

Keragaman Genetik Genotipe Porang di Sulawesi Selatan Berdasarkan Penanda Molekuler RAPD

Genetic Diversity of Porang Genotypes in South Sulawesi Based on RAPD Molecular Markers

Muh. Dzulkifly Ashan^{1*}, Muh Aswad Ashan², Agussalim³, Hidayati Nurkhasanah⁴

¹ Program Studi Teknologi Produksi Tanaman Hortikultura, Jurusan Teknologi Produksi Pertanian, Politeknik Pertanian Negeri Pangkajene Kepulauan, Pangkajene dan kepulauan, 90655

² Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Sekolah Pascasarjana, IPB University, Bogor, 16680

³ Agricultural Instrument Standardization Agency, Ministry of Agriculture, Manado 95000

⁴ Cereal Crops Agricultural Instrument Standardization Board, Ministry of Agriculture, Maros, 90513

*Corresponden Author Email: ashankifly@gmail.com

ABSTRAK

Keragaman genetik tanaman Porang (*Amorphophallus muelleri* Blume) saat ini menjadi objek kajian untuk melihat kandungan glukomanan karena tingginya peminat untuk dimanfaatkan sebagai zat tambahan yang mampu mengentalkan unsur cair dalam bahan makanan. Beberapa kawasan agroforestri di Sulawesi Selatan diketahui memiliki berbagai jenis spesies porang dengan kandungan glukomanan yang berbeda. Diketahui bahwa daerah sebaran porang terdapat di tiga Kabupaten yaitu Kabupaten Maros, Kabupaten Bulukumba dan Kabupaten Bantaeng. Penelitian ini merujuk pengambilan sampel ketiga lokasi tersebut dan dilakukan analisis laboratorium di Laboratorium Biologi Molekuler Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor, Jawa Barat. Penelitian berlangsung pada Bulan April sampai Juni 2023. Metode pengujian digunakan berbasis genetik dengan pengujian DNA secara kuantitatif dan kualitatif, dianalisis secara Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS) dengan metode Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested Clustering (SAHN). Ukuran derajat jarak kemiripan genetik tanaman porang ditetapkan berdasarkan koefisien kemiripan (similarity coefficient) dengan menggunakan metode Group Average Clustering. Hasil data ditampilkan pohon filogenetik yang membentuk empat kelompok berdasarkan 10 penanda molekuler RAPD berdasarkan nilai koefisien kemiripannya adalah 0,61. Berdasarkan hal tersebut diperoleh hubungan kekerabatan tanaman porang terdekat adalah MR3, BL3, BT3, MR4, BL4, BT4, MR5, BT5, BL6, BT6, dan BL9, kemudian BL8, dan BT8. Selanjutnya penelitian ini penting dilanjutkan untuk mendapatkan karakter morfologi dan fisiologi tanaman porang di tiga kabupaten ini.

Keyword : Porang, penanda, molekuler, RAPD, keragaman.

ABSTRACT

The genetic diversity of the Porang plant (*Amorphophallus muelleri* Blume) is currently the object of study to see the glucomannan content due to the high demand to be used as an additive that can thicken liquid elements in food ingredients. Some agroforestry areas in South Sulawesi are known to have various types of porang species with different glucomannan content. It is known that porang distribution areas are found in three districts, namely Maros Regency, Bulukumba Regency and Bantaeng Regency. This study refers to the sampling of the three locations and laboratory analysis at the Molecular Biology Laboratory of the Center for Research and Development of Biotechnology and Agricultural Genetic Resources, Bogor, West Java. The research took place from April to June 2023. The test method used was genetic-based with quantitative and qualitative DNA testing, analyzed by the Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS) with the Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested Clustering (SAHN) method. A measure of the degree of genetic similarity distance of porang plants is determined based on the similarity coefficient using the Group Average Clustering method. The data results show a phylogenetic tree that forms five clusters based on 10 RAPD molecular markers based on the similarity coefficient value is 0.61. Based on the result, the closest porang plant relationship is MR3, BL3, BT3, MR4, BL4, BT4, MR5, BT5, BL6, BT6, and BL9, then BL8, and BT8. Furthermore, it's important to continue this research to obtain morphological and physiological characters of porang plants in these three districts

Keyword : Porang, Marker, Molecular, RAPD, Diversity

PENDAHULUAN

Porang merupakan satu dari 170 jenis jenis *Amorphallus* yang ada di Indonesia dan di kenal di dunia. Porang jenis ini merupakan tanaman sumber karbohidrat alternatif yang mengandung glukomanan tertinggi diantara jenis *Amorphophallus* lainnya di Indonesia (Nikmah *et al.*, 2016). Porang pertama kali tercatat di Kepulauan Andaman di India. Kemudian tersebar ke timur melalui Myanmar dan ke Thailand menuju Indonesia (Sari dan Suhartati, 2015). Di Indonesia, Porang tumbuh liar dan dibudidayakan di Sumatera, Madura, Bali, Nusa Tenggara Barat (NTB), Sulawesi dan sebagian besar tersebar di Jawa (Rofik *et al.*, 2017). Adapun persebaran Porang di wilayah Jawa Timur meliputi Kabupaten Nganjuk, Madiun, dan Bojonegoro di sepanjang kawasan agroforestri (Aisah *et al.*, 2017). Namun hasil identifikasi agroforestri menunjukkan hutan di negara berkembang belum dimanfaatkan secara optimal termasuk tanaman Porang yang tumbuh liar di hutan (Rahayuningsih, 2020).

Porang (*Amorphophallus muelleri* Blume) merupakan tanaman liar di hutan, namun karena tingginya permintaan umbi tanaman Porang karena sangat populer terutama di Jepang, maka tanaman ini banyak dibudidayakan (Hidayah *et al.*, 2018). Produksi umbi porang di Indonesia Tahun 2020 mencapai 142.000 ton, dan 89,65% diolah menjadi chip porang untuk ekspor. Sampai saat ini Porang telah diekspor dalam bentuk yang telah dikeringkan. Umbi Porang banyak mengandung glukomanan yang digunakan pada makanan tradisional di Asia misalnya mie, tofu, dan jelly (Setyono *et al.*, 2021). Kadar glukomanan tertinggi di daerah Sulawesi Selatan berada di Kabupaten Sinjai dengan kadar 24,13%. Selanjutnya disusul kabupaten Gowa yaitu 19.5128%, Kabupaten Bulukumba yaitu 18.7902% dan Kabupaten Maros yaitu 18.0169%. Kadar glukomanan dengan nilai tersebut masih rendah dan belum mencapai mutu Standar Nasional Indonesia yaitu lebih dari 25% kadar glukomanan dalam umbi porang (Masniawati *et al.*, 2023).

Amorphophallus muelleri Blume adalah spesies unggulan dari keluarga *Amorphophallus*, tergolong sama dengan subspecies *Amorphophallus bulbifer* dan *Amorphophallus yuloensis*. Diantara ketiga spesies tersebut, hanya *Amorphophallus muelleri* Blume yang memiliki jumlah kromosom $2n = 26$, yang dapat dihibridisasi dengan *Amorphophallus konjac* dan *Amorphophallus albus*. *Amorphophallus muelleri* Blume memiliki ketahanan penyakit, cenderung toleransi suhu tinggi, dan kandungan Konjac Glucomannan (KGM) tinggi. Oleh karena itu, *Amorphophallus muelleri* Blume merupakan sumber plasma nutfah yang penting untuk perbaikan genetik *Amorphophallus konjac* dan *Amorphophallus albus* (Zhao *et al.*, 2020).

Plasma nutfah Porang memiliki keragaman genetik yang tinggi, tentu berpotensi untuk pengembangan dan peningkatan manfaat tanaman Porang melalui program pemuliaan tanaman. Salah satu potensinya dapat dianalisis hubungan kekerabatan berdasarkan penanda molekuler. Hubungan kekerabatan plasma nutfah sangat penting bagi para pemulia karena dapat menjadi dasar perakitan individu baru yang memiliki karakter unggul melalui proses hibridisasi dimasa yang akan datang (Saleh *et al.*, 2015). Hubungan kekerabatan dapat diidentifikasi secara singkat berdasarkan ukuran gen dalam suatu lokus/kromosom, dengan asumsi bahwa karakter yang berbeda disebabkan oleh adanya perbedaan susunan genetik (Mollah *et al.*, 2022). Secara morfologi, penanda telah digunakan secara luas, tetapi umumnya dipengaruhi oleh lingkungan, sehingga sulit untuk mengamati perbedaan antara spesies yang berkerabat dekat. Oleh karena itu, penanda molekuler berbasis RAPD menjadi alternatif dalam memecahkan permasalahan karakterisasi genotipe Porang (Nikmah *et al.*, 2016).

Penanda molekuler RAPD digunakan dikarenakan tanaman Porang masih pada tahap awal karakterisasi ataupun klasifikasi akibat belum tersedianya pangkalan pusat data tanaman Porang (Primer spesifik), metode ini tidak memerlukan pengetahuan tentang latar belakang genom yang dianalisis, dan

primer yang diperlukan sudah banyak dikomersialisasikan sehingga mudah diperoleh (Novita et al., 2014). Hasil penelitian dengan penanda RAPD digunakan pada variasi delapan varian pigmen warna pada tumbuhan misalnya kadar klorofil, β -karoten dan senyawa antosianin. hasil amplifikasi RAPD menggunakan primer OPA-11, OPC-04, OPU-06, OPC-07 dan OPN-18E menghasilkan pita polimorfik secara berturut-turut yakni 13 pita (250-1000 bp), 14 pita (250-2500 bp), 17 pita (250-2500 bp), 8 pita (250-1500 bp), dan 7 pita (250-1500 bp). Jumlah pita polimorfik tertinggi (17 pita) terdapat pada primer OPU-06, sedangkan jumlah terendah (7 pita) terdapat pada primer OPN-18E. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat kelompok yang memiliki hubungan kekerabatan berdasarkan variasi glukomanan (Porang Research Center, 2023). Penelitian tersebut berkenaan pula dengan kegiatan pengelompokkan berdasarkan kedekatannya dengan penanda genetik.

Berdasarkan uraian permasalahan diatas, maka perlu dilakukan Karakterisasi Genotipe Porang Sulawesi Selatan berdasarkan Penanda Molekuler RAPD sehingga hasil penelitian ini dapat dimanfaatkan untuk mengkarakterisasi dan mengelompokkan jenis-jenis porang pada beberapa wilayah ke dalam satu grup berdasarkan tingkat kemiripan secara genetik.

METODE

Tempat dan Waktu

Sampel penelitian dikumpulkan dan dieksplorasi dari habitat tumbuh liar Porang pada kawasan agroforestri yang ada di Sulawesi Selatan yakni Kabupaten Maros, Kabupaten Bulukumba, dan Kabupaten Bantaeng. Analisis molekuler dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. Penelitian berlangsung selama tiga bulan yaitu pada bulan April hingga Juni 2023.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah meteran, gunting, cutter, linggis, cangkul, sekop kecil, ember, penggerus (mortar, blue pestle, gotri/magnetic bead), tabung mikro steril ukuran 2 dan 1,5 mL, pipet mikro (10 μ L, 100-200 μ L dan 1000 μ L), sudip, tips ukuran (10 μ L, 100-200 μ L, 1000 μ L), rak tabung, vortex, waterbath, sentrifuse, fume hood/lemari asam, lemari pendingin/kulkas, tabung PCR (250 μ L), tip pipet (ukuran 10 μ L, 100-200 μ L dan 1000 μ L), tabung mikro 1,5 mL, pipet 10 (ukuran 10 μ L, 100-200 μ L dan 1000 μ L), pipet Multichannel 8 atau 12 channel (bila ada, sesuai kebutuhan), sentrifugasi, Thermal Cycle T-100 (BIORAD), erlemeyer, perlengkapan elektroforesis gel agarose (cetakan dan tangka elektroforesis), wadah plastik untuk pewarnaan DNA, UV Tray, Gel DOC EZ Imager (BIORAD), nanodrop spektrofotometer 2000, Software NTSYS-pc Versi 2.02i.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 sampel Porang masing-masing 10 sampel tiap lokasi (Tabel 1), 10 primer RAPD yakni OPA-02 (TGCCGAGCTG), OPA-03 (AGTCAGCCAC), OPA-09 (GGGTAACGCC), OPA-13 (CAGCACCCAC), OPA-14 (TCTGTGCTGG), OPC-08 (TGGACCGGTG), OPC-11 (AAAGCTGCGG), OPC-14 (TGCGTGCTTG), OPD-10 (GGTCTACACC), dan OPE-03 (CCAGATGCAC), silika gel, nitrogen cair, buffer ekstraksi (2% (w/v) CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide), 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA dan 1,4 mM NaCl), 2% (w/v) PVP (Polyvinyl purrolidone), 0,38% (w/v) natrium disulfit, chloroform : isoamyl alcohol (24:1), isopropanol/etanol absolut dingin, etanol 70% dingin, 3M Natrium asetat pH 5,2, RNase A (10 ng/ μ L), Gel agarose, lambda DNA (100 ng/ μ L, 200 ng/ μ L, dan 50 ng/ μ L), 0,5 X TBE (*Tris-buffer EDTA*), *loading dye*, *Etidium Bromide* (Pewarna DNA), 100 bp Ladder DNA, Es, ddH₂O (Nuclease Free Water), Kit PCR (Buffer PCR 10X, MgCl₂, dNTPs, Primer, Tag DNA *polymerase* atau kit PCR *Ready Mix*, dan DNA template

Pelaksanaan Penelitian

Pengambilan sampel

Penelitian ini menggunakan sampel daun Porang yang diambil dari beberapa kawasan agroforestri di Sulawesi Selatan yaitu Kabupaten Maros (Lingkungan Malisu Kelurahan Cempa Niga Kecamatan Camba dengan ketinggian 400 m), Kabupaten Bulukumba (Desa Balang Pesoan Kecamatan Bulukumpa), dan Kabupaten Bantaeng (Dusun Borong Ganjeng, Desa Bonto Macini, Kecamatan Sinoa ketinggian 486 mdpl). Luasan area pada pengambilan sampel sebesar 10.000 m². Teknik pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah simple random sampling yaitu cara pengambilan sampel dari anggota populasi tanpa memperhatikan tingkatan dalam anggota populasi tersebut. Pola pengambilan sampel dilakukan dengan pola diagonal. Setiap memasuki kawasan agroforestri dan saat pengambilan sampel, didokumentasikan menggunakan aplikasi kamera yang telah didukung fitur koordinat. Sampel daun yang digunakan adalah daun yang masih muda dan sehat. Daun muda yang telah diambil kemudian disimpan dalam plastik kedap udara yang telah diberi label sampel dan silika gel.

Ekstraksi Porang

Ekstraksi DNA menggunakan metode Ashan *et al.*, (2020) yang telah dimodifikasi. Sampel daun diekstraksi menggunakan nitrogen cair dan digerus menggunakan mortar. Penambahan 1000 µl buffer ekstraksi (2% (w/v) CTAB atau Cetyl trimethylammonium bromide, 100 mM Tris HCl pH 8,0, 20 mM EDTA, 1,4 mM NaCl) pada sampel daun menggunakan tube berukuran 2 ml. Inkubasi sampel pada water bath suhu 65°C selama 5 menit agar terjadi homogenisasi. Penambahan 800 µl chloroform: Isoamylalcohol (24:1). Sampel disentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit (20°C). Supernatan dipindahkan pada tabung baru sebanyak 600 µl. Penambahan larutan 3M Natrium asetat pH 5.2 sebanyak 1/10 x volume supernatan. Sedangkan penambahan larutan isopropanol dingin sebanyak 1 x volume supernatan. Inkubasi sampel pada suhu -20°C selama 60 menit untuk mengendapkan DNA. Selanjutnya, disentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm (10°C) selama 10 menit. Apabila pelet telah terbentuk di dasar tube, selanjutnya supernatan dibuang dan pelet yang tersisa didasar tube dibilas menggunakan 500 µl ethanol 70% dingin. Sampel kemudian di-sentrifuse pada 12.000 rpm (10°C) selama 5 menit. Supernatan kembali dibuang dan pelet yang terbentuk kemudian dikeringanginkan pada suhu ruang selama semalaman. Selanjutnya pelet DNA dilarutkan menggunakan 100 µL larutan 1 x TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0 dan 1 mM EDTA) dan inkubasi selama 10 menit pada suhu 65°C. Penambahan enzim RNase (10 ng/µl) sebanyak 2 µl, sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Sampel DNA selanjutnya dapat diuji kuantitas maupun kualitasnya, jika larutan stok masih kotor, dilakukan tahap purifikasi DNA sebelum disimpan pada suhu -20°C.

Purifikasi DNA Porang

Proses purifikasi menggunakan larutan chloroform: isoamyl alcohol (24:1) sebanyak 600 ml yang disentrifuse pada 12.000 rpm selama 25 menit. Sampel DNA pada tube baru ukuran 1,5 ml. Penambahan 3 M Natrium asetat (NaOAc) sebanyak 50 µl dan 600 µl isopropanol dingin. DNA dihomogenkan hingga terlihat benang-benang DNA hasil isolasi. Hasil tersebut diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit dan di sentrifuse larutan DNA pada 13.000 rpm selama 10 menit. Penambahan 400 ml etanol 70% dan disentrifuse pada 13.500 rpm selama 10 menit agar homogen. Hasil pelet DNA dikeringkan pada suhu ruang semalaman.

Uji kualitas, Kuantitas dan Pengenceran DNA dengan Spektrofotometer

Pengukuran DNA secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan nanodrop spektrofotometer dengan perbandingan absorbansi pada $\lambda 260/ \lambda 280$ (Hikmatyar *et al.*, 2015). Prinsip kerja nanodrop

spektrofotometer ialah DNA murni mampu menyerap cahaya ultraviolet karena adanya basa purin dan pirimidin (Permata *et al.*, 2014). DNA berkualitas baik berdasarkan uji nanodrop memiliki kemurnian 1,8-2,0 dan konsentrasi di atas 100 ng/μl (Hikmatyar *et al.*, 2015). Uji kuantitatif dilakukan dengan absorbansi pada Panjang gelombang 260 nm menggunakan spektrofotometer (Novita *et al.*, 2014). Konsentrasi DNA ditentukan dengan persamaan: $[DNA] = A_{260} \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$. (A_{260} : absorbansi pada pajang gelombang 260 nm; 50: larutan dengan nilai absorbansi 1,0 sebanding dengan 50 μg untai ganda DNA). Untuk DNA stok dilakukan pengenceran hingga mendapatkan konsentrasi larutan pengenceran berkisar 2-5 ng/ μl yang digunakan sebagai larutan pengujian PCR.

Amplifikasi DNA Porang dengan Thermal Cycle T-100 (BIORAD)

Amplifikasi PCR diawali dengan membuat larutan PCR Kit dengan volume akhir untuk 20 sampel sebagai berikut: Primer: 0,8 μl x 20 sampel=16 μl, ddH₂O: 12,32 μl x Jumlah Sampel=246 μl, Buffer: 4 μl x Jumlah Sampel=80 μl, Enzim: 0,16 μl x Jumlah Sampel=3,5 μl. Pembuatan larutan pereaksi PCR dilakukan diatas cooler box. Konsentrasi akhir total DNA diperkirakan sebesar 20 μl sesuai program PCR yang telah dibuat. Reaksi PCR dengan menggunakan Thermal Cycle T-100 (BIORAD) selama 45 siklus. Pra-PCR pada suhu 94°C selama 5 menit, kemudian diikuti oleh 45 siklus yang terdiri atas denaturasi 1 menit pada suhu 94°C, penempelan primer 1 menit pada suhu 36°C, dan 2 menit pemanjangan pada suhu 72°C. Setelah 45 siklus selesai, kemudian diikuti pasca-PCR 4 menit pada suhu 72°C dan pendinginan pada suhu 4°C selama 30 menit (Probojati *et al.*, 2019).

Visualisasi produk PCR dengan Elektroforesis gel agarosa 1%

Penyiapan gel agarose 1 % (volume 500 ml): sebanyak 1/100 gel agarose x 500 ml sehingga didapatkan 0,5 g. Agarose dilarutkan dengan larutan 0,5 X TBE menggunakan microwave. Gel yang telah polimerisasi sempurna dan membeku diletakkan di tangki elektroforesis. Penambahan produk PCR sebanyak 5 μl dimulai pada sumur ke-2 sampai selesai. Sumur ke-1 ditambahkan ladder ukuran 100 bp sebanyak 2 μl. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 80V selama 50 menit. Pewarnaan DNA menggunakan larutan Ethidium Bromide (EtBr) selama 10 menit, sedangkan perendaman gel dalam aquades selama 5-10 menit. Selanjutnya, gel diletakkan diatas wadah Gel Doc yang siap disinari UV dan didokumentasikan menggunakan kamera.

Analisis Data Molekuler

Skoring lokus dilakukan menggunakan software Genetik Analyzer 2010 maupun secara manual. Setiap pita dianggap sebagai satu lokus sehingga pita yang sama dari contoh tanaman diinterpretasikan sebagai satu lokus yang homolog. Lokus tersebut diubah ke dalam bentuk data biner dengan memberi nilai satu (1) untuk yang memiliki pita dan nilai nol (0) untuk yang tidak memiliki pita. Skoring data biner dilakukan pada sheet Microsoft Excel.

Data yang diperoleh dari hasil skoring elektroforesis pada RAPD berupa data biner, selanjutnya dilakukan analisis gerombol (cluster analysis) dengan teknik berhierarki yang ada dalam program Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System versi 2.02i (NTSYS) metode Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested Clustering (SAHN). Ukuran derajat jarak kemiripan genetik tanaman jarak pagar yang diamati berdasarkan koefisien kemiripan (similarity coefficient) atau jarak genetik (genetic distance) dengan menggunakan metode Group Average Clustering, dalam program NTSYS dipilih metode Unweight Pair Group Method Arithmetic (UPGMA). Estimasi kemiripan genetik diperoleh berdasarkan jumlah pita yang dimiliki bersama. Pengelompokan data matriks dan pembuatan dendrogram dilakukan dengan metode UPGMA, fungsi Similarity Qualitative (SIMQUAL) (Jamshidi dan Jamshidi, 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Purifikasi DNA Porang

Nilai kemurnian DNA diperoleh menggunakan metode spektrofotometer pada rasio absorbansi $\lambda 260/\lambda 280$ dan nilai konsentrasi DNA. DNA berkualitas baik memiliki kemurnian 1,8-2,0 (Mollah *et al.*, 2022). Berikut ini disajikan hasil pengukuran uji kualitas dan kuantitas DNA Porang setelah dipurifikasi pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Kuantitas DNA Stok Porang Setelah Purifikasi

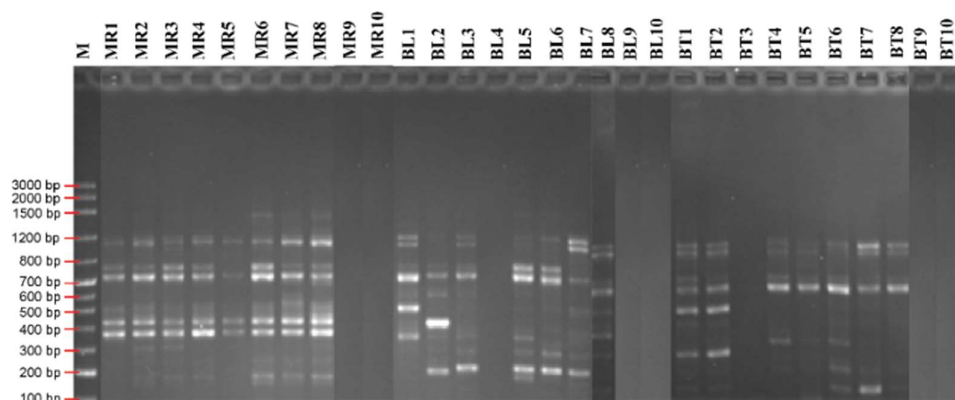
No	Sampel	Konsentrasi (ng/ μ L)	$\lambda 260/\lambda 280$	No	Sampel	Konsentrasi (ng/ μ L)	$\lambda 260/\lambda 280$
1	MR1	271,5	1,11	16	BL6	326,2	1,62
2	MR2	161,2	1,6	17	BL7	47,3	1,34
3	MR3	276	1,66	18	BL8	389,8	1,57
4	MR4	460,5	1,53	19	BL9	369,6	1,57
5	MR5	255	1,86	20	BL10	348,9	1,42
6	MR6	328,6	1,86	21	BT1	1162	1,21
7	MR7	204	1,84	22	BT2	189,3	1,3
8	MR8	156,7	1,94	23	BT3	91,9	1,37
9	MR9	137	1,86	24	BT4	417,1	1,21
10	MR10	117,1	1,91	25	BT5	304,5	1,38
11	BL1	351,3	1,42	26	BT6	374,4	1,45
12	BL2	710	1,39	27	BT7	103,4	1,47
13	BL3	585,5	1,22	28	BT8	336,1	1,51
14	BL4	853,1	1,3	29	BT9	184,6	1,51
15	BL5	213,1	1,33	30	BT10	516,1	1,29

Keterangan: MR: Maros, BL: Bulukumba, dan BT: Bantaeng; $\lambda 260/\lambda 280$: Panjang gelombang menunjukkan kemurnian DNA (Sumber: Data Primer, 2023).

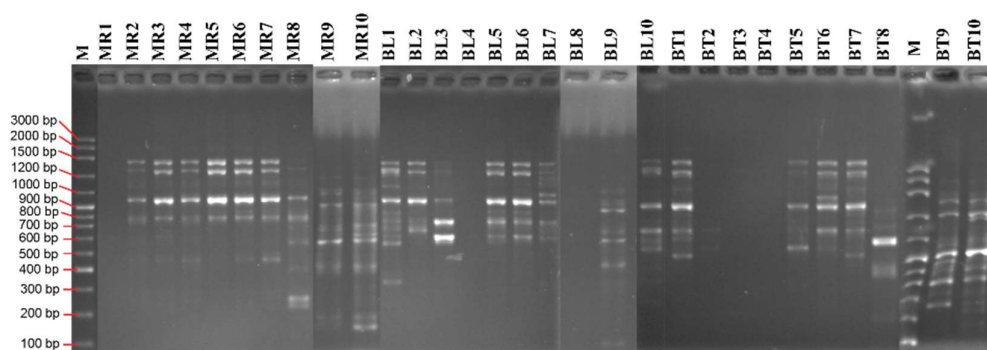
Hasil pengujian terhadap seluruh sampel, diperoleh rasio absorbansi $\lambda 260/\lambda 280$ yang beragam yakni berkisar antara 1,11 – 1,94 (Tabel 1). Nilai di bawah 1,8 menunjukkan kontaminan protein dan polisakarida yang tinggi. Sebaliknya, nilai yang lebih dari 2 “dua” menunjukkan kontaminan RNA yang cukup tinggi pada hasil isolasi (Tarigan, 2016). Keberadaan kontaminan menyebabkan serapan panjang gelombang 280 nm meningkat, sehingga rasio absorbansi semakin rendah yang mengakibatkan nilai absorbansi berada dibawah angka yang telah ditetapkan (Mollah *et al.*, 2022).

Amplifikasi DNA dengan Primer RAPD

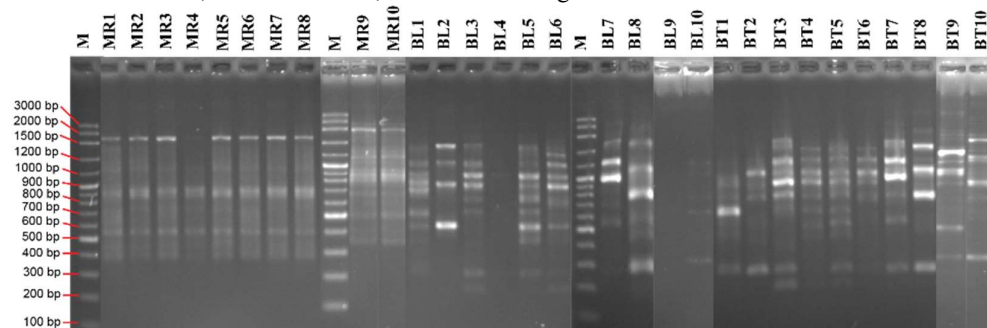
Amplifikasi RAPD menggunakan 10 primer RAPD yaitu: OPC-11, OPC-14, OPA-14, OPA-09, OPA-13, OPC-08, OPA-03, OPA-02, OPD-10, dan OPE-03. Seluruh primer menunjukkan visualisasi yang sangat baik, dimana tiga diantaranya yaitu primer OPC-11 (Gambar 1), primer OPA-9 (Gambar 2) dan primer OPA-14 (Gambar 3).



Gambar 1. Elektroforegram Amplifikasi DNA Porang dengan OPC-11, ket; M: marker ladder 100 bp, MR: Maros, BL: Bulukumba, dan BT: Bantaeng.



Gambar 2. Elektroforegram Amplifikasi DNA Porang dengan OPA-09, ket; M: marker ladder 100 bp, MR: Maros, BL: Bulukumba, dan BT: Bantaeng.



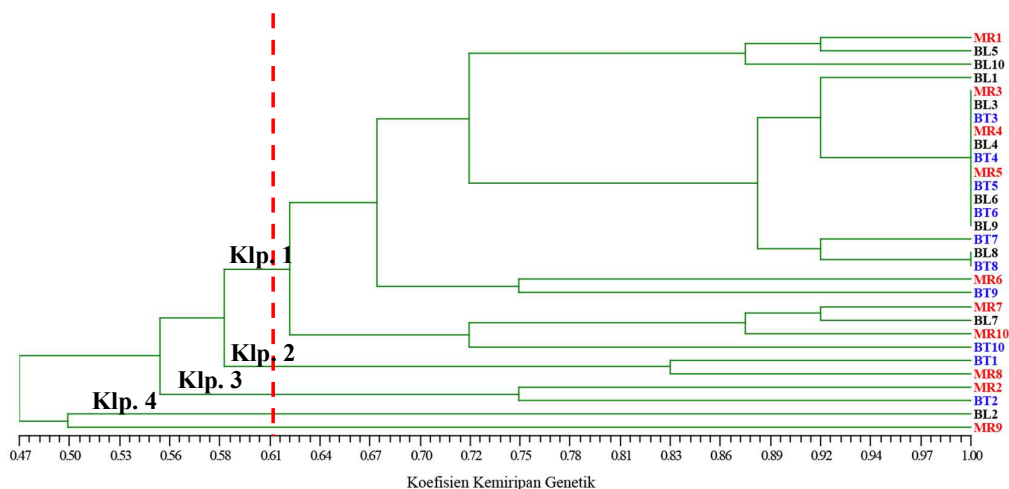
Gambar 3. Elektroforegram Amplifikasi DNA Porang dengan OPA-14, ket; M: marker ladder 100 bp, MR: Maros, BL: Bulukumba, dan BT: Bantaeng.

Identifikasi pita polimorfik dilakukan berdasarkan konsistensi kemunculan pita DNA, ketebalan pita DNA, ukuran pita DNA dan segregasi pada pita DNA (Adriansyah *et al.*, 2018). Berdasarkan hasil amplifikasi 10 primer, terdapat tingkat persentase polimorfik, persentase tertinggi pada OPA-14 (100%), OPA-02 (78%), dan OPC-08 (67,7%). Sedangkan persentase polimorfik terendah pada OPC-11 (49%). Pita polimorfik tersebut tersebar pada rentang 100 bp hingga 1500 bp. Hasil penelitian pada analisis RAPD untuk mendeteksi variabilitas genetik kedelai mutan menunjukkan 11 primer menghasilkan 100% pita polimorfik, diantaranya OPA-02, OPA-07, OPA-10, OPA-11, OPA-12, OPA-13, OPA-14,

OPA-15, OPA-16, OPA-18 dan OPA-20 (Wahyudi *et al.*, 2020). Selain itu, hasil penelitian tanaman pisang raja menunjukkan bahwa dari 12 primer RAPD yang teramplifikasi pada 13 kultivar dengan jumlah pita polimorfik sebanyak 115 pita dari 121 pita (ukuran 100 bp hingga 1500 bp), jumlah pita terbanyak dihasilkan dari primer OPA-02, OPA-4 dan OPA-17 (Probojati *et al.*, 2019).

Hubungan Kekerabatan Tanaman Porang Berdasarkan Penanda Molekuler RAPD

Analisis hubungan kekerabatan terhadap tanaman Porang berdasarkan penanda molekuler RAPD dilakukan dengan analisis hubungan kekerabatan berdasarkan pola pita DNA menggunakan software NTSYS-pc Versi 2.02i (Gambar 4).



Gambar 4. Pohon filogenetik kekerabatan 30 Tanaman Porang (*Amorphophallus muelleri* Blume) Berdasarkan Penanda Molekuler RAPD Pada Software NTSYS-pc Versi 2.02i, ket; MR: Maros, BL: Bulukumba, dan BT: Bantaeng.

Analisis kekerabatan pada 30 sampel tanaman Porang berdasarkan penanda molekuler RAPD memiliki tingkat kemiripan koefisien 0,50 – 1,00. Pada hasil tingkat koefisien kemiripan, tanaman Porang dikelompokkan menjadi empat kelompok. Pada kelompok I terdiri dari 24 tanaman yaitu MR1, BL5, BL10, BL1, MR3, BL3, BT3, MR4, BL4, BT4, MR5, BT5, BL6, BT6, BL9, BT7, BL8, BT8, MR6, BT9, MR7, BL7, MR10, BT10. Sampel MR3, BL3, BT3, MR4, BL4, BT4, MR5, BT5, BL6, BT6, dan BL9 yang memiliki tingkat koefisien kemiripan sebesar 1,00. Begitu pula BL8 dengan BT8. Kelompok dua terdiri dari dua tanaman yaitu BT1 dan MR8 dengan kemiripan 0,83. Kelompok 3 terdiri dari dua sampel yaitu MR2 dan BT2 dengan kemiripan 0,75. Kelompok 4 terdiri dari satu sampel yaitu BL2 dan MR9 dengan kemiripan 0,50. Tingkat koefisien kemiripan MR1, BL5, BL10, BL1, BT7, MR6, BT9, MR7, BL7, MR10, BT10, BT1, MR8, MR2, dan BT2 antara 0,55 - 0,92.

Berdasarkan penanda molekuler RAPD, hasil amplifikasi DNA dengan 10 primer sangat dipengaruhi oleh situs perlekatan primer pada cetakan DNA. Sebaran situs penempelan primer pada DNA menyebabkan satu pita DNA diamplifikasi dalam jumlah banyak. Primer RAPD dimungkinkan untuk perlekatan primer secara acak (Probojati *et al.*, 2019). Pemilihan primer pada analisis keragaman genetik berpengaruh terhadap polimorfisme pita yang dihasilkan, karena setiap primer memiliki situs penempelan tersendiri (Rahman *et al.*, 2017). Oleh karena itu, pita DNA polimorfik yang dihasilkan setiap primer menjadi berbeda, baik dalam ukuran banyaknya pasang basa maupun jumlah pita DNA

(Poerba dan Ahmad, 2013). Selain itu, hasil akurasi dalam pengelompokkan kultivar pisang dengan genom yang sama, dipengaruhi oleh pita DNA polimorfik yang dihasilkan oleh setiap primer berbeda dalam amplifikasi, baik dalam ukuran jumlah pasangan basa maupun jumlah pita DNA (Probojati *et al.*, 2019).

KESIMPULAN

Hubungan keragaman genetik tanaman Porang dapat diklasifikasi menjadi empat kelompok. Kelompok I terdiri dari 24 tanaman yaitu MR1, BL5, BL10, BL1, MR3, BL3, BT3, MR4, BL4, BT4, MR5, BT5, BL6, BT6, dan BL9, BT17, BL8, BT8, MR6, BT9, MR7, BL7, MR10, BT10. Kelompok dua terdiri dari dua tanaman yaitu BT1 dan MR8 dengan kemiripan 0,83. Kelompok 3 terdiri dari dua sampel yaitu MR2 dan BT2 dengan kemiripan 0,75. Kelompok 4 terdiri dari satu sampel yaitu BL2 dan MR9 dengan kemiripan 0,50. Sampel MR3, BL3, BT3, MR4, BL4, BT4, MR5, BT5, BL6, BT6, dan BL9 yang memiliki tingkat koefisien kemiripan sebesar 1,00. Begitu pula BL8 dengan BT8

DAFTAR PUSTAKA

- Adriansyah, F., Hanum, L., Muharni, M., & Windusari, Y. (2018). Analisis Polimorfisme Padi Varietas Lokal Sumatera Selatan Berdasarkan Pendekatan PCR-RAPD. *J. Lahan Suboptimal*, 7(1), 50–58.
- Aisah, B. N., Soegianto, A., & Basuki, N. (2017). Identifikasi Morfologi dan Hubungan Kekerabatan Tanaman Porang (*Amorphophallus muelleri* Blume) di Kabupaten Nganjuk, Madiun, dan Bojonegoro. *Jurnal Produksi Tanaman*, 5(6), 1035–1043. <http://protan.studentjournal.ub.ac.id/index.php/protan/article/view/475>
- Ashan, M. D., Miftahudin, Reflinur, Pabendon, M. B., Santoso, S. B., & Salim, A. (2020). Qtl mapping linked to downy mildew resistance genes in Maize (*Zea mays*). *Biodiversitas*, 21(8), 3735–3743. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210841>
- Hidayah, N., Suhartanto, M. R., & Santosa, E. (2018). Pertumbuhan dan Produksi Benih Iles-iles (*Amorphophallus muelleri* Blume) Asal Teknik Budi Daya yang Berbeda. *Buletin Agrohorti*, 6(3), 405–411. <https://doi.org/10.29244/agrob.v6i3.21109>
- Hikmatyar, M. F., Royani, J. I., & Dasumiati. (2015). Isolasi dan amplifikasi DNA Keladi Tikus (*Thyponium flagelliform*) untuk identifikasi keragaman geentik. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBi)*, 2(2), 42. <https://doi.org/10.29122/jbbi.v2i2.507>
- Jamshidi, S., & Jamshidi, S. (2011). NTSYSpc 2.02e Implementation in Molecular Biodata Analysis (Clustering, Screening, and Individual Selection). *International Conference on Environmental and Computer Science, January 2011*, 165–169. <https://www.researchgate.net/publication/268270321>
- Masniawati, A., Johannes, E., Magfira, & Tuwo, M. (2023). Analisis Glukomanan Umbi Porang (*Amorphophallus Muelleri* Blume) dari Beberapa Daerah di Sulawesi Selatan. *Ilmu Alam Dan Lingkungan*, 14(2), 1–10. <http://journal.unhas.ac.id>
- Mollah, A., Ashan, M. A., & Khatimah, A. H. (2022). Uji Kualitas dan Kuantitas DNA Porang (*Amorphophallus Muelleri* Blume) pada Beberapa Kawasan di Sulawesi Selatan. *Jurnal Agritechno*, 15(01), 1–7. <https://doi.org/10.20956/at.v15i1.688>
- Nikmah, I. A., Azrianingsih, R., & Wahyudi, D. (2016). Genetic Diversity of Porang Populations (*Amorphophallus Muelleri* Blume) In Central Java and West Java Based on LEAFY Second Intron Marker. *Journal of Tropical Life Science*, 6(1), 23–27. <https://doi.org/10.11594/jtls.06.01.05>
- Novita, L., Haska, N., Surahman, M., & Wahyu, Y. (2014). Pendugaan Parameter Genetik Karakter Morfo-Agronomi dan Seleksi Genotipe untuk Perbaikan Genetik Jarak Pagar. *J. Agron. Indonesia*, 42(3), 236–243. <https://journal.ipb.ac.id/index.php/jurnalagronomi/article/download/9181/7223/>
- Permata, R., Riniatsih, I., & Radjasa, O. K. (2014). Potensi pigmen karotenoid bakteri endofit lamun *Thalassia hemprichii* sebagai sumber senyawa alami penangkal radikal bebas DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil). *Journal of Marine Research*, 3(3), 294–303. <http://ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/jmr/article/view/6001>

- Poerba, Y. S., & Ahmad, F. (2013). Analisis keragaman genetik *Musa balbisiana* colla berdasarkan marka RAPD dan ISSR* [Genetic variation analyses of *Musa balbisiana* Colla based on RAPD and ISSR markers]. *Berita Biologi*, 12(2), 259–267.
- Porang Research Center. (2023). *Variasi kandungan glukomanan dan hubungan kekerabatan menggunakan penanda RAPD pada berbagai varian Amorphophallus variabilis blume asal Tuban*. Pusat Penelitian Dan Pengembangan Porang Indonesia. <https://porang.ub.ac.id/media.php?module=detailjurnal&judul=variasi-kandungan-glukomanan-dan-hubungan-kekerabatan-menggunakan-penanda-rapd-pada-berbagai-varian-amorphophallus-variabilis-blume-asal-tuban>
- Probojati, R. T., Wahyudi, D., & Hapsari, L. (2019). Clustering Analysis and Genome Inference of Pisang Raja Local Cultivars (*Musa* spp.) from Java Island by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Marker. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 4(2), 42–53. <https://doi.org/10.22146/jtbb.44047>
- Rahayuningsih, Y. (2020). Strategi Pengembangan Porang (*Amorphophallus Muelleri*) Di Provinsi Banten. *Jurnal Kebijakan Pembangunan Daerah*, 4(2), 77–92. <https://doi.org/10.37950/jkpd.v4i2.106>
- Rahman, M. O., Rahman, M. Z., Sony, S. K., & Islam, M. N. (2017). Genetic variation and molecular relationships among eight taxa of *Desmodium* desv. based on RAPD markers. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*, 24(2), 149–154. <https://doi.org/10.3329/bjpt.v24i2.35110>
- Rofik, K., Setiahadi, R., Puspitawati, I. R., & Lukito, M. (2017). Potensi Produksi Tanaman Porang (*Amorphophallus muelleri* Blume) di Kelompok tani MPSDH Wono Lestari Desa Padas Kecamatan Dagangan Kabupaten Madiun. *AGRI-TEK: Jurnal Ilmu Pertanian, Kehutanan Dan Agroteknologi*, 17(2), 53–65. <https://download.garuda.kemdikbud.go.id/article.php?article=970078&val=14929&title>
- Saleh, N., St.A., . Rahayuningsih, Radjit, B. S., Ginting, E., Harnowo, D., & Mejaya, I. M. J. (2015). *Tanaman Porang: Pengenalan, Budidaya, dan Pemanfaatannya* (A. Winarto (ed.); 1st ed.). Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. <https://repository.pertanian.go.id/server/api/core/bitstreams/cdc93535-5136-41a0-9734-52dcdfab548c/content>
- Sari, R., & Suhartati. (2015). Tumbuhan Porang: Prospek budidaya sebagai salah satu sistem agroforestry. *Info Teknis EBONI*, 12(2), 97–110.
- Setyono, R. N., Wasi', A., Rahmawati, Y., & Taufany, F. (2021). Pra-Desain Pabrik Konnyaku dari Tepung Glukomanan Umbi Porang (*Amorphophallus Oncophyllus*). *Jurnal Teknik ITS*, 10(2), 171–176. <https://doi.org/10.12962/j23373539.v10i2.69690>
- Tarigan, S. M. (2016). Penggunaan marka molekuler RAPD untuk identifikasi hibrida F1 Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq). *Jurnal Penelitian Pertanian BERNAS*, 12(2), 30–43.
- Wahyudi, D., Hapsari, L., & Sundari. (2020). RAPD Analysis for Genetic Variability Detection of Mutant Soybean (*Glycine max* (L.) Merr). *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 5(1), 68–77. <https://doi.org/10.22146/jtbb.53653>
- Zhao, C., She, X., Liu, E., Harijati, N., Cheng, T., Hu, Z., Jin, S., & Diao, Y. (2020). Screening of the candidate DNA barcodes for three important *amorphophallus* species identification. *Agronomy*, 10(9), 1–14. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091366>