

Analisis *Clustering* Varian *Amorphophallus muelleri* Blume yang Ditemukan di Jawa Timur Berdasarkan Marka Molekuler CslA Pengkode Mannan Synthase dengan Teknik PCR-RFLP

Novie Ary Priyanti ^{1)*}, Arik Arubil ¹⁾, Laras Estri Arumningtyas ²⁾, Rodiyati Azrianingsih ²⁾

¹⁾Program Studi Magister Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang

²⁾Dosen Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang

Diterima 16 Juli 2013, direvisi 19 September 2013

ABSTRAK

Amorphophallus muelleri Blume (Porang) merupakan tanaman yang banyak tersebar di wilayah Indonesia dan berpotensi sebagai bahan pangan alternatif karena memiliki kandungan glukomanan yang tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui *clustering* porang berdasarkan sekuen gen CslA pengkode glukomanan dengan menggunakan teknik PCR_RFLP. Tanaman porang didapat dari empat lokasi di Jawa Timur yaitu: (1) Madiun, (2) Nganjuk, (3) Blitar, dan (4) Jember dianalisis ciri morfologi dan molekulernya menggunakan primer AkCslA 680F dan AkCslA1288R serta sekuen gen nya dipotong menggunakan enzim restriksi *HaeIII*. Hasil analisis morfologinya didapatkan bahwa tanaman porang dapat dibedakan berdasarkan perbedaan corak tangkai daunnya. Varian (BlitarI, JemberI, dan MadiunI) memiliki corak tangkai daun prismatik besar, (Jember2 dan Nganjuk2) memiliki corak tangkai daun prismatik kecil. Analisis kandungan glukomanan didapatkan bahwa kandungan tertinggi dimiliki oleh varian Blitar2 sebesar 5,469% dan terendah Madiun2 sebesar 0,2312%. Hasil amplifikasi sekuen gen CslA menggunakan primer AkCslA 680 F dan AkCslA 1288R menunjukkan bahwa sekuen gen CslA teramplifikasi pada ukuran 200 bp. Pemotongan dengan enzim restriksi *HaeIII* menghasilkan dua pita monomorfik pada 100 bp dan 2000 bp, dan pita delapan pita polimorfik pada 100 bp sampai dengan 400 bp. Hasil analisis ini memperlihatkan bahwa tanaman porang memiliki keragaman yang tinggi. Hasil analisis *clustering* antar varian berdasarkan data molekulernya menunjukkan pengelompokan menjadi tiga cluster yang terdiri dari : *cluster* I (varian JemberI, BlitarI, dan MadiunI), *cluster* II (varian Jember2, Nganjuk2, dan Nganjuk I), dan *cluster* III (varian Blitar2). Jarak genetik terdekat antar varian JemberI dengan BlitarI, sedangkan jarak terjauh pada varian Blitar2.

Kata kunci : *Amorphophallus muelleri* Blume, Porang, PCR-RFLP, *Clustering*

ABSTRACT

Amorphophallus muelleri Blume is a ubiquitous plant found all over Indonesia and has the potential to be food substitute due to its high glucose content. This research was conducted to investigate the porang's clustering based on CslA gene glucose coding by using PCR-RFLP technique. Porangs used as the subject of this study were obtained from 4 different locations in East Java, which are : (1) Nganjuk, (2) Madiun, (3) Blitar and (4) Jember, analysed by morphological characteristic and molecular traits. Morphological analysis showed that porang derived based on their stalk pattern. BlitarI, JemberI, MadiunI variant have large prismatic stalk patterns, Jember1 and Nganjuk2 have a tight prismatic stalk pattern. Glucomannan content analysis showed that highest content is from Blitar2 5,469% and the lowest is Madiun2 0,2313%. The amplification of CslA gene sequence using primary AkCslA680F and AkCslA1288R showed that CslA gene sequence was amplified on 200 bp. The cutting by using *HaeIII* restrictive enzyme produced two monomorphic band on 1000 bp and 2000 bp, and 8 polymorphic band on 100 bp-400 bp. The result of this analysis showed that porang had high diversity. The analysis of among variants clustering based on their molecules data showed that grouping fell into 3 clusters, which were: cluster I (JemberI, BlitarI and MadiunI variants), cluster II (Jember2, Blitar2 and Nganjuk2 variants) and cluster III (Blitar2 variant). The shortest distance was found between JemberI and BlitarI variants, while the furthest was found in Blitar2 variants.

Keywords: *Amorphophallus muelleri* Blume, Porang, PCR-RFLP, *Clustering*.

PENDAHULUAN

Sebagai negara dengan konsumsi beras tertinggi di dunia, masyarakat Indonesia memerlukan bahan pangan alternatif pengganti beras. Porang (*A. muelleri*) merupakan tanaman yang dapat dijadikan sebagai bahan pangan alternatif karena mudah didapat dan umbinya mengandung kadar glukomanan yang tinggi hingga 67% [8]. Glukomanan merupakan karbohidrat penting yang digunakan sebagai *Thickener, film former, emulsifier, stabilizer*, bahan pengikat (*binding agent*), pembuat *selluloid*, bahan peledak, kosmetik dan makanan.

Glukomanan merupakan polisakarida linear yang terdiri dari *1,4-β-linked D-glucosyl* dan residu *D-mannosyl*, perbandingan antara glukosa:manosa sangat bervariasi [6]. Glukomanan dikode oleh famili gen yang mensintesis manan. Gen yang berperan dalam sintesis manan antara lain gen yang berasal dari famili gen Csl. Protein rekombinan CslA memproduksi *mannan polimer* ketika disuplai oleh *GDP-mannosa*. Protein yang sama juga memproduksi *linked glucomannan heteropolymer* ketika disuplai oleh *GDP-mannosa* dan *GDP-glucosa*.

Berdasarkan penelitian [7] hasil pengamatan genetik *A. muelleri* dengan menggunakan lima primer RAPD menunjukkan bahwa 50 aksesori yang digunakan dalam penelitian tersebut memiliki 42 fragmen DNA yang berukuran dari 300 bp hingga 1,5 kb. Dari 42 fragmen DNA, 29 fragmen (69,05%) diantaranya polimorfik, dengan indeks marka tertinggi terdapat pada primer OPD-04. Hal ini menunjukkan bahwa tanaman porang memiliki variasi yang tinggi dalam ciri molekulernya.

Salah satu metode untuk melihat keanekaragaman genetik dalam analisis DNA ialah dengan menggunakan *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). RFLP merupakan suatu teknik untuk membedakan organisme berdasarkan pola hasil pemotongan DNA terhadap enzim restriksi. Kesamaan pola fragmentasi DNA tersebut dapat digunakan

untuk membedakan spesies satu dengan lainnya [3]. Enzim restriksi merupakan enzim yang memotong DNA pada urutan basa tertentu sesuai sekuen pengenalanannya. Pada penelitian ini dipelajari karakteristik morfologi 12 varian porang dari 6 daerah di Jawa Timur serta karakteristik genetisnya berdasarkan marka PCR-RFLP menggunakan primer AkCSLA680F dan AkCSLA1288R serta enzim restriksi *HaeIII*.

METODE PENELITIAN

Pengamatan morfologi tanaman porang.

Tanaman porang yang diambil dari 4 daerah yaitu, Blitar, Madiun, Nganjuk dan Jember diamati ciri morfologinya meliputi perawakan, corak tangkai daun (prismatik kecil, prismatik besar, prismatik bergaris), warna tangkai daun (hijau, hijau muda), bentuk daun, warna daun, pola venasi, pertulangan daun, bentuk umbi, warna daging umbi dan kandungan glukomanan. Setiap daerah diambil 2 sampel tanaman yang berbeda corak tangkai daunnya.

Isolasi glukomanan. Isolasi Glukomanan dilakukan dengan menggunakan metode dari [1]. Umbi tanaman porang segar dikupas, dibersihkan, dan dicuci, lalu diparut dan dijadikan bubur. Sebanyak 250 g hasil parutan ini dimasukkan ke dalam baskom ukuran sedang dan ditambahkan air suling sebanyak 500 ml, lalu diremas-remas selama 2-3 menit, sehingga larutannya menjadi kental. Setelah itu disaring sampai seluruh patinya keluar semua. Filtrat ditampung (diulang 6-8 kali), sehingga larutan menjadi jernih dan cair, tidak kental lagi. Filtrat yang diperoleh digabungkan kemudian ditambahkan NaCl ke dalam filtrat hingga konsentrasi NaCl mencapai 0,05% dengan cara mengukur banyaknya larutan hasil penyaringan dan dikalikan 0,05 NaCl/100, didiamkan selama 24 jam pada suhu 4°C, selanjutnya didekantir. Setelah didiamkan, filtrat dipisahkan dan disentrifus 14.000 rpm, 15 menit, pada suhu 4°C. Hasilnya akan terdapat 2 fase, yaitu endapan dan cairan kental. Kemudian filtrat ditampung dan diendapkan dengan menggunakan isopropil alkohol dengan perbandingan 1:1,5. Setelah mengendap filtrat dibuang. Endapan yang diperoleh dikeringkan pada suhu 80°C selama

*Corresponding author :
E-mail: novie.ary29@yahoo.co.id

3 jam, dihaluskan sehingga diperoleh glukomanan.

Ekstraksi DNA. Daun segar tanaman porang sebanyak 0,1 g digerus pada mortar, kemudian ditambah 700 μ L bufer ekstrak yang ditambah dengan β -merkaptotanol, dipindah ke tabung 1,5 ml dan divorteks. Tabung diinkubasi dalam *water bath* suhu 65°C selama 45 menit, selanjutnya disentrifugasi 13000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dipindah ke tabung baru kemudian ditambah PCI1 $\times$ vol, kemudian divorteks. Disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Selanjutnya dipindah ke tabung baru dan ditambah larutan CI 1 $\times$ vol dan divorteks. Selanjutnya disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan ditambah dengan ammonium asetat 7,5 M (0,1 vol) dan *dithawing* kemudian ditambahkan ethanol absolut dan dikocok pelan 3-4 kali. Campuran ini selanjutnya diinkubasi pada suhu -20°C selama 24 jam, dan selanjutnya disentrifugasi ulang pada 13000 rpm selama 15 menit pada 4°C. Pelet yang didapatkan ditambah dengan ethanol 70% sebanyak 500 μ L dan dihomogenkan pelan. Setelah disentrifugasi, supernatan dibuang dan pelet dikeringkan dalam inkubator suhu 55°C. DNA yang berupa pelet dilarutkan dalam 50 μ L buffer TE (pH 7,6), kemudian larutan dicampur disuhu ruang sampai larut.

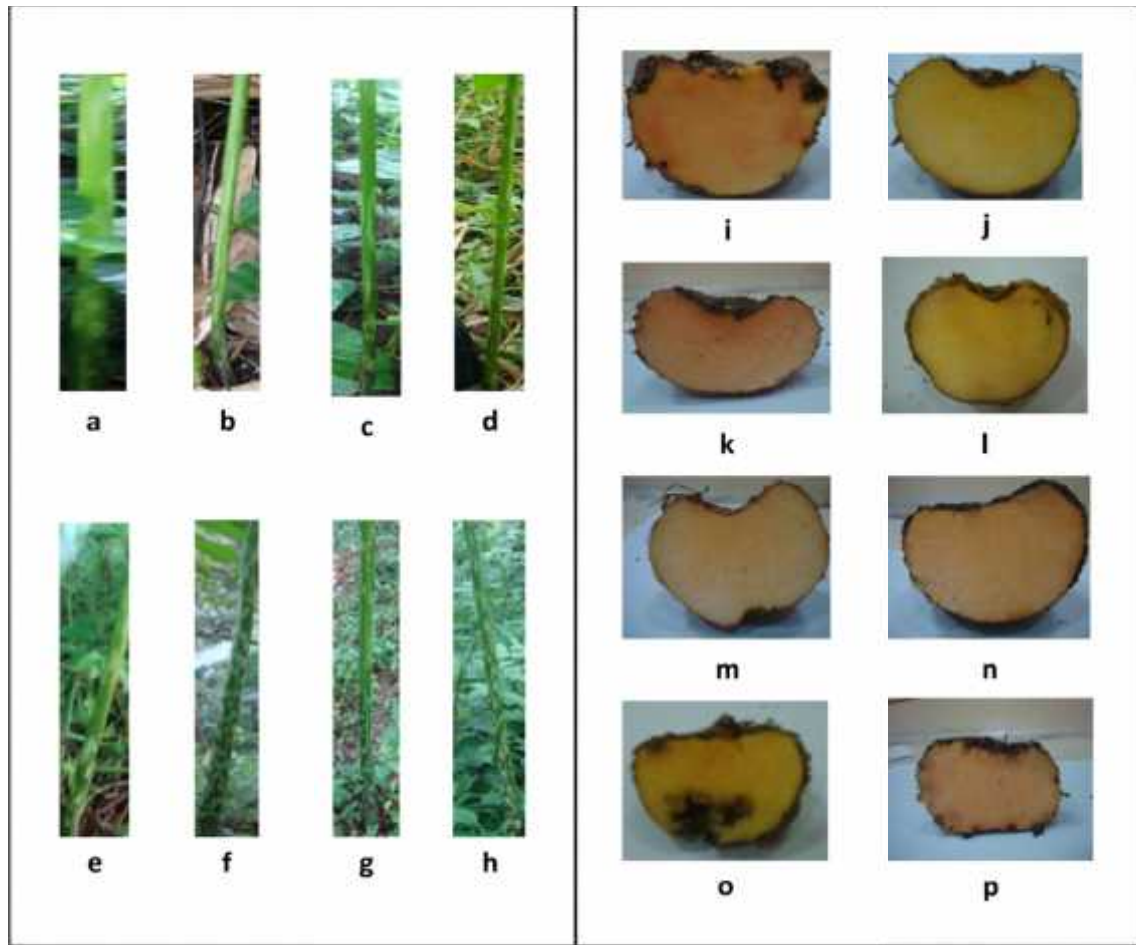
Amplifikasi gen CslA. DNA hasil ekstraksi diamplifikasi dengan menggunakan teknik PCR. Reaksi PCR (total volume 25 μ L) terdiri atas 10 μ L sampel DNA, 2 μ M BSA, 5 μ M PCR mix, 1 μ M primer AkCSLA680F (5'-CTACCACTTCAAGGTGGAGCAG-3') dan 1 μ M primer AkCSLA1288R (5'-CTCCCGATCTCCAACAAACC-3'), dan 1 μ M DNA hasil isolasi. Semua bahan tersebut dimasukkan dalam tabung PCR. Tabung-tabung PCR tersebut ditempatkan pada mesin PCR (*thermal cycler*) pada suhu 95°C selama 5 menit untuk *pre-denaturasi*, 95 °C selama 45 detik untuk denaturasi, 58,5 °C selama 45 detik untuk *annealing*, 72°C selama 45 detik untuk tahap ekstensi dan 72°C selama 10 menit untuk *post* ekstensi. Tahapan PCR dilakukan sebanyak 35 siklus. Hasil PCR disimpan dalam

freezer untuk digunakan lebih lanjut

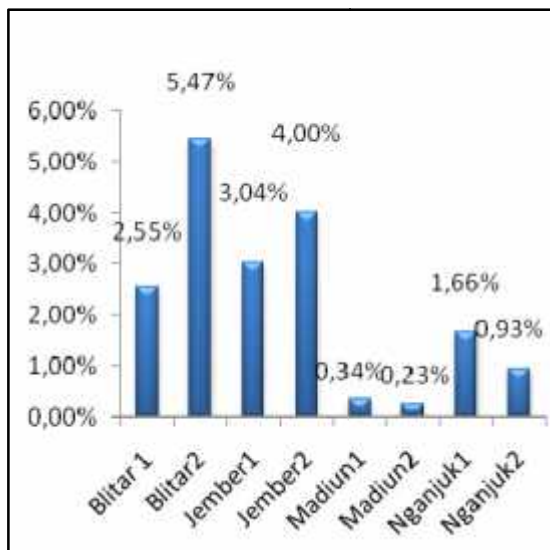
RFLP. Molekul DNA hasil PCR digunakan sebagai bahan dasar pemotongan dengan enzim restriksi. Tiap-tiap tabung mikrosentrifuge berukuran 1,5 ml diisi ddH₂O (*free water nuclease*) sebanyak 6 μ L, *digest buffer* + BSA 0,1 mg/ml (Fermentas) 1 μ L, DNA hasil PCR sebanyak 3 μ L serta enzim restriksi *HaeIII* sebanyak 1 μ L. Kemudian dilakukan *mix gentle* dan *spindown*. Campuran kemudian diinkubasi 3 sampai 16 jam pada *waterbath* suhu 37°C. Hasil PCR-RFLP kemudian dielektroforesis pada gel agarosa dengan konsentrasi 1,5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik morfologi porang (*Amorphophallus muelleri* Blume). Porang dari 4 daerah yaitu, Blitar, Madiun, Nganjuk dan Jember dianalisis ciri morfologinya dan menghasilkan varian porang Blitar1 (B1) memiliki corak tangkai daun prismatik besar dan berwarna hijau muda. Warna daging umbi oranye kekuningan dan kandungan glukomanan sebesar 2,551%. Varian Blitar2 (B2) memiliki corak tangkai daun berbentuk prismatik kecil dan berwarna hijau warna daging umbi oranye, kandungan glukomanan 5,469%. Varian Jember1 (J1) memiliki corak tangkai daun prismatik kecil dan bergaris, warna daging umbi oranye, kandungan glukomanan 4,004%. Varian Jember2 (J2) corak tangkai daun prismatik besar bergaris, warna daging umbi oranye kekuningan dan kandungan glukomanan 3,040%. Varian Madiun1 (M1) corak tangkai daun bentuk prismatik besar, warna daging umbi oranye dan kandungan glukomanan 0,338%. Varian Madiun2 (M2) corak tangkai daun berbentuk prismatik kecil yang rata di seluruh batang tanaman, warna daging umbi oranye dan kandungan glukomanan 1,231%. Varian Nganjuk1 (N1) corak tangkai daun prismatik kecil-kecil yang diselingi dengan garis panjang, warna umbi oranye dan kandungan glukomanan 1,662%. Varian Nganjuk2 (N2) corak tangkai daun bentuk prismatik bergaris, warna umbi oranye dan kandungan glukomanan 0,934%.



Gambar 1. Corak tangkai daun dan warna umbi tanaman porang varian (a,i) Blitar1, (b,j) Blitar2, (c,k) Jember1, (d,l) Jember2, (e,m) Madiun1, (f,n) Madiun2, (g,o) Nganjuk1, (h,p) Nganjuk2.



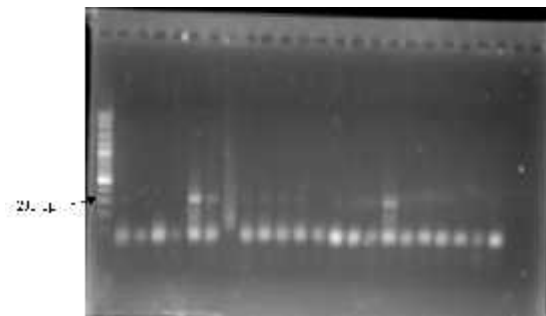
Gambar 2. Kandungan glukoman setiap varian porang

Berdasarkan perbedaan corak tangkai

daun, porang dapat dikelompokkan menjadi 3 kelompok, yaitu (1) berbatang hijau dan bercorak prismatik besar, dimiliki oleh B1, J1, dan M1 (2) berbatang hijau dan bercorak prismatik kecil yang dimiliki oleh B2, M2, dan N1 (3) berbatang hijau dan bercorak prismatik besar bergaris yang dimiliki J2 dan N2 (Gambar 1).

Berdasarkan kandungan glukomanannya, kandungan glukoman tertinggi dimiliki oleh varian B2 sebesar 5,469% sedangkan terendah oleh varian J2 sebesar 0,231% (Gambar 2).

Karakteristik genetik porang berdasarkan marka molekuler PCR-RFLP. Berdasarkan hasil PCR menggunakan AkCslA680F dan AkCslA1288R terdapat delapan sampel yaitu Blitar1, Blitar2, Jember1, Jember2, MadiunI, Madiun2, Nganjuk1, dan Nganjuk2 teramplifikasi pada 200 bp (Gambar 3).

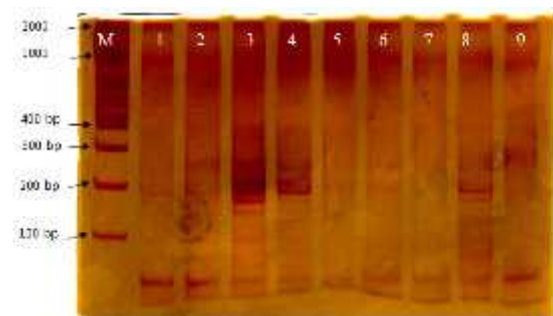


Gambar 3. Hasil PCR (M:marker, 2: Kp1, 3:M3, 4:Kp1, 5:Kp1, 6: B2, 7:J1, 8:B2, 9:B1, 10:N2, 11:B1, 12:J3, 13:M2, 14:M1, 15:P1, 16:J3, 17:N1, 18:P2, 19:M3, 20:M2, 21:P3, 22:P2)

Berdasarkan hasil RFLP dari delapan sampel yang teramplifikasi pada proses PCR hanya menghasilkan tujuh sampel yang terpotong oleh enzim restriksi *HaeIII* yaitu sampel dari daerah Nganjuk1, Nganjuk2, Blitar1, Blitar2, Jember1, Jember2, dan Madiun1, sedangkan satu sampel dari Madiun2 tidak dapat terpotong. Hal ini kemungkinan dikarenakan sampel Madiun2 memiliki sisi pemotongan yang tidak bisa dikenali oleh enzim *HaeIII*. Menurut [2,9] hal ini terjadi karena anggota gen CslA mengalami evolusi dan diversifikasi sehingga telah banyak berubah dari gen *ancestral* awalnya, sehingga pada pemotongan dengan enzim restriksi *HaeIII* tidak semua gen CslA dapat terpotong sehingga mengakibatkan perbedaan hasil potongan.

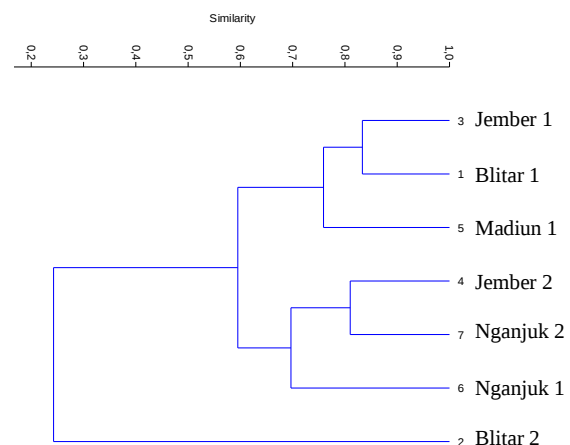
Pada hasil elektroforesis terdapat pita yang bersifat monomorfik karena ketujuh isolat porang yang diuji menghasilkan pita pada ukuran yang sama yaitu pada 1000 bp dan 2000 bp. Sedangkan pada pita yang lainnya bersifat polimorfik karena menghasilkan pita pada ukuran tertentu yang terletak pada 100 bp, 150 bp, 170 bp, 190 bp, 200 bp, 250 bp, 350 bp, 400 bp.

Dilihat dari letak pola pita pada setiap lokus pada antar varian porang yang diuji, delapan lokus polimorfik yang terletak diantara 100 bp sampai dengan 400 bp dan dua lokus monomorfik pada 100 bp dan 2000 bp (Gambar 4). Hal tersebut menunjukkan bahwa teknik PCR-RFLP menggunakan primer AkCslA680F dan AkCslA1288R dan enzim restriksi *HaeIII* dapat menunjukkan keragaman genetik pada varian porang yang dipelajari.



Gambar 4. Hasil RFLP (M:marker, 1:B1, 2: B1, 3:B2, 4:J1, 5:J2, 6:M1, 7:N1, 8:N2)

Pengelompokan varian porang berdasarkan dari ciri molekuler menggunakan teknik PCR-RFLP menunjukkan bahwa berdasarkan jarak genetik tanaman porang dibagi menjadi tiga kelompok. Kelompok I terdiri dari tiga varian porang, yaitu J1, B1 dan M1. Kelompok II terdiri dari tiga varian porang, yaitu varian J2, N2 dan N1. Sedangkan kelompok III hanya berisi satu varian yaitu B2.

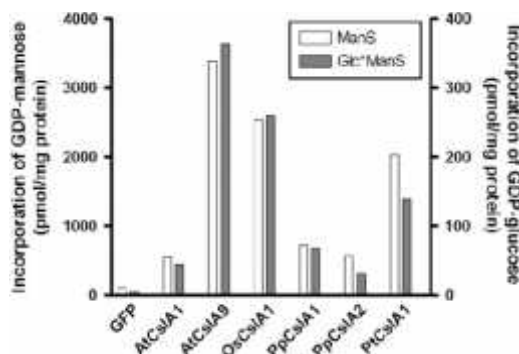


Gambar 5. Dendrogram hubungan kekerabatan.

Jarak genetik antar varian terlihat dari pengelompokan tersebut. Varian dalam satu kelompok memiliki jarak genetik lebih dekat dibandingkan dengan varian dari kelompok yang berbeda. Jarak genetik terdekat ialah antara varian J1 dan B1 dalam kelompok I, serta varian J2 dan N2 pada kelompok II (Gambar 5).

Kandungan glukomanan tertinggi berasal dari varian B2 yaitu sebesar 5,469% dan kandungan glukomanan terendah dimiliki varian M2 sebesar 0,2312%. Pada tanaman porang dari daerah yang sama ternyata memiliki kandungan glukomanan yang

berbeda. Hal ini disebabkan oleh perbedaan dan mutasi dari gen CslA sebagai gen yang bertanggung jawab dalam sintesis glukomanan. Seperti dijelaskan pada penelitian [4] yang menyatakan bahwa anggota gen CslA memiliki banyak mutan dan dari setiap mutan mengkode pembentukan glukomanan yang bervariasi. Penelitian [5] menegaskan bahwa kandungan glukomanan yang berbeda-beda tergantung dari perbandingan glukosa dan manosa serta protein rekombinan CslA yang bekerja pada individu tersebut (Gambar 6).



Gambar 6. Aktivitas protein rekombinan CSLA dalam pembentukan mannan dan glukomanan pada sel *Drosophilla* S2 secara *in vitro* [5].

KESIMPULAN

Perbedaan ciri morfologi yang didapat dari hasil pengamatan adalah corak tangkai daun dan warna daging buah. Kandungan glukomanan tertinggi didapatkan dari varian Blitar2 yaitu sebesar 5,469% dan kandungan glukomanan terendah dari varian Madiun2 yaitu sebesar 0,231%.

Amplifikasi gen CslA menggunakan primer AkCslA680F dan AkCslA1288R menghasilkan delapan potongan DNA berukuran 200 bp, dan pemotongan menggunakan enzim restriksi *HaeIII* menghasilkan dua pita monomorfik dan delapan pita polimorfik yang menunjukkan keragaman pada sampel yang dianalisis. Hasil analisis *clustering* berdasarkan marka molekuler RFLP didapatkan bahwa jarak terdekat adalah antar varian Jember 1 dengan Blitar1. Sedangkan jarak terjauh pada varian Blitar2.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Chairul dan Chairul, S. (2006), Isolasi Glukomanan dari dua jenis *Araceae*: talas (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) dan iles-iles (*Amorphophallus campanulatus* Blumei), *Berita Biologi*, **8**(3).
- [2] Del Bem, L.E., and M. G. Vincentz (2010), Evolution of xyloglucan-related genes in green plants, *BMC Evol. Biol.*, **10**:341. Doi: 10.1186/1471-2148-10-341.
- [3] Hill, W. (2005), *RFLP Definition*. <http://vm.cfsan.fda.gov/~frf/rflp.html>, diakses tanggal 3 November 2007 pukul 21.00 WIB.
- [4] Liepman, A. H. and D. M. Cavalier (2012), The cellulose synthase-like A and cellulose synthase-like C families: recent advances and future perspectives, Mini review, *Frontiers in Plant Science*.
- [5] Liepman, A. H., C. Joseph Nairn, Willats, G. T. William, Iben, Sorensen, Alison W. Roberts and Kenneth Keegstra (2007), Functional genomic analysis supports conservation of function among cellulose synthase-like A gene family members and suggest diverse roles of mannans in plants, *Plant Physiology*, April 2007, Vol. **143**, pp.1881-1893, www.plantphysiol.org
- [6] Megazyme (2004), *Glucomannan Assay Procedure K-Glum 08/01*, Megazyme International Ireland limited, Ireland.
- [7] Poerba, Y. S dan D. Martanti (2008), Keragaman genetik berdasarkan marka random amplified polymorphic DNA pada *Amorphophallus muelleri* Blume di Jawa, *Biodiversitas*, vol. **9**.
- [8] Wahyuni, S., E. A. Hadad, Hobir dan A. denian (2004), Plasma nutfah aneka tanaman perkebunan. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, *Perkembangan Teknologi, TRO*, **16** : 28-42.
- [9] Yin, Y., J. Huang and Y. Xu (2009), The cellulose synthase superfamily in fully sequenced plants and algae, *BMC Plant Biol.*, **9**:99. Doi: 10.1186/1471-2229-9-99.