

IDENTIFIKASI POLIMORFIS MARKA-MARKA MOLEKULER YANG DIDUGA BERKAITAN DENGAN KARAKTER DAYA HASIL TINGGI PADA 30 GENOTIP PADI

Nono Carsono^{1*}, Pradita N Lukman², Farida Damayanti¹, Untung Susanto⁴, Santika Sari³

¹Laboratorium Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran,

²Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran,

³Program Magister Pemuliaan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran,

Jl. Raya Bandung-Sumedang km. 21 Jatinangor, Sumedang, Jawa Barat 45363

⁴Staf Peneliti pada Balai Besar Penelitian Tanaman Padi (BB Padi),

Jl. Raya Sukamandi, Subang, Jawa Barat.

*Alamat korespondensi: ncarsono@mail.unpad.ac.id

Abstrak: Identifikasi marka polimorfis yang diduga berasosiasi dengan karakter daya hasil tinggi sangat penting dilakukan guna aplikasi seleksi berbasis marka dalam rangka perakitan padi berdaya hasil tinggi. Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi 30 genotip padi yang diduga berdaya hasil tinggi dengan menggunakan marka SSR. Amplifikasi produk PCR dipisahkan dengan menggunakan gel *agarose* 3% atau *polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE) 8%. Tingkat keinformatifan marka dapat ditentukan dengan cara penghitungan *Polymorphic Information Content* (PIC). Hasil analisis menunjukkan bahwa marka OSBLE3, RM 282, dan RM 259 memiliki nilai $PIC \geq 0,5$. Marka SSR dan marka gen spesifik yang digunakan untuk mengidentifikasi padi berdaya hasil tinggi menunjukkan bahwa tiga genotip padi terseleksi dapat direkomendasikan sebagai tetua donor dalam persilangan diantaranya yaitu genotip #1 (Fatmawati), #3 (Inpari13), dan #30 (IPB 160-F-3-3-1). Marka molekuler yang digunakan dapat memperkirakan tingkat polimorfisme dan juga berguna untuk mengkonfirmasi genotip padi yang berpotensi daya hasil tinggi.

Kata kunci: hasil tinggi, marka polimorfis, padi, dan PIC.

Abstract: Identification of polymorphic markers that are associated with high yielding character is highly important for the application of marker assisted selection in developing such trait in rice. This study was aimed to identify SSR markers which were reported by some researchers to be associated with high yielding trait in 30 rice genotypes. PCR amplifications were separated on a 3% agarose or a 8% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The informative markers were determined by calculating the *Polymorphic Information Content* (PIC). The results of the analysis revealed that OSBLE3, RM 282, and RM 259 had PIC values ≥ 0.5 which were classified as informative markers. Based on SSR and the gene specific markers applied, genotype #1 (Fatmawati), #3 (Inpari13), and #30 (IPB 160-F-3-3-1) are recommended as donor parents for developing high yielding rice lines. The molecular markers applied are able to estimate the level polymorphism and useful for confirming potential high yielding genotypes.

Keywords: high yielding, polymorphic marker, rice and PIC.

PENDAHULUAN

Beras merupakan makanan pokok bagi sebagian penduduk di dunia dan terutama di Indonesia. Peningkatan produktivitas tanaman padi merupakan bagian dari upaya untuk peningkatan produksi pertanian khususnya tanaman pangan. Ketersediaan tanaman pangan ini mengalami fluktuasi dari waktu ke waktu, oleh karena itu untuk memenuhi kebutuhan pangan nasional maka produksi beras nasional perlu ditingkatkan (Deptan, 2008 *dikutip* Khomawatie, 2010).

Berdasarkan hasil survey Badan Pusat Statistik pada tahun 2012, produksi beras nasional pada Mei 2011-April 2012 sebanyak 20.619.985 ton, dari gabah yang digiling di industri penggilingan padi sebanyak 32.873.663 ton. Kebutuhan masyarakat terhadap beras sekitar 87.235 kg/kapita/tahun (Deptan, 2012) dengan jumlah penduduk Indonesia sekitar 230 juta jiwa,

sehingga dibutuhkan sekitar 21 juta ton beras per tahun untuk mencukupi kebutuhan pangan. Permasalahan inilah yang membuat tanaman padi menjadi komoditas yang terus diusahakan dan dikembangkan agar dapat mencukupi kebutuhan pangan masyarakat. Oleh karena itu, Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Sukamandi, Subang bekerja sama dengan Laboratorium Pemuliaan Tanaman Unpad untuk melakukan penelitian pengujian terhadap 30 genotip padi yang diduga berdaya hasil tinggi (Tabel 2) dengan menggunakan 10 marka yang ditunjukkan pada Tabel 1. Marka-marka tersebut dipilih untuk mengkonfirmasi keberadaan dan polimorfisme (perbedaan ukuran) fragmen DNA yang dimiliki oleh 30 padi yang berdaya hasil tinggi koleksi BB Padi. Selain itu, 10 marka tersebut telah dilaporkan berkaitan dengan karakter daya hasil, baik daya hasil langsung maupun karakter komponen hasil,

seperti jumlah malai, bobot bulir, fase senescence, tinggi tanaman, jumlah anakan, serta kandungan klorofil. Ketiga puluh genotip padi yang memiliki

potensi hasil tinggi dan digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 2.

Tabel 1. Primer yang digunakan dalam penelitian

No.	Primer	Kromosom	Tipe	Karakter yang Diduga Terpaut	Sumber
1	RM 259	1	SSR	Jumlah Malai	Gramene (2006)
2	RM 531	8	SSR	Jumlah Malai	Gramene (2006)
3	RMw-513	5	SSR	Bobot bulir	Weng <i>et al.</i> (2008)
4	RM 282	3	SSR	Bobot Bulir	Guo <i>et al.</i> (2009)
5	FLO		<i>Gene-Specific primer</i>	Jumlah Malai	Kyozuka <i>et al.</i> (1998)
6	OsDOS	1	<i>Gene-Specific primer</i>	Fase Senescence	Kong <i>et al.</i> (2006) Gramene (2006)
7	OsBLE3	5	<i>Gene-Specific Primer</i>	Tinggi Tanaman	Yang <i>et al.</i> (2006) Gramene (2006) www.bioinformatics.nl
8	MOC1	6	<i>Gene-Specific Primer</i>	(<i>Tillering control in rice</i>)	Li <i>et al.</i> (2003) www.bioinformatics.nl
9	GLN1;1		<i>Gene-Specific Primer</i>	Kandungan Klorofil	Hakeem <i>et al.</i> (2012)
10	NADH-NAR1		<i>Gene-Specific Primer</i>	Kandungan Klorofil	Hakeem <i>et al.</i> (2012)

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengidentifikasi marka-marka yang polimorfik sehingga data yang diperoleh nantinya dapat digunakan untuk seleksi padi berdaya hasil tinggi. Selain itu varietas yang terseleksi dapat dijadikan tetua persilangan untuk perakitan padi berdaya hasil tinggi.

BAHAN DAN METODE

Percobaan dilakukan terdiri dari beberapa tahapan, yaitu isolasi DNA, spektrofotometri, amplifikasi DNA (PCR), dan elektroforesis. Setiap tahapan percobaan memerlukan bahan yang berbeda.

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam percobaan molekuler adalah sampel daun dari 30 genotip tanaman padi (Tabel 2), CTAB (*Cetyl Trimetil Ammonium Bromide*), SDS, isopropanol, etanol 80%, buffer TE (Tris-EDTA), alkohol 70%, *pottasium acetate*, *cisam* (fenol, kloroform, isoamil alkohol), cetakan DNA, *gene specific primer* dan SSR (Tabel 1), *Kappa polymerase*, Top Vision Agarose (Fermentas), larutan TBE 0,5 x 6 x *loading Dye* #R0611 (Fermentas), *Gen Ruller* #SM0311 1kb (Fermentas), *Gen Ruller* #SM0311 100bp (Fermentas), *Ethidium Bromide* (EtBr), dan DNA hasil PCR. *Acrylamide* 30%, *ammonium persulfate* 10%, TBE *electrophoresis* buffer 5x, H₂O, TEMED.

Metode Penelitian

Isolasi DNA Padi

DNA padi diisolasi dari sampel daun padi muda dengan menggunakan metode CTAB (*Cetyl trimethylammonium bromide*) (Doyle & Doyle, 1987

dengan modifikasi). Metode CTAB dilakukan melalui tiga tahap yaitu preparasi ekstrak sel, pemurnian DNA, dan pemekatan DNA. CTAB berfungsi sebagai buffer pengekstrak yang dapat merusak membran menjadi suatu larutan kompleks yang mengandung DNA.

Kuantifikasi dan pengujian kualitas DNA melalui Spektrofotometri

Pengujian kuantitas dan kualitas DNA genomik hasil isolasi dilakukan dengan mesin *Spectrophotometer* (Rayleigh UV-9200). Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA. Pengukuran konsentrasi DNA dilakukan pada panjang gelombang 260 nm. Jumlah radiasi UV yang diserap oleh larutan DNA (*absorbance* = A) sebanding dengan jumlah DNA dalam sampel yang diukur. Hasil pengukuran dicatat dan dianalisis untuk membuat DNA *template* dengan konsentrasi 20 ng/μL untuk digunakan dalam analisis PCR.

Amplifikasi DNA (PCR)

Pada tahapan ini, amplifikasi DNA dengan menggunakan PCR membutuhkan temperatur, waktu, dan siklus yang berbeda untuk setiap primernya. *Kappa DNA polymerase* dimasukan kedalam *tube* sebanyak 9,5 μL/*sample*, kemudian *primer forward* dan *reverse* masing-masing dimasukan 1 μL/*sample* ke dalam *tube*, dilanjutkan dengan DNA *template* 1 μL/*sample*. Setelah *tube* dipersiapkan semuanya, kemudian mesin PCR diatur programnya sesuai dengan primer. Primer yang digunakan disajikan pada Tabel 1

Tabel 2. Daftar genotip yang diteliti dalam penelitian

No.	Genotip	Karakter menonjol	Keterangan/Kontributor
1	Fatmawati	Malai lebat	VUB PTB/BB Padi
2	Ciherang	Potensi Hasil	VUB eksisting terpopuler/BB Padi
3	Inpari13	Umur sangat genjah	VUB promising terpopuler/BB Padi
4	Silugonggo	Umur sangat genjah	VUB umur sangat genjah/ BB Padi
5	IR64/TIL 1	Adaptabilitas luas	VU lama/BB Padi
6	TIL3	Potensi hasil	NIL perbaikan IR64/ BB Biogen/IRRI
7	TIL4	Potensi hasil	NIL perbaikan IR64/ BB Biogen/IRRI
8	TIL10	Potensi hasil	NIL perbaikan IR64/ BB Biogen/IRRI
9	Huanghuazhan	Potensi hasil	Calon VUB, GSR/BB Padi
10	Zhongzu14	Potensi hasil	Calon VUB, GSR/BB Padi
11	ZX117	Tanaman tipe ideal	Galur tipe baru, GSR/BB Padi
12	BP14574b-27-3-1M-3-2*B	Umur ultra genjah	Galur umur ultra genjah/ BB Padi
13	HIPA8	Malai lebat anakan sedang	Hibrida/ BB Padi
14	HIPA Jatim 2	Daun bendera tegak, malai lebat	Hibrida/ BB Padi
15	Ketan Putih (4655)	Anakan paling banyak	Plasma Nutfah/ BB Padi
16	Berem Batu (7818)	Anakan paling sedikit	Plasma nutfah /BB Padi
17	Padi Hungkai (3339)	Jumlah gabah paling banyak	Plasma nutfah /BB Padi
18	Nipponbare	Jumlah gabah paling sedikit	Plasma nutfah /BB Padi
19	BP14356e-1-B	Galur sangat tegak	Galur harapan/ BB Padi
20	B11143D-MR-1-PN-3-MR-3-Si-2-3-PN-1	PTB	Galur tipe baru/BB Padi
21	B12404E-MR-20-PN-3-3	PTB	Galur tipe baru/BB Padi
22	B12344-3D-PN-37-6	PTB	Galur tipe baru/BB Padi
23	B12411E-MR-9-4-1	PTB	Galur tipe baru/BB Padi
24	B12512E-MR-14-PN-1-3	PTB	Galur tipe baru/BB Padi
25	PK21	Potensi hasil	Tetua hibrida/BB Padi
26	PK88	Potensi hasil	Tetua hibrida/BB Padi
27	IPB 3S	Variasi daun bendera	VUB/IPB
28	IPB159-F-3-1	Variasi daun bendera	Galur harapan/ IPB
29	IPB159-F-17-1	Variasi daun bendera	Galur harapan/ IPB
30	IPB160-F-3-3-1	Variasi daun bendera	Galur harapan/ IPB

Elektroforesis dan Visualisasi

Produk amplifikasi dielektroforesis dengan menggunakan gel agarose 3% dan atau *polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE) 8%. Gel agarose 3% digunakan untuk elektroforesis beberapa primer seperti FLO, OSDOS, GLN1, dan NADH-NAR1 yang merupakan *gene specific* primer, sedangkan empat primer SSR dan dua *gene specific* primer lainnya menggunakan PAGE dikarenakan pada gel agarose tidak memperlihatkan polimorfisme. Selain itu, gel akrilamida mampu mendeteksi lebih banyak alel per lokus apabila susunannya berbeda 2bp.

Visualisasi dilakukan dengan menggunakan alat *gel documentation system* (Syngene) untuk melihat fragmen-fragmen DNA yang berbentuk pita-pita DNA. Setiap ukuran pita DNA berhubungan dengan karakter yang akan diamati.

Analisis Data

Analisis data molekuler dilakukan dengan skoring pita hasil visualisasi DNA. Setiap pita yang muncul pada gel merupakan alel tertentu. Alel tersebut diterjemahkan menjadi data biner yang diberi nilai berdasarkan ada tidaknya suatu alel (Hairinsyah, 2010). Nilai satu atau (+) akan diberikan apabila terdapat alel, dan nilai 0 atau (-) bila tidak terdapat alel.

Analisis persentase alel polimorfis dihitung untuk melihat berapa persen alel polimorfisme yang terbentuk di setiap primer yang digunakan. Untuk menghitung persentase pita polimorfis, digunakan rumus:

$$\text{Persen Polimorfis} = \frac{\text{Jumlah alel polimorfis}}{\text{Total alel}}$$

Tingkat keinformatifan primer ditentukan dengan cara penghitungan *Polymorphic Information Content* (PIC) (Hildebrand, 1992) dengan menggunakan program online PIC Calc yang tersedia di <http://www.genomics.liv.ac.uk/animal/Pic1.html>.

Nilai PIC dijadikan standar untuk mengevaluasi marka genetik berdasarkan pita DNA hasil amplifikasi PCR, oleh karena itu nilai PIC dibagi menjadi tiga kelas yaitu $\text{PIC} > 0,5$ = sangat informatif, kemudian $0,25 > \text{PIC} > 0,5$ = sedang, dan $\text{PIC} < 0,25$ = rendah.

HASIL DAN PEMBAHASAN

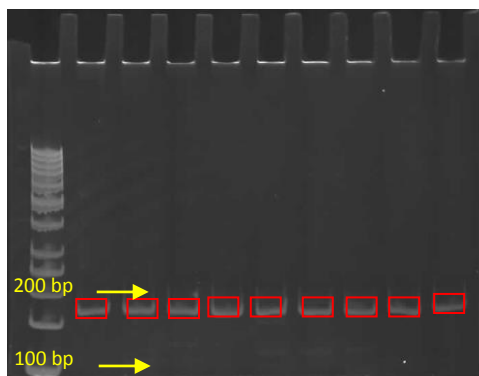
Dari 10 primer yang digunakan, terpilih 6 primer yang polimorfis seperti yang disajikan pada Tabel 1. Berdasarkan Tabel 3, maka dapat dilihat bahwa primer-primer yang memiliki sifat polimorfis, yang menghasilkan sekitar 2-5 alel. Persentase polimorfis setiap primer pun berbeda-beda. Sedangkan empat primer lainnya belum dapat mengamplifikasi dengan

baik yang mungkin disebabkan karena program PCR nya yang belum tepat. Selain itu, primer yang tidak sesuai dengan sekuens DNA padi yang diteliti, juga dapat menyebabkan produk tidak teramplifikasi karena tidak terdapat kecocokan yang komplemen antara DNA padi dengan sekuens primer yang digunakan. Primer-primer yang informatif ditunjukkan oleh nilai PIC $\geq 0,5$ (Zhang *et al.*, 2011), sedangkan primer yang memiliki nilai PIC yang semakin besar merupakan primer terbaik yang dapat digunakan sebagai penanda molekuler seperti primer

OSBLE 3, MOC1, dan RM 259. Nilai PIC untuk 6 primer terpilih berkisar antara 0,1-0,76. Nomor tanaman yang terseleksi oleh 6 primer yang polimorfis yaitu sampel #1 (Fatmawati), #3 (Inpari13), dan #30 (IPB 160-F-3-3-1). Ketiga genotip tersebut dapat direkomendasikan sebagai tetua untuk persilangan guna perakitan padi yang berdaya hasil tinggi. Salah satu contoh hasil elektroforesis PAGE dengan menggunakan marka MOC1, disajikan pada Gambar 1.

Tabel 3. Daftar primer yang terpilih

No.	Primer	Karakter terpaat	Jumlah alel polimorfis	Terdapat pada padi nomor	Polimorfis (%)	PIC	Sumber
1	FLO	Jumlah Malai	2	1, 2, 4, 6, 7, 10, 13, 14, 17, 18, 21, 22, 24, 27	100	0,1167	Kyozuka <i>et al.</i> (1998)
2	OSBLE3	Tinggi Tanaman	4	1, 3, 5, 7, 8, 11, 13, 20, 25, 30	100	0,5786	Yang <i>et al.</i> (2006)
3	MOC1	<i>Tillering control in rice</i>	2	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 30	100	0,3146	Li <i>et al.</i> (2003)
4	OSDOS	Fase <i>Senescence</i>	2	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30	100	0,2905	Kong <i>et al.</i> (2006)
5	RM 259	Jumlah Malai	3	1, 2, 3, 18, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30	100	0,5622	Gramene (2006)
6	RM 282	Bobot Bulir	5	1-30 kecuali 18, 25, 26, 27	80	0,765	Guo <i>et al.</i> (2009)



Gambar 1. Pola pita DNA padi genotip # 19-27 menggunakan marka MOC1.

IR64 merupakan varietas padi hibrida yang memiliki karakter jumlah anakan terbanyak jika dibandingkan dengan varietas unggul lainnya berdasarkan deskripsi varietas padi (BB Padi, 2010). IR64 memiliki jumlah anakan produktif sekitar 20 -35 batang, sehingga digunakan sebagai kontrol untuk karakter tersebut. Berdasarkan hasil visualisasi DNA menggunakan primer MOC 1 yang digunakan untuk mendeteksi gen yang mengendalikan jumlah anakan, terlihat bahwa sampel #19 (BP14356e-1-B), #20 (B11143D-MR-1-

PN-3-MR-3-Si-2-3-PN-1), #21 (B12404E-MR-20-PN-3-3), #22 (B12344-3D-PN-37-6), #23 (B12411E-MR-9-4-1), #24 (B12512E-MR-14-PN-1-3), #25 (PK21), dan #26 (PK88) memiliki pita yang sama dengan sampel #5 (IR64). Selain itu, sampel #1, #2, #3, 4 (Silugonggo), #6 (TIL3), #7 (TIL4), #8 (TIL10), #16 (Berem Batu 7818), #17 (Padi Hungkai), #18 (Nipponbare), #22 (B12344-3D-PN-37-6), #23 (B12411E-MR-9-4-1), #24 (B12512E-MR-14-PN-1-3), #25, #26, #28, #29, dan #30 juga memiliki pita yang sama dengan IR64.

KESIMPULAN

1. Dari sepuluh marka yang digunakan, diperoleh enam marka yang polimorfis, yaitu FLO, OSBLE3, MOC1, OSDOS, RM 259, RM 282.
2. Marka yang informatif ditunjukkan oleh OSBLE 3, RM282 dan RM 259.
3. Genotip-genotip yang terseleksi oleh marka molekuler yang berkaitan dengan potensi hasil tinggi yaitu Fatmawati, Inpari13, IPB 160-F-3-3-1. Ketiga genotip tersebut dapat direkomendasikan sebagai tetua persilangan dalam perakitan padi yang berdaya hasil tinggi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih disampaikan kepada Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Sukamandi, Subang yang telah mendanai sebagian penelitian ini melalui Dana Konsorsium Padi Nasional.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Pusat Statistik, (2012). Available at: <http://www.bps.go.id/?news=955>.
- Departemen Pertanian, (2012). Available at : <http://www.deptan.go.id/Indikator/tabe-15b-konsumsi-rata.pdf>.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987). Isolation of plant DNA from fresh tissues. *Focus*, **12**, 13-15.
- Gramene, (2006). *Oryza* Taxonomi. Available at http://www.gramene.org/species/oryza/rice_taxonomy.html.
- Guo, L., Lilian, M., Hua, J., Dali, Z., Jiang, H., Liwen, W., & Zhenyu, G. (2009). Genetic analysis and fine mapping of two genes for grain shape and weight in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, **51**(1), 45-51.
- Hairinsyah, (2010). Pendugaan parameter genetik dan analisa keragaman genetik kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq) dengan marka Simple Sequence Repeat (SSR). IPB. Bogor. Available at <http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/46891>.
- Hakeem, K, R., Ruby, C., Parvaiz, A., Altaf, A., & Muhammad, I. (2012). Physiological and molecular analysis of applied nitrogen in rice genotypes. *Rice Science*, **19**(1), 1-10.
- Khomawatie, I. (2010). Ekspresi fenotipe padi transgenik pembawa gen Csnitr1-L terhadap variasi dosis pemupukan nitrogen. Institut Pertanian Bogor. Available at <http://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/59280/G10ikh.pdf>.
- Kong, Z., Yang, W., Xue, Y., Li, M., & Xu, W. (2006). A novel nuclear-localized CCCH-type zinc finger protein, OSDOS, is involved in delaying leaf senescence in rice (*Oryza sativa* L). *Plant physiology*, **141**(4), 1376-1388.
- Kyozuka, J., Saeko, K., Keisuke, N., Takeshi, I., & Ko, S. (1998). Down-regulation of RFL, the FLO/LFY homolog of rice, accompanied with panicle branch initiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**(5), 1979-1982.
- Li, X., Qian, Q., Zhiming, F., Yonghing, W., Guosheng, X., Dali, Z., Xiaoqun, W., Xinfang, L., Sheng, T., Fujimoto, H., Ming, Y., Da, L., Bin, H., & Jiang, L. (2003). Control of tillering in rice. *Nature*, **422**, 618-621.
- Sambrook, J., & David, W.R. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*.
- Weir, B.S. (1990). *Genetic Data Analysis: Methods for Discrete Genetic Data* Sunderland Massachusetts. Sinauer Associates.
- Weng, J., Suhai, Gu., Xiangyuan, Wan., He, Gao., Tao, Guo., Ning, Su., Cailin, L., Xin, Z., Zhijun, C., Xiuping, G., Jiulin, W., Ling, J., Huqu, Z., & Jianmin, W. (2008). Isolation and initial characterization of GW5, a major QTL associated with rice grain width and weight. *Cell Res*, **18**(12), 1199-209.
- Yang, G., Ichikawa, H., Komatsu, S., Nakamura, H., & Kitano, H. (2006). OsBLE3, a brassinolide-enhanced gene, is involved in the growth of rice. *Phytochemistry*, **67**, 1442-1454.