

Analisis Korelasi Marka *Simple Sequence Repeats* Molecular Markers dengan Karakter Ketahanan terhadap Wereng Cokelat pada Lima Kultivar Padi

Gigih Ibnu Prayoga¹, Santika Sari², Danar Dono³, dan Nono Carsono^{2*}

¹Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian dan Biologi, Universitas Bangka Belitung

²Departemen Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran

³Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran

Jl. Raya Bandung-Sumedang KM 21 Jatinangor 45363

*Alamat korespondensi: ncarsono@unpad.ac.id

INFO ARTIKEL	ABSTRACT/ABSTRAK
Diterima: 31-07-2022 Direvisi: 21-10-2022 Dipublikasi: 30-12-2022	Correlation Analysis between <i>Simple Sequence Repeats</i> Molecular Markers and Brown Planthopper Resistance Traits in Five Rice Cultivars
Keywords: Molecular markers, Photosynthetic rate, Protein content, Rice, Trichomes, Z-mantel	The brown planthopper (<i>Nilaparvata lugens</i> Stal.) is well-known as the major pest in rice cultivation in Indonesia and other countries in Asia. Developing resistant rice lines is the ideal option for economic and effective management. The comparison of important traits between resistant and susceptible rice genotypes to brown planthopper (BPH) and the correlation between Simple Sequence Repeats (SSR) molecular markers with important traits that are supposed to be associated with the defense mechanism against BPH is highly important to elucidate. In this study, characterization of important traits and screening of eight SSR markers were performed for five genotypes, i.e., PTB-33 (resistant genotype), IR-64 (tolerant), Pandan Wangi (susceptible), Ciherang (susceptible), and Sintanur (susceptible). PTB-33 showed a higher photosynthetic rate (tolerant ability), longer trichomes (antixenosis ability), and lower protein content (antibiosis ability) compared with other cultivars. RM8213 exhibited visible polymorphic DNA bands between PTB-33 and other cultivars, whereas, RM586 and RM589 showed polymorphic DNA bands between PTB-33 and other cultivars, except with cv. IR-64. The Z-mantel test for correlation between physiological traits and SSR markers showed that <i>Qbph4</i> and <i>Bph17(t)</i> genes were highly correlated with photosynthetic rates and trichome length, whereas <i>Bph3</i> and <i>bph4</i> genes showed a high level of correlation with protein content. It is assumed that these three traits play an important role in the defense mechanism against BPH in rice.
Kata Kunci: Kandungan protein, Laju fotosintesis, Marka molekuler, Padi, Trikoma, Z-Mantel	Hama wereng cokelat (<i>Nilaparvata lugens</i> Stal.) telah lama menjadi masalah utama dalam budidaya padi di Indonesia dan beberapa negara Asia lainnya. Merakit tanaman yang memiliki ketahanan terhadap hama ini, dipandang sebagai pendekatan yang lebih efektif dan ramah terhadap lingkungan dan manusia. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh perbedaan pada karakter penting padi antara kultivar padi tahan dengan kultivar rentan wereng cokelat, selain itu juga untuk mendapatkan marka-marka SSR yang bisa digunakan untuk Marker Assisted Selection (MAS) dan hubungannya dengan karakter penting. Riset ini meliputi pengamatan karakter penting dan skrining delapan marka SSR yang diduga berkaitan dengan gen <i>bph</i> (ketahanan terhadap wereng cokelat) pada lima kultivar padi tetua yaitu PTB-33

(genotipe tahan), IR-64, Pandan Wangi, Ciherang, dan Sintanur. PTB-33 memiliki laju fotosintesis yang lebih tinggi (toleran), trikoma yang lebih panjang, dan kandungan protein yang lebih rendah dibandingkan kultivar lainnya yang diuji. Hasil visualisasi marka RM8213 menunjukkan adanya polimorfisme pita DNA pada genotipe tahan PTB-33 dengan kultivar lainnya. Selain itu, marka RM586 dan RM589 juga menunjukkan adanya polimorfisme pada kultivar PTB-33 dengan kultivar lainnya kecuali dengan kultivar IR-64. Hasil analisis Z-Mantel antara marka SSR dengan karakter penting genotipe uji menunjukkan bahwa gen *Qbph4* dan *Bph17(t)* mempunyai korelasi yang sangat tinggi dengan karakter laju fotosintesis dan panjang trikoma, sedangkan gen *Bph3* dan *bph4* berkorelasi tinggi dengan kandungan protein. Ketiga karakter tersebut diduga berperan penting dalam mekanisme pertahanan terhadap hama wereng cokelat pada padi.

PENDAHULUAN

Produktivitas padi di Indonesia saat ini masih relatif rendah (3,5 - 5,2 ton/ha) yang dikarenakan oleh berbagai sebab, diantaranya terkait dengan faktor pembatas pertumbuhan dan perkembangan tanaman, yaitu adanya serangan hama dan penyakit. Hama wereng cokelat (*Nilaparvata lugens* Stal.) merupakan hama utama padi pada pertanaman padi hampir di semua negara. Selain itu, hama wereng cokelat juga merupakan vektor bagi virus-virus utama padi seperti virus tungro dan virus kerdil (Nagadhara *et al.*, 2004). Serangan hama dan virus ini mampu menurunkan produktivitas hasil padi, bahkan dapat menyebabkan pertanaman padi menjadi tidak menghasilkan sama sekali (puso).

Upaya pencegahan yang dapat dilakukan adalah melalui perakitan tanaman padi yang tahan beragam biotipe wereng cokelat. Upaya ini dapat dipandang lebih ekonomis dan ramah lingkungan karena dapat menghindari penggunaan insektisida yang berlebihan (Maqbool *et al.*, 2001). Upaya perakitan kultivar padi tahan wereng cokelat dapat dilakukan dengan berbagai metode, salah satunya yaitu metode intrograsi atau penggabungan gen-gen ke dalam satu kultivar melalui persilangan.

Pemilihan tetua persilangan sebagai tetua donor yang memiliki ketahanan terhadap wereng cokelat, merupakan tahap awal untuk intrograsi gen. Berdasarkan studi literatur, diketahui bahwa genotip PTB-33 merupakan salah satu kultivar tahan wereng cokelat dengan beberapa gen tahan wereng cokelat (*Bph* atau *bph*) (Jairin *et al.*, 2007a; Nugaliyadde *et al.*, 2004; Santhanalakshmi *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2005). PTB-33 merupakan kultivar introduksi dari India yang memiliki gen ketahanan terhadap wereng cokelat, yaitu *bph2*, *Bph3*, *bph4* yang terdapat pada

kromosom 6, serta beberapa gen ketahanan lainnya yang diduga merupakan *quantitative trait loci* (QTL) (Santhanalakshmi *et al.*, 2010). Gen-gen *bph* inilah yang direncanakan untuk diintrogresikan ke dalam padi kultivar unggul Indonesia (IR-64, Pandan Wangi, Ciherang, dan Sintanur) sehingga akan diperoleh galur-galur padi harapan yang memiliki ketahanan terhadap wereng cokelat. Kultivar-kultivar unggul Indonesia tersebut dipilih karena memiliki hasil dan kualitas beras yang tinggi, namun rentan terhadap wereng cokelat.

Marker Assisted Selection (MAS), upaya untuk menyeleksi tanaman dengan karakter yang diinginkan dengan memanfaatkan teknologi marka molekuler, telah banyak diaplikasikan untuk beberapa tanaman. Aplikasi MAS dengan marka-marka *Simple Sequence Repeats* (SSR) yang merupakan marka yang sangat polimorfik dan berbasis PCR (*Polymerase Chain Reaction*), sehingga relatif mudah untuk diterapkan.

Jena *et al.* (2009) telah berhasil mengaplikasikan teknik MAS untuk merakit padi Japonica yang tahan wereng cokelat, salah satunya dengan aplikasi SSR. Penggunaan metode SSR untuk aplikasi MAS telah berhasil diaplikasikan pada tanaman padi untuk berbagai tujuan termasuk perakitan kultivar padi tahan hama (Jena *et al.*, 2006; Jena *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2006;). Penggunaan MAS sangat bermanfaat untuk membantu proses seleksi galur-galur yang sedang bersegregasi dan memiliki karakter dan komposisi gen-gen yang diharapkan.

Salah satu syarat keberhasilan MAS dengan metode SSR adalah tersedianya marka-marka spesifik yang mampu mendeteksi gen terkait. Berdasarkan hal itu, dalam penelitian ini akan digunakan beberapa marka SSR, yaitu RM589 dan

RM586 yang terpaut dengan gen *Bph3* dan *bph4* (Jairin *et al.*, 2007b; Jena & Mackill, 2008), RM8213 dan RM5953 yang terpaut dengan gen *Bph17(t)* (Sun *et al.*, 2005), serta beberapa marka lainnya (RM7, RM8072, dan RM19291) yang diketahui dapat mendeteksi keberadaan gen *bph*. RM589 dan RM586 telah terbukti berhasil mendeteksi gen *bph* pada kultivar PTB-33, namun marka-marka lainnya belum pernah digunakan untuk mendeteksi gen *bph* pada kultivar PTB-33 dan kultivar lainnya yang digunakan pada penelitian ini. Marka-marka ini nantinya akan diuji (diskrining) untuk mengetahui kehandalannya dalam membedakan kultivar tahan dan rentan. Marka yang lolos seleksi akan digunakan untuk aplikasi MAS pada generasi keturunan.

Upaya lain yang harus dilakukan selain upaya introgresi dan aplikasi MAS dalam rangka memperoleh kultivar tahan wereng cokelat yang *durable* yaitu mengetahui karakter penting yang dimiliki oleh kultivar tahan.

Karakter penting tanaman mempunyai peranan yang signifikan terhadap kemampuan tanaman untuk bertahan dari serangan wereng (Chen, 2009; Horgan, 2009; Manuwoto & Adijuwana, 1991; Wang *et al.*, 2008). Lebih lanjut Horgan (2009) mengemukakan bahwa pendekatan baru dalam pengembangan kultivar resistan yang *durable* didasarkan pada strategi untuk menggabungkan gen (*pyramiding*), dimana strategi ini bergantung kepada pengetahuan mengenai fungsi gen yang berhubungan dengan sistem ketahanan. Informasi mengenai karakter penting tanaman seperti kandungan protein serta hubungannya dengan keberadaan gen Bph hasil aplikasi MAS pada kultivar tahan, nantinya dapat digunakan untuk mengembangkan galur-galur padi harapan yang memiliki tingkat ketahanan yang tinggi, *broad spectrum* terhadap biotipe wereng cokelat (Brar *et al.*, 2009) dan memiliki ketahanan yang bersifat *durable*.

Berdasarkan pemaparan di atas, penggunaan teknik introgresi yang digabungkan dengan aplikasi MAS merupakan cara yang efektif untuk merakit kultivar padi tahan wereng cokelat. Hasil akhir yang diharapkan dari penelitian ini yaitu diperolehnya marka-marka SSR yang terbukti dapat membedakan kultivar tahan dan rentan berdasarkan ukuran pita DNA sehingga bisa digunakan untuk aplikasi MAS. Selain itu, diharapkan diperoleh informasi mengenai perbedaan karakter penting antara kultivar tahan dan rentan serta korelasinya dengan marka-marka SSR yang digunakan, sehingga dapat digunakan

sebagai dasar perakitan dan seleksi berdasarkan karakter tanaman.

Analisis korelasi karakter fisiologis dengan marka SSR yang digunakan bertujuan untuk mengetahui seberapa tinggi keeratan antara marka SSR yang digunakan, gen *Bph* yang terkait, serta karakter fisiologis yang dimunculkan tanaman. Saat ini telah berhasil diketahui sejumlah karakter fisiologis yang berkorelasi dengan ketahanan tanaman seperti kandungan asparagin, kandungan triclin, dan lapisan lilin (*wax*) pada permukaan daun (Horgan, 2009).

Informasi mengenai gen-gen Bph yang mengendalikan karakter fisiologis tersebut juga telah dipublikasikan oleh Horgan (2009), namun masih banyak gen-gen Bph yang belum diketahui fungsinya. Melalui penggunaan marka yang tepat, dapat diketahui gen-gen Bph yang bertanggung jawab dalam mengendalikan karakter fisiologis yang mendukung ketahanan kultivar PTB-33. Informasi korelasi yang diperoleh pada penelitian ini nantinya dapat digunakan sebagai informasi dasar ataupun acuan untuk seleksi tidak langsung menggunakan marka SSR yang teruji mempunyai nilai korelasi tinggi dengan karakter fisiologis dalam perakitan tanaman padi tahan wereng cokelat.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Kebun Percobaan dan Laboratorium Analisis Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran. Bahan tanaman yang digunakan adalah kultivar padi tahan wereng cokelat yaitu PTB-33 sebagai tetua donor, sedangkan untuk tetua betina digunakan kultivar padi unggul Indonesia yaitu IR-64, Ciherang, Pandan Wangi, dan Sintanur.

Analisis Karakter Penting

Persiapan tanaman padi untuk analisis karakter-karakter penting tetua dilakukan berdasarkan metode Wang *et al.* (2008) yang telah dimodifikasi. Penanaman disusun berdasarkan Rancangan Acak Kelompok (RAK). Lima kultivar ditanam pada pot-pot sebanyak 10 tanaman setiap kultivar dan diulang 5 kali. Saat tanaman berumur 30 hst, dilakukan pengamatan karakter fisiologis pada 10 tanaman pada setiap ulangan yang dipilih secara acak. Sampel tanaman tersebut diamati karakter-karakter penting dan dilakukan analisis kandungan protein setelah pemanenan.

Pengamatan karakter pertumbuhan meliputi pengukuran luas daun dan panjang trikoma (di bawah mikroskop). Pengamatan karakter fotosintesis meliputi bukaan stomata, kandungan klorofil, dan laju fotosintesis. Sampel daun yang diambil untuk pengamatan adalah daun ketiga, sebanyak tiga daun per rumpun, dan tiga titik pengamatan setiap daun (bagian ujung, tengah, dan pangkal). Pengukuran bukaan stomata diukur dengan menggunakan alat Porometer, pengukuran kandungan klorofil dilakukan dengan menggunakan alat *Chlorophyll Content Meter* (OPTI SCIENCES CCM 200 Plus), pengukuran laju fotosintesis diukur menggunakan *Portable Photosynthetic Meter*, dan pengukuran panjang trikoma menggunakan mikroskop. Metode pengujian kandungan protein berdasarkan Wang *et al.* (2008).

Marker Screening

Seleksi marka dilakukan dengan marka *Single Sequence Repeat* (SSR) berbasis PCR. Marka-marka yang ditelusuri melalui literatur, selanjutnya diuji untuk mendeteksi gen Bph pada kultivar PTB-33. Ekstraksi DNA menggunakan metode *Cetyl trimethylammonium bromide* (CTAB) oleh Doyle dan Doyle (1987) dengan sedikit modifikasi. Pengujian kualitas dan kuantitas DNA menggunakan

spektrofotometer pada panjang gelombang 260/280 nm. Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan mesin PCR dengan komponen PCR berupa 9,5 µL KAPA2G1M Fast Ready Mix DNA polymerase (0,25 U), dNTPs (0,2 Mm), MgCl₂ (1,5 Mm), 1µL primer forward dan reverse, serta 1µL template (20 ng DNA). Skrining marka menggunakan delapan marka molekuler yang terkait erat dengan karakter ketahanan terhadap wereng cokelat (Table 1).

Produk hasil amplifikasi PCR dielektroforesis menggunakan 1,5%- 3,0% gel agarose dalam larutan buffer 0,5x TBE yang dirunning pada durasi waktu dan besaran tegangan listrik tertentu. Hasil visualisasi DNA dideteksi melalui UV-transiluminator [*gel documentation system* (G-Box dari Syngene) dan sebagai standard digunakan 100bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific) untuk menetapkan ukuran pita hasil amplifikasi DNA]. Pengamatan pola pita DNA pada gel agarose dilakukan secara visual. Pola pita DNA polimorfis, jika terdapat pola pita DNA yang berbeda ditunjukkan dengan ukuran yang berbeda minimal satu genotip uji. Sementara itu, jika pola pita DNA pada seluruh genotip uji memiliki pola yang sama, ditunjukkan dengan ukuran yang sama, maka pola pita DNA monomorfis.

Tabel 1. Marka-marka SSR yang digunakan untuk skrining marka dan gen Bph yang terkait

No	Marka	Gen terkait	Kromosom	Sekuens Primer		PCR product size	Sumber
				Forward	Reverse		
1.	RM7	<i>Qbph 3</i>	3	ttcgccatgaagtctctcg	cctcccatcatttcgtgtt	180bp	1
2.	RM313	<i>Qbph 3</i>	3	tgctacaagtgttcttcaggac	gctcacctttgtgttcac	111bp	1
3.	RM8072	<i>Bph 3</i>	6	gatcactcaggtcatccattc	aatcagagaggctaaagacaataat	146bp	2
4.	RM19291	<i>Bph 3</i>	6	cacttgacgtgtcctctgtacg	gtgtttcagttcacttgcacg	146bp	2
5.	RM586	<i>Bph 3</i> dan <i>bph 4</i>	6S dan 6	acctcgctgtattaggtacc	gagatagccaacgagatacc	271bp	2
6.	RM589	<i>Bph 3</i> dan <i>bph 4</i>	6S dan 6	atcatggctgggtgcttaac	caggttccaacgagactg	186bp	2
7.	RM5953	<i>Qbph 4</i> dan <i>Bph 17(t)</i>	4 dan 4S	aaactttctgtgatgtatc	atcctgtctagaattgaca	129bp	1
8.	RM8213	<i>Qbph 4</i> dan <i>Bph 17(t)</i>	4 dan 4S	agcccagtgatacaaatgatg	gcgaggagataccaagaag	177bp	1

Keterangan: 1: Sun *et al.* (2005); 2: Jairin *et al.*, 2007a

Analisis Data

Data hasil pengamatan karakter karakter penting yang diperoleh diuji terlebih dahulu menggunakan uji normalitas Kolmogorov-Smirnov. Selanjutnya data dianalisis varian (ANOVA) dengan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dan perbedaan antar perlakuan diuji lanjut dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf nyata 5%. Korelasi antara data karakter penting dan data marka molekuler dianalisis menggunakan Z-Mantel. Data

diolah dengan menggunakan software SPSS v.17.0, DSAASTAT v.1.021, dan NTSys v.2.10q.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakter Penting Tanaman

Data pada Tabel 2 menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan antara kultivar tahan PTB-33 dengan kultivar lainnya untuk karakter luas daun, kandungan klorofil, dan konduktan stomata. Hal ini menunjukkan bahwa ketahanan pada kultivar PTB-

33 tidak berhubungan dengan ketiga karakter tersebut. Akan tetapi, studi yang dilakukan Wang *et al.* (2008) memperlihatkan bahwa karakter luas daun, kandungan klorofil, dan konduktan stomata pada kultivar rentan mengalami penurunan saat

diinfeksi dibandingkan dengan kultivar tahan. Hal ini menunjukkan bahwa mekanisme ketahanan tanaman padi terhadap hama wereng cokelat berbeda-beda.

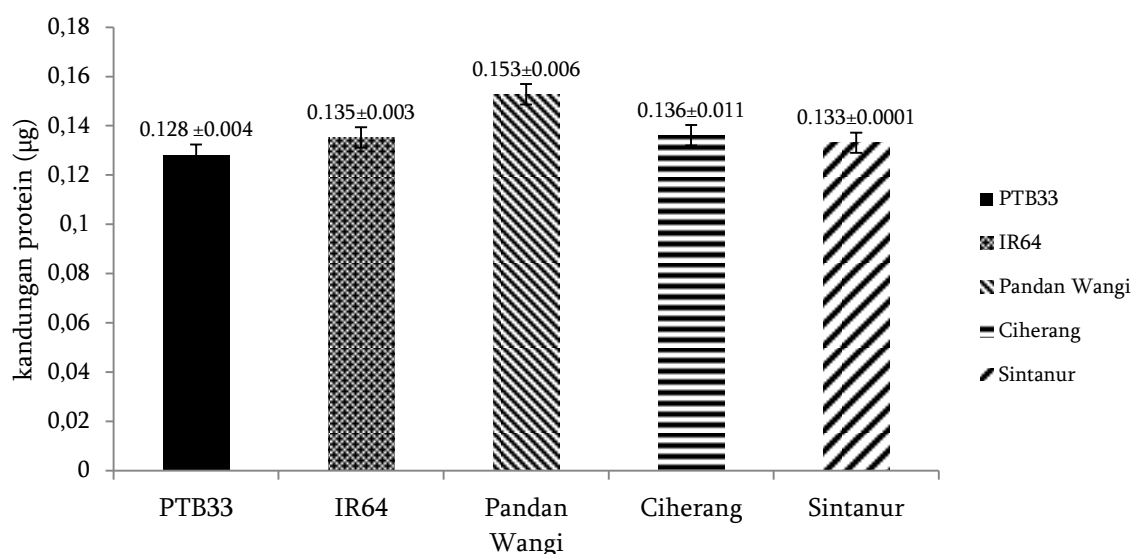
Tabel 2. Hasil analisis karakter penting lima genotip padi

Kultivar	Luas daun (cm ²)	Kandungan klorofil (CCI)	Konduktan stomata (s/m)	Fotosintesis (μmol/m ² s)	Panjang trikoma (mm)
PTB-33	1,66 a	1,69 a	406,32 a	7,28 a	0,82 a
IR-64	2,06 a	2,06 a	516,60 a	6,27 ab	0,18 b
Pandan Wangi	2,25 a	2,03 a	434,32 a	7,41 a	0,17 bc
Ciherang	2,23 a	1,97 a	496,40 a	5,83 b	0,12 c
Sintanur	1,82 a	1,88 a	375,80 a	7,48 a	0,18 b

Keterangan : nilai rata-rata yang memiliki huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji Jarak Berganda Duncan pada taraf 5%.

Hasil pengujian pada karakter laju fotosintesis menunjukkan bahwa kultivar PTB-33 memiliki laju fotosintesis yang lebih tinggi, namun tidak berbeda nyata jika dibandingkan dengan kultivar IR-64, Pandan Wangi, dan Sintanur (Tabel 2). Laju fotosintesis yang tinggi selain berpengaruh terhadap hasil tanaman, juga dapat menjadi pertahanan tanaman terhadap serangan hama (Johnson *et al.*, 1983). Wang *et al.*, (2008) juga menjelaskan bahwa kultivar tahan mempunyai kemampuan untuk mengembalikan aktivitas fotosintesis seperti semula dan tumbuh normal jika terjadi serangan wereng cokelat. Laju fotosintesis yang tinggi pada kultivar PTB-33 dapat menjadi salah satu faktor pendukung ketahanan kultivar ini terhadap wereng cokelat.

Perbedaan yang signifikan antara kultivar tahan PTB-33 dibandingkan empat kultivar lainnya yang diuji hanya ditunjukkan oleh karakter panjang trikoma (Tabel 2). Pada karakter panjang trikoma, hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa kultivar PTB-33 memiliki rata-rata panjang trikoma 0,82 mm, jauh melebihi kultivar lainnya yang memiliki rata-rata 0,12 - 0,18 mm. Penelitian yang telah dilakukan Junengsih dkk. (2012) sebelumnya menunjukkan bahwa kultivar PTB-33 memiliki trikoma yang lebih rapat dibandingkan kultivar IR-64 dan Ciherang. Adanya trikoma yang panjang dan rapat ini dapat menjadi salah satu faktor ketahanan kultivar PTB-33. Hu *et al.* (2013) menyatakan bahwa trikoma daun bermanfaat sebagai mekanisme ketahanan terhadap stress biotik dan abiotik.



Gambar 1. Kandungan protein total pada lima kultivar padi menggunakan metode Bradford. Data menunjukkan nilai rerata dengan kesalahan baku dari rerata

Beberapa penelitian yang telah dilakukan sebelumnya menyebutkan bahwa kultivar PTB-33 memiliki mekanisme ketahanan berupa antibiosis (Baehaki & Abdullah, 2007) dan toleran (Baehaki & Abdullah, 2007; Kaneda *et al.*, 1981). Mekanisme ketahanan antibiosis ditunjukkan melalui kandungan protein (Dong *et al.*, 2017; Ren *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2009). Rendahnya protein pada kultivar PTB-33 menghalangi pemanfaatan unsur nutrisi oleh wereng cokelat sehingga menghambat perkembangan populasi wereng cokelat. Selain faktor biofisik, faktor biokimia tanaman juga diketahui berfungsi sebagai sistem pertahanan terhadap wereng cokelat (Manuwoto & Adijuwana, 1991).

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa kandungan protein kultivar PTB-33 lebih rendah yaitu sebanyak 0,128 µg, dibanding kultivar lainnya (Gambar 1). Mattson (1980) menyatakan bahwa tanaman dengan kandungan protein rendah dapat menyebabkan pertumbuhan serangga tertekan. Lebih lanjut Hao *et al.* (2018) membuktikan bahwa protein pada tanaman padi yang bertanggung jawab dalam ketahanan terhadap wereng cokelat adalah *shaftoside* (yang berinteraksi dengan NICDK1 (cyclin-dependent kinase 1) yang dimiliki oleh wereng cokelat. Berdasarkan pendapat tersebut, maka kandungan protein yang rendah pada kultivar PTB-33 diduga menjadi salah satu faktor pembentuk ketahanan yang tinggi terhadap wereng cokelat pada kultivar ini.

Marker Screening (Skrining Marka)

Berdasarkan visualisasi yang telah dilakukan pada delapan marka SSRs, diperoleh hasil bahwa empat marka SSRs menunjukkan adanya polimorfisme dan empat marka lainnya menunjukkan pola pita monomorfis. Marka RM7 dan RM313 yang diketahui mendeteksi gen *Qbph3* pada kromosom 3 (Sun *et al.*, 2005), tidak menunjukkan adanya polimorfisme (monomorfik) antar pita DNA pada tiap kultivar yang diuji (Gambar 2). Semua kultivar uji memiliki pita DNA dengan ukuran yang sama, yaitu 180bp untuk RM7 dan 111bp untuk RM313, sesuai dengan PCR *product size* untuk masing-masing marka tersebut.

Hasil ini menunjukkan bahwa pada semua kultivar yang diuji memiliki gen *Qbph3*. Hasil yang sama juga diperoleh untuk marka RM8072 yang mendeteksi gen *Bph3* pada kromosom 6 (Jairin *et al.*, 2007a) (Gambar 3), dimana semua kultivar uji memiliki pita DNA dengan ukuran 146bp, yang

menunjukkan bahwa semua kultivar memiliki gen *Bph3*. Polimorfisme secara jelas ditunjukkan oleh marka RM586 dan RM589, yang merupakan marka pendeteksi gen *Bph3* dan *bph4* pada kromosom 6S dan 6 (Jairin *et al.*, 2007a) (Gambar 4), serta marka RM8213 yang mendeteksi dua gen yaitu *Qbph4* dan *Bph17(t)* pada kromosom 4 (Sun *et al.*, 2005) (Gambar 5).

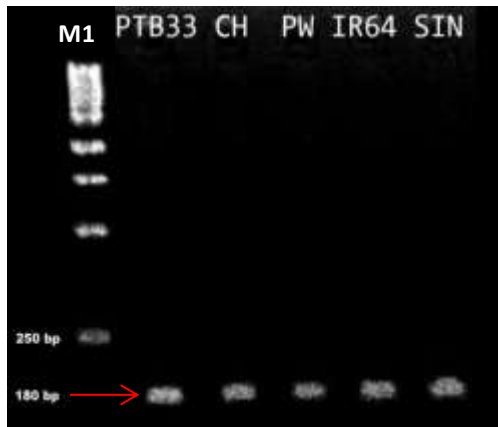
Pada marka RM586 dan RM589, ukuran pita DNA yang ditunjukkan oleh kultivar PTB-33 (271bp) berbeda dengan kultivar lainnya kecuali kultivar IR-64. Kesamaan ukuran pita DNA ini dapat disebabkan karena kedua kultivar ini memiliki gen *Bph*, khususnya gen *Bph* yang terpaut dengan kedua marka yang digunakan. Marka RM586 dan RM589 diketahui terpaut dengan gen *Bph3* dan *bph4* pada kromosom 6. Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa gen *Bph3* dan *bph4* telah diteliti dimiliki oleh kultivar PTB-33 dan kultivar IR-64 (Jairin *et al.*, 2007a; Santhanalakshmi *et al.*, 2010). Oleh karena itu, penggunaan RM586 dan RM589 nantinya hanya digunakan untuk persilangan kultivar PTB-33 dengan kultivar lainnya, kecuali kultivar IR-64. Hal ini memperlihatkan bahwa terdapat kemungkinan kultivar PTB-33 memiliki gen *Qbph4* dan *Bph17(t)*, sehingga menyebabkan adanya polimorfisme dengan kultivar lainnya.

Hasil yang berbeda diperlihatkan oleh RM5953, dimana tidak adanya polimorfisme antar kultivar yang diuji, padahal RM5953 diketahui terpaut dengan gen yang sama dengan RM8213, yaitu gen *Qbph4* dan *Bph17(t)*. Semua kultivar terlihat memiliki pita DNA dengan ukuran 129bp sesuai dengan PCR *product size* yang diharapkan (Gambar 5). Tidak ada polimorfis pada RM5953 diduga karena perbedaan ukuran fragmen DNA genotip tahan dan genotip peka yang terlalu kecil, tidak dapat dipisahkan pada agar agarose. Oleh karena itu, dibutuhkan optimasi yang lebih baik pada saat elektroforesis, seperti penggunaan *Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (PaGE) yang dapat memisahkan pita DNA lebih baik daripada agarose gel yang digunakan pada penelitian ini. Adanya kedua gen tersebut, ditambah beberapa gen *Bph* yang telah diketahui sebelumnya pada kultivar PTB-33 seperti *Bph3* dan *bph4* (Jairin *et al.*, 2007a; Santhanalakshmi *et al.*, 2010), menjadi salah satu alasan ketahanan yang tinggi pada kultivar ini terhadap berbagai biotipe wereng cokelat.

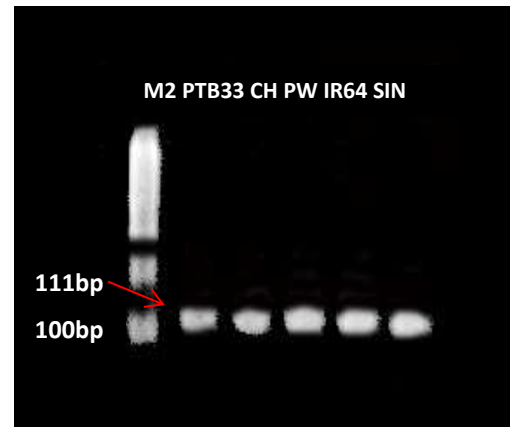
Maqbool *et al.*, (2001) menyatakan bahwa adanya beberapa gen ketahanan dalam satu kultivar

diketahui dapat membentuk ketahanan yang tinggi pada tanaman. Selanjutnya, berdasarkan hasil visualisasi tersebut, maka RM8213 akan digunakan

sebagai marka penyeleksi keturunan hasil persilangan antara kultivar PTB-33 dengan kultivar lainnya.

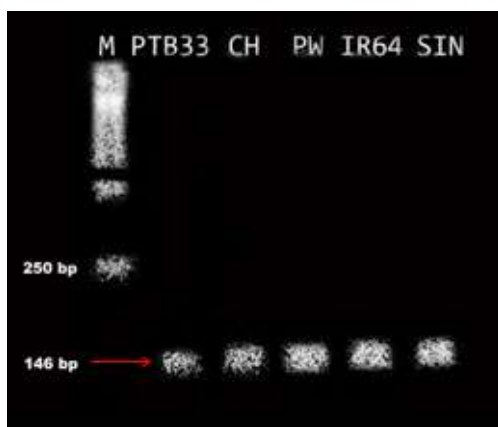


(a)

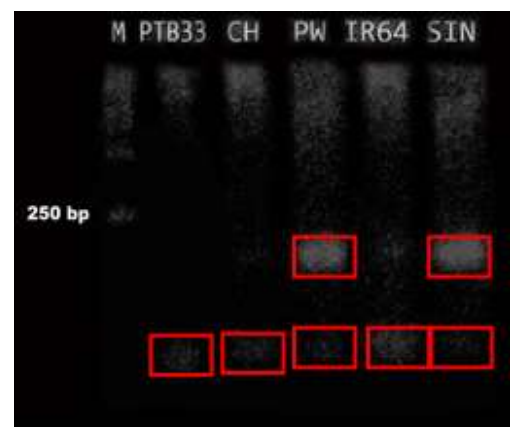


(b)

Gambar 2. Hasil visualisasi (a) RM7 dan (b) RM313 pada lima kultivar padi. Ket: M1 = DNA Ladder 1000bp; PTB33; CH = Ciherang; PW = Pandan Wangi; Sin = Sintanur; M2 = DNA Ladder 100bp



(a)



(b)

Gambar 3. Hasil visualisasi (a) RM8072 dan (b) RM19291 pada lima kultivar padi. Ket: M = DNA Ladder 1000bp; PTB33; CH = Ciherang; PW = Pandan Wangi; Sin = Sintanur

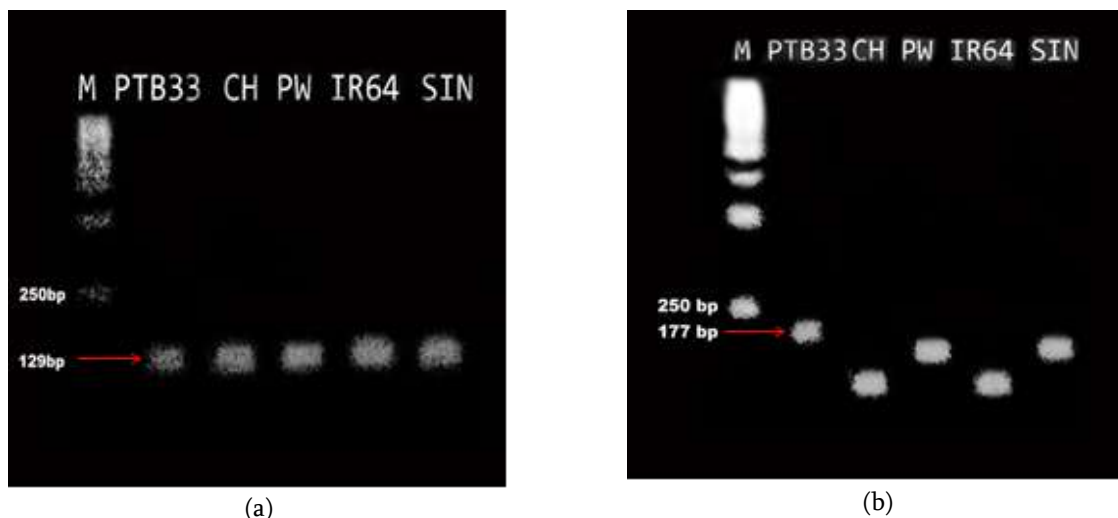


(a)



(b)

Gambar 4. Hasil visualisasi (a) RM586 dan (b) RM589 pada lima kultivar padi. Ket: M = DNA Ladder 1000bp; PTB33; CH = Ciherang; PW = Pandan Wangi; Sin = Sintanur



Gambar 5. Hasil visualisasi (a) RM5953 dan (b) RM8213 pada lima kultivar padi. Ket: M = DNA Ladder 1000bp; PTB33; CH = Ciherang; PW = Pandan Wangi; Sin = Sintanur.

Korelasi Marka dengan Karakter Penting

Analisis korelasi difokuskan pada marka yang menunjukkan polimorfisme dengan karakter penting yang berbeda nyata pada kultivar PTB-33 dibandingkan kultivar lainnya. Hasil analisis Z-mantel pada Tabel 3 memperlihatkan bahwa korelasi yang sangat tinggi ditunjukkan oleh karakter laju fotosintesis dengan marka RM8213 ($z = 0,94$; $p\text{-value} = 0,00001$) dan karakter panjang trikoma dengan RM8213 ($z = 0,97$; $p\text{-value} = 0,00001$) dan korelasi yang tinggi antara kandungan protein dengan RM586 ($z = 0,83$; $p\text{-value} = 0,00001$). Rohlf (2000) menyatakan bahwa nilai $z > 0,9$ menunjukkan bahwa adanya kecocokan yang sangat baik antara dua matriks yang diuji, kemudian nilai $z > 0,8$ yang berarti baik, sedangkan nilai $z < 0,7$ menunjukkan korelasi yang sangat lemah. Tingginya nilai z menunjukkan bahwa RM8213 terkait erat dengan pembentukan karakter laju fotosintesis dan panjang trikoma, serta RM586 terkait dengan kandungan protein pada kultivar yang diuji. Oleh karena itu, RM8213 nantinya dapat digunakan sebagai marka penseleksi untuk ketahanan terhadap wereng coklat berdasarkan karakter laju fotosintesis dan panjang trikoma, dan RM586 sebagai marka penyeleksi berdasarkan kandungan protein pada genotip hasil persilangan.

Gen *Bph* yang terpaat dengan kedua marka tersebut (RM586 dan RM8213) yaitu gen *Bph3*, *bph4*, *Qbph4* dan *Bph17(t)*. Horgan (2009) telah melakukan studi review terhadap beberapa gen *bph* dan karakter yang terkait, antara lain gen *Bph1* dan *Bph3* dengan lapisan lilin di permukaan daun, kandungan schaftosides yang lebih tinggi, serta gen

Bph3 dan *bph4* dengan kemampuan pertahanan tanaman saat diserang. Namun, fungsi dari gen *bph* lainnya (*Bph5* hingga *Bph21*) belum diketahui. Melalui penelitian ini, diperoleh beberapa informasi tambahan mengenai keterkaitan antaragen *Bph3*, *bph4*, *Qbph4* dan *Bph17(t)* dengan karakter penting terkait ketahanan tanaman.

Tabel 3. Hasil analisis Z-Mantel untuk korelasi marka molekuler dengan karakter penting tanaman

Marka SSR	Karakter penting		
	Laju fotosintesis	Panjang trikoma	Kandungan protein
RM586	0,39	0,18	0,83*
RM589	0,62	0,28	0,16
RM8213	0,94*	0,97*	0,52

Keterangan: Angka pada tabel menunjukkan nilai z berdasarkan analisis Z-Mantel.

Pada populasi bersegregasi seleksi berdasarkan genotipik dapat dilakukan pada usia dini dibandingkan dengan seleksi fenotipik (Ashkani *et al.*, 2012; Collard & Mackill, 2010; Jena & Mackill, 2008). Beberapa penelitian pada padi menunjukkan gen target bisa diidentifikasi lebih baik pada populasi bersegregasi pada berbagai fase pertumbuhan tanaman dengan penggunaan marka DNA yang terkait erat (Huang *et al.*, 1997; Ashkani *et al.*, 2012). Hanya saja belum diketahui seberapa besar pengaruh gen-gen *bph* tersebut terhadap kedua karakter terkait, karena adanya gen-gen lain yang diketahui berperan terhadap laju fotosintesis dan panjang trikoma. Laju fotosintesis diketahui dikendalikan oleh banyak gen sedangkan karakter

trikoma pada padi antara lain dikendalikan oleh gen Glabrous Rice 1 (GLR1) (Hachtel, 1997; Li *et al.*, 2012). Oleh karena itu, dibutuhkan penelitian lebih lanjut di tingkat molekuler dan fenotipik pada galur-galur keturunan untuk mengetahui fungsi masing-masing gen *bph* dengan karakter penting terkait ketahanan tanaman.

SIMPULAN

1. Kultivar tahan wereng cokelat, PTB-33, cenderung memiliki laju fotosintesis yang lebih tinggi (toleran), trikoma yang lebih panjang (antixenosis), dan kandungan protein yang lebih rendah (antibiosis) dibandingkan kultivar lainnya.
2. Marka RM8213 menunjukkan pola pita (band) DNA yang berbeda (polimorfisme) untuk gen *Bph* terkait pada kultivar PTB-33 dibandingkan kultivar lainnya, sedangkan marka RM586 dan RM589 menunjukkan polimorfisme pada kultivar PTB-33 dan IR-64 dibandingkan dengan kultivar lainnya.
3. Marka RM586 dan RM8213 mempunyai korelasi yang sangat tinggi dengan karakter laju fotosintesis dan panjang trikoma, dan gen *Bph3* dan *bph4* berkorelasi tinggi dengan kandungan protein.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi yang telah membiayai sebagian riset ini melalui skema Hibah Strategis Nasional.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashkani, S, MY Rafii, I Rusli, M Sariah, Abdullah, NA Siti, HA Rahim, and MA Latif. 2012. SSRs for marker-assisted selection for blast resistance in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Molecular Biology Reporter. 30: 79–86.
- Baehaki, SE, dan B Abdullah. 2007. Evaluasi karakter ketahanan galur padi terhadap wereng coklat biotipe 3 melalui uji penapisan dan uji peningkatan populasi. Apresiasi Hasil Penelitian Padi. Hlm. 367–382.
- Brar, DS, PS Virk, KK Jena, and GS Khush. 2009. Breeding for resistance to planthoppers in rice. Pp. 401-428. In Planthoppers: New Threats to The Sustainability of Intensive Rice Production Systems in Asia (KL Heong and B Hardy, Eds.). International Rice Research Institute. Los Bannos.
- Chen, YH. 2009. Variation in planthopper-rice interactions: possible interaction among three species?. Pp. 315-339. In Planthoppers: New Threats to The Sustainability of Intensive Rice Production Systems in Asia (KL Heong and B Hardy, Eds.). International Rice Research Institute. Los Bannos.
- Collard, BCY, and DJ Mackill. 2010. Marker-assisted selection: an approach for precision of plant breeding in the twenty-first century. Philosophical Transactions of the Royal Society B. 363: 557–572.
- Dong, Y, X Fang, Y Yang, G-P Xue, X Chen, W Zhang, X Wang, C Yu, J Zhou, Q Mei, W Fang, C Yan, and J Chen. 2017. Comparative proteomic analysis of susceptible and resistant rice plants during early infestation by small brown planthopper. Frontiers in Plant Science. 8: 1744. DOI:10.3389/fpls.2017.01744.
- Doyle, JJ, and JL Doyle. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissues. Focus. 12: 13–15.
- Hachtel, W. 1997. DNA and Gene Expression in Photosynthetic Plastids (Chloroplasts). Hand Book of Photosynthesis. Marcel Dekker. New York.
- Hao, PY, YL Feng, YS Zhou, XM Song, HL Li, Y Ma, CL Ye, and XP Yu. 2018. Schaftoside interacts with NlCDK1 Protein: a mechanism of rice resistance to brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. Frontiers in Plant Science. 9: 710. DOI: 10.3389/fpls.2018.00710.
- Horgan, F. 2009. Mechanisms of resistance: a major gap in understanding planthopper-rice interactions. Pp. 281-302. In Planthoppers: New Threats to The Sustainability of Intensive Rice Production Systems in Asia (KL Heong and B Hardy, Eds.). International Rice Research Institute. Los Bannos.
- Hu, B, Y Wan, X Li, F Zhang, W Yan, and J Xie. 2013. Phenotypic characterization and genetic analysis of rice with pubescent leaves and glabrous hulls (PLgh). Crop Science. 53: 1878–1886.
- Huang, N, ER Angeles, J Domingo, G Magpantay, S Singh, Q Zhang, N Kumaravadivel, J Bennett, and GS Khush. 1997. Pyramiding of bacterial resistance genes in rice: marker-aided

- selection using RFLP and PCR. *Theoretical Applied Genetics*. 95: 313–320.
- Jairin, J, S Teangdeerith, P Leelagud, K Phengrat, A Vanavichit, and T Toojinda. 2007a. Detection of brown planthopper resistance genes from different rice mapping populations in the same genomic location. *Science Asia*. 33: 347–352.
- Jairin, J, K Phengrat, S Teangdeerith, A Vanavichit, and T Toojinda. 2007b. Mapping of a broad-spectrum brown planthopper resistance gene, Bph3, on rice chromosome 6. *Molecular Breeding*. 19: 35–44.
- Jena, KK, JU Jeung, JH Lee, HC Choi, and DS Brar. 2006. High-resolution mapping of a new brown planthopper (BPH) resistance gene, Bph18(t), and marker-assisted selection for BPH resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 112: 288–297.
- Jena, KK, and DJ Mackill. 2008. Molecular markers and their use in marker-assisted selection in rice. *Crop Science*. 48: 1266–1276.
- Jena, KK, JP Suh, JH Lee, SJ Yang, A Pamplona, and YG Kim. 2009. Development of brown planthopper (BPH) resistant breeding lines using marker-assisted selection in rice. *Crop Science*. 48(4): 1266–1276.
- Johnson, MW, SG Welter, NC Toscano, IP Ting, and JT Trumble. 1983. Reduction of tomato leaflet photosynthesis rates by mining activity of *Liriomyza sativae*. *Journal of Economic Entomology*. 76: 1061–1063.
- Junengsih, D Dono, dan N Carsono. 2012. Ketahanan padi transgenik DB-1 terhadap wereng coklat biotipe Sumatera Utara. Hasil Penelitian. [Tidak dipublikasikan].
- Kaneda, C, K Ito, and R Ikeda. 1981. Screening of rice cultivars for resistance to brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stal., by three genotypes. *Japanese Journal of Breeding*. 31(2): 141–151.
- Li, JB, MY Xia, HX Qi, GC He, BL Wan, and ZP Zha. 2006. Marker-assisted selection for brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) resistance genes Bph14 and Bph15 in rice. *Scientia Agricultura Sinica*. 39: 2132–2137.
- Li, J, Y Yuan, Z Lu, L Yang, R Gao, J Lu, J Li, and G Xiong. 2012. Glabrous Rice 1, encoding a homeodomain protein, regulates trichome development in rice. 5(1): 32. DOI: 10.1186/1939-8433-5-32.
- Manuwoto, S, dan H Adijuwana. 1991. Mekanisme dan faktor kimia yang mendasari resistensi beberapa varietas padi terhadap wereng batang coklat *Nilaparvata lugens* Stal (Homoptera : Delphacidae). *Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian Indonesia*. 1(1): 5–13.
- Maqbool, SB, S Riazuddin, NT Loc, AMR Gatehouse, JA Gatehouse, and P Christou. 2001. Expression of multiple insecticidal genes confers broad resistance against a range of different rice pests. *Molecular Breeding*. 7: 85–93.
- Mattson, WJ. 1980. Herbivory in relation to plant nitrogen content. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 11:119–161.
- Nagadhara, D, S Rameshi, I-C Pasalu, Y-K Rao, N-P Sarma, V-D Reddy, and K-V Rao. 2004. Transgenic rice plants expressing snowdrop lectin genes (GNA) exhibit high-level resistance to the whitebacked planthopper (*Sogatella furcifera*). *Theoretical and Applied Genetics*. 109: 1399–1405.
- Nugaliyadde, L, D-S Des Abeysiriwardena, L-G-A Samanmalee, R Pathirana, and R-M Wilkins. 2004. Inheritance of resistance in rice to brown planthopper: its implications on rice varietal improvement in Sri Lanka. Available online at http://www.goviya.lk/agri_learning/Paddy/Paddy_Research/Paddy_pdf/P3.pdf. Accessed 26 November 2010.
- Ren, J, F Gao, X Wu, X Lu, L Zeng, J Lv, X Su, H Luo, and G Ren. 2016. Bph32, a novel gene encoding an unknown SCR domain-containing protein, confers resistance against the brown planthopper in rice. *Scientific Reports*. 6: 37645. DOI: 10.1038/srep37645.
- Santhanalakshmi, S, S Saikumar, and S Rao. 2010. Mapping genetic lokus linked to brown planthopper linked to rice *Oryza sativa* L. *International Journal of Plant Breeding and Genetics*. 4: 13–22.
- Sharma, PN, A Torii, S Takumi, N Mori, and C Nakamura. 2004. Marker-assisted pyramiding of brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) resistance genes Bph1 and Bph2 on rice chromosome 12. *Hereditas*. 140: 61–69.
- Sun, L, C Su, C Wang, H Zhai, and J Wan. 2005. Mapping of a major resistance gene to the brown planthopper in the rice cultivar Rathu Heenati. *Breeding Science*. 55: 391–396.

- Sun, LH, CM Wang, CC Su, YQ Liu, HQ Zhai, and JM Wan. 2006. Mapping and marker-assisted selection of a brown planthopper resistance gene *bph2* in rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Genetica Sinica*. 33(8): 717–723.
- Wang, Y, X Wang, H Yuan, R Chen, L Zhu, R He, and G He. 2008. Responses of two contrasting genotypes of rice to brown planthopper. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 21(1): 122–132.
- Wei, Z, W Hu, Q Lin, X Cheng, M Tong, L Zhu, R Chen, and G He. 2009. Understanding rice plant resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*): a proteomic approach. *Proteomics*. 9: 2798–2808.