

Pengujian Kemurnian Genetik Benih Padi Galur F₃ (Pandanwangi x PTB33) Terseleksi Menggunakan Marka Molekuler *Simple Sequence Repeats (SSR)*

Syindy R. Nasihin¹, Weny H. Rizky², dan Nono Carsono^{2*}

¹Mahasiswa Magister Ilmu Tanaman Fakultas Pertanian Unpad, Jatinangor-Sumedang 45363.

²Staf Pengajar pada Lab. Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman Fakultas Pertanian Unpad, Jatinangor-Sumedang 45363.

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

ABSTRACT

Seed Purity Testing of F₃ Progeny of Rice Lines Derived from a Cross between Pandanwangi x PTB-33 Estimated by Simple Sequence Repeat Markers

Seeds with high purity is required to produce maximum crop yield. Genetic purity of selected F₃ rice seed progenies derived from a cross between Pandanwangi x PTB33 was estimated by SSR (simple sequence repeats) molecular markers. Objective of current experiment was to obtain rice seed with high genetic purity (100%) in terms of homogeneity of alleles. The experiment was conducted at Laboratory of Plant Analysis and Biotechnology, meanwhile field experiment was performed at Ciparanje Experimental Station, Faculty of Agriculture, Universitas Padjadjaran. Based on primer designed by Bradbury (aromatic trait) and primers RM589 and RM586 (supposed to correlate with brown planthopper resistance gene), seeds of F₃ selected had 100% genetic purity. SSR markers applied for each offspring were able to demonstrate the purity of the seed. Genotypes with 100% genetic purity can be continued for propagating their seeds.

Keywords: *F₃, seed purity, seed rice, SSR markers*

ABSTRAK

Benih dengan kemurnian genetik tinggi sangat diperlukan untuk produksi tanaman yang maksimal. Kemurnian genetik padi generasi F₃ hasil persilangan Pandanwangi x PTB-33 diestimasi dengan menggunakan marka molekuler SSR. Percobaan ini bertujuan untuk mendapatkan generasi F₃ yang memiliki kemurnian genetik 100%. Penelitian dilaksanakan di Kebun Percobaan Ciparanje, Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran dan Laboratorium Analisis dan Bioteknologi Tanaman. Hasil analisis menggunakan primer Bradbury menunjukkan 100% benih murni berdasarkan karakter aromatik, begitupun berdasarkan karakter ketahanan terhadap wereng (primer RM589 dan RM586) menunjukkan 100% benih murni. Marka molekuler SSR yang digunakan untuk verifikasi kemurnian mampu menunjukkan kemurnian genetik benih padi yang tinggi. Genotip PP dapat dilanjutkan untuk pengujian dan atau perbanyak benih sumber.

Kata kunci: benih padi, F₃, marka SSR, uji kemurnian genetik

PENDAHULUAN

Benih padi yang unggul dapat dilihat dari mutu benih itu sendiri, yang mencakup mutu genetik, mutu fisik dan mutu fisiologis (Sadjad, 1993). Mutu fisik dilihat dari penampilan benih secara fisik, mutu fisiologis merupakan viabilitas dari

benih tersebut, sedangkan mutu genetik benih salah satunya dilihat dari kemurnian genetik benih. Pengujian kemurnian genetik benih penting sebagai salah satu upaya penjaminan benih bermutu tinggi, yaitu sesuai dengan keunggulan benih itu sendiri (Budiarti dkk., 2011).

Metode pengujian benih secara konvensional dilakukan dengan mengamati benih secara visual dan verifikasi varietas menggunakan cara *grow out test* (ISTA, 2008). Menurut Wahyuni dkk. (2008) pengujian benih secara konvensional memiliki beberapa kelemahan antara lain, terdapat kemiripan bentuk gabah yang cukup tinggi pada beberapa varietas sehingga sulit dibedakan secara visual. Kasus lain seperti saat sertifikasi, pengamatan berdasarkan observasi visual saja mengakibatkan lot benih tidak lulus sertifikasi benih, karena mutu benih yang dianggap rendah (Mulsanti, 2011).

Penggunaan marka molekuler dapat dijadikan sebagai alternatif teknologi baru yang dimanfaatkan untuk pengujian kemurnian genetik benih yang cepat (tidak harus melalui satu siklus pertanaman), tepat dan akurat (tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan, stadia pertumbuhan tanaman dan tipe sel atau jaringan benih). Pengujian ini dilakukan dengan melihat kemiripan atau kedekatan antara pola pita yang terbentuk antara suatu populasi dengan tetuanya atau dengan standar marka yang digunakan (Yashitola *et al.*, 2002). Di Indonesia hingga saat ini, pengujian kemurnian benih menggunakan marka molekuler belum banyak dilakukan, sehingga penelitian ini dapat memperkaya wawasan tentang pengujian benih menggunakan marka molekuler.

Metode referensi untuk verifikasi varietas termasuk pengujian genetik menggunakan marka molekuler telah ditetapkan oleh *International Seed Testing Association* (ISTA). Contoh untuk pengujian kemurnian genetik benih gandum adalah dengan penggunaan SSR (*Simple Sequence Repeat*), dan pada jagung hibrida digunakan metode verifikasi dengan UTIELF (*Ulthra-thin Layer Isoelectric Focusing*) (ISTA, 2008). Hal ini menunjukan bahwa marka molekuler dapat digunakan sebagai standar uji kemurnian genetik benih.

Sejak beberapa tahun lalu, Laboratorium Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran telah berupaya untuk merakit varietas unggul baru yang memiliki karakter unggul yang diharapkan, antara lain perakitan varietas unggul baru yang memiliki karakter padi aromatik (kultivar Pandanwangi) dan tahan wereng (PTB33), menghasilkan genotip PP sejumlah 20 galur terseleksi. Benih padi generasi F₃ yang merupakan hasil silangan dari tetua yang memiliki karakter-karakter unggul yang diharapkan dan telah diseleksi di F₂ berdasarkan marka molekuler dan secara fenotipik. Kemurnian genetik benih padi tersebut belum diuji, guna pengujian awal bagi calon-calon

galur potensial, diperlukan uji kemurnian genetik benih untuk mendukung terakitnya varietas unggul yang dapat dijadikan sebagai benih sumber.

Marka-marka SSR yang akan digunakan untuk mendeteksi gen ketahanan terhadap wereng pada populasi PP adalah RM589 dan RM586, yang mendeteksi gen *Bph3* dan *bph4* (Jairin *et al.*, 2007). Primer untuk mendeteksi aromatik pada populasi PP yaitu marka Bradburry terdiri atas *Fragrant Antisense Primer* (IFAP) dan Internal *Non-fragrant Sense Primer* (INSP) (Bradbury *et al.*, 2005). Marka-marka ini telah terbukti mampu menunjukkan polimorfis (pola pita yang berbeda).

Gen yang dapat terdeteksi berdasarkan marka yang digunakan pada populasi PP kemudian dilakukan analisis data dengan melihat pola pita DNA yang dibandingkan dengan tetuanya, sehingga dapat dihitung persentase kemurnian dari benih padi generasi F₃ terseleksi. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh data kemurnian genetik benih padi genotip PP generasi F₃ yang terseleksi sehingga dapat dijadikan dasar untuk langkah seleksi ataupun perbanyak benih yang akan dilakukan pada generasi selanjutnya.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di rumah kaca Ciparanje dan Laboratorium Analisis dan Bioteknologi Tanaman, Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran. Kegiatan penanaman benih padi generasi F₃ dilakukan di rumah kaca sedangkan untuk kegiatan pengujian menggunakan marka molekuler dilakukan di Laboratorium Analisis dan Bioteknologi Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran. Penelitian dilaksanakan pada bulan April sampai Oktober 2013.

Kegiatan penanaman benih padi memerlukan beberapa peralatan yaitu baki persemaian dan ember. Peralatan yang digunakan untuk kegiatan percobaan molekuler yaitu sarung tangan, pestle, mortar, spatula, micro tube, PCR (mastercycler Epgradient dari Eppendorf), spectrophotometer (Rayleigh UV-9200), tangki elektroforesis, alumunium foil, *gel documentation system* (G-Box dari Syngene), *refrigerated microcentrifuge* (Eppendorf), pipet dan pipet tip beragam ukuran, lemari pendingin, dan inkubator.

Benih padi generasi F₃ yang digunakan merupakan benih hasil seleksi yaitu genotip PP-228 (hasil persilangan Pandanwangi dan PTB 33) sebanyak 36 tanaman. Bahan tanaman yang

digunakan untuk isolasi DNA adalah daun yang berumur 3 MST (Minggu Setelah Tanam). Bahan yang digunakan dalam percobaan molekuler adalah ethanol, isopropanol, fenol, chloroform, ethidium bromide, CTAB, PCR kit KAPA2G™ Fast ReadyMix (2X) (KapaBiosystems), *primer* RM589, RM586 dan *primer* Bradburry (Sigma-aldrich), *loading dye* (Thermo-Scientific), aquades, TE buffer, dan mili-Q.

Isolasi DNA dilakukan dengan metode CTAB (*Cetyl trimethylammonium bromide*) (Dellaporta *et al.*, 1983). Pengujian kuantitas dan kualitas DNA hasil isolasi dilakukan dengan mesin *Spectrophotometer* (Rayleigh UV-9200). Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA (Sambrook & Russel, 1989). Amplifikasi PCR dilakukan menggunakan mesin PCR Thermocycler (Eppendorf).

Sebelum melakukan proses elektroforesis, dibuat gel terlebih dahulu. Langkah pembuatan gel agarose konsentrasi 1,5% yaitu menimbang serbuk agarose sebanyak 0,9 gram kemudian dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer. Serbuk agarose yang sudah ditimbang, lalu ditambahkan TBE 0,5X sampai volume 60 ml dalam gelas ukur dan dimasukkan ke dalam oven microwave ±2 menit. Setelah itu, larutan dituangkan ke dalam *tray* elektroforesis selanjutnya dipasang *comb* untuk mencetak "sumur". Larutan didiamkan hingga dingin dan mengeras. Setelah gel agarose mengeras, cetakan *comb* dicabut.

Proses selanjutnya yaitu dilakukan pengisian tangki dengan memasukkan *TBE buffer* 0,5X ke dalam tangki elektroforesis. Gel agarose dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis, dan ditunggu hingga dingin. DNA hasil PCR dimasukkan ke dalam "sumur" gel agarose sebanyak 2µl ditambah 1µl *loading dye* (Thermo-Scientific). Setelah semua "sumur" terisi, dilakukan *running* elektroforesis. Setelah selesai, dilakukan pewarnaan pada gel agarose dengan direndam menggunakan larutan 0,2 µg/ml *Ethidium-Bromide* selama 30 menit, kemudian dipindahkan dan rendam gel agarose dalam aquades steril untuk selama 15 menit. Proses visualisasi gel agarose dilakukan dengan memindahkan ke mesin *Gel documentation system* (G-Box dari Syngene), untuk melihat hasil akhir dari amplifikasi yang dilakukan.

Analisis data yaitu dengan pengamatan pola pita DNA hasil visualisasi. Pengamatan pada kegiatan marka molekuler yang dilakukan meliputi pembacaan pita DNA hasil visualisasi. Pengamatan dilakukan dengan melihat pola pita DNA yang terbentuk pada generasi F₃ yang dibandingkan dengan tetua persilangan yang memiliki karakter

yang diduga terpaut. Pola pita yang sama dengan tetua penyumbang karakter unggulnya dihitung 1, sedangkan yang tidak sama dengan tetuanya dihitung 0. Adapun perhitungan persentase kemurnian (Hipi, 2013) sebagai berikut:

$$\% \text{ kemurnian benih} = \frac{\text{Jumlah benih memiliki pola pita sama dengan tetuanya}}{\text{Jumlah keseluruhan benih yang diamati}} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan mutu fisik benih menunjukkan penampilan benih yang prima, yaitu bentuknya homogen, beras, dan bersih dari campuran benih jenis lain. Pengamatan mutu fisiologis dilakukan dengan mengamati viabilitas benih saat persemaian dan penanaman di rumah kaca, seluruh benih tumbuh dengan baik dan serempak.

Pengujian kualitas DNA dilakukan dengan elektroforesis, menggunakan gel agarose yang kemudian divisualisasi menggunakan *Gel documentation* (G-box dari Syngene), setelah sebelumnya diwarnai dengan 0,2 µg ml⁻¹ larutan ethidium bromide selama 30 menit. Hasil pengujian kualitas menunjukkan seluruh populasi yang akan diamati memiliki DNA yang dapat digunakan untuk proses amplifikasi. Konsentrasi yang didapat dari hasil isolasi DNA masing-masing populasi berkisar antara 235 ng/µl sampai 1675 ng/µl. Pada DNA hasil isolasi dilakukan pengenceran (dilusi), agar konsentrasi DNA yang akan digunakan untuk proses PCR memiliki konsentrasi sama. Konsentrasi yang digunakan sesuai dengan kebutuhan proses PCR berbasis SSR yaitu 20 ng/µl (Sambrook & Rusel, 1989). Menurut Dualembang dkk (2009) konsentrasi DNA yang diperoleh dari hasil isolasi yang berbeda-beda, dapat dipengaruhi oleh teknik isolasi yang digunakan, cara melakukan ekstraksi DNA, dan tingkat keterampilan peneliti dalam proses isolasi.

Identifikasi kemurnian benih dilakukan pada padi generasi F₃ yang telah terseleksi. Hasil analisis pola pita hasil visualisasi agarose gel pada populasi PP-228 ditunjukkan pada Tabel 5. Identifikasi dilakukan dengan mengamati pola pita DNA pada padi generasi F₃ yang disesuaikan dengan tetua yang menyumbang karakter yang diharapkan. Persentase kemurnian genetik benih dihitung berdasarkan jumlah tanaman yang terdeteksi primer yang digunakan.

Jumlah populasi PP (Pandanwangi x PTB33) yang diidentifikasi sebanyak 36 tanaman. Analisis

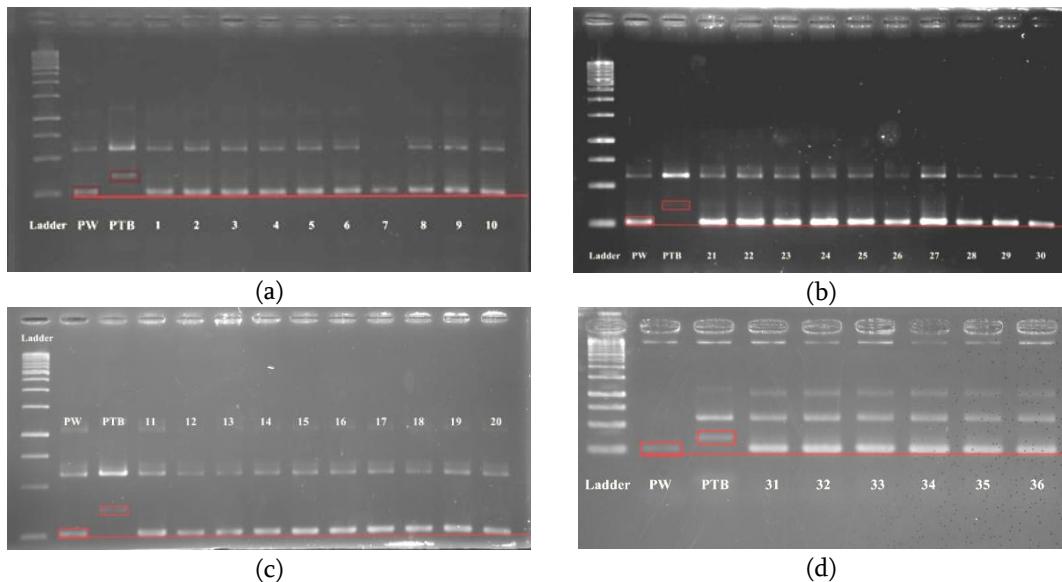
molekuler dilakukan dengan menggunakan *primer* Bradbury, yang terpaut dengan gen aromatik serta *primer* SSR yang diduga terpaut dengan gen ketahanan terhadap wereng (RM586 dan RM589).

Marka spesifik Bradbury merupakan marka yang paling baik digunakan untuk mendekripsi aroma, jika dibandingkan RM223 dan RM515 yang juga dapat mendekripsi aroma. Pola pita yang dihasilkan marka Bradbury dapat dengan jelas memperlihatkan aromatik (257 bp) dan non-aromatik (355 bp) (Bradbury *et al.* 2005). Hasil amplifikasi DNA untuk *primer* Bradbury menunjukkan keturunan dari persilangan Pandanwangi x PTB33 memiliki karakter aroma, dimana pola pita DNA 36 keturunannya sama dengan karakter tetua Pandanwangi yang memiliki karakter aroma dengan PCR *product size* 257 bp (pasang basa; Gambar 1). Adapun perhitungan persentase kemurnian populasi IP berdasarkan primer Bradbury sebagai berikut:

$$\begin{aligned}\% \text{ kemurnian genetik benih} &= \frac{36}{36} \times 100\% \\ &= 100\%\end{aligned}$$

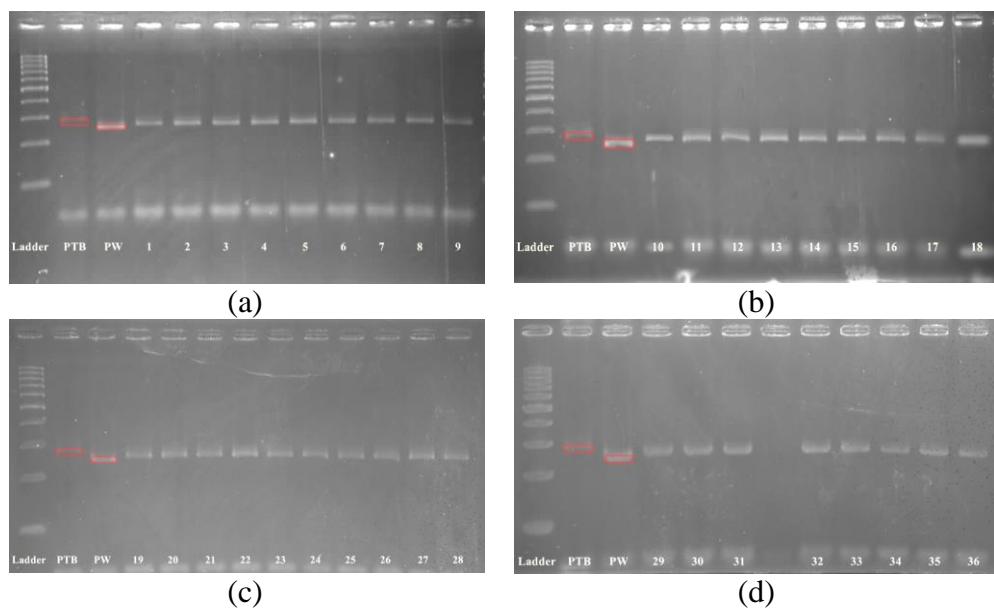
PTB33 sebagai tetua jantan (donor) dalam persilangan Pandanwangi x PTB33 diharapkan dapat mendonorkan karakter ketahanan terhadap wereng. Beberapa gen pengendali karakter ketahanan terhadap wereng coklat adalah *Bph3* dan *bph4* dan telah diketahui primer RM586 dan RM589 yang berasosiasi dengan gen tersebut (Jena & Mackill, 2008; Jairin *et al.*, 2007). Hasil visualisasi menggunakan primer tersebut menunjukkan seluruh populasi PP generasi F3 (36 tanaman) memiliki gen ketahanan terhadap wereng (Gambar 2 dan Gambar 3). Perhitungan persentase kemurnian populasi IP berdasarkan ketahanan wereng, sebagai berikut:

$$\begin{aligned}\% \text{ kemurnian genetik benih} &= \frac{36}{36} \times 100\% \\ &= 100\%\end{aligned}$$



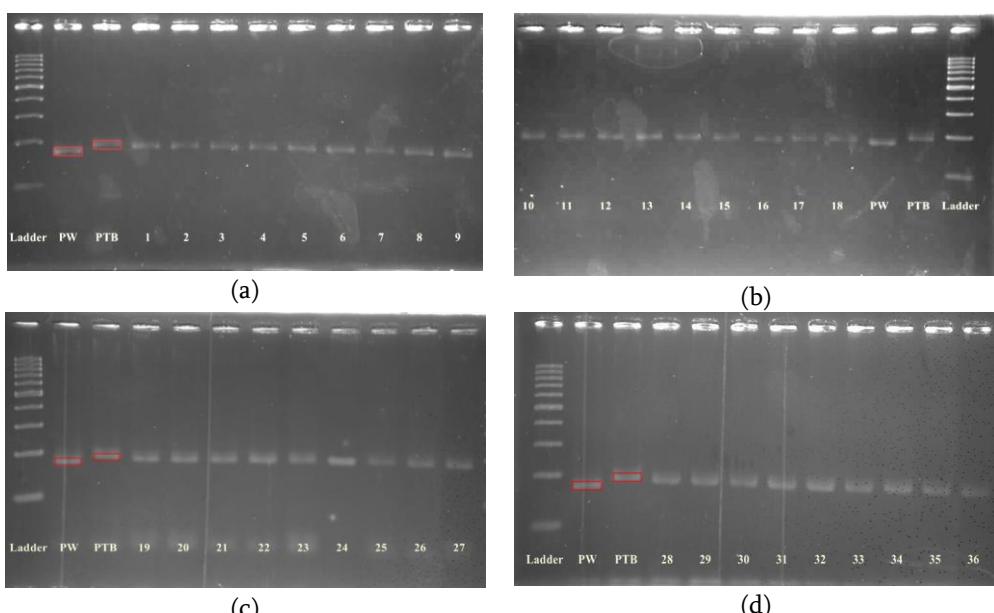
Gambar 1. Hasil visualisasi populasi PP menggunakan primer Bradbury untuk karakter aroma.

Keterangan: PTB = Tetua PTB33; PW = Tetua Pandanwangi; (a) PP 1-10; (b) PP 11-20; (c) PP 21-30; (d) PP 31-36.



Gambar 2. Hasil visualisasi populasi PP menggunakan primer RM586.

Keterangan: PTB = Tetua PTB33; PW = Tetua Pandanwangi; (a) PP 1-9; (b) PP 10-18; (c) PP 19-28; (d) PP 29-36.



Gambar 3. Hasil visualisasi populasi PP menggunakan primer RM 589.

Keterangan: PTB = Tetua PTB33; PW = Tetua Pandanwangi; (a) PP 1-9; (b) PP 10-18; (c) PP 19-27; (d) PP 28-36.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan, yaitu populasi PP memiliki kemurnian genetik sebesar 100% berdasarkan karakter aromatik dan sebesar 100% berdasarkan karakter ketahanan terhadap wereng. Populasi PP memiliki kemurnian genetik tinggi berdasarkan karakter yang diharapkan sehingga penelitian untuk populasi tersebut dapat

dilanjutkan. Penelitian selanjutnya diharapkan mendukung populasi tersebut untuk dapat dijadikan benih sumber varietas unggul, antara lain pengujian fenotipik dan daya hasilnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada teman-teman mahasiswa di Laboratorium Analisis

dan Bioteknologi Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran, yang telah membantu pelaksanaan kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashkani, S, MY Rafii, I Rusli, M Sariah, SNA Abdullah, HA Rahim and MA Latif. 2012. SSRs for marker-assisted selection for blast resistance in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Molecular Biology Rep. 30:79-86.
- Bradbury, LMT, RJ Henry, Q Jin, RF Reinke, and DLE Waters. 2005. A perfect marker for fragrance genotyping in rice. Molecular Breeding, 16 (4), 279–283. doi:10.1007/s11032-005-0776-y
- Budiarti, S, H Puspa, A Widiastuti, Dina, Niluh, ES Vine dan A Nurul. 2011. Petunjuk Teknis Pengujian Mutu Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura. Balai Besar Pengembangan dan Pengujian Mutu Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura: Depok.
- Cooke, RJ and JC Reeves. 2003. Plant genetic resources and molecular markers: variety registration in a new era. Plant Genetic Resources. 1 : 81-87.
- Dellaporta, SL, J Wood and JB Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. Plant Molecular Biology. Rep 1(4): 19-21
- Hipi, A, S Memen, I Satriyas and Riyanto. 2013. Seed genetic purity assessment of maize hybrid using microsatellite markers (SSR). International Journal of Applied Science and Technology 3 (5): .
- Jairin, J, S Teangdeerith, P Leelagud, K Phengrat, A Vanavhicit and T Toojinda. 2007. Detection of brown planthopper resistance genes from different rice mapping populations in the same genomic location. Science Asia 33:347-352.
- Jena, KK and DJ Mackill. 2008. Molecular markers and their use in marker-assisted selection in rice. Crop Sci. 48:1266-1276.
- Liu, L, Y Wang, Y Gong, X Zhai, F Yu, and H Shen. 2006. Genetic purity test of F1 hybrid tomato using molecular marker analysis. XXVII International Horticulture Congress-IHC 2006. International Symposium on Seed Enhancement and Seedling Production Technology. ISHS Acta Horticulture 771. Available online at <http://www.actahort.org/> pada 6 April 2013.
- Maesang, N, SL Ranamukhaarachchi, MJ Petersen, and SB Andersen. 2001. Soybean cultivar identification and genetic purity analysis using microsatellite DNA marker. Seed Science and Technology, (29) p: 637 645.
- Mulsanti, WI. 2011. Identifikasi dan Evaluasi Kemurnian Genetik Benih Padi Hibrida Menggunakan Marka Mikrosatelit. Institut Pertanian Bogor. [Thesis tidak dipublikasikan]
- Sadjad, S. 1993. Dari Benih Kepada Benih. PT Gramedia Widiaasarana Indonesia: Jakarta.
- Sambrook, J and DW Russel. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Edisi ke-3. New York: Cold-Spring Harbor Laboratory Pr.
- Slamet L, dan H Inez. 2012. Bioteknologi Untuk Ketahanan Pangan. Diakses melalui <http://id.pdfsb.com/jurnal+bioteknologi+pangan> diakses pada tanggal 6 April 2013
- SNI (Standar Nasional Indonesia). 2003. SNI 01-6233.2.2003. Benih Padi-Bagian 2: Kelas Benih Dasar (BD); SNI 01-6233.3.2003. Benih Padi-Bagian 3: Kelas Benih Pokok (BP); SNI 01-6233.4.2003. Benih Padi-Bagian 4: Kelas Benih Sebar (BR). ICS 65.020.20. Badan Standarisasi Nasional. Diakses melalui <http://sisni.bsn.go.id> pada 06 April 2013.
- Sutopo, L. 2004. Teknologi Benih. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya.
- USDA-ARS. 2003. Development and utilization of simple sequence repeat (SSR) molecular markers for the improvement of alfalfa and related species. Annual Report 2003.
- Wahyuni, S, IW Mulsanti, AA Daradjat, Sudibyo, M Lilis dan N Yunani. 2008. Identifikasi penciri spesifik dan uji BUSS beberapa varietas padi. Laporan akhir tahun, DIPA 2008. Balai Besar Penelitian Tanaman Padi. Badan Litbang Pertanian.

- Yashitola, J, T Thirumurgan, RM Sudaram, MK Naseerullah, MS Ramesha, NP Sarma, and RV Sonti. 2002. Assesment of purity of rice hybrid using microsatellite and STS marker. Crop Sience. 42 : 1369-1373.
- Ye yun, X., Z Zhan,X Yi Ping, and Y Long-ping. 2005. Identification and purity test of super hybrid rice with SSR molecular markers. Rice Science, 2005, 12(1): 7-127.