

Seleksi Marka SSR untuk Toleransi Terhadap Cekaman Suhu Tinggi pada Populasi F2 Padi

SSR Markers Selection for Tolerance to High Temperature Stress on the Population of F2 in Rice

Victor Manotar Pademan Manalu¹⁾, Desta Wirnas²⁾, Sudarsono Sudarsono²⁾

¹⁾ Alumni Sekolah Pascasarjana, Mayor Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Institut Pertanian Bogor (IPB University), Bogor, Indonesia, ²⁾ Departemen Agronomi dan Hortikultura, Institut Pertanian Bogor (IPB University), Bogor, Indonesia. Jl. Meranti, Kampus IPB Dramaga

Korespondensi: dwirnas@gmail.com

Diterima: 17 Agustus 2023 **Disetujui:** 15 September 2023. **Dipublikasi:** 25

September 2023

DOI: [10.24198/zuriat.v34i2.49422](https://doi.org/10.24198/zuriat.v34i2.49422)

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh primer SSR terpaut toleran terhadap suhu tinggi dengan menggunakan *bulked segregant analysis* (BSA) dan dilanjutkan dengan *single marker analysis* (SMA). Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Tanaman, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Institut Pertanian Bogor (IPB). Bahan genetik yang digunakan DNA tetua IPB 4S, Situ Patenggang, DNA dari genotipe F2, 12 Primer SSR. Hasil penelitian menunjukkan primer SSR RM 337 mengikuti segregasi hukum Mendel, kemudian berdasarkan *single marker analysis* dengan menggunakan karakter bobot gabah bernas menunjukkan primer SSR RM 337 terpaut toleran terhadap suhu tinggi dengan nilai peluang yang sangat nyata. Genotipe F2 yang memiliki pola pita DNA seperti Situ Patenggang (Tetua toleran) dan daya hasil tinggi menghasilkan 54 genotipe F2. Diferensial seleksi berdasarkan *genotyping* dengan menggunakan primer RM 337 menghasilkan kenaikan bobot gabah bernas sebesar 37.96%.

Kata kunci: Analisis Segregasi Bulk, Analisis Marka Tunggal, Marka Molekuler, Populasi F2, SSR

ABSTRACT

This study aims to obtain SSR markers linked to tolerance to high temperature using bulked segregant analysis (BSA) and continued with single marker analysis (SMA). The experiment was conducted at the Laboratory of Plant Molecular Biology, Department Agronomy and Horticulture, Bogor Agricultural University (IPB). The genetic materials include parental DNA IPB 4S, Situ Patenggang, and the DNA of F2 genotypes, and the 12 primer SSR. The primary result showed that the primer RM 337 followed segregation based on the Law of Mendel. After that, based on single marker analysis the using weight grain character, the primer RM 337 was linked to tolerance to high temperature with a significant result. Based on analysis of molecular, F2 genotypes are similar to the DNA pattern of Situ Patenggang (tolerant parent), and high yielding was the result 54 genotypes F2. Selection differential based on genotyping use primer RM 337 can increase weight grain were 37.96%.

Keywords: *Bulked Segregant Analysis, F2 Population, Molecular Marker, Single Marker Analysis, SSR*

PENDAHULUAN

Padi (*Oryza sativa* L.) merupakan salah satu tanaman pangan yang di konsumsi oleh lebih dari setengah penduduk dunia dan kebutuhannya terus meningkat (Krishnalatha dan Sharma 2012). Salah satu tantangan dalam mempertahankan produksi pangan, khususnya beras adalah perubahan iklim global yang ditandai dengan peningkatan suhu muka bumi. IPCC (2007) melaporkan bahwa pada akhir abad ke-21 suhu permukaan bumi akan meningkat sebesar rata-rata 2-4 °C dan akan berakibat buruk pada komoditas pertanian yaitu tanaman akan tercekam suhu tinggi.

Sifat toleransi padi terhadap cekaman suhu tinggi dapat diperbaiki melalui program pemuliaan tanaman. Seleksi pada lingkungan bercekaman harus dilakukan di lingkungan target dengan tujuan untuk dapat memaksimalkan ekspresi gen-gen yang mengendalikan daya hasil maupun daya adaptasi (Cooper dan Byth, 1996). Seleksi pada kondisi bercekaman dapat dilakukan berdasarkan fenotipe, marka molekuler, dan gabungan antara fenotipe dan marka molekuler (Bernando, 2002).

Pemanfaatan marka molekuler dalam seleksi materi pemuliaan tanaman disebut *molecular marker assisted selection* (MAS). Teknik MAS memiliki kelebihan, antara lain sifatnya yang stabil dan tidak terpengaruh lingkungan. MAS dapat diujikan pada tanaman, bahkan pada saat tanaman masih muda, dan ditanam di rumah kaca maupun di lapang, tanpa terpengaruh musim. Beberapa kelebihan tersebut menyebabkan seleksi berdasarkan marka molekuler berpotensi memberikan hasil yang lebih akurat dibandingkan dengan seleksi berdasarkan fenotipe tanaman yang terpengaruh oleh musim, iklim mikro, spesifik organ, dan fase pertumbuhan tanaman (Susanto *et al.*, 2008).

Marka makrosatelit merupakan marka genetik yang bersifat kodominan, dapat mendeteksi keragaman alel. Beberapa pertimbangan untuk penggunaan marka mikrosatelit diantaranya: (a) marka terdistribusi secara melimpah dan merata dalam genom, variabilitasnya sangat tinggi, dan lokasi genom dapat diketahui; (b) merupakan alat bantu yang sangat akurat untuk membedakan genotipe, evaluasi kemurnian benih, pemetaan dan seleksi genotipe untuk karakter yang diinginkan; (c) studi genetik populasi dan analisis diversitas genetik (Powell *et al.*, 1996).

Populasi F2 merupakan populasi yang sangat baik untuk dijadikan studi genetik, hal ini dikarenakan pada populasi ini terlihat jelas rasio pola segregasi dan mudah untuk di amati. Oleh sebab itu pada penelitian ini digunakan populasi F2 padi hasil persilangan IPB 4S dengan Situ Patenggang. Penelitian ini dilaksanakan dengan tujuan untuk memperoleh marka SSR terpaut sifat toleran suhu tinggi pada padi melalui analisis segregasi populasi F2 dengan menggunakan BSA dan SMA.

BAHAN DAN METODE

A. Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan adalah varietas IPB 4S sebagai tetua peka, varietas Situ Patenggang sebagai tetua toleran dan populasi F2 hasil persilangan IPB 4S dan Situ Patenggang (Manalu, *et. al.*, 2017).

B. Prosedur Penelitian

Metode yang digunakan untuk menyeleksi 12 primer SSR yaitu metode *bulked segregant analysis* (BSA) dan *single marker analysis* (SMA). Metode BSA ini dipergunakan dengan terlebih dahulu melakukan identifikasi fenotipik pada genotipe-genotipe F2 hasil persilangan IPB 4S dan Situ Patenggang menggunakan hasil pengamatan terhadap bobot

gabah bernas. Selanjutnya dilakukan identifikasi genotipik yang terdiri dari tiga tahapan seleksi primer. Pertama yang dilakukan yaitu seleksi primer dengan menggunakan DNA tetua untuk mendapatkan primer yang polimorfik terhadap tetua toleran dan peka. Kedua dilakukan pengelompokan berdasarkan karakter bobot gabah bernas, *bulk* toleran terdiri atas campuran DNA dari individu-individu tanaman yang toleran dalam populasi F2 dan *bulk* peka terdiri atas campuran DNA dari individu-individu tanaman yang peka dalam populasi F2. *Bulk* DNA toleran dan *bulk* DNA peka ini dipergunakan untuk menyeleksi kembali primer yang menunjukkan polimorfik dan terpaut pada tetua toleran. Tahap ketiga dilakukan seleksi primer pada masing-masing individu dari *bulk* DNA toleran dan *bulk* DNA peka serta di ujikan ke seluruh individu F2 individu untuk mengetahui ko-segregasi marker yang terpilih. Primer yang dipilih adalah primer yang bersifat polimorfik dan terpaut pada tetua toleran, *bulk* DNA toleran dan masing-masing individu yang toleran pada populasi F2.

Setelah metode BSA selesai di kerjakan maka dilakukan metode SMA. Tahapan seleksi primer di tetua sama seperti dengan yang dikerjakan pada metode BSA, perbedaannya adalah pada metode SMA semua primer yang polimorfik di tetua dilakukan *genotyping* pada seluruh individu F2. SMA dilakukan dengan cara menggabungkan data fenotip dan genotip kemudian dilakukan analisis ANOVA faktor tunggal dengan program SPSS.

C. Ekstraksi DNA dan Ampifikasi DNA

Bahan yang digunakan untuk ekstraksi DNA adalah daun tanaman padi pada usia menjelang generatif yang mengalami cekaman suhu tinggi. Isolasi DNA digunakan dengan menggunakan metode *cetyltrimethylammonium bromida* (CTAB) (Doyle dan Doyle, 1987) yang telah di modifikasi.

Metode amplifikasi DNA dengan mesin *polymerase chain reaction* (PCR). Pada penelitian ini digunakan 12 primer SSR untuk mengamplifikasi semua sampel yang ada. Informasi sekuen primer tersebut disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Jenis Primer SSR yang digunakan dalam penelitian ini

No	Primer	Sekuen Primer	Tipe Repetisi	Kisaran Produk PCR (pb)	Ta (°C)	Kromosom
1	RM3586	f: gaagagagagccagagccag r: acacgatcgagctagaagacg	(GA)12	118	63.5	3
2	RM160	f: agctagcagctatagcttagctggagatcg r: tctcatcgccatgagagcctc	(GAA)23	131	65	3
3	RM3735	f: ggcaccgatcagctagctag r: ataactcctccttgctgcc	(GA)16	138	61	4
4	RM310	f: ccaaaacatttaaaatcatg r: gcttgttgctcattaccattc	(GT)19	105	47	8
5	RM26212	f: gtcgctcctcctccaatcc r: gctcgtgcttctaactcttgc	(CTC)9	180	61	4
6	RM127	f: gtgggatagctgcgtcgcgtcg r: aggccagggtgtggcatgctg	(AGG)8	223	67	4
7	RM5687	f: gatcgtggcgattgac r: gacttgtgggtgtgttttg	(AAT)17	158	58	4
8	RM471	f: acgcacaagcagatgatgag r: gggagaagacgaatgtttgc	(GA)12	106	56	4
9	RM6132	f: cegccatctcttcagttc r: cagtgcatagaggagaggacg	(CGC)8	184	60	10
10	RM6100	f: tctctaccagtaccgacc r: gctggatcacagatcattgc	(CGA)8	144	55	10
11	RM103	f: ctccaattcaggccggtggc r: cgccacagctgacctgcatgc	(GAA)5	336	67	6
12	RM337	f: gtaggaaaggaaggcagag r: cgatagatagctagatgtggcc	(CTT)4-19 (CTT)8	210	60	8

Sumber: Zhu *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2009; Xiao *et al.* 2011; Buu *et al.* 2014

Metode amplifikasi DNA dengan mesin PCR. Untuk amplifikasi DNA, 3 μ l primer (sudah ada primer forward dan reverse), 3 μ l DNA ekstrak (untuk DNA *bulk*, sebelumnya di *bulked* dulu DNA individu-individu yang toleran dan peka) dan 6 μ l taq polymerase (Merk Kappa seri *ready to use with dye*) dan dimasukkan ke dalam PCR *tube* dan diamplifikasi pada mesin PCR (ESCO), sehingga total volume reaksi PCR adalah 12 μ l. Proses amplifikasi ini dilakukan sebanyak 35 siklus, yaitu pre denaturasi selama 3 menit pada suhu 95 °C, denaturasi siklus selama 15 detik pada suhu 95 °C, annealing selama 15 detik pada suhu 47-67 °C (tergantung suhu annealing primer) dan extension selama 15 detik pada suhu 72 °C, stop PCR / post PCR dilakukan pada suhu 72 °C selama 10 menit dan pendinginan hasil PCR selama 10 menit pada suhu 4 °C. Hasil dari amplifikasi ini dilanjutkan dengan elektroforesis menggunakan agarose biasa (Vivantis) untuk melihat ada atau tidak adanya pita, setelah di lihat ada baru dilanjutkan elektroforesis dengan menggunakan agarose *Super Fine Resolution* (Amresco).

D. Elektroforesis dengan Agarose *Super Fine Resolution* (SFR)

Produk PCR primer SSR dipisahkan dengan elektroforesis gel menggunakan agarose *super fine resolution* (SFR) dari Amresco dengan konsentrasi 3%, buffer LB (Lithium Boric) merk Faster Better Media 1/2 x pada volume 40 mL. Elektroforesis horizontal menggunakan alat elektroforesis merk Bio-Rad selama 120 menit pada voltase 120 volt. Marker DNA yang digunakan adalah marker 100 bp (Vivantis). Kemudian pewarnaan hasil elektroforesis dengan menggunakan Etidium Bromide dengan cara perendaman selama 10 detik kemudian di rendam dengan aquadest selama 30 menit.

E. Analisis Data

Analisis SSR dilakukan pada populasi P₁, P₂ dan F₂. Pertama yang dilakukan yaitu seleksi primer dengan menggunakan DNA tetua untuk mendapatkan primer yang polimorfik terhadap tetua toleran dan peka. Metoda BSA (*bulk segregation analysis*) dilakukan dengan pengelompokan berdasarkan karakter agronomi yang mempunyai korelasi tinggi dengan hasil tanaman. Terdapat 1 kelompok *Bulk* toleran terdiri atas campuran DNA dari individu-individu tanaman yang toleran (masing-masing 5 genotipe per grup toleran) dalam populasi F₂ dan 1 kelompok *bulk* peka terdiri atas campuran DNA dari individu-individu tanaman yang peka (masing-masing 5 genotipe per grup peka) dalam populasi F₂. Setelah diperoleh primer yang menunjukkan polimorfik pada tetua, selanjutnya dilakukan analisis terhadap *bulk*. Primer yang polimorfik pada *bulk* kemudian di ujikan ke seluruh individu tanaman dari populasi F₂ untuk mengetahui ko-segregasi dari primer terpilih.

Genotipe yang memiliki posisi satu alel pada posisi bagian atas diskor sebagai A (homosigot AA), genotipe yang memiliki posisi satu alel pada posisi bagian bawah diskor sebagai B (homosigot BB), sedangkan yang memiliki dua alel diberi skor H (Heterosigot AB). Hasil pengujian marka SSR terpilih dari seleksi marka di *bulk* yang dicobakan pada seluruh individu F₂ di analisis dengan menggunakan uji *chi square* untuk mengetahui apakah mengikuti pola segregasi hukum Mendel I yaitu 1:2:1 (A:H:B), rasio ini sebenarnya modifikasi dari rasio fenotipe Hukum Mendel I yaitu 3:1 dimana secara fenotipe individu heterozigot masuk dalam kategori dominan, sementara jika kita lakukan *genotyping* maka individu heterozigot akan menjadi nisbah tersendiri. Hipotesis yang diajukan untuk analisis ini adalah:

H_0 : data sesuai dengan nisbah 1:2:1

H_1 : data tidak sesuai dengan nisbah 1:2:1

Untuk mengetahui akurasi hasil BSA maka pekerjaan selanjutnya dilakukan metoda SMA (*Single Marker Analysis*). Metode SMA dilakukan setelah diperoleh primer yang menunjukkan polimorfik pada tetua, selanjutnya dilakukan analisis terhadap seluruh individu F2. Data genotipe hasil skoring primer SSR digabungkan dengan data bobot gabah bernas. *Single Marker Analysis* dilakukan dengan menggunakan software IBM SPSS Statistics 22.

Diferensial seleksi pada populasi F2 terpilih (mengikuti pola pita DNA Situ Patenggang dan berdaya hasil tinggi) diestimasi berdasarkan menggunakan formula Falconer dan Mackay (1996):

$$S = \frac{(\bar{x}_i - \bar{x}_0)}{\bar{x}_0} \times 100 \%$$

Keterangan:

S = diferensial seleksi,

\bar{x}_i = nilai tengah populasi terseleksi

\bar{x}_0 = nilai tengah populasi sebelum seleksi.

Nilai duga kemajuan genetik diestimasi menggunakan formula Falconer dan Mackay (1996):

$$R = i \sigma_p h^2$$

Keterangan:

R = dugaan kemajuan genetik,

i = intensitas seleksi (pada penelitian ini dengan terpilih 54 genotipe berdasarkan primer RM 337 maka intensitas seleksi adalah 1.290)

σ_p = standar deviasi dari ragam fenotipe

h^2 = heritabilitas

Pendugaan nilai respon seleksi untuk generasi berikutnya yaitu F3 dilakukan dengan menjumlahkan dari nilai tengah populasi terseleksi (generasi F2 yang berasal dari seleksi primer RM 337 terpilih) ditambah nilai kemajuan genetik.

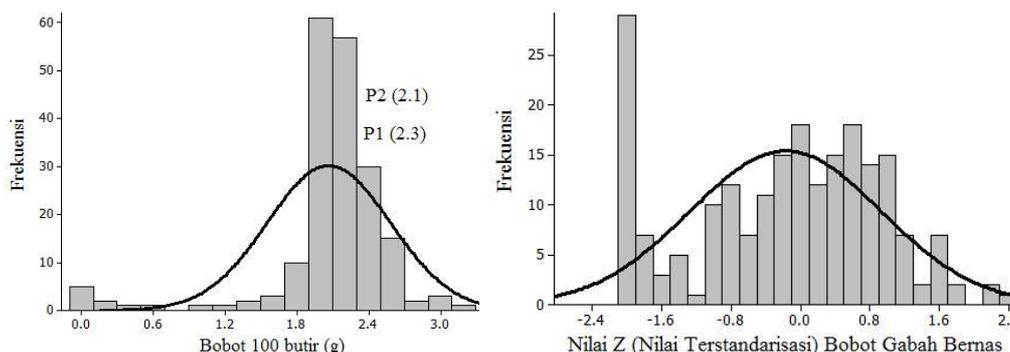
HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Seleksi Primer di Tetua

Analisis yang dilakukan yaitu seleksi 12 primer SSR pada kedua tetua IPB 4S dan Situ Patenggang. Hasil amplifikasi 12 primer SSR terhadap DNA tetua padi toleran (IPB 4S) dan peka (Situ Patenggang) terhadap cekaman suhu tinggi di rumah kaca diperoleh 5 primer SSR yang menghasilkan polimorfik. Hal ini membuktikan bahwa primer-primer tersebut dapat digunakan untuk melakukan seleksi ke tahap selanjutnya.

B. *Bulked Segregant Analysis*

Hasil pengujian pada generasi F2 hasil persilangan IPB 4S dan Situ Patenggang menunjukkan sebaran tidak mendekati normal, sehingga untuk memperoleh dua kelompok genotipe yang memiliki tingkat toleransi yang berbeda dalam keadaan toleran cekaman suhu tinggi maka sebaran ini perlu dinormalkan, dengan peubah Z (Gambar 1).



Gambar 1. Pola sebaran data bobot gabah bernas sebelum dan setelah distandarisasi dengan nilai Z pada populasi F2 padi (IPB 4S x Situ Patenggang)

Berdasarkan sebaran normal dapat dipilih sebanyak lima individu toleran dan lima individu peka. Individu yang termasuk kategori sangat toleran yaitu individu yang mempunyai nilai bobot gabah bernas $X \geq \bar{x} + 3SD$ (nilai $Z \geq 3$) dan individu yang sangat peka yaitu individu yang mempunyai nilai bobot hasil $X \leq \bar{x} - 3SD$ (nilai $Z \leq -3$) (Aluko and Oard 2004). Berdasarkan hasil data terstandarisasi ditetapkan genotipe-genotipe toleran dan peka yang disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2 Nilai fenotipe bobot gabah bernas populasi F2 padi (IPB 4S x Situ Patenggang) pada kondisi tercekam suhu tinggi

Nomor Individu	Bobot gabah bernas (g)	Nilai Z	Kategori
F2-114/IT1	80.6	2.38	Toleran
F2-28/IT2	77.67	2.22	Toleran
F2-48/IT3	75.96	2.13	Toleran
F2-93/IT4	64.75	1.52	Toleran
F2-190/IT5	64.66	1.52	Toleran
F2- 153/IP1	4.57	-1.88	Peka
F2-182/IP2	4.04	-1.82	Peka
F2-122IP3	4.00	-1.76	Peka
F2-201/IP4	2.83	-1.76	Peka
F2-31/IP5	1.79	-1.73	Peka

Keterangan: IT1: Individu Toleran ke-1; IT2: Individu Toleran ke-2; IT3: Individu Toleran ke-3; IT4: Individu Toleran ke-4; IT5: Individu Toleran ke-5; BP: Bulk Peka; IP1: Individu Peka ke-1; IP2: Individu Peka ke-2; IP3: Individu Peka ke-3; IP4: Individu Peka ke-4; IP5: Individu Peka ke-5

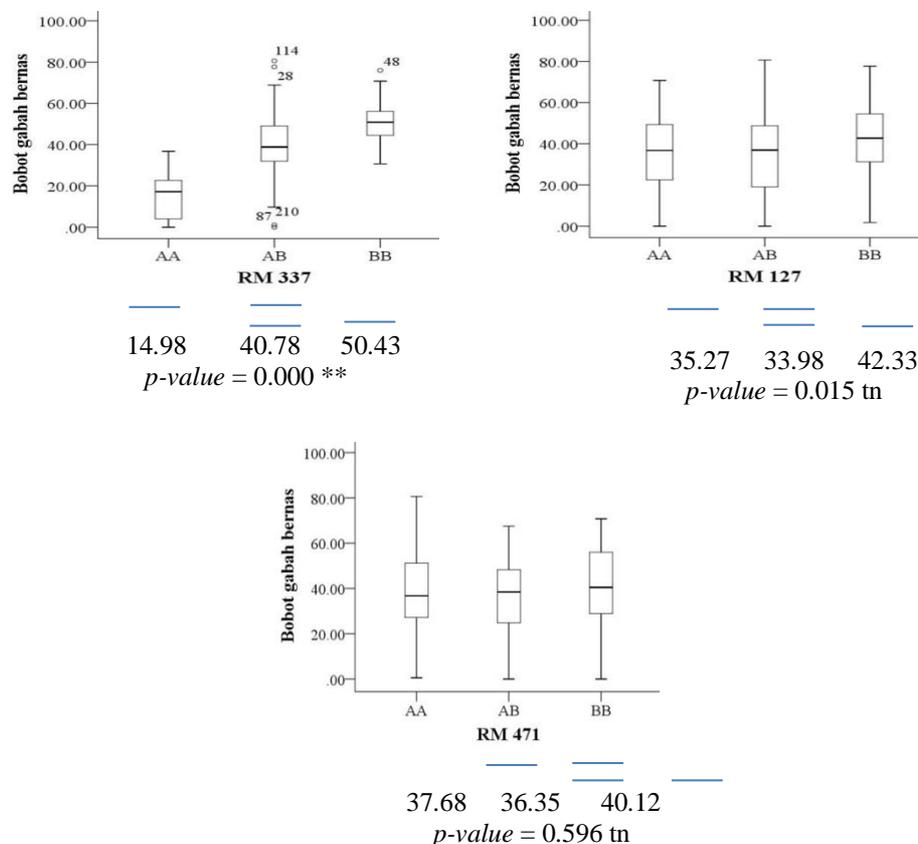
Analisis fenotipe dengan metode diskriminan ini telah berhasil memisahkan genotipe yang toleran dan peka. Pemisahan ini sangat menentukan dalam keberhasilan metode *bulk segregant analysis* yang digunakan dalam seleksi marka. Hal yang sama juga telah dilakukan oleh Sihalo (2015) pada penelitian kedelai untuk toleransi terhadap cekaman tanah masam. Berdasarkan seleksi primer dari kedua tetua di dapatkan 5 primer yang polimorfik, kelima primer ini kemudian digunakan untuk analisis pada bulk DNA dan individu bulk.

Berdasarkan hasil kegiatan BSA didapatkan bahwa primer RM 337 mempunyai ko-segregasi sesuai Hukum Mendel I, akan tetapi belum bisa dipastikan hubungan primer tersebut dengan karakter agronomi tertentu untuk mencari segregan yang toleran terhadap suhu tinggi. Karakter agronomi yang berhubungan langsung dengan sifat toleransi terhadap cekaman suhu tinggi salah satunya adalah karakter bobot gabah bernas (Mohammadi *et al.* 2007). Oleh sebab itu perlu dilakukan analisis marka tunggal (*single*

marker analysis). Doerge (2002) menyatakan bahwa *single marker analysis* merupakan analisis segregasi fenotipe dengan marker genotipe dimana marker yang akan kita analisis apakah ada hubungan atau asosiasi pada karakter kuantitatif yang kita inginkan. Collard *et al.* (2005) menyatakan bahwa *single marker analysis* merupakan salah satu metode analisis *quantitative trait loci* (QTL) dengan memanfaatkan *analysis of varian* (ANOVA).

Berdasarkan hasil *single marker analysis* terhadap bobot gabah bernas pada seluruh individu F2 yang di uji, menunjukkan hanya satu penanda yang memiliki asosiasi, yaitu RM 337 (Gambar 2). Kombinasi alel dari lokus tersebut terdiri dari tiga kombinasi, masing-masing kombinasi memiliki rata-rata bobot gabah bernas (BGB) yang berbeda. Genotipe AA memiliki bobot gabah bernas terendah, yaitu sebesar 14.98 g tanaman⁻¹. Genotipe AB memiliki rata-rata bobot gabah bernas menengah, yaitu sebesar 40.78 g tanaman⁻¹. Genotipe BB memiliki rata-rata bobot gabah bernas tertinggi, yaitu sebesar 50.43 g tanaman⁻¹.

Berdasarkan Gambar 2, boxplot menunjukkan pada primer RM 337 terlihat terdapat 2 genotipe yang memiliki nilai *outlier* (pencilian) atas, genotipe tersebut adalah: F2-28 dan F2-114 pada genotipe AB dan pencilian bawah pada genotipe F2-87 dan F2-210 pada genotipe AB, sementara pada genotipe BB, terdapat pencilian atas yaitu genotipe F2-48. Untuk keperluan proses seleksi dalam pemuliaan berdasarkan marka molekuler umumnya pemulia menginginkan genotipe yang homosigot dominan tapi fenotipenya berdaya hasil tinggi, maka genotipe F2-28 dan F2-114 tidak akan terpilih meskipun berdaya hasil tinggi karena heterosigot. Primer RM 127 dan RM 471 berdasarkan hasil *single marker analysis* tidak memberikan pengaruh yang nyata. Primer RM 3586 dan RM 310 menghasilkan pita yang monomorfik pada seluruh populasi F2.



Gambar 2. Boxplot hasil *single marker analysis* pada padi F2 (IPB 4S x Situ Patenggang)

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan di dapatkan bahwa primer RM 337 memiliki signifikansi yang nyata dan nilai R^2 52.50% terhadap karakter bobot gabah bernas pada kondisi tercekam suhu tinggi. Buu (2014) dalam penelitiannya juga mendapatkan bahwa primer RM 337 dengan nilai R^2 21.70% dan nilai peluang yang nyata terhadap karakter bobot gabah bernas pada kondisi tercekam suhu tinggi. Sementara peneliti lainnya melaporkan bahwa primer RM 1089 dan RM 229 memiliki signifikansi yang nyata terhadap karakter bobot gabah bernas (Poli *et al.* 2013). Hal ini bisa disebabkan karena hasil tersebut hanya berlaku pada populasi yang di uji dan memerlukan pengujian jika akan digunakan pada latar belakang genetik yang berbeda. Hal ini diperkuat oleh Xie *et al.* (2008) yang menyatakan bahwa QTL dipengaruhi oleh latar belakang genetik, namun terdapat marka yang stabil pada beberapa latar belakang genetik dan dapat digunakan dalam seleksi.

Penggunaan marka molekuler untuk toleransi terhadap cekaman suhu tinggi telah banyak dilaporkan oleh para peneliti dengan menggunakan marka SSR pada tanaman padi (Zhu *et al.* 2005; Jagadish *et al.* 2010; Xiao *et al.* 2011; Poli *et al.* 2013; Buu *et al.* 2014). Ye *et al.* (2015) melaporkan bahwa terdapat 1 QTL yang bertanggung jawab terhadap cekaman suhu tinggi yaitu QHTSF4.1 pada kromosom nomor 4 yang konsisten ditemui pada populasi F2 hasil persilangan IR64/N22 dan IR64/Giza170 dengan menggunakan 6000 marka SNP.

Penggunaan marka molekuler untuk toleransi terhadap cekaman suhu tinggi pada tanaman lainnya juga telah banyak dilaporkan oleh para pemulia antara lain: Lin *et al.* (2006) pada tanaman tomat untuk mengidentifikasi marka RAPD yang terpaut toleran cekaman suhu tinggi dengan menggunakan karakter bobot buah, Garg *et al.* (2012) pada tanaman gandum dengan menggunakan marka SNP untuk mendeteksi gen *heat shock protein*, Barakat *et al.* (2012) seleksi menggunakan marka SSR dengan metode BSA untuk identifikasi penanda molekuler terkait dengan tingkat pengisian biji-bijian sebagai indikator untuk gen toleransi suhu tinggi pada tanaman gandum, Yamin (2014) pada tanaman gandum dengan menggunakan marka SSR pada populasi F4 menggunakan metode *bulk segregant analysis* (BSA) berdasarkan karakter bobot gabah bernas, Thudi *et al.* (2014) pada kacang arab (*chickpea*) dengan menggunakan pendekatan pemetaan asosiasi marka SNP.

C. Kemajuan Seleksi Menggunakan *Marker Assisted Selection*

Seleksi merupakan suatu prosedur memilih sejumlah individu dari suatu populasi dan membiarkannya membentuk generasi baru. Seleksi merupakan salah satu penyebab terjadinya perubahan dari frekuensi suatu alela dalam populasi, karena hanya alela yang dipilih akan diteruskan ke generasi berikutnya. Tujuan seleksi adalah untuk memperoleh peningkatan frekuensi gen-gen yang diinginkan pada generasi berikutnya (Falconer dan Mackay 1996). Kemajuan seleksi sangat bergantung dari adanya keragaman genetik dan metode seleksi yang tepat. Seleksi berdasarkan fenotipe umumnya dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Potensi dan penggunaan marka molekuler DNA sebagai instrumen dalam pemuliaan tanaman sangat menguntungkan. Keuntungan memanfaatkan marka molekuler sebagai *marker assisted selection* adalah marka molekuler bersifat stabil karena tidak dipengaruhi oleh lingkungan sehingga tidak dipengaruhi oleh kondisi dimana tumbuhan berada dan dapat terdeteksi pada semua tahap perkembangan tanaman, jumlah tidak terbatas dan memiliki nilai heritabilitas tinggi sehingga hasil seleksi yang diperoleh lebih akurat (Mohan *et al.* 1997; Gupta *et al.* 2002; Collard dan Mackill 2007; Susanto *et al.* 2008).

Hasil seleksi menggunakan marka molekuler yang dilakukan terhadap genotipe F2 berdasarkan *single marker analysis* diperoleh 54 genotipe yang pola pita DNA nya (Homosigot BB) terpaut dengan Situ Patenggang (tetua toleran suhu tinggi) dan berdaya hasil tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa seleksi menggunakan marka molekuler tidak dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, namun sangat dipengaruhi oleh faktor genetik tanaman (Pakniyat dan Tavakol 2007).

Kemajuan seleksi yang telah dilakukan terhadap semua karakter yang diamati pada populasi F2 terpilih dengan menggunakan marka molekuler disajikan pada Tabel 3. Pada umumnya kemajuan seleksi adalah linier, terutama kalau ditinjau dari jangka pendek. Kemajuan yang cepat pada generasi awal menunjukkan suatu perubahan yang besar dari frekuensi mayor gen (Syukur *et al.* 2015). Penggunaan marka molekuler DNA pada penelitian ini akan sangat menguntungkan, karena mempunyai nilai heritabilitas yang tinggi. Nilai kemajuan seleksi tersebut dapat dijadikan indikator keberhasilan pelaksanaan seleksi.

Tabel 3. Kemajuan seleksi berdasarkan primer RM 337 pada padi

Karakter	Rata-rata populasi awal	Rata-rata populasi terseleksi	Diferensial seleksi (%)
Kehijauan daun 105 HST	44.4	44.76	0.81
Tinggi tanaman saat panen (cm)	140.35	142.67	-1.65
Jumlah anakan total	21.77	24.80	13.92
Jumlah anakan produktif	17.23	20.06	17.17
Panjang malai (cm)	28.02	29.14	4.11
Jumlah gabah bernas	144.02	175.94	21.98
Jumlah gabah hampa	105.19	115.04	9.66
Jumlah gabah hampa (%)	44.24	38.94	-11.98
Jumlah gabah total	249.21	290.98	16.78
Lama pengisian biji (hari)	31.59	33.83	-7.26
Bobot 100 butir (g)	2.08	2.25	8.70
Bobot gabah bernas (g)	36.56	50.44	37.96

Berdasarkan hasil *single marker analysis* maka kemajuan seleksi akan memberikan perbaikan nilai tengah bobot gabah bernas sebesar 37.96%, bobot 100 butir sebesar 8.70%, jumlah gabah bernas sebesar 21.98%. Seleksi dengan menggunakan marka RM 337 mempunyai keunggulan yaitu meningkatnya nilai tengah kehijauan daun, jumlah anakan produktif, jumlah anakan total, panjang malai, jumlah gabah bernas, dan jumlah gabah total sedangkan kelemahannya adalah meningkatnya tinggi tanaman sebesar 1.65%, lama pengisian biji sebesar 7.26%, dan meningkatnya jumlah gabah hampa sebesar 9.66% yang hal ini tidak diinginkan pemulia. Penggunaan kemajuan seleksi dengan menggunakan marka molekuler di laporkan oleh Sihaloho (2015) pada kedelai untuk toleransi terhadap cekaman Al dan tanah masam pada populasi F4. Sihaloho (2015) dalam penelitiannya mendapatkan 20 genotipe yang membawa marka RAPD terpaut toleran tanah masam menghasilkan bobot biji tanaman⁻¹ lebih baik dari pada genotipe yang tidak membawa marka dan memperoleh kemajuan seleksi sebesar 18.3%.

D. Kemajuan Genetik dan Dugaan Respon Seleksi

Kegiatan yang terpenting dari seleksi adalah bagaimana penampilan keturunan dari individu-individu hasil seleksi. Kemajuan seleksi dapat diduga sebelum dilakukan seleksi, apabila nilai heritabilitas dari karakter yang diseleksi diketahui. Perbaikan penampilan populasi yang dibentuk dari individu-individu hasil seleksi dibandingkan dengan populasi dasarnya disebut sebagai kemajuan genetik. Nilai pendugaan kemajuan genetik dan dugaan respon seleksi pada generasi F3 berdasarkan seleksi primer RM 337 disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Kemajuan genetik dan dugaan respon seleksi pada padi generasi F3 berdasarkan seleksi primer RM 337

Karakter	σ_p	h^2_{bs}	ΔR	Dugaan respon seleksi
Kehijauan daun 105 HST	2.72	0.25	1.78	46.54
Tinggi tanaman saat panen (cm)	15.86	0.90	10.38	153.05
Jumlah anakan total	6.39	0.55	4.18	28.98
Jumlah anakan produktif	6.53	0.63	4.27	24.33
Panjang malai (cm)	2.95	0.74	1.93	31.07
Jumlah gabah bernas	61.62	0.70	40.33	216.27
Jumlah gabah hampa	45.94	0.51	30.07	145.11
Jumlah gabah hampa (%)	18.09	0.76	11.84	27.10
Jumlah gabah total	80.27	0.76	52.53	343.51
Lama pengisian biji (hari)	4.81	0.31	3.14	36.97
Bobot 100 butir (g)	0.48	0.62	0.31	2.56
Bobot gabah bernas (g)	18.46	0.50	12.08	62.52

Keterangan: σ_p : standart deviasi dari ragam fenotipe; h^2_{bs} : heritabilitas arti luas; ΔR : kemajuan genetik; DRSL: dugaan respon seleksi langsung; DRSM: dugaan respon seleksi dengan multikarakter

Pendugaan respon seleksi yang telah dilakukan terhadap semua karakter yang diamati pada populasi F2 dengan menggunakan marka molekuler menunjukkan bahwa nilai dugaan respon seleksi terbesar terdapat pada karakter bobot gabah bernas tanaman⁻¹. Nilai dugaan respon seleksi itu dapat dijadikan indikator keberhasilan pelaksanaan seleksi, karakter yang mempunyai nilai respon seleksi tinggi seperti pada karakter bobot gabah bernas tanaman⁻¹ dapat dijadikan variabel yang tepat untuk menyeleksi populasi F2.

KESIMPULAN

Seleksi marka yang dilakukan baik menggunakan metode BSA maupun SMA menghasilkan satu marka yaitu RM 337 yang konsisten teramplifikasi pada tetua toleran dan genotipe-genotipe F2. Berdasarkan *single marker analysis* diperoleh 54 genotipe yang pola pita DNANYa seperti Situ Patenggang (tetua toleran suhu tinggi) dan hanya fenotipe yang berdaya hasil tinggi. Hasil *single marker analysis* maka kemajuan seleksi akan memberikan akan memberikan perbaikan nilai tengah bobot gabah bernas sebesar 37.96%. Pendugaan respon seleksi dengan menggunakan primer RM 337 akan memberikan perbaikan nilai tengah bobot gabah bernas pada generasi berikutnya (F3) menjadi 62.52 g.

DAFTAR PUSTAKA

- Aluko GK, Oard JH. 2004. Evaluation of discriminant analysis as a tool for rapid identification of marker associated with drought resistance in rice. *In* Polland D, Sawkend CM, Ribaut JS, Hoisirgton D, editor. *Resalient Crops for Water Limited Environment: Proceeding at Workshop 24-28 May 2004*.
- Barakat MN, Al-Doss AA, Elshafei AA, Moustafa KA. 2012. Bulked segregant analysis to detect quantitative trait loci (QTL) related to heat tolerance at grain filling rate in wheat using simple sequence repeat (SSR) markers. *Afr. J. Biotechnol.* 11(61):12436-12442.
- Bernardo R. 2002. *Breeding for Quantitative Traits in Plant*. Woodbury, Minnesota (US): Stemma Press.
- Buu B C, Ha PTT, Tam BP, Nhien TT, Hieu NV, Phuoc NT, Minh L, Giang L H, Lang NT. 2014. Quantitative Trait Loci Associated with Heat Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Breed. Biotech.* 2(1):14-24. <http://dx.doi.org/10.9787/PBB.2014.2.1.014>.
- Collard BCY, Mackill DJ. 2007. Marker-assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philos. Trans. R. Soc.Lond. B Biol. Sci.* 17:1–16.
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica.* 142: 169–196
- Cooper M, Byth DE. 1996. Understanding plant adaptation to achieve systematic applied crop improvement – a fundamental challenge. *In*: M. Cooper dan G.L Hammer. *Plant Adaptation and Crop Improvement*. Manila (FI): IRRI dan CAB International. Hlm. 5-23.
- Dourge RW. 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental population. *Nat. Rev. Genet.* 3:43-52.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v.19, p.11-15, 1987.
- Falconer DS, Mackay TFC. 1996. *Introduction to Quantitative Genetic 4th Edition*. London (GB): Longman Group Ltd.
- Garg D, Sareen S, Dalal S, Tiwari R, Singh R. 2012. Heat shock protein based SNP marker for terminal heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *AJCS* 6(11):1516-1521.
- Gupta PK, Varshney RK, Prasad M. 2002. Molecular markers: Principles and Methodology. *In* S. Mohan Jain. D.S. Brar. B.S. Ahloowalia, editor. *Molecular Techniques in Crop Improvement*. Dordrecht (NL): Kluwer Academic Publisher.
- Intergovernmental Panel on Climate Change. 2007. Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Inter-governmental Panel on Climate Change. p. 29-34. *In* Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL (Editor). Cambridge University Press, Cambridge, GB.
- Jagadish S, Cairns J, Lafitte R, Wheeler T, Price A, Craufurd P. 2010. Genetic analysis of heat tolerance at anthesis in rice. *Crop Sci* 50:1633–1641.

- Krishnalatha S, Sharma S. 2012. Identification of maintainers and restorers for WA and Kalinga sources of CMS lines in rice (*Oryza sativa* L.). *Elec. J. Plant Breeding*. 3:949-951
- Lin K-H, Lo H-F, Lee S-P, Kuo G, Chen J-T, Yeh W-L. 2006. RAPD markers for the identification of yield traits in tomatoes under heat stress via bulked segregant analysis. *Hereditas*. 143:142-154.
- Manalu, V. M. P., Wirnas D, Sudarsono S. 2017. Karakter Seleksi pada Generasi Awal untuk Adaptasi Padi terhadap Cekaman Suhu Tinggi. *J. Agron. Indonesia*, Agustus 2017, 45(2):109-116.
- Mohammadi V, Bihamta MR, Zali AA. 2007. Evaluation of screening techniques for heat tolerance in wheat. *Pakistan J. Biol. Sci.* 10:887-892.
- Mohan M, Nair S, Bhagwat A, Krishna TG, Masahiro Y. 1997. Genom mapping, molecular markers and marker assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding*. 3:87-103.
- Poli Y, Basava RK, Panigrahy M, Vinukonda VP, Dokula NR, Voleti SR, Desiraju S, Neelamraju S. 2013. Characterization of a Nagina22 rice mutant for heat tolerance and mapping of yield traits. *Rice*. 6:36-44.
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breeding*. 2: 225-238.
- Ribaut JM, William HM, Khairallah M, Worland AJ, and Hoisington D. 2001. Genetic Basis of Physiological Traits. In Reynolds MP, Ortiz-Monasterio JI, McNab A (Eds). *Application of Physiology in wheat breeding*. CIMMYT. Mexico.
- Roldan-Ruiz I. 2014. *Marker-trait associations*. Hand Out Advanced Course Modern Breeding Techniques Cassava. 8-19 September 2014 - Ghent University, Belgium.
- Sihaloho AN. 2015. Analisis genetik dan efisiensi seleksi menggunakan *single seed descent* pada kedelai [*Glycine max* (L.) Merr.] untuk adaptasi tanah masam. [Disertasi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Sihaloho, AN, Trikoesoemaningtyas, Sopandie D, Wirnas D. 2015. Identifikasi aksi gen epistasis pada toleransi kedelai terhadap cekaman aluminium. *J. Agron. Indonesia*. 43:30–35.
- Susanto U, Sutrisno, Aswidinnoor H. 2008. Pemanfaatan teknik marka molekuler untuk perbaikan varietas padi. Di dalam: *Padi, Inovasi Teknologi dan Ketahanan Pangan*, Buku 1. Subang (ID): Balai Besar Penelitian Tanaman Padi (BB Padi). Hlm 324-336.
- Syukur M, Sujiprihati S, Yuniarti R. 2015. *Teknik Pemuliaan Tanaman*. Edisi Revisi. Jakarta (ID): Penebar Swadaya.
- Thudi M, Upadhyaya HD, Rathore A, Gaur PM, Krisnamurthy L, Roorkiwal M, Nayak SN, Chaturvedi SK, Basu PS, Gangarao NVPR, et al. 2014. Genetic dissection of drought and heat tolerance in chickpea through genome-wide and candidate gene-base association mapping approaches. *Plos one*. 9(5):96758-96770.

- Xiao Y, Pan Y, Luo L, Zhang G, Deng H, Dai L, Liu X, Tang W, Chen L, Wang GL. 2011. Quantitative trait loci associated with seed set under high temperature stress at the flowering stage in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*. 178:331–338.
- Xie XW, Xu MR, Zang JP, Sun Y, Zhu LH, Xu JL, Zhou YL, Li ZK. 2008. Genetic background and environmental effects on QTLs for sheath blight resistance revealed by reciprocal introgression lines in rice. *Acta Agronomica Sinica*. 34:1885-1893.
- Yamin M. 2014. Pendugaan komponen ragam karakter agronomi gandum (*Triticum aestivum* L.) dan identifikasi marka simple sequence repeat (SSR) terpaut suhu tinggi menggunakan *bulk segregant analysis* (BSA). [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Ye C, Tenorio FA, Argayoso MA, Laza MA, Koh H-J, Redona ED, Jagadish KSV, Gregorio GB. 2015. Identifying and confirming quantitative trait loci associated with heat tolerance at flowering stage in different rice populations. *BMC Genetics*. 16:41-51.
- Zhang G, Chen L, Xiao G, Xiao Y, Chen X and Zhang S. 2009. Bulked Segregant Analysis to Detect QTL Related to Heat Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.) Using SSR Markers. *Agricultural Sciences in China*. 8(4): 482-487.
- Zhu C, Xiao Y, W C, Jiang L, Zhai H, Wan J. 2005. Mapping QTL for Heat-Tolerance at Grain Filling Stage in Rice. *Rice Science*. 12(1): 33–38.