



Keragaman Genetik 30 Genotipe Padi (*Oryza sativa* L) Berdasarkan 9 Marka SSR Terpaut Kandungan Zn

Genetic Diversity of 30 Rice (*Oryza sativa* L) Genotypes Based on 9 SSR Markers Linked to Zn Content

Rischa Ainunnisa Febriella^{1*}, Untung Susanto², Fawzy Muhammad Bayfurqon³, Hayatul Rahmi⁴

^{1*}Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Singaperbangsa Karawang

²Balai Besar Penelitian Tanaman Padi Sukamandi

^{3,4}Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Singaperbangsa Karawang

*E-mail: 1710631090120@student.unsika.ac.id

ABSTRAK

Aplikasi marka SSRs (Simple Sequence Repeats) dapat digunakan untuk menentukan keragaman genetik padi (*Oryza sativa* L.). Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis keragaman genetik padi yang diuji berdasarkan aplikasi marka SSR yang dilaporkan terpaut dengan sifat kandungan Zn tinggi. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Pemuliaan Tanaman Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, di Kabupaten Subang Jawa Barat pada bulan Mei 2021 sampai Agustus 2021. Hasil penelitian ini mendeteksi sebanyak 41 alel dengan rata-rata jumlah alel per marka 4,56 dan kisaran 2-10 alel per lokus. Rata-rata frekuensi alel mayor adalah 0,61 dengan nilai terendah 0,27 pada marka RM23 dan nilai tertinggi adalah 0,97 pada marka RM247. Nilai diversitas gen berkisar antara 0,06 (RM247) hingga 0,79 (RM23) dengan rata-rata 0,51. Nilai PIC (polymorphic information content) berkisar antara 0,06 (RM247) hingga 0,76 (RM23) dengan rata-rata 0,48. Analisis filogenetik menunjukkan bahwa 30 genotipe padi terbagi menjadi 4 kelompok utama pada koefisien kemiripan genetic sebesar 0,44. Cluster pertama terdiri dari 15 genotipe padi, cluster kedua terdiri dari 12 genotipe padi, cluster ketiga terdiri dari 2 genotipe dan cluster keempat terdiri 1 genotipe padi.

Kata kunci: Padi, Zinc, Keragaman Genetik, SSRs

ABSTRACT

SSRs (Simple Sequence Repeats) markers could be applied to determine the genetic diversity of rice (*Oryza sativa* L.). The purpose of this study was to analyze the genetic diversity of 30 genotypes based on 9 SSR markers reported to be associated with high Zn content. The research was conducted in the Plant Breeding Laboratory of the Indonesian Center for Rice Research (ICRR) in Subang District of West Java Province from May 2021 to August 2021. The results showed that there were 41 alleles detected with an average number of alleles per marker of 4.56 ranging from 2-10 alleles per locus. The average major allele frequency was 0.61 with the lowest score of 0.27 (RM23) and the highest of 0.97 (RM247). The value of gene diversity ranged from 0.06 (RM247) to 0.79 (RM23) with an average of 0.51. The value of PIC (polymorphic information content) ranged from 0.06 (RM247) to 0.76 (RM23) with an average of 0.48. The phylogenetic analysis showed that 30 rice genotypes were divided into 4 main groups at the similarity coefficient of 0.44. The first cluster consisted of 15 rice genotypes, the second consisted of 12 rice genotypes, the third consisted of 2 genotypes and the fourth consisted of 1 rice genotype.

Keywords: Rice, Zinc, Genetic Diversity, SSRs

PENDAHULUAN

Padi (*Oryza sativa* L) merupakan bahan makanan pokok bagi rakyat Indonesia. Konsumsi masyarakat Indonesia akan beras dari tahun ke tahun semakin meningkat sejalan dengan semakin bertambahnya jumlah penduduk. Oleh karena itu, perluasan areal pertanian dan pemanfaatan teknologi pertanian sangat diperlukan untuk meningkatkan jumlah produksi padi di Indonesia (Sumarno, 2014). Menurut Badan Pusat Statistik (2019) rata-rata total produksi padi di Indonesia

Rischa Ainunnisa Febriella, Untung Susanto, Fawzy Muhammad Bayfurqon, Hayatul Rahmi :
Keragaman Genetik 30 Genotipe Padi (Oryza sativa L) Berdasarkan 9 Marka SSR Terpaut Kandungan Zn (Hal. 74 - 79)

pada 2019 sekitar 54,60 juta ton gabah kering giling (GKG), atau mengalami penurunan sebanyak 4,60 juta ton (7,76 persen) dibandingkan tahun 2018. Beras sebagai makanan pokok berfungsi sebagai penyedia nutrisi bagi manusia. Salah satu nutrisi esensial bagi manusia adalah zinc. Prevalensi balita kekurangan gizi Zn di dunia dan Indonesia masih cukup tinggi, yaitu sekitar 30%. Unsur Zn memegang peran penting bagi metabolisme tubuh manusia, diantaranya adalah merupakan penyusun lebih dari 300 enzim dalam tubuh yang terkait dengan berbagai sistem metabolisme tubuh. Peningkatan kadar zinc dalam beras meningkat secara signifikan dengan adanya aplikasi pemupukan urea diperkaya zinc sulfat heptahidrat. (Kusudaryati, 2013).

Karakterisasi morfologi sangat dipengaruhi lingkungan dan memerlukan waktu di lapang sehingga pendekatan marka molekuler perlu dipertimbangkan. Karakterisasi menggunakan marka molekuler dapat memberikan hasil yang lebih cepat, tepat dan efektif dibandingkan dengan karakterisasi secara morfologi. Tingkat keragaman yang diperolehpun dapat lebih tinggi dibandingkan karakterisasi secara morfologi. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis keragaman genetik padi yang diuji berdasarkan aplikasi marka SSR yang dilaporkan terpaut dengan sifat kandungan Zn tinggi. (Bredemeijer et al., 2002 dalam Lestari et al.2017).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai dengan bulan Agustus 2021 di di Rumah Kaca dan di Laboratorium Pemuliaan Tanaman Balai Besar Penelitian Tanaman padi (BB Padi) yang berlokasi di Desa Sukamandijaya, Kecamatan Ciasem, Kabupaten Subang. Bahan yang digunakan adalah benih 30 genotipe padi sawah, nitrogen cair, buffer ekstraksi komersil DNAzol, buffer TAE, buffer TBE 10x, chloroform isoamilalcohol (CIA) dengan perbandingan 24 : 1 chloroform 48 ml dan isoamyl alcohol 2 ml, 70% isopropanol dingin, β -mercaptoetanol dingin 2%, red PCR Master mix (Thermo Scientific), gelred (pewarna), akrilamid, bisacrylamide, APS, TEMED, PCRBIO Ladder III 50 up to 1500 bp parafilm, aluminium foil, etanol, aquades, aquabidest (ddH₂O), kertas tissue, serta 9 primer marka mikrosatelit yaitu, RM23, RM294A, RM247, RM17, RM6, RM7488, RM309, RM400 dan RM415 (Tabel 1). Adapun Alat yang digunakan dalam penelitian di Rumah Kaca adalah cawan petri, pot, oven. Sedangkan di Laboratorium adalah mikro tube, rak tube, vortex, oven, centrifuge, freezer, kulkas, spektrofotometer nanodrop, elektroforesis (Polyacrylamide), PCR (Therma Cycler), UV - transilluminator (UV Doc-its), Gel-Doc (U Doc-its), chambell well (bak elektroforesis), power supply, autochlafl, pengaduk magnetik, tabung eppendorf 2.0 ml, 1.5 ml, dan 50 ul, mikropipet ukuran 1-50 μ l, 100-500 μ l, dan 200-1000 μ l, tip pipet (warna putih, kuning, dan biru), alat-alat gelas (gelas ukur, baker glass, erlenmeyer, dll).

Ekstraksi DNA dilakukan terhadap daun dari tanaman tunggal menggunakan DNA ekstraktion kit (DNA Zol). Program PCR dijalankan dengan pengaturan suhu predenaturasi 95°C selama 3 menit kemudian diikuti oleh 35 siklus, setiap siklus terdiri dari tiga tahap yaitu denaturasi 95°C selama 15 detik, tahap berikutnya penempelan (annealing) dengan suhu disesuaikan dengan masing-masing primer pada kisaran suhu 50°C - 60°C selama 30 detik, kemudian tahap pemanjangan (extension) dengan suhu 72°C selama 40 detik, diakhiri dengan tahapan pemanjangan akhir suhu 72°C selama 1 menit.

Tabel 1. Karakteristik 9 Marka SSR terpaut kandungan Zn tinggi

No	SSR Markers	Chrom	Size	Forward	Reverse	Referensi
1	RM6	2	163	GTCCCCTCCACCCAATTC	TCGTCTACTGTTGGCTGCAC	Panaud et al. (1996)
2	RM17	12	184	TGCCCTGTTATTTTCTTCTCTC	GGTGATCCTTTCCATTTC	Panaud et al. (1996)
3	RM23	1	145	CATTGGAGTGAGGCTGG	GTCAGGCTTCTGCCATTCTC	Chen et al. (1997)
4	RM247	12	131	TAGTGCCGATCGATGTAACG	CATATGGTTTTGACAAAGCG	Chen et al. (1997)
5	RM309	12	169	GTAGATCACGCACCTTTCTGG	AGAAGGCCTCCGGTGAAG	Temnykh et al. (2000)
6	RM400	6	321	ACACCAGGCTACCCAACTC	CGGAGAGATCTGACATGTGG	Temnykh et al. (2001)
7	RM415	12	227	CTTCGATCCATCATCCATGG	ATTGCTGTACGCAGTTTCGG	Temnykh et al. (2001)
8	RM7488	6	184	ACCTCCATAAGGGACAAATG	GATTTAGGAGGGTTTTGAGG	Mc Couch et al. (2002)
9	RM294A	1	173	TTGGCCTAGTGCCTCCAATC	GAGGGTACAACCTTAGGACGCA	Temnykh et al. (2000)

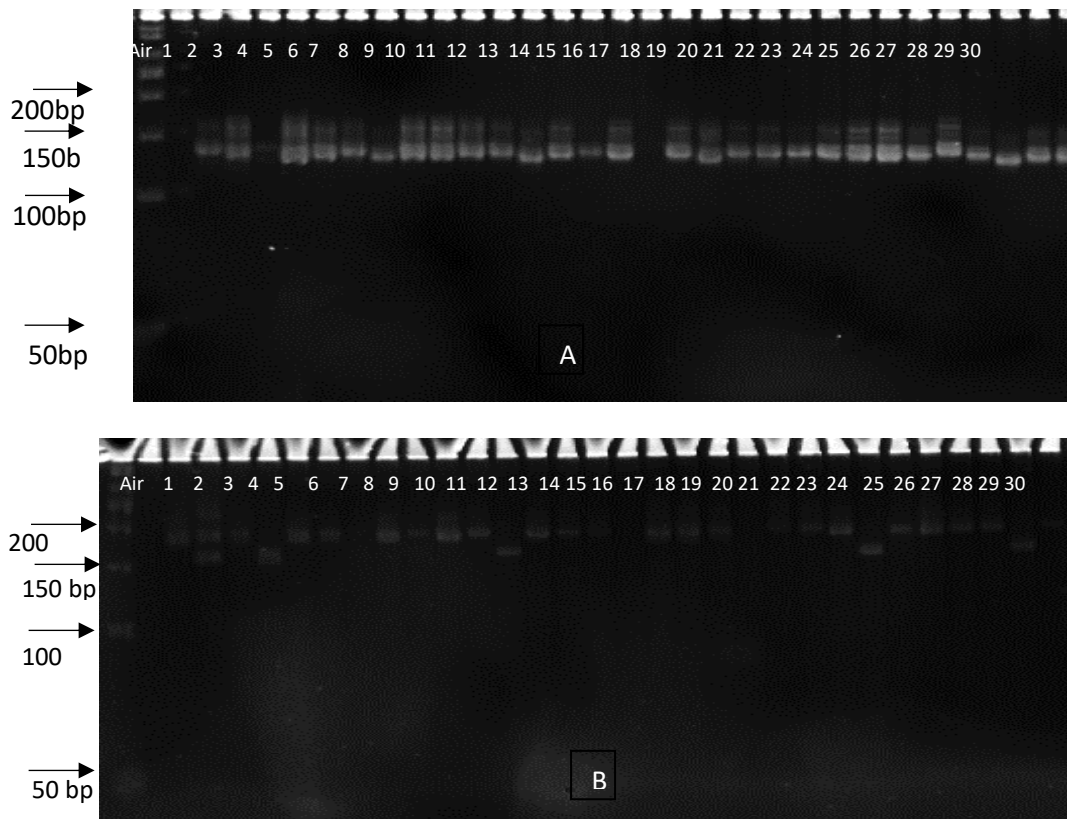
Keterangan: pada table referensi putaka yang menyebutkan primer - primer tersebut terpaut dengan kandungan Zn pada padi.

Skoring pola pita produk PCR yang dihasilkan dari tiap genotipe pada setiap marka yang diaplikasikan dilakukan berdasarkan besar fragmen DNA produk PCR tersebut yang tervisualisasikan pada jarak tempuh tiap fragmen DNA dalam proses elektroforesis yang dilakukan. Analisis data dilakukan berdasarkan hasil pengkodean nilai pita DNA berupa data biner dengan “1” (ada pita) atau “0” (tidak ada pita) pada program Microsoft Excel. Analisis dilakukan pada parameter diversitas genetic dan PIC (*Polymorphic Information Content*) menggunakan software Power Marker serta analisis kalster berdasarkan kemiripan genetic menggunakan software NTSYS

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Visualisasi Fragmen DNA

Kesembilan marka yang diuji menghasilkan pola pita hasil amplifikasi fragmen DNA yang bersifat polymorphic (Gambar 1). Marka-marka tersebut menghasilkan pola pita polimorfik dengan ukuran 100-321 bp.



Gambar 1 Contoh pola pita yang divisualisasikan pada elektroforesis gel akrilamid 8% dengan menggunakan marka (A) RM247 dan (B) RM17

Tiap primer menghasilkan jumlah pita DNA (alel) yang berbeda. Pita yang muncul memiliki ukuran jumlah pasangan basa dan intensitas pita yang bervariasi. Perbedaan intensitas pita DNA dipengaruhi oleh kemurnian dan konsentrasi genom dalam reaksi. Banyaknya pita yang dihasilkan oleh setiap primer tergantung pada sebaran situs yang homolog pada genom (William et al., 1990 dalam Mutia, 2021). Adanya perbedaan pola pita yaitu berdasarkan jumlah dan ukuran pita menggambarkan variabilitas genom tanaman yang kompleks.

Polimorfisme Marka SSR

Penelitian ini mampu mengidentifikasi 41 alel dari 30 genotipe padi yang diuji dengan 9 marka SSR tersebut di atas. Rata-rata jumlah alel per marka adalah sebesar 4,56 dengan kisaran 2–10 alel per marka. Kesembilan marka SSR tersebut berposisi (lokus) menyebar relatif merata pada 4 kromosom padi yaitu, 2 marka pada kromosom 1, 1 marka pada kromosom 2, 2 marka pada kromosom 6, dan 4 marka pada kromosom 12 (Tabel 2). Jumlah alel sangat bervariasi di tiap lokus

Rischa Ainunnisa Febriella, Untung Susanto, Fawzy Muhammad Bayfurqon, Hayatul Rahmi :
Keragaman Genetik 30 Genotipe Padi (Oryza sativa L) Berdasarkan 9 Marka SSR Terpaut Kandungan Zn (Hal. 74 - 79)

SSR, berkisar antara memiliki 2 alel pada lokus RM247 dan 10 alel pada RM294A dengan rata-rata jumlah alel 4,56 per lokus.

Tabel 2. Jumlah alel, frekuensi alel utama, diversitas gen, dan tingkat polimorfisme (*Polymorphism Information Content*, PIC), heterozigositas yang dihasilkan dari 30 genotipe padi pada penelitian ini

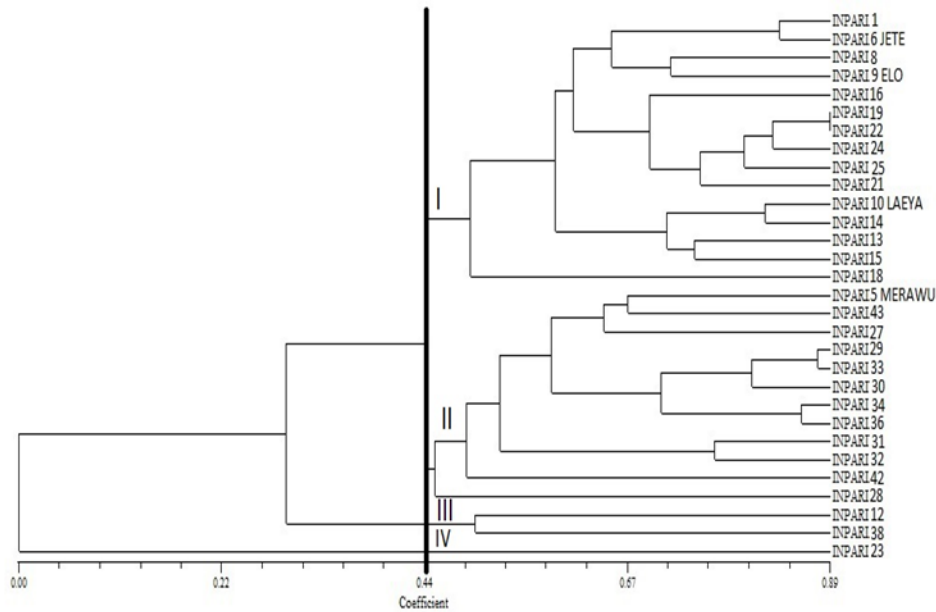
Primer	Jumlah Alel	Diversitas gen	PIC
RM23	6	0,79	0,76
RM294A	10	0,70	0,67
RM247	2	0,06	0,06
RM17	4	0,49	0,45
RM6	3	0,46	0,41
RM7488	3	0,24	0,23
RM309	5	0,63	0,59
RM415	4	0,74	0,69
RM400	4	0,51	0,43
jumlah	41	5	
rerata	4,56	0,51	0,48

Nilai diversitas gen menunjukkan tingkat keragaman dalam suatu populasi (Somantri *et al.*, 2002). Nilai-nilai keragaman genetik untuk setiap marka bervariasi yaitu antara 0,06 pada marka RM247 hingga 0,79 pada marka RM23, dengan rata-rata 0,51. Nilai *Polymorphic Informatif Content Value* (PIC) dari 9 marka yang diuji berkisar antara 0,06-0,76 dengan rata-rata PIC sebesar 0,48. Nilai PIC tertinggi terdapat pada marka RM23 sebesar 0,76 dan terendah pada marka RM247 dengan nilai PIC 0,06 (Tabel 2). Sebanyak empat marka SSR dari total sembilan marka yang digunakan memiliki nilai PIC > 0,50. Keempat marka tersebut antara lain RM23 dengan nilai 0,76, RM294A dengan nilai 0,67, RM309 dengan nilai 0,59 dan RM415 dengan nilai 0,69. Nilai rata-rata PIC adalah 0,48 sehingga dapat dikatakan mempunyai tingkat informasi polimorfisme genetik yang sedang. Nilai PIC marka SSR yang digunakan sangat penting untuk diketahui dalam analisis keragaman genetik dan kekerabatan plasma nutfah (Rohaeni *et al.*, 2016).

Kuantitas PIC didasarkan pada jumlah alel yang dapat dihasilkan oleh suatu marka dan frekuensi dari tiap alel dalam set genotipe yang diuji. Nilai ini mengindikasikan bahwa marka SSR tersebut cukup informatif digunakan untuk melihat keragaman antar genotip dan dimungkinkan menggambarkan pula variabilitas kandungan Zn dari genotype yang diuji. Semakin besar nilai PIC dalam suatu marka, maka semakin baik primer tersebut untuk menguji variabilitas genetik suatu populasi (Anderson *et al.* 1993).

Analisis Cluster

Analisis cluster dilakukan dengan menggunakan metode UPGMA untuk mengelompokkan varietas yang dipelajari berdasarkan pencocokan sederhana koefisien kesamaan. Analisis filogenetik menunjukkan bahwa 30 genotipe padi terpisah menjadi empat cluster utama pada koefisien 0,44 (Gambar 2). Cluster pertama terdiri atas 15 genotipe yang seluruhnya merupakan jenis padi sawah yaitu Inpari 1, Inpari 6 Jete, Inpari 8, Inpari 9 Jelo, Inpari 16, Inpari 19, Inpari 22, Inpari 24, Inpari 25, Inpari 21, Inpari 10, Inpari 14, Inpari 13, Inpari 15, Inpari 18, cluster kedua terdiri atas 12 genotipe yang seluruhnya merupakan padi sawah yaitu Inpari 5 Merawu, Inpari 43, Inpari 27, Inpari 29, Inpari 33, Inpari 30, Inpari 34, Inpari 36, Inpari 31, Inpari 32, Inpari 42, Inpari 28, cluster ketiga terdiri atas 2 genotipe yang seluruhnya merupakan padi sawah yaitu Inpari 12 dan Inpari 38 lalu cluster keempat terdiri atas 1 genotipe seluruhnya merupakan padi sawah yaitu Inpari 23. Cluster pertama terbagi kembali menjadi 2 subcluster yaitu subcluster IA yang terdiri atas 14 genotipe dan subcluster IB yang terdiri atas 1 genotipe. Sementara cluster kedua terpisah menjadi dua subcluster yaitu subcluster IIA yang merupakan subcluster dengan densitas tertinggi yaitu sebanyak 11 genotipe dan subcluster IIB yang hanya terdiri atas satu genotipe. Cluster ketiga dan keempat tidak memiliki subcluster.



Gambar 2. Dendrogram UPGMA 30 Genotipe padi berdasarkan 9 marka SSR

Pada Gambar 2 dapat dilihat bahwa terdapat 4 cluster yaitu cluster pertama terdapat genotipe padi dengan kekerabatan terdekat yaitu inpari 1 dan inpari 6 jete, sedangkan genotipe padi yang kekerabatan terjauh yaitu inpari 23 pada cluster keempat. Semakin tinggi tingkat kemiripan dalam kelompok yang sama (dengan tingkat kekerabatan yang tinggi) akan menghasilkan individu-individu dengan kemiripan yang kuat, maka peluang terjadinya inbreeding akan semakin tinggi (Dualembang *et.al.*, 2011).

KESIMPULAN

Penelitian ini mampu mengidentifikasi 41 alel dengan jumlah alel per marka berkisar antara 2 Hingga 10 dengan rata-rata 4,56. Nilai diversitas gen tertinggi diperoleh 0,79 (RM23) terendah diperoleh 0,06 (RM247) dengan rata-rata 0,51 Nilai PIC tertinggi diperoleh 0,76 (RM23) terendah diperoleh 0,06 (RM247) dengan rata-rata 0,48. Tiga puluh genotipe padi yang diuji menggunakan 9 marka SSR terbagi dalam empat cluster utama pada batas koefisien kemiripan genetik sebesar 0,44. Cluster pertama terdiri atas 15 genotipe padi, cluster kedua terdiri atas 12 genotipe padi, cluster ketiga terdiri atas 2 genotipe, dan cluster keempat terdiri hanya 1 genotipe.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Balai Besar Penelitian Tanaman Padi (BB Padi) dan Universitas Singaperbangsa Karawang yang telah memperkenankan dilaksanakannya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, A., Churchill, G. A., Autrique, J. E., Tanksley, S. D., Sorrells, M. E. 1993. Optimizing Parental Selection for Genetic Linkage Maps. *Genome*, 36(1) : 181-186.
- Badan Pusat Statistik. 2019. Luas Panen dan Produksi Padi di Indonesia. Diakses: <https://www.bps.go.id/publication/2020/12/01/21930121d1e4d09459f7e195/luas-panen-dan-produksi-padi-di-indonesia-2019> [22 April 2021].
- Chen X, Temnykh S, Xu Y, Cho YG, McCouch SR. 1997. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and applied genetics* 95:553–567

Rischa Ainunnisa Febriella, Untung Susanto, Fawzy Muhammad Bayfurqon, Hayatul Rahmi : *Keragaman Genetik 30 Genotipe Padi (Oryza sativa L) Berdasarkan 9 Marka SSR Terpaut Kandungan Zn (Hal. 74 - 79)*

Dualembang, E., Musa, Y., Azrai, M. 2011. Karakterisasi Genetik Koleksi Plasma Nutfah Sorgum (*Sorghum bicolor* L. Moench) Berbasis Marka SSR (*Simple Sequence Repeats*). *Jurnal Balai Penelitian Tanaman Serealia*, 25: 1-15

Kusudaryati, D. P. D. 2013. Kekurangan Asupan Besi dan Seng Sebagai Faktor Penyebab Stunting pada Anak. *Profesi (Profesional Islam): Media Publikasi Penelitian*. 10 (1) : 57-61.

Lestari, P., Risliawati, A., Utami, D. W., Hidayatun, N., Santoso, T. J., Chaerani, C. 2017. Pengembangan Identitas Spesifik Berbasis Marka SSR Pada 29 Varietas Kedelai Lokal Indonesia. *Jurnal Biologi Indonesia*. 12 (2) : 219-229

Mutia, D. 2021. Identifikasi dan Karakterisasi Genetik Galur Mutan Kedelai (*Glycine max* L. Merrill) Generasi M5 Berdasarkan Kandungan Asam Lemak Menggunakan Marka Simple Sequence Repeats (SSR). [Skripsi], Medan: Universitas Sumatra Utara.

McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, Lobos KB, Clare K, Walton M, Fu B, Maghirang R, Li Z, Xing Y, Zhang Q, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D, Stein L. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.), *DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 9:199–207

Panaud, O, Chen X, McCouch SR. 1996. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and applied genetics* 252: 597-607

Rohaeni W. R, Susanto U, Yunani N, Usyati N, Satoto. 2016. Kekerabatan Beberapa Aksesori Padi Lokal Tahan Hama Penyakit Berdasarkan Analisis Polimorfisme Marka SSR. *Jurnal AgroBiogen*. 12 (2) : 81–90.

Somantri, I. H., Santoso, T. J., Minantyorini, A. A., Sisharmini, A., Apriana, A. 2002. Karakterisasi Molekuler Plasma Nutfah Tanaman Pangan. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman*. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

Sumarno. 2006. *Periodisasi Musim Tanam Padi Sebagai Landasan Manajemen Produksi Beras Nasional*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, Bogor

Temnykh S, Park WD, Ayres NM, Cartinhour S, Hauck N, Lipovich L, Cho YG, Ishii T, McCouch SR. 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and applied genetics* 100:697–712.

Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour S, McCouch S. 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential, *Genome research* 11:1441–1452.