

Hubungan kekerabatan padi gogo pada kondisi ternaungi berdasarkan analisis RAPD

Relationship analysis of upland rice under shading condition based on RAPD

YULI SULISTYOWATI^{1,*}, ANGELITA PUJI LESTARI², ENUNG SRI MULYANINGSIH¹

¹Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. Jl. Raya Bogor KM 46 Cibinong 61911, Jawa Barat, Indonesia. Tel. +62-021-8754587,

*email: ysulistyowati@yahoo.com

²Balai Besar Penelitian Tanaman Padi (BB Padi). Jl. Raya 12 Sukamandi Subang 41256, Jawa Barat, Indonesia.

Manuskrip diterima: 23 Juni 2018. Revisi disetujui: 24 Juli 2018.

Abstrak. Sulistyowati Y, Lestari AP, Mulyaningsih ES. 2018. Hubungan kekerabatan padi gogo pada kondisi ternaungi berdasarkan analisis RAPD. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 4: 190-194*. Padi gogo merupakan tanaman yang toleran pada lahan kering dan dapat ditanam sebagai tanaman sela di bawah tegakan. Akan tetapi naungan tanaman tegakan menjadi kendala pertumbuhannya di lahan perkebunan, sehingga perlu upaya untuk memperoleh varietas padi gogo yang toleran terhadap kondisi naungan. Marka molekuler dapat digunakan untuk menganalisis keragaman genetik, mengetahui identitas kultivar dan studi evolusi. RAPD (Random amplified polymorphism DNA) merupakan salah satu metode untuk menganalisis keragaman genetik. Penelitian sebelumnya telah dilakukan seleksi terhadap 200 genotipe padi gogo yang diberi perlakuan naungan, selanjutnya 19 genotipe dengan hasil/rumpun tinggi dan 11 genotipe dengan hasil/rumpun rendah digunakan dalam penelitian ini. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh informasi keragaman genetik dari 30 padi gogo yang ditanam pada kondisi naungan berdasarkan analisis marka molekuler. Tiga puluh genotipe padi gogo dievaluasi menggunakan 20 marka RAPD. Hasil analisis diperoleh 12 marka menunjukkan pita polimorfik yang jelas untuk selanjutnya dianalisis menggunakan program NTSYS 2.02. Hasil analisis menunjukkan terdapat 72 lokus RAPD, dengan rata-rata 6 pita per primer. Analisis dendrogram pada koefisien kemiripan 0.76 terdapat 4 kelompok (kluster). Jumlah genotipe untuk masing-masing kluster berturut-turut adalah 16, 9, 3 dan 2 (kluster 1,2,3 dan 4). Informasi genetik berguna untuk pemilihan tetua dan mengetahui keragaman plasma nutfah yang ada.

Kata kunci: Naungan, padi gogo, RAPD

Abstract. Sulistyowati Y, Lestari AP, Mulyaningsih ES. 2018. Relationship analysis of upland rice under shading condition based on RAPD *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 4: 190-194*. Upland rice is tolerant crops on dry land and can be planted as a crop stream to the area under the stands. However, the shade area under the stands often affect the growth of rice in the fields. Efforts to develop upland rice varieties tolerant shade is necessary. Molekuler markers can be used to analysis genetic variability, inform cultivar identity and evolution study. RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA) is one of the methods to analysis genetic variability. In a previous study, screening level of 200 rice genotypes had been done in a controlled shade using paranet. 19 genotypes with high yield and 11 genotypes with low yield under controlled shade were used in this study. The objective of this study was to assess the genetic variability of 30 rice genotypes that planted under the shade area using molekuler marker analysis. Thirty rice genotypes were analyzed using 20 RAPD primer. Twelve out of 20 primer gave the polimorfic bands and then analyzed using the NTSYS 2.02 program. The results showed a total of 72 RAPD loci, with an average of 6 fragmen per primer. The dendrogram for pooled data showed four clusters in similarity coefficient 0.76. The number of genotypes of each cluster were 16, 9, 3 and 2 respectively (cluster 1,2,3, and 4). The information of genetic variability is useful in the choice of parents for plant breeding and assess the variability of germplasm.

Keywords: Shading, upland rice, RAPD

PENDAHULUAN

Beras merupakan makanan pokok bagi sebagian besar penduduk di Indonesia. Untuk memenuhi kebutuhan pangan bagi penduduk yang terus meningkat diperlukan ketersediaan pangan yang cukup. Seiring semakin berkurangnya sawah atau lahan subur untuk pertanian, maka diperlukan pemanfaatan lahan-lahan sub optimal. Salah satu lahan sub optimal adalah lahan perkebunan atau dibawah tegakan. Padi gogo merupakan padi yang ditanam pada lahan kering sehingga dapat diupayakan sebagai

tanaman sela pada tanaman tahunan terutama saat belum berproduksi serta tajuk belum saling menutupi. Akan tetapi pengembangan padi gogo sebagai tanaman sela untuk areal di bawah tegakan sering menghadapi berbagai kendala, terutama intensitas cahaya yang rendah. Menurut Harsanti (2011) kekurangan cahaya pada tanaman padi gogo dapat mengakibatkan terganggunya proses metabolisme sehingga menurunkan laju fotosintesis dan sintesis karbohidrat yang selanjutnya dapat menyebabkan penurunan hasil. Cahaya matahari merupakan sumber energi untuk proses fotosintesis (Sirait 2008). Oleh karena itu diperlukan upaya

untuk memperoleh varietas padi gogo yang toleran terhadap kondisi naungan.

Saat ini kemajuan ilmu bidang biologi molekuler telah dapat mengamati karakterisasi makhluk hidup pada tingkat DNA dalam bentuk marka. Marka molekuler merupakan karakter seleksi yang stabil, tidak dipengaruhi oleh lingkungan dan dapat dilakukan pada generasi awal. Penanda *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) merupakan salah satu marka molekuler yang banyak digunakan untuk klasifikasi dan identifikasi tanaman. Hingga saat ini telah banyak hasil penelitian yang menggunakan RAPD pada berbagai komoditas pertanian dan untuk berbagai tujuan. Handayani *et al.* (2012) melakukan seleksi marka RAPD terpaut sifat toleran intensitas cahaya rendah pada kedelai. Goraniya *et al.* (2013) melaporkan bahwa RAPD dapat membantu dalam mengidentifikasi dan pembuktian keragaman dan hubungan genetik antara spesies yang berbeda pada *Manilkara hexandra* dan *Averrhoa carambola*. Teknik RAPD juga digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan antara mangga lokal dan mangga populer yang telah dilakukan oleh Gajera *et al.* (2014).

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan penanaman 200 genotipe padi gogo pada kondisi ternaungi di Kebun Percobaan Muara, Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Bogor. Dari penelitian tersebut diperoleh kisaran hasil/rumpun antara 0.00 g – 19.03 g, selanjutnya dipilih 19 genotipe dengan hasil lebih dari 10.5 g/rumpun dan 11 genotipe dengan hasil kurang dari 1.5 g/rumpun untuk digunakan dalam penelitian ini. Ketiga puluh genotipe tersebut dianalisis menggunakan marka RAPD. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat hubungan kekerabatan dari 30 genotipe padi gogo yang ditanam pada kondisi ternaungi. Data keragaman genetik atau jarak genetik yang diperoleh dapat digunakan untuk memilih calon tetua persilangan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong pada bulan Agustus – Desember 2017. Sebanyak 30 genotipe padi gogo disemai dalam bak plastik berukuran 40 x 30 x 15 cm menggunakan media tanah dan kompos dengan perbandingan 2 : 1. Selanjutnya bak persemaian disimpan dalam rumah kaca dan disiram menggunakan *hand sprayer* untuk menjaga kelembaban.

Daun tanaman padi yang telah berumur 2-3 minggu dipotong menggunakan gunting yang telah disterilisasi menggunakan etanol 70%. Daun dimasukkan dalam tube 1.5 ml dan diletakkan dalam box berisi es. Selanjutnya sampel daun disimpan dalam freezer untuk digunakan dalam ekstraksi DNA.

Isolasi DNA

Metode isolasi DNA menggunakan metode CTAB. Daun di dalam tube 1.5 ml diberi Nitrogen cair lalu digerus dan ditambahkan 750 ul buffer isolasi (Tris-HCl pH 7.5 0.2 M, EDTA 0.05 M, NaCl 2 M, dan CTAB 2%). Selanjutnya sampel diinkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam. Kemudian ke dalam tube ditambahkan 750 ul *chloroform*:

isoamylalkohol (24: 1) dan disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 8.000 rpm. Supernatan dipindahkan ke tube baru dan ditambah dengan 400 ul isopropanol dingin, lalu disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 8.000 rpm. Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan 70% etanol. Pelet dikeringkan dan dilarutkan dengan 50 ul TE pH 8.0.

Kualitas dan keberadaan DNA diamati menggunakan elektroforesis berdasarkan pita yang terbentuk. Elektroforesis dilakukan pada 1% gel agarose menggunakan buffer 0.5x TBE 70 volt selama 45 menit. Hasil elektroforesis divisualisasikan di atas UV transiluminator dan difoto dengan alat biodocanalyser.

Kuantitas dan kemurnian DNA diukur menggunakan nanodrop (Implen Nanophotometer). Selanjutnya dibuat pengenceran DNA 100 ng/ul agar konsentrasi seragam saat digunakan dalam analisis molekuler.

Analisis molekuler

Berdasarkan hasil percobaan di lapang dalam kondisi ternaungi yang dilakukan di Kebun Percobaan BB Padi, Muara, Bogor dipilih 19 genotipe yang memiliki hasil/rumpun lebih dari 10.5 g dan 11 genotipe dengan hasil/rumpun kurang dari 1.5 g (Tabel 1). Selanjutnya DNA dari genotipe-genotipe tersebut dianalisis keragaman genetiknya menggunakan marka RAPD. RAPD dilakukan dengan prinsip penggandaan DNA menggunakan alat PCR. Kemunculan pita DNA menjadi dasar untuk analisis keragamannya

Tabel 1. Genotipe padi gogo yang dianalisis menggunakan marka RAPD

	No.	Genotipe
Genotipe dengan hasil/rumpun lebih dari 10.5 g	1	B14168E-MR-31
	2	B14168E-MR-33
	3	B11592F-MR-4-6-1-6-2-3-2-TB1
	4	B14168E-MR-23
	5	B12755E-MR-1-PN-8-2-3-1
	6	B12743-MR-18-2-3-5-PN-10-3-1
	7	B15119C-TB-13
	8	B11908F-TB-1-1
	9	B15175C-TGB-19
	10	B15175C-TGB-23
	11	B15175C-TGB-40
	12	B15302B-TGB-38
	13	B15344B-TB-31
	14	B15344B-TB-50
	15	B15340-1B-TB-39
	16	B15341-2B-TB-37
	17	B12056F-TB-1-5-4-1
	18	B14089F-Ng-80
	19	Al-Kautsar
Genotipe dengan hasil/rumpun kurang dari 1.5 g	20	IR 64
	21	Inpago 5
	22	Kalimutu
	23	Inpago 6
	24	Inpago 7
	25	Inpago 11
	26	Cisantana
	27	Salumpikit
	28	Kasalath
	29	Grendel 2
	30	Grendel 5

Amplifikasi DNA

DNA diamplifikasi menggunakan PCR. Reaksi terdiri atas: 100 ng/ μ L genomik DNA (1 μ L), 10X buffer polimerase DNA (1 μ L), 10 mM dNTPs (0.2 μ L), 10 μ M/uL primer (0.8 μ L), 5U/ μ L enzim Taq polimerase DNA (0.04 μ L) dan ditambahkan ddH₂O hingga volume reaksi total mencapai 10 μ L.

Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan 20 primer RAPD yaitu OPA 02, OPA 09, OPB 09, OPC 05, OPC 09, OPD 05, OPD 06, OPG 13, OPH 03, OPJ 01, OPJ 05, OPN 12, OPS 19, OPW 05, OPW 16, OPY 08, OPZ 03, S122, S123, dan S126 dengan alat PCR Thermal Cycler (Biometra), pada kondisi: satu siklus denaturasi (95°C, 3 menit); 44 siklus amplifikasi [denaturasi 94°C 30 detik, annealing 31°C 30 detik, sintesis 72°C 1 menit]; 72°C 10 menit (pemanjangan final); 10°C (penyimpanan). Hasil PCR dipisahkan dalam 2 % gel agarose yang telah diberi SYBR safe. Running gel dilakukan selama 120 menit pada tegangan 50 volt. Gel divisualisasi menggunakan Gel Doc.

Analisis data

Analisis kekerabatan dilakukan berdasarkan pita produk amplifikasi yang muncul kemudian discoring secara visual. Skor 1 apabila ada pita dan 0 jika tidak ada pita. Scoring ini dilakukan pada setiap genotipe tanaman dan setiap primer, sehingga membentuk data biner. Estimasi kekerabatan didasarkan atas jumlah kesamaan pita yang teramplifikasi yang dianalisis dengan perangkat lunak NTSYS 2.02. Dendrogram dibuat menggunakan unweighted pair-group with arithmetic average (UPGMA).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Berdasarkan hasil analisis dari 20 primer yang digunakan, 12 primer menghasilkan produk amplifikasi. Hasil amplifikasi berupa 9 pita monomorfik dan 63 pita polimorfik dengan jumlah total pita amplifikasi sebanyak 72 pita (Tabel 2). Beberapa contoh hasil PCR ditampilkan pada Gambar 1. Hasil PCR menggunakan 12 primer selanjutnya dianalisis menggunakan program NTSYS 2.02

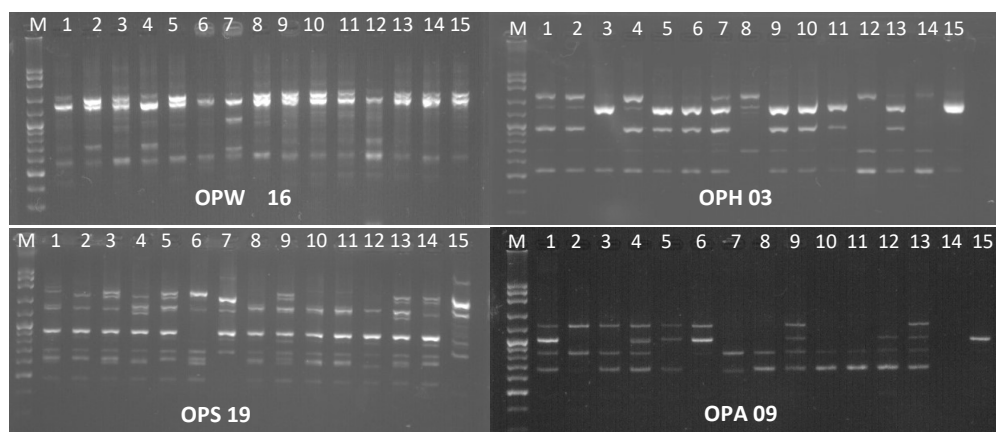
untuk mengetahui kekerabatan genetik di antara genotipe yang diuji. Dendrogram yang dihasilkan menunjukkan adanya 4 kelompok genotipe padi gogo (Gambar 2). Jumlah genotipe untuk masing-masing kluster berturut-turut adalah 16, 9, 3 dan 2 (kluster 1,2,3 dan 4).

Pembahasan

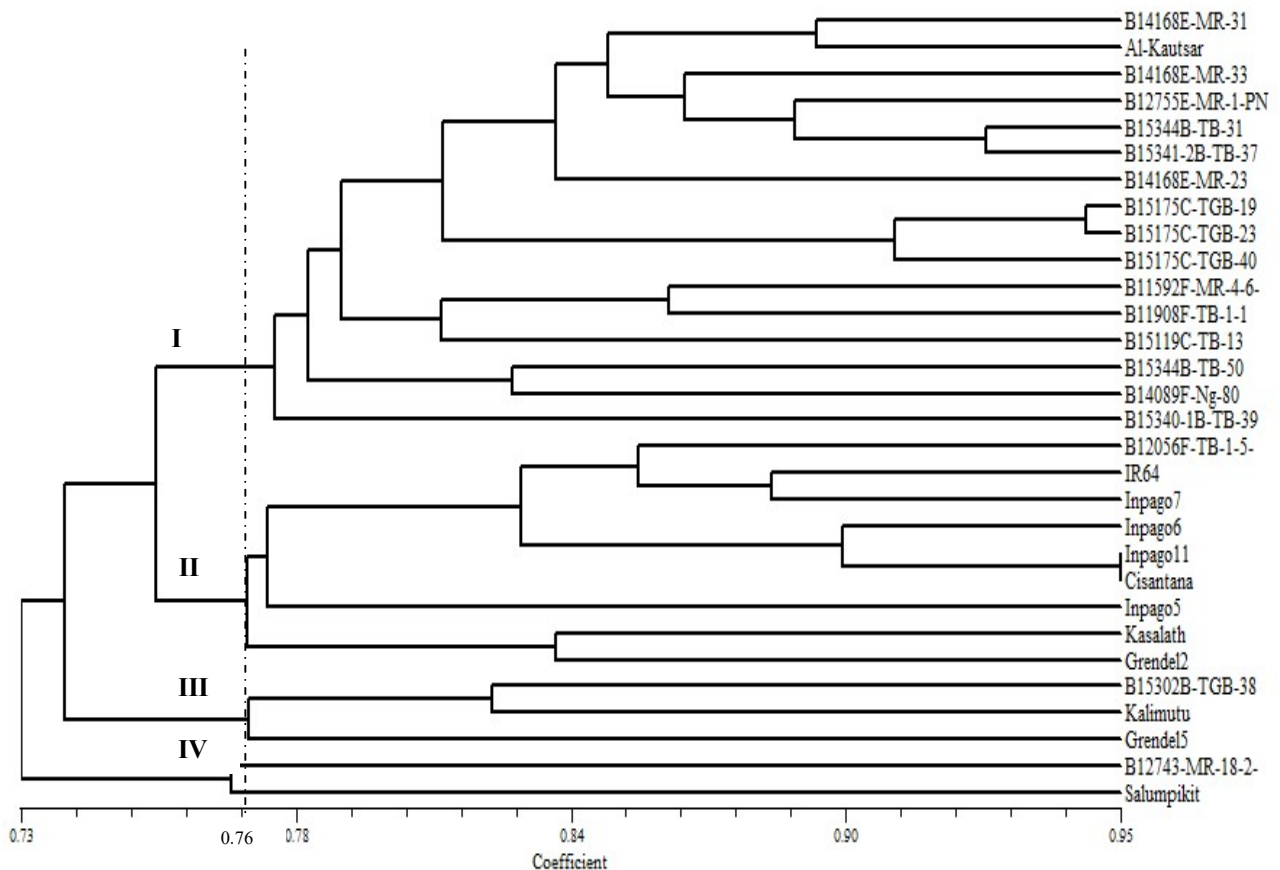
Pengamatan keragaman genetik dalam studi ini dilakukan menggunakan marka molekuler RAPD. Keuntungan dari penggunaan marka molekuler ini adalah bahwa hasil yang diperoleh tidak dipengaruhi lingkungan. Analisis DNA dilakukan terhadap 30 genotipe untuk melihat karakter kekerabatan genetik antar genotipe. Pada penelitian ini digunakan 20 primer RAPD untuk mengamplifikasi total genom DNA. Dari 20 primer yang diuji, 12 primer memunculkan pita (OPH 03, OPS 19, OPW 16, OPW 05, OPA 02, OPC 05, OPG 13, OPJ 01, OPB 09, OPA 09, OPJ 05 dan OPC 09) dan 8 primer tidak memunculkan pita atau tidak teramplifikasi (OPY 08, OPZ 03, OPD 05, OPD 06, OPN 12, S122, S123, dan S126). Pita tidak teramplifikasi dapat disebabkan oleh suhu annealing belum optimal atau urutan DNA primer yang tidak sesuai dengan urutan DNA pada genom padi yang diuji.

Tabel 2. Primer RAPD yang digunakan dan rekapitulasi hasil PCR dalam analisis DNA padi naungan

No	Primer	Pita monomorfik	Pita polimorfik	Jumlah total pita	Persentase Polimorfisme (%)
1	OPS 19	1	10	11	91
2	OPG 13	0	4	4	100
3	OPH 03	0	6	6	100
4	OPW 16	2	4	6	67
5	OPC 05	0	10	10	100
6	OPW 05	2	2	4	50
7	OPJ 01	1	3	4	75
8	OPJ 05	1	1	2	50
9	OPA 09	0	8	8	100
10	OPB 09	0	4	4	100
11	OPA 02	2	7	9	78
12	OPC 09	0	4	4	100
Total		9	63	72	



Gambar 1. Hasil PCR menggunakan primer OPW 16, OPS 19, OPH 03 dan OPA 09. Keterangan . M marker ladder 100bp; 1-15 sampel genotipe padi gogo



Gambar 2. Dendrogram kekerabatan 30 genotipe padi gogo dengan penanda RAPD

Jumlah pita yang dihasilkan untuk setiap primer bervariasi mulai dari 2 (OPJ 05) hingga 11 (OPS 19) dengan rata-rata kemunculan pita setiap primer adalah 6. Dari 72 total pita yang dihasilkan, 63 adalah pita polimorfik (87.5 %). Kesesuaian setiap primer bervariasi dan berbeda terhadap setiap DNA cetakan, meskipun DNA berasal dari komoditi tanaman yang sama (Simarmata dan Rustikawati 2015). Pita polimorfik menunjukkan adanya keragaman dalam genom tanaman. Semakin banyak primer yang dapat mengamplifikasi pita polimorfik, semakin besar keragaman dalam genom (Mulyaningsih dan Indrayani 2014).

Hasil PCR menunjukkan adanya keragaman diantara genotipe padi gogo yang diuji. Pita DNA hasil amplifikasi dianalisis keragamannya secara deskriptif. Analisis kelompok (cluster analysis) dilakukan menggunakan *unweighted pair group method for arithmetic mean* (UPGMA) untuk menghitung jarak genetik. Pengelompokan tersebut menampilkan hubungan kekerabatan genetik dalam bentuk dendrogram yang dihasilkan dalam program NT-SYS.

Hasil analisis kluster berdasarkan 12 marka RAPD terhadap 30 padi gogo pada koefisien kemiripan 0,76 atau jarak genetik 0,24 terdapat empat kelompok atau kluster. Kelompok 1 terdiri dari 16 genotipe : B14168E-MR-31, Al-Kautsar, B14168E-MR-33, B12755E-MR-1-PN-8-2-3-1, B15344B-TB-31, B15341-2B-TB-37, B14168E-MR-23, B15175C-TGB-19, B15175C-TGB-23, B15175C-TGB-40,

B11592F-MR-4-6-1-6-2-3-2-TB1, B11908F-TB-1-1, B15119C - TB-13, B15344B-TB-50, B14089F-Ng-80 dan B15340 -1B-TB-39. Kelompok 2 terdiri dari 9 genotipe yaitu B12056F-TB-1-5-4-1, IR 64, Inpago 7, Inpago 6, Inpago 11, Cisantana, Inpago 5, Kasalath dan Grendel 2. Kelompok 3 terdiri atas 3 genotipe yaitu B15302B-TGB-38, Kalimutu dan Grendel 5. Kelompok 4 hanya memiliki 2 genotipe yaitu B12743-MR-18-2-3-5-PN-10-3-1 dan Salumpikit. Berdasarkan primer yang digunakan, genotipe B15175C-TGB-19 dan B15175C-TGB-23 memiliki koefisien kemiripan diatas 94 %, sedangkan Cisantana dan Inpago 11 memiliki koefisien kemiripan 95%.

Dari pengelompokan tersebut terlihat bahwa pada kluster 1 mengelompok genotipe-genotipe padi gogo yang memiliki hasil lebih dari 10.5 g/rumpun pada kondisi ternaungi. Sedangkan kluster 2 hampir semuanya merupakan genotipe padi gogo yang memberikan hasil kurang dari 1.5 g/rumpun dan hanya 1 genotipe yang memberikan hasil lebih dari 10.5 g/rumpun. Kluster 3 dan 4 terdiri dari padi gogo yang memiliki hasil lebih dari 10.5 g/rumpun dan kurang dari 1.5 g/rumpun. Berdasarkan hasil pengelompokan tersebut, diduga primer yang digunakan dalam penelitian ini dapat mengelompokkan adaptasi genotipe terhadap naungan. Menurut Hapsoro *et al* (2015) penggunaan penanda molekuler memberikan hasil yang lebih handal pada penilaian keragaman genetik. Marka molekuler yang terpaut dengan sekuen gen yang

mengendalikan karakter yang ingin diperbaiki dapat dijadikan sebagai alat bantu seleksi (Hussain 2006).

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Sri Indrayani, S.Si dan Oktri Yurika, A.Md yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini. Kepada Proyek Penelitian KP4S tahun anggaran 2017 Kementerian Pertanian, yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Gajera HP, Bambharolia RP, Domadiya RK, Patel SV, Golakiya BA. 2014. Molecular characterization and genetic variability studies associated with fruit quality of indigenous mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *Plant Systematics and Evolution* 300: 1011-1020.
- Goraniya SN, Tusamda AR, Shirolkar G, Rao SN, Murthy SD, Pawar. 2013. Molecular analysis of *Manilkara hexandra* Roxb. and *Averrhoa carambola* L. using RAPD markers helps to understand genetic variations. *Intl J of Pharm Pharmaceut Sci* 5 (3): 626-628.
- Handayani T, Sastrosumarjo S, Sopandie D, Suharsono S, Setiawan A. 2012. Analisis marka morfologi dan molekuler sifat ketahanan kedelai terhadap intensitas cahaya rendah. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia* 8 (1).
- Hapsoro D, Warganegara HA, Utomo SD, Sriyani N, Yusnita. 2015. Genetic diversity among sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) genotypes as shown by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Agrivita* 37 (3): 247-257.
- Harsanti R. 2011. Potensi hasil tanaman padi gogo yang berasosiasi dengan bakteri fotosintetik *Synechococcus* sp pada lingkungan yang terpapar berbagai tingkat penanaman. [Skripsi]. Universitas Jember, Jember.
- Hussain SS. 2006. Molecular breeding for abiotic stress tolerance. drought perspective. *Proc Pakistan Acad Sci* 43 (3): 189-210.
- Mulyaningsih ES, Indrayani S. 2014. Keragaman morfologi dan genetik padi gogo lokal asal Banten. *Jurnal Biologi Indonesia* 10 (1) : 119 - 128.
- Simarmata M, Rustikawati. 2015. Identifikasi genetik kultivar padi gogo dengan menggunakan marka RAPD. *Akta Agrosia* 18 (2): 1-10.
- Sirait J. 2008. Luas daun, kandungan klorofil dan laju pertumbuhan rumput pada naungan dan pemupukan yang berbeda. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 13 (2): 109-116