

IDENTIFIKASI KERAGAMAN GENETIK ANTARA PELITA I/I DAN ROJOLELE MENGGUNAKAN MARKAH RAPD*

[Identification of Genomic Diversity Between Rice Types Cv Pelita I/I and Cv Rojolele]

Ishak

Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi, BAT AN
PO Box 7010, JKSKL
Jakarta 12070

ABSTRACT

The study of genomic diversity in molecular level on two sub-species i.e indica and javanica rice types were represented by cv. Pelita 1/1 and Rojolele respectively. Javanica called padi bulu due to long aunt on the grain. Polymerase Chain Reaction (PCR) with 17 primers have been used for detecting genomic variation between these two sub-species. Results of experiment indicated that 12 out of 17 primers showed polymorphic DNA. This study would assist plant breeder to decide, whether to improve rice quality through crossing between javanica and indica is necessary.

Kata kunci/key words: Keragaman genetik/genetic diversity; RAPD; Pelita 1/1; Rojolele

PENDAHULUAN

Tiga sub-spesies padi yang dikenal dunia sampai saat ini yaitu indika, javanika dan japonika. Sebagian besar jenis padi tipe indika ditanam di daerah Asia tenggara termasuk Indonesia, sedangkan javanika banyak ditanam pada daerah India dan Indonesia. Dua jenis varietas berasal dari subspecies javanika yang banyak ditanam di Indonesia adalah Pandan Wangi dan Rojolele. Kedua jenis varietas padi tersebut disebut juga dengan nama padi bulu karena ujung gabah mempunyai bulu yang panjang. Padi tipe japonika kebanyakan ditanam pada daerah yang beriklim sedang seperti Jepang dan Cina. Menurut Mackill (1995) japonika dapat dibagi dalam dua sub group yaitu "temperate japonica" dan "tropical japonica", yang berdasarkan analisis RAPD tidak memberikan perbedaan yang berarti antara ke dua sub-group tersebut. Perbedaan yang nyata dari analisis

diversitas genetik dengan teknik RAPD adalah dua kelompok besar yaitu antara indika dan japonika. Analisis yang dilakukan dengan genetika molekular akan menuntun peneliti dalam mengambil keputusan untuk menentukan apakah kekerabatan genetik suatu spesies dekat atau jauh, sehingga dapat memprediksi apakah hasil silangan akan mencapai tujuan atau tidak dalam merakit plasma nutfah baru. Oleh karena bertambah jauh kekerabatan varietas akan dapat terjadi "sexual incompatibility"

Perkembangan penelitian akhir-akhir ini dalam bidang molekular genetik untuk memperbaiki kualitas tanaman telah menggunakan sidik jari DNA. Salah satu teknik sidik jari DNA adalah "Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)" yang sering digunakan dalam menentukan keragaman genetik, kemurnian suatu spesies, dan untuk taxonomi (Weeden *et al.*, 1992 sit. Iqbal dan Rayburn,

* Penelitian ini dibiayai oleh International Atomic Energy Agency (IAEA, Wina, Austria)

1994). Di samping itu teknik RAPD mampu membedakan mutan "meiotic" dari *Medicago sativa* (Barcacia, *et al.*, 1994). Analisa RAPD berdasarkan "marker Polymerase Chain Reaction (PCR)" yang menggunakan primer terdiri dari 10-oligomer atau lebih (Williams *et al.*, 1990). Hasil amplifikasi DNA genom dengan PCR dipisahkan dengan gel elektroforesis. Perbedaan dari dua genotipe akan di ekspresikan dalam bentuk pola pita DNA. Analisa RAPD dapat juga digunakan dalam mendeteksi keragaman genetik antara varietas padi yang mempunyai kekerabatan dekat (Fukuoka *et al.*, 1992 sit. Virk *et al.*, 1995).

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keragaman genom Pelita I/I dan Rojolele yang berasal dari dua subspecies berbeda.

BAHAN DAN CARA KERJA

Isolasi DNA genom padi

DNA diisolasi dari daun yang segar dan bebas dari penyakit; daun diambil pada saat tanaman berumur sekitar 6-8 minggu. Isolasi DNA menggunakan metode Roger dan Bendich (1988) yang sudah dimodifikasi. Ditimbang 2 gr daun kemudian diberi larutan nitrogen cair kemudian digerus dalam lumpang porselin sampai menjadi tepung. Daun yang sudah menjadi tepung ini kemudian dipindahkan ke dalam tabung falkon berukuran 50 ml; setelah itu diberikan 10 ml bufer ekstraksi DNA (CTAB) terdiri dari 100 mM Tris.HCl pH 8.0; 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl; 2% CTAB dan 1% *PolyvinylPyrrolidon* (PVP) **BM** 40000. Sampel dan bufer dicampur sempurna dengan cara menggoyang tabung secara perlahan-lahan setiap lima menit dan waktu yang dibutuhkan adalah 30 menit. Setelah sampel dan bufer tercampur sempurna dalam tabung kemudian diberikan khloroform:isoamilalkohol (24:1) dan diaduk sempurna dengan cara menggoyang-goyang tabung ke atas dan ke bawah perlahan-

lahan. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 17 menit. Supernatan diambil dan dipindahkan ke tabung falkon yang baru kemudian diberikan 0,15 volume CTAB 10% dan larutkan dengan 0,7 M NaCl dan goyang perlahan-lahan sehingga tercampur sempurna. Ekstraksi yang kedua sama seperti ekstraksi pertama yaitu dengan menggunakan khloroform: isoamilalkohol (24:1) kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 17 menit. Supernatan diambil untuk dipindahkan ke tabung falkon yang baru kemudian ditambahkan 2 volume larutan CTAB terdiri dari 50 mM Tris HCl pH 8.0; 10 mM EDTA dan CTAB 1% dan diaduk sempurna sampai merata setelah itu diinkubasi selama 2 jam pada suhu 5°C. DNA dipresipitasi dalam tabung tersebut dengan kecepatan 4000 rpm selama 17 menit. Pelet DNA dilamtkan dengan bufer mengandung kadar garam tinggi yaitu terdiri dari 1,0 M NaCl, 10 mM Tris HCl dan 5 mM EDTA. Larutan DNA kemudian diendapkan lagi dengan alkohol 99% selama 2 jam. DNA yang terdapat dalam larutan alkohol dapat diambil dengan bantuan pengaduk plastik kecil, kemudian dipindahkan ke tabung eppendorf dan dilamtkan dalam bufer TE (1 mM EDTA dan 10 mM Tris.HCl). RNA yang ada dalam larutan DNA dapat dihilangkan dengan menggunakan 5 μ l RNase (stok 1 mg/ml) untuk setiap 600 μ l DNA yang ada dalam tabung kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Kemurnian DNA dapat dideteksi dengan gel elektroforesis menggunakan pewarnaan etidium bromide

Analisis PCR (Polymerase Chain Reaction)

Reaksi PCR dilakukan pada volume total adalah 30 μ l dalam tabung PCR yang berukuran 200 μ l. Setiap sampel yang akan dianalisis dengan PCR mengandung 0,1 mM DNTP, 2,5 μ l bufer PCR, 0,5 mM MgCl₂, 400 nM primer, 1,25 unit

tag-DNA polymerase (Gibco-BRL), 30 ng DNA sampel. Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan mesin PCR (Perkin-Elmer). Reaksi PCR dilakukan sebanyak 45 siklus, pada tahap pertama dilakukan pemanasan 94°C selama 4 menit, kemudian diikuti oleh reaksi berikutnya untuk setiap siklus dengan pemanasan pada suhu 93°C untuk 20 detik, 36°C selama 40 detik, 72°C selama 60 detik. Setelah reaksi PCR selesai sebanyak 45 siklus kemudian diikuti dengan pemanasan pada suhu 72°C selama 4 menit dan pendinginan pada suhu 10°C selama 30 menit.

Agarose gel elektroforesis

Produk PCR "dirunning" dengan menggunakan agarose gel elektroforesis dengan konsentrasi 1,2% dalam bufer TBE (Tris-Borac-EDTA). Etidium bromide sebagai pewarna untuk DNA ditambahkan pada agarose dengan konsentrasi akhir 0,5 µl/ml. Sekitar 8 µl setiap sampel hasil PCR dimasukkan ke setiap slot gel. Gel elektroforesis di "running" pada tegangan listrik 50 Volt dalam waktu 4 jam. Hasil pemisahan fragmen DNA dapat dideteksi di bawah ultraviolet kemudian diambil gambarnya untuk dianalisis berdasarkan migrasi dari fragmen DNA tersebut.

HASIL

Padi Pelita I/I dan Rojolele adalah berasal dari subspecies yang berbeda, secara fenotipe dapat juga diamati perbedaan beberapa sifat agronomis yang menonjol seperti umur tanaman, bentuk ujung gabah, lebar daun bendera, ketebalan daun dan sifat lainnya (Tabel 1). Perbedaan genotipe ke dua jenis tanaman ini akan diekspresikan ke bentuk penampilan fenotipe tanaman tersebut. Bentuk gabah dari ke dua subspecies tersebut sangat berbeda sekali terutama pada ujung gabah. Rojolele mempunyai ujung gabah yang berbulu panjang, sedangkan Pelita I/I pendek. Panjang

bulu ujung gabah padi Rojolele kadang-kadang mencapai 5 cm.

Isolasi DNA genom dari daun padi Pelita I/I dan Rojolele menggunakan metode CTAB yang dimodifikasi, telah memberikan hasil yang cukup memuaskan pada reaksi PCR. Hasil uji coba sampai tiga kali dari produk PCR dengan menggunakan jenis primer yang sama telah memberikan hasil yang konstan. Kemurnian DNA sampel yang digunakan dalam reaksi PCR akan menentukan ketepatan dalam menganalisis fragmen DNA setelah dipisahkan dengan gel elektroforesis. Isolasi DNA genom dalam skala yang lebih banyak akan menjamin kemurnian dan keseragaman hasil dari analisis RAPD. Terputusnya rantai DNA genom sewaktu melakukan ekstraksi akan dapat memberikan salah tafsir terhadap "DNA banding pattern" yang dideteksi pada gel elektroforesis.

Tujuh belas jenis primer yang mengandung komposisi urutan nukleotida G+C 60% telah digunakan dalam reaksi PCR untuk DNA genom Pelita I/I dan Rojolele. Setiap primer memberikan respon yang berbeda terhadap jumlah pita DNA yang dihasilkan setelah dilakukan pemisahan dengan gel elektroforesis. Pita DNA polymorphic yang dihasilkan dari PCR menggunakan primer UBC.32 sebanyak delapan pita DNA untuk pelita I/I, sedangkan Rojolele hanya menghasilkan empat pita DNA. Berat molekul pita DNA yang berbeda tersebut adalah 0,33 kb, 0,45 kb, 0,52 kb, 0,65 kb dan 1,3 kb dapat dideteksi pada Pelita I/I dan tidak ada pada Rojolele (Gambar 1a). Primer UBC.31 pada reaksi PCR menghasilkan pola pita DNA yang spesifik pada 1,9 kb dan 0,71 kb. Pita DNA pada 1,9 kb pada Rojolele sangat tebal, sedangkan pita DNA tersebut tidak terdeteksi pada Pelita I/I. Tidak semua jenis primer yang digunakan memberikan pita DNA "polymorphic" seperti UBC.156 dan UBC. 157 tidak memberikan keragaman antara dua

Tabel 1. Deskripsi beberapa sifat agronomis dua jenis padi dari subspecies indika dan javanika

Deskripsi	Pelita M	Rojolele
Subspesies	Indika	javanika
Umur tanaman	130-140 hari	150-160 hari
Bentuk tanaman	tegak	tegak
Tinggi tanaman	104,50?3,60	89,7072,50
Jumlah anakan vegetatif	10,0072,72	5,1071,70
Lebar daun bendera	1,7170,15 cm	2,0870,19 cm
Bentuk daun	Hijau tipis	hijau tebal
Ujung gabah	berbulu pendek	berbulu panjang

Tabel 2. Analisis pita DNA spesifik produk PCR yang ditemukan pada Varietas Pelita I/I subspecies indika dan Rojolele subspecies javanika

Kode primer	Urutan basa primer 5'—>3'	Pita DNA spesifik (Kb)	
		Pelita I/I	Rojolele
UBC.30	5'-CCGGCCTTAG-3'	1,3	0,90; 0,57
UBC.31	5'-CCGGCCTTAG-3'	-	1,9 ; 0,7
UBC.32	5'-GGGGCCTTAA-3'	1,30;0,65;0,52;0,45;0,33	-
UBC.67	5'-GAGGGCGAGC-3'	-	0J >
UBC.73	5'-GGGCACGCGA-3'	0,41	0,27
UBC.74	5'-GAGCACCTGA-3'	0	0
UBC.97	5'-ATCTGCGAGC-3'	0	0
UBC.98	5'-ATCCTGCCAG-3'	0	0
UBC.100	5'-ATCGGGTCCG-3'	-	2,56; 2,33; 1,84; 1,46
UBC.115	5'-TTCCGCGGGC-3'	1,10; 0,45	-
UBC.127	5'-ATCTGGCAGC-3'	2,12	-
UBC.156	5'-GCC†GGTTGC-3'	0	0
UBC.157	5'-CGTGGGCAGG-3'	0	0
UBC.158	5'-TAGCCGTGGC-3'	0,99;0,84	2,23;0,85
UBC.203	5'-CACGGCGAGT-3'	1,55	1,07
UBC.212	5'-GCTGCGTGAC-3'	0,47	-
UBC.226	5'-GGGCCTCTAT-3'	0,57	1,10; 0,45

0 = tidak ada pita DNA "polymorphic"

sub spesies tersebut. Produk PCR menggunakan primer UBC. 158 dapat dideteksi spesifik pita DNA pada 0,98 kb dan 0,82 kb (Gambar 1b). Primer UBC.74, UBC.97, UBC.98 tidak memperlihatkan adanya pita DNA "polymorphic" antara Pelita I/I dan Rojolele (Tabel 2). Hasil reaksi PCR menggunakan primer UBC. 100 diperoleh 7 pita DNA pada Rojolele dan 3 pita DNA pada Pelita I/I (Gambar 1c).

PEMBAHASAN

Random Amplified Polymorphic DNA banyak digunakan untuk mengidentifikasi keragaman genetik dari koleksi plasma nutfah padi (Ko, *et al.*, 1994; Virk *et al.*, 1995; Yu and Nguyen, 1994). Teknik ini dapat juga digunakan untuk menentukan persentase persilangan yang terjadi pada generasi F1 (Wang *et al.*, 1994). Program seleksi sifat genetik yang dibantu dengan penggunaan markah molekular dapat memacu usaha memperbaiki sifat-sifat tanaman ke arah tanaman unggul. Variasi kuantitatif antara sumber plasma nutfah padi dapat diidentifikasi dengan markah molekular seperti RAPD (Virk *et al.* 1996). Di samping itu RAPD dapat juga digunakan dalam taxonomi tanaman dan mengidentifikasi kekerabatan antara dua spesies yang berbeda (Tingey *et al.*, 1994) dan pengelompokan genotipe berasal dari spesies yang sama (Samec dan Nasinec, 1996; Virk *et al.*, 1995)

Varietas padi Pelita I/I dan Rojolele berasal dari spesies yang sama yaitu *Oryza sativa* L, tetapi berlainan subspecies. Menurut Glaszmann (1994) berdasarkan analisis isozim menunjukkan bahwa kekerabatan padi tipe javanika lebih cenderung ke arah tipe padi japonika. Analisis molekular dari padi javanika dan indika sangat penting artinya dalam bidang pemuliaan tanaman, oleh karena akan mengetahui seberapa jauh

adanya "genetic barrier" dalam melakukan persilangan. Dalam pemuliaan konvensional selalu mengandalkan persilangan dari dua sumber plasma nutfah untuk mendapatkan keragaman genetik pada generasi berikutnya. Dengan mengetahui adanya keanekaragaman DNA genom melalui informasi pita DNA "polymorphic" dari suatu spesies, maka keputusan akan dapat dibuat lebih awal dalam usaha memperbaiki sifat-sifat genetik dari suatu tanaman.

Penelitian ini menunjukkan bahwa teknik RAPD cukup akurat untuk digunakan dalam mendeteksi keragaman genetik pada DNA genom Pelita I/I dan Rojolele. Hasil pengamatan terbukti bahwa 12 dari 17 primer yang digunakan telah memperlihatkan pita DNA "polymorphic". Hal ini berarti lebih dari 70% primer yang digunakan bisa dijadikan sebagai markah DNA untuk membedakan DNA "polymorphic" antara kedua varietas tersebut di atas. Menurut Tingey *et al.*, (1994) bahwa teknik RAPD ini lebih sederhana dan murah bila dibandingkan dengan teknik RFLP. Kelemahan lain dari teknik RFLP adalah sangat sulit membedakan spesies yang mempunyai kekerabatan dekat seperti tipe padi "temperate japonica" dengan tipe padi "tropical japonica". Sedangkan teknik RAPD mampu mengatasi masalah tersebut apabila digunakan lebih banyak jenis primer.

Hubungan genetik antara subspecies sudah banyak diteliti termasuk berbagai jenis padi berasal dari subspecies yang sama, tumbuh pada geografis yang berbeda (Virk, *et al.*, 1995). Berbagai hal yang harus diperhatikan dan dikontrol dalam mengerjakan reaksi PCR adalah menjaga kemurnian DNA genom yang digunakan sebagai "DNA template" agar tidak salah dalam membuat interpretasi setelah pemisahan fragmen DNA dengan elektroforesis.

KESEVEPULAN

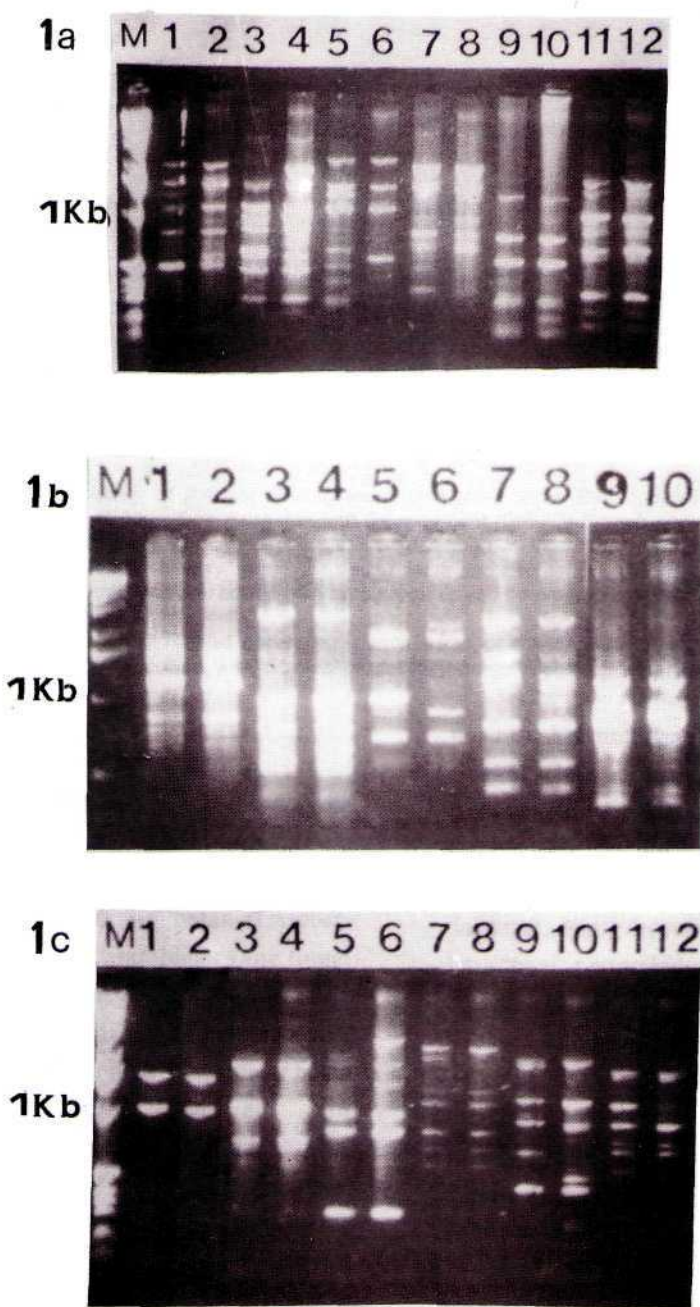
Hasil analisis RAPD dari DNA genom Pelita I/I dan Rqjolele menunjukkan bahwa 12 dari 17 primer yang digunakan memberikan pita DNA "polymorphic". Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa akan terjadi "genetic barrier" seandainya dilakukan persilangan antara kedua subspecies tersebut. Oleh karena berdasarkan penelitian ini menunjukkan lebih 70% dari primer yang digunakan dideteksi adanya pita DNA "polymorphic"

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada "International Atomic Energy Agency" (IAEA, Wina, Austria) yang telah memberikan dana untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Barcaccia G, Tavoletti S, Pezotti M, Falcecinelli M and Veronesi F. 1994. Fingerprinting of alfalfa meiotic mutants using RAPD markers. *Euphytica* 80, 119-25
- Glaszmann JC. 1994. A varietal classification of Asian cultivated rice (*Oryza sativa* L.) based on isozyme polymorphism. In: *Rice Genetic*. Proceed. IRRI Genet. Symp. 1985, 83-90
- Iqbal MJ and Rayburn AL. 1994. Stability of RAPD markers for determining cultivar specific DNA profiles in rye (*Secale cereale* L.). *Euphytica* 75, 215-220
- Ko HL, Cowan DC, Henry RJ, Grajam GC, Blakeney AB and Lewin LG. 1994. Random amplified polymorphic DNA analysis of Australian rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *Euphytica* 80, 179-189.
- Mackill DJ. 1995. Classifying japonica rice cultivars with RAPD. *Crop Sci.* 35, 889-894.
- Nybom H. 1994. DNA fingerprinting - A useful tool in fruit breeding, *Euphytica* 77, 59-64.
- Rogers SO and Bendich AJ. 1988. Extraction DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Press. A6, 1-10
- Samec P and Natsinec V. 1996. The use of RAPD technique for the identification and classification of *Pisum sativum* L. Genotypes. *Euphytica* 89, 229-234
- Tingey SV, Rafalski JA and Hanafey MK. 1994. Genetic with RAPD markers: In *Plant Molecular Biology*. Coruzzi and Puigdormenech P (Eds.), 491-498
- Virk PS, Ford-Lloyd BV, Jackson MT, Newbury, HJ. 1995. Use of RAPD for study of diversity within plant germplasm collections. *Heredity* 74, 170-179
- Virk PS, Ford-Lloyd BV, Jackson MT, Pooni HS, and Newbury HJ. 1996. Predicting quantitative variation within rice germplasm using molecular markers. *Heredity* 76, 296-304
- Wang G, Castiglione S, Zhang J, Fu R, Ma J, Li, W, Sun Y, and Sala F. (1994). Hybrid rice (*Oryza sativa* L.): Identification and percentage determination by RAPD fingerprinting. *Plant Cell Reports* 14, 112-115
- Williams JGK, Kubelik, AR, Livak, KJ, Rafalski JA and Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 18, 6531-6535
- Yu L-H** and **Nguyen HT.** 1994. Genetic variation detected with RAPD markers upland and lowland rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 87, 668-672.



Gambar 1a-c. Profil DNA "banding pattern" dari Pelita I/I dan Rojolele. Setiap pasangan nomer 1-2, 3-4, dst adalah pasangan Pelita I/I dan Rojolele, M adalah DNA marker (1 kb ladder). Gambar 1a, setiap pasangan menggunakan primer berturut-turut UBC.30, UBC.31, UBC.32, UBC.67, UBC.73, UBC.73, dan UBC.74. Gambar 1b, primer UBC.156, UBC.157, UBC.158, UBC.203, dan UBC 212. Gambar 1c, primer UBC.97, UBC.98, UBC.100, UBC.127, UBC.226, UBC.115.