

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil dan Pembahasan

4.1.1. Isolasi DNA Tanaman Padi

Hasil isolasi DNA daun padi dari 29 varietas padi (3 aksesori padi Introduksi dan 26 Padi lokal Indonesia) menunjukkan bahwa ada 1 varietas yang mengalami **kontaminasi protein** dengan kemurnian $< 1,8$ yaitu varietas **bendang pulau** yaitu kemurnian DNA yaitu **1,78** dengan konsentrasi **92,6 ng/ μ l**. Hasil isolasi DNA biasanya tidak selalu seragam konsentrasinya, oleh karena itu konsentrasi DNA diperoleh harus diseragamkan dengan pengenceran. Sedangkan untuk varietas yang mengalami **kontaminasi RNA** dengan kemurnian $> 2,0$ tidak terjadi kontaminasi.

4.1.2. Analisis Kuantitatif DNA

Hasil Analisis kuantitatif DNA dengan menggunakan alat *Spectrophotometer Nanodrop*. Spektrofotometer merupakan metode standar dalam pengukuran kuantitas DNA hasil isolasi. Spektrofotometer juga dapat digunakan untuk menentukan kemurnian DNA. Nilai kemurnian dari suatu sampel DNA hasil isolasi dapat dinyatakan dengan perbandingan nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

Hasil Analisis kuantitatif DNA menunjukkan nilai konsentrasi DNA aksesori **Maninjau** yang **paling tinggi** yaitu **174,4 ng/ μ l** dengan nilai

kemurnian DNA 1,82 dan tidak mengalami kontaminasi protein maupun RNA. Sedangkan nilai konsentrasi yang **paling rendah** yaitu aksesori **Seren** yaitu **57,1 ng/ μ l** tetapi memiliki kemurnian DNA yang murni yaitu **1,83 ng/ μ l**. DNA dapat dikatakan murni apabila nilai perbandingan 260/280 berkisar antara 1,8-2,0. DNA yang terkontaminasi oleh protein dapat menggunakan enzim protease dan yang terkontaminasi oleh RNA dapat dilakukan penambahan enzim RNase.

Kemurnian suatu DNA dapat dikatakan baik apabila berada pada rentang 1.8 hingga 2.0 karena pada rentang ini kemampuan DNA menyerap cahaya lebih baik (Aliyu *et al.*, 2013). Kemurnian DNA dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah penggunaan RNase. Perlakuan RNase terhadap sampel dapat menghilangkan RNA dari sampel dan mengurangi terjadinya peristiwa *smear* pada hasil elektroforesis. Proses degradasi RNA dari sampel DNA akan menghasilkan kualitas DNA hasil isolasi yang lebih baik (Aliyu *et al.* 2013). Untuk dapat mengetahui hasil analisis kualitatif isolasi DNA lebih jelasnya dapat dilihat pada Tabel 2 di bawah ini.

Tabel 2. Hasil Analisis Kuantitatif isolasi DNA 29 Aksesori Padi 26 Aksesori Padi lokal Indonesia dan 3 aksesori padi Introduksi) menggunakan Spektrofotometer

No	Sample Aksesori Padi	Nucleic Acid Conc	Unit	260/280	Sample Type	Factor
1.	Cere Ware	147	ng/μl	1,81	DNA	50
2.	Jawara Hawara	141,8	ng/μl	1,83	DNA	50
3.	Inpari 1	140,6	ng/μl	1,82	DNA	50
4.	Jalawara	70,1	ng/μl	1,83	DNA	50
5.	Seren	57,1	ng/μl	1,83	DNA	50
6.	Basmati	88,9	ng/μl	1,83	DNA	50
7.	IR 64	74,2	ng/μl	1,82	DNA	50
8.	Inpari 35	63,5	ng/μl	1,83	DNA	50
9.	Purple Rice	117,6	ng/μl	1,83	DNA	50
10.	Mira 1	166,1	ng/μl	1,8	DNA	50
11.	Tambleg	127,8	ng/μl	1,81	DNA	50
12.	Padi Gadok	125,2	ng/μl	1,81	DNA	50
13.	Situ Bagendit	133,7	ng/μl	1,82	DNA	50
14.	Pare Cerai	145,6	ng/μl	1,81	DNA	50
15.	Dodokan	126,5	ng/μl	1,82	DNA	50
16.	Bendang Pulau	92,6	ng/μl	1,78	DNA	50
17.	Sidenok	168,2	ng/μl	1,81	DNA	50
18.	Inpari 13	133,1	ng/μl	1,8	DNA	50
Varietas Kontrol Positif Gen Umur Genjah						
19.	M70D	140,7	ng/μl	1,82	DNA	50
20.	Maninjau	174,4	ng/μl	1,82	DNA	50
21.	Gajah Mungkur	103,5	ng/μl	1,81	DNA	50
Varietas Kontrol Negatif Gen umur Genjah						
22.	Kewal Bulu Putih	147,6	ng/μl	1,82	DNA	50
23.	Rojolele Delangu	144,9	ng/μl	1,83	DNA	50
24.	Tunggul Hideung	82,2	ng/μl	1,8	DNA	50
25.	Kewal Benur	149,1	ng/μl	1,82	DNA	50
Varietas Kontrol Positif Gen Wereng Batang Coklat Biotipe 3						
26.	Ciherang	139,3	ng/μl	1,82	DNA	50
27.	Black Madras	140,1	ng/μl	1,82	DNA	50
Varietas Kontrol Positif Gen Wereng Batang Coklat Biotipe 3						
28.	Inpari 30	136	ng/μl	1,82	DNA	50
29.	IR 42	125,5	ng/μl	1,82	DNA	50

Menurut Nurhaini *et al.* (2003), Konsentrasi DNA berdampak pada kualitas fragmen hasil amplifikasi PCR. Konsentrasi DNA terlalu rendah akan menghasilkan fragmen DNA yang sangat tipis pada gel atau bahkan tidak

terlihat secara visual, sebaliknya jika konsentrasi DNA terlalu tinggi akan menyebabkan fragmen terlihat tebal sehingga sulit dibedakan antara satu pita dengan pita lainnya. Setelah diketahui hasil analisis kuantitatif DNA padi, selanjutnya dilakukan analisis kualitatif DNA padi.

4.1.3. Analisis Kualitatif DNA

Hasil uji kualitas DNA padi hasil isolasi menunjukkan pita-pita yang cukup tebal (Gambar 4). Elektroforegram juga menunjukkan sampel hasil isolasi yang murni karena tidak ditemukan adanya *smear* pada pita. Uji kualitatif DNA menggunakan DNA lambda sebagai pembanding yang telah diketahui konsentrasinya, yaitu sebesar 20 ng/ μ L. Uji kuantitas DNA dilakukan untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA hasil isolasi. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa tidak terdapat fragmen *smear* dan ketebalan pita DNA sampel lebih tebal dibandingkan pita DNA lambda. Hasil pengukuran kuantitas DNA menggunakan spektrofotometer nanodrop berada pada rentang **57-174.4 ng/ μ L** dan kemurnian DNA berada pada rentang **1.78-1.83** (Tabel 2). Konsentrasi gel agarosa yang digunakan dalam analisis kualitatif DNA berpengaruh dalam ukuran fragmen DNA yang dipisahkan. Semakin kecil konsentrasi agarose yang digunakan, memberikan resolusi yang lebih baik untuk fragmen DNA yang berukuran besar (Lee dan Bahaman, 2010).



Gambar 4. Elektroforegram beberapa DNA padi hasil isolasi DNA.

Hasil visualisasi DNA menggunakan gel agarosa 1% menghasilkan pita DNA dengan ketebalan pita yang beragam. Pada hasil visualisasi uji kualitas hasil isolasi DNA gambar jelas dengan menggunakan alat *Chemidoc UV-Transilluminator EZ Biorad* yang baik. Ketebalan pita yang beragam diakibatkan oleh nilai kemurnian dan konsentrasi pada masing-masing sampel berbeda yang ditunjukkan pada (Tabel 2). Selain pita DNA, hasil elektroforesis menunjukkan tidak adanya materi ikatan lain (*smear*) yang menandakan bahwa di dalam DNA yang diperoleh murni/tidak terjadi terkontaminasi RNA dan tidak terdegradasi, sehingga pita-pita DNA yang sama ukurannya tidak akan menimbulkan pita *smear*, dengan demikian konversi konsentrasi DNA sampel dengan DNA pembanding bisa dilakukan.

Lambda adalah suatu suspensi dengan panjang gelombang tertentu sehingga ketika dilakukan pengamatan menggunakan sinar UV, konsentrasi pada larutan uji dapat diketahui dengan melihat warna pendaran cahaya yang ditampilkan (Dualembang *et al.*, 2011).

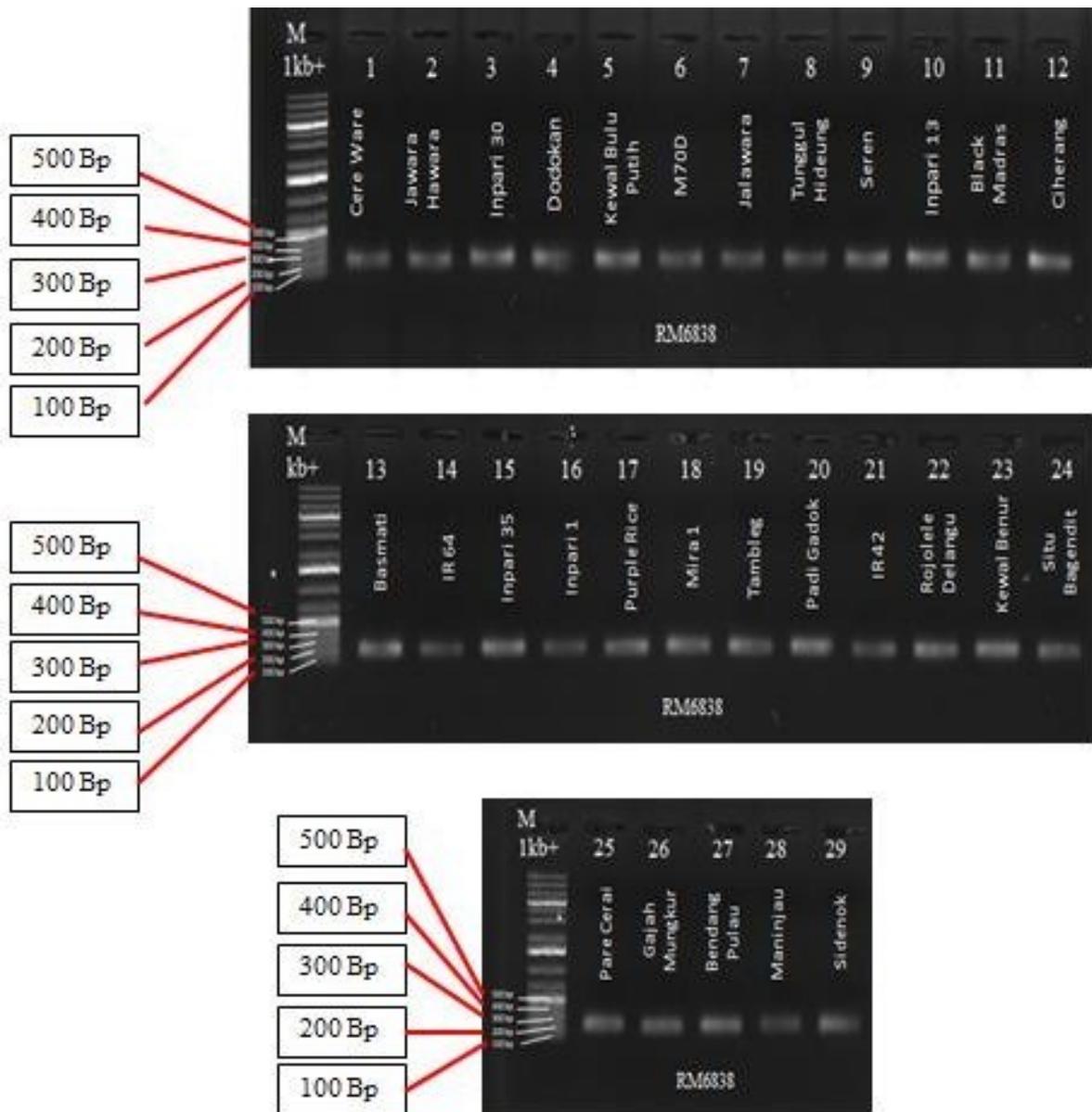
Elektroforesis menggunakan gel agarosa banyak digunakan untuk menganalisis molekul DNA serta untuk memisahkan, mengidentifikasi, serta

memurnikan fragmen DNA dan RNA yang dilakukan pada medan gerak horizontal (Agrawal, 2008). Kelebihan elektroforesis menggunakan gel agarosa biasanya lebih mudah dan sederhana, laju pemisahan lebih cepat sehingga fragmen DNA lebih cepat terbentuk, mampu memisahkan campuran potongan DNA sesuai dengan ukurannya, preparasi gel lebih cepat karena pembuatan gel agarosa lebih mudah, serta bersifat non toksik.

4.2 Hasil Analisis Gen Umur Genjah

4.2.1. Marka SSR Penyandi Umur Genjah pada 29 Plasma Nutfah Padi

Amplifikasi DNA adalah prinsip dasar pada PCR yakni mengamplifikasi enzimatik fragmen DNA dengan menggunakan dua oligonukleotida primer yang komplementer dengan ujung 5' dari kedua untaian sekuens target, begitupula dengan penelitian ini. Seleksi tanaman padi gen umur genjah dilakukan dengan menggunakan primer RM6838, RM5607, dan RM3571 yang kemudian diamplifikasi dengan mesin PCR. Primer RM6838, RM5607, dan RM3571 adalah marka pengapit untuk mendeteksi lokus *qDTH8*, *HD12* dan *HD2* pada tanaman padi. Untuk lebih jelasnya dapat di lihat pada gambar 5 yaitu Elektroforegram DNA Hasil Amplifikasi PCR Primer RM6838 untuk primer umur genjah dibawah ini.

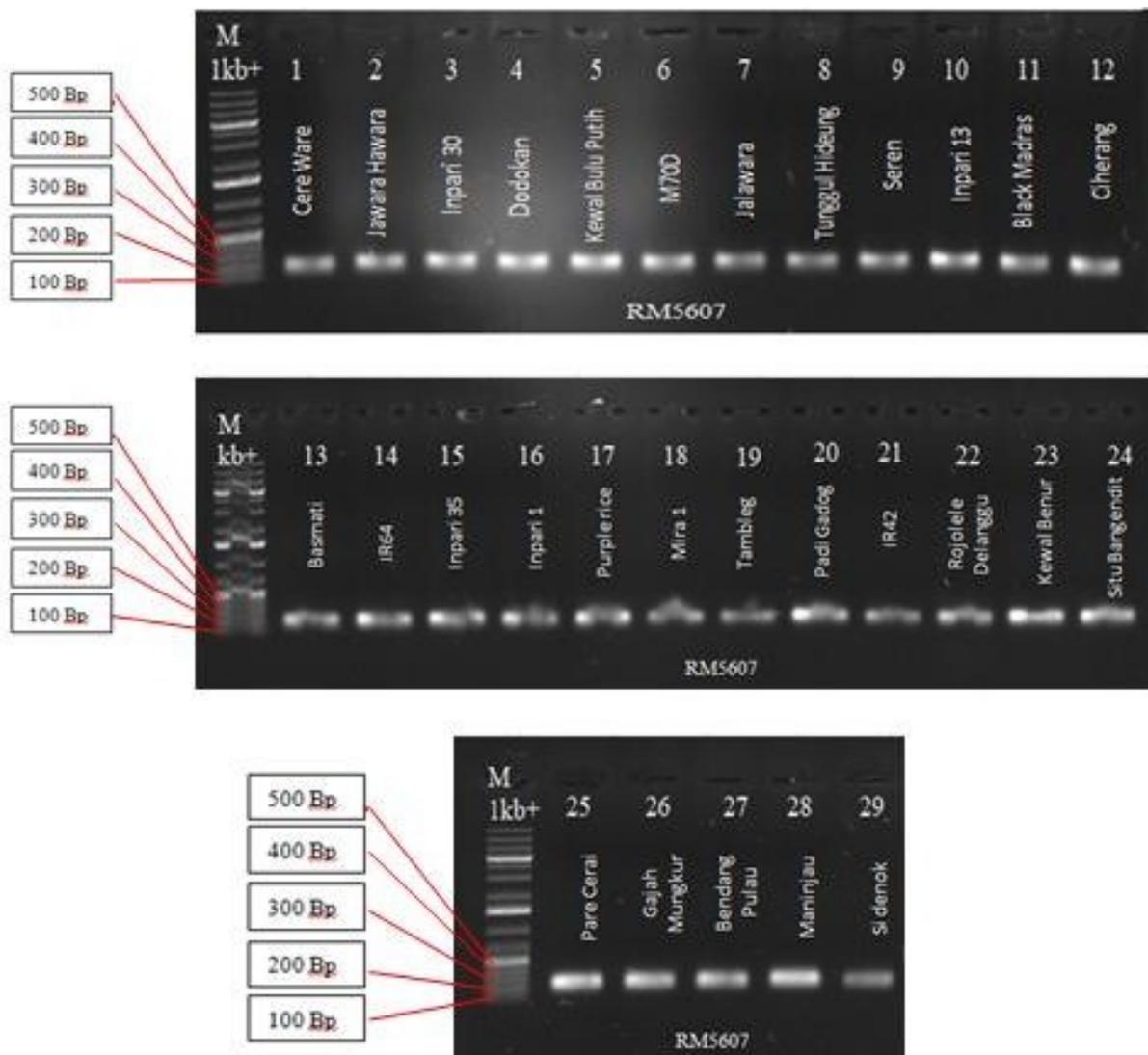


Gambar 5. Elektroforegram DNA 29 Aksesori Padi dengan menggunakan Primer RM6838

Primer RM6838 dapat mendeteksi alel-alel yang memiliki gen *qDTH8* terletak pada kromosom 8. Chao *et al.* (2013) menyatakan bahwa gen *qDTH8* menyandi protein HAP3 yang bertindak sebagai faktor transkripsi pada

proses transkripsi gen. Gen *qDTH8* meregulasi proses ekspresi gen florigen *Hd3a* yang dapat memicu terjadinya proses pembungaan pada tanaman padi.

Hasil elektroforesis primer pada lokus *qDTH8* dapat dilihat dalam Gambar 5. Hasil elektroforegram primer RM6838 (Gambar 5) memiliki ukuran pita DNA pada ukuran >200 bp yaitu Jawara Hawara, Inpari 1, Purple rice, Mira 1, Tambleg, Padi Gadog, IR42, Kewal Benur, Pare Cerai, Gajah mungkur, Bendang Pulau, Maninjau, dan Sidenok. Adapun ukuran pita DNA pada ukuran <200 bp yaitu Cere Ware, Inpari 30, Dodokan, Kewal Bulu Putih, M70D, Jalawara, Tunggul Hideung, Seren, Inpari 13, Black Madras, Ciherang, Basmati, IR64, Inpari 35, Rojolele Delanggu, dan Situ bagendit. Hal tersebut membuktikan penelitian ini sesuai dengan bank data *Gramene* dan hasil penelitian sebelumnya. Produk amplifikasi PCR dengan primer RM6838 mampu mendeteksi gen *qDTH8* berada pada ukuran pita <200 bp. Untuk selanjutnya yaitu kita dapat melihat Hasil Amplifikasi PCR Primer RM5607 pada gambar 6 yang merupakan primer umur genjah selanjutnya.

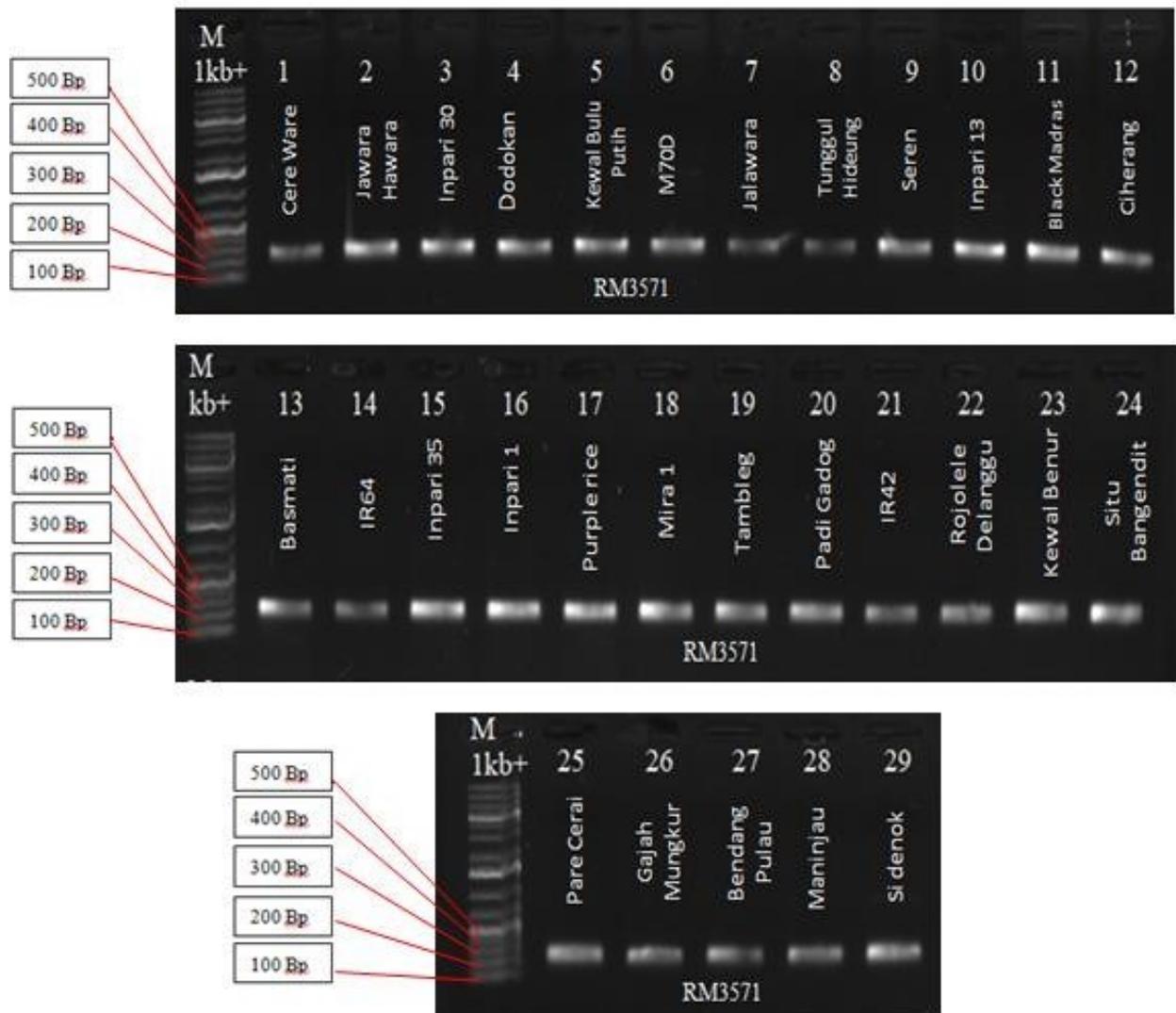


Gambar 6. Elektroforegram DNA 29 Aksesori Padi dengan menggunakan Primer RM5607

Kemampuan marka dalam menghasilkan alel polimorfis. Dari data profil alel diketahui bahwa marka RM5607 memiliki nilai PIC tinggi yaitu 0,90 yang berarti bahwa primer tersebut bisa menghasilkan sejumlah besar karakter pembeda antar aksesori yang diteliti. Marka RM5607 terpaut dengan gen pengatur umur

pembungaan HD7 yang terdapat pada kromosom 7. Marka ini dapat menunjukkan polimorfisme ukuran alel antara plasma nutfah padi genjah sangat genjah.

Hasil elektroforesis primer pada lokus HD7 dapat dilihat dalam Gambar 6. Hasil elektroforegram primer RM5607 (Gambar 6) memiliki ukuran pita DNA pada ukuran >200 bp yaitu Basmati, IR64, Inpari 35, Inpari 1, Purple rice, Mira 1, Tambleg, Padi Gadog, IR42, Rojolele Delunggu, Kewal Benur, Situ Bagendit, Pare Cerai, Gajah mungkur, Bendang Pulau, Maninjau, Sidenok, Jawara Hawara, Inpari 30, Tunggul Hideung, dan Inpari 13. Adapun ukuran pita DNA pada ukuran <200 bp yaitu Dodokan, Kewal Bulu Putih, M70D, Jalawara, Black Madras, dan Ciherang. Hal tersebut membuktikan penelitian ini sesuai dengan bank data *Gramene* dan hasil penelitian sebelumnya. Produk amplifikasi PCR dengan primer RM5607 mampu mendeteksi gen HD7 berada pada ukuran pita <200 bp. Untuk selanjutnya yaitu kita dapat melihat Hasil Amplifikasi PCR Primer RM3571 pada gambar 7 yang merupakan primer umur genjah selanjutnya.



Gambar 7. Elektroforegram DNA 29 Akses Padi dengan menggunakan Primer RM3571

Primer RM3571 dapat mendeteksi alel-alel yang memiliki gen HD12 terletak pada kromosom 8 dengan ukuran bp 160-178. Marka RM3571 terpaut dengan gen HD12 memiliki tingkat signifikansi paling tinggi terhadap varietas berumur sangat genjah. Hasil analisis pengelompokan menunjukkan adanya pengelompokan yang menggambarkan variasi dalam fenotipe kelompok

Subspesies: Indica, Japonica, dan Tropical Japonica serta dalam karakter umur tanaman.

Hasil pada Gambar 7 menunjukkan bahwa marka RM3571 yang terpaut dengan salah satu gen pengatur umur pembungaan, HD2, bersifat polimorfis untuk beberapa aksesori. Hasil elektroforegram primer RM3571 (Gambar 7) memiliki ukuran pita DNA pada ukuran >200 bp yaitu Cere Ware, Jawara Hawara, Inpari 30, Dodokan, Kewal Bulu Putih, M70D, Jalawara, Tunggul Hideung, Seren, Inpari 13, Black Madras, Ciherang, Situ Bagendit, Pare Cerai, Gajah mungkur, Bendang Pulau, Maninjau, dan Sidenok. Adapun ukuran pita DNA pada ukuran <200 bp yaitu Basmati, IR64, Inpari 35, Inpari 1, Purple rice, Mira 1, Tambleg, Padi Gadog, IR42, Rojolele Delanggu, dan Kewal Benur.

4.3. Hasil Analisis Gen Ketahanan Wereng Batang Coklat Biotipe 3

4.3.1. Marka SSR Penyandi Wereng batang coklat Biotipe 3 pada 29

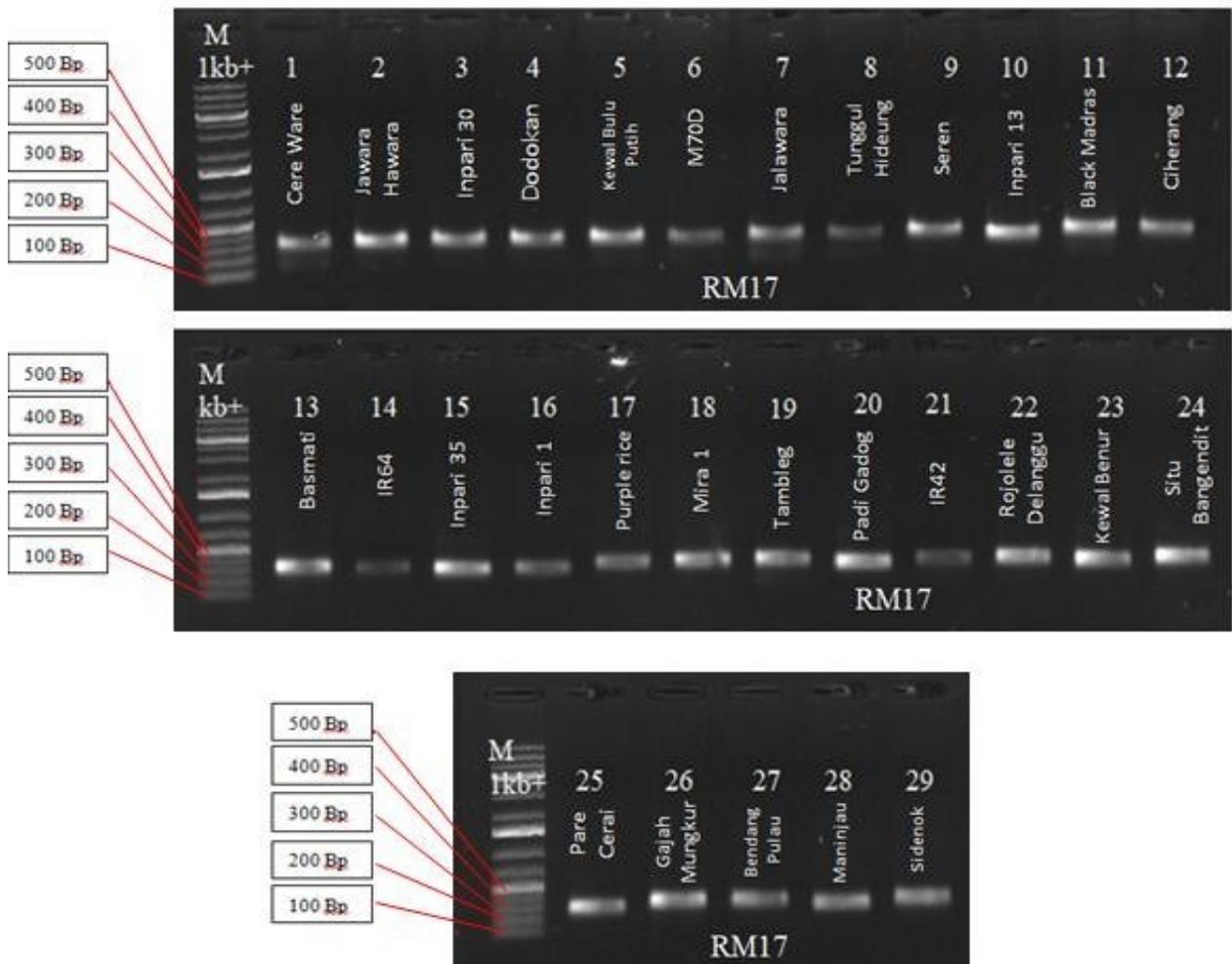
Plasma Nutfah Padi

DNA hasil isolasi yang telah diketahui kualitas dan kuantitasnya kemudian diamplifikasi menggunakan mesin PCR dengan marka molekuler. Panjang ukuran DNA yang diamplifikasi dibatasi oleh dua buah primer spesifik yang sudah ditentukan. Tersedianya gen-gen ketahanan menjadi sangat krusial dalam perakitan varietas unggul baru tahan hama ini. Ribuan aksesori plasma nutfah padi telah ditapis di IRRI untuk ketahanan terhadap WBC biotipe 1, 2, dan 3 (Brar *et al.* 2009). Hu *et al.* (2018) melaporkan lebih dari 30 gen ketahanan terhadap WBC telah diidentifikasi pada tanaman padi.

Beberapa gen yang bertanggung jawab terhadap ketahanan tanaman padi bahkan telah diidentifikasi dan diketahui mekanisme kerjanya, di antaranya *Bph3* (Liu *et al.* 2015), *Bph6* (Guo *et al.* 2018), dan *Bph14* (Du *et al.* 2009).

Plasma nutfah padi di Indonesia cukup melimpah untuk eksplorasi gen-gen ketahanan baru terhadap WBC. Gen-gen ketahanan tersebut dapat diuji untuk mengidentifikasi gen yang paling efektif dalam mengatasi WBC yang berkembang di Indonesia. Selanjutnya, gen-gen tersebut dapat dipetakan lokasinya secara tepat dalam kromosom padi dengan menggunakan marka molekuler sehingga dapat digunakan dalam perakitan varietas baru tahan WBC berbasis marka atau untuk identifikasi dan isolasi gen secara lebih detail.

Karena perubahan biotipe WBC ke arah yang lebih ganas merupakan ancaman kontinyu terhadap peningkatan produksi padi, maka introduksi gen-gen ketahanan baru terhadap WBC dari berbagai donor ke dalam padi untuk mendapatkan varietas dengan produksi dan kualitas hasil beras tinggi serta tahan WBC terus dilakukan. Tersedianya marka molekuler yang terpaut erat dengan gen-gen ketahanan terhadap WBC akan sangat membantu kegiatan pemuliaan karena marka molekuler memungkinkan dilakukannya seleksi turunan persilangan berdasarkan genotipe dibandingkan seleksi berdasarkan fenotipe ketahanan (Su *et al.* 2006). Untuk lebih jelasnya dapat di lihat pada gambar 8 yaitu Elektroforegram DNA Hasil Amplifikasi PCR Primer RM17 untuk primer ketahanan WBC Biotipe III dibawah ini.

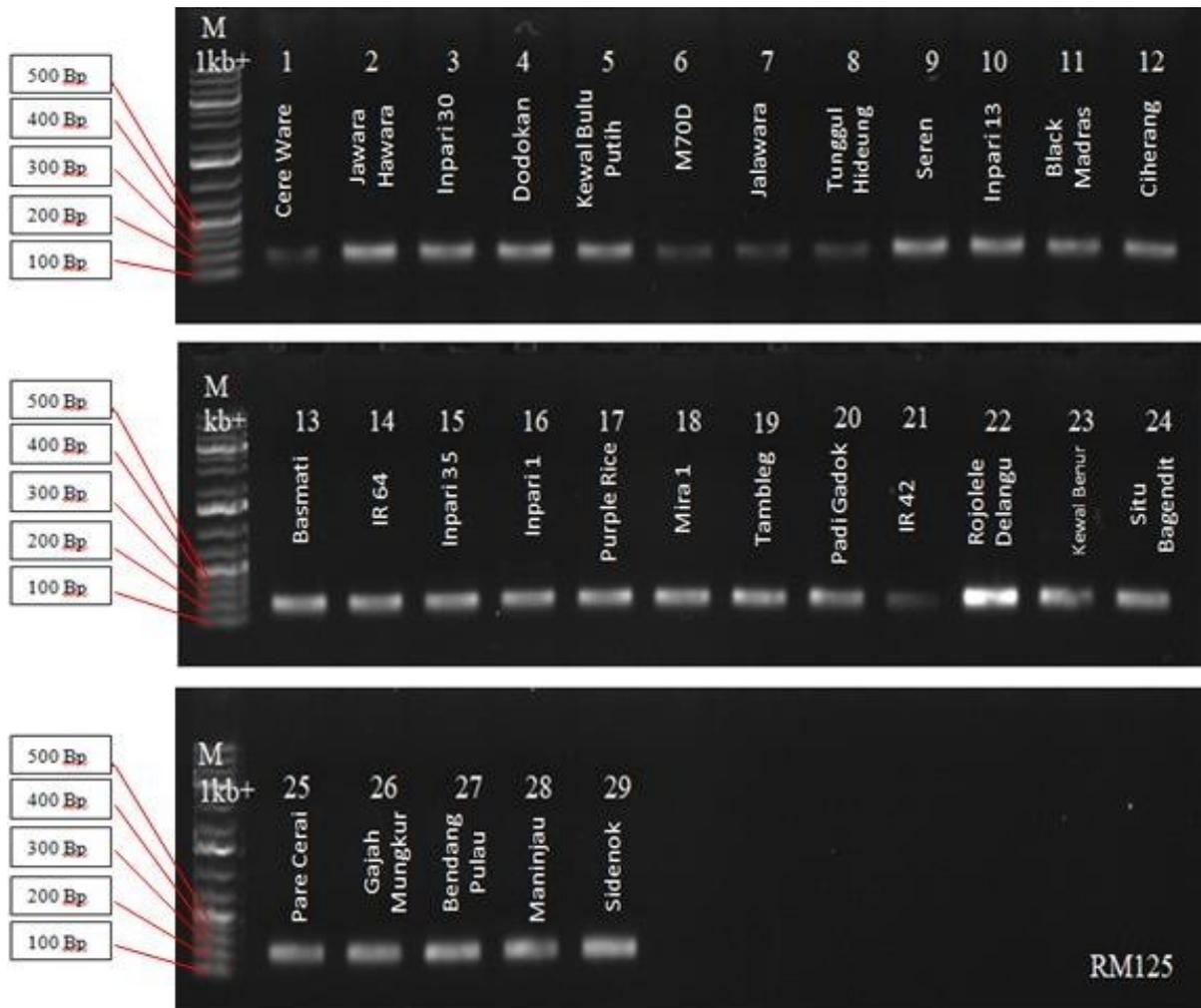


Gambar 8. Elektroforegram DNA 29 Akses Padi dengan menggunakan Primer RM17

Gen-gen dan QTL ketahanan terhadap WBC pada umumnya diidentifikasi pada stadia tanaman muda (berumur 5-14 hari) dan tanaman lebih dewasa (berumur >1 bulan) sehingga mekanisme ketahanan yang dideteksi adalah *antixenosis (nonpreference)* dan antibiosis (gangguan terhadap proses metabolik) (Soundararajan et al. 2005). RM17 dianggap paling potensial sebagai marka diagnostik awal untuk mengetahui calon galur harapan yang terindikasi tahan

terhadap WBC biotipe 3, karena: 1) lokasinya yang berada pada daerah QTL yang juga berdekatan dengan gen pengendali ketahanan terhadap WBC, yaitu gen *Bph10* dan *Bph19(t)* (Lang & Buu 2003; Li et al. 2010) diduga dapat memberikan kemampuan membedakan ketahanan dengan lebih baik dibandingkan marka lainnya; 2) memiliki dua alel yang berasosiasi dengan ketahanan terhadap WBC, dan 3) terdeteksi pada sebagian besar aksesii. Marka RM17 berjarak hanya 16,7 cm dari gen *Bph19(t)* pada kromosom 12. Individu-individu tahan dan rentan pada progeni populasi persilangan tersebut dapat dibedakan dengan menggunakan marka RM17 (Li et al. 2010). Calon-calon galur harapan yang terdeteksi mengandung lokus RM17 dikembangkan melalui persilangan antara tetua elit dengan sumber-sumber ketahanan.

Hasil elektroforegram primer RM17 (Gambar 8) memiliki ukuran pita DNA pada ukuran >200 bp untuk semua varietas. Dan Berdasarkan hasil dendogram pada Gambar 13 dapat diketahui bahwa aksesii Ciherang dan Black madras, sebagai kontrol positif yang memiliki gen ketahanan WBC Biotipe 3. Selanjutnya kita dapat lihat pada (gambar 9) yaitu Elektroforegram DNA Hasil Amplifikasi PCR Primer RM125 untuk primer ketahanan WBC Biotipe III selanjutnya.



Gambar 9. Elektroforegram DNA 29 Aksesori Padi dengan menggunakan Primer RM125

Hasil elektroforegram primer RM125 (Gambar 9) yang terletak dikromosom 7 yang memiliki gen *qBPH12* memiliki ukuran pita DNA <200 bp yaitu varietas Cereware, Basmati, dan IR42. Sedangkan Ukuran Pita DNA >200 bp yaitu varietas Inpari 30, Dodokan, Kewal bulu putih, M70D, Jalawara, Seren, IR64, Inpari 35, Inpari 1, Purple Rice, Mira 1, Tambleg, Padi Gadok, Rojolele Delangu, Kewal benur, Situ bagendit, Pare cerai, Gajah mungkur, Bendang pulau

dan Maninjau. Dan untuk ukuran pita DNA >300 yaitu Jawara Hawara, Tunggul hideung, Inpari 13, Black madras, Ciherang, dan Sidenok.

Dalam proses amplifikasi DNA, ketiga primer gen umur genjah dan kedua primer gen tahan WBC biotipe 3 juga memiliki keunggulan untuk mendeteksi multi alel di dalam lokus kromosom (Susanto *et al.* 2008). Hasil amplifikasi kemudian dipisahkan dengan elektroforesis untuk melihat pita-pita DNA yang dimiliki oleh tiap tanaman.

Hasil *scoring* pita elektroforegram primer, RM6838 (Gambar 5), RM5607 (Gambar 6), RM3571 (Gambar 7), RM17 (Gambar 8), dan RM125 (Gambar 9) menunjukkan bahwa tanaman yang mengandung kedua gen yang berasal dari tetua atau heterozigot lebih banyak dibandingkan tanaman yang hanya memiliki salah satu gen tetua saja atau homozigot. Adapun hasil yang didapat bahwa semua primer polimorfis. Terlihat pada Tabel 3 dibawah ini merupakan perolehan nilai digital skoring hasil amplifikasi PCR pada 5 primer yaitu diantaranya Primer RM6838, Primer RM5607, Primer RM3571, Primer RM17, dan RM125. Setiap Marka SSR primer menghasilkan 5-6 lokus. Pada primer RM17 menghasilkan 6 lokus, sedangkan pada primer RM6838, RM5607, RM3571, dan RM125 menghasilkan 5 lokus. Ini bisa saja disebabkan karena primer-primer tersebut dapat mengamplifikasi dengan optimal. Selain itu, primer yang sesuai dengan sekuens DNA padi yang diteliti sehingga diperoleh produk teramplifikasi karena terdapat kecocokan yang komplemen antara DNA padi dengan sekuens primer yang digunakan (Carson *et al.*, 2014).

Tabel 3. Nilai digital skoring hasil amplifikasi PCR pada 5 primer marka SSR

No	Nama Varietas	Nilai digital Marka SSR				
		RM6838	RM5607	RM3572	RM17	RM125
1	Cere Ware	0010000.	0100000.	0010000.	1010000.	0100000.
2	Jawara Hawara	0010000.	0100000.	0010000.	0010000.	0010000.
3	Inpari 30	0010000.	0100000.	0010000.	0010000.	0010000.
4	Dodokan	0010000.	0100000.	0010000.	0010000.	0100000.
5	Kewal Bulu Putih	1000000.	1000000.	0001000.	0001000.	0100000.
6	M70D	0010000.	0100000.	0001000.	0100000.	0100000.
7	Jalawara	0010000.	0100000.	0100000.	1000100.	0010000.
8	Tunggul Hideung	1000000.	0010000.	0010000.	0000100.	0010000.
9	Seren	0010000.	0100000.	0010000.	0000010.	0100000.
10	Inpari 13	0010000.	0100000.	0010000.	0000100.	0010000.
11	Black Madras	0010000.	0100000.	0100000.	0100000.	0100000.
12	Ciherang	0100000.	0001000.	1000000.	0100000.	0100000.
13	Basmati	0010000.	0100000.	0010000.	0100000.	1000000.
14	IR 64	0010000.	0100000.	0010000.	0010000.	0010000.
15	Inpari 35	0010000.	0000100.	0010000.	0100000.	0100000.
16	Inpari 1	0010000.	0000001.	0010000.	0100000.	0010000.
17	Purple Rice	0010000.	0000001.	0100000.	0010000.	0010000.
18	Mira 1	0010000.	0000001.	0100000.	0100000.	0100000.
19	Tambleg	0100000.	0000001.	0100000.	0010000.	0010000.
20	Padi Gadok	0100000.	0000001.	0100000.	0010000.	0010000.
21	IR 42	0100000.	0000001.	1000000.	0010000.	0010000.
22	Rojolele Delangu	1000000.	0010000.	0010000.	0001000.	0100000.
23	Kewal Benur	1000000.	0010000.	0010000.	0010000.	0100000.
24	Situ Bagendit	1000000.	0100000.	0100000.	0001000.	0100000.
25	Pare Cerai	0010000.	0100000.	0010000.	0100000.	0100000.
26	Gajah Mungkur	0010000.	0100000.	0100000.	0010000.	0100000.
27	Bendang Pulau	0010000.	0100000.	0100000.	0010000.	0100000.
28	Maninjau	0010000.	0100000.	0100000.	0100000.	0010000.
29	Sidenok	0010000.	0100000.	0100000.	0010000.	0010000.

Keragaman pita DNA terjadi karena adanya perbedaan jumlah dan intensitas pita DNA yang terbentuk pada setiap primer. Panjaitan (2014) menyatakan bahwa variasi yang terjadi pada jumlah dan intensitas pita DNA yang terbentuk setelah proses amplifikasi sangat tergantung pada cara primer

mengenal urutan DNA komplementernya pada cetakan DNA yang digunakan. Selain itu sebaran situs penempelan primer pada DNA cetakan dan adanya kompetisi tempat penempelan primer pada DNA cetakan menyebabkan satu fragmen diamplifikasi dalam jumlah banyak sementara fragmen lainnya hanya sedikit. Dalam Analisis molekuler dari masing-masing 29 varietas pola Alel dari pita DNA berdasarkan Primer yang digunakan yaitu primer gen umur genjah dan gen tahan WBC biotipe III yang dihasilkan bervariasi.

Berdasarkan Primer yang digunakan yaitu primer gen umur genjah dan gen tahan WBC biotipe III yang dihasilkan bervariasi, ada yang mengikuti pola alel AABB, AABb, AaBB, AaBb, AABb, AaBb, AaBB, AaBb, dan AaBb (**Dalam Rentan**) yaitu varietas Cereware, Jawara Hawara, Inpari 30, Dodokan, Kewal Bulu Putih, Jalawara, Tunggul Hideung, Seren, Inpari 13, Basmati, IR64, Inpari 1, Purple rice, Tambleg, Padi Gadok, IR42, Rojolele Delangu, Kewal Benur, dan Situ Bagendit Selanjutnya yang mengikuti pola alel AAbb, Aabb, Aabb (**Dalam Tahan**) yaitu varietas Ciherang, Inpari 35, Mira 1 dan Pare Cerai. Selanjutnya yang mengikuti pola alel aaBB, dan aaBb (**Genjah Rentan**) yaitu varietas Gajah mungkur, Bendang Pulau, Maninjau, dan sidenok. Dan yang mengikuti pola alel aabb (**Genjah Tahan**) yaitu varietas Black Madras dan M70D, untuk lebih jelasnya dapat kita lihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Tabulasi hasil analisis molekuler berdasarkan Primer yang digunakan

No	Nama Varietas	Primer umur genjah			Primer Tahan WBC III		Alel	Fenotipik
		RM6838	RM5607	RM3571	RM17	RM125		
1.	Cere Ware	+	+	-	-	+	aaABb	Dalam Rentan
2.	Jawara Hawara	+	+	-	-	-	aaABB	Dalam Rentan
3.	Inpari 30	+	+	-	-	-	aaABB	Dalam Rentan
4.	Dodokan	+	+	-	-	+	aaABb	Dalam Rentan
5.	Kewal Bulu Putih	-	-	-	-	+	AABBb	Dalam Rentan
6.	M70D	+	+	+	+	+	aaabb	Genjah Tahan
7.	Jalawara	+	+	-	-	-	aaABB	Dalam Rentan
8.	Tunggul Hideung	-	-	-	-	-	AAABB	Dalam Rentan
9.	Seren	+	+	-	+	+	aaABB	Dalam Rentan
10.	Inpari 13	+	+	-	-	-	aaABB	Dalam Rentan
11.	Black Madras	+	+	+	+	+	aaabb	Genjah Tahan
12.	Ciherang	-	-	-	+	+	AAAbb	Dalam Tahan
13.	Basmati	+	+	-	+	-	aaAbB	Dalam Rentan
14.	IR 64	+	+	-	-	-	aaABB	Dalam Rentan
15.	Inpari 35	+	-	-	+	+	aAAbb	Dalam Tahan
16.	Inpari 1	+	-	-	+	-	AAABb	Dalam Rentan
17.	Purple Rice	+	-	+	-	-	aAaBB	Dalam Rentan
18.	Mira 1	+	-	+	+	+	aAabb	Dalam Tahan
19.	Tambleg	-	-	+	-	-	AAaBB	Dalam Rentan
20.	Padi Gadok	-	-	+	-	-	AAaBB	Dalam Rentan
21.	IR 42	-	-	-	-	-	AAABB	Dalam Rentan
22.	Rojolele Delangu	-	-	-	-	+	AAABb	Dalam Rentan
23.	Kewal Benur	-	-	-	-	+	AAABb	Dalam Rentan
24.	Situ Bagendit	-	+	+	-	+	AaaBb	Dalam Rentan
25.	Pare Cerai	+	+	-	+	+	aaABb	Dalam Tahan
26.	Gajah Mungkur	+	+	+	-	+	aaaBb	Genjah Rentan
27.	Bendang Pulau	+	+	+	-	+	aaaBb	Genjah Rentan
28.	Maninjau	+	+	+	+	-	aaabB	Genjah Rentan
29.	Sidenok	+	+	+	-	-	aaaBB	Genjah Rentan

Keterangan: a = (Genjah); A = (Dalam);
b = (Tahan WBC Biotipe III); B = (Rentan WBC Biotipe III)

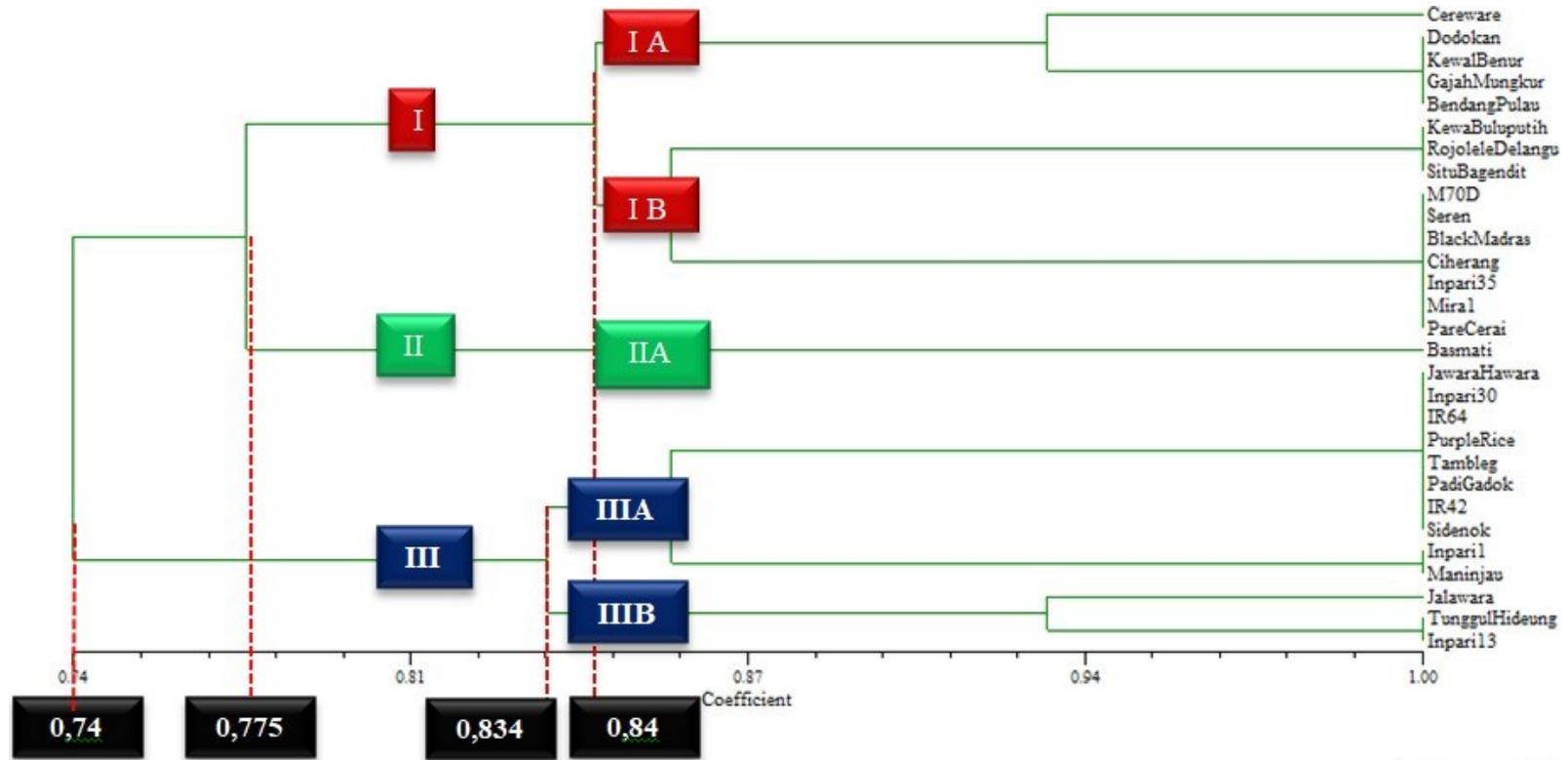
Hasil pita-pita DNA yang polimorfis dapat dianalisis, dengan melihat tingkat keragaman atau kekerabatannya. Menggunakan aplikasi program software NT-Sys pc2.11a untuk “*cluster tree analysis*” untuk mengungkap hubungan genetik dan kedekatan di antara semua genotipe yang diteliti. Adapun hasil Dendogram 29 Aksesori Padi berbasis gen umur genjah masing-masing primer yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 10.

Berdasarkan hasil dendogram diatas dari 29 aksesori padi berdasarkan 3 primer gen umur genjah yaitu RM6838, RM5607, dan RM3571 menunjukkan bahwa 29 aksesori padi mengelompok menjadi 3 klaster pada koefisien 0,75-1,00 nilai kemiripan 75% -100%. Pada Klaster I terdapat 2 kelompok yaitu kelompok Klaster IA dan Klaster IB. **Klaster IA** terdapat 13 aksesori padi (Cere ware, Jawara Hawara, Inpari 30, Dodokan, M70D, Jalawara, Seren, Inpari 13, Basmati, IR64, Pare Cerai, Inpari 35, dan Inpari 1) memiliki kemiripan genetik terkait **sifat umur genjah** sebesar 0,85-1,00 atau 85-100% dengan varietas kontrol positif aksesori M70D. Sedangkan pada **Klaster IB** terdapat 6 aksesori padi yaitu (Black Madras, Gajah Mungkur, Bendang Pulau, Maninjau, Sidenok dan Situ Bagendit) memiliki kemiripan genetik terkait **sifat umur genjah** 0,85-1,00 atau 85-100% dengan varietas kontrol Positif gen umur genjah yaitu Gajah Mungkur dan Maninjau.

Pada Klaster II terdapat 2 kelompok yaitu kelompok Klaster IIA dan Klaster IIB. **Klaster IIA** terdapat 2 aksesori padi (Ciherang dan IR42) memiliki kemiripan genetik terkait **semi umur genjah** sebesar 0,81-1,00 atau 81-100%. **Klaster IIB** terdapat 4 aksesori padi (Purple Rice, Mira I, Tambleg, dan Padi Gadok), memiliki kemiripan genetik terkait **semi umur genjah** sebesar 0,81-1,00

atau 81-100%. Pada **Klaster III** terdapat 1 kelompok yaitu kelompok Klaster IIIA. Klaster IIIA terdapat 4 aksesori padi (Kewal Bulu Putih, Tunggul Hideung, Rojolele Delangu, dan Kewal Benur) memiliki kemiripan genetik terkait **Sifat Dalam/tidak Genjah** 0,75-1,00 atau 75-100%.

4.5. Kekerbatan 29 Plasma Nutfah Padi Berbasis Gen Tahan Hama Wereng Batang Coklat Biotipe 3



Gambar 11. Dendrogram 29 aksesi padi berdasarkan 2 primer gen tahan WBC Biotipe III

Hasil pita-pita DNA yang polimorfis dapat dianalisis, dengan melihat tingkat keragaman atau kekerabatannya. Menggunakan aplikasi program software NT-Sys pc2.11a untuk “*cluster tree analysis*” untuk mengungkap hubungan genetik dan kedekatan di antara semua genotipe yang diteliti. Adapun hasil Dendogram 29 Aksesori Padi berbasis gen tahan hama wereng batang coklat biotipe 2 primer yaitu Primer RM17 dan RM125 yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 11.

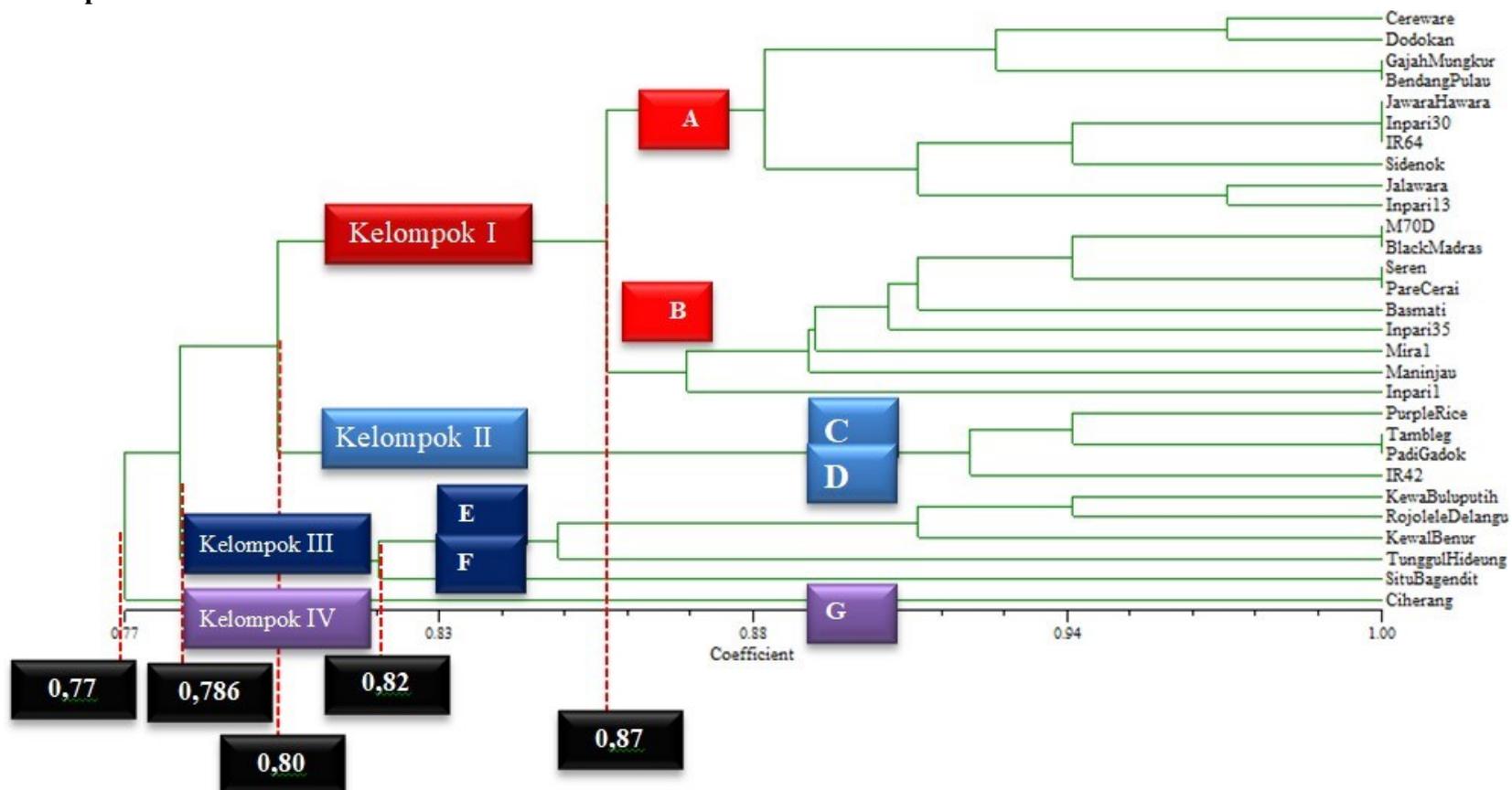
Berdasarkan hasil dendogram diatas dari 29 aksesori padi berdasarkan 2 primer gen tahan WBC III yaitu RM17 dan RM125 menunjukkan bahwa 29 aksesori padi mengelompok menjadi 3 klaster pada koefisien 0,74-1,00 nilai kemiripan 74%-100%. Pada Klaster I terdapat 2 kelompok yaitu kelompok Klaster IA dan Klaster IB. **Klaster IA** terdapat 5 aksesori padi (Cere ware, Dodokan, Kewal benur, Gajah mungkur, Bendang Pulau) yang memiliki kemiripan genetik 0,84-1,00 atau 84-100% dengan varietas kontrol Positif Gen tahan WBC III yaitu **Black madras dan Ciherang** yang merupakan aksesori **Gen Tahan WBC Biotipe III**. Selanjutnya yaitu pada **Klaster IB** terdapat 10 aksesori padi (Kewal Bulu Putih, Rojolele Delangu, Situ Bagendit, M70D, Seren, Black Madras, Ciherang, Inpari 35, Mira 1, dan pare cerai) yang memiliki kemiripan genetik 0,84-1,00 atau 84-100% dengan varietas kontrol Positif Gen tahan WBC III yaitu **Black madras dan Ciherang** yang merupakan aksesori **Gen Tahan WBC Biotipe III**. Untuk selanjutnya yaitu **Klaster II** terdapat 1 kelompok yaitu kelompok Klaster IIA terdapat 1 aksesori padi (Basmati) yang memiliki kemiripan genetik 0,775-1,00 nilai kemiripan 77,5-100%. Dan pada **Klaster III** terdapat 2 kelompok yaitu

kelompok Klaster IIIA dan Klaster IIIB. **Klaster IIIA** terdapat 10 aksesori padi (Jawara Hawara, Inpari 30, IR64, Purple Rice, Tambleg, Padi Gadok, IR42, dan Sidenok, Inpari 1, dan Maninjau) yang memiliki kemiripan genetik 0,834-1,00 atau 83,4-100% dengan varietas kontrol Negatif Gen tahan WBC III yaitu **Inpari 30 dan IR42** yang merupakan aksesori **Gen Rentan WBC Biotipe III**. **Klaster IIIB** terdapat 3 aksesori padi (Jalawara, Tunggul Hideung, dan Inpari 13) yang memiliki kemiripan genetik 0,834-1,00 atau 83,4-100% dengan varietas kontrol Negatif Gen tahan WBC III yaitu **Inpari 30 dan IR42** yang merupakan aksesori **Gen Rentan WBC Biotipe III**.

Aksesori padi Black madras dan ciherang sebagai kontrol positif gen tahan WBC Biotipe III, Padi Black Madras dinilai sebagai varietas padi yang tahan terhadap serangan hama dan penyakit. Padi jenis varietas ini dikatakan sebagai jenis padi yang tahan terhadap serangan hama wereng batang coklat, penggerek batang padi, tikus, burung dan penyakit hawar daun bakteri. **Ketahanan** padi Black Madras ini disebabkan oleh morfologi tanaman padi yang berbeda dengan padi pada umumnya yang memiliki **warna daun yang ungu dan daun bendera yang tegap**. Secara morfologi padi Black Madras tidak berbeda jauh dengan jenis tanaman padi pada umumnya, akan tetapi yang membedakan tanaman padi Black madras memiliki warna daun yang ungu kehitaman, struktur batang yang lebih tinggi, masa tanam sekitar 110-115 hari dan memiliki potensi hasil sekitar 7-8 ton/ha yang tentunya jauh berbeda dengan varietas tanaman padi lainnya (Yahya, 2018).

Akresi Ciherang memiliki gen ketahanan untuk serangan WBC III. Hal ini disebabkan oleh kandungan varietas ciherang mempunyai indeks glikemik rendah (54.5) dan memiliki kandungan protein 10.3%, lemak 0.072 % dan karbohidrat 87.6 %. Tiap 100 gram ciherang mengandung kalori, vitamin B1 0.30 mg, vitamin B2 0.13 mg, vitamin B3 0.56 mg, vitamin B6 0.12 mg, asam folat 29.9 mg, besi 4.6 ppm dan seng 23 ppm. Dari setiap kandungan yang dimiliki berperan sebagai koenzim dalam proses metabolisme. Rendahnya indeks glikemik yang dimiliki varietas ciherang menyebabkan sifat resiko kimia seperti amilosa dan konsistensi gel menggambarkan rasa dan teksturnya, hal ini dapat dikaitkan terhadap kemampuan makan wereng coklat dan berdasarkan hasil analisis tersebut ternyata pada varietas ciherang tidak ada senyawa yang menjadi *character impact compound* seperti 2-asetil-1-pirolin pada varietas ciherang, sehingga tidak terdeteksi aroma yang menonjol. Oleh karena itu varietas ciherang termasuk nonaromatik. Dalam hal ini dengan **tidak adanya aromatik** yang dihasilkan varietas ciherang, maka wereng batang coklat **tidak tertarik pada varietas ciherang** (Indrasari, 2011).

4.6. Kekerabatan 29 Plasma Nutfah Padi Berbasis Gen Umur Genjah Padi dan Gen Tahan Hama Wereng Batang Coklat Biotipe 3



Gambar 12. Dendogram 29 aksesii padi berdasarkan 5 Primer Marka SSR

Hasil analisis total kekerabatan ditampilkan dalam bentuk dendogram. Pada Gambar 12 memperlihatkan dari 29 aksesi padi menjadi 4 kelompok utama. Kelompok 1 terdiri dari 19 aksesi padi dengan kesamaan genetik sebesar 0,80-1,00 atau 80 –100%, Kelompok kedua terdiri dari 3 aksesi padi dengan kesamaan genetik sebesar 0,80- 1,00 atau 80 –100%, Kelompok tiga terdiri dari 5 aksesi padi berdasarkan pada kesamaan genetik sebesar 0,786- 1,00 atau 78,6–100%. Dan kelompok ke empat terdiri 1 aksesi padi berdasarkan pada kesamaan genetik sebesar 0,77- 1,00 atau 77–100%. Untuk lebih jelasnya profil kekerabatan hasil amplifikasi genetik 29 plasma nutfah padi pada 5 primer marka SSR dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Profil Kekerabatan Hasil Amplifikasi Genetik 29 Plasma Nutfah Padi pada 5 Primer Marka SSR (3 Primer gen umur genjah dan 2 primer gen tahan WBC III)

Kelompok	Sub Kelompok	Jumlah Aksesi	Aksesi yang terpilih	Kesamaan Genetik	Keragaman Genetik
I	A	10	Cereware, Dodokan, Gajah Mungkur, Bendang Pulau, Jawara Hawara, Inpari 30, IR64, Sidenok, Jalawara, Inpari 13.	0,87 – 1,00	87% - 100%
	B	9	M70D, Black madras, Seren, Pare Cerai, Basmati, Inpari 35, Mira 1, Maninjau, Inpari 1.	0,87 – 1,00	87% - 100%
II	C	3	Purple rice, Tambleg dan Padi Gadok	0,80 – 1,00	80% - 100%
	D	1	IR42	0,80 – 1,00	80% - 100%
III	E	4	Kewal Bulu Putih, Rojolele Delangu, Kewal Benur, dan Tunggul Hideung	0,786– 1,00	78,6% - 100%
	F	1	Situ Bagendit	0,786– 1,00	78,6% - 100%
IV	G	1	Ciherang	0,77 – 1,00	77% - 100%
Jumlah		29			

Dari hasil penelitian ini dihasilkan keragaman genetik 0,77 – 1,00 atau 77 -100%. Dilihat secara genetik bertujuan untuk tujuan pemuliaan tanaman dapat dikategorikan sebagai aksesi yang secara genetik hampir sama atau duplikasi. Aksesi padi tersebut mungkin berasal dari tanaman-tanaman yang secara genetik

memang sangat dekat satu dengan yang lainnya, walaupun berasal dari padi lokal Indonesia maupun Introduksi.

Analisis kekerabatan berfungsi dalam penyediaan informasi dasar untuk keperluan konservasi genetika dan pemuliaan suatu spesies. Koefisien kemiripan merupakan ukuran derajat kedekatan genetik antar padi. Semakin besar koefisien kemiripan antar padi maka semakin mirip padi-padi tersebut secara genetik (Siregar *et al.*, 2013).

Terdapat 4 kelompok utama kekerabatan 29 plasma nutfah padi menggunakan 5 primer Marka SSR (3 Primer gen umur genjah dan 2 primer gen tahan WBC III) dapat dilihat pada gambar 11 , Pada **kelompok I** terdapat 2 sub kelompok yakni sub **kelompok A dan B**. Sub kelompok A dan B dengan koefisien kemiripan genetik (KKG) 0,87–1,00 atau jarak genetik 0-13%. Pada sub kelompok A terdapat 4 aksesori plasma nutfah padi yaitu Cereware, Dodokan, Gajah Mungkur, Bendang Pulau, Jawara Hawara, Inpari 30, IR64, Sidenok, Jalawara, dan Inpari 13. Sedangkan pada sub kelompok B terdapat aksesori plasma nutfah padi yaitu M70D, Black madras, Seren, Pare Cerai, Basmati, Inpari 35, Mira 1, Maninjau, dan inpari 1.

Pada **kelompok II** yaitu terdapat 2 sub kelompok yakni sub kelompok C dan D. Pada Sub kelompok C dan D dengan koefisien kemiripan genetik (KKG) 0,80–1,00 atau jarak genetik 0-20%. Pada **sub kelompok C** terdapat 3 aksesori plasma nutfah padi yaitu Purple rice, Tambleg, dan Padi gadok. Pada sub **kelompok D** terdapat 1 aksesori plasma nutfah padi yaitu IR42. Pada **Kelompok III** yaitu terdiri dari 2 Sub kelompok yaitu kelompok E dan F dengan koefisien

kemiripan genetik (KKG) 0,786-1,00 atau jarak genetik 0-21,4%. Pada sub **kelompok E** terdapat 4 aksesori plasma nutfah padi yaitu Kewal Bulu Putih, Rojolele delangu, Kewal Benur, dan Tunggul Hideung. Sedangkan pada **kelompok F** terdapat 1 aksesori plasma nutfah padi yaitu Situ bagendit. Dan yang terakhir yaitu pada **Kelompok IV** dengan koefisien kemiripan genetik (KKG) 0,77-1,00 atau jarak genetik 0-23%. terdapat 1 sub kelompok yaitu Kelompok G. Pada sub **kelompok G** terdapat 1 aksesori plasma nutfah padi yaitu Ciherang.

Menurut Siregar *et al.* (2013), analisis kekerabatan berfungsi dalam penyediaan informasi dasar untuk keperluan konservasi genetika dan pemuliaan suatu spesies. Koefisien kemiripan merupakan ukuran derajat kedekatan genetik antar padi. Semakin besar koefisien kemiripan antar padi maka semakin mirip padi-padi tersebut secara genetik.

Besar kecilnya jarak genetik antar klon yang dievaluasi merupakan informasi penting dalam pemanfaatan klon-klon tersebut untuk pemuliaan tanaman. Dua klon yang mempunyai jarak genetik yang tinggi, apabila disilangkan akan menghasilkan turunan yang variasinya sangat tinggi. Sebaliknya, dua klon yang jarak genetiknya rendah, apabila disilangkan akan menghasilkan turunan yang variasinya rendah (Kurniasih 2012).