

Identifikasi Galur Tetua Padi Hibrida dengan Marka SSR Spesifik dan Pemanfaatannya dalam Uji Kemurnian Benih

Indria W. Mulsanti¹, Memen Surahman², Sri Wahyuni¹, dan Dwinita W. Utami³

¹Balai Besar Penelitian Tanaman Padi
Jl Raya 9 Sukamandi- Subang 41256
Email: mulsanti_indri@yahoo.com

²Institut Pertanian Bogor

³Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian

Naskah diterima 2 April 2012 dan disetujui diterbitkan 16 Januari 2013

ABSTRACT. Identification of Specific SSR Marker to Identify Hybrid Rice Parental Lines and Their Utilization for Seed Purity Assessment. DNA finger printing of hybrid rice variety and their parental lines are important molecular traits as a tool in plant variety protection, DUS test, and seed purity assessment. Molecular markers including microsatellite (SSR) markers have been used in varietal assessment. This study was aimed to identify specific SSR markers that can be used to distinguish parent lines of hybrid rice and to assess seed purity. The experiment was conducted in 2011 at Biology Molecular Laboratory of ICABIOGRAD, Bogor. Sixteen SSR markers were used to identify parental lines of five hybrid varieties of rice. Two hybrid varieties (F1), Hipa 6 and Hipa 7, were used in the seed purity assessment. Seven markers were polymorphic, and six of them (RM206, RM263, RM276, RM346, RM335, RM570) were capable of distinguishing parental lines of the five hybrid varieties. RM 346 marker could be used for testing seed purity of Hipa 6, while RM 206 marker for Hipa 7. Specific SSR marker was capable of distinguishing a false hybrid rice that might not be recognized by the grow out test in the field.

Keyword: Hybrid rice seed, parental lines, SSR, purity assessment.

ABSTRAK. Sidik jari DNA padi hibrida dan identifikasi tetua pembentuknya merupakan faktor penting dalam perlindungan varietas tanaman, pengujian BUSS (baru, unik, stabil, seragam), uji kemurnian benih, dan perlindungan terhadap hak pemulia. Marka molekuler telah banyak digunakan dalam pengujian varietas, di antaranya marka mikrosatelit (SSR). Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan marka SSR spesifik untuk mengidentifikasi galur tetua lima varietas padi hibrida dan uji kemurnian benih. Penelitian dilaksanakan pada tahun 2011 di laboratorium Biologi Molekuler Balai Besar Biogen, Bogor. Enam belas marka SSR digunakan untuk identifikasi 8 galur yang dapat digunakan sebagai tetua dari lima varietas padi hibrida, dan dua padi hibrida (Hipa 6 dan Hipa 7) digunakan untuk uji kemurnian benih. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 7 marka SSR bersifat polimorfis dari 16 marka SSR yang diuji, 6 di antaranya (RM206, RM263, RM276, RM346, RM335, dan RM570) dapat membedakan tetua padi hibrida yang diuji. Marka SSR spesifik RM346 dapat digunakan untuk uji kemurnian benih Hipa 6, sedangkan marka RM206 untuk benih Hipa 7. Uji kemurnian benih menggunakan marka SSR dapat mengidentifikasi campuran benih hibrida yang tidak dapat dikenali dengan *grow out test*.

Kata kunci: Benih padi hibrida, galur tetua, SSR, uji kemurnian.

Keberhasilan pengembangan padi hibrida tidak hanya ditentukan oleh ketersediaan benih secara kuantitas, tetapi juga kualitas. Mutu benih mencakup mutu genetik, mutu fisik, dan mutu fisiologis (Sadjad 1993). Benih mempunyai mutu genetik yang baik apabila asli (*true to type*), dan diketahui varietasnya. Uji kemurnian benih merupakan tahapan yang harus dilakukan untuk mengendalikan mutu genetik suatu lot benih.

Kemurnian genetik benih F1 sangat penting dalam kegiatan produksi benih padi hibrida. Kebenaran dan keseragaman varietas harus selalu terjaga agar dapat dihasilkan benih padi hibrida yang bermutu. Oleh karena itu, uji kemurnian benih diperlukan sebelum didistribusikan dan ditanam secara luas. Identifikasi varietas menjadi sangat penting bila dikaitkan dengan perlindungan varietas tanaman dan hak kekayaan intelektual. Kontaminasi kemurnian genetik benih F1 hibrida dapat disebabkan oleh persilangan yang berasal dari serbuk sari varietas lain, terjadinya *selfing* karena tetua galur mandul jantan (GMJ) yang tidak murni, dan kontaminasi benih varietas lain secara mekanis pada saat panen dan pengolahan benih.

Beberapa varietas padi yang dilepas akhir-akhir ini memiliki bentuk gabah yang sangat mirip (Wahyuni *et al.* 2008). Selain itu, dalam satu varietas yang sama terdapat variasi fisik bentuk gabah, bentuk gabah pada pangkal malai tidak persis sama dengan bentuk gabah pada ujung malai. Bentuk gabah yang berbeda belum tentu berasal dari varietas yang berbeda dan bentuk gabah yang sama tidak dapat dipastikan sebagai varietas yang sama. Oleh karena itu, kelulusan uji varietas di laboratorium hendaknya tidak hanya berdasarkan pada pengamatan visual bentuk gabah tetapi juga harus melalui pengujian verifikasi varietas yang sudah standar. Acuan standar tersebut harus dapat mendeskripsikan suatu varietas secara sah, misalnya pola pita isozyme, protein atau DNA (ISTA 2010).

Metode pengujian kemurnian genetik varietas atau verifikasi varietas padi yang saat ini banyak digunakan adalah uji keseragaman di lapangan. Penilaian kemurnian genetik dilakukan dengan cara membandingkan morfologi tanaman yang diuji dengan pertanaman dari benih otentiknya. Pelaksanaan metode uji keseragaman di lapangan membutuhkan waktu yang cukup lama, karena harus melalui satu siklus pertanaman (ISTA 2010). Uji kemurnian benih diharapkan dapat dilaksanakan secara cepat, akurat, memiliki tingkat reproduktibilitas yang tinggi dengan hasil evaluasi yang sah, sehingga dapat memenuhi tuntutan kebutuhan industri perbenihan.

Teknik bioteknologi seperti pengujian secara biomolekuler (DNA, protein, enzim) tidak hanya dapat dimanfaatkan pada perbanyakan benih dan pemuliaan tanaman, tetapi juga dapat diterapkan untuk mengevaluasi kemurnian genetik. Berbagai metode menggunakan marka molekuler telah banyak diterapkan untuk pengujian varietas, di antaranya marka mikrosatelit atau marka SSR (*Simple Sequence Repeats*). Marka SSR memiliki beberapa keunggulan, di antaranya memiliki tingkat polimorfisme tinggi, bersifat kodominan, memiliki akurasi tinggi dan terdapat berlimpah di genom.

Marka SSR telah digunakan secara luas dalam analisis berbasis molekuler. Marka ini telah banyak digunakan pada berbagai studi keragaman genetik (Blair *et al.* 1999), verifikasi dan identifikasi varietas tanaman (Moeljopawiro 2007; Pabendon *et al.* 2005; Meesang *et al.* 2001), dan uji kemurnian benih padi hibrida (Tamilkumar *et al.* 2009; Liu *et al.* 2007; Xin *et al.* 2005). Identifikasi kebenaran suatu genotipe tanaman dengan menggunakan marka yang tidak terpaut merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk menilai kemurnian benih hibrida dan satu penanda yang polimorfik sudah cukup untuk pengujian kemurnian benih (Yashitola *et al.* 2002).

Penelitian ini bertujuan untuk 1) mendapatkan marka SSR spesifik yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi galur tetua varietas padi hibrida, dan melihat tingkat polimorfisme dari marka tersebut; dan 2) mengetahui hasil perbandingan uji kemurnian benih dengan SSR dan uji keseragaman tanaman di lapangan.

yaitu Hipa 6 dan Hipa 7. Enam belas marka mikrosatelit yang dipilih dari linkage map (<http://www.gramene.org>) digunakan untuk membedakan galur tetua padi hibrida.

Analisis berdasarkan marka mikrosatelit dilakukan dengan ekstraksi dan isolasi DNA dari daun padi menggunakan metode CTAB (Murray and Thompson 1980). Daun padi dari tanaman yang telah berumur 3 minggu diambil sebanyak 5 g dari satu tanaman contoh. Setelah isolasi DNA, dilanjutkan dengan pengujian kualitas dan kuantitas DNA menggunakan spektrofotometer. Untuk setiap reaksi PCR digunakan 3 µl DNA dari hasil pengenceran yang ditambahkan 2 µl buffer PCR (10 x), 2,4 µl MgCl₂ (25 mM), 0,4 µl dNTPs mix (10 mM), 0,2 µl primer R (10 pmol), 0,2 µl primer F (10 pmol), 0,2 µl TaqDNA polymerase (5 µ/µl) dan 10,4 µl ddH₂O. Profil reaksi PCR yang digunakan adalah 94°C selama 5 menit denaturasi awal, 94°C selama 1 menit denaturasi, 53°C selama 30 detik penempelan primer, 72°C selama 1 menit untuk perpanjangan primer, dan 72°C selama 5 menit perpanjangan primer tambahan, siklus diulang 35 kali.

Elektroforesis hasil PCR dilakukan menggunakan gel agarose 3% dan buffer TAE. Sampel DNA produk PCR dijalankan pada proses elektroforesis dengan voltase 87-88 volt selama 30-45 menit. Elektroforesis gel poliakrilamid menggunakan alat elektroforesis vertikal dengan buffer TBE. Analisis data molekuler dilakukan untuk mengetahui tingkat polimorfisme (*Polymorphic Information Content, PIC*) dan profil karakterisasi marka mikrosatelit.

Analisis data molekuler dilakukan berdasarkan hasil skoring pita DNA yang muncul pada gel. Nilai 1 diberikan apabila ada alel dan nilai 0 bila tidak ada alel. Nilai PIC dihitung untuk masing-masing marka mikrosatelit (Smith *et al.* 1997), menggunakan software online (www.genomics.liv.ac.uk/animal/Pic1.html). Format data biner digunakan untuk membuat analisis kluster berdasarkan metode pautan rata-rata UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Arithmetic*) melalui program NTSYS versi 2.02. Dendrogram dikonstruksi untuk delapan galur tetua. Analisis jarak genetik diperoleh dengan formula: $S = 1 - GS$, di mana S adalah jarak genetik dan GS adalah kemiripan genetik.

BAHAN DAN METODE

Deteksi Marka SSR Spesifik

Delapan galur tetua dari lima varietas padi hibrida yang digunakan pada penelitian ini juga digunakan untuk mengidentifikasi marka SSR (Tabel 1). Uji kemurnian benih dilakukan menggunakan dua varietas hibrida,

Tabel 1. Lima varietas hibrida yang digunakan beserta galur tetuannya.

Varietas hibrida	Galur mandul jantan	Restorer
Hipa 6	A 2	PK 17
Hipa 7	A 1	R 14
Hipa 8	A 1	PK 21
Hipa 9	A 1	PK 12
Hipa 10	A 6	PK 18

Uji Kemurnian Benih Hibrida dan Uji Keresagaman Tanaman di Lapangan

Bahan tanaman untuk pengujian kemurnian benih di lapangan disemai terlebih dahulu pada petakan persemaian. Kemudian bibit yang telah berumur 15 hari dipindah ke sawah dengan jumlah satu bibit per lubang, ditanam pada jarak 25 cm x 25 cm. Benih F1 hibrida ditanam di lapang sesuai dengan panduan pengujian individual (PPI) kebaruan, keunikan, keseragaman, dan kestabilan tanaman padi (PPVT 2010). Tanah diolah sempurna dengan cara dibajak, diratakan, dan bersih dari gulma. Pupuk dasar diberikan pada saat tanaman berumur 8 hari setelah tanam (HST), yaitu 100 kg urea, 100 kg SP-36, dan 50 kg KCl/ha. Pemupukan susulan dilakukan pada stadia pembentukan anakan aktif (21 HST) berupa 100 kg urea/ha dan pada stadia primordia bunga (42 HST) berupa 100 kg urea/ha dan 50 kg KCl/ha (Badan Litbang Pertanian 2007). Pengairan, penyiangan, pengendalian hama dan penyakit dilakukan sebaik mungkin sesuai dengan petunjuk pengelolaan tanaman terpadu padi hibrida (Badan Litbang Pertanian 2010).

Pengamatan morfologi diamati terhadap 40 individu tanaman yang ditentukan secara acak sebagai tanaman contoh untuk masing-masing hibrida (Hipa 6 dan Hipa 7). Pengamatan karakter morfologi dilakukan untuk mengidentifikasi varietas campuran. Pengujian kemurnian di laboratorium dengan metode molekuler menggunakan individu tanaman contoh yang sama dengan uji kemurnian benih di lapang. Contoh daun diambil dari individu tanaman contoh pada fase vegetatif (45 hari), setelah itu tanaman contoh tetap dibiarkan tumbuh untuk diamati karakter morfologinya. Pekerjaan molekuler untuk uji kemurnian genetik di laboratorium menggunakan metode yang sama dengan metodologi untuk deteksi marka SSR spesifik pada tetua hibrida. Pada pengujian kemurnian genetik di laboratorium dipilih satu marka SSR untuk masing-masing hibrida.

Penentuan tingkat kemurnian genetik di lapang berdasarkan karakter morfologi tiap individu tanaman contoh pada berbagai tahap pertumbuhan tanaman. Karakterisasi morfologi tanaman dilakukan terhadap 60 karakter yang terdiri atas karakter kualitatif, kuantitatif, dan pseudokuantitatif dimana metode pengamatannya dilakukan berdasarkan PPI tanaman padi (PPVT 2010). Pada fase bibit dilakukan pengamatan terhadap warna koleoptil. Pada fase vegetatif dilakukan pengamatan terhadap beberapa karakter, seperti warna pelepah, intensitas warna hijau pada daun, warna antosianin pada daun, distribusi dan intensitas antosianin, panjang dan lebar helai daun. Pada fase generatif awal dilakukan pengamatan terhadap penampilan daun bendera, bulu pada ujung gabah, warna bulu pada ujung gabah, umur 50% berbunga, fase generatif akhir, dan umur matang.

Individu tanaman yang memiliki karakter menyimpang atau penampilan yang berbeda ditentukan sebagai tanaman campuran dan dihitung persentasenya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Deteksi Marka SSR Spesifik

Hasil penelitian menunjukkan, dua dari 16 pasang primer yang digunakan tidak menghasilkan pita DNA pada gel elektroforesis (Tabel 2). Sebanyak 41 alel dihasilkan dari 14 primer yang teramplifikasi untuk identifikasi tetua padi hibrida, dengan jumlah alel per lokus rata-rata 2,92. Persentase lokus polimorfis adalah 50% di mana terdapat tujuh primer yang bersifat polimorfis dengan jumlah alel yang polimorfis sebanyak 22. Jumlah alel per lokus polimorfik rata-rata 5,86. Rata-rata jumlah alel per lokus polimorfik merupakan jumlah total alel pada semua lokus dibagi dengan jumlah lokus polimorfis.

Tingkat polimorfisme (PIC) diperlukan untuk memilih marka yang dapat membedakan antargalur/tetua yang digunakan. Kuantifikasi PIC adalah jumlah alel yang dapat dihasilkan oleh suatu marka dan frekuensi dari tiap alel dalam set genotipe yang diuji. Nilai polimorfisme ditentukan oleh frekuensi kemunculan alel (DeVicente and Fulton 2003). Marka yang menghasilkan alel lebih sedikit memiliki

Tabel 2. Nama lokus, sekuen basa berulang, kisaran basa, dan jumlah alel dari 16 marka SSR yang digunakan dalam penelitian.

Kode lokus	Sekuen basa berulang	Kisaran basa (bp)	Jumlah alel		Tingkat polimorfis
			Total	Polimorfis	
RM104	(GA) ₉	222	2	0	0
RM154	(GA) ₂₁	183	7	0	0
RM164	(GT) ₁₆ TT(GT) ₄	246	3	2	0,555
RM206	(CT) ₂₁	147	6	6	0,783
RM209	(CT) ₁₈	134	-	-	-
RM215	(CT)₁₆	148	2	0	0
RM219	(CT) ₁₇	202	1	0	0
RM250	(CT) ₁₇	153	1	0	0
RM263	(CT)₃₄	199	3	2	0,455
RM276	(AG) ₈ A ₃ (GA) ₃₃	149	3	3	0,505
RM335	(CTT) ₂₅	104	4	3	0,675
RM346	(CTT) ₁₈	175	2	2	0,195
RM464	(AT) ₂₁	262	2	0	0
RM475	(TATC) ₈	235	1	0	0
RM551	(AG) ₁₈	192	-	-	-
RM570	(AG) ₁₅	208	4	4	0,530
Jumlah rata-rata			41	22	
			2,92		

kemampuan yang lebih kecil untuk membedakan sampel yang diuji. Nilai PIC yang tinggi ditunjukkan pada marka yang menghasilkan banyak alel. Nilai PIC tertinggi dari marka-marka yang polimorfis ditunjukkan oleh RM206 (0,783) dan terendah pada RM346 (0,195). Menurut pengklasifikasian nilai PIC yang dilakukan oleh Botstein *et al.* (1980), lima marka termasuk dalam kategori sangat informatif ($PIC > 0,5$), satu marka memiliki nilai PIC sedang yaitu RM 263 dan satu marka memiliki nilai PIC rendah ($< 0,25$) yaitu RM 346 (0,195).

Hasil karakterisasi berdasarkan marka SSR menunjukkan koefisien kemiripan genetik dari persilangan galur tetua hibrida berkisar antara 0,56–0,88 atau pada jarak genetik 0,12–0,44 (Tabel 3). Semakin besar nilai koefisien kemiripan genetik antara dua galur semakin besar kemiripan genetiknya.

Tabel 3. Jarak genetik galur tetua dari lima varietas hibrida.

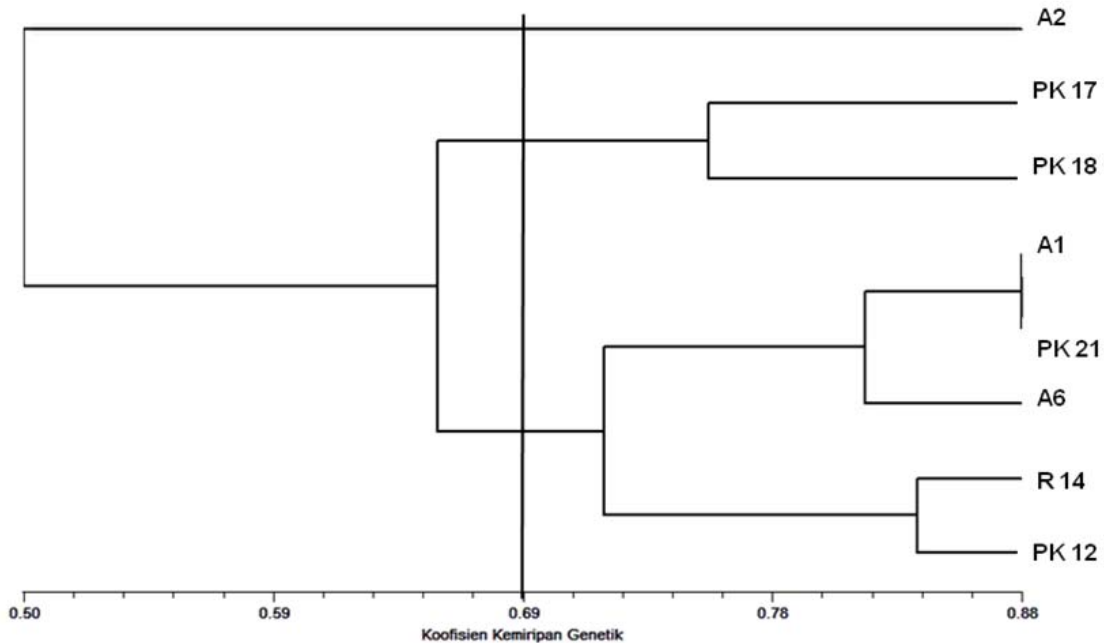
Varietas hibrida	Tetua	Kemiripan genetik	Jarak genetik	Rata-rata hasil* (t/ha)	Potensi hasil* (t/ha)
Hipa 6	A 2 x PK 17	0,56	0,44	7,3	10,6
Hipa 7	A 1 x R 14	0,80	0,20	7,6	11,4
Hipa 8	A 1 x PK 21	0,88	0,12	7,5	10,4
Hipa 9	A 1 x PK 12	0,72	0,28	8,1	10,4
Hipa 10	A 6 x PK 8	0,76	0,24	8,1	9,4

*) berdasarkan deskripsi varietas tanaman padi (BB Padi 2011)

Analisis kelompok (*cluster analysis*) terhadap galur tetua menggunakan tujuh marka SSR polimorfis menghasilkan dendrogram UPGMA dari delapan galur tetua dari lima varietas hibrida (Gambar 1). Kedelapan tetua yang dianalisis dapat dibedakan dengan jelas berdasarkan marka mikrosatelit. Pada tingkat kesamaan 69% terbentuk tiga kelompok. Kelompok 1 terdiri dari A 2, kelompok 2 adalah PK 17 dan PK 18, dan kelompok-3 terdiri dari A 1, PK 21, A 6, R14, dan PK 12.

Tetua Hipa 6 memiliki nilai jarak genetik 0,44 dan berada pada kelompok yang berbeda berdasarkan dendrogram kemiripan genetik (Gambar 1). Galur mandul jantan A 2 berada pada kelompok 1, berbeda dengan restorer PK 17 yang berada pada kelompok 2. Tetua Hipa 10 juga berada pada kelompok yang berbeda dimana GMJ A6 berada pada kelompok 3 dan restorer PK 18 pada kelompok 2. Jarak genetik antara tetua Hipa 10 tersebut adalah 0,24. Beberapa tetua dari hibrida yang diuji berada dalam kelompok yang sama. Tetua Hipa 7 dan Hipa 9 memiliki jarak genetik 0,20 dan 0,28. Jarak genetik terdekat ditunjukkan oleh tetua Hipa 8 sebesar 0,12. Galur mandul jantan A1 berada pada kelompok yang sama dengan restorer, PK 21.

Secara teoritis, heterosis akan meningkat bila jarak genetik dari kedua tetua lebih jauh (Melchinger and Gumber 1998). Keunggulan padi hibrida berupa heterosis diharapkan muncul terutama pada karakter potensi hasil. Potensi dan rata-rata hasil dari hibrida yang



Gambar 1. Dendrogram analisis UPGMA delapan tetua hibrida padi berdasarkan kemiripan genetik dengan menggunakan tujuh marka SSR polimorfis.

digunakan memiliki nilai yang hampir sama, berkisar 9,4–11,4 t/ha untuk potensi hasil dan 7,6–8,1 t/ha untuk rata-rata hasil. Tetua hibrida yang memiliki jarak genetik terjauh adalah tetua Hipa 6 yaitu 0,44 tetapi potensi dan rata-rata hasil Hipa 6 tidak lebih tinggi dari Hipa 8 yang memiliki jarak genetik terdekat antartetua pembentuknya yaitu 0,12 (Tabel 3). Hubungan antara jarak genetik tetua pembentuk dan heterosis tidak konsisten. Penelitian Cai and Lan (2005) dan Zhao *et al.* (2009) menunjukkan bahwa marka molekular berkorelasi positif dengan heterosis pada tanaman padi. Beberapa penelitian lain menunjukkan hal yang berbeda (Zainal dan Amirhusin 2005, Pabendon *et al.* 2009).

Jarak genetik dapat saja digunakan untuk memprediksi heterosis bila heterozigositas antartetua berkorelasi erat dengan tampilan hibridanya (Zhang *et al.* 1995). Korelasi antarjarak genetik dan heterosis bergantung pada materi, rancangan penelitian, dan marka molekular yang digunakan. Pada penelitian ini, perbedaan genetik antara tetua dianalisis dengan marka molekular nonspesifik yang dipilih secara acak. Jarak genetik yang didapatkan berdasarkan lokus acak dapat menyebabkan hasil yang tidak konsisten bila digunakan

untuk menganalisis korelasi antara jarak genetik antartetua dengan heterosis (Zhang *et al.* 2010). Pengaruh heterosis pada padi dikendalikan oleh banyak gen, sehingga heterosis tidak cukup diterangkan hanya melalui jarak genetik. Jarak genetik antartetua dipengaruhi oleh banyak aspek yang melibatkan banyak sifat dan lokus, tetapi tidak semua lokus bertautan dengan hasil.

Dari 16 marka SSR yang diuji diperoleh tujuh marka yang polimorfik. Enam marka dapat digunakan untuk membedakan galur tetua dari lima varietas padi hibrida yang digunakan. Pasangan tetua hibrida dan marka yang polimorfis dapat dilihat pada Tabel 4. SSR RM164 merupakan marka polimorfis tetapi tidak dapat digunakan untuk membedakan galur tetua dari varietas padi hibrida yang diuji, sehingga walaupun memiliki nilai PIC yang cukup tinggi (0,555) marka tersebut tidak polimorfis untuk dapat membedakan galur mandul jantan dengan restorernya.

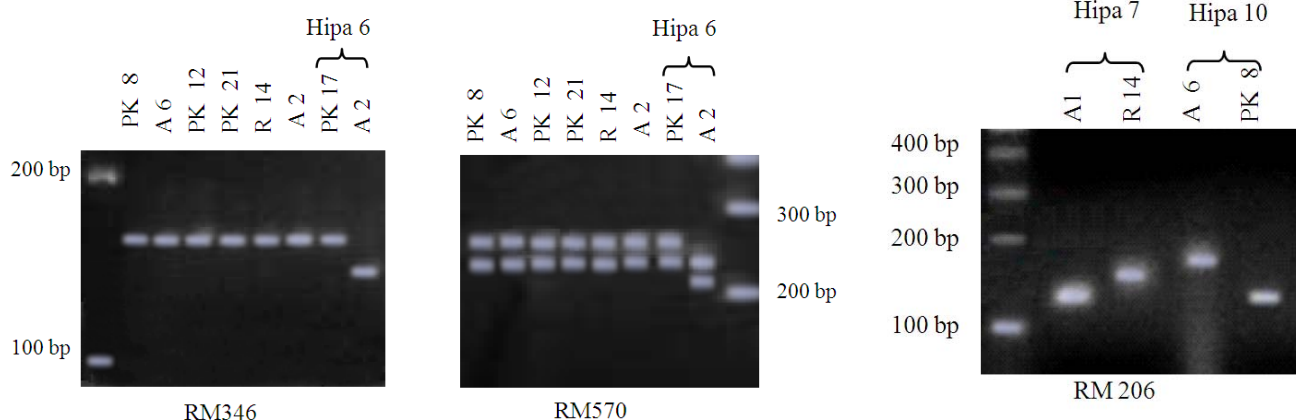
Marka SSR yang dapat menghasilkan pita polimorfis pada galur tetua hibrida dapat digunakan untuk mengidentifikasi tetua hibrida dan hibrida turunannya. Marka-marka polimorfis tersebut dapat digunakan untuk uji kemurnian benih padi hibrida. Beberapa marka polimorfis yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi Hipa 6, Hipa 7, Hipa 8, Hipa 9, dan Hipa 10 dapat dilihat pada Tabel 4. Penampilan pita polimorfis dari tetua Hipa 6, Hipa 7, dan Hipa 10 dapat dilihat pada Gambar 2.

Tabel 4. Pasangan tetua varietas padi hibrida dan marka SSR yang digunakan untuk membedakan galur tetua dari varietas hibrida.

Varietas	Tetua	Marka SSR polimorfis
Hipa 6	A 2 x PK 17	RM346, RM335, RM570, RM206
Hipa 7	A 1 x R 14	RM206, RM335
Hipa 8	A 1 x PK 21	RM263, RM206
Hipa 9	A 1 x PK 12	RM276, RM335
Hipa 10	A 6 x PK 8	RM206, RM276, RM263

Uji Kemurnian Benih Hibrida dan Uji Keseragaman Tanaman di Lapangan

Identifikasi kebenaran suatu genotipe tanaman menggunakan marka yang tidak terpaud merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk menilai



Gambar 2. Penampilan pita polimorfisme DNA dari tetua padi hibrida Hipa 6 menggunakan marka RM346 (a) dan RM570 (b) serta dari tetua hibrida Hipa 7 dan Hipa 10 menggunakan marka SSR RM206 (c).

kemurnian benih hibrida dan satu penanda yang polimorfis sudah cukup untuk pengujian kemurnian benih (Yashitola *et al* 2002). Beberapa marka SSR yang polimorfis yang dapat digunakan untuk membedakan galur tetua Hipa 6, dan untuk uji kemurnian benih dipilih marka RM346. Pemilihan marka RM346 berdasarkan sifat polimorfisme yang cukup jelas terlihat pada galur tetua (antara GMJ dan restorer) (Gambar 2a) dibandingkan dengan marka yang lain (RM570). Marka tersebut menghasilkan satu pita pada masing-masing tetua, sehingga dapat lebih mudah membedakan pada uji kemurnian benih dibandingkan menggunakan RM570. Marka RM 206 dipilih untuk uji kemurnian benih Hipa 7, karena merupakan marka yang polimorfis dan spesifik untuk Hipa 7 (Gambar 2c).

Hasil uji kemurnian genetik benih padi Hipa 6 dan Hipa 7 dapat dilihat pada Tabel 5 dan 6. Pengujian

Tabel 5. Deteksi tanaman campuran pada uji kemurnian benih padi hibrida Hipa 6 menggunakan metode SSR dan uji keseragaman tanaman di lapangan.

Metode uji kemurnian	Jumlah sampel	Tanaman campuran (%)	Nomor sampel
SSR	40	17,5	2, 3, 12, 19, 21, 33, 38
Uji keseragaman tanaman di lapang	40	17,5	1, 2, 3, 12, 19, 37, 38

Tabel 6. Deteksi tanaman campuran pada uji kemurnian benih padi hibrida Hipa 7 dengan menggunakan metode SSR dan uji keseragaman tanaman di lapangan.

Metode uji kemurnian	Jumlah sampel	Tanaman campuran (%)	Nomor sampel
SSR	40	12,5	4, 14, 15, 23, 29
Uji keseragaman tanaman di lapang	40	17,5	1, 4, 14, 15, 23, 29, 34

molekuler menggunakan marka RM346 pada 40 individu hibrida Hipa 6 menunjukkan individu nomor 2, 3, 12, 19, 21, 33, dan 38 bukan tanaman hibrida Hipa 6. Individu tersebut merupakan varietas campuran karena tidak memiliki pita yang sama dengan kedua tetuanya. Hasil uji keseragaman di lapang berdasarkan pengamatan morfologi tanaman menunjukkan campuran varietas lain pada tanaman nomor 1, 2, 3, 12, 19, 37, dan 38. Persentase tanaman campuran antara uji SSR dengan uji kemurnian di lapang adalah sama (17,5%), tetapi terdapat perbedaan pada individu-individu tanaman yang diidentifikasi sebagai campuran. Pada individu nomor 1 dan 37 yang diidentifikasi sebagai campuran di lapang ternyata bukan merupakan campuran pada hasil pengujian dengan marka SSR RM346. Individu tersebut memiliki dua pita polimorfis yang menandakan tetua Hipa 6. Hal sebaliknya terjadi pada individu nomor 21 dan 33 yang di lapang tidak dikategorikan sebagai campuran ternyata tidak memiliki dua pita yang merupakan identitas dari tetua hibrida. Hasil pengujian menggunakan marka SSR lebih dapat dipercaya karena jelas menunjukkan bahwa individu 21 dan 33 bukan hasil persilangan dari A2 dan PK 17 (Gambar 3), walaupun secara morfologi dinilai mirip dengan tanaman Hipa 6.

Uji kemurnian benih menggunakan marka RM206 pada Hipa 7 menunjukan tanaman campuran pada individu nomor 4, 14, 15, 23, dan 29. Pengamatan di lapang terhadap individu yang diidentifikasi sebagai campuran adalah tanaman nomor 1, 4, 14, 15, 23, 29, dan 34. Persentase tanaman campuran pada uji keseragaman tanaman di lapang lebih besar dibandingkan uji SSR, perbedaan terlihat pada tanaman nomor 1 dan 34. Tanaman nomor 1 dan 34 yang diidentifikasi sebagai campuran berdasarkan identifikasi morfologi ternyata merupakan hibrida karena memiliki pita yang berasal dari tetua pembentuknya. Hal yang sama juga terjadi pada penelitian Liu *et al.* (2007) pada tomat hibrida dan marka RAPD. Tanaman yang secara morfologi mirip belum tentu merupakan hibrida yang



Gambar 3. Hasil elektroforesis DNA hibrida Hipa 6 pada uji kemurnian benih menggunakan marka SSR RM346 pada media elektroforesis gel polyakrilamid. L = DNA ladder, A = galur mandul jantan dan R = restorer.

sama bila bukan berasal dari persilangan tetua pembentuknya, dan hal tersebut dapat dibuktikan melalui pengujian secara molekuler.

Hasil uji kemurnian varietas Hipa 6 dan Hipa 7 menunjukkan terdapat perbedaan antarpemilihan kemurnian menggunakan marka SSR dan uji keseragaman tanaman di lapang. Hal ini dapat disebabkan oleh sulitnya menilai perbedaan morfologi antarindividu di lapangan. Penilaian secara morfologi bersifat subjektif dan dapat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan. Penampilan bentuk tanaman dikendalikan oleh sifat genetik di bawah pengaruh faktor lingkungan. Apabila faktor lingkungan lebih kuat memberikan pengaruh maka akan terjadi variasi pada morfologi tanaman. Pengalaman dan tingkat keahlian dari petugas pemeriksa pertanian juga menjadi faktor penting pada akurasi penilaian uji kemurnian di lapang.

Pengujian dengan SSR dapat mendeteksi campuran-campuran yang sangat mirip secara morfologi dan membedakannya secara jelas dengan hasil elektroforesis. Beberapa tanaman yang terserang hama penyakit dan berakibat pada perubahan penampilan fisik dan menimbulkan kerancuan pada uji kemurnian di lapang, dapat dengan jelas dikenali kebenarannya menggunakan uji kemurnian dengan SSR. Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan marka SSR berperan penting dalam mengidentifikasi varietas dan uji kemurnian benih padi hibrida (Nandankumar *et al.* 2004, Xin *et al.* 2005, Sundaram *et al.* 2008). Pengujian dengan marka SSR sangat bermanfaat bila dibutuhkan informasi kemurnian suatu lot benih dalam waktu yang cepat.

Penilaian yang tidak tepat dalam uji kemurnian benih di lapang dapat menyebabkan kerugian besar pada produsen benih karena dapat saja tanaman yang dinilai sebagai tanaman campuran secara kasat mata berbeda karena dipengaruhi oleh pemupukan dan serangan hama penyakit. Tingginya persentase tanaman campuran dapat berakibat pada tidak lulusnya lot benih dalam proses sertifikasi. Menggunakan marka molekuler dalam analisis kemurnian benih secara genetik dapat menghemat waktu, ruang, tenaga kerja, dan memiliki tingkat keberulangan yang tinggi. Namun masih terdapat beberapa kekurangan dalam penggunaan marka SSR, antara lain memerlukan biaya yang relatif mahal sehingga di Indonesia belum banyak digunakan dalam pengujian rutin.

KESIMPULAN

Tujuh marka SSR polimorfis diperoleh dari 16 marka SSR yang diuji dan enam di antaranya (RM206, RM263, RM276,

RM346, RM335 dan RM570) dapat digunakan untuk membedakan tetua padi hibrida yang diuji. RM164 merupakan marka SSR polimorfis, tetapi tidak dapat digunakan untuk membedakan galur mandul jantan dengan pasangan restorer dari varietas padi hibrida yang diuji karena tidak menghasilkan pita polimorfik antara pasangan galur tetua hibrida.

Marka mikrosatelit RM346 dapat digunakan untuk pengujian kemurnian benih varietas Hipa 6, sedangkan marka RM206 spesifik untuk varietas Hipa 7. Terdapat perbedaan antara hasil uji kemurnian benih menggunakan marka molekuler dengan hasil uji berdasarkan morfologi tanaman di lapang. Perbedaan tersebut dapat disebabkan oleh sulitnya menilai perbedaan morfologi antarindividu tanaman di lapangan. Uji kemurnian benih menggunakan marka SSR dapat mengenali tanaman campuran yang sangat mirip secara morfologi dan membedakannya secara jelas dengan hasil elektroforesis.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Litbang Pertanian. 2007. Daerah pengembangan dan anjuran budi daya padi hibrida. Petunjuk Teknis Lapang. Departemen Pertanian. Jakarta. 43p.
- Badan Litbang Pertanian. 2010. Pedoman pelaksanaan sekolah lapang pengelolaan tanaman terpadu padi hibrida. Departemen Pertanian. 57p.
- BB Padi. 2011. Deskripsi varietas padi. Sukamandi. 118p.
- Blair, M.W., O. Panaud, and S.R. McCouch. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) Theor. Appl. Genet. 98: 780-792.
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick, and R. David. 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. Am. J. Human Gene. 32: 314-331.
- Cai, J. and W. Lan. 2005. Using of AFLP marker to predict the hybrid yield and yield heterosis in rice. Chin. Agric. Sci. Bull. 21(4):39-43.
- DeVicente, M.C. and T. Fulton. 2003. Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity. www.ipgr.cgiar.org/publication/pubfile.asp?ID_PUB=912.
- ISTA. 2010. International rules for seed testing. Verification of species and cultivar. 8.1-8.11. ISTA. Bassersdorf, Switzerland.
- Liu, L.W., Y. Wang, Y.Q. Gong, T.M. Zao, G. Liu, X.Y. Li, and F.M. Yu. 2007. Assessment of genetic purity of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) hybrid using molecular marker. Scientific Horticulture 115: 7-12.
- Meesang, N., S.L. Ranamukhaarachchi, M.J. Petersen, and S.B. Andersen. 2001. Soybean cultivar identification and genetic purity analysis using microsatellite DNA marker. Seed Science and Technology 29: 637-645.
- Melchinger, A.E. and R.K. Gumber. 1998. Overview of heterosis and heterotic groups in agronomic crops. Concepts and breeding on heterosis in crop plants. CSSA Special Publication 25: 29-44.

- Moeljopawiro, S. 2007. Marka mikrosatelit sebagai alternatif uji BUSS dalam perlindungan varietas tanaman padi. *Zuriat* 18(2):129-138.
- Murray, M.G. and W.P. Thompson. 1980. Rapid isolation on high molecular weight DNA. *Nucleic Acid Rep.* 8:4321-4325.
- Nandankumar, N., A.K. Singh, R.K. Sharma, T. Mohapatra, K.V. Prabhu, and F.U. Zaman. 2004. Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seed in rice using microsatellite markers. *Euphtica* 136:257-264.
- Pabendon, M.B., M.J. Mejaya, H. Aswidinnoor, dan J. Koswara. 2009. Korelasi antara jarak genetik inbrida dengan penampilan fenotipik hibrida jagung. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan* 28(2):69-77.
- Pabendon, M.B., M.J. Mejaya, Subandi, dan M. Dahlan. 2005. Sidik jari empat varietas jagung hibrida beserta tetuanya berdasarkan marka mikrosatelit *Zuriat* 16(2): 192-200.
- PPVT. 2010. Panduan pengujian individual kebaruan, keunikan, keseragaman, dan kestabilan tanaman padi. Departemen Pertanian. Jakarta.
- Sadjad, S. 1993. Dari benih kepada benih. PT Gramedia Widiasarana Indonesia, Jakarta.
- Smith, J.S.C., E.C.L. Chin, H. Shu, O.S. Smith, S.J. Wall, M.L. Senior, S.E. Mitchel, S. Kresovich, and J. Ziegler. 1997. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparison with data from RFLPS and pedigree. *Theor. Appl. Genet.* 95:163-173.
- Sundaram, R.M., B. Naveenkumar, S.K. Biradar, S.M. Balachandram, B. Mishra, M. Ilyas Ahmed, M.S. Ramesha, and N.P. Sarma. 2008. Identification of informative SSR marker capable of distinguishing hybrid rice parental lines and their utilization in seed purity assessment. *Euphytica* 163:215-224.
- Tamilkumar, P., R. Jerlin, N. Senthil, K.N. Ganesan, R.J. Jeevan, and Raveendran. 2009. Fingerprinting of rice hybrid and their parental lines using microsatellite marker and their utilization in genetic purity assessment of hybrid rice. *Rice Journal of Seed Science* 2(3):40-47.
- Wahyuni, S., I.W. Mulsanti, A.A. Daradjat, Sudiby, M. Lilis, dan N. Yunani. 2008. Identifikasi penciri spesifik dan uji BUSS beberapa varietas padi. Laporan akhir tahun DIPA 2008. Balai Besar Penelitian Tanaman Padi. Sukamandi. 33 p.
- Xin, Y., Z. Zhang, Y. Xiong, and L. Yuan. 2005. Identification and purity of super hybrid rice with SSR molekular marker. *J. Rice Science* 12(1):7-12.
- Yashitola, J., T. Thirumurgan, R.M. Sudaram, M.K. Naseerullah, M.S.Ramesha, N.P. Sarma, and R.V. Sonti. 2002. Assessment of purity of rice hybrid using microsatellite and STS marker. *Crop Sci.* 42:1369-1373.
- Zainal, A. dan B. Amirhusin. 2005. Pengelompokan tetua hibrida berdasarkan sifat-sifat morfologi dan RAPD-PCR. *Zuriat* 16(1): 9-21.
- Zhang, Q.F., Y.J. Gao, M.A. Saghai Maroof, H.S. Yang, X.J. Li. 1995. Molecular divergence and hybrid performance in rice. *Mol. Breeding* 1(2):133-142.
- Zhang, T., X. Ni, Jiang K., H. Deng, Q. He, Q. Yang, L. Yang, X. Wang, Y. Cao, and J. Zheng. 2010. Relationship between heterosis and parental genetic distance based on molecular markers for functional genes related to yield traits in rice. *J. Rice Sci.* 17(4):288-295.
- Zhao, Q.Y., Z. Zhu, Y.D. Zhang, L. Zhao, T. Chen, Q.F. Zhang, and C.L. Wang. 2009. Analysis between heterosis and genetic distance based on simple sequence repeat markers in Japonica rice. *J. Rice Sci.* 23(2):141-147.