

# Keragaman Genetik Kultivar Padi Beras Hitam Lokal Berdasarkan Penanda Mikrosatelit

Kristamtini<sup>1\*</sup>, Taryono<sup>2</sup>, Panjisakti Basunanda<sup>2</sup>, dan Rudi H. Murti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Yogyakarta, Jl. Stadion Maguwoharjo No. 22, Karang Sari, Wedomartani, Ngemplak, Sleman, Yogyakarta Telp. (0274) 884662, 514959; Faks. (0274) 4477052; \*E-mail: krisniur@yahoo.co.id

<sup>2</sup>Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Bulaksumur, Yogyakarta 55281

Diajukan: 3 Maret 2014; Diterima: 18 Juli 2014

## ABSTRACT

**Genetic Diversity of Local Black Rice Cultivars Based on Microsatellite Markers. Kristamtini, Taryono, Panjisakti Basunanda, and Rudi H. Murti.** Indonesia has diverse accessions of local black rice, which are important sources of germplasm. However, some of the local black rice cultivars have different names, leading a need to be identified to determine their genetic diversity using molecular marker. This study aimed to identify genetic diversity of eleven cultivars of local black rice, collection of the Assessment Institute for Agricultural Technology, Yogyakarta and compared them with two white rice varieties using four microsatellite markers. Detection of microsatellite alleles polymorphism was carried out by visualization of PCR amplicons by electrophoresis on agarose gel. To estimate their genetic diversity, phylogenetic tree and principal coordinate analysis were performed using binary data of SSR alleles. The results revealed that total markers enabled to differentiate black rice cultivars as reflected by high value of polymorphic information content (PIC) mean (0.695). This value was consistent with the high genetic diversity of black rice (genetic diversity index,  $h = 0.283$ ) in comparison with white rice cultivars ( $h = 0.020$ ). The phylogenetic and main coordinate analyses suggested that black rice cultivars genetically differed from white rice. The local black rice cultivars were preferentially grouped based on their genetic those were distributed in three coordinates and did not represent their local geographic origin. Genetic diversity analysis in this study will be useful as an initial basis for proper identification and selection for appropriate parents to assist breeding program of black rice in Indonesia.

**Keywords:** Genetic diversity, local cultivar, black rice, microsatellite markers.

## ABSTRAK

**Keragaman Genetik Kultivar Padi Beras Hitam Lokal Berdasarkan Penanda Mikrosatelit. Kristamtini, Taryono, Panjisakti Basunanda, dan Rudi H. Murti.** Indonesia memiliki beragam aksesori padi hitam lokal yang penting sebagai sumber plasma nufah. Namun demikian, sebagian padi hitam lokal tersebut memiliki nama yang berbeda-beda sehingga perlu diidentifikasi secara genetis menggunakan marka molekuler. Penelitian ini bertujuan untuk mengiden-

tifikasi keragaman genetik sebelas kultivar padi hitam lokal koleksi Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Yogyakarta dan dibanding dengan dua varietas padi beras putih menggunakan empat penanda mikrosatelit/*simple sequence repeat* (SSR) yang terpaut sifat warna beras. Deteksi polimorfisme alel SSR dilakukan dengan visualisasi amplicon hasil *polymerase chain reaction* (PCR) pada elektroforesis gel agarosa. Untuk mengetahui keragaman genetiknya, pohon filogeni dan analisis koordinat utama dibuat berdasarkan data biner alel SSR. Hasilnya menunjukkan bahwa total marka mampu membedakan kultivar padi hitam seperti direfleksikan oleh nilai rerata *polymorphic information content* (PIC) yang cukup tinggi (0,695). Hasil tersebut didukung oleh keragaman yang tinggi pada padi hitam (indeks keragaman genetik,  $h = 0,283$ ) dibanding dengan beras putih ( $h = 0,020$ ). Hasil analisis gerombol dan analisis koordinat utama juga menunjukkan bahwa kultivar padi hitam secara genetis berbeda dengan padi beras putih. Kultivar-kultivar padi hitam mengelompok sesuai dengan karakter genetiknya yang tersebar di tiga koordinat tanpa mempertimbangkan asal geografisnya. Analisis keragaman genetik ini bermanfaat sebagai langkah awal untuk identifikasi kultivar padi hitam dan seleksi tetua persilangan dalam membantu program pemuliaan padi di Indonesia.

**Kata kunci:** Keragaman genetik, kultivar lokal, padi hitam, penanda SSR.

## PENDAHULUAN

Beras hitam merupakan salah satu jenis beras yang ada di dunia, di samping beras putih, beras cokelat, dan beras merah. Akhir-akhir ini beras hitam mulai populer dan dikonsumsi oleh sebagian masyarakat sebagai bahan pangan fungsional karena secara alami atau melalui proses tertentu mengandung satu atau lebih senyawa yang dianggap mempunyai fungsi fisiologis yang bermanfaat bagi kesehatan. Beras hitam memiliki kandungan antosianin tinggi yang terletak pada lapisan perikarp, yang memberikan warna ungu gelap (Ryu *et al.*, 1998; Takashi *et al.*, 2001). Antosianin telah diakui sebagai bahan pangan fungsional kesehatan karena aktivitas antioksidan (Nam *et al.*, 2006; Philpott *et al.*, 2004; Satue-Gracia *et al.*, 1997), antikanker (Hyun dan Chung, 2004; Kamei *et al.*, 1995), hipoglikemia (Tsuda *et al.*, 2003), dan efek anti inflamasi (Tsuda *et al.*, 2002). Fungsi-fungsi

tersebut memberikan efek sinergis dengan berbagai nutrisi secara *in vivo*. Pigmen antosianin juga efektif mengurangi kadar kolesterol (Lee *et al.*, 2008). Di samping kelebihan yang dimiliki, padi beras hitam umumnya mempunyai umur tanaman yang panjang, habitus tanaman yang tinggi, dan produktivitas rendah yang menjadi kendala dalam usaha budidayanya.

Identifikasi kultivar padi beras hitam lokal di Indonesia sangat diperlukan untuk memahami karakter spesifik sehingga dapat memanfaatkan potensi yang dimiliki dan menghilangkan karakter yang tidak diinginkan untuk program perbaikan varietas. Program perbaikan varietas memerlukan keragaman genetik sebagai bahan dasar dalam kegiatan pemuliaan. Keragaman warna beras berkisar mulai hitam pekat sampai hitam cerah. Nama padi beras hitam berbeda-beda di berbagai tempat/daerah. Padi beras hitam di Solo dikenal sebagai "Beras Wulung" (berarti "hitam"), di kawasan Cibeusi, Subang, Jawa Barat, disebut dengan nama "Beras Gadog", di Sleman dikenal dengan nama "Cempo Ireng", ada juga yang menyebut sebagai "Beras Jliheng" (Kristantini, 2008), sedangkan di Bantul dikenal dengan nama "Beras Melik". Namun demikian, padi beras hitam dengan nama-nama yang berbeda belum diketahui secara pasti keterkaitannya dengan perbedaan karakter, baik secara morfologis, biokimia, maupun genetis, atau hanya nama saja. Oleh karena itu, analisis keragaman padi hitam lokal sangat diperlukan, sesuai dengan pernyataan Solouki *et al.* (2008) bahwa evaluasi keragaman genetik dapat dilakukan, baik dengan penanda morfologi, biokimia, maupun molekuler.

Teknologi penanda molekuler telah banyak dilaporkan pada berbagai spesies tanaman karena penanda DNA tidak terpengaruh lingkungan dalam teknik identifikasinya. Pabendon *et al.* (2011) menyatakan bahwa teknologi marka dapat digunakan untuk menjawab pertanyaan yang berhubungan dengan keragaman genetik, klasifikasi, dan filogeni yang berhubungan dengan pengelolaan plasma nutfah, serta menjadi alat bantu dalam pemuliaan dan seleksi melalui penanda gen. Identifikasi plasma nutfah tanaman secara lebih luas menggunakan penanda molekuler dapat memberikan hasil yang cepat, efektif, dan akurat. Dengan penanda molekuler, dapat dilihat perbedaan genetik di antara galur-galur inbrida. Menurut McCouch dan Tanksley (1991), penanda molekuler memegang dua peranan penting dalam program pemuliaan tanaman, yaitu sebagai penentu sidik jari dan penanda dalam seleksi terpaut dengan karakter fenotipik tertentu yang diinginkan.

Di antara sejumlah penanda molekuler yang tersedia, mikrosatelit atau *simple sequence repeats*

(SSRs) telah menjadi sistem penanda yang sering digunakan. Penanda SSR terdiri atas susunan DNA dengan motif 1–6 pasang basa, berulang sebanyak lima kali atau lebih secara berurutan (Vigouroux *et al.*, 2002). Teknologi SSR banyak digunakan karena berbagai kelebihan dan memungkinkan dilakukannya pengamatan beberapa penanda sekaligus (*multiplex*) (Susanto *et al.*, 2009). Menurut Powell *et al.* (1996), beberapa pertimbangan dalam penggunaan penanda SSR dalam studi genetik di antaranya: (1) penanda tersebar secara melimpah dan merata dalam genom, keragamannya sangat tinggi (banyak alel dalam lokus), sifatnya kodominan dan lokasi genom dapat diketahui; (2) reproduksibilitas dan ketepatan yang sangat tinggi; (3) sangat akurat dalam membedakan genotipe, evaluasi kemurnian benih, pemetaan, dan seleksi genotipe untuk karakter yang diinginkan, serta studi genetik populasi dan analisis diversitas genetik.

Penanda SSR telah banyak digunakan untuk mengidentifikasi dan memverifikasi suatu varietas tanaman (Nunome *et al.*, 2003; Vosman *et al.*, 2001) dan mengidentifikasi keragaman genetik plasma nutfah tanaman, seperti jagung (Pabendon *et al.*, 2005), terung-terungan (Nunome *et al.*, 2003; Vosman *et al.*, 2001), dan gandum (Zawko, 2003). Pemanfaatan penanda SSR untuk analisis keragaman genetik beras berwarna telah dilaporkan, seperti beras merah lokal (Utami *et al.*, 2009), beras berwarna (Patel *et al.*, 2014), dan beras cokelat (Suzuki *et al.*, 2004). Penanda SSR juga memiliki kemampuan dalam membedakan varietas padi sehingga dapat direkomendasikan untuk digunakan dalam perlindungan varietas tanaman (Moeljopawiro, 2010). Namun demikian, sampai saat ini evaluasi keragaman genetik padi beras hitam lokal di Indonesia masih belum dilakukan secara intensif.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keragaman genetik kultivar padi beras hitam lokal menggunakan penanda SSR spesifik untuk warna beras.

## BAHAN DAN METODE

### Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli sampai dengan Oktober 2013 di Laboratorium Genetika dan Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada (UGM), Yogyakarta.

### Bahan Tanaman dan Penanaman

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebelas kultivar padi beras hitam koleksi Balai Pengkajian Teknologi Pertanian (BPTP) Yogyakarta dan dua padi beras putih, yaitu Situ Bagendit

dan Inpari 6. Daftar padi yang digunakan dalam penelitian ini tercantum pada Tabel 1.

Semua aksesori padi ditanam dalam ember dalam rumah kaca untuk keperluan isolasi DNA. Sebanyak 3–5 butir benih ditanam per ember dan dijarangkan menjadi satu bibit per ember pada umur 10 hari. Penanaman dilakukan sampai minggu ke-3 untuk dipanen daunnya. Sampel daun diambil dari beberapa individu tanaman (*bulk*) dari satu nomor aksesori, mengingat nomor aksesori yang ditanam merupakan individu dari aksesori tanaman yang telah seragam karena telah dilakukan pemurnian.

### Isolasi dan Amplifikasi DNA

Daun padi digerus sampai berbentuk bubuk dengan bantuan nitrogen cair. Isolasi DNA dilakukan menggunakan metode *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) sesuai protokol yang direkomendasikan Doyle dan Doyle (1990).

Amplifikasi PCR dilakukan dalam volume 10  $\mu$ l dengan konsentrasi DNA 5 ng/ $\mu$ l sebanyak 2,5  $\mu$ l, ditambah PCR *mix* Go Taq Green 5  $\mu$ l, dan primer F/R (10 mM) 0,25  $\mu$ l. Program PCR yang digunakan sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit, dilanjutkan 35 siklus yang terdiri atas denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, penempelan primer pada suhu 55°C selama 1 menit dan suhu 72°C selama 2 menit, pengulangan langkah 2–4

sebanyak 13 kali dengan program *touchdown* (penurunan suhu secara teratur) dengan perbedaan sebanyak 0,5°C setiap siklusnya, kemudian diikuti dengan pemanjangan primer akhir pada suhu 72°C selama 7 menit. Adapun penanda SSR yang digunakan dalam penelitian disajikan pada Tabel 2.

### Elektroforesis Hasil Amplifikasi DNA

Hasil amplifikasi PCR dipisahkan pada gel metafor agarosa 2% dalam bufer TBE 1 $\times$  dan dipanaskan perlahan-lahan sampai semua bahan larut dan ditambah pewarna DNA (*flouoroSafe*<sup>®</sup>) 0,01%. Larutan gel dipadatkan di dalam cetakan, disimpan pada suhu 4°C selama 30–60 menit sebelum digunakan untuk mendapatkan resolusi yang lebih baik. Setelah gel siap digunakan, hasil PCR dimasukkan ke dalam sumur gel yang direndam dalam larutan bufer TBE 1 $\times$  pada alat elektroforesis horizontal dengan tegangan 80 V selama 60 menit. Selanjutnya, hasilnya divisualisasikan di bawah transiluminator UV dan difoto.

### Analisis Data

Tingkat keinformatifan penanda SSR ditentukan dengan penghitungan *polymorphic information content* (PIC) (Weir, 1990), dengan rumus:

$$PIC = \frac{n}{j} \left( 1 - \sum_{j=1}^n (P_{ij})^2 \right)$$

**Tabel 1.** Daftar padi beras hitam dan beras putih yang digunakan dalam evaluasi keragaman genetik.

Nama kultivar	Warna beras	Daerah asal	Kode
Melik	Hitam	Kedon-Ganjuran-Bantul-Yogyakarta	A
Jlitheng	Hitam	Sleman, Yogyakarta	B
Cempo Ireng	Hitam	Seyegan-Sleman-Yogyakarta	C
Pari Ireng	Hitam	Padasan-Pakembinangun-Sleman-Yogyakarta	D
Padi hitam Nusa Tenggara Timur	Hitam	Alor-Nusa Tenggara Timur	E
Padi hitam Bantul	Hitam	Njayan-Imogiri-Bantul	O
Padi hitam Magelang (berbulu)	Hitam	Sawangan-Magelang-Jawa Tengah	R
Padi hitam Magelang (tak berbulu)	Hitam	Sawangan-Magelang-Jawa Tengah	S
Padi hitam Sragen	Hitam	Sragen-Jawa Tengah	T
Padi hitam Wonosobo	Hitam	Banjarnegara perbatasan Wonosobo-Jawa Tengah	W
Padi hitam Banjarnegara	Hitam	Banjarnegara-Jawa Tengah	Y
Situ Bagendit	Putih	BB Padi Sukamandi	G
Inpari 6	Putih	BB Padi Sukamandi	I

**Tabel 2.** Penanda SSR terkait sifat warna beras dan urutan basa nukleotidanya.

Nama primer	Kromosom	Urutan basa nukleotida
RM180	7	F : CTACATCGGCTTAGGTGTAGCAACACG R : ACTTGCTCTACTTGTGGTGAGGGACTG
RM224	11	F : ATCGATCGATCTTCACGAGG R : TGCTATAAAAAGGCATTTCGGG
RM220	1	F : GGAAGGTAAGTGTTCACAC R : GAAATGCTTCCCACATGTCT
RM252	4	F : TTCGCTGACGTGATAGGTTG R : ATGACTTGATCCCAGAACG

Sumber: Utami *et al.* (2009).

dengan Pij adalah frekuensi pola j yang dihasilkan oleh penanda SSR yang kemudian dijumlahkan untuk keseluruhan pola yang dihasilkan penanda SSR. Nilai PIC dihitung untuk setiap penanda SSR (Smith *et al.*, 2000).

Hasil profil DNA yang dihasilkan diterjemahkan menjadi data biner (1 = ada pita DNA, 0 = tidak ada pita DNA). Nilai keragaman genetik (h) untuk setiap individu dan populasi dihitung berdasarkan *Nei's gene diversity* (1973) dan analisis variasi molekuler (AMOVA) dilakukan dengan program *Gen AlEx 6* (Peakall dan Smouse, 2006). Analisis variasi molekuler dilakukan untuk mengetahui distribusi keragaman genetik di dalam dan antar populasi.

Nilai keragaman genetik menggambarkan keragaman genetik dalam suatu populasi, sedangkan nilai rerata jarak genetik antara dua populasi menggambarkan keragaman genetik antar populasi. Analisis georombol juga dilakukan untuk memvisualisasi pengelompokan populasi menggunakan metode UPGMA. Tingkat kemiripan genetik atau jarak genetik ditentukan berdasarkan rumus Nei dan Li (1979) atau dikenal dengan istilah koefisien Nei menggunakan bantuan *software* Multi Variate Statistic Package (MVSP ver. 3.1) (Kovach, 1989).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis dilakukan pada tiga belas kultivar padi yang terdiri atas sebelas aksesori padi beras hitam dan dua aksesori padi beras putih dengan empat penanda SSR. Total terdapat 26 alel yang teridentifikasi pada total kultivar yang diamati dalam penelitian ini. Jumlah alel pada tiap lokus bervariasi dengan selang antara 4 (RM180) sampai 9 (RM252), dengan rerata 6,5. Nilai rerata alel per lokus tersebut lebih tinggi daripada analisis SSR hasil penelitian Cho *et al.* (2000) dan sebanding dengan hasil Yu *et al.* (2003) yang menggunakan aksesori tetua padi program pemuliaan internasional, namun lebih rendah daripada nilai rerata padi aromatik (Jain *et al.*, 2004).

Nilai PIC yang menggambarkan diversitas dan frekuensi alel antara aksesori padi yang diamati juga menunjukkan variasi antar lokus. Penanda RM180, RM220, RM224, dan RM252 (Gambar tidak ditampil-

kan) menunjukkan bahwa nilai rerata PIC untuk keempat penanda SSR mencapai 0,695 dengan selang 0,33 (RM180) sampai 0,84 (RM220). Terdapat kecenderungan semakin tinggi nilai PIC, semakin banyak alel yang terdeteksi, yang menunjukkan relevansi dengan laporan Yu *et al.* (2003). Artinya, semakin besar ulangan SSR DNA, semakin banyak jumlah alel yang terdeteksi. Tingginya nilai rerata PIC juga merupakan petunjuk tingginya keragaman genetik populasi yang diamati. Penanda RM220 dan RM252 memiliki nilai PIC yang lebih tinggi daripada dua penanda lainnya (Tabel 3). Hal ini mengandung makna bahwa penanda SSR RM252 dan RM220 yang masing-masing berlokasi di kromosom 4 dan kromosom 1 (McCouch *et al.*, 2002) memiliki kemampuan tinggi dalam mengidentifikasi kultivar padi secara genetik. Kedua penanda SSR tersebut diduga merupakan penanda yang terpaut dengan sifat warna hitam beras dan antosianin. Sesuai dengan laporan Wang dan Shu (2007), hasil analisis genetik klasik menunjukkan bahwa dua lokus *Pb* (*Prp-b*) dan *Pp* (*Prp-a*) yang masing-masing berlokasi di kromosom 4 dan kromosom 1, dibutuhkan untuk pewarnaan perikarp dengan antosianin dari beras hitam (*purple rice*).

Keterpautan sifat warna beras ini didukung oleh hasil penelitian Utami *et al.* (2009) pada lima kultivar padi merah asal DIY, yaitu Mandel Handayani, Segreng Cempo Merah, Anel Merah, dan Saodah berdasarkan analisis dengan empat penanda SSR, yaitu RM252, RM220, RM180, dan RM224, menunjukkan adanya perbedaan alel yang terkait dengan sifat warna/pigmen pada bagian sekam atau perikarp dari gabah. Kristantini dan Purwaningsih (2009) juga mendukung bahwa penanda SSR RM220 mampu membedakan aksesori padi merah Mandel, Segreng, dan Aeksibundong.

Keragaman dihitung berdasarkan frekuensi alel (1 dan 0) dan jumlah lokus polimorfik, yang menunjukkan keragaman genetik dalam populasi yang relevan dengan nilai rerata PIC. Jadi, nilai koefisien keragaman sejalan dengan nilai persentase lokus polimorfik, yaitu semakin tinggi persentase lokus polimorfik, semakin tinggi koefisien keragaman yang timbul dalam populasi. Hasil analisis keragaman gene-

**Tabel 3.** Data polimorfisme tiap penanda SSR yang digunakan.

Penanda SSR	Jumlah pola pita (alel)	Jumlah pita teramplifikasi	Nilai PIC
RM180	4	16	0,33
RM220	8	20	0,84
RM224	5	23	0,79
RM252	9	23	0,82
Rerata			0,70

tik (Tabel 4) menunjukkan persentase lokus polimorfik tertinggi dicapai oleh populasi padi beras hitam (92%). Tingginya persentase lokus polimorfik pada populasi padi beras hitam ini sejalan dengan nilai keragaman genetik yang tinggi pada populasi padi beras hitam sebesar 0,283 atau 28,3%. Hal ini dapat dimengerti karena populasi padi beras hitam yang digunakan berasal dari area yang berbeda yang kemungkinan berbeda secara genetis. Sebagai pembandingan, dua varietas padi beras putih yang digunakan sebagai *outgroup* menunjukkan perbedaan yang tinggi secara genetis dengan padi beras hitam. Persentase lokus polimorfik untuk populasi padi beras putih (4%) dan keragaman genetik padi beras putih (0,020) jauh lebih rendah daripada kelompok padi beras hitam. Hal ini mungkin disebabkan karena jumlah varietas padi beras putih yang minim (dua varietas), juga karena keduanya mempunyai kedekatan secara genetis. Dengan demikian, motif ulangan nukleotida (dua, tiga, empat) (Ni *et al.*, 2002) seperti yang dihasilkan oleh penanda SSR dalam penelitian ini, mendukung variasi yang tinggi dalam populasi padi beras hitam.

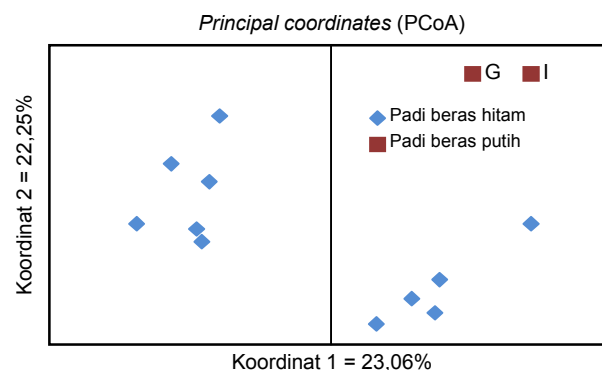
Berdasarkan analisis variasi molekuler, variasi total menunjukkan besarnya distribusi keragaman genetik di dalam populasi sebesar 70%, sedangkan 30% keragaman terletak di antara populasi. Populasi dengan keragaman genetik yang tinggi dapat dijadikan *pool* untuk digunakan sebagai material pemuliaan tanaman lebih lanjut. Hal ini menunjukkan bahwa

keragaman genetik di dalam populasi, baik padi beras hitam maupun padi beras putih, dalam studi ini dapat digunakan sebagai tetua persilangan dalam proses pemuliaan tanaman.

Penyebaran genetik padi beras hitam dan putih ditampilkan pada empat *biplot* yang merupakan hasil analisis koordinat utama (*Principal Coordinate Analysis/PCoA*). Analisis koordinat utama merupakan analisis yang digunakan untuk mengetahui kedekatan individu berdasarkan kemiripan karakter melalui penyederhanaan dimensi. Gambar 1 menunjukkan hasil analisis koordinat utama yang berasal dari jarak genetik yang dihitung dari data biner dengan SSR. Padi beras hitam yang sebagian besar berasal dari berbagai tempat di Jawa Tengah dan satu dari Nusa Tenggara Timur mengelompok terpisah dengan kelompok padi beras putih. Kultivar-kultivar padi beras hitam mengelompok sesuai dengan karakter genetiknya dan tersebar di tiga koordinat tanpa mewakili area geografi asal. Padi beras putih terkonsentrasi pada satu titik yang berdekatan (satu koordinat) yang menunjukkan keragaman genetik yang rendah. Hasil PCoA ini memberikan petunjuk bahwa keragaman genetik yang besar pada populasi padi beras hitam penting sebagai informasi awal untuk dapat digunakan sebagai materi genetik pemuliaan tanaman karena keragaman yang besar dalam populasi merupakan kunci sukses dalam pemuliaan tanaman.

**Tabel 4.** Hasil analisis keragaman genetik berdasarkan ukuran pita DNA hasil PCR menggunakan empat penanda SSR.

Populasi	Persentase lokus polimorfik (%)	Jumlah sampel (N)	Jumlah alel yang berbeda (Na)	Keragaman (h)
Padi beras hitam	92,00	11,00	1,89	0,28
Padi beras putih	4,00	2,00	0,32	0,02
Rerata	48,00	6,50	1,10	0,15
SE	44,00	0,64	0,13	0,02



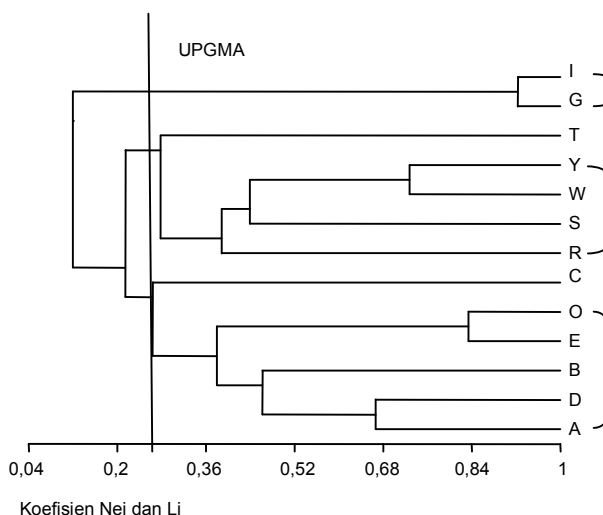
**Gambar 1.** Scatter plot/diagram tebar populasi padi beras hitam dan padi beras putih berdasarkan kovarian matrik menggunakan empat penanda SSR. Kelompok padi beras hitam (Melik, Jliheng, Cempo Ireng, Pari Ireng, padi hitam NTT, padi hitam Bantul, padi hitam Magelang berbulu, padi hitam Magelang tak berbulu, padi hitam Sragen, padi hitam Banjarnegara perbatasan Wonosobo, padi hitam Banjarnegara) dan Kelompok padi beras putih (Situbagendit dan Inpari 6).

Analisis gerombol juga dilakukan untuk memvisualisasi pengelompokan dan keragaman menggunakan metode UPGMA (Kovach, 1989). Dendrogram hasil analisis gerombol berdasarkan persamaan genetik ditampilkan pada Gambar 2.

Dendrogram menunjukkan bahwa kultivar padi dengan kesamaan genetik cenderung mengelompok bersama. Gambar 2 menampilkan dua kelompok utama, yaitu kelompok padi beras putih (kelompok I) dan kelompok padi beras hitam (kelompok II), yang sesuai dengan hasil analisis PcoA. Implikasi dari dendrogram tersebut adalah kultivar-kultivar yang berada dalam satu kelompok menunjukkan adanya kemiripan genetik besar atau memiliki jarak genetik yang kecil seperti tampak pada Tabel 5. Padi beras

hitam terdiri atas empat kelompok/subkelompok. Subkelompok 1 terdiri atas satu kultivar padi beras hitam dari Sragen, Jawa Tengah. Subkelompok 2 mengelompokkan empat kultivar dari Jawa Tengah, yaitu jenis padi beras hitam berbulu dari Magelang (R), padi hitam Magelang tidak berbulu (S), padi hitam Wonosobo (W), dan padi hitam Banjarnegara (Y), sedangkan subkelompok 3 mayoritas mengelompokkan kultivar dari Yogyakarta (padi hitam Melik (A), Jlitiheng (B), Pari ireng (D), padi hitam Bantul (O), dan padi hitam NTT (E)). Subkelompok 4 juga mengandung hanya satu padi hitam Cempo Ireng dari Yogyakarta (C).

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat ditarik suatu implikasi bahwa empat penanda SSR RM180,



Gambar 2. Dendrogram hasil pengelompokan tiga belas padi berdasarkan hasil amplifikasi DNA menggunakan empat penanda SSR.

Tabel 5. Matrik kemiripan genetik berdasarkan hasil amplifikasi DNA menggunakan empat penanda SSR.

Similarity matrix													
	A	B	C	D	E	O	R	S	T	W	Y	G	I
A	1,000												
B	0,308	1,000											
C	0,333	0,154	1,000										
D	0,667	0,615	0,167	1,000									
E	0,500	0,308	0,333	0,500	1,000								
O	0,333	0,308	0,333	0,333	0,833	1,000							
R	0,429	0,133	0,286	0,143	0,286	0,143	1,000						
S	0,333	0,154	0,000	0,167	0,333	0,167	0,429	1,000					
T	0,286	0,000	0,143	0,000	0,143	0,143	0,375	0,143	1,000				
W	0,364	0,000	0,182	0,182	0,545	0,364	0,308	0,545	0,308	1,000			
Y	0,333	0,000	0,167	0,167	0,500	0,333	0,429	0,333	0,286	0,727	1,000		
G	0,000	0,154	0,000	0,167	0,167	0,167	0,143	0,000	0,000	0,000	0,333	1,000	
I	0,000	0,143	0,000	0,154	0,154	0,154	0,133	0,000	0,133	0,167	0,462	0,923	1,000

Kelompok padi beras hitam (A = Melik, B = Jlitiheng, C = Cempo Ireng, D = Pari Ireng, E = padi hitam NTT, O = padi hitam Bantul, R = padi hitam Magelang berbulu, S = padi hitam Magelang tak berbulu, T = padi hitam Sragen, W = padi hitam Banjarnegara berbatasan Wonosobo, Y = padi hitam Banjarnegara) dan kelompok padi beras putih (G = padi putih Situbagendit, I = padi putih Inpari 6).

RM220, RM224, dan RM252 diduga terpaut dengan sifat warna beras. Hal ini terbukti dari hasil analisis gerombol yang menunjukkan bahwa terdapat dua kelompok besar, yaitu kelompok padi beras hitam dan kelompok padi beras putih. Empat penanda SSR belum dapat membedakan kultivar padi beras hitam lokal sesuai asal daerah. Namun, analisis filogeni memberikan petunjuk awal adanya kecenderungan pengelompokan kultivar padi beras hitam yang mempunyai kedekatan genetik dari daerah yang berdekatan, seperti kultivar dari Magelang (subkelompok II-2) dan Yogyakarta (subkelompok II-3). Hasil identifikasi molekuler dengan SSR juga secara jelas membuktikan bahwa kultivar padi beras hitam dengan nama yang berlainan di tiap area yang diuji dalam penelitian ini mempunyai sifat genetik yang berlainan dengan level kedekatan yang berbeda-beda. Informasi keragaman genetik subspecies padi pada kromosom spesifik, seperti yang diuji dalam penelitian ini akan sangat bermanfaat untuk program pemuliaan padi (Ni *et al.*, 2002), terutama pemetaan gen dan aplikasi *marker-assisted selection* (MAS). Selanjutnya, evaluasi agromorfologi kultivar padi beras hitam diperlukan untuk mendukung hasil analisis molekuler.

### KESIMPULAN

Hasil analisis gerombol dan analisis koordinat utama menunjukkan bahwa kultivar padi beras hitam secara genetik berbeda dengan padi beras putih. Kultivar-kultivar padi beras hitam sendiri mengelompok sesuai dengan karakter genetiknya yang tersebar di tiga koordinat. Keragaman populasi padi beras hitam lebih tinggi atau lebih beragam secara genetik daripada padi beras putih, dengan nilai keragaman genetik ( $h$ ) populasi padi beras hitam = 0,283 dan nilai  $h$  populasi padi beras putih = 0,020. Persentase lokus polimorfik (populasi padi beras hitam = 92%; populasi padi beras putih = 4%) dapat digunakan untuk menjelaskan keanekaragaman genetik. Pohon filogeni dan nilai jarak genetik menunjukkan bahwa kultivar padi beras hitam dari berbagai daerah di Indonesia yang diuji tidak mempunyai kesamaan genetik. Penanda SSR terpaut sifat warna beras yang netral dan kodominan mempunyai potensi untuk dimanfaatkan sebagai penanda molekuler untuk identifikasi keragaman genetik padi beras hitam sekaligus membantu proses seleksi dalam program pemuliaan padi beras hitam.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Sdr. Tantri Swandari atas bantuan teknis dalam penelitian.

### DAFTAR PUSTAKA

- Cho, Y.G., T. Ishii, S. Temnykh, X. Chen, L. Lipovich, S.R. McCouch, W.D. Park, N. Ayres, and S. Cartinhour. 2000. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100:713-722.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12(1):13-15.
- Hyun, J.W. and H.S. Chung. 2004. Cyanidin and malvidin from *Oryza sativa* cv. Heugjinjubeo mediate cytotoxicity against human monocytic leukemia cells by arrest of G(2)/M phase and induction of apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* 52:2213-2217.
- Jain, S., R.K. Jain, and S.R. McCouch. 2004. Genetic analysis of Indian aromatic and quality rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using panels of fluorescently-labeled microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 109:965-977.
- Kamei, M., T. Kojima, M. Hasegawa, T. Koide, T. Umeda, T. Yukawa, and K. Terabe. 1995. Suppression of tumor cell growth by anthocyanins *in vitro*. *Cancer Invest.* 13:590-594.
- Kovach, W.L. 1989. Comparisons of multivariate analytical techniques for use in pre-Quaternary plant paleoecology. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 60:255-282.
- Kristantini. 2008. Penampilan Cempo Ireng sebagai sumber daya genetik lokal beras hitam. hlm. 117-122. *Dalam* W.A. Yulianto, U. Santosa, A. Setyowati, S. Luwihono, S. Tamaroh, C.L. Suryani, S. Hardjanti, A. Slamet, D.W. Prastuti, A. Wazyka, dan W. Kunetro (eds.) *Prosiding Seminar Nasional Pengembangan Produk Berbasis Sumber Pangan Lokal untuk Mendukung Kedaulatan Pangan*. Program Studi Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Agro-industri, Universitas Mercu Buana, Yogyakarta, bekerja sama dengan Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia (PATPI) Yogyakarta dan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Yogyakarta, 18 Desember 2008.
- Kristantini dan H. Purwaningsih. 2009. Potensi pengembangan beras merah sebagai plasma nutfah Yogyakarta. *J. Litbang Pertanian* 28(3):88-95.
- Lee, J.C., J.D. Kim, F.H. Hsieh, and J.B. Eun. 2008. Production of black rice cake using ground black rice and medium-grain brown rice. *Int. J. Food Sci. Tech.* 43(6):1078-1082.
- McCouch, S.R. dan S.D. Tanksley. 1991. Development and use of restriction fragment length polymorphism in rice breeding and genetics. p. 109-133. *In* G.S. Kushand and G.H. Toenniessen (eds.) *Rice Biotechnology*. CAB International. Wallingford, UK.
- McCouch, S.R., L. Teytelman, Y. Xu, K.B. Lobos, K. Claire, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z. Li, Y. Xing, Q. Zhang, I. Kono, M. Yano, R.F. Jellestrom, G. Declerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware, and L. Stein. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.* 9:199-207.

- Moeljopawiro, S. 2010. Marka mikrosatelit sebagai alternatif uji BUSS dalam perlindungan varietas tanam padi. *Bul. Plasma Nutfah* 16(1):1-7.
- Nam, S., S.P. Choi, M.Y. Kang, H.J.Koh, N. Kozukue, and M. Friedman. 2006. Antioxidative activities of bran extracts from twenty one pigmented rice cultivars. *Food Chem.* 94:613-620.
- Nei, M. and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:5269-5273.
- Ni, J., P.M. Colowit, and D.J. Mackill. 2002. Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers. *Crop Sci.* 42:601-607.
- Nunome, T., K. Suwabe, H. Iketani, M. Hirai, and G. Wricke. 2003. Identification and characterization of microsatellites in eggplant. *Plant Breed.* 122(3):256-262.
- 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):192-201.
- Pabendon, M.B., M. Azrai, F. Kasim, dan M.J. Mejaya. 2011. Prospek penggunaan marka molekuler dalam program pemuliaan jagung. <http://pustaka.litbang.deptan.go.id/bppi/lengkap/bpp10236.pdf>. [21 Desember 2011].
- Patel, S., R. Ravikiran, S. Chakraborty, S. Macwana, N. Sasidharan, R. Trivedi, and B. Aher. 2014. Genetic diversity analysis of colored and white rice genotypes using microsatellite (SSR) and insertion-deletion (INDEL) markers. *EJFA* 26:497-507.
- Peakall, R. and P.E. Smouse. 2006. Gen ALE 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6(1):288-295.
- Philpott, M., K.S. Gould, C. Lim, and L.R. Ferguson. 2004. *In situ* and *in vitro* antioxidant activity of sweet potato anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 52(6):1511-1513.
- Powell, W., G.C. Machray, and J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1:215-222.
- Ryu, S.N., S.Z. Park, and C.T. Ho. 1998. High performances liquid chromatographic determination of anthocyanin pigments in some varieties of black rice. *J. Food Drug Anal.* 6:1710-1715.
- Satue-Gracia, M., I.M. Heinonen, and E.N. Frankel. 1997. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome system. *J. Agric. Food Chem.* 45:3362-3367.
- Smith, J.S.C., S. Kresovich, M.S. Hopkins, S.E. Mitchell, R.E. Dean, W.L. Woodman, M. Lee, and K. Porter. 2000. Genetic diversity among elite sorghumbred lines assessed with simple sequence repeats. *Crop Sci.* 40:226-232.
- Solouki, M., H. Mehdikhani, H. Zeinali, and A.A. Emamjomeh. 2008. Study of genetic diversity in chamomile (*Matricaria chamomilla*) based on morphological traits and molecular markers. *Sci. Hortic.* 117:281-287.
- Susanto, U., Sutrisno, dan H. Aswidinnoor. 2009. Pemanfaatan teknik markah molekuler untuk perbaikan varietas padi. <http://bbpadi.litbang.deptan.go.id/library/content/file/102/0000/0000/0000/ee279a28ebdf7421c1fba2622e9582315452-28-05-2013-08-11-47.pdf>. [8 Mei 2012].
- Suzuki, M., T. Kimura, K. Yamagishi, H. Shinmoto, and K. Yamaki. 2004. Comparison of mineral contents in 8 cultivars of pigmented brown rice. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 51:424-427.
- Takashi, I., X. Bing, Y. Yoichi, N. Masaharu, and K. Tetsuya. 2001. Antioxidant activity of anthocyanin extract from purple black rice. *J. Med. Food.* 4:211-218.
- Tsuda, T., F. Horio, and T. Osawa. 2002. Cyanidin 3-O-beta-D-glucoside suppresses nitric oxide production during a zymosan treatment in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 48(4):305-310.
- Tsuda, T., F. Horio, K. Uchida, H. Aoki, and T. Osawa. 2003. Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *J. Nutr.* 133(7):2125-2130.
- Utami, D.W., Kristantini, dan Prajitno. 2009. Karakterisasi plasma nutfah padi beras merah lokal asal provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta berdasarkan karakter morfo-agronomi dan marka SSRs. *Zuriat* 20(1):10-18.
- Vigouroux, Y., J.S. Jaqueth, Y. Matsuoka, O.S. Smith, W.D. Beavis, J.S.C. Smith, and J. Doebley. 2002. Rate and pattern of mutation at microsatellite loci in maize. *Mol. Biol. Evol.* 19(8):1251-1260.
- Vosman, B., D. Esselink, and R. Smulders. 2001. Microsatellite markers for identification and registration of rose varieties. [http://www.upov.org/edocs/mdocs/upov/en/bmt\\_two\\_rose\\_1/bmt\\_two\\_rose\\_1\\_1.pdf](http://www.upov.org/edocs/mdocs/upov/en/bmt_two_rose_1/bmt_two_rose_1_1.pdf). [8 Mei 2012].
- Wang, C. and Q.Y. Shu. 2007. Fine mapping and candidate gene analysis of purple pericarp gene *Pb* in rice (*Oryza sativa* L.). *Chin. Sci. Bull.* 52(22):3097-3104.
- Weir, B.S. 1990. *Genetic Data Analysis: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA. p. 222-260.
- Yu, S.B., W.J. Xu, C.H. Vijayakumar, J. Ali, B.Y. Fu, J.L. Xu, Y.Z. Jiang, R. Maghirang, J. Domingo, C. Aquino, S.S. Virmani, and Z.K. Li. 2003. Molecular diversity and multilocus organization of the parental lines used in the International Rice Molecular Breeding Program. *Theor. Appl. Genet.* 108(1):131-140.
- Zawko, G. 2003. Protein and DNA methods for variety identification. *Agribusiness Crop Updates* 2003. [http://archive.agric.wa.gov.au/objtwr/imported\\_assets/content/fcp/cer/cropupdates2003\\_cereals.pdf](http://archive.agric.wa.gov.au/objtwr/imported_assets/content/fcp/cer/cropupdates2003_cereals.pdf). [8 Mei 2012].