

**TINGKAT POLIMORFISME BEBERAPA MARKER SSR
(SIMPLE SEQUEN REPEAT) UNTUK IDENTIFIKASI SIDIK JARI DNA
PLASMA NUTFAH PADI**

Wage R. Rohaeni, Indria W. Mulsanti, A. Hidayatullah dan Satoto

Balai Besar Penelitian Padi, Jl. 9 Sukamandi-Subang
e-mail: wagebbpadi@gmail.com

ABSTRAK

Marker SSR (Simple Sequent Repeat) merupakan salah satu marker molekuler yang memiliki keunggulan hasil akurat, marker kodominan, repeatable, dan relatif murah. Teknologi ini telah berkembang, tervalidasi dan praktis diterapkan dalam kegiatan-kegiatan identifikasi plasma nutfah, analisis kekerabatan dan jarak genetik serta seleksi materi pemuliaan. Informasi tingkat polimorfik marker SSR penting diketahui untuk menentukan marker-marker yang efektif digunakan untuk identifikasi sidik jari DNA. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui PIC (polymorphism information content) dari marker-marker SSR terkait sifat tertentu yang diaplikasikan pada beberapa plasma nutfah koleksi BB Padi. Penelitian dilaksanakan pada April – Juni 2015 di Laboratorium DNA, Kelompok Peneliti Pemuliaan dan Plasma Nutfah, Balai Besar Tanaman Padi. Sebanyak 13 marker SSR terkait sifat tertentu diaplikasikan terhadap 35 plasma nutfah yang terdiri dari padi lokal dan padi introduksi. Analisis PIC dilakukan terhadap hasil visualisasi pita DNA dengan menggunakan bantuan software power marker. Penelitian menunjukkan 11 marker SSR bersifat polimorfik dan dua marker bersifat monomorfik. Marker RM8213 memiliki nilai PIC tertinggi (0.676) dibandingkan 12 marker lainnya. Marker RM443 dan RM4608 adalah marker SSR yang tidak dapat menghasilkan pita DNA (nilai PIC 0.00) pada semua sampel DNA plasma nutfah yang diujikan.

Kata kunci: marker SSR, PIC, plasma nutfah, padi

ABSTRACT

SSR markers (Simple Sequent Repeat) is one of the molecular marker that has the advantage of accurate results, markers codominant, repeatable, and relatively inexpensive. This technology has developed, validated and applied in practical activities germplasm identification, kinship analysis and genetic distance as well as the selection of breeding materials. Level information polymorphic SSR markers is important to know to determine markers are effectively used for the identification of DNA fingerprinting. This study aims was to determine the PIC (polymorphism information content) of the SSR markers related to specific traits applied to some germplasm collections. The experiment was conducted in April-June 2015 DNA Laboratory, ICRR. A total of 13 SSR markers related to

specific properties was applied to 35 germplasm consisting of local rice and paddy introduction. PIC analysis conducted on visualization of DNA bands with the help of software power marker. The study saw that 11 polymorphic SSR marker and two marker is monomorphic. Markers RM8213 was the highest PIC value (0.676) compared to 12 other marker. Marker RM443 and RM4608 are SSR markers that can not produce DNA (PIC value of 0:00) in all DNA samples tested germplasm.

Keywords: *SSR marker, PIC, germplasm, rice*

PENDAHULUAN

Tingkat polimorfisme marker DNA adalah daya produksi pita DNA dari hasil reaksi PCR dengan menggunakan marker/primer tertentu. Tingkat polimorfisme dipengaruhi oleh ragam genotipe yang digunakan (Sobrizal, 2007; Tasma *et al.*, 2013) dan sangat tergantung bagaimana primer mengenal urutan DNA komplementernya pada cetakan DNA (*DNA template*) yang digunakan (Tingey *et al.*, 1994). Marker yang digunakan untuk reaksi PCR dan hasil elektroforesisnya menunjukkan pola pita yang sama antar setiap sampel DNA dari genetik yang berbeda merupakan marker monomorfik sedangkan apabila hasil elektroforesis menunjukkan pola pita berbeda antar setiap sampel DNA adalah marker polimorfik.

Tingkat polimorfisme marker DNA dapat dinilai dengan melihat nilai PIC (*polymorphism information DNA*). Nilai PIC adalah nilai daya produksi pita DNA yang dihasilkan dari reaksi PCR dengan menggunakan primer tertentu. Nilai PIC 0.00 artinya marker yang digunakan dalam reaksi PCR menghasilkan pola pita yang sama pada semua DNA sampel yang artinya bersifat monomorfik. Marker yang memiliki nilai PIC > 0.00 disebut marker polimorfik. Semakin tinggi nilai PIC artinya pola-pola pita DNA yang dihasilkan semakin informatif. Nilai PIC > 0.50 adalah nilai yang diharapkan untuk identifikasi sidik jari DNA (Botstein *et al.*, 1980). Kuantifikasi PIC adalah jumlah alel yang dapat dihasilkan oleh suatu marker dan frekuensi dari tiap alel dalam set genotipe yang diuji. Nilai polimorfisme ditentukan oleh frekuensi kemunculan alel (DeVicente and Fulton 2003).

Ribuan marker SSR yang tersebar rapat diseluruh bagian genom tanaman padi telah diteliti dan divalidasi (Temnykh *et al.*, 2000; McCouch *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2007). Namun demikian, tidak semua dari marker yang ada dan sudah divalidasi dapat digunakan. Seperti halnya hasil pemilihan marker pada penelitian Mulsanti *et al.* (2013) yang menunjukkan bahwa dari 16 marker SSR yang digunakan, hanya 7 yang dapat menghasilkan pita polimorfis.

Analisis nilai PIC marker DNA merupakan salah satu rangkaian kegiatan dalam identifikasi sidik jari plasma nutfah. Analisis ini berfungsi untuk menentukan marker-marker yang *available* untuk digunakan dalam analisis tingkat keragaman/jarak genetik/clustering antar genotipe-genotipe padi yang digunakan. Tingkat polimorfisme marker DNA dapat diketahui dengan melihat nilai PIC.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat polimorfisme pita DNA berdasarkan nilai PIC (*Polymorphism Information Content*) yang dihasilkan oleh marker-marker yang digunakan pada kegiatan sidik jari DNA plasma nutfah padi.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada April – Juni 2015 di Laboratorium DNA, Kelompok Peneliti Pemuliaan dan Plasma Nutfah, Balai Besar Tanaman Padi. Sampel DNA yang digunakan sebanyak 35 sampel DNA dari galur plasma nutfah yang terdiri dari padi lokal dan padi introduksi. Marker SSR yang diaplikasikan dan diteliti tingkat polimorfismenya sebanyak 13 marker yang terkait dengan sifat-sifat tertentu (Tabel 1)

Tabel 1. Daftar marker SSR

No	Marker SSR	Chr	Karakter Terpaut	T _m (°C)	Kisaran basa (bp)
1	RM259	1	Jumlah Malai	55	
2	RM1287	1	<i>QTL Saltol</i>	55	162
3	RM315	1	<i>Gen Rf3</i>	55	133
4	RM443	1	<i>Gen Rf3</i>	55	124
5	RM250	2	Bph13	55	153
6	RM266	2	Seed set	55	127
7	RM282	3	<i>Grain/pan</i>	55	136
8	RM5444	3	Hd 8	60	225
9	RM6308	3	Bph19	60	176
10	RM1022	3	<i>Bph18</i>	60	169
11	RM261	4	<i>Bph12</i>	55	125
12	RM241	4	<i>Plant height</i>	55	138
13	RM8213	4	<i>Bph17</i>	55	177

Isolasi DNA dilakukan terhadap sampel daun plasma nutfah yang dikoleksi dari lapang. Ekstraksi dan isolasi DNA dari sampel daun padi menggunakan metode CTAB (Murray and Thompson, 1980). Sampel daun plasma nutfah padi diambil sebanyak ± 5 gram dari pertanaman bibit umur 21 HSS.

Selanjutnya, hasil isolasi DNA diuji kualitas dan kuantitas menggunakan spektrofotometer nanodrops. Konsentrasi sampel DNA hasil isolasi harus > 50 ul agar memenuhi standar untuk reaksi PCR. Reaksi PCR dilakukan terhadap sampel-sampel DNA dengan menggunakan 13 marker dengan suhu *time melting* sesuai petunjuk teknis dari label masing-masing marker. Pada setiap reaksi PCR digunakan 3 μ l DNA dari hasil pengenceran yang ditambahkan 2 μ l buffer PCR (10 x), 2,4 μ l MgCl₂ (25 mM), 0,4 μ l dNTPs mix (10 mM), 0,2 μ l primer R (10 pmol), 0,2 μ l primer F (10 pmol), 0,2 μ l TaqDNA polymerase (5 μ /ul) dan 10,4 μ l ddH₂O.

Runing elektroforesis hasil PCR dilakukan dengan menggunakan gel poly acrylamide 0.8%. Produk PCR di *runing* dengan menggunakan alat elektroforesis vertikal dan buffer TBE dengan tegangan 100 volt selama 60 menit. Visualisasi hasil elektroforesis dilakukan dengan menggunakan mesin *Gel Doc* dengan metode visualisasi *Ethidium Bromide*. Pola-pola pita yang terbentuk kemudian diskoring secara manual di media Ms. Excel. Skor 1 menandakan adanya pita dan 0 menandakan tidak ada pita. Hasil skoring kemudian dianalisis nilai PIC dengan menggunakan *software Power Marker* versi 3.23 (Liu dan Muse, 2005) untuk mengetahui tingkat polimorfisme pola pita yang terbentuk.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis nilai PIC menunjukkan 11 marker SSR bersifat polimorfik dan 2 bersifat monomorfik. Nilai rata-rata PIC dari 13 marker SSR yang digunakan adalah 0.3294. dengan nilai tertinggi 0.6764 dan terendah 0.000 (Tabel 2).

Marker RM443 dan RM4608 adalah marker yang memiliki nilai PIC paling rendah yaitu dengan nilai 0.000. Hal ini dapat disebabkan oleh dua kemungkinan, yaitu (1) tidak terbentuknya pita DNA akibat urutan basa marker yang tidak dapat mengenali urutan DNA komplementernya pada cetakan DNA (*DNA template*) dari masing-masing galur plasma nutfah yang digunakan, atau (2) hasil produk PCR menunjukkan pola pita yang sama pada semua DNA plasma nutfah yang digunakan. Berdasarkan hasil penelitian Susanto *et al.* (2014), RM4608 menghasilkan nilai PIC yang sama dengan penelitian ini yaitu 0.000. Hal ini menunjukkan bahwa marker SSR RM4608 diduga merupakan marker monomorfik. Namun beda halnya dengan RM443, dimana pada penelitian ini bersifat monomorfik, sedangkan pada penelitian Susanto *et al.* (2014) dengan suhu *annealing* yang sama yaitu 55 °C adalah bersifat polimorfik. Hal tersebut diduga bahwa pemakaian RM443 memerlukan optimasi suhu *annealing* khusus pada proses reaksi PCR.

Hasil menunjukkan bahwa RM8213 adalah marker yang memiliki nilai PIC paling tinggi yaitu 0.6764. Berdasarkan Botstein *et al.* (1980) nilai PIC yang tergolong baik dan informatif untuk kegiatan sidik jari DNA adalah $PIC > 0.5$. Menurut Tasma *et al.*, (2001) dan Tasma *et al.*, (2011), nilai $PIC > 0.50$ menunjukkan tingkat polimorfisme yang tinggi. Berdasarkan hal tersebut, artinya, marker RM8213 adalah marker SSR paling available dan memiliki kemampuan membedakan antar karakter (*gen diversity*) paling baik dibanding lainnya. RM8213 menghasilkan *gen diversity* sebesar 0.718 dan paling tinggi dibandingkan marker lainnya. Berdasarkan hasil penelitian Sun *et al.* (2005), marker RM8213 adalah marker SSR yang terkait erat *gen* resistensi terhadap hama wereng batang coklat (bph17) dan terletak pada kromosom no.4.

Nilai PIC menjadi penting untuk diteliti. Zulfahmi (2013) menyatakan terdapat beberapa permasalahan dalam menggunakan penanda mikrosatelit/ SSR. Permasalahan ini dapat dikelompokkan ke dalam problem praktek dan problem data. Problem praktek tersebut diantaranya: a) Pemilihan primer untuk

mikrosatelit, banyak jenis primer yang telah didisain untuk analisis mikrosatelit pada tanaman. Primer-primer itu perlu di-screening dan dioptimasi sebelum diaplikasikan pada jenis tanaman tertentu, karena setiap tanaman mempunyai karakteristik spesifik yang berbeda satu sama lain. b) Slippage selama proses amplifikasi, termopolimerase dapat slip sehingga menghasilkan produk yang berbeda dalam ukurannya. Istilah slip disini maksudnya proses penempelan deretan basa ada kemungkinan meleset terhadap template DNA. c) Ukuran produk amplifikasi berbeda dari ukuran produk sebenarnya. Ukuran produk amplifikasinya inilah kemungkinan paling dipengaruhi oleh kualitas marker dengan melihat nilai PICnya.

Tabel 2. Karakter terpaut, jumlah alel, availability, gene diversity, dan nilai PIC pada 13 marker SSR

No.	Marker	Karakter Terpaut	Jumlah alel	Availability	GeneDiversity	PIC
1	RM315	Jumlah Malai	2	0.6667	0.4911	0.3705
2	RM443	<i>QTL Saltol</i>	1	0.4222	0.0000	0.0000
3	RM250	<i>Gen Rf3</i>	3	0.9333	0.2846	0.2554
4	RM266	<i>Gen Rf3</i>	3	0.6000	0.2030	0.1922
5	RM282	Bph13	2	0.9556	0.4867	0.3683
6	RM5444	Seed set	2	0.9556	0.2726	0.2354
7	RM6308	<i>Grain/pan</i>	5	0.9111	0.5033	0.4744
8	RM261	Hd 8	3	0.9333	0.4206	0.3500
9	RM241	Bph19	5	0.9778	0.5517	0.4964
10	RM8213	<i>Bph18</i>	5	0.9778	0.7180	0.6764
11	RM510	<i>Bph12</i>	3	0.9333	0.5408	0.4529
12	RM190	<i>Plant height</i>	3	0.8222	0.4879	0.4106
13	RM4608	<i>Bph17</i>	1	0.8889	0.0000	0.0000
	Mean		3 (1-5)	0.8444	0.3816	0.3294

Provan dan Hollingsworth (2001) menyatakan bahwa homoplasi merupakan factor pembatas metode SSR. Homopasi ini adalah alel yang berada pada posisi sama (missal genotype A dan B) namun tidak sama secara keturunan. Homoplasi ini yang diduga menghasilkan perubahan nilai PIC dan menurut Estoup et al., (2002) ini dapat mempengaruhi perubahan hasil analisa filogenetik. Namun demikian, sebelumnya Ginot et al. (1996) menyatakan permasalahan ini dapat diminimalisir dengan menambah polimerase pfu selama atau setelah proses PCR, atau dengan menggunakan polimerase DNA T4 setelah PCR.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menyimpulkan bahwa 11 marker SSR bersifat polimorfik dan dua marker bersifat monomorfik. Marker RM8213 adalah marker paling informatif dengan nilai PIC tertinggi (0.676) dibandingkan 12 marker lainnya. Marker RM443 dan RM4608 adalah marker SSR yang bersifat monomorfik (nilai PIC 0.00) pada semua sampel DNA plasma nutfah yang diujikan.

DAFTAR PUSTAKA

- 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.
- 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.
- Estoup, A., P. Jarne, and J.M. Cornent. 2002. Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetic analysis. *Molecular Ecology*, 11: 1591-1604.
- Ginot, F., I. Bordelais, S. Nguyen, and G. Gyapay. 1996. Correction of some genotyping errors in automated fluorescent microsatellite analysis by enzymatic removal of obse base overhangs. *Nucleic Acids Research*, 24(3): 540-541.
- Liu, K. and S.V. Muse 2005. PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21(9):2128-2129.
- Mulsanti, I.W., M. Surahman, S. Wahyuni, D. W. Utami. 2013. J. Penelitian Pertanian Tanaman Pangan Vol. 32 No. 1 : 1-8.
- Provan, J., W. Powell, and P.M. Hollingsworth. 2001. Chloroplast microsatellites : new tools for studies in plant ecology and evolution. *TREE.* 16 (3): 142 - 147.
- Smith J.S.C., E.C.L. Chin, H. Shu, O.S. Smith, S.J. Wall, M.L. Senior, S.E. Mitchell, 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. *Theoretical Applied Genetics.* 95: 163-173.
- Sobrizal. 2007. Mutasi pada beberapa kandidat galur mutan pemulih kesuburan tanaman padi. *Bul. Agron.* (35) (2) 75 – 80.
- Sun, L. C. SU, C. Wang, H. Zhai, J. Wan. 2005. Mapping a major resistance gene to the Brown Planthopper in rice cultivar Rathu Heenati. *Breeding Science*, 55: 391-396.

- Susanto, U., Satoto, N.A. Rohmah, M.J. Mejaya. 2014. Similarity of 26 new released rice varieties and rice parental hybrids based on 36 SSR markers. *J. Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*, Vol. 33 No. 2 : 71-76.
- Tingey, S.V., J.A. Rafalski, and M.K. Hanafey. 1994. Genetic analysis with RAPD markers. In: Coruzzi, C. and P. Puidormenech (eds.). *Plant Molecular Biology*. Berlin: Springer-Verlag.
- Tasma, I.M., L.L. Lorenzen, D.E. Green, R.C. Shoemaker. 2001. Mapping genetic loci for flowering time, maturity, and photoperiod insensitivity in soybean. *J. Molecular Breeding*. 8: 25-35.
- Tasma, I.M., D. Satyawan, A. Warsun, M. Yunus, B. Santosa. 2011. Phylogenetic and maturity analysis of sixty soybean genotypes used for DNA marker development of early maturity quantitative trait loci in soybean. *J. Agro Biogen*. 7(1): 37-46.
- Tasma, I.M., S. Arumsari. 2013. Analisis diversitas genetik aksesi kelapa sawit Kamerun berdasarkan marka SSR. *Jurnal Littri* 19(4): 194-202.
- Zulfahmi. 2013. Penanda DNA untuk analisis genetik tanaman. *Jurnal Agroteknologi*. Vol. 3 No. 2: 41-52.