

## Deteksi Jenis Padi *Indica* dan *Japonica* Padi Gogo Rancah Beras Merah Varietas Slegreng dan Mandel Berbasis Fragmen ORF100 dan ORF29

Wahyu Dewi U. Haryanti<sup>1</sup>, Hermin P. Kusumaningrum<sup>2</sup>, Anto Budiharjo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Magister Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro  
Kampus Tembalang, Semarang 50275, Jawa Tengah, Indonesia.

<sup>2</sup> Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro  
Kampus Tembalang, Semarang 50275, Jawa Tengah, Indonesia.

---

### ABSTRAK

Deteksi fragmen *Open Reading Frame* (ORF)100 dan ORF29 telah dilakukan pada dua jenis padi gogo rancah beras merah yaitu varietas Slegreng dan Mandel. Metode penelitian dilakukan dengan cara isolasi DNA kloroplas padi diikuti dengan amplifikasi PCR menggunakan optimasi suhu *annealing* pada tiga suhu yang berbeda, yaitu 53°C, 55°C, dan 56°C. Selanjutnya hasil amplifikasi divisualisasikan menggunakan elektroforesis pada gel agarose 1%. Suhu *annealing* 53°C merupakan suhu yang optimal untuk memperlihatkan fragmen ORF100 dan ORF29. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fragmen ORF100 dan ORF29 dapat teramplifikasi pada padi Slegreng dan mandel, sehingga kedua jenis padi tersebut menunjukkan kecenderungan subspecies *japonica*. Perbedaan ketebalan dan ukuran pita tidak mempengaruhi keberadaan fragmen ORF100 dan ORF29 sebagai penanda untuk mengidentifikasi tipe *indica* atau *japonica*. Pemanfaatan marka molekuler fragmen ORF100 dan ORF29 dalam mendeteksi jenis padi diharapkan dapat melengkapi hasil karakterisasi dan pengelompokan varietas padi berdasar karakter morfologi dan fisiologi.

*Keywords: chloroplast DNA, ORF100, ORF29, indica-japonica differentiation*

### PENDAHULUAN

Padi merupakan tanaman pertanian yang paling dominan di Indonesia, dan beras mencukupi sekitar 60% dari sumber karbohidrat yang dikonsumsi masyarakat. Padi memiliki 25 spesies *Oryza*, dan yang dikenal adalah *Oryza sativa* dengan dua subspecies utama, yaitu *japonica* (padi bulu) yang ditanam di daerah subtropis dan *indica* (padi cere) yang banyak ditanam di Indonesia (Purwono dan Purnamawati, 2009). Setiap varietas padi bisa memiliki persamaan atau karakter, dan dapat digunakan sebagai dasar pengelompokan. Banyaknya varietas atau kultivar padi mengakibatkan permasalahan kesulitan dalam membedakan, sehingga diperlukan suatu pengelompokan varietas tersebut. Pengelompokan subspecies padi biasanya dilakukan pendekatan fenetik berdasarkan karakter morfologi, anatomi (Irawan dan Purbayanti, 2008), (Utami dkk., 2009), sitologi dan isoenzim (Li *et al.*<sup>2</sup>, 2012). Karakterisasi plasma nutfah selain didasarkan atas penampilan

fenotip morfologi tanaman juga dengan menggunakan marka molekuler (Daradjat dkk., 2010).

Variasi teknik molekuler beragam tergantung cara pelaksanaan dan target data yang diharapkan. Keragaman dan filogeni padi telah diteliti menggunakan DNA kloroplas dan DNA mitokondria. Beberapa teknik yang digunakan seperti *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Amplification Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), mikrosatelit dan *single strand conformation polymorphism* (SSCP) (Chuayjaeng and Volkaert, 2006), tetapi tidak dapat mengelompokkan padi subspecies *indica* atau *japonica*.

Karakterisasi genom kloroplas merupakan salah satu cara membedakan jenis padi. Salah satunya adalah karakterisasi keragaman genetik genom kloroplas padi dengan marka genetik fragmen ORF100 dan ORF29 (Li *et al.*<sup>2</sup>, 2012). Fragmen *Open reading frame* (ORF) 100 dan ORF29 banyak digunakan pada analisis keragaman

genetik DNA kloroplas padi, dan merupakan marka yang efisien untuk mengelompokkan padi ke dalam tipe *indica* atau *japonica* (Li *et al.*<sup>1</sup>, 2012). Variasi pada DNA kloroplas (cpDNA) padi dapat membandingkan dan melengkapi hasil pengamatan secara morfologi dan sitologi padi (Matsuoka *et al.*, 2002).

Identifikasi dan karakterisasi keragaman genetik pada padi penting dilakukan karena merupakan langkah awal dalam program pemuliaan (Nasir, 2001). Pelestarian sumberdaya genetik pertanian juga berperan dalam usaha konservasi mencegah kepunahan dan hilangnya sumberdaya genetik karena diambil oleh negara lain (Kristantini dan Prajitno, 2009).

Penelitian ini bertujuan melakukan deteksi jenis padi *indica* atau *japonica* pada padi gogo beras merah varietas Slegreng dan Mandel dengan marka molekuler berbasis marka kloroplas fragmen ORF100 dan ORF29.

**BAHAN DAN METODE**

**Sampel tanaman**

Materi genetik yang digunakan adalah sampel daun tanaman muda padi varietas Slegreng dan Mandel. Satu pembanding digunakan sebagai kontrol yaitu kultivar Mentik Wangi. Benih tanaman diperoleh dari kebun percobaan Balai Pengkajian Teknologi Pertanian (BPTP) Jawa Tengah. Benih ditumbuhkan di kebun percobaan BPTP Jawa Tengah.

**Isolasi DNA kloroplas**

Isolasi DNA kloroplas dilakukan dari daun tanaman padi yang berumur sekitar dua minggu. Metode untuk isolasi DNA kloroplas padi mengikuti metode Dellaporta *et al.*, (1983). Sampel daun muda segar ditimbang seberat 0,25 g kemudian digerus di atas es. Sampel daun yang telah lumat dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi kemudian ditambah buffer ekstraksi CTAB dan diinkubasi 65°C selama 60 menit. Sampel kemudian ditambahkan kloroform selanjutnya dilakukan sentrifugasi 10.000 rpm selama 5 menit sehingga terbentuk dua fase. Supernatan diambil kemudian ditambahkan buffer CATB/NaCl, dikocok perlahan dan ditambahkan kloroform, selanjutnya disentrifugasi 10.000 rpm selama 5 menit.

Supernatan diambil untuk ditambahkan buffer presipitasi CTAB, kemudian inkubasi 65°C

selama 30 menit. Sampel disentrifugasi 10.000 rpm selama 5 menit, jika muncul endapan supernatan dibuang dan pelet ditambahkan buffer *High salt-TE* dan kembali diinkubasi pada 65°C selama 30 menit. Sampel selanjutnya ditambah etanol absolut dan disentrifugasi 10.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet ditambahkan etanol 80%, kembali disentrifugasi 10.000 rpm selama 5 menit. Etanol dibuang kemudian dikeringanginkan *overnight*. Sampel DNA selanjutnya disimpan di dalam kulkas dalam buffer TE, dan dapat digunakan untuk amplifikasi.

**Analisis suhu amplifikasi**

Amplifikasi DNA kloroplas dengan primer cp1 dan cp2 (Li *et al.*<sup>1</sup>, 2012) dilakukan pada tiga suhu yang berbeda, yaitu 56°C, 55°C, dan 53°C. Suhu yang berbeda untuk optimasi dipilih berdasarkan hasil analisis primer cp1 dan cp2 berdasarkan program FASTPCR6.3

**Tabel 1.** Hasil analisis primer cp1 dan cp2 dengan program FASTPCR6.3

Primer cp1		Primer cp2	
<i>Tm</i>	<i>Tm</i>	<i>Tm</i>	<i>Tm</i>
<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
54,5°C,	55,4°C	58,6°C	54,9°C
55,7°C	54,9°C	57,8°C	54,9°C
51,1°C	49,5°C	51,9°C	-
CG: 52,6%	CG: 58,8%	CG: 64,7%	CG: 58,8%

**Amplifikasi PCR dan elektroforesis gel agarosa**

DNA kloroplas yang diperoleh digunakan untuk amplifikasi PCR dengan Primer cp1 (5'-GTG GAC CTG ACT CCT TGA A-3' dan 5'-AGC CGA GGT CGT GGT AA-3') yang akan mengamplifikasi DNA kloroplas pada fragmen ORF100, dan primer cp2 (5'-GCA GCC CAA GCG AGA CT-3' dan 5' AAG GCT CGG CGA TAC TG-3') akan mengamplifikasi DNA kloroplas pada fragmen ORF100 (Li *et al.*<sup>1</sup>, 2012).

Program PCR yang digunakan adalah denaturasi awal pada 95°C selama 3 menit, dilanjutkan dengan 30 kali siklus berulang yang terdiri dari 30 detik pada suhu 95°C untuk proses denaturasi,

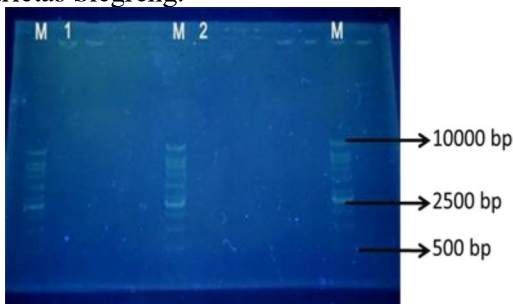
suhu 56°C, 55°C dan 53°C selama 30 detik untuk proses *annealing*, dan suhu 72°C selama 50 detik untuk proses ekstensi primer. Tahap ekstensi akhir dilakukan pada suhu 72°C selama 10 menit, dan kondisi *hold* pada suhu 4°C.

Produk PCR kemudian di *running* menggunakan elektroforesis horisontal dengan gel agarosa 1% yang ditambah 4µL Goodview dalam buffer TAE 0,5X. Hasil elektroforesis kemudian diamati dengan lampu ultraviolet dan didokumentasikan.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

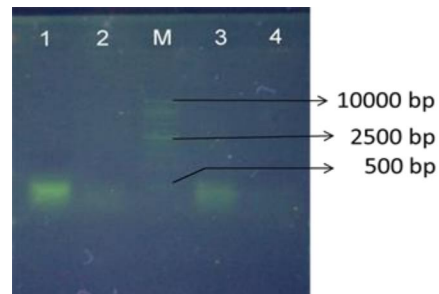
Optimasi suhu *annealing* dilakukan pada tiga suhu yang berbeda, yaitu 56°C, 55°C, dan 53°C. Pemilihan suhu 56°C berdasarkan program *Fast PCR 6.3*. Hasil optimasi dengan suhu *annealing* 56°C (Gambar 1.) tidak menghasilkan produk amplifikasi DNA kloroplas yang spesifik. Suhu *annealing* 56°C terlalu tinggi, sehingga primer cp1 tidak dapat menempel pada DNA template baik padi Slegreng maupun Mandel. Suhu *annealing* yang terlalu tinggi menyebabkan primer tidak dapat menempel pada DNA template sehingga produk yang diharapkan akan berkurang, bahkan tidak teramplifikasi.

Hasil amplifikasi DNA kloroplas dengan suhu *annealing* 55°C berupa pita tebal dan tipis. Pita DNA padi kultivar Mentik wangi terlihat lebih tebal dibandingkan padi varietas Segreng (Gambar 2.). Suhu *annealing* 55°C belum optimal untuk mengamplifikasi DNA kloroplas padi kultivar Mentik wangi karena hanya memunculkan pita tipis, sedangkan pada varietas Segreng suhu 55°C terlalu tinggi menyebabkan primer kurang dapat menempel pada template dan memunculkan pita sangat tipis. Hal ini berarti primer cp1 mengamplifikasi urutan DNA target Mentik Wangi lebih banyak dibanding varietas Slegreng.



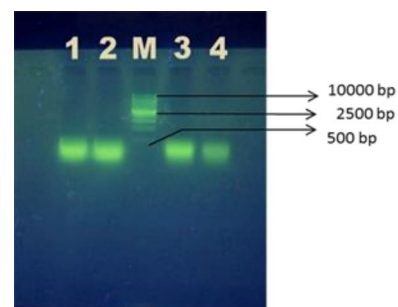
**Gambar 1.** Hasil elektroforesis gel agarosa fragmen ORF100 padi Slegreng dan Mentik

Wangi pada suhu *annealing* 56°C; M: marker, 1: Mentik Wangi, 2: Slegreng



**Gambar 2.** Hasil elektroforesis gel agarosa pada fragmen ORF100 dan ORF29 padi Slegreng dan Mentik Wangi pada suhu *annealing* 55°C; M: marker, 1: ORF100 Mentik Wangi, 2: ORF100 Slegreng, 3: ORF29 Mentik Wangi, 4: ORF29 Slegreng.

Hasil visualisasi gel agarosa padi varietas Segreng dan kultivar Mentik wangi pada suhu *annealing* 53°C memberikan gambaran pita secara jelas (Gambar 3.). Suhu *annealing* 53°C merupakan suhu optimal reaksi amplifikasi primer cp1, karena pita DNA kloroplas padi terlihat paling tebal dibandingkan reaksi PCR dengan suhu *annealing* yang lain. Hal ini diketahui bahwa amplifikasi DNA bekerja optimum sehingga dihasilkan produk amplifikasi dengan spesifitas tinggi.

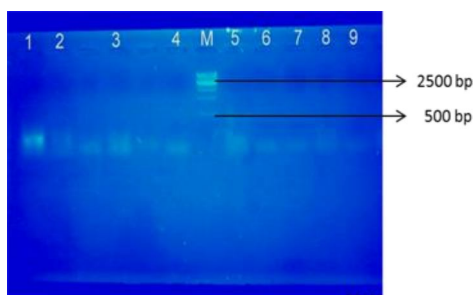


**Gambar 3.** Hasil elektroforesis gel agarosa pada fragmen ORF100 dan ORF29 padi Slegreng dan Mentik Wangi pada suhu *annealing* 53°C; M: marker, 1: ORF100 Mentik Wangi, 2: ORF100 Slegreng, 3: ORF29 Mentik Wangi, 4: ORF29 Slegreng.

Pemilihan suhu ideal untuk primer cp1 terkait dengan panjang dan urutan G-C. Primer dengan *Tm* lebih tinggi dari 50°C dan kandungan G-C 40 sampai 60% pada umumnya dapat

mengamplifikasi lebih spesifik dan efisien (Grunenwald, 2003). Persyaratan tersebut dipenuhi oleh primer cp1, karena cp1 forward memiliki kandungan G-C sebanyak 52,6% dan cp1 reverse sebanyak 58,8%, sehingga cp1 dapat mengamplifikasi fragmen ORF100 pada suhu annealing 53°C dan suhu ekstensi 72°C pada varietas Slegreng, Mandel dan kultivar Mentik Wangi (Gambar 4.).

Hasil elektroforesis menunjukkan munculnya fragmen ORF100 pada Slegreng dari beberapa daerah, varietas Mandel, maupun pada kontrol kultivar Mentik Wangi. Perbedaan ketebalan dan ukuran pita tidak mempengaruhi keberadaan fragmen ORF100 dan ORF29 sebagai molekul penanda yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi tipe *indica* atau *japonica*.



**Gambar 4.** Hasil elektroforesis gel agarosa pada fragmen ORF100 padi Slegreng, Mandel dan Mentik Wangi pada suhu annealing 53°C; M: marker, 1: Mentik Wangi, 2: Slegreng Karanganyar, 3: Mentik Wangi, 4: Slegreng Boyolali, 5: Mentik Wangi, 6: Slegreng Banjar

Sun *et al.*, (1997) membedakan tipe *indica* dan *japonica* dengan melihat keberadaan fragmen ORF100. Adanya fragmen ORF100 maka padi dikelompokkan tipe *japonica*, sebaliknya tidak adanya fragmen ORF100 maka padi dapat dikelompokkan tipe *indica*. Keberadaan fragmen ORF100 pada padi varietas Slegreng dan Mandel bahwa padi-padi lokal tersebut termasuk dalam golongan padi *japonica*.

Li *et al.*<sup>2</sup>, (2012) mengemukakan bahwa *O. sativa* L. (padi budidaya Asia) subspecies *indica* merupakan keturunan pertama dari *O. rufifogon* (padi liar Asia), dan subspecies *japonica* merupakan hasil evolusi dari *indica*. Perbedaan karakter genetik subspecies *indica* dan *japonica* ini berkaitan dengan sifat penting agronomi, adaptasi lingkungan, dan kemampuan reproduksi.

Pemanfaatan marka molekuler dalam deteksi jenis padi *indica* atau *japonica* diharapkan dapat melengkapi hasil karakterisasi dan pengelompokan varietas padi berdasar karakter morfologi dan anatomi. Juga berperan dalam program pemuliaan untuk perakitan galur beras unggul, khususnya padi beras merah yang memiliki banyak keunggulan.

## KESIMPULAN

Pemanfaatan marka kloroplas fragmen ORF100 dan ORF29 pada padi lokal varietas Slegreng dan Mandel dapat mengelompokkan padi dalam tipe *indica* atau *japonica*. Berdasarkan karakter fragmen ORF100 dan ORF29 padi varietas Slegreng dan Mandel memperlihatkan kecenderungan tipe *japonica*.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Chuayjaeng, S. and Volkaert, H. 2006. Chloroplast Diversity and Phylogeny in Wild and Cultivated Rice (*Oryza spp.*). *Kasetsart Journal*. 40: 306-313.
- [2] Daradjat, A.A., Silitonga, S. dan Nafisah. 2010. Ketersediaan Plasma Nutfah untuk Perbaikan Varietas Padi. Balai Besar Penelitian Tanaman Padi.
- [3] Grunenwald, H. 2003. Optimization of Polymerase Chain Reactions. *PCR Protocols*, Second Editon. 226: 89-95.
- [4] Irawan, B. dan Purbayanti, K. 2008. Karakterisasi dan Kekerbatan Kultivar Padi Lokal di Desa Rancakalong, Kecamatan Rancakalong, Kabupaten Sumedang. Seminar Nasional PTTI 21-23 Oktober 2008.
- [5] Kristantini dan Prajitno AL. 2009. Karakterisasi Padi Beras Merah Segreng Varietas Unggul Lokal Gunungkidul. *Jurnal Ilmu-ilmu Pengetahuan*. 5(2): 45-51.
- [6] Li, W., Kang, G., Zhang, B. Huang, G., and Chen, L. 2012. Chloroplast DNA genetic diversity between Asian cultivated rice (*Oryza sativa* L.) and different types of cytoplasmic male sterile rice. *African Journal of Agricultural Research*. 7(25):3705-3711. Available online at <http://www.academicjournals.org/AJAR>. DOI: 10.5897/AJAR11.2229.
- [7] Li, W., Zhang, B., Huang, G.W., Kang, G.P., Liang, M.Z., and Chen, L.B. 2012.

- Chloroplast DNA Polymorphism and Evolutional Relationships Between Asian Cultivated Rice (*Oryza sativa*) and its Wild Relatives (*O. rufipogon*). *Genetics and Molecular Research*. 11(4): 4418-4431.
- [8] Matsuoka, Y., Yamazaki, Y., Ogihara, Y., and Tsunewaki, K., 2002. Whole Chloroplast Genome Comparison of Rice, Maize, and Wheat, Implications for Chloroplast Gene Diversification and Phylogeny of Cereals. *Molecular Biology and Evolution*. 19(12): 2084-2091. ISSN: 0737-4038.
- [9] Nasir, M. 2001. Pengantar Pemuliaan Tanaman. Jakarta: Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional.
- [10] Purwono dan Purnamawati, H. 2009. Budidaya 8 Jenis Tanaman Pangan Unggul. Jakarta: Penebar Swadaya.
- [11] Sun, C., Yoshimura, A. Li, Z., Zhou, H., Wang, X., and Iwata, N. 1997. Genetic Differentiation of Chloroplast Genome in *O. Rupifogon Griff.* and *O. Sativa L.* *J. Agric. Biotech.* 5: 319-324.
- [12] Utami, D.W., Kristamtini dan Prajitno. 2009. Karakterisasi Plasma Nutfah Padi Beras Merah Lokal Asal Propinsi Daerah Istimewa Yogyakarta Berdasarkan karakter Morfo-Agronomi dan Marka SSRs. *Zuriat*. 20(1): 10-18.