

VALIDASI QTL DAN APLIKASINYA UNTUK PERBAIKAN SIFAT TOLERAN KERACUNAN Al PADA PADI (*Oryza sativa* L.)

Kesia Yohana¹, Adisyahputra¹, Kurniawan Rudi Trijatmiko²

¹Program Studi Biologi FMIPA Universitas Negeri Jakarta (UNJ). Jl. Rawamangun Muka No.1 Rawamangun, Jakarta Timur. 13220. Indonesia.

²Laboratorium Biomolekuler. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

*Corresponding Email: Kesiyohana3@gmail.com

ABSTRACT

Membuka lahan pertanian baru pada lahan marginal yang merupakan tanah asam adalah salah satu solusi dalam peningkatan produksi beras. Kendala yang dihadapi pada solusi tersebut adalah tanah asam mengandung aluminium terlarut yang dapat meracuni tanaman. Tindakan efektif agar padi tetap dapat diproduksi pada tanah asam adalah dengan penyilangan galur padi yang bersifat toleran yaitu Cabacu dengan padi bersifat peka yaitu IR64 sehingga menghasilkan populasi galur toleran Al. Penelitian ini bertujuan untuk validasi Quantitative Trait Loci (QTL) toleran Al pada galur padi hasil penyilangan Cabacu dengan IR64 pada generasi F7. Metode yang digunakan adalah eksperimen dengan menguji fenotipik menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial dan deskriptif dengan analisis data secara kualitatif menjelaskan hasil isolasi DNA. Data hasil pengamatan fenotipe diolah dengan program SPSS versi 16 untuk melihat sebaran data dan dilakukan uji normalitas menggunakan Uji Shapiro-Wilk. Dilakukan juga uji T untuk melihat keterpautan fenotipe dan genotipe. Hasil penelitian yaitu analisis uji fenotipe menunjukkan bahwa data distribusi secara normal. Sedangkan analisis marka tunggal menunjukkan bahwa sifat toleran aluminium terletak pada kromosom 1 (RM5).

Keywords: padi, Quantitative Trait Loci (QTL), toleran aluminium.

PENDAHULUAN

Padi (*Oryza sativa* L.) merupakan bahan pokok pangan masyarakat Indonesia pada umumnya. Menurut Badan Pusat Statistik tahun 2012, jumlah penduduk Indonesia 237.641.326 jiwa pada tahun 2010 dengan rata-rata pertumbuhan penduduk 1.49% per tahun dan luas areal panen 11.8 juta hektar. Kebutuhan beras nasional pada tahun 2012 dengan konsumsi per kapita rata-rata 113.48 juta kg per tahun, maka Indonesia dihadapkan pada ancaman rawan pangan pada tahun 2030. Seiring dengan pesatnya pertumbuhan penduduk serta beralihnya lahan pertanian untuk pemukiman dan industri, maka lahan yang tersedia untuk pertanian tanaman pangan, khususnya padi, menjadi semakin berkurang. Hal ini akan berakibat pada terganggunya kelangsungan produksi beras nasional (Kochian, 2000).

Pemerintah harus mengambil langkah yaitu dengan membuka lahan pertanian baru di lahan marginal yang kebanyakan merupakan tanah asam. Salah satu kendala perusahaan pertanian di tanah

asam adalah pH tanah yang rendah serta kandungan Alumunium terlarut yang tinggi sampai pada taraf yang dapat meracuni tanaman. Keracunan Al ditandai dengan terhambatnya pertumbuhan akar sebagai akibat terhambatnya pemanjangan sel (Kochian, 2000).

Menurut Anas dan Yoshida (2000), pengaruh yang ditimbulkan dari keracunan Al antara lain, sistem perakaran tidak berkembang baik yaitu akar mudah patah, pendek, tebal, percabangan tidak normal, tudung akar rusak dan berwarna coklat atau merah. Alumunium menjadi racun apabila berada pada kondisi asam karena akan lebih mudah larut dan melepaskan ion trivalent (Al^{3+}) yang merusak sel-sel tanaman (Delhaize *at. al.*, 2012).

Pendekatan alternatif yang mungkin dilakukan untuk solusi adalah menggunakan genotip-genotip tanaman yang mempunyai toleransi yang tinggi terhadap cekaman Al. Beberapa genotip padi lokal asal Indonesia diketahui bersifat toleran Al (Khatiwada *at. al.*, 1996). Salah satu galur padi lokal yang bersifat toleran Al adalah galur Cabacu dan sifat toleran ini dapat diwariskan pada galur yang bersifat peka terhadap Al yaitu IR64 melalui proses penyilangan.

Analisis karakter fenotip dan marka molekuler yang terpaut sifat toleransi keracunan alumunium dapat membantu proses seleksi dalam program perakitan galur padi toleran keracunan alumunium. Sebanyak 33 Quantitative Trait Loci (QTL) untuk karakter toleransi cekaman Al telah teridentifikasi pada ke-12 kromosom tanaman padi (Wu *at. al.*, 2000) dan QTL pada kromosom 1, 3, dan 9 terdeteksi pada berbagai studi QTL toleransi cekaman Al pada padi (Huang *at. al.*, 2009). Collard dan Mackill (2007), menyatakan bahwa proses identifikasi dan seleksi sifat yang diinginkan dapat dilakukan dengan menggunakan marka DNA sehingga varietas yang dihasilkan lebih konsisten dan lebih akurat. Salah satu marka yang dapat digunakan dalam seleksi tanaman adalah Simple Sequence Repeats (SSR). Marka ini mempunyai potensi untuk studi polimorfisme pada padi. Temnykh *at. al.*, (2000).

Penelitian ini membantu dalam menyeleksi galur-galur harapan padi dalam usaha pemuliaan tanaman padi, mengetahui QTL kromosom sifat toleransi pada tanaman padi generasi F7 hasil persilangan galur Cabacu x IR64, mengetahui keterpautan antara fenotipik dan genotipik tanaman padi F7 hasil persilangan galur Cabacu x IR64. Dalam jangka panjang varietas toleransi Al yang dihasilkan dapat mendukung peningkatan produksi beras nasional.

METODE

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah bak plastik, kain kasa, benang nilon, jarum, tabung plastik (corning), ember besar, styrofoam, Aerator, microtube 2 ml, microtube 1,5 ml, box styrofoam, ice box, termos, mikropipet, PCR plate, waterbath, gunting, kertas label, kertas saring, pena, corong, neraca analitik, sendok, alumunium foil, autoklaf, sumpit, sentrifius Beckman MicrofugeTM 12, pipet mikro, pinset, cetakan gel, comb, kaca gel poliakrilamid, penjepit kaca, karet, spatula, erlenmayer, gelas piala, gelas ukur, magnetic stirrer, microwave, alat elektroforesis, lemari asam, kulkas (-20 °C), minivorteks Bio- Rad, minispinner Bio-Rad, mesin PCR (PCR BioRad T100TM Thermal cycler) dan spektrofotometer Nanodrop Thermo Scintific 2000.

Bahan yang digunakan untuk analisis fenotipe untuk seleksi padi adalah tanaman padi yaitu 154 galur tanaman padi generasi ketujuh (F7) hasil persilangan Cabacu x IR64, tetua tanaman padi

yaitu varietas Cabacu, toleran Al) dan IR64 (padi sawah, peka Al) serta padi varietas Dupa (toleran Al) dan ITA131 (peka Al) sebagai control, larutan hara Yoshida (Yoshida *at. al.* 1976) dan larutan Aluminium (AlCl_3). Sedangkan untuk kegiatan isolasi DNA ialah daun tanaman padi galur hasil persilangan, nitrogen cair, buffer ekstraksi SDS (Tris HCl, 0,5 M EDTA pH 8,0, 5 M NaCl, SDS (*Sodium Deodecyl Sulphate*), 10%, chisam (kloroform:isoamilalkohol = 24:1), etanol absolut 96%, etanol 70%, RNase, TE. Bahan yang digunakan untuk cek DNA DNA sampel acak, *loading dye*, agarose, ddH₂O, 0,5 x TBE (*Tris Boric* EDTA). Bahan yang digunakan untuk amplifikasi DNA dengan PCR antara lain 10 x Buffer PCR (BPCR) untuk menjaga pH selama PCR supaya tetap di *range* medium, 10nM dNTPs sebagai *building block* dalam proses ekstensi DNA, Taq DNA Polimerase sebagai katalis reaksi polimerisasi DNA, serta 5 μM primer *forward* dan *reverse* dan ddH₂O.

Bahan-bahan untuk elektroforesis antara lain 8% *Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (PAGE), 10% Amonium persulfat (APS), dan Tetrametiletildiamin (TEMED), serta 1 x buffer TBE (*Tris Boric* EDTA), *loading dye* sebagai pemberat DNA sekaligus penanda posisi pita DNA saat elektroforesis, DNA hasil PCR, Silver (AgNO_3), *pellet* NaOH dan formaldehid (CH_3OH) untuk pewarnaan pita DNA dan juga DNA Ladder 100 bp (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).*box*, termos, mikropipet, PCR plate, *waterbath*, gunting, kertas label, kertas saring, pena, corong, neraca analitik, sendok, aluminium foil, autoklaf, sumpit, sentrifius *Beckman Microfuge*TM 12, pipet mikro, pinset, cetakan gel, *comb*, kaca gel poliakrilamid, penjepit kaca, karet, spatula, erlenmayer, gelas piala, gelas ukur, *magnetic stirrer*, *microwave*, alat elektroforesis, lemari asam, kulkas (-20°C), minivorteks Bio-Rad, minispinner Bio-Rad, mesin PCR (PCR BioRad T100TM *Thermal cycler*) dan spektrofotometer *Nanodrop Thermo Scintific* 2000.

Waktu dan Tempat Penelitian

Kegiatan ini dilaksanakan pada bulan Januari 2017 sampai bulan Juni 2017 di Laboratorium Biologi Molekuler Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen) yang berlokasi di Jalan Tentara Pelajar nomor 3A Cimanggu, Bogor, Jawa Barat.

Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimen yaitu menguji fenotipik dengan menggunakan desain rancangan acak lengkap (RAL). Selain eksperimen metode yang digunakan dalam penelitian ini juga berupa deskriptif dengan analisis data secara kualitatif menjelaskan pola DNA yang dihasilkan dari persilangan padi galur Cabacu dengan IR64 generasi F7.

Prosedur Penelitian

Analisis Fenotipe Untuk Seleksi Padi (Yoshida *at. al.*, 1976)

Seleksi padi dilakukan di rumah kaca menggunakan Rancangan Acak Lengkap yang terdiri atas 2 perlakuan dengan masing-masing 2 ulangan. Media perlakuan terdiri atas 2 bak plastik berukuran 42 x 31 x 15 cm dan 2 bak plastik ulangan berukuran 42 x 31 x 15 cm, begitupun juga untuk perlakuan kontrol atau normal tanpa aluminium terdiri atas 2 bak plastik dan 2 bak plastik ulangan. Bak plastik diisi masing-masing 10 Liter aquades dan larutan hara Yoshida (Yoshida *et.al.*, 1976) untuk perlakuan normal dan untuk perlakuan aluminium ditambah dengan larutan Aluminium (AlCl_3)

sebesar 45 ppm. Komposisi larutan hara Yoshida yang akan digunakan disajikan dalam table 2. Sebanyak 154 galur padi generasi F7 (Cabacu x IR64), kedua tetuanya (Cabacu dan IR64), serta kedua tanaman padi kontrol (Dupa dan ITA131) diletakkan berdasarkan nomor urutan yang telah dibuat di atas styrofoam berlubang yang bagian bawahnya diberi lapisan kain kasa. Sebelum diberi perlakuan benih padi dinkubasi didalam oven selama 24 jam. Setelah itu di direndam dengan air selama 4 hari. Styrofoam ini kemudian diletakkan di atas bak plastik yang telah berisi larutan perlakuan agar akar padi dapat tumbuh. Larutan Yoshida dipertahankan pada pH 4 dengan mengamati perubahan pH larutan setiap 2 hari sekali. Tanaman ditumbuhkan selama 21 hari (3 minggu) kemudian diukur panjang akar utama (cm), tinggi tanaman (cm) dan bobot kering akar (gr). Setelah dilakukan pengukuran, maka dipilih 20 galur tanaman padi yang memiliki akar terpanjang (toleran Al) dan 20 terpendek (peka Al) pada perlakuan dengan penambahan 45 ppm AlCl₃. Pemilihan ini berdasarkan rumus relatif panjang akar (RPA) berdasarkan berikut:

$$\text{RPA} = \frac{\text{Panjang akar pada 45 ppm Al}}{\text{Panjang akar pada 0 ppm Al}}$$

Standar nilai RPA mengikuti Nasution dan Suhartini (1992) dan Khatiwada *at. al.*, (1996) yaitu: RPA ≥ 0.7 = toleran, RPA 0.69-0.62 = moderat, RPA ≤ 0.61 = peka.

Data panjang akar populasi F7 pada larutan Yoshida yang mengandung 45 ppm AlCl₃ dipakai sebagai data fenotipik dan digunakan dalam uji keterpautan menggunakan marka SSR.

Isolasi DNA (Dellaporta at. al., 1983)

Dimulai dengan pelabelan pada *microtube* dan menyiapkan ice box, selanjutnya mengambil sampel daun padi di rumah kaca. Daun diambil dari tetua yaitu Cabacu dan IR64 dan 154 galur hasil persilangan galur generasi F7 (Cabacu x IR64), daun di potong kecil-kecil dengan gunting untuk mempermudah dalam proses pengerusan (lisis) lalu dimasukkan ke dalam *microtube* 2 ml. Selanjutnya adalah tahap ekstrasi, *microtube* 2 ml dikumpulkan dalam suatu wadah (sterofom), selanjutnya nitrogen cair dimasukkan kedalam wadah tersebut dan dibiarkan selama ± 2 menit. Hal ini dilakukan agar daun padi yang berada di dalam *microtube* 2 ml membeku dan mudah untuk di gerus. Kemudian *microtube* 2 ml diambil dan dilakukan penggerusan hingga halus menggunakan sumpit yang sebelumnya telah di sterilkan.

Tahap ekstrasi bertujuan untuk menghancurkan dinding sel setelah hancur ditambahkan dengan 700 μ l buffer ekstraksi SDS (Sodium Deodecyl Sulphate) dan selanjutnya diinkubasi didalam *waterbath* pada suhu 65°C selama 15 menit, tabung dibolak-balik setiap 5 menit agar ekstrak tercampur dengan merata. Setelah itu, 700 μ l larutan campuran *cloroform:isoamilalkohol* dengan perbandingan 24:1 ditambahkan kedalam *microtube* 2 ml, kemudian *microtube* 2 ml divortex hingga larutan tercampur merata. Setelah homogen, *microtube* 2 ml disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Sentrifugasi berfungsi untuk memisahkan larutan berdasarkan berat molekul.

Hasil sentrifugasi akan menghasilkan supernatan. Supernatan berupa cairan berwarna kuning yang berada di lapisan paling atas. Supernatan dipipet 500 μ l dengan hati-hati dan dipindahkan kedalam *microtube* 2 ml yang baru. Selanjutnya tambahkan etanol absolute dingin sebanyak dua kali lipat volume supernatan yang diambil, tabung di bolak-balik hingga tercampur merata, kemudian disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Kemudian supernatan dibuang, sedangkan pelet yang terbentuk ditambahkan 500 μ l etanol 70% lalu disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit. Selanjutnya, supernatan dibuang dan pelet yang di peroleh

dikeringkan selama semalam. Pelet yang telah kering dilarutkan dengan 100 μ l TE+RNase, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. DNA yang diperoleh dari isolasi DNA kemudian disimpan dalam freezer dengan suhu -20°C.

Uji kualitatif dan kuantitatif DNA

Uji kualitas DNA tanaman dilakukan dengan menggunakan gel agarose 1%. Tahapan pertama adalah menghomogenkan gel agarose 1 g pada larutan TBE 0,5X sebanyak 100 ml pada erlenmeyer dengan cara dipanaskan dalam *microwave* hingga larutan gel benar-benar homogen. Setelah homogen, dinginkan sebentar dengan menggunakan air mengalir pada bagian luar tabung erlenmeyer. Kemudian tuang gel agarose pada cetakan dan tunggu hingga padat. *chamber* elektroforesis diisi dengan menggunakan TBE 0,5X dan masukkan gel yang sudah padat kedalam *chamber* tersebut.

Tahap kedua hasil ekstraksi DNA sebanyak 2 μ l dihomogenkan dengan loading dye sebanyak 1 μ l dan d_4 H₂O sebanyak 2 μ l dengan menggunakan pipet mikro dan *parafilm*, kemudian dimasukkan ke dalam sumur (*wells*). Proses dilakukan selama 30 menit dengan tegangan listrik 100 volt. Setelah proses elektroforesis selesai, gel direndam dalam larutan EtBr selama \pm 10 menit dan bilas dalam aquades selama \pm 5 menit, lalu gel didokumentasikan di *Chemidoc Transilluminator EQ Biorad*.

Uji kuantitatif DNA tanaman dapat dilakukan dengan menggunakan nanodrop. Sebanyak 2 μ l TE dimasukkan dalam kuvet sebagai blanko. Kemudian sebanyak 2 μ l sampel DNA dimasukkan ke dalam kuvet, setelah itu tekan tombol *read*. Hasil pengukuran nilai kemurnian sampel DNA akan muncul dalam satuan konsentrasi ng/ μ l. Pengukuran konsentrasi DNA dilakukan pada panjang gelombang 260 nm. Sedangkan untuk pengukuran kemurnian DNA dilakukan dengan perbandingan A_{260}/A_{280} .

Amplifikasi DNA dengan PCR

DNA padi galur tetua yaitu Cabacu dan IR64 dan 154 galur hasil persilangan galur generasi F7 (Cabacu x IR64) diperbanyak melalui proses PCR. Amplifikasi Reaksi PCR dilakukan pada 20 μ l volume mengandung Mix PCR (Tabel 5.) yang dimasukkan kedalam plate PCR, dalam 1 plate PCR terdapat 96 *minitube*. Program PCR yang digunakan adalah denaturasi permulaan selama 5 menit pada suhu 94°C, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari denaturasi (*denaturation*) selama 1 menit pada suhu 94°C, penempelan primer (*annealing*) selama 1 menit pada suhu 55°C, dan perpanjangan primer (*extencion*) selama 2 menit pada suhu 72⁰ C, perpanjangan primer terakhir dilakukan selama 7 menit pada suhu 72⁰ C. setelah itu hasil PCR diberi *loading dye* 5 μ l, tutup dengan *aluminium foil* dan masukkan ke dalam *freezer* (-20°C).

Elektroforesis Gel Poliakrilamid (Sambrook at. al., 1989)

Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan *Polyacrylamide Gel Elektroforesis* (PREMIX), DNA *marker* yang digunakan yaitu sebesar 100 bp DNA ladder. Siapkan rangkaian plat kaca yang akan digunakan, pastikan agar tidak terdapat kebocoran pada plat kaca. Setelah rangkaian kaca siap untuk digunakan, semua bahan dicampurkan untuk membuat gel. Gel dibuat dari 50 mL larutan PREMIX 8%, 500 μ l APS dan 50 μ l TEMED. Larutan dikocok terlebih dahulu supaya homogen dan masukkan kedalam plat kaca diamkan selama \pm 15 menit, setelah gel membeku masukkan plat kaca yang berisi gel tersebut ke dalam *chamber* elektroforesis yang berisi 1X TBE.

Hasil PCR yang telah dicampurkan dengan *loading dye* diinjeksikan kedalam sumur sebanyak 2 µl, terakhir DNA *marker* 2 µl dimasukkan ke dalam sumur paling ujung sebelum tetua dan ditengah, tambahkan kembali buffer 1X TBE kedalam *chamber* dan hilangkan gelembung yang ada didalamnya. *Running* elektroforesis dilakukan selama 75 menit dengan tegangan 500 Ampere 100 Volt. Gel polakrilamid yang telah selesai *running* dilepaskan dari plat kaca, lalu diwarnai dengan larutan *staining* dalam EtBr selama 15 menit, kemudian gel dicuci ddH_2O selama 10 menit, setelah itu visualisasi hasil elektroforesis didokumentasikan di *Chemidoc Transilluminator EQ Biorad*.

Analisis Data

Data hasil pengamatan fenotipe diolah dengan program SPSS versi 16 untuk melihat sebaran data dan dilakukan uji normalitas menggunakan Uji Shapiro- Wilk. Kemudian analisis marka tunggal yaitu dengan membagi populasi ke dalam kelas-kelas berdasar pada genotipe untuk setiap lokus/marka, dan menganggap adanya sebuah QTL jika terdapat perbedaan nyata dalam rata-rata skor fenotipe untuk masing-masing kelompok. Analisis marka tunggal dapat dilakukan menggunakan salah satu metode, yaitu uji T (McCouch dan Doerge, 1995). Nomor galur akan di kelompokkan berdasarkan pola DNA yang terbentuk. Grup A (mengikuti tetua Cabacu), grup B (mengikuti tetua IR64). Kemudian dilakukan perbandingan nilai rata-rata RPA antara grup A dan grup B menggunakan uji T. Marka akan dianggap terpaud dengan QTL apabila memiliki nilai peluang kurang dari 0,05 (berbeda nyata pada taraf 5%).

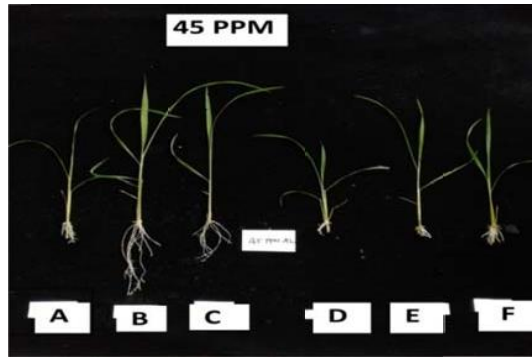
Analisis kesetimbangan Hardy Weinberg juga dilakukan. Rasio perbandingan AA:Aa:aa sesuai dengan generasi, kemudian ditetapkan perbandingan jumlah genotipe ekspetasi (yang diharapkan) berdasarkan rasio perbandingan AA:Aa:aa. Kemudian jumlah genotipe ekspetasi dikurang dengan jumlah genotipe obeservasi (yang didapat), lalu hasil dari pengurangan tersebut dipangkatkan, lalu dibagi. Rumus ini untuk mendapatkan χ^2 hitung. Jika χ^2 hitung < χ^2 Tabel maka sesuai dengan kesetimbangan Hardy Weinberg.

$$\text{Rumus mencari } \chi^2 \text{ hitung: } \chi^2 \text{ hitung} = \sum \frac{(fO-fe)^2}{fe}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Fenotipik

Uji fenotipe merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui tinggi tanaman, panjang akar dan berat kering akar dari percobaan yang dilakukan dengan menggunakan larutan 45 ppm alumunium. Terlihat jelas dari Gambar 3 dan Tabel 3 terdapat perbedaan panjang akar. Perbedaan panjang akar ini terjadi pada perlakuan pemberian Al 45 ppm yaitu antara galur IR64 yang memiliki rata-rata 3.9 cm dan Cabacu dengan rata-rata 13.6 cm dan juga pada galur kontrol lainnya yaitu galur Dupa dengan rata-rata 10.5 cm, ITA131 dengan rata-rata 4.5 cm, Kasalath dengan rata-rata 2.5 cm dan Ciherang dengan rata-rata 6 cm dengan. Panjang akar pada perlakuan larutan 45 ppm, jika dilihat dari ukurannya, galur IR64 lebih pendek dibandingkan dengan Cabacu. Perbedaan panjang akar kedua galur tersebut yaitu Cabacu lebih panjang 9.7 cm, hal ini membuktikan bahwa galur IR64 peka terhadap Al 45 ppm sedangkan galur Cabacu resisten dengan Al 45 ppm Berbeda dengan kontrol atau tanpa perlakuan memiliki panjang akar yang tidak terlalu jauh berbeda. Galur Cabacu hanya lebih panjang cm, dengan panjang akar IR64 sebesar 13.9 cm sedangkan Cabacu 18 3 cm (terlihat pada Gambar 5).



Gambar 1. Perbandingan tanaman galur-galur padi pada perlakuan 45 ppm (A)IR64, (B) Cabacu, (C) Dupa, (D) ITA131, (E) Kasalath, (F) Ciherang

Tabel 1. Perbandingan karakter uji fenotip dari beberapa galur local Indonesia pada perlakuan Al 45 ppm

No	Karakter	Cabacu	IR64	Kasalath	Dupa	ITA131	Ciherang
1	Tinggi tanaman (cm)	37.54	22.42	27.32	33.60	22.12	20.75
2	Panjang akar (cm)	13.62	3.87	2.50	10.50	4.50	6.00
3	Berat kering akar (gr)	0.03	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02

Tabel 2. Perbandingan karakter uji fenotip dari beberapa galur local Indonesia tanpa perlakuan

No	Karakter	Cabacu	IR64	Kasalath	Dupa	ITA131	Ciherang
1	Tinggi tanaman (cm)	45.72	35.50	27.25	38.35	26.95	35.57
2	Panjang akar (cm)	18.30	13.90	11.20	22.30	15.50	10.20
3	Berat kering akar (gr)	0.12	0.08	0.02	0.02	0.02	0.03

Tabel 3. Persentase Penurunan Galur Cabacu, IR64 dan generasi F8

Galur	Tinggi Tanaman (cm)		Persen penurunan (%)	Panjang Akar (cm)		Persen penurunan (%)	Berat kering akra (gr)		Persen penurunan (%)
	Normal	Al		Normal	Al		Normal	Al	
Cabacu	45.73	37.54	18%	18.30	13.63	26%	0.03	0.03	0%
IR64	35.50	22.43	37%	13.90	3.87	72%	0.02	0.01	50%
Generasi F8	41.43	29.39	29%	17.67	7.94	55%	0.03	0.02	33%

Tabel 4. Normalitas Generasi F8 tanpa perlakuan dengan perlakuan AL 45 ppm

Karakter tanaman	Tanpa perlakuan			Perlakuan Al 45 ppm		
	Rata-rata	Kisaran data	Kolmogorof smirnov	Rata-rata	Kisaran data	Kolmogorof smirnov
Tinggi tanaman	41.43	19.50-55.80	0.46	29.39	17.38-40.62	0.72
Panjang akar	17.67	10.50-34.52	0.71	7.94	2.75-15.75	0.67
Berat kering akar	0.03	0.01-0.06	0.45	0.02	0-0.05	0.90

Keterangan: * jika nilai uji Kolmogorov smirnov < 0.05 maka sebaran data tidak normal. Tetapi jika nilainya > 0.05 maka sebaran data normal

Sifat fenotipe yang diamati yaitu Tinggi tanaman, panjang akar, dan berat kering akar. Perlakuan yang dilakukan pada 45 ppm Al, galur Cabacu memiliki rata-rata tinggi tanaman sebesar 37,54 cm; rata-rata panjang akar 13,63 cm dan rata-rata berat kering akar sebesar 0.03 gr, sedangkan pada perlakuan 45 ppm Al, galur IR64 memiliki rata-rata tinggi tanaman sebesar 22,43; rata-rata panjang akar sebesar 3.86 dan rata-rata berat kering akar sebesar 0.02.

Karakter tanaman pada tetua Cabacu, tetua IR64 dan generasi F8 pada perlakuan pemberian larutan Al 45 ppm menunjukkan penurunan persen yang dihitung dengan cara jumlah karakter tanaman tanpa perlakuan (normal) di kurangi jumlah karakter dengan perlakuan Al kemudian hasil pengurangan tersebut dibagi dengan jumlah tanpa perlakuan (normal) kemudian hasilnya dikali seratus. Penurunan persen pada galur cabacu dari karakter tinggi tanaman yaitu 18%, panjang akar 26%, dan berat kering akar 0%. Penurunan persen pada karakter tinggi tanaman dan panjang akar menunjukkan bahwa galur Cabacu toleran pada Al 45 ppm karena tidak menunjukkan penurunan hingga 50%. Sedangkan pada galur IR64 terjadi penurunan persen pada karakter tinggi tanaman yaitu 37%, panjang akar 72% dan berat kering akar 50%. Menunjukkan bahwa galur IR64 peka terhadap cekaman Al 45 ppm, karena panjang akar IR64 mengalami penurunan yang sangat jauh. Karakter yang paling menunjukkan toleran atau tidak toleran adalah panjang akar, galur IR64 mengalami penurunan cukup besar yang berarti menunjukkan bahwa panjang akar semakin terus memendek ketika tercekam Al 45 ppm.

Karakter generasi F8 menunjukkan penurunan persen yaitu untuk tinggi tanaman 29%, panjang akar 55%, berat kering akar 33%. Penurunan persen ini menunjukkan bahwa generasi F8 sudah cukup baik, panjang akar tidak mengikuti tetua cabacu namun tidak juga menunjukkan seperti tetua IR64. Perbaikan sifat toleransi bisa dibilang sudah cukup berhasil karena sifat tetua yang tidak diinginkan yaitu IR64 tidak mendominasi karena panjang akar tidak sampai mengalami penurunan 70% seperti tetua IR64.

Karakter tanaman atau karakter agronomi merupakan fenotipe yang dibagi menjadi karakter kualitatif dan kuantitatif. Karakter kualitatif adalah sebaran fenotipenya diskontinu yang dikendalikan oleh gen monogenik atau poligenik. Sedangkan karakter kuantitatif adalah sebaran fenotipenya kontinu atau menunjukkan sebaran data normal yang dikendalikan oleh banyak gen yang masing-masing gen berpengaruh kecil terhadap ekspresi suatu karakter atau jika sebaran data tidak normal maka efek masing-masing gen berpengaruh besar (gen mayor) (Trustinah, 1997). Analisis normalitas menggunakan uji Kolmogorov-smirnov pada sifat fenotipe populasi F8 menunjukkan bahwa sebaran data normal, hal ini menunjukkan bahwa karakter fenotipe tinggi tanaman dan panjang akar tersebut bersifat kuantitatif dan dikendalikan oleh banyak gen. Karakter agronomi biasanya dikendalikan oleh beberapa gen pada lokus yang berbeda dimana efek masing-masing gen kecil atau gen minor (Poelhman dan Sleper, 2006). Gen-gen tersebut secara bersama-sama mempunyai pengaruh yang lebih besar dari pengaruh lingkungan.

Populasi F8 pada setiap karakter tanaman menunjukkan kisaran data yang lebar atau cukup jauh, hal ini disebabkan karena Cabacu dan IR64 memiliki latar belakang genetik yang sangat berbeda. Persilangan akan mengakibatkan adanya penggabungan gen-gen dari kedua tetua. Keragaman atau variasi genetik dapat terjadi karena adanya gen-gen yang bersegregasi dan berinteraksi dengan gen lain, terutama pada generasi awal sehingga tingkat heterosigositasnya tinggi (Sulistiyowati *et al.*, 2016).

Populasi F8 berarti menunjukkan bahwa adanya segregasi transgresif, dapat dilihat dari kisaran yang lebar, yang lebih tinggi atau lebih rendah dari kedua tetua dan yang cenderung hampir mengikuti

kedua tetua. Segregan transgresif terjadi karena akumulasi gen-gen yang menguntungkan dari kedua tetua akibat terjadinya rekombinasi gen (Noori & Harati 2005). Trijatmiko *at. al.*, (2001) juga menjelaskan bahwa terjadinya segregasi transgresif dua arah ini kemungkinan menunjukkan tidak satupun tetua membawa semua alel positif atau alel negatif. Akumulasi alel-alel komplementer yang diwariskan oleh kedua tetua pada individu tertentu menyebabkan terjadinya transgresif tersebut. Segregan transgresif ini dapat memberikan peluang untuk melakukan seleksi atau memilih galur dengan sifat yang diinginkan.

Pemberian nama galur dimulai dari generasi F2. Generasi F2 merupakan hasil *selfing* dari generasi F1. Generasi F1 merupakan hasil persilangan antara tetua IR64 dan Cabacu. Generasi F1 menghasilkan benih yang semua gennya heterozigot. Ketika generasi F2 *selfing* hasilnya adalah memiliki komposisi genetik berbeda satu sama lain. Setiap 1 benih generasi F2 ditumbuhkan dan dipanen, *selfing* dari generasi F2 sampai F6 dikerjakan menggunakan *single seed descent* atau seleksi turunan biji tunggal. Metode *single seed descent* dilakukan dengan menanam satu benih padi dari setiap tanaman (keturunan) untuk ditanam pada generasi selanjutnya. Persilangan generasi F7 ditek dengan marka, masing-masing galur berbeda satu sama lain.

Analisis Marka Tunggal

Analisis marka tunggal ini membagi populasi kedalam 2 kelas genotip untuk setiap marka. Dalam hal ini kelas genotip tersebut adalah A: Mengikuti tetua IR64 dan B: mengikuti tetua Cabacu. Dari Tabel 5 dibawah ini nilai uji T pada relatif panjang akar (RPA) dengan marka SSR yang menunjukkan <0,05 adalah RM 05. Sedangkan untuk nilai uji T pada panjang akar pada perlakuan 0 ppm dengan marka SSR yang menunjukkan <0,05 adalah RM 72.

Tabel 5. Uji T keterpautan genotip pada RPA dan panjang akar

No	Primer	P.Value RPA	P. Value 0 PPM
1	RM 05	0.04*	0.39
2	RM 19	0.16	0.34
3	RM 25	0.07	0.14
4	RM 72	0.07	0.04*

Keterangan : *jika nilai uji T <0,05 maka terdapat perbedaan (beda nyata)

Metode ini membagikan populasi kedalam kelas-kelas berdasarkan genotipe setiap lokus/marka, dan menganggap adanya satu QTL jika terdapat perbedaan nyata dalam rata-rata skor fenotipe untuk masing-masing kelompok. Pendekatan analisis marka tunggal digunakan dalam penelitian ini. Pendekatan analisis marka tunggal untuk menguji keterpautan tidak membutuhkan informasi susunan marka pada peta pautan (Prasetyono *at. al.* 2003). Analisis marka tunggal data menggunakan uji t-student (McCouch dan Doerge, 1995). Uji t digunakan apabila genotipe yang diuji hanya ada dua macam, misal AA dan aa. Marka terpaut dengan QTL apabila nilai peluangnya kurang dari 0,05 (5%). Hasil analisis statistik untuk analisis marka tunggal dapat dilihat dari Tabel 5. Tabel tersebut disimpulkan bahwa marka terpaut dengan QTL untuk sifat toleransi pada aluminium 45 ppm yaitu marka RM 05 (kromosom 1), sedangkan untuk marka terpaut dengan QTL untuk sifat panjang akar tanpa perlakuan apapun yaitu pada marka RM 72 (kromosom 8).

Mao *at. al.* (2004) menyatakan bahwa dengan menggunakan padi varietas IR1552 yang sensitif Al dan varietas Azuena (toleran Al) untuk memetakan QTL sifat toleran Al. Tiga QTL untuk relatif

panjang akar (RPA) dideteksi secara berturut-turut pada kromosom 1, 9, dan 12. Cekaman Al dapat menginduksi biosintesis lignin dan komponen-komponen lain dinding sel dari akar. Dua gen yang berhasil dipetakan yaitu satu protein yang belum diketahui fungsinya dan 1 ubiquitin-like protein untuk cekaman Al pada kromosom 1 Mao *at. al.* (2004).

Wu *at. al.* (2000), telah memetakan QTL dan lokus epistasis karakter toleransi Al untuk relatif panjang akar (RPA) setelah cekaman Al 2 minggu dan 4 minggu. Dua QTL didapatkan juga pada perlakuan Al selama 2 dan 4 minggu pada kromosom 1 dan 12. Sementara QTL pada kromosom 1 hanya terdeteksi pada perlakuan 2 minggu setelah cekaman Al.

Posisi atau lokasi RM5 pada kromosom 1 yaitu 23.971.321 bp, sedangkan untuk RM72 pada kromosom 8 yaitu 6.762.710 bp (27.72 cM). Pemetaan kromosom dapat dilakukan secara fisik melalui observasi mikroskopik atau peta sitologi yang disebut peta fisik dan dinyatakan dengan jumlah pasangan basa/basepare (bp). Selain itu, dapat pula melalui studi rekombinasi gen atau pindah silang yang disebut peta genetik dan dinyatakan dalam centimorgan (cM) (Jusuf 2001). Jarak fisik rata-rata per centimorgan diamati menjadi 244 kb untuk genom padi (Chen *at. al.* 2002). Posisi marka mikrosatelit dalam kromosom juga dapat diketahui berdasarkan data dari database genom padi yang tersedia pada website www.gramene.org. Gramene merupakan sebuah database genom tanaman sereal dan padi (*Oryza sativa*). Penentuan posisi gen dalam kromosom disebut pemetaan gen atau pemetaan kromosom dinyatakan dengan jumlah pasangan basa/basepare (bp).

Sifat toleransi terhadap keracunan aluminium merupakan sifat kuantitatif (dikendalikan banyak gen). Marka tidak mengendalikan sifat fenotipe tertentu, tetapi marka menandai region tertentu pada kromosom tertentu. Analisis keterpautan menunjukkan suatu marka terpaut fenotipe tertentu yang berarti bahwa region yang berada dekat dengan marka tersebut mengendalikan fenotipe yang diuji. Beberapa individu pada marka menunjukkan bahwa jika dilihat dari sifat fenotipe panjang akar yang di hitung melalui rumus relatif panjang akar, individu tersebut toleran Al yang berarti membawa sifat galur cabacu, namun pada saat visualisasi DNA menunjukkan bahwa individu tersebut memiliki pita sama seperti galur IR64 yang berarti membawa sifat dari galur IR64

Analisis Kesetimbangan Hardy Weinberg

Persilangan generasi F8 memiliki rasio genotipe 0,5:0:0,5 (AA:Aa:aa). Jumlah gen yang diamati sebesar 40, maka ekspektasi (yang diharapkan) adalah AA=20 dan aa=20. Menurut hukum kesetimbangan Hardy Weinberg nilai χ^2 hitung haruslah kurang dari χ^2 tabel. Nilai χ^2 Tabel sebesar 3.841 (derajat kebebasan=1 dan $\alpha =0,05$). Hasil dapat dilihat pada Tabel 6, 7, 8 dan 9 yang menunjukkan bahwa persilangan generasi F8 pada semua marka SSR yang diamati sesuai dengan kesetimbangan Hardy Weinberg dan gen hasil perilangan ini stabil.

Tabel 6. Kesetimbangan Hardy Weinberg pada marka RM 05

Genotipe	Ekspektasi	Observasi	E-O	E-O ²	E-O ² /E
Cabacu= AA	20	20	0	0	0
IR64= aa	20	19	1	1	0.05
					χ^2 hitung: *0.05

Ket: *jika nilai χ^2 hitung < χ^2 tabel maka sesuai dengan kesetimbangan Hardy Weinberg

Tabel 7. Kesetimbangan Hardy Weinberg pada marka RM 19

Genotipe	Ekspetasi	Observasi	E-O	E-O2	E-O2/E
Cabacu= AA	20	16	4	16	0.8
IR64= aa	20	21	-1	1	0.05
					χ^2 hitung : *0.85

Ket: *jika nilai χ^2 hitung < χ^2 tabel maka sesuai dengan kesetimbangan Hardy Weinberg

Tabel 8. Kesetimbangan Hardy Weinberg pada marka RM 25

Genotipe	Ekspetasi	Observasi	E-O	E-O2	E-O2/E
Cabacu= AA	20	12	8	64	3.2
IR64= aa	20	21	-1	1	0.05
					χ^2 hitung : *3.25

Ket: *jika nilai χ^2 hitung < χ^2 tabel maka sesuai dengan kesetimbangan Hardy Weinberg

Tabel 9. Kesetimbangan Hardy Weinberg pada marka RM 72

Genotipe	Ekspetasi	Observasi	E-O	E-O2	E-O2/E
Cabacu= AA	20	13	7	49	2.45
IR64= aa	20	15	5	25	1.25
					χ^2 hitung : *3.7

Ket: *jika nilai χ^2 hitung < χ^2 tabel maka sesuai dengan kesetimbangan Hardy Weinberg

SIMPULAN

Distribusi data fenotipik generasi F8 menyebar secara normal, hal ini menunjukkan bahwa karakter fenotipe tinggi tanaman, panjang akar dan berat kering akar tersebut bersifat kuantitatif dan dikendalikan oleh banyak gen. Keterpautan marka mikrosatelit (SSR) dengan sifat toleransi keracunan 45 ppm aluminium berada pada marka RM 5. Lokasi gen yang terkait dengan sifat toleransi keracunan aluminium pada padi F8 hasil persilangan Cabacu x IR64 yaitu terletak di kromosom 1 pada posisi 23.971.321 bp (95,7 cM), sedangkan untuk lokasi gen sifat panjang akar tanpa perlakuan berada pada RM72 kromosom 8 yaitu 6.762.710 bp (73.5 cM).

DAFTAR PUSTAKA

- Anas dan Yoshida. T., 2000. Screening of Al Tolerant Sorghum by Hematoxylin Staining and Growth Response. *Plant Prod Sci.* 3:246-253. Azhar, C. 2010. *Kajian morfologi dan produksi tanaman padi (Oryza sativa L.)*.
- Khatiwada SP., Senadhira D., Carpena A.L., Zeigler R.S., Fernandez P.G. 1996. Variability and genetics of tolerance for aluminum toxicity in rice (*Oryza sativa* L). *Theor Appl Genet.* 93: 738-744
- Kochian, L.V. 2000. Molecular Physiology of Mineral Nutrient Acquisition, Transport and Utilization. Irr. B. Buchanan, W. Gruissem dan R. Jones, Eds. Biochemistry dan Molecular Biology of Plant. *American Society of Plant Physiologists.* Maryland. USA
- Kochian, L.V., O.A. Hoekenga., dan M.A. Pinos. 2004. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu.Rev. Plant Biol.*

55:459–493.

- Kochian, L.V., M.A. Piñeros, dan O.A. Hoekenga. 2005. The physiology, genetics, and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant Soil*. 274:175–195.
- Ma, J.F., Ryan, P.R., dan E. Delhaize. 2001. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* 6:273–278.
- Mao, C., Yi, K., Yang, L., Zheng, B., Wu, Y., Liu, F., Wu, P. 2004. Identification of aluminum-regulated genes by cDNA-AFLP in rice (*Oryza sativa* L.): aluminum-regulates genes for the metabolism of cell wall components. *J of Exp Botany*. 55 (394): 137-143.
- Prasetyono, J., dan Tasliah. 2004. Marka Mikrosatelit: Marka Molekuler yang Menjanjikan. Buletin AgroBio: *Jurnal Tinjauan Ilmiah Riset Biologi dan Bioteknologi Pertanian*. 6: 45-51.
- Temnykh, S., Park, W.D., Ayres, N., Cartinhour, S., Hauck, N., Lipovich, L., Cho, Y.G., Ishii, T., dan McCouch, S.R. 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100: 697-712.
- Yoshida S, Forno D, Cock J and Gomez KA. 1976. *Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice*. The IRRI. Philippines.