

KERAGAMAN GENETIK VARIETAS PADI *japonica* DAN *indica* BERDASARKAN MARKA DNA TERKAIT MUTU RASA

PUJI LESTARI¹, REFLINUR¹, DODY DWI HANDOKO², MASTUR¹

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

²Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Jalan Raya Sukamandi 9, Subang 41256

ABSTRACT

PCR-based markers and evaluation of physicochemical properties should be addressed for the improvement of rice varieties with good eating dan cooking quality (EQ). This study aimed to examine the genetic diversity of rice varieties based on DNA markers related to physicochemical properties determining EQ. A total of 46 rice varieties consisting of 22 *japonica* varieties and 24 *indica* varieties were examined using 43 PCR-based markers. The results showed that polymorphic information content (PIC) ranged from 0.04 to 0.38, in support of genetic diversity indices which ranged from 0.04 to 0.50 across total markers. Pairwise genetic similarity matrix ranged from 0.40 to 0.98 with the closest genetic distance was observed between two *japonica* varieties (Dongjin and Hwaseong) and the most distant one was between *japonica* and *indica* (Onnuri/Manmi with Cigeulis/Fatmawati). The unweighted neighbor-joining tree clustered the rice varieties into two major clades, *indica* and *japonica*, and subsequent subclades were differentiating according to the individual genetic background. The genetic diversity of rice from different subspecies and DNA markers for EQ can effectively be utilized for basic information and marker-assisted selection (MAS) for the development of improved varieties with good EQ in rice breeding program.

Key Words: eating quality, genetic diversity, *japonica* and *indica* rice varieties, DNA marker, neighbor-joining tree

Penulis korespondensi: PUJI LESTARI | email: plestari129@yahoo.com

Dikirim: 26-12-2017 | Diterima: 04-03-2018

PENDAHULUAN

Padi (*Oryza sativa* L.) merupakan tanaman pangan penting yang menjadi makanan pokok hampir separuh penduduk dunia. Padi merupakan komoditas penting karena karakter agronomi dan nutrisinya menyediakan lebih dari 20% kalori per kapita bagi penduduk dunia (Kubo & Purevdorj, 2004). Padi budidaya juga memegang posisi unik karena merupakan tanaman pertama yang disekuen genomnya. Perkembangan ilmu genomika dan molekuler semakin membuka kesempatan berbagai studi dan pemanfaatannya untuk peningkatan genetik mutu padi (Garris *et al.*, 2005).

Padi terbagi menjadi dua subspecies utama, yaitu *indica* dan *japonica* yang merupakan hasil domestikasi spesies nenek moyang, yaitu *Oryza rufipogon* (Doi *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2003). Padi *indica* banyak dibudidayakan di Asia tropis (Asia Tenggara), dan *japonica* merupakan tanaman *temperate* di Asia Timur, dataran tinggi Asia Tenggara, dan Asia Selatan. Genotipe dan fenotipe padi *indica* dan *japonica* sangat berbeda. Bentuk butir padi dua subspecies tersebut berbeda. Butir padi *indica* cenderung panjang, ramping dan *non-sticky* setelah dimasak. Sebaliknya butir padi *japonica* pendek, cenderung bulat, dan nasinya *sticky* (Matsuo *et al.*, 1997; Kohyama *et al.*, 2016). Kepulenan beras masak/nasi biasanya dipengaruhi oleh kadar amilosa. Semakin rendah kandungan amilosa maka nasi semakin pulen. Pada umumnya nasi pulen mengandung amilosa sekitar 20% dan tidak lebih dari 25% (Suprihatno *et al.*, 2010). Nasi yang pulen, tidak terlalu basah atau kering, dan sebaliknya nasi pera, kering dan keras bila amilosanya tinggi. Beberapa karakter pembeda lainnya adalah warna daun, panjang rambut *apical*, reaksi fenol, kandungan amilosa dan lainnya yang

sebagian menunjukkan karakter *overlap* antara kedua subspecies ini (Garris *et al.*, 2005).

Gen-gen penyintesis pati berperan terhadap variasi fisika-kimia pati karena mempengaruhi jumlah dan struktur amilosa dan amilopektin butir padi. Secara genetik minimal satu gen mayor dan *modifiernya* mengontrol kandungan amilosa, protein, dan sifat pasta (*rapid visco analyser*, RVA) (Bao *et al.*, 2006). Kandungan protein menentukan mutu rasa, dalam hal ini tekstur dan sifat keras bagian permukaan nasi. Alel dari RM4108-A dan RM4108-C berasosiasi signifikan dengan kandungan protein rendah yang menghasilkan mutu rasa bagus dan pulen (Hori *et al.*, 2016). Variasi genetik gen penyintesis pati seperti gen *waxy* (*Wx*), *sucrose synthase* (SSI, SSIIa) dan *starch branching enzyme* (SBEIIa, SBEIIb) di *indica* dan *japonica* bermanfaat bagi upaya pengembangan varietas padi baru dengan kualitas pati yang lebih baik (Luo *et al.*, 2015). Analisis molekuler ini melengkapi karakterisasi sifat fenotipe pati yang dilakukan antara varietas *indica* dan *japonica* (Tan *et al.*, 2002; Kharabian-Masouleh *et al.*, 2011, 2012; Lestari *et al.*, 2013; Palanga *et al.*, 2016).

Berbagai jenis marka molekuler seperti *sequence tagged site* (STS), *simple sequence repeat* (SSR), *single nucleotide polymorphism* (SNP) (termasuk *cleaved amplified polymorphic sequence*/CAPS, *derived cleaved amplified polymorphic sequence*/dCAPS, *single nucleotide amplified polymorphism*/SNAP), *sequence characterized amplified region* (SCAR), dan *insertion/deletion* (Indel), yang terkait dengan gen penyintesis pati telah dikembangkan dan diaplikasikan untuk analisis genetik, pemetaan pada populasi persilangan maupun evaluasi plasma nutfah. Sampai saat ini telah dikembangkan marka terkait gen penyintesis pati (*Wx*, SSI, SSIIa, SBEI, SBEIIa and SBEIIb) untuk identifikasi alel target pada varietas

padi *japonica* dan *indica* (Bao *et al.*, 2006; He *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2015), dan marka genetik SNP untuk *genotyping* dalam program pemuliaan padi dalam upaya meningkatkan kualitas pati (Yan *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2010). Untuk melengkapi marka DNA tersebut sejumlah marka SCAR terkait mutu rasa (Ohstubo *et al.*, 2003), dan marka molekuler berdasarkan *quantitative trait loci* (QTL) dan gen kandidat yang mengontrol mutu rasa telah dikembangkan untuk evaluasi mutu rasa beras *japonica* dan *indica* (Lestari *et al.*, 2009, 2015).

Kemajuan pengembangan dan pemanfaatan marka DNA terkait mutu rasa dan sifat fisiko-kimia lainnya telah banyak dilakukan di negara lain. Namun analisis diversitas varietas *indica* Indonesia dan *japonica* dengan marka DNA terkait mutu rasa tersebut masih sangat terbatas. Untuk itu penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi variasi genetik varietas padi *indica* dari Indonesia dan *japonica* berdasarkan marka DNA terkait mutu rasa.

METODE

Sebanyak 46 varietas padi terdiri atas 22 varietas *japonica* yang sebagian besar berasal dari Korea dan 24 varietas *indica* dari Indonesia yang memiliki mutu rasa dari rendah sampai tinggi digunakan dalam penelitian ini (Tabel 1). Informasi mutu rasa varietas dalam studi ini berdasarkan uji organoleptik hasil penelitian sebelumnya (Lestari *et al.*, 2009; Lestari *et al.*, 2015). Analisis molekuler dilakukan di Seoul National University (SNU), dan Lab, Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen).

DNA genomik diisolasi dari daun muda dan sehat menggunakan metode *cetyl trimethyl ammonium bromide* (CTAB) mengikuti protokol Murray dan Thompson (1980). Daun digerus menjadi bubuk halus menggunakan *pestle* dan mortar dengan bantuan nitrogen cair. DNA yang diperoleh dilarutkan dalam 100 µl 1X bufer TE (pH 8,0). Kemurnian dan kuantitas DNA diukur menggunakan NanoDrop 2000 spektrofotometer pada panjang gelombang 260/280 dan 230/280 nm. DNA divisualisasikan melalui elektroforesis gel agarosa 0,8% untuk memastikan kualitas dan kuantitasnya.

Sebanyak 43 primer dari pengembangan sebelumnya baik dari hasil desain maupun adopsi dari kelompok peneliti lain seperti dilaporkan oleh Lestari *et al.* (2015), digunakan untuk mengamplifikasi (PCR) marka DNA dari semua varietas dalam penelitian ini (Tabel 2). Volume PCR total adalah 20 µl dengan komposisi sebagai berikut: DNA 20 ng/µl sebanyak 1 µl, 10X bufer mengandung 25 mM MgCl₂, 2,5 mM dNTPs sebanyak 1 µl, 1 Unit Taq Polymerase (Intron Biotechnology, Korea), dan primer *forward* dan *reverse* (10 mM) masing-masing 1 µl. Suhu penempelan mengikuti suhu *melting* tiap primer. Secara umum amplifikasi PCR terdiri dari denaturasi awal pada 95°C selama 5 menit, total 35 siklus dengan program denaturasi 1 menit pada 95°C, *annealing* 30 detik pada 55°C (sesuai dengan suhu *melting* tiap primer) dan perpanjangan selama 1 menit pada 72°C, dan perpanjangan final pada 72° selama 7 menit. Produk PCR untuk primer STS, SCAR, dan SNP (CAPS/dCAPS) divisualisasikan pada gel agarosa 3%. Penggunaan gel agarosa dengan persentase kecil ini telah cukup untuk memigrasikan amplicon tersebut yang berbasis alel dan/atau keberadaan ukuran produk target (ada dan tidak ada pita DNA). Amplicon dari primer SSR dan Indel

dielektroforesis pada poliakrilamid 8% non denaturasi dan direndam dalam larutan *ethidium bromide* (Model MGV-202-33, CBS Scientific Co., Del Mar, CA, USA).

Tabel 1. Varietas padi *japonica* dan *indica* yang digunakan dalam penelitian ini.

Nama varietas	Subspesies	Asal negara	Mutu rasa berdasarkan uji hedonik*
Koshihikari	<i>japonica</i>	Jepang	4,25
Gopum	<i>japonica</i>	Korea Selatan	4,18
Samgwang	<i>japonica</i>	Korea Selatan	4,28
Ilpum	<i>japonica</i>	Korea Selatan	4,39
Geuman	<i>japonica</i>	Korea Selatan	4,20
Seonong4	<i>japonica</i>	Korea Selatan	4,12
Dongjin	<i>japonica</i>	Korea Selatan	3,95
Hwaseong	<i>japonica</i>	Korea Selatan	3,80
Hwacheong	<i>japonica</i>	Korea Selatan	3,68
Samdeok	<i>japonica</i>	Korea Selatan	3,46
Baekjinju1	<i>japonica</i>	Korea Selatan	4,10
Nakdong	<i>japonica</i>	Korea Selatan	3,75
Onnuri	<i>japonica</i>	Korea Selatan	3,95
Manmi	<i>japonica</i>	Korea Selatan	3,90
Chucheong	<i>japonica</i>	Korea Selatan	4,00
Hitomebore	<i>japonica</i>	Jepang	4,15
Palkong	<i>japonica</i>	Korea Selatan	3,17
Giho	<i>japonica</i>	Korea Selatan	3,60
Samnam	<i>japonica</i>	Korea Selatan	3,05
Hexi41	<i>japonica</i>	Cina	2,80
Sinkeumo	<i>japonica</i>	Korea Selatan	3,60
Dobong	<i>japonica</i>	Korea Selatan	2,76
Rojolele	<i>indica</i>	Indonesia	4,10
Ciliwung	<i>indica</i>	Indonesia	3,90
Sintanur	<i>indica</i>	Indonesia	4,10
Cimelati	<i>indica</i>	Indonesia	4,05
Cigeulis	<i>indica</i>	Indonesia	3,90
Memberamo	<i>indica</i>	Indonesia	4,10
Tukad Balian	<i>indica</i>	Indonesia	4,15
Conde	<i>indica</i>	Indonesia	4,00
Angke	<i>indica</i>	Indonesia	3,90
Batang Gadis	<i>indica</i>	Indonesia	4,00
Ciherang	<i>indica</i>	Indonesia	3,95
Batanghari	<i>indica</i>	Indonesia	3,80
Fatmawati	<i>indica</i>	Indonesia	3,80
Cibodas	<i>indica</i>	Indonesia	3,60
Kalimutu	<i>indica</i>	Indonesia	3,60
Cirata	<i>indica</i>	Indonesia	3,40
Cisokan	<i>indica</i>	Indonesia	3,45
Ramos	<i>indica</i>	Indonesia	3,10
Batang Piaman	<i>indica</i>	Indonesia	3,94
Singkil	<i>indica</i>	Indonesia	2,95
Konawe	<i>indica</i>	Indonesia	3,05
Logawa	<i>indica</i>	Indonesia	3,25
Pepe	<i>indica</i>	Indonesia	4,25
Jatiluhur	<i>indica</i>	Indonesia	2,20

*Lestari *et al.* (2009), Lestari *et al.* (2015)

Pola pita hasil *genotyping* semua primer diskoring sesuai dengan jumlah alel yang muncul dalam total koleksi varietas padi. Data hasil skor ini dianalisis statistik terkait dengan total alel, alel dominan, alel jarang, heterozigositas, *genetic diversity indices* dan *Polymorphic Information Content* (PIC), PIC dan heterozigositas dihitung untuk total varietas dan primer (Liu, 2001). *Genetic diversity indices* dan analisis kluster dibuat berdasarkan estimasi metode Nei dengan analisis *neighbor-joining*. Keragaman genetik juga diestimasi pada intra dan inter subspecies serta antar varietas. Untuk mendukung formasi kluster, dilakukan analisis bootstrap 1000 permutasi menggunakan PowerMarker V3.25 (Felsenstein, 1985; Liu & Muse, 2005). Analisis asosiasi antara data marka molekuler dan sifat fisika-kimia dan organoleptik dilakukan menggunakan perangkat lunak Tassel V.5.0. (Bradbury *et al.*, 2007).

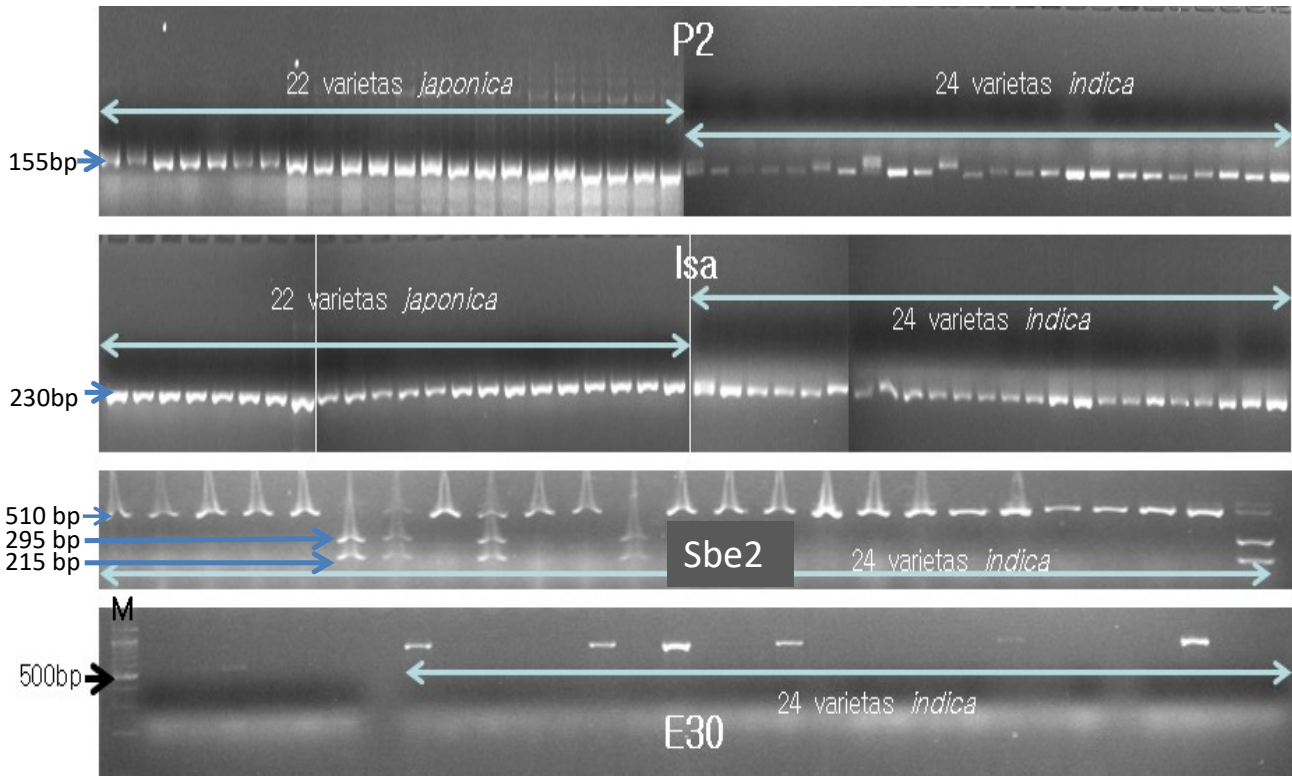
Tabel 2. Marka molekuler yang digunakan dalam penelitian ini.

Nama Marka PCR	Jenis Marka	Urutan sekuen primer	
		Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Ohstubo et al. (2002, 2003); Ohtsubo dan Nakamura (2007)			
A6	STS	CCAGCTGTACGCTGTACTAC	CCAGCTGTACGCTTCCCCAGC
A7	STS	TGCCTCGCACCAGAAATAG	TGCCTCGCACCATGAG
B1	STS	GTTTCGCTCCTACAGTAATTAAGGG	GTTTCGCTCCCATGCAATCT
B43	STS	GGCCGGCATGACTCAC	ACTGGCCGGCATCAAGAC
F6	STS	ACCACTCCATATATATCATCCAAAG	ACCACTCCATATCACCACAAGG
G4	STS	GAGACCGATATGCGATTTC	GTGGTGTTTAGATCCAGAGACTTA
G22	STS	CTCACTCAAATTTACAGTGCATTTTCTTG	AGGGCCATGATACAAGACTCTGT
G28	STS	GGCGGTCTGTTCTGCGAT	GGAGAATCCCACAGTAAGTTTTTCTTTG
J6	STS	GTCCGAGTGGTCAGACCG	GTCGGAGTGGATGGAGTAGC
M2CG	STS	ACAACGCCTCCGATGA	ACAACGCCTCCGACAACAAGAT
M11	STS	GTCCACTGTGACCACAACAT	GTCCACTGTGGGGATTGTTC
P5	STS	ACAACGGTCCGTCTTGTCTT	ACAACGGTCCAACAGATACTTTTGA
S13	STS	GTCTTCTCTGTGGTTAGGACAGGGT	GTCGTTCTGTGGTGTCTCAGAT
T16	STS	GGTGAACGCTGTAGTTGGAATATA	GGTGAACGCTCAGATTTAAATATAAT
WK9	STS	CCCGCAGTTAGATGCACCATT	CCGCAGTTAGATCAAGTGGC
E30	STS	TACCTGGTTGATGTATACAGATCTGGTT	ATCCCTCGATCCCTCTAGCATTAT
B7	STS	CAGGTGTGGGTTACAAGGATGA	CAGGTGGTTCACGGCCTTT
G49A	STS	AATCCAGACATGAAATTTATATGCGAGATA	AATCCAGACATGTGTCTCAATTTTTG
G81	STS	TACCTGAACCAGCAAGCATGCGCG	TACCTGAACCAGTATAATCTTTG
P3	STS	AACGGGCCAAAACGGAGGT	AACGGGCCAACGCAG
Bao et al. (2006a,b)			
Wx (SNP)	CAPS/AccI	CTTTGTCTATCTCAAGACAC	TTTCCAGCCCAACACCTTAC
SS1 (SSR)	SSR	GATCCGTTTTTGTGTGCC	CCTCCTCTCCGCGCATCTG
SBE1 (SSR)	SSR	ATTTCTTTGGCCACAGGCGA	CCCAGATTCGGAAACAAGAAC
SBE1 (STS)	STS	GAGTTGAGTTGCGTCAGATC	AATGAGGTTGCTTGTCTGCTG
SBE2 (SNP)	dCAPS/SpeI	GTCTTGGACTCAGATGCTGGACTC	ATGTATAACTGGCAGTTCGAACGG
SSIa	SNP	F7: CTGGATCACTTCAAGCTGTACGAC F22: CAAGGAGAGCTGGAGGGGGC	R1: GCCGGCCGTGCAGATCTTAAAC R21: ACATGCCCGCACCTGGAAA
Lestari et al. (2009)			
S3cl	Indel	CCACTCTCATGTCTTGAAC	GCCATGACATTTGGACAT
S3clI	dCAPS/TaqI	TTCCATGATGTGCCACTCTC	GGACAAATGTTTTAGTGAATAAAT
TreB	Indel	CACCTCCAGTTCTGCTCAAA	CACCTCCAAAACGAATATGG
AMs	SSR	CTTCCAAGGACCCCATCT	CCCAACATCTCCGTCAGAAAT
GPA	SSR	CCAAATACGGCGCCTTCT	AGTTTCTGGGCTCGGAGGA
GBSS1	SSR	CAAATAGCCACCCACACCAC	CCTGCAGATGTTCTTCTGATG
AcPh	dCAPS/MseI	AGTTGTGGTTTAAAGCATAGG	ATTGTCTTTTCTTTAAAGTTTATTA
CBG	SSR	AGCTTCCCTAATGGCTTCGT	ATTTGCCAACTTTTGGATGG
SH51	dCAPS/SpeI	ATTCTTGATGAAAATAATTAAGTAG	GGTTAACCATCTTATAAAAATTTGTC
He et al. (2006)			
SS1 (STS)	STS	TCTAGATTGCTACACGTGAGAGG	TCTCCACGATAAATTCCACC
SBE3 (STS)	STS	TCCGTCATTTCCGTTAGTCTCTCT	ACATCCTCTAGACTATGGGCGACTC
SssIIa	STS	TCTAGATTGCTACACGTGAGAGG	GGAGCCACCTGTAAGCGGTG
Isa	STS	CCTGTCTTGACAGTGGCGTA	GCACGGTTCTGATGTACGAGAG
Pul3 (3'end)	STS	GGGTTCGCTTTCACAACACAG	GTCACGACATAAGAGAAGCTGC
Pul5 (5'end)	STS	AGTTCGCTAGTCATCTGCTCG	CCCATGTCTTGTCTCCACTT
Zeng et al. (2007)			
P2	STS	ATTAGCGGTTAAATGGATGAGTTC	AAGCAATACTAATCCTCCAAACC
P3A	STS	AATCCAACGCATCAAGGCTGGC	ACAATGCCAAACACCAGGAACCTG
P4	STS	TGAGCTTTACCTCCCTCCTAACC	TCCACCTTCTCTCTCATCCAC
P7	STS	AGTTAAACAACCTCCCACTGC	GGGTAGGATAGGGGATAAGGAGC
Kobayashi et al. (2008)			
KA43	SSR	CCTTCTGAATGCGGAATTT	GAAATGATGGCATGGGAGAT
Lestari et al. (2015)			
MAD	STS	TAACAACCACGGCCGAGAA	GAGCGTCTTTTCTTTCCGGTA
HP	STS	TGGAGGAGATGTACGTCGAG	GAAGTCGAGTGGTCCATGA
PP2	CAPS/MseI	TTTGAATAGGTCCTGCTT	CCATGCATCTCATTAGTCAA
PFruc	dCAPS/EcoRI	CTTCTTCTCGGGTGTCTCG	TGTTAAGTCCAGGGCAGAGG
Aglu	STS	CCTCTGGAATCTTGTATTTAGG	ATCCGCTAGATCACTGACAAA
LDS	STS	CGAGGAGACAGACAGCATCA	GATGCAGCAGCCATGAGTT
BE2	CAPS/SpeI	GCCCGAACATGATTTCTA	GGCTTTACCGACCTTACTGT
BE6	dCAPS/HphI	TACCCAGTTAAGTGTCTGTAAAGG	GAAGAGAGCGCAAGAATCCATTGTT

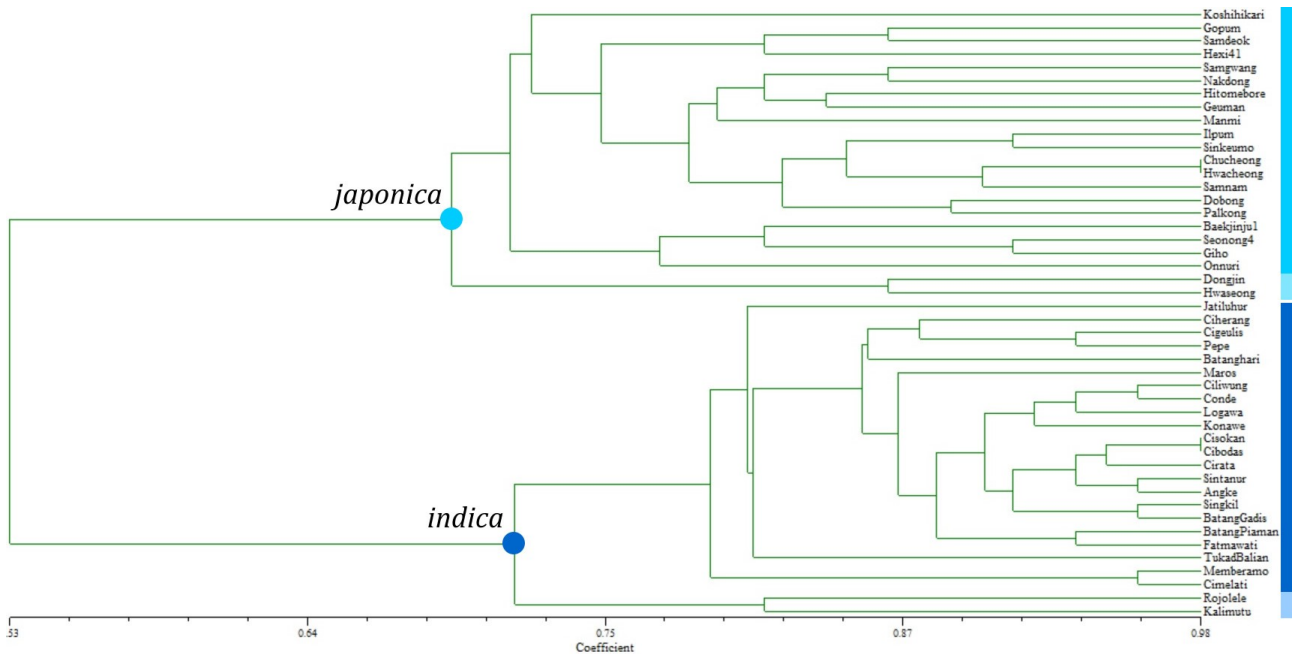
HASIL DAN PEMBAHASAN

Total alel yang terdeteksi di antara 46 varietas dari total 43 primer adalah 92 dengan rerata 2 alel per lokus. Contoh pola pita dan polimorfisme yang dihasilkan beberapa primer dalam studi ini

ditampilkan pada Gambar 1. Frekuensi alel dominan (>30%) diidentifikasi pada 46 lokus dengan rerata 0,74 dengan nilai tertinggi 0,98 pada B7 dan SH51. Marka DNA lainnya yang menghasilkan alel mayor >90% adalah B43, P5, dan SSI sebaliknya Aglu, LDS, dan P7 memiliki alel mayor terendah yaitu 0,5.



Gambar 1. Contoh pola polimorfisme antara padi *japonica* dan *indica* menggunakan marka DNA. Primer P2 (148 dan 155 bp), Isa (220 dan 230 bp), dan Sbe2 (510, 295 dan 215 bp) adalah marka kodominan yang dilihat berdasarkan perbedaan ukuran alel. E30 (790 bp) adalah marka dominan dengan sistem skoring “ada” dan “tidak ada pita”.



Gambar 2. Dendrogram kekerabatan genetik 46 varietas padi berdasarkan 43 marka DNA.

Polymorphic Information Content (PIC) sebagai salah satu indikator tingkat polimorfisme marka molekuler menunjukkan rerata rendah pada total marka (0,26) dengan selang antara 0,04 dan 0,38. Marka DNA yang memiliki PIC tertinggi adalah P7, Isa, Aglu, dan LDS. Ringkasan statistik total 43 primer yang diobservasi dalam studi ini ditampilkan pada Tabel 3. Nilai PIC tinggi cenderung diikuti oleh indeks *gene diversity* yang tinggi pula dan sebaliknya. Rerata indek *gene*

diversity pada total koleksi varietas padi berdasarkan total primer adalah 0,33 dengan nilai terendah 0,04 (primer B7, SH51, CBG, dan P2) dan tertinggi adalah pada 0,5 (A7, Aglu, BE3, LDS, Isa, P7, Pul3, dan KA43).

Meskipun marka DNA memiliki PIC rendah, namun berpotensi cukup baik sebagai marka untuk deteksi mutu rasa baik pada *japonica* (Lestari *et al.*, 2009) maupun *indica* (Lestari *et al.*, 2015). Oleh karena itu dalam studi ini pemanfaatan marka DNA dalam

sebuah formulasi set marka lebih dianjurkan daripada aplikasi marka tunggal. Hasil ini didukung fakta bahwa alel yang dihasilkan oleh marka DNA tersebut cenderung bialel dalam koleksi varietas *japonica* dan *indica* ini. Marka DNA yang digunakan telah diaplikasikan pada padi, yaitu primer SCAR yang dikembangkan dari RAPD (Ohstubo *et al.*, 2002, 2003) dan primer jenis lain yang berbasis gen spesifik ataupun QTL yang berasosiasi dengan sifat fisika-kimia (Bao *et al.*, 2006; He *et al.*, 2006; Lestari *et al.*, 2009, 2015).

Hasil analisis filogeni menunjukkan bahwa marka DNA yang digunakan dalam penelitian ini mampu menghasilkan diferensiasi subspecies *japonica* dan *indica* termasuk diferensiasi varietas berdasarkan latar belakang genetiknya. Analisis filogeni 46 varietas padi menunjukkan adanya variasi total varietas dengan koefisien kesamaan genetik dari 0,37 sampai 1,00 (Gambar 2), Total varietas terbagi menjadi 2 klaster utama, yang secara jelas memisahkan varietas *japonica* (22 varietas) dan *indica* (24 varietas), dalam kelompok *japonica*, ada 2 subklaster yang terdiri atas mayoritas varietas *japonica* dan 2 varietas lainnya (Dongjin dan Hwaseong) di subklaster kedua. Varietas Jepang Hitomebore dan varietas Cina (Hexi41) cenderung mengelompok dengan varietas Korea daripada Koshihikari, varietas premium Jepang lainnya, Koshihikari dengan mutu rasa enak di Jepang (Lestari *et al.*, 2009) dapat dibedakan dari koleksi varietas Korea Selatan (Gambar 2). Demikian juga varietas *japonica* dari Korea Selatan, Seonong4 dengan mutu rasa tinggi cenderung dekat dengan kelompok mutu rasa cukup tinggi. Ada 2 varietas *japonica* yang sangat dekat jarak genetiknya (0,98) yaitu varietas Dongjin dan Hwaseong. Kesamaan genetik terendah pada *japonica* ternyata terdeteksi antara varietas Korea dengan padi introduksi seperti Koshihikari-Seonong4, Onnuri-Hexi41(0,58), dan Hwaseong-Hitomebore (0,58). Koshihikari (*japonica*) sebagai beras dengan mutu rasa tinggi dapat menjadi sumber tetua potensial untuk perbaikan mutu rasa beras Indonesia yang mayoritas *indica*. Mengingat perbedaan jarak genetik yang terlalu jauh dapat menjadi *genetic barrier*, persilangan lintas subspecies antara *japonica* dan *indica*, maka diperlukan uji coba dengan cukup banyak persilangan maupun resiprok.

Hal yang sama terjadi pada kelompok *indica*. Mayoritas varietas mendominasi subklaster pertama (22 varietas) dan dua varietas lainnya (Rojolele dan Kalimutu) cenderung terpisah di subklaster kedua. Hasil ini kemungkinan disebabkan adanya pengaruh kemiripan karakter fisikokimia lainnya. Rojolele (kandungan amilosa 22,53% dan Kalimutu (kandungan amilosa 23,04%) memiliki kandungan amilosa rendah sampai sedang (Avaro *et al.*, 2009) yang mirip dengan tropical *japonica*, didukung oleh informasi molekuler marka DNA ini. Kandungan protein Rojolele (4,1%) dan Kalimutu (3,6%) juga tidak terlalu jauh. Terdapat kecenderungan varietas lokal dengan karakter mirip memiliki jarak genetik

lebih dekat dibandingkan dengan varietas komersil populer seperti Ciherang. Namun Fatmawati mempunyai kedekatan dengan varietas lokal (Batang Piaman) mungkin karena latar belakang genetik dari sistem *pedigreenya*.

Tabel 3. Ringkasan statistik total 43 primer yang diobservasi pada 46 varietas padi.

Primer	Frekuensi alel mayor	Indek Diversitas Genetik	PIC
A7	0,52	0,50	0,37
B1	0,89	0,19	0,17
B43	0,91	0,16	0,15
E30	0,57	0,49	0,37
F6	0,59	0,48	0,37
G4	0,80	0,31	0,27
G22	0,76	0,36	0,30
G28	0,76	0,36	0,30
J6	0,65	0,45	0,35
M11	0,83	0,29	0,25
M2CG	0,83	0,29	0,25
P5	0,96	0,08	0,08
S13	0,59	0,48	0,37
T16	0,89	0,19	0,17
WK9	0,78	0,34	0,28
P3	0,70	0,42	0,33
B7	0,98	0,04	0,04
G49A	0,74	0,39	0,31
G81	0,65	0,45	0,35
TreB	0,65	0,45	0,35
SSIIa	0,74	0,39	0,31
Ams	0,83	0,29	0,25
GPAs	0,87	0,23	0,20
AcPh	0,72	0,41	0,32
S3cl	0,83	0,29	0,25
S3CII	0,65	0,45	0,35
GBSS1	0,78	0,34	0,28
SH51	0,98	0,04	0,04
PP2	0,87	0,23	0,20
PFRuc1	0,61	0,48	0,36
Aglu	0,50	0,50	0,38
LDS	0,50	0,50	0,38
BE3	0,54	0,50	0,37
Isa	0,50	0,50	0,38
SSI	0,96	0,08	0,08
Sbe2	0,59	0,48	0,37
P3A	0,93	0,12	0,11
P4	0,96	0,08	0,08
P7	0,50	0,50	0,38
Pul3	0,54	0,50	0,37
KA43	0,52	0,50	0,37
CBG	0,98	0,04	0,04
P2	0,98	0,04	0,04
Rataan	0,74	0,33	0,26

Secara umum Kalimutu memiliki rataan kesamaan genetik paling rendah dengan varietas lain. Variasi yang luas yang terlihat pada varietas *indica* dapat disebabkan oleh bervariasinya ekosistem penanaman di Indonesia misalnya di lahan sawah, tadah hujan dan rawa (Lestari *et al.*, 2014). Secara keseluruhan antara varietas *japonica* dan *indica*, koefisien kesamaan yang paling rendah (0,4) dalam arti jarak genetik paling jauh ditemukan antara varietas *japonica* dan *indica* baik varietas elit maupun lokal, khususnya Onnuri atau Manmi dengan Cigeulis atau Fatmawati. Jadi varietas yang memiliki sifat fisiko-kimia diantara *indica* dan *japonica* akan cenderung dekat secara genetik dengan varietas subspecies lainnya meskipun tetap mengelompok dalam subspecies utamanya.

Varietas Onnuri atau Manmi (*japonica*) dengan Cigeulis atau Fatmawati (*indica*) memiliki jarak genetik yang jauh. Subklaster varietas *japonica* mengelompokkan varietas Korea (Gopum dan Samdeok) dan Cina (Hexi41), memiliki jarak genetik cukup jauh dengan padi Indonesia, sehingga dapat menjadi alternatif tetua persilangan. Dalam hal ini, perlu ditemukan solusi atas kendala genetik (*genetic barrier*) persilangan antara padi *indica* dan *japonica*.

Perbedaan antara varietas padi dalam studi ini menunjukkan status keragaman genetik yang luas antara *japonica* dan *indica* yang memisahkan keduanya berdasarkan subspecies. Informasi polimorfisme berdasarkan marka DNA ini terbukti mendukung diferensiasi dua subspecies padi berdasarkan karakter umum fenotip biji, habitat asli, dan level genetik khususnya gen ontologi dari laporan sebelumnya (Matsuo *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 2003; Johns & Mao, 2007). Keragaman genetik padi *indica* Indonesia lebih rendah dibandingkan dengan padi *japonica*. Hal ini mungkin karena sebagian besar varietas yang dilepas diperoleh dari varietas yang secara luas ditanam di berbagai daerah dan dari varietas asli Indonesia. Beberapa varietas unggul baru (VUB) padi di Indonesia berasal dari tetua persilangan jenis IR yang dikembangkan dari *International Rice Research Institute*. Sebagai contoh, asal persilangan Conde adalah IR646/IRBB7, Cigeulis dari persilangan Ciliwung/Cikapundung//IR64, dan varietas Ciliwung dikembangkan dari IR38//2*Pelita I-1/IR4744-128-4-1-2. Salah satu tetua persilangan dari Ciharang, Cigeulis, dan Pepe diketahui adalah IR64. Demikian juga varietas lokal padi yang cenderung spesifik ditanam di daerah tertentu dengan peluang kecil adanya pengaruh *gene flow*. Untuk pemuliaan padi, keragaman genetik padi *indica* Indonesia perlu diperluas melalui introduksi plasma nutfah dari berbagai daerah asal termasuk Korea, Jepang dan Cina.

KESIMPULAN

Rataan alel mayor, PIC, dan *genetic diversity indices* tergolong rendah. Matriks kesamaan genetik menunjukkan adanya jarak genetik antar varietas *japonica* dan *indica* Indonesia sehingga dapat dipertimbangkan sebagai tetua persilangan. Analisis klaster berdasarkan marka DNA berhasil mengelompokkan varietas padi menjadi dua klaster utama, *indica* dan *japonica*, dan subklaster selanjutnya memisah menurut latar belakang genetik individu.

DAFTAR REFERENSI

Avaro MRA, Tong L, Yoshida T. 2009. A simple and low-cost method to classify amylose content of rice using a standard color chart. *Plant Production Science*. 12:97-99.

Bao JS, Corke H, Sun M. 2006a. Microsatellites, single nucleotide polymorphisms and a sequence tagged site in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in nonwaxy rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical Applied Genetics*. 113: 1185-1196.

Bao JS, Corke H, Sun M. 2006b. Nucleotide diversity in starch synthase IIa and validation of single nucleotide polymorphisms in relation to starch gelatinization temperature and other

physicochemical properties in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical Applied Genetics*. 113: 1171-1183.

Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DF, Casstevens TN, Ramdoss Y, Buckler ES. 2007. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*. 23:2633-2635.

Cheng CY, Motohashi R, Tsuchimoto S, Fukuta Y, Ohtsubo H, Ohtsubo E. 2003. Polyphyletic origin of cultivated rice: based on the interspersed pattern of SINES. *Molecular Biology and Evolution*. 20: 67-75.

Doi K, Sobrizal K, Ikeda K, Sanchez PL, Kurakazu TA. 2002. Developing and evaluating rice chromosome segment substitution lines, pp. 275-287 *In* IRRRI Conference September, 16-19, 2002, International Rice Research Institute, Beijing, China.

Felsenstein J. 1985. Confidence limit on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783-791.

Garris AJ, Tai TH, Coburn J, Kresovich S, McCouch M. 2005. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics*. 169: 1631-1638.

He Y, Han Y, Jiang L, Xu C, Lu J, Xu M. 2006. Functional analysis of starch-synthesis genes in determining rice eating and cooking qualities. *Molecular Breeding*. 18:277-290.

Hori K, Suzuki K, Iijima K, Ebana K. 2016. Variation in cooking and eating quality traits in Japanese rice germplasm accessions. *Breeding Science*. 66(2): 309-318.

Johns MA and Mao L. 2007. Differentiation of two rice subspecies *indica* and *japonica*: a Gene Ontology perspective. *Functional and Integrative Genomics*. 7(2): 135-151.

Kharabian-Masouleh A, Waters DL, Reinke RF, Henry RJ. 2011. Discovery of polymorphisms in starch-related genes in rice germplasm by amplification of pooled DNA and deeply parallel sequencing. *Plant Biotechnology Journal*. 9:1074-1085.

Kharabian-Masouleh A, Waters DLE, Reinke RF, Ward R, Henry RJ. 2012. SNP in starch biosynthesis genes associated with nutritional and functional properties of rice. *Scientific Report-Uk*. 2:557-565.

Kobayashi A, Tomita K, Yu F, Takeuchi Y, Yano M. 2008. Verification of quantitative trait locus for stickiness of cooked rice and amylose content by developing near-isogenic lines. *Breeding Science*. 58: 235-242.

Kohyama K, Sodhi NS, Suzuki K, Sasaki T. 2016. Texture evaluation of cooked rice prepared from Japanese cultivars using two-bite instrumental test and electromyography. *Journal of Texture Studies*. 47: 188-198.

Kubo M, Purevdorj M. 2004. The future of rice production and consumption. *Journal of Food Distribution Research*. 35: 128-142.

Lestari P, Ham TH, Lee HH, Woo MO, Jiang WJ, Chu SH, Kwon SK, Ma KH, Lee JH, Cho YC, Koh HJ. 2009. PCR marker-based evaluation of eating quality of cooked rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 57 (7): 2754-2762.

Lestari P, Koh HJ. 2013. Evaluasi kandungan protein dan sifat pasta beras *japonica* dengan marka DNA. *Berita Biologi*. 12(2): 141-152.

Lestari P, Reflinur, Koh HJ. 2014. Prediction of physicochemical properties of Indonesian *indica* rice using molecular markers. *HAYATI Journal of Biosciences*. 21(2): 76-86.

Lestari P, Jiang W, Chu SH, Reflinur, Sutrisno, Kusbiantoro B, Kim B, Piao R, Cho YC, Koh HJ. 2015. DNA markers for eating quality of *indica* rice in Indonesia. *Plant Breeding*. 134: 40-48.

Liu J. 2001. Power Marker V3.25 Manual, <http://www.powermarker.net>.

Liu K, Muse SV. 2005. PowerMarker: integrated analysis of environment for genetic diversity in core collection accessions of wild barley, *Hordeum vulgare* ssp. spontaneum. *Hereditas*. 136: 67-73.

Luo J, Jobling SA, Millar A, Morell MK, Li Z. 2015. Allelic effect on starch structure and properties of six starch biosynthesis genes in a rice recombinant inbred line population. *Rice*. 8: 15.

Matsuo T, Futsuhara Y, Kikuchi F, Yamaguchi H. 1997. *Science of the Rice Plant, Food and Agriculture*. Policy Research Center, Tokyo.

Murray MG, Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Research*. 8: 4321-4325.

Ohtsubo K, Nakamura S, Imamura T. 2002. Development of the primer sets for identification of a rice variety, Koshihikari by PCR. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*. 76: 388-397.

- Ohstubo K, Nakamura S, Okadome H. 2003. Investigation on estimation of rice palatability by DNA analysis (studies on estimation of rice palatability by DNA analysis part I). *Nippon Nogeikagaku Kaishi*. 50:122–132.
- Ohtsubo K, Nakamura S. 2007. Cultivar identification of rice (*Oryza sativa* L.) by PCR application to processed rice product. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 55(4): 1501-1509.
- Palanga KK, Traore K, Bimpong K, Jamshed M, Kulama MAP. 2016. Genetic diversity studies on selected rice varieties grown in Africa based on aroma, cooking and eating quality. *African Journal of Biotechnology*. 15:1136–1146.
- Suprihatno B, Daradjat AA, Satoto. 2010. Deskripsi varietas padi. Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Sukamandi, Subang.
- Tan Y, Sun M, Corke H. 2002. Physicochemical properties of an elite rice hybrid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82:1628–1636.
- Tian ZX, Yan CJ, Qian QA, Yan S, Xie HL, Wang F, Xu JF, Liu GF, Wang YH, Liu QQ, Tang SZ, Li YJ, Gu MH. 2010. Development of gene-tagged molecular markers for starch synthesis-related genes in rice. *Chinese Science Bulletin*. 55:3768–3777.
- Yan C, Tian S, Zhang Z, Han Y, Chen F, Li X, Gu M. 2007. The source of genes related to rice grain starch synthesis among cultivated varieties and its contribution to quality. *Agricultural Sciences in China*. 6:129–136.
- Zeng D, Yan MX, Wang YH, Liu XF, Qian Q, Li JY. 2007. Du1, encoding a novel Prp 1 protein regulates starch biosynthesis through affecting the specificity of Wxb pre-mRNAs in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology*. 65: 501–509.