

EVALUASI KANDUNGAN PROTEIN DAN SIFAT PASTA BERAS JAPONICA DENGAN MARKA DNA * [Evaluation of protein content and pasting properties of japonica rice using DNA marker]

Puji Lestari¹✉ and Hee-Jong Koh²

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian,
Jl. Tentara Pelajar No. 3A Bogor 16111

²Seoul National University, San56-1, Seoul 151-921, South Korea
E-mail: plestari129@yahoo.com

ABSTRACT

An evaluation of protein content and pasting properties of rice using molecular markers approach is still limited. This study was aimed to evaluate protein content and pasting properties of japonica rice using DNA marker in complement to conventional tools. This study was further analysis based on the data of protein content and pasting properties of 22 japonica varieties and genotyping data using 30 DNA markers. Multiple regression analysis was performed to formulate equations to estimate the protein content and pasting properties. As a result, the protein content and Rapid Visco Analyzer (RVA) pasting properties values of 22 varieties demonstrated in the range of japonica rice with high variation. Correlation between protein content and RVA pasta properties showed differential profiles. Several type of DNA markers tested in this study showed allele variation among varieties. To estimate the protein content and several parameters of pasting properties of japonica rice, six marker sets in the form of model equations were successfully developed. High resolutions of equations with significant R^2 in range of 0.95 - 0.99 showed their potency to predict rice physicochemical properties. These developed marker sets are an initial step which needs further validation in order to be able for evaluation of the physicochemical properties in early generation of breeding and germplasm collection of japonica rice in the future.

Key word: DNA marker, japonica rice, pasting properties, protein content, regression equation

ABSTRAK

Evaluasi kandungan protein dan sifat pasta beras menggunakan pendekatan marka molekuler masih terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi kandungan protein dan sifat pasta beras japonica dengan marka DNA untuk melengkapi metoda konvensional. Studi ini merupakan analisis lanjutan berdasarkan data kandungan protein dan sifat pasta 22 varietas padi japonica dan data *genotyping* dengan total 30 marka DNA. Analisis regresi ganda selanjutnya dilakukan untuk membuat formulasi persamaan untuk menduga kandungan protein dan sifat pastanya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai kandungan protein dan sifat pasta yang diukur dengan *Rapid Visco Analyzer* (RVA) dari 22 varietas padi mempunyai kisaran dalam varietas japonica dengan variasi tinggi. Korelasi antara kandungan protein dan sifat pasta menunjukkan profil diferensial. Sejumlah tipe marka DNA yang diujikan menunjukkan variasi alel diantara varietas. Untuk menduga kandungan protein dan parameter sifat pasta padi japonica, enam set marka dalam bentuk persamaan regresi berhasil dibuat. Resolusi yang tinggi dari persamaan tersebut dengan nilai signifikan R^2 dalam selang 0,95–0,99 menunjukkan potensi dari enam set marka tersebut untuk memprediksi sifat fisiko-kimia beras. Set marka DNA ini merupakan langkah awal yang memerlukan validasi dalam studi selanjutnya sehingga berguna untuk mengevaluasi sifat fisiko-kimia generasi awal dalam pemuliaan dan koleksi plasma nutfah padi japonica di masa depan.

Kata kunci: kandungan protein, marka DNA, padi japonica, persamaan regresi, sifat pasta

PENDAHULUAN

Padi merupakan makanan pokok hampir separuh penduduk dunia dan berpengaruh terhadap ekonomi global. Padi sesuai kultivar grup dapat dibedakan berdasarkan karakter genetik, morfologi, dan sifat fisiko-kimianya. Sifat fisiko-kimia pati menentukan mutu rasa (palatabilitas) beras masak atau nasi dan mutu masakan (*cooking*). Pati merupakan komponen utama butir beras, sedangkan komponen minor terbanyak adalah protein dan lipid yang masing-masing sekitar 4,5 - 10% dan 0,5% (Derycke *et al.*, 2005). Kandungan amilosa juga ikut menentukan

sifat fisiko-kimia pati beras, yang secara reology menunjukkan bahwa granula pati beras dengan kandungan amilosa tinggi akan lebih kuat dan kaku dan sebaliknya. Granula pati yang kuat dan kaku menghasilkan nasi lebih keras dan tidak pulen, sebaliknya granula pati beras yang lemah akan menghasilkan nasi pulen dan lembek.

Kandungan protein sebagai faktor paling erat hubungannya dengan palatabilitas/mutu rasa beras japonica (Yu *et al.*, 2008), menunjukkan korelasi negatif dengan nilai palatabilitas. Dalam hubungannya dengan sifat fisiko-kimia beras lainnya, variasi

kandungan protein menyebabkan perbedaan viskositas pasta pati beras karena pengaruhnya pada granula pati saat mengembang dan karakter kekakuannya (Derycke *et al.*, 2005). Dalam hal ini, profil sifat pasta dapat digunakan sebagai indikasi mutu rasa nasi dan mutu masakan (*cooking*). Studi sebelumnya menunjukkan adanya korelasi langsung antara sifat pasta dengan mutu rasa nasi japonica (Kuo *et al.*, 2001). Pada awalnya profil sifat pasta digunakan untuk mempelajari pengaruh protein terhadap sifat pasta tepung beras (Meadow, 2002). Viskositas menurun sepanjang titik kurva ketika tepung diuji dengan agen pereduksi yang memutus ikatan disulfida dalam protein. Peran protein terhadap mutu masakan berdasarkan keberadaan agen pereduksi air waktu memasak nasi ternyata meningkatkan kepuhlenan semua kultivar padi yang diuji.

Sifat pasta yang ditentukan dengan *Rapid Visco Analyzer* (RVA) ikut berperan dalam menentukan sifat fisiko-kimia tepung beras. Profil pasta yang merupakan fenomena yang mengikuti gelatinisasi dapat memprediksi sifat fungsional pati beras. Sifat pasta RVA yang ditentukan berdasarkan viskositas meliputi parameter suhu awal pasting, waktu dan viskositas puncak, viskositas akhir, viskositas jatuh (*breakdown viscosity*, BDV) dan viskositas balik (*setback viscosity*, SBV). Tiap sifat pasta menunjukkan kondisi tertentu pati. Waktu dan viskositas puncak mengindikasikan daya ikat air pati dan disintegrasinya, BDV menunjukkan ketahanan terhadap pemanasan, SBV sebagai indikasi potensi retrogradasi dan sineresis, dan viskositas akhir memberikan indikasi kemampuan pembentukan gel (Lee *et al.*, 2001; Allahgholipour *et al.*, 2006; Syamsir *et al.*, 2012).

Beberapa metoda umum digunakan untuk menentukan sifat fisiko-kimia beras, namun masih mempunyai kelemahan. Alat/mesin pengukur kandungan protein, amilosa dan karakter pasta memerlukan jumlah sampel analisis cukup banyak dan terbatas pada sejumlah aksesori sampel yang kecil guna mendukung uji organoleptik mutu rasa nasi. Beberapa studi tentang prediksi mutu rasa nasi secara

umum baik berdasarkan Toyo meter ataupun organoleptik yang dikonversi ke dalam set marka molekuler sudah dilakukan (Ohtsubo *et al.*, 2002; 2003; Lestari *et al.*, 2009, 2012). Namun demikian sampai sekarang pendekatan set marka khusus sifat fisiko-kimia beras japonica belum diteliti secara mendalam. Karena sifat kompleks pati beras secara genetik, prediksi mutu rasa nasi japonica dengan model matematika biasa masih dirasa sulit.

Beberapa marka DNA sering digunakan untuk analisis mutu rasa nasi ataupun sifat fisiko-kimia beras adalah *simple sequence repeat* (SSR), *sequence tagged site* (STS) dan *single nucleotide polymorphism* (SNP). Marka yang didisain dari lokasi di genom secara acak dan biasa disebut marka universal seperti SSR telah lama diaplikasikan untuk *genotyping*, analisis keragaman genetik, pemetaan dan lainnya. Perkembangan selanjutnya, marka fungsional merupakan marka DNA yang diperoleh dari motif sikuen yang mempunyai karakter fungsional dianggap lebih superior daripada marka acak dalam genom. Marka fungsional seperti SSR, STS ataupun SNP yang berasosiasi dengan gen terkait sifat fisiko-kimia beras telah banyak dikembangkan (Liu *et al.*, 2004; Bao *et al.*, 2006; Lestari *et al.*, 2009). Penelitian ini bertujuan untuk menduga sifat fisiko-kimia terutama kandungan protein and sifat pasta padi japonica berdasarkan pendekatan marka DNA dalam set model persamaan. Untuk mendukung formulasi set marka, kandungan protein dan sifat pasta RVA varietas padi yang diuji juga dievaluasi.

BAHAN DAN CARA KERJA

Materi genetik dan persiapan sampel

Total 22 beras japonica yang digunakan dalam penelitian ini sama dengan varietas yang digunakan untuk formulasi set marka untuk evaluasi mutu rasa beras japonica (Lestari *et al.*, 2009). Padi ditanam di lapangan percobaan Suwon, Korea Selatan sesuai standar penanaman padi sawah dan berasnya dipertahankan kadar airnya sekitar 15% untuk analisis sifat fisiko-kimia. Untuk isolasi DNA, padi ditanam di rumah kaca dengan pengaturan pencahayaan, suhu

dan kelembaban sesuai pertumbuhan tanaman padi selama 5 minggu.

Pengukuran sifat fisiko-kimia

Sampel beras untuk analisis fisiko-kimia disosoh sampai 91%. Kandungan protein ditentukan berdasarkan nitrogen total setelah dikonversi (dikalikan 5,95) berdasarkan hasil protein dari metode micro-Kjeldahl (AOAC, 1995). Kandungan amilosa dihitung berdasarkan nilai absorban relatif pewarna *starch-iodine* dalam larutan digesti tepung beras lolos 100 mesh berdasarkan metoda Perez and Juliano (Chen *et al.*, 2007). Sifat pasta ditentukan dengan mengukur pada *Rapid Visco Analyzer* (RVA) berdasarkan manual sesuai rekomendasi (NewPort Sci. Co., Australia). Sifat pasta tepung beras ditentukan dalam 6 parameter yaitu viskositas puncak (*peak viscosity*, PV), viskositas awal (*hot paste viscosity*, HPV), viskositas akhir (*cool paste viscosity*, CPV), viskositas jatuh (*breakdown viscosity*, BDV = PV - HPV), dan viskositas balik (*setback viscosity*, SBV = CPV - PV), sesuai prosedur dari Bao dan Xia (1999).

Isolasi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan pada daun padi muda dan sehat yang dipanen, dibekukan dalam nitrogen cair dan disimpan pada -80°C. Jaringan daun digerus dalam nitrogen cair menjadi serbuk halus, selanjutnya DNA genomik diekstraksi menggunakan metoda *cetyl-trimethyl ammonium bromide* (CTAB) berdasarkan protokol dari Murray and Thompson (1980). Kualitas dan kuantitas DNA diukur menggunakan spektrofotometer Nano Drop® ND-1000 (Nano Drop, Willington, Delaware, USA) dan dimigrasikan pada 0,8% gel agarosa.

Amplifikasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Analisis genotip menggunakan 30 primer hasil pengembangan sebelumnya yang terdiri dari STS, SSR, Indels (*insertion/deletions*) dan CAPS/dCAPS (*cleaved amplified polymorphic sequence/derived cleaved amplified polymorphic sequence*) (Ohtsubo *et al.*, 2002; 2003; Bao *et al.*, 2006; Ohtsubo dan Nakamura, 2007; Lestari *et al.*, 2009) yang digunakan untuk evaluasi mutu rasa beras japonica

(Lestari *et al.*, 2009) dan diringkas pada Tabel 1. Reaksi PCR dibuat dalam volume total 20 µl dengan komposisi 2 µl DNA pada 20 ng/µl, 2 µl 10X bufer mengandung 25 mM MgCl₂, 1 µl 2,5 mM dNTPs, 1 unit Taq Polymerase (Intron Biotechnology, Korea), dan 1 µl primer *forward* dan *reverse* (10 µM). Amplifikasi DNA dilakukan dengan mesin PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc.USA) dengan skema amplifikasi terdiri dari 35 siklus (96°C selama 1 menit, 62°C selama 1 menit, dan 72°C selama 2 menit) dengan perpanjangan final pada 72°C selama 5 menit. Produk PCR hasil amplifikasi primer STS dan dCAPS/CAPS dielektroforesis masing-masing pada 3% dan 1,5% gel agarosa. Sedangkan amplicon primer SSR dan Indels dimigrasikan pada 4% gel poliakrilamid yang divisualisasikan melalui *staining* dalam larutan etidium bromida.

Analisis statistika

Hasil amplifikasi primer STS dalam penelitian ini merupakan marka dominan yang menghasilkan pita DNA “ada” (1) dan “tidak ada” (0). Pita DNA dari primer kodominan seperti SSR, Indels dan CAPS/dCAPS juga dikonversi ke data biner. Pola pita yang dihasilkan tersebut dirubah ke dalam nilai biner sebagai 1 (alel referensi) dan 0 (alel hasil mutasi). Analisis korelasi antar parameter dilakukan untuk menentukan parameter fisiko-kimia yang paling berpengaruh. Semua data molekuler 22 varietas padi dengan 30 marka molekuler yang dilaporkan di penelitian sebelumnya (Lestari *et al.*, 2009) dan dalam studi ini dikonversi ke dalam bentuk biner. Dalam penelitian ini analisis dititikberatkan untuk membuat formulasi persamaan dari set marka menggunakan data biner total primer dan data fisiko-kimia dianalisis statistik dengan analisis regresi ganda. Analisis dilakukan menggunakan perangkat lunak SAS (2001).

Secara singkat data biner total 30 marka dan tiap data kuantitatif fisiko-kimia di buat dalam file Excel kemudian diexport ke file perangkat lunak SAS sesuai instruksi untuk menentukan kombinasi marka yang signifikan. Hasil analisis menghasilkan keluaran kombinasi marka berdasarkan jumlah mar-

Tabel 1. Primer dan sekuensnya untuk amplifikasi PCR yang digunakan dalam studi ini.

Primer	Sikuen	
	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
A6	CCAGCTGTACGCCTGTACTAC	CCAGCTGTACGTCTTCCCCAGC
A7	TGCCTCGCACCAGAAATAG	TGCCTCGCACCATGAG
B1	GTTTCGCTCCTACAGTAATTAAGGG	GTTTCGCTCCCATGCAATCT
B43	GGCCGGCATGACTCAC	ACTGGCCGGCATCAAGAC
F6	ACCACTCCATATATATCATCCAAAG	ACCACTCCATATCACCACAAGG
G4	GAGACCGATATGCGATT	GTGGTGTTTAGATCCAGAGACTTA
G22	CTCACTCAAATTTACAGTGCATTTTCTTG	AGGGCCATGATACAAGACTCTGT
G28	GGCGGTCTGTTCTGCGAT	GGAGAATCCCACAGTAAGTTTTTCTTTG
J6	GTCGGAGTGGTCAGACCG	GTCGGAGTGGATGGAGTAGC
M2CG	ACAACGCCTCCGATGA	ACAACGCCTCCGACAACAAGAT
M11	GTCCACTGTGACCACAACAT	GTCCACTGTGGGGATTGTT
P5	ACAACGGTCCGTCCTTGCTT	ACAACGGTCCAACAGATACTTTTGA
S13	GTCGTTCTGTGGTTAGGACAGGGT	GTCGTTCTGTGGTGTCTCAGAT
T16	GGTGAACGCTGTAGTTGGAATATA	GGTGAACGCTCAGATTTAAATATAAT
WK9	CCCGCAGTTAGATGCACCATT	CCCGCAGTTAGATCAAGTGGC
E30	TACCTGGTTGATGTATACAGATCTGGTT	ATCCCTCGATCCCTCTAGCATTAT
B7	CAGGTGTGGTTACAAGGATGA	CAGGTGGTTCACGGCCCTT
G49A	AATCCAGACATGAAATTTATATGCAGATA	AATCCAGACATGTTGTCCTCAATTTTTG
G81	TACCTGAACCAGCAAGCATGCGCG	TACCTGAACCAGTATAATCTTTG
P3	AACGGGCCAAAAACGGAGGT	AACGGGCCAACGCAG
SSIIa	F7:CTGGATCACTTCAAGCTGTACGAC	R1:GCCGGCCGTGCAGATCTTAAC
	F22:CAAGGAGAGCTGGAGGGGGC	R21:ACATGCCGCGCACCTGGAA
S3cl	CCACTCTCATGTCCCTTGAAC	GCCATGACATTTGGACAT
S3cll	TTCCATGATGTGCCACTCTC	GGACAAATGTTTTCAGTGAATAAA
TreB	CACTCCAGTTCTCTGCTCAA	CACCTCCAAAACGAATATGG
AMs	CTTCCAAGGACCCCATCCT	CCCAACATCTCCGTCAGAAT
GPA	CCAAATACGCGGCCTTCT	AGTTTCTGGGCTCGGAGGA
GBSSI	CAAATAGCCACCCACACCAC	CTTGCAGATGTTCTTCTCGATG
AcPh	AGTTGTGGTTAAGCATAGG	ATTGTCCTTTTCTTTAAAGTTTATTA
CBG	AGCTTCCCTAATGGCTTCGT	ATTTGCCAACTTTTGGATGG
SH51	ATTCTTGATGAAAATAATTAAGTAG	GGTTAACCATCTTATAAAATTTGTC

Keterangan *= primer SSIIa merupakan primer SNP (*single nucleotide polymorphism*) yang terdiri 2 pasang primer yaitu dua *forward* (F7, F22) dan dua *reverse* (R1, R21)

ka dan nilai R^2 dari yang terkecil sampai tertinggi. Pemilihan jumlah dan kombinasi marka tiap parameter fisiko-kimia dilakukan berdasarkan nilai R^2 tertinggi signifikan yang secara relatif mempunyai jumlah marka minimum. Kemudian analisis linier regresi ganda dengan SAS dilakukan pada tiap kombinasi marka yang telah dipilih untuk tiap sifat fisiko-kimia baik kandungan protein maupun masing-masing sifat pasta. Nilai akhir sifat fisiko-kimia se-

bagai variabel “dependent”, dan data marka sebagai variable “independent”. Keluaran analisis adalah estimasi parameter tiap marka dengan nilai R^2 yang signifikan berdasarkan nilai t dalam kombinasi sejumlah marka untuk tiap sifat fisiko-kimia.

Rumus umumnya adalah $Y = a + bX_1 + cX_2 + dX_3 + \dots + X_n$.

Dimana Y adalah sebagai hasil perhitungan nilai kuantitatif sifat fisiko-kimia yang diprediksi;

a adalah nilai “intercept” total marka;

b, c dan seterusnya adalah nilai estimasi parameter tiap marka;

X₁, X₂, ..., X_n adalah data biner (nol (0) atau satu (1)) dari alel yang dihasilkan tiap marka. Nilai positif dan negatif tergantung dari tanda dari nilai estimasi parameter untuk tiap marka.

HASIL

Evaluasi kandungan protein dan sifat pasta

Sebanyak 22 varietas padi japonica menunjukkan variasi yang tinggi kandungan protein maupun profil sifat pasta RVA-nya (Tabel 2). Rataan nilai kandungan protein, CPV, BDV, PV, SBV dan HPV masing-masing 6,83%, 232,62 RVU, 89,19 RVU, 242,37 RVU, -9,75 RVU dan 153,17 RVU. Selang kandungan protein adalah 5,91 - 7,89% sedangkan BDV dari 39,83 sampai 123,08 RVU dan SBV antara -94,75 - 25 RVU. Nilai parameter sifat pasta didukung oleh suhu pasta dan suhu *peak* yang konsisten sesuai karakter pasta tiap varietas selama pengukuran yaitu masing-masing dalam selang 4,71 - 6,53 menit dan 67,96 - 77,43°C. Untuk mengetahui adanya pengaruh kandungan protein terhadap nilai sifat pasta tepung beras, analisis korelasi dilakukan. Ada korelasi positif antara kandungan protein dengan BDV dan PV, sebaliknya antara kandungan protein dengan CPV, HPV dan SBV menunjukkan korelasi negatif (Gambar 1). Data fisiko-kimia tersebut penting untuk mendukung dalam analisis asosiasi dengan data molekuler dari marka untuk pembuatan set marka.

Analisis genotip dengan marka DNA

Uji genotipik 22 varietas japonica yang memiliki mutu rasa bervariasi dengan menggunakan marka DNA hasil pengembangan sebelumnya telah dilaporkan di Lestari *et al.* (2009). Ringkasan hasil analisis 30 marka molekuler dalam nilai biner (kode nol dan satu) ditampilkan pada Tabel 3. Secara umum beberapa alel jarang ditemukan di varietas japonica dan sebaliknya. Terutama insersi alel CTTT di lokus TreB, SSR (CT)27 di lokus AMs, (CT)11 di lokus GPA, (CT)17 di lokus GBSSI dan alel G pada lokus AcPh. Hal ini menggambarkan bahwa distribusi alel tidak memperhitungkan sifat fisiko-kimia beras. Varietas dengan kandungan protein rendah seperti Koshihikari, Ilpum, Samgwang cenderung mempunyai alel T, dan tidak memiliki insersi di lokus TreB. Enam belas varietas mempunyai alel T pada lokus AcPh, dan terlihat jelas varietas Jepang yaitu Koshihikari dan Hitomebore ternyata mempunyai kesamaan pola dan berbeda dengan varietas padi Korea umumnya. Kecuali SSIIa, distribusi alel dari gen pensintesis pati yang lain adalah monomorfik di padi japonica, menggambarkan bahwa marka tersebut (Bao *et al.*, 2006) tidak mampu membedakan varietas japonica. Contoh pola pita ampikon yang dihasilkan dari marka dapat dilihat di Gambar 2. Bersama dengan marka STS yang berasosiasi dengan palatabilitas (Ohtubo *et al.*, 2002; 2003), total 30 marka (Lestari *et al.*, 2009) diikuti sertakan dalam analisis regresi untuk estimasi kandungan protein dan sifat pasta berdasarkan 22 varietas beras japonica.

Tabel 2. Rataan kandungan protein dan sifat pasta varietas padi japonica yang digunakan dalam studi ini.

Parameter	Rataan ± SD	Selang	CV (%)
Kandungan protein	6,83 ± 0.61**	5,91 – 7,89	8,89
CPV	232,62 ± 42.08**	93,53 – 284,39	18,09
BDV	89,19 ± 21.16**	39,83 – 123,08	23,73
PV	242,37 ± 28.52**	181,89 – 298,95	11,77
SBV	-9,75 ± 31.08 ^{tn}	-94,75 – 25,00	36,56
HPV	153,17 ± 30.99**	62,20 – 208,80	20,23

**beda nyata pada level 1%, ^{tn} tidak berbeda nyata

Tabel 3. Data molekuler dari 30 marka yang diobservasi pada 22 varietas padi japonica dalam bentuk nilai biner*.

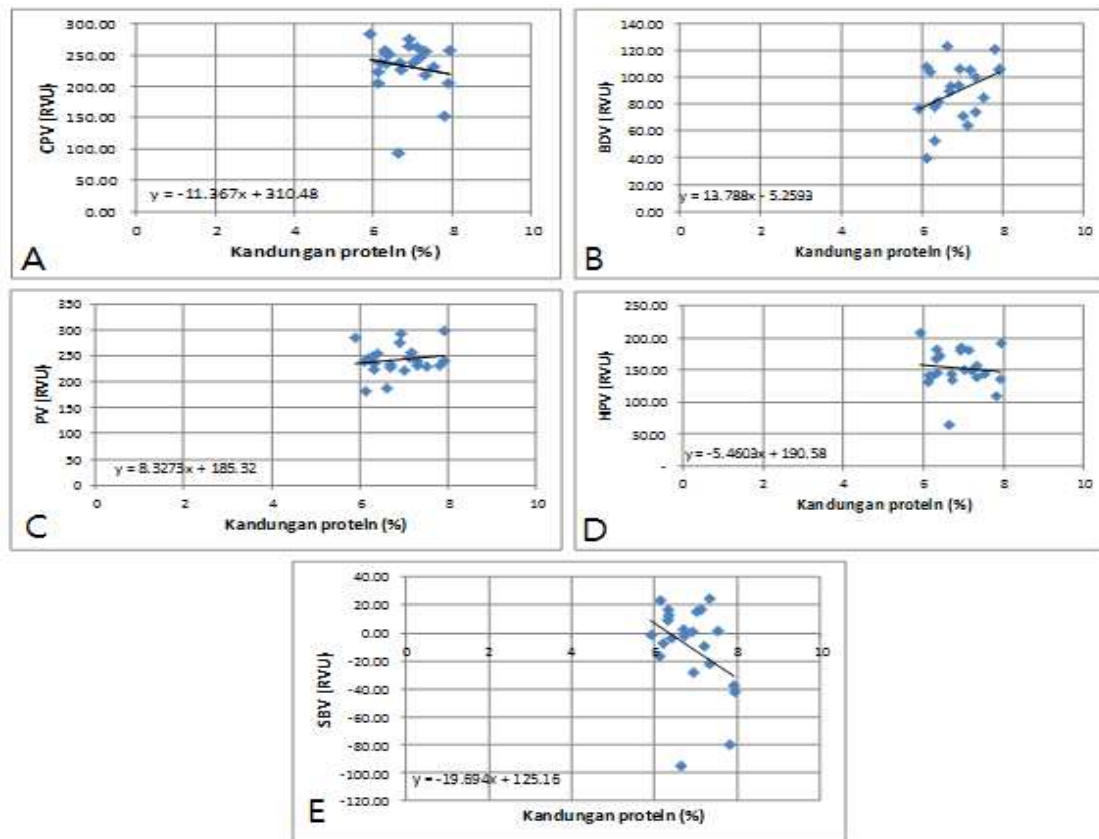
Varietas	A6 ¹	A7 ¹	B1 ¹	B43 ¹	E30 ¹	F6 ¹	G4 ¹	G22 ¹	G28 ¹	J6 ¹	M11 ¹	M2CG ¹	P5 ¹	S13 ¹	T16 ¹	WK9 ¹	P3 ¹	B7 ¹	G49A ¹	G81 ¹
Koshihikari	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
Kopum	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
Samgwang	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0
Ipum	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
Chucheong	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0
Dongjin	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
Sinkemo	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
Hwaseong	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Hwacheong	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0
Dobong	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
Samnam	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0
Palkong	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Hitomebore	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Bekjinju1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
Seonong4	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1
Onnuri	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0
Manmi	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
Giho	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
Geman	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1
Nakdong	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Hexi41	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
Samdeok	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0

Tabel 3. Lanjutan

Varietas	TreB	CBG	TreB	SSIIa	AMs	GPA	AcPh	S3cl	S3CII	GBSSI	SH51
Koshihikari	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Kopum	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Samgwang	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1
Ilpum	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1
Chucheong	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
Dongjin	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
Sinkemo	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1
Hwaseong	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
Hwacheong	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
Dobong	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1
Samnam	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1
Palkong	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
Hitomebore	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1
Bekjinju1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1
Seonong4	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
Onnuri	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1
Manmi	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1
Giho	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1
Geman	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1
Nakdong	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1
Hexi41	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
Samdeok	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

*Data molekuler ini telah dilaporkan dalam Lestari *et al.* (2009) namun ditampilkan dalam bentuk biner untuk total 30 marka

¹ada pita DNA (1), tidak ada pita DNA (0); SSIIa:TT:GGTTTC (0), GC:GGGCTC (1); TreB: insersi CTTT (1), tidak ada insersi (0); S3CII: perubahan basa T (1) ke G (0); S3CI: tidak ada delesi (1), delesi CTC (0); AMs: (CT)31 (1), (CT)27 (0); GPA: (CT)26 (0),(CT)11 (1); GBSSI: (CT)18 (1),(CT)17 (0); AcPh: perubahan basa dari T (1) ke G (0); SH51:pPerubahan basa dari A (0) ke T (1); CBG: (CTT)19 (1), (CTT)8 (0)



Gambar 1. Korelasi antara kandungan protein dan sifat pasta RVA tepung beras. (A) Kandungan protein dan CPV, (B) Kandungan protein dan BDV, (C) Kandungan protein dan PV, (D) Kandungan protein dan HPV, (E) Kandungan protein dan SBV.

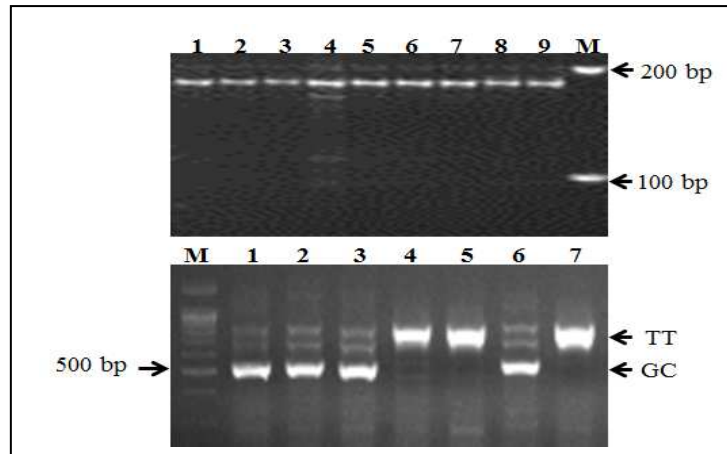
Formulasi set marka DNA

Analisis linier regresi biasa menunjukkan bahwa marka DNA secara individu tidak dapat membedakan sifat fisiko-kimia beras japonica, untuk itu analisis regresi ganda dilakukan berdasarkan 30 marka. Kombinasi marka dengan nilai R^2 tinggi yang mengandung marka yang signifikan ($P < 0,01$) dipilih untuk digunakan sebagai variabel independen dalam membuat formulasi.

Akhirnya persamaan model berhasil dibuat untuk memprediksi kandungan protein dan sifat pasta RVA dengan resolusi signifikan tinggi. Nilai R^2 paling rendah adalah 0,95 untuk estimasi BDV dan bahkan nilai regresi untuk PV dan HPV adalah 0,99. Persamaan regresi tersebut memudahkan dalam pelaksanaan analisis mengingat jumlah marka dalam set pendeteksi paling banyak 15 marka (kandungan

protein dan PV), kemudian berturut-turut 14 marka (HPV), 13 marka (CPV dan SBV) dan hanya 12 marka (BDV). Hal ini menunjukkan bahwa nilai kandungan protein dan parameter sifat pasta (PV, HPV, CPV, BDV, SBV) dapat diduga dengan resolusi tinggi dengan persamaan regresi pada analisis genotip menggunakan marka tersebut. Hal penting adalah beberapa marka hasil pengembangan sendiri (Lestari *et al.*, 2009) menunjukkan potensinya karena selalu memberi kontribusi dalam set marka pada semua enam persamaan model (AcPh dan GPA) dan beberapa ada pada sebagian persamaan regresi (TreB, AMs, S3cI, GBSSI). Sebagian besar marka STS hasil pengembangan Ohtsubo *et al.* (2002; 2003) juga berperan dalam terbentuknya persamaan regresi.

Set marka dalam model persamaan tersebut dapat sebagai kandidat potensial untuk memprediksi



Gambar 2. Contoh pola pita hasil amplifikasi PCR beberapa varietas padi japonica dengan marka DNA yang terpilih dalam set marka. (A) Primer GPA, dimana M: ladder DNA 100 bp, 1: Koshihikari, 2:Gopum, 3:Samgwang, 4: Ilpum, 5:Chucheong, 6:Hwaseong, 7:Hitomebore, 8: Giho, 9: Geuman; (B) Primer SSIIa, dimana M: ladder DNA 100 bp, 1: Koshihikari, 2:Gopum, 3:Samgwang, 4: Ilpum, 5:Chucheong, 6:Hwaseong, 7:Hitomebore.

Tabel 4. Persamaan model set set marka untuk evaluasi kandungan protein dan sifat pasta yang memiliki koefisien signifikan dari nilai t tiap marka melalui analisis linier regresi ganda

Parameter	R^2 ($P < 0,001$)	Persamaan regresi
Kandungan protein	0,96	$Y = -0,08684 + 0,29297(B1) + 0,40589(B43) + 0,73523(E30) - 0,52430(F6) - 0,72031(G28) - 0,31180(J6) + 2,12309(M11) + 1,31090(M2CG) - 0,58746(P5) + 1,82238(WK9) + 2,11808(SSIIa) + 0,27360(TreB) + 0,60210(GPA) + 2,36726(AcPh) + 1,72159(AMs)$
Final viscosity (CPV)	0,98	$Y = 408,36377 - 30,79181(A6) - 52,35771(A7) - 20,56804(B1) + 25,66550(B43) - 36,81424(F6) + 92,55712(G4) - 71,76593(G22) - 43,84964(J6) + 135,95332(P5) - 34,67305(SSIIa) + 13,63171(TreB) - 58,62226(GPA) - 37,04857(AcPh)$
Breakdown (BDV)	0,95	$Y = -94,83805 + 19,64441(A7) + 19,82414(B1) - 32,63120(B43) - 43,78173(G4) + 27,99793(G28) + 56,88896(M11) + 10,14517(M2CG) + 76,75568(SSIIa) - 31,19180(S3cI) + 52,78330(GPA) + 79,51526(GBSSI) + 57,16663(AcPh)$
Peak viscosity (PV)	0,99	$Y = 112,51255 - 31,74561(A7) + 16,49981(B43) + 33,98017(E30) + 23,41282(G4) - 31,56849(G22) - 12,59017(G28) - 33,60093(J6) + 34,21896(M11) + 17,05941(M2CG) + 124,46655(P5) + 27,16985(WK9) + 59,86900(SSIIa) + 15,53685(S3cI) + 56,13896(AMs) + 31,79147(AcPh)$
Hot paste viscosity (HPV)	0,99	$Y = 240,75464 - 36,77810(A6) - 35,49296(A7) - 37,56220(B1) + 36,21105(B43) + 100,81759(G4) - 47,60380(G22) - 59,50820(J6) + 111,88594(P5) + 33,59336(WK9) - 20,90862(S3cI) - 43,05909(GPA) + 5,61241(SSIIa) + 22,42820(AMs) - 14,02661(F6)$
Setback (SBV)	0,96	$Y = 339,71701 - 29,60822(A6) - 16,31249(A7) - 47,57819(E30) - 32,10477(F6) + 54,03978(G4) - 39,65439(G22) - 55,51411(M11) - 45,20057(M2CG) - 46,51399(WK9) - 119,89070(SSIIa) - 17,52896(GPA) - 79,89105(GBSSI) - 91,81636(AcPh)$

sifat fisiko-kimia aksesori padi yang diinginkan. Misalnya ada koleksi varietas padi yang akan ditentukan kandungan proteinnya tanpa mengukur dengan metode Kjeldahl, melainkan dengan set marka yang

telah dibuat (Tabel 4). DNA genomik varietas padi tersebut diamplifikasi masing-masing dengan marka yang tercakup dalam persamaan khusus untuk menduga kandungan protein (B1, B43, E30, F6,

G28, J6, M11, M2CG, P5, WK9, SSIIa, TreB, GPA, AcPh dan AMs). Hasil amplifikasi PCR tiap marka dikonversi ke data biner mengikuti keterangan Tabel 3. Dengan mengganti kode marka dalam persamaan sebagai nilai biner (nol atau satu) sesuai hasil analisis PCR dan mengikuti perhitungan persamaannya, maka nilai kandungan protein tiap varietas tersebut dapat dihitung. Perhitungan yang sama dilakukan untuk menduga nilai sifat pasta RVA varietas padi lainnya.

PEMBAHASAN

Sifat fisiko-kimia pati beras seperti kandungan protein dan sifat pasta merupakan indikator tak langsung untuk evaluasi mutu rasa nasi dan mutu masakannya dari varietas padi (Champagne, 1997). Dibandingkan dengan sifat pasta pati seperti PV, HPV, CPV, BDV dan SBV, kandungan protein lebih erat korelasinya dengan mutu rasa nasi (Yu *et al.*, 2008). Varietas japonica dalam studi ini mempunyai tekstur nasi pulen berdasarkan nilai sifat pasta RVA yang rendah khususnya SBV (rata-rata – 9,75 RVU) and BDV (rata-rata 39,83 RVU). Nilai parameter RVA dalam studi ini juga lebih rendah dari pada hasil dari Allahgholipour *et al.* (2006). Sebagai contoh, khusus varietas superior Koshihikari, mempunyai kandungan protein rendah dan beberapa parameter sifat pasta RVA lebih tinggi dibandingkan dengan varietas japonica lainnya. Rendahnya kandungan protein dan meningkatnya sifat lengket RVA serta tekstur, menyebabkan tingginya palatabilitas. Jadi, sifat fisiko-kimia pati beras bervariasi tergantung varietas yang umumnya memiliki perbedaan level genetik. Namun demikian sampai saat ini sifat fisiko-kimia berbagai varietas padi umumnya ditentukan secara konvensional yang memerlukan jumlah sampel beras banyak dan waktu lama. Marka DNA yang berkembang pesat dapat menjadi metoda alternatif untuk evaluasi secara cepat dan efisien.

Variasi nukleotida merupakan basis utama dari perubahan fenotip yang dapat diturunkan, sehingga variasi di genom padi menjadikan pengembangan marka lebih efektif. Oleh karena itu se-

bagian besar marka untuk sifat fisiko-kimia beras dikembangkan berdasar analisis polimorfisme dan asosiasi (Bao *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2012). Marka yang diuji dalam studi ini menunjukkan polimorfisme di antara varietas japonica (Tabel 3). Sebagai contoh, alel dari SSIIa yang berkorelasi tinggi dengan suhu gelatinisasi, menghasilkan variasi allele TT/GC. Diketahui bahwa beras dengan suhu gelatinisasi rendah cenderung memiliki alel TT dan sebaliknya (Bao *et al.*, 2006). Lokus AMs dan GPA hasil seleksi dari daerah *quantitative trait loci* (QTL) mungkin juga berkontribusi terhadap variasi sifat fisiko-kimia karena distribusi alel di japonica, mengingat peranan gen-gen tersebut dalam biosintesis gula amino dan asam amino. Alel dari S3cI berbasis sukrosa sintase 3 yang berperan dalam pengisian pati di biji padi (Wang *et al.*, 1999), memungkinkan enzim ini juga mempunyai korelasi tak langsung dengan variasi sifat fisiko-kimia pati beras. Jadi hasil *genotyping* menunjukkan bahwa meskipun variasi sikuen marka DNA yang berasosiasi dengan gen khusus tidak terletak di daerah *coding* tetapi marka-marka ini memberikan variasi diantara varietas padi. Variasi alel berbagai lokus di antara varietas padi tersebut menjadi dasar untuk pengembangan set marka.

Marka molekuler yang digunakan dalam formulasi set marka dalam penelitian ini dikembangkan berdasarkan analisis QTL terkait mutu rasa dan mutu masakan beras japonica, gen-gen terkait biosintesis polisakarida di *pathway* padi (Bao *et al.*, 2006; Lestari *et al.*, 2009) termasuk marka STS yang berasosiasi dengan palatabilitas nasi (Ohtsubo *et al.*, 2002 ; 2003; Ohtsubo dan Nakamura, 2007). Marka DNA fungsional yang diperoleh dari posisi di dalam atau dekat dengan gen target tersebut dapat menjadi sumber marka potensial untuk berbagai studi genetik, analisis sidik jari DNA varietas padi, membantu seleksi dalam pemuliaan maupun estimasi sifat fisiko-kimia varietas padi japonica seperti dilaporkan dalam studi ini.

Variasi polimorfisme yang dihasilkan oleh marka, prospektif dalam membantu evaluasi kandun-

gan protein dan profil RVA. Secara individu, sebagian marka yang digunakan dalam studi ini telah dimanfaatkan untuk uji perbandingan varietas padi Korea dan Cina dalam aspek protein dan kualitas biji padi (Yu *et al.*, 2008). Namun uji genotip dan polimorfisme belum cukup untuk mendiferensiasi kandungan protein dan profil pasta padi, sehingga analisis regresi ganda dikembangkan dalam studi ini (Tabel 4). Hal lebih penting lagi, data biner *genotyping* total marka yang diasosiasikan dengan data fisiko-kimia berhasil menjadi alat bantu potensial dalam formulasi set marka untuk estimasi sifat fisiko-kimia varietas/galur padi japonica.

Semua marka yang tercakup hasil formulasi dalam tiap persamaan mempunyai peranan sebagai pembeda karena adanya variasi alel. Berdasarkan nilai regresi tertinggi (R^2) (Lestari *et al.*, 2009) persamaan model hasil regresi ganda dilaporkan efektif untuk evaluasi mutu rasa beras japonica. Pendekatan yang sama juga telah dilakukan untuk estimasi mutu rasa beras japonica lainnya dengan memanfaatkan jenis marka STS (Ohtsubo dan Nakamura, 2007). Evaluasi kandungan protein dan amilosa maupun sifat adesif nasi telah dirintis berdasarkan primer yang berasosiasi dengan gen penyimpan protein (Nakamura *et al.*, 2004). Sesuai dengan studi sebelumnya maka enam set marka hasil formulasi dalam studi ini diharapkan dapat menjadi kandidat pendekatan secara molekuler untuk evaluasi kandungan protein dan sifat pasta melengkapi metoda konvensional.

Set marka yang memuat marka hasil pengembangan dalam studi ini perlu divalidasi untuk mengetahui konsistensi dan keakuratan hasil formulasi sehingga dapat diaplikasikan. Karena persamaan ini berdasarkan analisis awal, maka validasi semua set marka dapat dilakukan dengan memanfaatkan berbagai varietas padi japonica dan populasi persilangan seperti studi sebelumnya (Lestari *et al.*, 2009). Validasi dilakukan pada sejumlah aksesori padi dengan menentukan nilai fisiko-kimia menggunakan dua pendekatan, yaitu secara konvensional dan pendekatan marka. Hasil kandungan protein dan

masing-masing nilai pasta secara konvensional diobservasi korelasinya dengan nilai hasil perhitungan dengan set marka. Seperti halnya validasi set marka untuk evaluasi mutu rasa beras japonica ternyata menghasilkan nilai korelasi signifikan cukup tinggi (r : 0,85) dari hasil formulasi awal dengan R^2 sekitar 0,99 (Lestari *et al.*, 2009). Set marka tersebut berhasil diaplikasikan untuk analisis rutin sampel sampai sekarang. Demikian juga pada penelitian ini, setelah melalui proses validasi secara berulang, metoda marka tersebut dapat membantu evaluasi rutin fisiko-kimia beras di berbagai laboratorium pangan. Selain itu, set marka tersebut juga menjanjikan karena hanya perlu jumlah sampel analisis sedikit, cukup daun sebagai sumber DNA dan analisis PCR dan visualisasinya yang cepat. Hal tersebut juga memberi peluang aplikasinya untuk evaluasi aksesori dalam koleksi plasma nutfah padi ataupun seleksi galur-galur awal persilangan sehingga mempercepat program pemuliaan mutu padi.

KESIMPULAN

Nilai rata-rata kandungan protein, CPV, BDV, PV, SBV dan HPV masing-masing 6,83 %, 232,62 RVU, 89,19 RVU, 242,37 RVU, - 9,75 RVU dan 153,17 RVU. Kandungan protein mempunyai korelasi positif dengan dengan BDV dan PV, sebaliknya berkorelasi negatif terhadap CPV, HPV dan SBV. Uji genotip dengan total 30 marka DNA pada 22 varietas padi japonica penting sebagai dasar untuk membuat formulasi set marka dalam persamaan regresi. Hasil polimorfisme varietas japonica yang mempunyai sifat fisiko-kimia bervariasi mengarahkan analisis regresi ganda untuk evaluasi kandungan protein dan sifat pasta. Enam persamaan regresi dengan resolusi tinggi ($P < 0.001$) memiliki R^2 0,96, 0,98, 0,95, 0,99, 0,99 dan 0,96 untuk masing-masing kandungan protein, CPV, BDV, PV, HPV dan SBV berturut-turut.

DAFTAR PUSTAKA

- Allahgholipour M, AJ Ali, F Alinia, T Nagamine and Y Kojima. 2006. Relationship between rice grain amylose and pasta properties for breeding better quality rice varieties. *Plant Breed.* 125,

- 357–262.
- AOAC. 1995.** AOAC Official Methods of Analysis. 16th ed.; AOAC: Gaithersburg, MD, pp 30.
- Bao JS and YW Xia. 1999.** Genetic control of the paste viscosity characteristics in indica rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* **98**, 1120–1124.
- Bao JS, H Corke and M Sun. 2006.** Microsatellites, single nucleotide polymorphisms and a sequence tagged site in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in non-waxy rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* **113**, 1185–1196.
- Champagne ET. 1997.** Rice quality criteria for new uses. In: *International Symposium in Rice Quality*. Notingan, pp. 24–27.
- Chen MH and CJ Bergman. 2007.** Method for determining the amylose content, molecular weights, and weight- and molar-based distribution of degree of polymerization of amylose and fine-structure of amylopectin. *Carbohydrate Polymers* **69**, 562–578.
- Derycke V, WS Veraverbeke, GE Vanceputte, W De Man, RC Hoseney and JA Delcour. 2005.** Impact of protein on paste and cooking properties of non-parboiled and parboiled rice. *Cereal Chem.* **82**, 468–474.
- Kuo BJ, MC Hong and FS Thseng. 2001.** The relationship between the amylographic characteristics and eating quality of japonica rice in Taiwan. *Plant Prof. Sci.* **4**, 112–17.
- Lee WJ, JK Suh, HK Oh, SS Kim and D Shelton. 2001.** Relationship of grain hardness to physicochemical and processing properties of sorghum. *Food Sci. Biotechnol.* **10**, 423–428.
- Lestari P, A Risliawati dan HJ Koh. 2012.** Identifikasi dan aplikasi marka berbasis PCR untuk identifikasi varietas padi dengan palatabilitas tinggi. *J. Agrobiogen* **8**, 69–77.
- Lestari P, TH Ham, HH Lee, MO Woo, WJ Jiang, SH Chu, SK Kwon, KH Ma, JH Lee, YC Cho and HJ Koh. 2009.** PCR marker-based evaluation of eating quality of cooked rice (*Oryza sativa* L.). *J. Agric Food Chem.* **57**, 2754–2762.
- Liu X, M Gu, Y Han, Q Ji, J Lu, S Gu, R Zhang, X Li, J Chen, SS Korban and M Xu. 2004.** Developing gene-tagged molecular markers for functional analysis of starch-synthesizing genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* **135**, 345–353.
- Meadow F. 2002.** Paste process in rice flour using Rapid Visco Analyser curves and first derivatives. *Cereal Chem.* **79**, 559–562.
- Murray MG and WF Thompson. 1980.** Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**, 4321–4325.
- Nakamura S, H Okadome, K Yoza, K Haraguchi, T Okunishi, K Suzuki, H Satoh and K Ohtsubo. 2004.** Differentiation and search for palatability-factors of world-wide rice grains by PCR method. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **78**, 764–779.
- Ohtsubo K, S Nakamura and T Imamura. 2002.** Development of the primer sets for identification of a rice variety, Koshihikari, by PCR. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **76**, 388–397.
- Ohtsubo K, S Nakamura and H Okadome. 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 and S Nakamura. 2007.** Variety identification of rice (*Oryza sativa* L.) by Polymerase Chain Reaction method and its application to processed rice products. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 1501–1509.
- Statistical Analysis Systems (SAS). 2001.** *SAS User's Guide*, release 8.2; Statistical Analysis Systems Institute: Cary, NC.
- Syamsir E, P Hariyadi, D Fardiaz, N Andarwulan dan F Kusnandar. 2012.** Pengaruh proses heat-moisture treatment (HMT) terhadap karakteristik fisikokimia pati. *J. Teknol. Dan Industri Pangan XXIII*, 100–106.
- Wang AY, MH Kao, WH Yang, Y Sayion, LF Liu, PD Lee and JC Su. 1999.** Differentially and developmentally regulated expression of three rice sucrose synthase genes. *Plant Cell Physiol.* **40**, 800–807.
- Yu T Q, W Jiang, TH Ham, SH Chu, P Lestari, JH Lee, MK Kim, FR Xu, L Han, L Dai and HJ Koh. 2008.** Comparison of grain quality traits between japonica rice cultivars from Korea and Yunnan province of China. *J. Crop Sci. Biotechnol.* **11**, 135–140.
- Zhao WG, Chung JW, Kwon SW, Lee JH, Ma KH and Park YJ. 2012.** Association analysis of physicochemical traits on eating quality in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* DOI 10.1007/s10681-012-0820-z.