

Identifikasi dan Aplikasi Marka Berbasis PCR untuk Identifikasi Varietas Padi dengan Palatabilitas Tinggi

Puji Lestari^{1*}, Andari Risliawati¹, dan Hee Jong Koh²

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: lestari_71@yahoo.com

²Seoul National University, San56-1, Kwanak-gu, Sillim-dong, Seoul 151-921 South Korea

Diajukan: 16 Maret 2012; Diterima: 14 Juni 2012

ABSTRACT

Identification and Application of PCR-based Marker to Identify Rice Variety with High Palatability. *Puji Lestari, Andari Risliawati, and Hee Jong Koh.* To date, there has been no DNA fingerprint profile as unique identity of rice variety that has a high palatability (overall eating quality) in Indonesia, thus identification of premium varieties using molecular markers is considered to be important. This study aimed to establish DNA fingerprint profiles of *indica* and *japonica* rice varieties, and unique identities of rice varieties with high palatability using molecular markers associated with palatability. Total of 22 *japonica* and 24 *indica* rice varieties were evaluated their overall eating quality and tested using 20 molecular markers STS (sequence-tagged site) which were designed on the basis of *japonica* rice genome. To identify the genes functions, all these markers amplicons were cloned, transformed, sequenced and the sequences results were analyzed their homologous against the genome database. Ilpum (*japonica*) and Rojolele (*indica*) were identified to have the highest palatability compared to other varieties. DNA fingerprint profiles identified with the total STS markers were not able to differentiate each variety, however premium varieties of *japonica* and *indica* showed specific identities. A unique identity of Indonesian *indica* variety possessing high palatability, Rojolele was successfully developed using a markers set. DNA fingerprint profile in digital value system facilitates the identification of premium rice from other varieties. The fragments of the STS primers showed no any known-genes functions related to rice eating quality, therefore these markers are preferentially used for identification of premium rice with high palatability than differentiation of rice varieties based on the palatability. In this study, the unique identity of rice variety with high palatability is very usefull to evaluate the purity for germplasm protection.

Keywords: Palatability, Polymerase Chain Reaction, rice, sequence-tagged site.

ABSTRAK

Identifikasi dan Aplikasi Marka Berbasis PCR untuk Identifikasi Varietas Padi dengan Palatabilitas Tinggi. *Puji Lestari, Andari Risliawati, dan Hee Jong Koh.* Sam-

pai saat ini belum ada profil sidik jari DNA sebagai identitas unik varietas padi yang mempunyai palatabilitas (total mutu rasa) tinggi di Indonesia, sehingga identifikasi varietas premium menggunakan marka molekuler dipandang perlu. Tujuan penelitian ini adalah untuk membuat profil sidik jari DNA varietas padi *indica* dan *japonica* sekaligus identitas unik varietas padi yang mempunyai palatabilitas tinggi menggunakan marka terpaut palatabilitas. Total 22 varietas *japonica* dan 24 varietas *indica* dievaluasi mutu rasanya dan diuji secara molekuler menggunakan 20 marka STS (*sequence-tagged site*) yang berbasis genom padi *japonica*. Untuk mengidentifikasi fungsi gennya, semua amplicon marka tersebut dikloning, ditransformasi, disekuens, dan hasil sekuennya dianalisis homologinya dengan database genom. Varietas Ilpum (*japonica*) dan Rojolele (*indica*) teridentifikasi mempunyai palatabilitas tertinggi dibandingkan dengan varietas lainnya. Profil sidik jari DNA padi yang diidentifikasi dengan total marka STS tersebut belum dapat mendiferensiasi tiap varietas, namun varietas *japonica* dan *indica* premium teridentifikasi secara spesifik. Identitas unik varietas *indica* Indonesia yang memiliki palatabilitas tinggi, Rojolele berhasil dibuat menggunakan sebuah set marka. Profil sidik jari DNA dalam nilai digital memudahkan dalam sistem identifikasi varietas beras premium dari varietas lainnya. Fragmen dari primer STS tersebut diketahui bukan merupakan gen yang terpaut mutu rasa beras, sehingga marka tersebut lebih sesuai untuk identifikasi beras premium dengan palatabilitas tinggi daripada diferensiasi varietas berdasarkan palatabilitas. Dalam studi ini, identitas unik varietas padi dengan palatabilitas tinggi tersebut sangat berguna dalam membantu mengevaluasi kemurnian varietas untuk tujuan perlindungan plasma nutfah.

Kata kunci: Padi, palatabilitas, *Polymerase Chain Reaction*, *sequence-tagged site*.

PENDAHULUAN

Padi (*Oryza sativa*) menempati posisi penting sebagai tanaman pangan yang menjadi sumber makanan pokok sebagian besar penduduk dunia. Kalau penduduk negara subtropik seperti Korea Selatan, Jepang, Taiwan, dan sebagian daerah Cina memilih beras *japonica* sebagai konsumsi pangan hariannya, di lain pihak penduduk negara Asia Tenggara lebih suka beras *indica* karena sesuai dengan cara memasak dan tipe masakan. Jumlah plasma nutfah padi dan spesies

kerabatnya tersebar dalam koleksi yang sangat besar, melebihi 400 ribu di seluruh dunia. Meskipun diversifikasi padi umumnya berdasarkan sifat genetik dan morfo-fisiologi, karakter mutu rasa beras atau palatabilitas juga menjadi salah satu kriteria penting sebagai pembeda diversitas.

Palatabilitas beras yang menjadi semakin penting terutama di negara yang memproduksi beras, secara komprehensif ditentukan oleh aroma, penampilan, rasa, dan tekstur, dan secara bersamaan mewakili mutu rasa beras (Okadome, 2005). Untuk memenuhi permintaan di pasar, varietas padi yang dapat memenuhi persyaratan baik dari segi industri makanan dan konsumen terhadap mutu rasa beras sangatlah penting.

Palatabilitas beras dipengaruhi oleh varietas, penanganan pascapanen, pengolahan hasil, dan proses memasak. Palatabilitas beras yang bagus khususnya *japonica* biasanya dicirikan oleh kandungan protein dan amilosa yang rendah (Blakeney *et al.*, 2001), sehingga menjadikan beras lebih pulen dan tidak pera. Karena mutu rasa beras sangat dipengaruhi oleh sifat fisiko-kimia beras (Li *et al.*, 2003), maka otomatis banyak faktor genetik berperan di sini. Beberapa gen yang terlibat dalam sintesis pati, asam amino, gula amino, dan lipid berpengaruh terhadap sifat fisiko-kimia pati beras yang selanjutnya menentukan palatabilitas beras.

Mengingat pentingnya menjaga mutu rasa beras dan kemurnian dari tercampurnya dengan beras bermutu rasa lebih rendah, identifikasi beras dengan mutu rasa tinggi diperlukan. Pada umumnya beras dengan palatabilitas tinggi memiliki kemudahan dalam pengolahan, aroma dan rasanya juga enak, namun harganya mahal. Identifikasi beras berdasarkan mutu dirasa penting bagi petani sebagai produsen, pihak konsumen, pedagang, industri makanan, dan pemerintah (Ohtsubo dan Nakamura, 2007). Oleh karena itu perlu mengembangkan teknologi hemat waktu dan cepat dalam identifikasi dan diversifikasi varietas padi berdasarkan palatabilitas terutama padi dengan mutu rasa tinggi.

Pada era sekarang metode untuk identifikasi varietas berdasarkan polimorfisme DNA atau sidik jari DNA telah dikembangkan seiring kemajuan ilmu biologi. Marka DNA memiliki keuntungan jelas karena berdasarkan sampling fragmen dalam genom. Beberapa jenis marka DNA yang umum digunakan untuk analisis sidik jari DNA adalah RFLP (*Restriction Fragmen Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), SSR (*Single Sequence Repeat*), AFLP (*Amplified Fragmen Length Polymor-*

phism), STS (*Sequence-Tagged Site*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), dan SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Analisis RFLP telah digunakan untuk membedakan jenis *indica* dan *japonica* dari *O. sativa* (Zang *et al.*, 1992). Karena pita DNA selain target ampikon lain di RAPD juga muncul, maka modifikasi menjadi marka STS atau SCAR yang dikembangkan berdasarkan RAPD lebih dianjurkan. Marka STS berhasil dikembangkan dari AFLP dan RAPD untuk mengidentifikasi lokasi kromosom untuk gen ketahanan patogen pada padi (Jain *et al.*, 2004). Primer STS hasil pengembangan dari RAPD yang telah digunakan untuk mengidentifikasi varietas padi premium Jepang, Koshihikari (Ohtsubo *et al.*, 2002) dan galur isogeniknya (Nakamura *et al.*, 2004), digunakan dalam penelitian ini dan diobservasi pada varietas padi *japonica* dan *indica*.

Penelitian ini bertujuan untuk (1) identifikasi varietas beras *japonica* dan *indica* premium yang mempunyai palatabilitas tinggi; (2) menguji marka STS terpaut palatabilitas pada padi *japonica* (Korea Selatan dan Cina) dan *indica* Indonesia; (3) membuat profil sidik jari varietas padi *indica* dan *japonica* berdasarkan marka yang terpaut sifat palatabilitas beras; dan (4) mengetahui fungsi fragmen yang dihasilkan oleh marka STS yang merupakan modifikasi marka RAPD.

BAHAN DAN METODE

Materi Genetik

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Crop Molecular Breeding*, Seoul National University (SNU), Korea Selatan dan Laboratorium *Rice Flavor*, Balai Besar Penelitian Tanaman Padi sejak 2007 sampai 2009. Sebanyak 22 varietas padi *japonica* koleksi Laboratorium *Crop Molecular Breeding*, SNU, Korea Selatan, dan 24 varietas *indica* hasil pemuliaan di Indonesia koleksi BB Biogen digunakan dalam penelitian ini. Populasi RILs terdiri dari 40 galur yang berasal dari persilangan tetua padi *japonica*, yaitu Suwon 365 dan Chuchoeng, koleksi *Rural Development Administration* (RDA), Suwon, Korea Selatan, juga digunakan untuk pengujian.

Uji Organoleptik

Uji organoleptik beras *japonica* dilakukan mengikuti protokol NICS, RDA, Korea Selatan. Uji organoleptik dilakukan oleh 11 panelis orang Korea Selatan yang sudah terlatih dan dilakukan sebanyak tiga ulangan. Parameter uji palatabilitas yang dievaluasi meliputi kilap, aroma, rasa, kepulenan, tekstur, dan palatabilitas (total nilai mutu rasa).

Uji organoleptik untuk beras *indica* dilakukan dengan cara yang sama dalam mempersiapkan sampel beras dan sebagai panelisnya adalah orang Indonesia. Pengujian terhadap total peubah yang meliputi kilap, warna, aroma, kepulenan, dan rasa. Uji organoleptik juga dilakukan oleh 11 panelis yang telah terlatih dan berpengalaman, sebanyak tiga ulangan. Nilai organoleptik yang digunakan untuk kedua jenis grup padi tersebut adalah uji perjenjangan atau uji ranking (urutan), yang berfungsi untuk mengetahui perbedaan dan perubahan mutu rasa/palatabilitas beras. Rataan urutan ditentukan berdasarkan nilai rata-rata dari 11 panelis. Rataan urutan terendah (nilai 1) memiliki palatabilitas tertinggi, sedangkan rataan urutan tertinggi menunjukkan palatabilitas terendah.

Isolasi DNA

Daun tanaman yang berumur 5 minggu setelah tanam digunakan untuk isolasi DNA. Sebelum ekstraksi DNA, daun padi muda dan sehat yang dipanen dibekukan dalam nitrogen cair dan disimpan pada suhu -80°C . Jaringan daun digerus dalam nitrogen cair menjadi serbuk halus, selanjutnya DNA genomik diekstraksi menggunakan metode CTAB. Kualitas dan kuantitas DNA yang diukur menggunakan spektrofotometer Nano DropR ND-1000 (Nano Drop, Willington, Delaware, USA) dan dimigrasikan pada 0,8% gel agarosa.

Analisis STS dan Amplifikasi PCR

Dua puluh primer STS hasil pengembangan dari RAPD berdasar genom padi *japonica* yang dirancang untuk identifikasi varietas premium di Jepang, Koshihikari (Ohtsubo *et al.*, 2002; 2003; Ohtsubo dan Nakamura, 2007) digunakan dalam studi ini. Daftar sekuen primer STS yang digunakan dalam penelitian ini tercantum di artikel sebelumnya (Lestari *et al.*, 2009). Analisis genotipe dilakukan melalui amplifikasi DNA 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) dan perpanjangan final pada 72°C selama 5 menit. Produk PCR divisualisasikan menggunakan elektroforesis 3% gel agarosa untuk mendapatkan resolusi yang lebih baik. Semua amplifikasi DNA untuk sekuensing, dilakukan dalam total 35 siklus yang terdiri dari denaturasi 95°C selama 1 menit, *annealing* pada 60°C selama 30 detik, dan perpanjangan pada suhu 72°C selama 1 menit.

Kloning dan Sekuensing

Untuk mengidentifikasi sekuen ampikon yang diproduksi oleh tiap primer STS, pita DNA target yang

teramplifikasi di varietas padi *indica* dan *japonica* diekstraksi dari gel agarosa. Hasil elusi gel dimurnikan dengan Kit elusi gel (Intron Bioteknologi, Korea Selatan), kemudian dikloning ke dalam vektor pGEM-T Easy dan ditransformasikan ke dalam sel kompeten *Escherichia coli* DH5 α yang dibuat menurut protokol Sambrook dan Russell (2001). Plasmid diisolasi menggunakan Kit Pemurnian plasmid DNA-spin (Intron Bioteknologi, Korea Selatan) dan sekuensing dengan mesin sekuenser DNA, ABI-3700 DNA mengikuti instruksi dari perusahaan (Biosystems Terapan, Inc). Sekuensing dilakukan dua arah (*forward* dan *reverse*) kecuali ukuran ampikon lebih kecil dari 700 kb. Sekuensing dilakukan sebanyak 2 ulangan untuk kevalidan hasil sekuen. Urutan nukleotida hasil sekuensing dipisahkan dari nukleotida kontaminan seperti vektor atau primer universal saat sekuensing, dan dikonfirmasi keberadaan primer *forward* dan *reverse* untuk amplifikasi PCR ke sekuen target. Sekuen tiap primer yang disusun berdasarkan primer *forward* dan *reverse* disejajarkan dengan program BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/>) khususnya *pairwise alignment*, secara spesifik yaitu, *optimal GLOBAL alignment* untuk memperoleh total panjang sekuen ampikon target.

Pembuatan Profil Sidik Jari DNA

Hasil amplifikasi primer STS dalam penelitian ini yang merupakan marka dominan, menghasilkan pita DNA "ada" (positif) dan "tidak ada" (negatif). Pola pita yang dihasilkan tersebut dikonversi ke dalam nilai biner sebagai 1 (positif, ada pita DNA) dan 0 (negatif, tidak ada pita DNA). Profil sidik jari DNA unik tiap varietas dibuat berdasarkan hasil amplifikasi primer dalam nilai biner yang berurutan dari kiri ke kanan sesuai urutan 20 primer yang digunakan, sehingga menampilkan sistem nilai digital.

Analisis Homologi

Pencarian homologi dilakukan dengan membandingkan urutan sekuen ampikon dengan semua urutan sekuen di database *non-redundant* menggunakan program BLASTX (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>). Urutan sekuen yang menunjukkan homologi tidak signifikan kemudian dibandingkan lagi terhadap database nukleotida menggunakan program BLASTN. Berdasarkan analisis program BLAST, hasil homologi gen yang teridentifikasi dapat diketahui dari nilai signifikansi yang ditunjukkan oleh nilai E. Nilai E semakin mendekati nol (0) menunjukkan signifikansinya makin tinggi. Selain itu tingkat homologi fragmen dengan gen yang teridentifikasi tersebut ditunjukkan

dalam persentase. Analisis homologi juga dikonfirmasi di database genom padi (www.gramene.org).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Organoleptik Palatabilitas Beras

Karena alat *taste meter* dirancang khusus untuk mengukur palatabilitas beras varietas *japonica* (Tanaka *et al.*, 1992), maka pendugaan mutu rasa beras (palatabilitas) baik untuk *japonica* maupun *indica* dilakukan melalui uji organoleptik. Sistem urutan digunakan dalam evaluasi organoleptik pada palatabilitas beras varietas *japonica* maupun *indica* dalam studi ini. Untuk mendukung ketepatan hasil pengujian mutu rasa beras, grup panelis dibedakan sesuai kebiasaan konsumsi grup kultivar padi. Dalam penelitian ini, panelis orang Korea melakukan uji varietas *japonica* dan sebaliknya orang Indonesia untuk varietas *indica*.

Mutu rasa beras merupakan salah satu faktor yang menentukan tingkat penerimaan konsumen (Hairmansis *et al.*, 2007). Hasil evaluasi organoleptik menunjukkan bahwa Koshihikari (beras premium di Jepang) dan Ilpum menunjukkan palatabilitas tertinggi di antara varietas Korea. Rojolele menunjukkan mutu rasa tertinggi dibandingkan dengan varietas padi Indonesia lainnya (Tabel 1). Tekstur nasi pulen merupakan faktor yang menentukan mutu rasa beras.

Beras yang menunjukkan palatabilitas tinggi biasanya mempunyai tekstur pulen dan sebaliknya untuk nasi pera. Sesuai hasil penelitian ini, secara umum varietas Ilpum disukai orang Korea dan Rojolele juga banyak dikonsumsi masyarakat Indonesia karena rasanya yang enak. Namun demikian ada unsur subyektivitas yang dipengaruhi oleh lokasi, suku bangsa, lingkungan, tingkat pendidikan, dan golongan terhadap mutu rasa beras (Damardjati dan Purwani, 1998). Perbandingan beberapa varietas padi premium dengan palatabilitas tinggi terutama beras di pasaran dari unsur pencampuran ataupun kasus salah pelabelan dirasa sangat perlu. Analisis sidik jari DNA menggunakan marka molekuler yang mudah aplikasinya, cepat dan tidak mahal biayanya penting dilakukan.

Analisis Genotipe dengan Primer STS terpaut Palatabilitas

Marka STS atau SCAR yang dikembangkan dari RAPD (Jain *et al.*, 2004) dianggap lebih *reproducible* dan mudah aplikasinya (Stewart dan Via, 1993). Marka STS hasil pengembangan dari RAPD berhasil mendiferensiasi padi *japonica* berdasarkan palatabilitas dan beras ketan (Ohtsubo *et al.*, 2001). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pendekatan marka molekuler berbasis PCR dengan primer STS yang digunakan dalam penelitian ini berhasil mengidentifikasi padi *japonica* premium yang memiliki palatabilitas tinggi (Ohtsubo dan Nakamura, 2007). Kombinasi primer STS

Tabel 1. Nilai digital konversi dari pola pita DNA berdasarkan 20 marka STS sebagai profil sidik jari DNA varietas dan urutan palatabilitas dari 22 varietas padi *japonica* dan 24 varietas *indica*.

Varietas <i>japonica</i>	Rataan urutan	Nilai digital	Varietas <i>indica</i>	Rataan urutan	Nilai digital
Koshihikari	1,00	11,110,001,110,110,000,001	Rojolele	1,00	11,111,110,101,000,100,011
Gopum	1,85	11,111,000,101,000,000,011	Ciliwung	3,76	10,110,100,101,000,000,010
Samgwang	1,22	11,111,000,111,001,001,101	Cisokan	3,35	10,110,100,101,000,000,011
Ilpum	1,06	11,111,000,100,000,010,101	Cibodas	5,32	10,110,100,101,000,000,011
Chucheong	2,51	11,111,100,101,000,000,101	Jatiluhur	5,75	10,110,100,101,000,000,010
Dongjin	2,96	11,110,100,010,001,000,011	Cirata	5,59	10,110,100,001,000,000,011
Sinkeumo	3,95	11,110,000,110,000,010,101	Memberamo	3,88	10,111,010,101,000,010,011
Hwaseong	3,67	11,110,100,010,000,000,100	Ciherang	3,76	10,110,000,101,000,000,010
Hwacheong	3,94	11,111,000,101,000,000,101	Sintanur	2,00	10,110,000,101,000,000,010
Dobong	5,35	11,110,000,101,100,000,001	Cimelati	2,72	10,111,010,101,000,010,011
Samnam	4,65	11,111,000,001,000,000,101	Maros	3,61	10,110,110,001,000,000,010
Palkong	4,76	10,110,000,110,100,000,101	Singkil	5,53	10,110,100,001,000,000,011
Hitomebore	2,35	11,110,001,111,111,110,001	Batanghari	3,41	10,110,100,101,000,000,011
Baekjinju1	3,01	11,001,100,111,100,010,110	Code	4,00	10,110,100,101,000,000,010
Seonong4	2,97	11,001,101,011,001,110,111	Angke	3,53	10,110,100,101,000,010,010
Onnuri	3,22	11,001,100,011,101,010,000	Batang Gadis	3,95	10,111,100,001,000,000,011
Manmi	2,85	11,011,001,110,101,000,101	Batang Piaman	2,89	10,110,110,101,000,000,011
Giho	3,55	11,001,001,011,001,000,111	Cigeulis	2,89	10,110,100,101,000,000,011
Geuman	2,15	11,111,001,111,100,000,011	Fatmawati	3,44	10,110,110,101,000,000,011
Nakdong	3,78	11,110,001,111,001,000,000	Konawe	3,56	10,110,100,001,000,000,010
Hexi41	5,12	11,111,111,111,000,100,001	Logawa	5,06	10,111,100,101,000,000,010
Samdeok	4,21	11,011,001,111,001,010,001	Pepe	1,44	10,110,100,101,000,000,010
			Tukad Balian	2,59	11,110,010,101,000,000,011
			Tukad Unda	5,00	11,110,100,001,001,000,010

Deret nilai digital berdasarkan urutan primer STS dari kiri ke kanan: A6-A7- B1- B43- E30- F6- G4- G22- G28- J6- M2CG- M11- P5- S13- T16- WK9- B7- G49A- G81- P3.

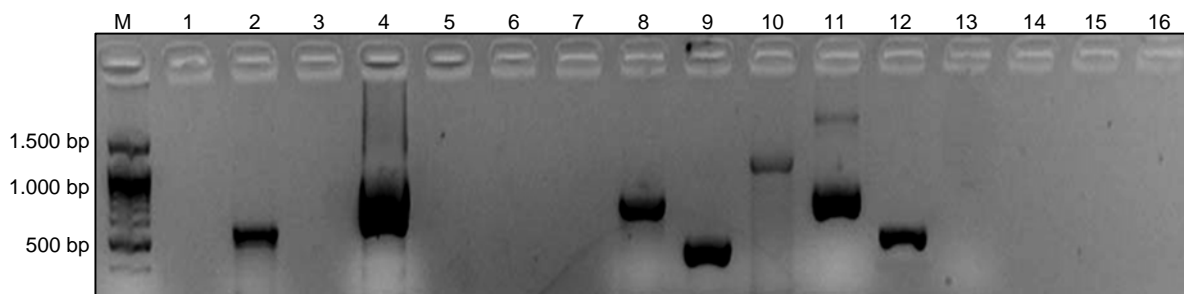
tersebut dengan beberapa marka fungsional yang berhubungan dengan sifat fisiko-kimia pati beras, mampu mendeteksi mutu rasa beras *japonica* (Lestari *et al.*, 2009). Marka STS yang berlatar belakang genom padi *japonica* diharapkan dapat diaplikasikan pada padi *indica* khususnya varietas Indonesia.

Berdasarkan total 20 primer yang diobservasi, beberapa primer (B1, B43, dan G81) memberi petunjuk pola monomorfik hanya di padi *indica* namun tidak di *japonica*. Dengan demikian ada kespesifikan primer pada varietas, khususnya primer yang spesifik pada padi varietas *japonica*, yaitu ada 11 primer meliputi B1, B43, G22, M2CG, P5, T16, B7, G49A, G81, J6, dan M11. Pola pita yang dihasilkan oleh 20 marka STS pada 22 varietas *japonica* dan 24 varietas *indica* dalam nilai digital ditunjukkan pada Tabel 1. Varietas Koshihikari (Jepang), Ilpum (Korea Selatan), dan Rojolele (Indonesia) yang masing-masing tertinggi palatabilitasnya menunjukkan profil sidik jari DNA spesifik (Tabel 1). Contoh pola pita yang dihasilkan oleh primer STS ini khususnya Koshihikari ditampilkan pada Gambar 1. Pola pita DNA di varietas Koshihikari dalam studi ini sama dengan hasil observasi sebelumnya (Ohtsubo *et al.*, 2003). Beberapa primer STS tersebut terutama G81, G49A, dan WKA9L juga berhasil mengidentifikasi galur-galur hasil persilangan dengan tetua Koshihikari (Ohtsubo dan Nakamura, 2007), yaitu galur-galur Koshihikari Niigata BLs. Pola pita tunggal hasil PCR dari marka STS tersebut terbukti sangat membantu dalam proses identifikasi maupun teknik pengulangannya. Berdasarkan survei polimorfisme pada tetua varietas *japonica*, Suwon 365, dan Chuheong, terseleksi 3 primer (E30, F6, dan J6) yang menunjukkan polimorfisme pada progeni dengan perbedaan palatabilitas. Dengan demikian marka ini memberi peluang untuk digunakan sebagai MAB (*marker-assisted breeding*) meskipun masih memerlukan validasi.

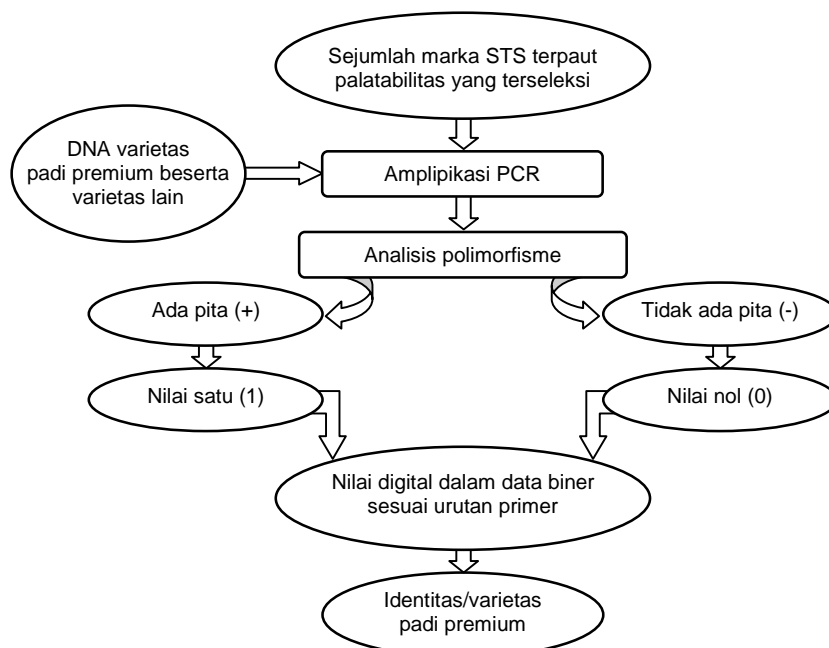
Analisis Profil Sidik Jari DNA

Varietas Koshihikari, Ilpum, dan Rojolele menunjukkan mutu rasa tertinggi sesuai asal negara berdasarkan uji organoleptik. Total 20 marka STS mampu mendiskriminasi beras premium berdasarkan kelompok kultivar, yaitu *indica* dari Indonesia (Rojolele) dan *japonica* (Koshihikari dan Ilpum) dari varietas dengan palatabilitas lebih rendah. Profil sidik jari dalam nilai digital memudahkan dalam identifikasi ketiga varietas tersebut dan juga varietas lainnya (Tabel 1). Nilai digital tersebut dapat digunakan sebagai identitas varietas yang berbasis palatabilitas. Seleksi marka STS terpaut palatabilitas beras yang berbasis genom varietas *japonica* dari studi sebelumnya mempermudah dalam pengujian pada varietas padi *indica* dalam pembuatan set marka untuk identitas varietas berdasarkan palatabilitas. Pola pita dari marka STS dikonversi ke dalam sistem biner (satu/ada pita DNA dan nol/tidak ada pita DNA) sesuai urutan marka memudahkan pembacaan identitas varietas (Gambar 2).

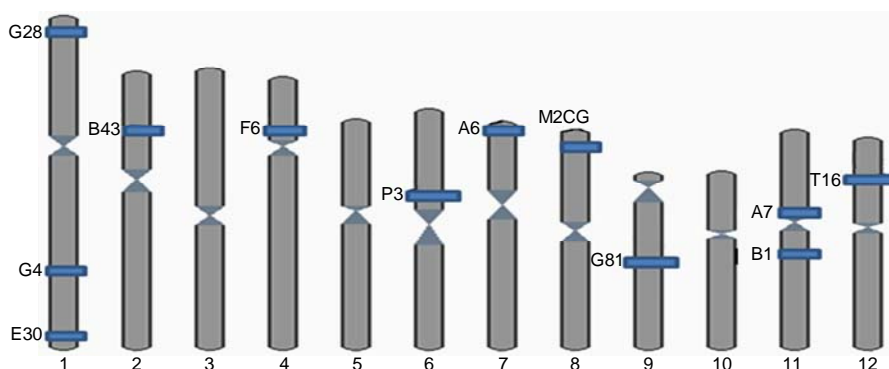
Koshihikari berhasil didiskriminasi dari varietas *japonica* Jepang lainnya berdasarkan set primer yang dikembangkan (Ohtsubo *et al.*, 2002). Mengacu hasil observasi primer STS pada padi *japonica* premium tersebut, maka total primer tersebut juga dicobakan pada padi *indica* dari Indonesia. Profil sidik jari DNA beras premium Korea Selatan, Ilpum, dihasilkan dari sembilan primer, yaitu A6+A7+B1+B43+F6+J6+E30+G49A+P3. Sementara nilai digital dari pola pita primer STS yang dihasilkan menunjukkan bahwa hanya 12 primer (A6+A7+B1+B43+E30+F6+G4+G28+T16+G81+P3) yang menghasilkan amplikon positif pada varietas Rojolele. Profil sidik jari tersebut unik pada varietas Rojolele. Posisi fragmen penanda sidik jari DNA spesifik yang dihasilkan dari 12 primer STS dalam genom padi Rojolele ditampilkan pada Gambar 3. Posisi amplikon 12 primer STS di genom Rojolele sebagian besar di lengan pendek kromosom khususnya primer G28, B43, F6, P3, A6, M2CG, A7, dan T16 dan



Gambar 1. Pola pita DNA yang dihasilkan primer STS pada varietas Koshihikari. M = 100 bp DNA ladder, 1-16 = primer STS. Sebanyak 7 primer yang menghasilkan amplikon di varietas Koshihikari, yaitu A7 (sumur 2), B43 (sumur 4), G22 (sumur 8), G28 (sumur 9), J6 (sumur 10), M11 (sumur 11), B1 (sumur 12).



Gambar 2. Diagram alir pembuatan nilai digital data biner untuk profil sidik jari DNA sebagai identitas spesifik varietas beras premium.



Gambar 3. Posisi fragmen profil sidik jari DNA berdasarkan marka STS di genom padi Rojolele. Total genom padi yang terdiri dari 12 kromosom yang menunjukkan posisi 12 fragmen STS pada tiap kromosom dari genom Rojolele sebagai penanda sidik jari DNA spesifik. Lokasi fisik fragmen dalam contiq target tiap primer STS sebagai berikut, fragmen G28: AP002913, G4: AP003295, E30: AP003238, B43: AP005004, F6: AL606606, P3: AP003522, A6: AP005187, M2CG: AP005730, G81: AP005702, A7: AC136501, B1: AC135121, T16: AL831811. No. 1-12: lokasi kromosom di genom padi.

sisanya di lengan panjang kromosom 1, 9, dan 11. Posisi ke-12 fragmen STS di genom Rojolele berada di *contiq* spesifik varietas tersebut. Terbukti bahwa marka STS berbasis genom mampu mengidentifikasi beras dengan palatabilitas tinggi di Indonesia.

Gabungan marka STS dengan marka fungsional untuk gen-gen yang terpaut sifat fisiko-kimia pati beras mungkin lebih prospektif untuk tujuan evaluasi palatabilitas, seperti dilaporkan oleh Lestari *et al.* (2009). Penggunaan secara khusus ke-20 marka STS tersebut lebih cenderung untuk identifikasi beras berbasis palatabilitas daripada mendeteksi palatabilitas beras.

Pendekatan pembuatan profil sidik jari DNA tersebut prospektif untuk dikembangkan pada beras palatabilitas tinggi lainnya di Indonesia. Ke depannya apabila ditemukan varietas lain dengan kualitas rasa enak ternyata memiliki sidik jari DNA sama dengan sidik jari DNA Rojolele, penambahan marka sebagai *identifier* diperlukan untuk diferensiasi. Pembuatan sidik jari DNA baru untuk varietas beras premium lain, seperti Pandanwangi, Menthik, dan lainnya juga dapat dilakukan dengan membuat set markanya. Kelebihan pendekatan ini, teknik PCR menggunakan agarosa yang mudah dengan nilai digital akan memudahkan penelusuran di database. Didukung kemudahan DNA yang dapat diisolasi dari beras (Ohtsubo *et al.*, 1999),

metode pendekatan marka sederhana ini juga dapat dilakukan dengan menggunakan sampel beras di pasaran untuk menguji kemurnian beras premium yang memiliki mutu rasa enak sekaligus melindungi varietas-varietas premium. Pemanfaatan sebagai set marka lebih dianjurkan daripada *marker* tunggal untuk mengidentifikasi beras premium yang mempunyai palatabilitas tinggi ataupun diversifikasinya.

Identifikasi Fragmen Primer STS

Analisis homologi fragmen dari primer STS dilakukan untuk mengidentifikasi urutan dan fungsi gen yang diduga berhubungan dengan palatabilitas beras. Selang ukuran sekuen dari primer tersebut kurang lebih antara 1.450-1.800 bp untuk kedua varietas grup *japonica* dan *indica* (Lestari *et al.*, 2009). Dari total 14 primer yang teramplifikasi baik di *japonica* maupun *indica*, ada petunjuk perbedaan lokasi ampikon di kromosom, yaitu primer A7, B43, dan P3 (Tabel 2). Fragmen primer A7, B43, dan P3 di padi *japonica* terletak masing-masing di kromosom 12, 9, dan 5, sementara di genom padi *indica* di kromosom 11, 2, dan 6. Urutan nukleotida dari primer lainnya menunjukkan keidentikan antara *japonica* dan *indica*. Posisi ampikon primer STS tersebut di genom padi tersebar secara acak hampir di semua kromosom.

Analisis homologi menunjukkan bahwa primer STS tersebut tidak ada asosiasinya dengan gen terkait palatabilitas beras. Hasil analisis homologi fragmen dari primer STS ditampilkan pada Tabel 3. Sebagian besar fragmen menunjukkan homologi tinggi (>95)

secara signifikan dengan daerah genom padi. Hanya beberapa sekuen primer yang jelas menunjukkan homologi tinggi secara nyata (nilai E mendekati nol) dengan gen tertentu dan sebagian transposon, seperti F6 (*retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass*), J6 (*retrotransposon, putative, centromere-specific*), M11 (*oxidoreductase, 2OG-Fe oxygenase family protein, expressed*), dan G4 (*Peptide transporter*).

Mengingat sebagian besar segmen dari primer STS tersebut menunjukkan homologi dengan nilai *blast* yang tinggi dengan gen-gen pada padi dan tidak terkait langsung dengan sifat fisiko-kimia pati beras, jelas bahwa primer STS lebih dirancang berdasarkan urutan genom dari *O. sativa* (grup varietas *japonica*). Karena itulah beberapa segmen, seperti primer G22, J6, M11, dan P5 tidak teramplifikasi di varietas padi *indica*. Pada genom padi baik *japonica* dan *indica*, ke-20 fragmen hasil amplifikasi primer STS tersebut tidak ditemukan di kromosom 3, dan ada 4 fragmen yang menempati di kromosom 1 (G4, G28, S13, dan E30). Latar belakang genetik padi *indica* dan *japonica* yang berbeda menjadikan karakter morfologi berlainan, demikian juga sifat yang berhubungan dengan mutu rasa (Ohtsubo *et al.*, 1998). Dengan demikian segmen fungsional gen-gen yang mengontrol mutu rasa antara grup kultivar padi *japonica* dan *indica* tersebut kemungkinan berlainan. Perubahan asam amino pada beberapa gen yang bertanggung jawab pada sintesis pati berpengaruh terhadap diversitas palatabilitas antara *indica* dan *japonica* (Sun *et al.*, 2011). Terbukti

Tabel 2. Analisis homologi fragmen yang dihasilkan 20 primer STS berdasarkan lokasi kromosom pada genom padi grup *japonica* dan *indica*.

Primer	Kromosom	
	<i>Japonica</i>	<i>Indica</i>
A6	7	7
A7	12	11
B1	11	11
B43	9	2
F6	4	4
G4	1	1
G22	9	Tidak ada pita
G28	1	1
J6	11	Tidak ada pita
M2CG	8	8
M11	6	Tidak ada pita
P5	10	Tidak ada pita
S13	1	1
T16	12	12
WK9	9	9
E30	1	1
B7	2	Tidak ada pita
G49A	11	Tidak ada pita
G81	6	6
P3	5	6

Tabel 3. Analisis homologi sekuen dari primer STS untuk mengetahui fungsi gen-nya di padi (*O. sativa*) dengan analisis BLASTX dan TBLASTX.

Primer	Ukuran (bp)	Fungsi gen	Homologi (%)	Nilai E*
A6	682	<i>Subtilisin-like protease precursor, putative, expressed</i>	66	3e-18
A7	519	<i>Lipase/hydrolase, putative, expressed</i>	63	5e-05
B1	509	<i>Ribosomal RNA apurinic site specific lyase, putative</i>	76	8,1e-25
B43	826	<i>Transposon protein, putative, CACTA, En/Spm sub-class</i>	70	3,1e-123
F6	1193	<i>Retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass</i>	98	1,7e-103
G22	642	<i>Aldose reductase, putative, expressed</i>	97	1,1e-66
G28	445	<i>Anther-specific proline-rich protein APG precursor, putative, expressed</i>	57	0,0029
J6	1035	<i>Retrotransposon, putative, centromere-specific</i>	100	3,2e-171
M2CG	1207	<i>Serine carboxypeptidase 1 precursor, putative, expressed</i>	73	1e-39
M11	723	<i>Oxidoreductase, 2OG-Fe oxygenase family protein, expressed</i>	95	2,8e-79
P5	557	<i>Hypothetical protein</i>	59	0,997
E30	790	<i>SHR5-receptor-like kinase, putative</i>	55	0,88
WK9	1662	<i>AB107360: O. sativa (japonica cultivar-group) DNA, STS marker, clone: ARIF1AK</i>	100	0
G4	824	<i>Peptide transporter</i>	95	5e-67
G81	866	<i>Hypothetical protein</i>	83	2e-08
P3	663	<i>Hypothetical protein OsL_19221 [O. sativa indica group]</i>	100	2e-09
B7	616	<i>O. sativa japonica group genomic DNA, chromosome 2, BAC clone: B1121A12</i>	97	2e-126
G49A	1503	<i>Hypothetical protein OsL_35600 [O. sativa indica group]</i>	97	3e-176
T16	1121	<i>Oryza sativa chromosome 12, BAC OJ1561_A05 of library Monsanto from chromosome 12 of cultivar Nipponbare of ssp. japonica of O. sativa (rice), complete sequence</i>	99	0
S13	1832	<i>Rp1-like protein [O. sativa japonica group]</i>	97	1e-141

*Nilai E = menunjukkan signifikansi dengan sekuen gen yang teridentifikasi. Nilai E makin mendekati nol (0) menunjukkan signifikansi makin tinggi.

bahwa meskipun primer ini didisain tidak berdasarkan pada gen kandidat yang terpaut dengan palatabilitas beras, primer STS tersebut terbukti adaptif dan mampu diaplikasikan di padi *indica* untuk identifikasi beras dengan palatabilitas tinggi. Adanya petunjuk bahwa fragmen yang dihasilkan primer STS tersebut dalam posisi yang acak di genom, memberikan peluang sebagai marka yang dapat berfungsi untuk identifikasi/difersifikasi varietas secara umum.

KESIMPULAN

Varietas padi *japonica* Kosihikari dan Ilpum, serta varietas *indica* Rojolele teridentifikasi sebagai varietas dengan palatabilitas tinggi. Marka STS yang berbasis genom padi *japonica* berhasil diaplikasikan untuk identifikasi padi *indica* Indonesia yang mempunyai palatabilitas tinggi dengan identitas unik. Profil sidik jari DNA varietas padi *indica* dan *japonica* termasuk beras premium (Rojolele, *indica* dan Ilpum, *japonica*) berhasil dibuat dengan menggunakan set marka STS yang terpaut palatabilitas dalam nilai digital. Analisis homologi menunjukkan bahwa fragmen hasil amplifikasi primer STS yang merupakan hasil modifikasi dari RAPD tidak terpaut dengan gen-gen pada padi yang mengontrol mutu rasa beras, dan terletak secara acak di genom padi. Pendekatan dalam studi ini dapat diaplikasikan untuk identifikasi beras premium lainnya melalui eksplorasi marka yang spesifik terpaut palatabilitas terutama dari segmen target di genom padi.

DAFTAR PUSTAKA

- Blakeney, A.B., L.G. Lewin, and R.F. Reinke. 2001. Quality rice for north Asia. RIRDC: New South Wales, Australia. 34 p.
- Damardjati, D.S. dan E.Y. Purwani. 1998. Determinan mutu-beras di Indonesia. *Dalam* Inovasi Teknologi Pertanian-Seperempat Abad Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Buku I. Badan Litbang Pertanian. Jakarta. hlm. 416-442.
- Hairmansis, A., B. Kustianto, Supartopo, A.P. Lestari, dan Suwarno. 2007. Keragaan mutu beras galur-galur padi rawa. Apresiasi Hasil Penelitian Padi. Balai Besar Penelitian Tanaman Padi. hlm. 713-724.
- Jain, A., R. Ariyadasa, A. Kumar, M.N. Srivastava, M. Mohan, and S. Nair. 2004. Tagging and mapping of a rice gall midge resistance gene, Gm8, and development of STSs for use in marker-aided selection and gene pyramiding. *Theor. Appl. Genet.* 109:1377-1384.
- Lestari, P., H.T. Ham, H.H. Lee, W. Jiang, O.M.Wook, S.W. Kwon, S.H. Chu, Y.C. Cho, and H.J. Koh. 2009. PCR marker-based evaluation of eating quality of cooked rice (*Oryza sativa*). *J. Agric. Food Chem.* 57:2754-2762.
- Li, Z., J. Wan, J. Xia, and M. Yano. 2003. Mapping of quantitative trait loci controlling physicochemical properties of rice grain (*Oryza sativa* L). *Breed. Sci.* 53:209-215.
- 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. 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.
- Ohtsubo, K., H. Toyoshima, and H. Okadome. 1998. Quality assay of rice using traditional and novel tools. *Cereal Foods World* 43:203-206.
- Ohtsubo, K.; S. Nakamura, H. Morooka, T. Fuji, T. Fuse, and S. Kawasaki. 1999. Identification of domestic rice cultivars by RAPD method using a single grain of cooked rice as a sample. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 46:262-267.
- Ohtsubo, K., S. Nakamura, K. Yoza, and K. Shishido. 2001. Identification of glutinous rice cultivars using rice cake as samples by the PCR method. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 48:306-310.
- Ohtsubo, K., S. Nakamura, and T. Imamura. 2002. Development of the primers sets for identification of a rice varieties, Koshihikari, by PCR. *Nippon Noeikagaku 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 Noeikagaku Kaishi* 50:122-132.
- Okadome, H. 2005. Review: Application of instrument-based multiple texture measurement of cooked milled-rice grains to rice quality evaluation. *JARQ* 39:261-268.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Stewart, C.N. and L.E.A. Via. 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR application. *Biotechniques* 14:748-750.
- Sun, M.M., S.E. Abdula, H.J. Lee, Y.C. Cho, L.Z. Han, H.J. Koh, and Y.G. Cho. 2011. Molecular aspect of good eating quality formation in Japonica rice. *Plos One* 6:1-12.
- Tanaka, R., K. Ino, and M. Kanagawa. 1992. Cultivation method and eating quality of paddy rice 1. Evaluation with mechanical taster of boiled rice so called "MIDO meter". *Tohoku J. Crop Sci.* 35:45-46.
- Zang, Q., M.M.A. Saghai, T.Y. Lu, and B.Z. Shen. 1992. Genetic diversity and differentiation of indica and japonica rice detected by RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.* 83:495-459.
-