

CB

Current Biochemistry

37

OPEN ACCESS

ISJD

ISSN : 2355-7877
eISSN : 2355-7931

Volume II Issue I April 2015



Bioethanol Production by Using Detoxified Sugarcane Bagasse Hydrolysate and Adapted Culture of *Candida tropicalis* 1

Inda Setyawati, Laksmi Ambarsari, Siti Nur'aeni, Suryani, Puspa Julistia Puspita, Popi Asri Kurniatin, Waras Nurcholis

The Addition Effects of Glucose as a Co-substrate on Xylitol Production by *Candida guilliermondii* 13

Laksmi Ambarsari, Suryani, Steffanus Gozales, Puspa Julistia Puspita

Isolasi dan Seleksi Bakteri Termofilik Pereduksi Kromium Heksavalen dari Limbah Pengolahan Batik 22

Wijiastuti, I Made Artika, Novik Nurhidayat

Karakterisasi Rizobakteri Penghasil Giberelin yang Diisolasi dari Tanah Hutan di Banten 32

Hadi Susilo, Nisa Rachmania Mubarik, Triadiati

Identifikasi Gen Aroma (*badh2* Termutasi) dan Sifat Aroma Pada BC₅F₂ Ciherang Aromatik 42

Jap Mai Cing, Djarot Sasongko Hami Seno, Tri Joko Santoso

Published by:



Department of Biochemistry
Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Bogor Agricultural University (IPB)

In collaboration
with:



Indonesian Society for Biochemistry and Molecular Biology
(PBBMI), Bogor's Chapter

Special thanks to our Reviewers:

Dr. Dra. Nisa Rachmania Mubarik, M.Si
Department of Biology, Bogor Agricultural
University (IPB)

Dr. Isroi, S.Si., M.Si
Indonesian Biotechnology Research Institute
for Estate Crops

Drs. Edy Djauhari P.K., M.Si
Department of Biochemistry, Bogor
Agricultural University (IPB)

Prof. Dr. Ir. Khaswar Syamsu, M.Sc
Department of Agroindustrial Technology,
Bogor Agricultural University (IPB)

Dr. Dra. Laksmi Ambarsari, MS
Department of Biochemistry, Bogor
Agricultural University (IPB)

Prof. Dr. Ir. Nastiti Siswi Indrasti
Department of Agroindustrial Technology,
Bogor Agricultural University (IPB)

Dr. Ir. Utut Widyastuti M.Si.
Department of Biology, Bogor Agricultural
University (IPB)

Dr. Bram Kusbiantoro
Indonesian Agency for Agricultural Research
and Development

Dr. Asmini Budiani, M.Si
PT. Riset Perkebunan Nusantara

Dr. Ir. Liesbetini Haditjaroko, MS
Department of Agroindustrial Technology,
Bogor Agricultural University (IPB)

Dr. G. John Acton, BSc. Ph.D
Flinders University, Australia

Prof. Dr. Aris Triwahyudi
Department of Biology, Bogor Agricultural
University (IPB)

Dr. Ir. Abdjad Asih Nawangsih, M.Si
Department of Plant Protection, Bogor
Agricultural University (IPB)

Current Biochemistry Staff

Chief Editor

I Made Artika

Managing Editor

Suryani

Editorial Assistant

Puspa Julistia Puspita

Inda Setyawati

Husnawati

Ukhradiyah

Layout Editor

Rahadian Pratama

Syaefudin

Ikhsan Alif Rusmana

Publisher

IPB Press

Editorial Board

Maria Bintang

Djarot Sasongko Hami Seno

Syamsul Falah

Laksmi Ambarsari

Edy Djauhari

Waras Nurcholis

Akhmad Endang Zainal Hasan

Mega Safithri

Secretariat of Current Biochemistry

Department of Biochemistry

Bogor Agricultural University (IPB)

Bogor 16680, Indonesia

Phone/Fax.: +62 251 8423267

E-mail: current.biochemistry@gmail.com

To Our Subscribers

Welcome to the volume 2 of "Current Biochemistry". This journal publishes submissions entirely in English, or submissions in Indonesian with abstract in English, the results of original research that contribute significantly to the understanding of biological processes. Biochemistry is a laboratory based science that explores chemical processes within living organisms. It has become the foundation for understanding all living processes and now almost all areas of the life sciences are engaged in biochemical research. Today, one of the main focus of biochemistry is in understanding how biological molecules give rise to the processes that occur within living cells, which in turn relates greatly to the study and understanding of whole organisms.

"Current Biochemistry" is intended to make contemporary Indonesian research in biochemistry known internationally, and to encourage the sharing of this research with the widest possible audience. Our mandate is to publish manuscripts relating to emerging areas in biochemistry, chemical biology, biophysics, genomics, proteomics, model studies and structures, cellular and molecular biology, computational biochemistry, biotechnology, and new method developments which are all encouraged, especially if they address basic biochemical mechanisms. We therefore cordially invite quality articles from authors to elevate the standard and extend the readership of the journal.

We would like to thank the reviewers and all those who have contributed to the first issue of Current Biochemistry volume 2.

With best wishes

From the Editor

Table of Contents

Bioethanol Production by Using Detoxified Sugarcane Bagasse Hydrolysate and Adapted Culture of <i>Candida tropicalis</i>	1
Inda Setyawati, Laksmi Ambarsari, Siti Nur'aeni, Suryani, Puspa Julistia Puspita, Popi Asri Kurniatin, Waras Nurcholis	
The Addition Effects of Glucose as a Co-substrate on Xylitol Production by <i>Candida guilliermondii</i>	13
Laksmi Ambarsari, Suryani, Steffanus Gozales, Puspa Julistia Puspita	
Isolation and Selection of Thermophilic Bacteria as Hexavalent Chromium Reducer from Batik Processing Waste Water	22
Wijiastuti, I Made Artika, Novik Nurhidayat	
Characterization of Gibberellin Producing Rhizobacteria Isolated from Soil Forest in Banten	32
Hadi Susilo, Nisa Rachmania Mubarik, Triadiati	
Identification of Aroma Gene (Mutated <i>badh2</i>) and Properties of Aroma on Aromatic BC₅F₂ Ciherang	42
Jap Mai Cing, Djarot Sasongko Hami Seno, Tri Joko Santoso	

Identification of Aroma Gene (Mutated *badh2*) and Properties of Aroma on Aromatic BC₅F₂ Ciherang

(Identifikasi Gen Aroma (*badh2* Termutasi) dan Analisis Aroma BC₅F₂ Ciherang Aromatik)

Jap Mai Cing¹, Djarot Sasongko Hami Seno¹, Tri Joko Santoso²

¹Department of Biochemistry, Bogor Agricultural University, Bogor, 16680, Indonesia

²Indonesian Center for Agricultural Biotechnology & Genetic Resources, Bogor, 16111, Indonesia

Received : 28 December 2014; Accepted: 3 March 2015

*Corresponding author: Jap Mai Cing, SSI; Departemen Biokimia, Jl. Agatis Gd. Fapet Lt. 5, Wing 5, Bogor 16680; Telp/Fax. +62251-8423267; E-mail: meicink@gmail.com

ABSTRACT

Aromatic rice varieties have some weaknesses such as low productivity, and less resistant to pests and diseases. This study aimed to obtain homozygous strain of BC₅F₂ Ciherang aromatic through the identification of aroma gene (mutated *badh2*) and properties of the aroma. Ciherang paddy (non-aromatic paddy) was used as the female parent, whereas Mentik Wangi paddy (aromatic paddy) was used as the male parent. The experiment was conducted in BC₅F₂ because it is expected to generate plants with properties 98.4% close to female parent. The DNA from five strains of paddy plants BC₅F₂ Ciherang X Mentik Wangi was isolated by a modified CTAB method. The concentration of DNA was determined by measuring absorbance at 260 nm wavelength, while its purity was determined from the ratio of the absorbance at a wavelength of 260/280 nm. PCR-based molecular selection was done by using the Bradbury primers. PCR results showed that of the 250 samples, there were 66 samples had DNA fragment of the same size as that of Mentik Wangi, i.e. 257 bp, 67 samples had the same size as the DNA fragment of Ciherang, i.e. 355 bp, and 117 samples had the same size with the both of DNA fragments, i.e. 257 bp and 355 bp. Plants with amplified 257 bp DNA fragment was subjected to leaf aroma test using 1.7% KOH. The results showed that 42 positive samples, out of 66 samples. Samples positive on leaf aroma test were tested again on rice aroma test. Rice aroma test results showed the majority (85.4%) samples that are positive on leaf aroma test is also positive on the rice aroma test.

Keywords: aromatic, *badh2*, Ciherang, Bradbury primers.

ABSTRAK

Padi varietas aromatik memiliki beberapa kelemahan seperti produktivitas yang rendah, kurang tahan terhadap hama dan penyakit. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan galur BC₅F₂

Ciherang aromatik homozigot yang memiliki gen aroma (*badh2* termutasi) dan karakter wangi. Padi Ciherang (padi nonaromatik) digunakan sebagai induk betina, sedangkan padi Mentikwangi (padi aromatik) digunakan sebagai induk jantan. Percobaan ini dilakukan pada BC₅F₂ karena karakter wangi akan didapatkan dengan sifat 98,4% mendekati induk betina. Lima galur tanaman padi BC₅F₂ Ciherang X Mentikwangi diisolasi DNA-nya dengan metode Doyle dan Doyle (1987). Konsentrasi dan kemurnian DNA ditentukan pada panjang gelombang 260 nm dan 260/280 nm. Seleksi molekuler berbasis PCR dilakukan dengan menggunakan primer Bradburry. Hasil yang diperoleh dari 250 sampel ada 66 sampel memiliki fragmen DNA berukuran sama dengan Mentikwangi yaitu 257 bp, 67 sampel memiliki fragmen DNA berukuran sama dengan Ciherang yaitu 355 bp, dan 117 sampel memiliki fragmen DNA keduanya yaitu 257 bp dan 355 bp. Tanaman yang membawa fragmen DNA berukuran 257 bp diuji aroma daunnya dengan KOH 1,7%. Hasil yang diperoleh sebanyak 42 sampel positif beraroma dari 66 sampel. Sampel yang positif pada uji aroma daun diuji lagi aroma berasnya. Hasil uji aroma beras menunjukkan sebagian besar sampel positif beraroma.

Kata kunci: aromatik, *badh2*, Mentikwangi

1. PENDAHULUAN

Padi aromatik seperti Mentik Wangi memiliki kelebihan di antaranya sifat aroma yang menyerupai pandan, teksturnya yang pulen, dan harganya yang mahal di pasaran. Padi jenis aromatik ini juga banyak diminati oleh penduduk kawasan Asia. Sekitar 250.000 penduduk di Negara Asia menyukai beras aromatik (LITBANG 2006). Namun, padi varietas aromatik ini memiliki kelemahan yaitu produktivitasnya rendah, serta kurang tahan terhadap hama dan penyakit. Oleh karena itu, sebagai bagian dari upaya peningkatan ketahanan pangan perlu dilakukan introduksi sifat aroma dari padi aromatik ke padi unggul nonaromatik (seperti padi Ciherang) sehingga akan diperoleh padi varietas baru yang berkarakter wangi dengan sifat agronomi sebaik padi nonaromatik.

Site-directed crossing merupakan alternatif metode untuk mengintroduksi suatu sifat spesifik tanpa melalui rekayasa genetik, sehingga tidak akan menghasilkan

produk tanaman transgenik (Xu *et al.* 2004, Mackill *et al.* 2007). Analisis aroma padi juga dipermudah dengan adanya marka molekuler. Bradburry *et al.* (2005a) telah berhasil mengidentifikasi padi aromatik dan nonaromatik berdasarkan marka molekuler berbasis gen *badh2*. Gen *badh2* merupakan gen penyandi aroma wangi yang terdapat pada padi aromatik. Deteksi dini untuk membedakan jenis padi aromatik dan nonaromatik sangat diperlukan pada pembibitan. Hal tersebut sangat membantu peneliti dan petani dalam menentukan jenis padi yang akan ditanam secara tepat. Adanya perbedaan gen pada sekuen padi aromatik dan nonaromatik dapat digunakan untuk deteksi jenis padi tersebut.

Mentik Wangi digunakan sebagai tetua donor aromatik, sementara Ciherang digunakan sebagai tetua pemulih. Ciherang dipilih sebagai tetua pemulih karena memiliki masa tanam yang relatif singkat, tahan penyakit hawar daun, dan wereng coklat biotipe 2 dan 3, dapat ditanam di berbagai lokasi, dan produktivitasnya tinggi.

Penelitian ini menggunakan padi BC₅F₂ untuk introduksi sifat yang progeni gennya bersifat resesif (misalnya sifat aromatik).

Berdasarkan hal-hal yang telah dikemukakan sebelumnya, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah perlunya mendapatkan galur sampel terbaik melalui identifikasi gen *badh2* termutasi dan analisis karakter wangi. Penelitian ini bertujuan memperoleh galur BC₅F₂ Ciherang aromatik homozigot resesif melalui identifikasi gen aroma (*badh2* termutasi) dan sifat aroma. Hasil yang diharapkan dari penelitian ini adalah benih Ciherang aromatik (BC₅F₂) dapat menjadi varietas padi unggul yang membawa sifat-sifat positif Ciherang serta wangi seperti donornya Mentik Wangi. Hipotesis pada penelitian ini adalah keberadaan gen *badh2* termutasi pada turunan BC₅F₂ dapat diidentifikasi dan karakter wanginya dapat dianalisis.

2. METODOLOGI

Tanaman padi yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari BB Biogen Kementan (Bogor). Daun muda sampel tanaman padi yang telah berumur 3 minggu diisolasi DNA-nya dengan metode CTAB yang mengacu pada metode Doyle dan Doyle (1987). Konsentrasi DNA ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer nanodrop pada panjang gelombang 260 nm (A_{260}), sedangkan kemurniannya ditentukan berdasarkan rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 dan 280 nm ($A_{260/280}$) (Sambrook *et al.* 1989). Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan marka Bradbury. Campuran reaksi dan siklus suhu mengacu pada Bradbury *et al.* (2005b). Pemisahan produk PCR dilakukan dengan

elektroforesis agarosa 1% menggunakan 1 kb ladder sebagai marker. Sampel DNA dialiri arus dengan voltase 75 V selama 40 menit. Gel agarosa selanjutnya divisualisasi dengan *chemidoc gel system*. Sampel yang positif membawa sifat aroma dari Mentik Wangi diuji lanjut pada daun dan berasnya. Sampel daun diuji aromanya dengan menggunakan KOH 1,7%, sedangkan sampel beras diuji aromanya melalui perebusan dengan menggunakan dH₂O (Dong *et al.* 2001). Selanjutnya, sampel daun dan beras diuji aromanya oleh tiga orang panelis semi terlatih dengan skor evaluasi 0-3 (Tabel 1). Skor dari panelis dirata-ratakan dan dikelompokkan menjadi tiga kelompok. Skor > 1,0 digolongkan beraroma, skor 0,6-1,0 digolongkan sedikit beraroma, dan skor < 0,5 digolongkan tidak beraroma.

3. HASIL

Rata-rata konsentrasi DNA pada salah satu galur sampel BC₅F₂ Ciherang x Mentik Wangi (CM 1.2) adalah 1688.8 ng/μL, sedangkan rata-rata kemurniannya adalah 1.89 (Tabel 2). Elektroforegram hasil seleksi tanaman padi BC₅F₂ Ciherang x Mentik Wangi pada salah satu galur dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil analisis dari 250 tanaman padi didapatkan 66 tanaman padi positif membawa alel homozigot resesif yang ditandai dengan terbentuknya fragmen DNA berukuran 580 bp dan 257 bp, sebanyak

Tabel 1 Skor evaluasi aroma padi menggunakan metode KOH

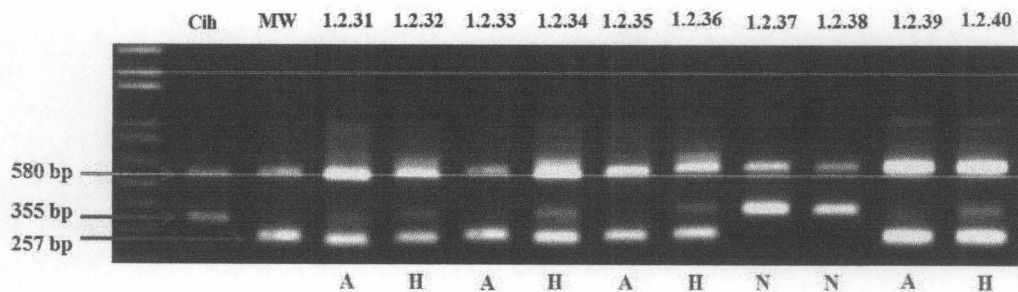
Skor	Evaluasi Aroma
0	Tidak ada aroma
1	Aroma lembut/agak beraroma
2	Sedikit beraroma
3	Aroma kuat

67 tanaman padi membawa alel homozigot dominan yang ditandai dengan terbentuknya fragmen DNA berukuran 580 bp dan 355 bp, serta sebanyak 117 tanaman padi membawa alel keduanya atau heterozigot yang ditandai dengan terbentuknya fragmen DNA berukuran 580 bp,

355 bp, dan 257 bp (Tabel 3). Tanaman padi yang positif membawa alel homozigot resesif menandakan bahwa tanaman tersebut mengikuti fragmen DNA padi Mentik Wangi. Di antara 66 tanaman padi yang membawa alel homozigot resesif, sebanyak 11 tanaman berasal dari galur

Tabel 2 Kuantitas & kemurnian DNA hasil isolasi BC₅F₂ Ciherang x Mentik Wangi galur 1.2

No	Sampel	Konsentrasi (ng/μL)	A 260/280
1.	Ciherang	1124,6	1,92
2.	Mentik Wangi	662,1	1,81
3.	1.2.31	779,6	1,86
4.	1.2.32	1577,2	1,95
5.	1.2.33	1828,6	1,92
6.	1.2.34	1165,0	1,97
7.	1.2.35	2483,9	1,84
8.	1.2.36	1782,1	1,80
9.	1.2.37	3205,6	1,90
10.	1.2.38	2095,4	1,95
11.	1.2.39	783,0	1,79
12.	1.2.40	1187,3	1,91
Rata-rata		1688,8	1,89



Gambar 1 Elektroforegram hasil seleksi B_C5F₂ Ciherang x Mentik Wangi. A: aromatik, N: nonaromatik, H: heterozigot. Marker: DNA 1 Kb ladder, Sampel: Ciherang (Cih), Mentik Wangi (MW), Padi BC₅F₂ Cih/MW (1.2.31-1.2.40).

Tabel 3 Pola fragmen DNA BC₅F₂ Ciherang x Mentik Wangi

No	Galur	Jumlah pola fragmen DNA		
		Homozigot resesif (Aromatik/ A)	Homozigot dominan (Nonaromatik/ N)	Heterozigot (H)
1.	1.2	11	12	27
2.	2.3	17	8	25
3.	3.1	-	26	24
4.	4.13	13	14	23
5.	5.6	25	7	18
Total		66	67	177

1.2, sebanyak 17 tanaman berasal dari galur 2.3, sebanyak 13 tanaman dari galur 4.13, dan sebanyak 25 tanaman dari galur 5.6.

Tanaman padi yang positif membawa alel homozigot resesif (fragmen DNA padi Mentik Wangi) diuji aroma daunnya dengan menggunakan KOH 1.7%. Hasil uji aroma daun pada salah satu galur tanaman padi BC₅F₂ Ciherang x Mentik Wangi ditunjukkan pada Tabel 4. Berdasarkan uji aroma daun, tanaman

yang positif membawa alel homozigot resesif sebagian besar menunjukkan skor beraroma, yakni 42 sampel beraroma dari 66 sampel yang diamati. Sampel yang positif (membawa sifat aroma seperti Mentik Wangi) pada uji aroma daun diuji lagi aroma berasnya. Hasil uji aroma beras pada salah satu galur tanaman padi BC₅F₂ Ciherang x Mentik Wangi ditunjukkan pada Tabel 5. Berdasarkan uji aroma beras, tanaman yang berkarakter wangi pada uji aroma daun

Tabel 4 Hasil evaluasi aroma daun BC₃F₂ Ciherang x Mentik Wangi galur 1.2

No	Galur	Seleksi dengan PCR	Skor rata-rata aroma	Hasil evaluasi aroma daun
1	CIH	N	0,0	Tidak beraroma
2	MW	A	3,0	Beraroma
3	1.2.1	H	0,3	Tidak beraroma
4	1.2.2	A	1,7	Beraroma
5	1.2.3	H	0,7	Sedikit beraroma
6	1.2.6	N	0,7	Sedikit beraroma
7	1.2.10	N	0,3	Tidak beraroma
8	1.2.11	A	2,3	Beraroma
9	1.2.21	A	2,3	Beraroma
10	1.2.22	A	1,7	Beraroma
11	1.2.23	A	2,0	Beraroma

A : aromatik, H : heterozigot, N : nonaromatik

Skor > 1,0 : beraroma; Skor 0,6 - 1,0 : sedikit beraroma; Skor < 0,5 : tidak beraroma

Tabel 5 Hasil evaluasi aroma beras BC₅F₂ Ciherang x Mentik Wangi galur 1.2

No	Galur	Hasil evaluasi aroma daun	Skor rata-rata aroma	Hasil evaluasi aroma beras
1	CIH	N	0,0	Tidak beraroma
2	MW	A	3,0	Beraroma
3	1.2.2	A	1,3	Beraroma
4	1.2.11	A	2,3	Beraroma
5	1.2.21	A	2,0	Beraroma
6	1.2.23	A	1,7	Beraroma
7	1.2.24	A	2,3	Beraroma
8	1.2.33	A	2,0	Beraroma
9	1.2.39	A	1,3	Beraroma
10	1.2.50	A	2,0	Beraroma

A : aromatik, H : heterozigot, N : nonaromatik

Skor > 1,0 : beraroma; Skor 0,6 - 1,0 : sedikit beraroma; Skor < 0,5 : tidak beraroma

Tabel 6 Rekapitulasi evaluasi aroma beras pada keempat galur BC₅F₂ Ciherang x Mentik Wangi

Sampel	Jumlah sampel yang diamati	Skor evaluasi aroma		
		Beraroma	Sedikit beraroma	Tidak beraroma
CM 1.2	8	8*	-	-
CM 2.3	8	8*	-	-
CM 4.13	13	9*	4	-
CM 5.6	12	10*	2	-

* Sampel yang lolos seleksi aroma

sebagian besar (85,4%) juga berkarakter wangi pada uji aroma beras. Jumlah sampel yang lolos seleksi aroma ada 35 sampel dari 250 sampel. Delapan sampel yang lolos seleksi berasal dari galur CM 1.2, delapan sampel dari galur CM 2.3, sembilan sampel dari galur CM 4.13, dan sepuluh sampel dari galur CM 5.6 (Tabel 6).

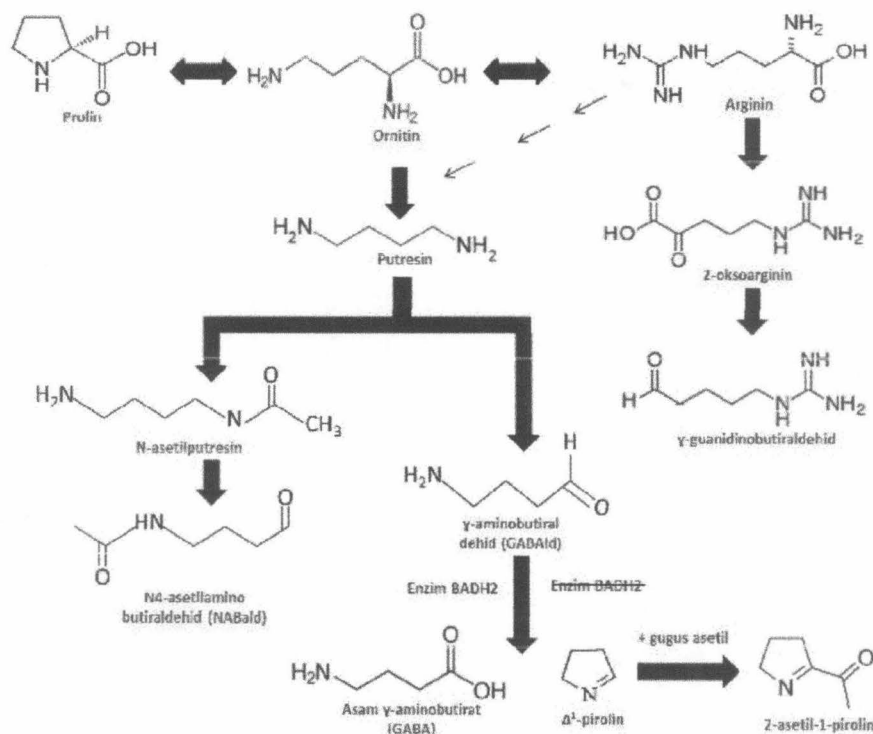
4. PEMBAHASAN

Ada dua jenis padi yang digunakan dalam penelitian ini. Padi Ciherang (nonaromatik lokal) digunakan sebagai tetua sedangkan padi Mentikwangi (aromatik lokal) digunakan sebagai donor aroma. Padi Ciherang termasuk dalam kelompok padi sawah varietas unggul populer yang diperoleh melalui beberapa kali persilangan. Padi Ciherang memiliki banyak kelebihan, antara lain umur tanamannya yang cukup singkat (116-125 hari), produktivitas tinggi (rata-rata produksi 5-8,5 ton/ha), dapat ditanam di berbagai lokasi, tahan terhadap bakteri hawar daun (HDB) strain III dan IV, serta tahan terhadap wereng coklat biotipe 2 dan 3. Padi Mentik Wangi merupakan padi varietas Javanica yang memiliki aroma menyerupai pandan dan bertekstur pulen. Namun padi Mentik Wangi memiliki kelemahan yaitu produktivitasnya rendah serta tidak tahan hama dan penyakit (LITBANG 2006).

Persilangan padi Ciherang sebagai

induk betina dan padi Mentik Wangi sebagai induk jantan melalui metode persilangan terarah dapat menghasilkan varietas padi dengan sifat agronomi seperti padi Ciherang ditambah dengan sifat aroma dari padi Mentik Wangi. Persilangan antara Ciherang dengan Mentik Wangi hingga menghasilkan turunan pertama (F1) telah dilakukan oleh Hami Seno *et al.* (2009). Para peneliti tersebut juga telah melakukan persilangan balik antara F1 dan tetua Ciherang, kemudian dilanjutkan hingga silang balik yang ke-5 (BC₅F₁). Proses ini diharapkan dapat menghasilkan tanaman hasil persilangan yang stabil saat dilakukan penyerbukan sendiri (*selfing*) karena sifat yang dihasilkan 98,4% mendekati tetua imduk (Mackill *et al.* 2007). Penyerbukan sendiri pada generasi BC₅F₁ juga diperlukan untuk memunculkan sifat-sifat dalam keadaan homozigot dominan, homozigot resesif dan heterozigot. Hal ini dikarenakan penyerbukan sendiri pada tanaman BC₅F₁ akan menyebabkan adanya segregasi. Gen homozigot resesif seperti karakter wangi akan didapatkan pada tanaman BC₅F₂ yang telah mengalami segregasi.

Sifat aromatik pada tanaman padi disebabkan oleh adanya senyawa 2-asetil-1-pirolin (2AP) yang terdapat pada semua bagian tanaman padi, kecuali akar (Lorieux *et al.* 1996). Senyawa tersebut terbentuk



Gambar 2 Jalur pembentukan 2-asetil-1-pirolin (Bradbury *et al.* 2005b).

akibat delesi pada kromosom 8 (gen *badh2*). Biosintesis senyawa 2AP ditunjukkan oleh Gambar 2. Pembentukan 2AP dimulai dari pemecahan prolin menjadi putresin, kemudian membentuk γ -aminobutiraldehid (GABald). GABald merupakan substrat bagi enzim BADH2. Jika enzim BADH2 aktif, maka enzim ini dapat mengubah GABald menjadi asam- γ -aminobutirat (GABA). Sebaliknya, jika enzim BADH2 tidak aktif, maka GABald akan mengalami asetilasi (penambahan gugus asetil) membentuk 2-asetil-1-pirolin (Bradbury *et al.* 2005b).

Seleksi molekuler berbasis PCR dilakukan terhadap tanaman BC₅F₂ untuk mendapatkan tanaman yang positif mengandung gen aroma yaitu *badh2* termutasi. Sebelum dilakukan seleksi dengan PCR, konsentrasi dan kemurnian DNA tanaman BC₅F₂ harus diketahui untuk mempermudah proses seleksi. DNA

diisolasi dengan menggunakan modifikasi metode Doyle dan Doyle (1987) karena metode ini hanya membutuhkan sampel dengan jumlah sedikit, tahapannya mudah, dan tidak membutuhkan waktu pengerjaan yang relatif lama. Hasil isolasi DNA diuji konsentrasinya pada panjang gelombang 260 nm dan kemurniannya pada panjang gelombang 260/280 nm. Oleh karena konsentrasi DNA yang didapatkan dari proses isolasi tidak seragam, maka perlu dilakukan pengenceran. Hal ini dilakukan untuk menjamin bahwa jumlah DNA yang akan diamplifikasi dengan PCR mempunyai konsentrasi yang sama sehingga diharapkan hasil amplifikasinya seragam. Konsentrasi DNA dari seluruh sampel diseragamkan menjadi 50 μ g/mL melalui proses pengenceran. Nilai kemurnian DNA yang diperoleh sesuai dengan literatur yaitu antara 1,8-2,0. Apabila nilainya kurang dari 1,8 maka sampel DNA masih mengandung kontaminan

protein dan untuk menghilangkannya ditambahkan protease. Apabila nilainya lebih dari 2,0 maka sampel DNA masih mengandung kontaminan RNA, dan untuk menghilangkannya ditambahkan ribonuklease (Sambrook *et al.* 1989). Selanjutnya, DNA hasil isolasi telah dapat digunakan untuk amplifikasi PCR karena tidak terkontaminasi dengan protein maupun polisakarida.

Tanaman padi BC₅F₂ Ciherang x Mentik Wangi diseleksi melalui tiga tahapan yaitu seleksi menggunakan marka aromatik berbasis PCR dengan primer Bradbury, seleksi aroma daun dengan KOH, serta seleksi aroma beras melalui perebusan dengan dH₂O. Primer yang digunakan dalam PCR terdiri dari dua primer eksternal (EAP dan ESP) dan dua primer internal (IFAP dan INSP) (Bradbury *et al.* 2005b). Primer EAP dan ESP akan menempel pada kedua jenis padi (nonaromatik dan aromatik) yang akan mengamplifikasi DNA dan membentuk kontrol positif dengan ukuran 580 bp. Pasangan primer EAP dan INSP akan menempel pada padi nonaromatik dan menghasilkan pita DNA yang berukuran 355 bp, sedangkan pasangan primer ESP dan IFAP akan menempel pada padi aromatik dan menghasilkan pita DNA yang berukuran 257 bp (Gambar 1). Dengan demikian, padi tetua Ciherang akan menghasilkan dua pita DNA yang masing-masing berukuran 580 bp dan 355 bp, sedangkan padi tetua Mentik Wangi akan menghasilkan dua pita DNA yang masing-masing berukuran 580 bp dan 257 bp. Hasil persilangan dari padi Ciherang dan Mentik Wangi yang homozigot dominan (N) akan mengikuti pola fragmen tetua Ciherang dengan menghasilkan pita DNA yang berukuran 580 bp dan 355 bp. Hasil persilangan dari padi Ciherang dan Mentik Wangi yang heterozigot

(H) akan menghasilkan tiga pita DNA dengan ukuran 580 bp, 355 bp dan 257 bp, sedangkan hasil persilangan dari padi Ciherang dan Mentik Wangi yang homozigot resesif (A) akan mengikuti pola fragmen Mentik Wangi dengan menghasilkan pita DNA yang berukuran 580 bp dan 257 bp.

Hasil seleksi dengan menggunakan primer Bradbury menunjukkan bahwa 250 sampel tanaman padi Ciherang x Mentik Wangi dapat dibedakan pola fragmen DNANYA menjadi homozigot dominan (N), homozigot resesif (A) dan heterozigot (H). DNA tanaman padi yang positif membawa alel homozigot resesif atau seperti padi Mentik Wangi (257 bp) ukurannya lebih kecil dibandingkan DNA tanaman padi yang membawa alel homozigot dominan atau seperti padi Ciherang (355 bp). Hal ini terjadi karena adanya delesi basa pada ekson nomor tujuh di kromosom nomor delapan, sedangkan pada padi non-aromatik tidak terjadi delesi basa pada kromosom nomor delapan (Bradbury *et al.* 2005a). Seleksi dengan primer Bradbury menghasilkan 66 sampel homozigot resesif (A). Hasil elektroforesis pada gel agarosa menunjukkan adanya dua pita berukuran 580 bp dan 257 bp yang menandakan bahwa sampel-sampel ini mengikuti pola fragmen Mentik Wangi. Hasil ini sesuai dengan penelitian lainnya (Padmadi 2009; Fatahajudin 2011, Rizkiany 2013).

Semua tanaman padi yang positif membawa alel homozigot resesif (A) diseleksi pada tahap selanjutnya yaitu uji aroma daun dengan menggunakan KOH 1,7%. Selain tanaman yang membawa alel homozigot resesif (A), diikutsertakan juga beberapa tanaman yang homozigot dominan (N) dan heterozigot (H). Hasil penelitian menunjukkan bahwa

sampel yang secara molekuler positif membawa fragmen Mentik Wangi (A) terbukti beraroma pada uji aroma daun (Tabel 4). Namun, untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat, pengujian dilanjutkan pada aroma beras. Hasil pengujian pada aroma beras ternyata menunjukkan bahwa sampel yang beraroma pada uji aroma daun juga terbukti beraroma pada uji aroma beras.

Senyawa 2AP dapat ditemukan di seluruh bagian tanaman padi kecuali pada bagian akar. Kandungan senyawa 2AP lebih tinggi pada bagian ujung daun padi daripada bagian pangkal daun. Kandungan senyawa 2AP pada daun muda juga lebih tinggi bila dibandingkan dengan daun tua (Lourieux *et al.* 1996). Oleh karena itu, uji aroma dengan metode KOH ini menggunakan daun padi yang masih muda sehingga diharapkan kandungan senyawa 2AP lebih mudah terdeteksi. Selain menggunakan daun padi, uji aroma juga dilakukan dengan menggunakan beras yang dipanaskan dalam air. Walaupun metode ini bersifat konvensional, namun cukup memadai untuk uji kualitas aroma padi karena dianggap dapat membedakan padi aromatik dan nonaromatik (Garland *et al.* 2000).

Identifikasi gen aroma (*badh2* termutasi) dan sifat aroma pada tanaman BC₅F₂ Ciherang aromatik telah berhasil dilakukan. Keberhasilan ini terbukti dengan didapatkannya sampel-sampel yang membawa fragmen Mentik Wangi (DNA berukuran 257 bp). Selain itu, keberhasilan penelitian ini juga terbukti melalui uji sifat aroma pada daun dan beras. Dari 250 sampel yang digunakan dalam penelitian ini, 66 sampel positif secara molekuler, namun hanya 42 sampel yang lolos uji aroma daun, dan 35 sampel yang lolos uji aroma beras. Penelitian ini perlu dilanjutkan untuk mengetahui aroma secara

kuantitatif, namun untuk itu perlu disiapkan sampel dalam jumlah yang cukup banyak.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada seluruh staf Laboratorium Biologi Molekuler BB Biogen Kementan (Bogor).

6. DAFTAR PUSTAKA

- Bradbury LM, Fitzgerald TL, Henry RJ, Jin Q, Waters DLE. 2005a. The gene for fragrance in rice. *Plant Biotech. J.* 3:363–370.
- Bradbury LMT, Henry RJ, Jin Q, Reinke RF, Waters DLE. 2005b. A perfect marker for fragrance genotyping in rice. *Mol. Breed* 16:279–283.
- Dong, Y, E Tsuzuki, and H.Terao. 2001. Genetic analysis of aroma in three rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *J Genet Breed* 55: 39-44.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation from small amount of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.
- Fatahjudin MT. 2011. Introduksi gen aroma (*badh2* termutasi) dari varietas Pandan Wangi atau Mentik Wangi ke Ciherang [skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Garland S, Lewin L, Blakeney A, Reineke R, Henry R. 2000. PCR-based molecular markers for the fragrance gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 101:364–371.
- Hamiseno DS, Santoso TJ, Tri Jatmiko KR, Padmadi B, Praptiwi D. 2009. Konstruksi padi nonaromatik yang beraroma wangi menggunakan PCR berbantuan marka gen *badh2*. Prosiding Seminar Hasil-Hasil Penelitian IPB 2009, 678-688. ISBN: 978-602-8853-03-3, 978-602-8853-08-8.
- [LITBANG] Balai Penelitian Bahan Pangan. 2006. Mengenal padi VUTB Fatmawati. *J Litbang* 12:1-6.
- Lorieux M, Petrov M, Huang N, Guiderdoni E, Ghesquiere A. 1996. Aroma in rice: genetic analysis of a quantitative trait. *Theor App Genet* 93:1145–1151.
- Mackill DJ, Septiningsih E, Pamploma AM, Sanches

- D, Iftekhar A, Masudussaman AS, Collard B, Neeraja C, Vergara G, Maghirang-Rodriquez, R, Heuer S, Ismail AM. 2007. Marker assisted selection for submergence tolerance in rice. *Mol. Plant Breeding* 5: 207-208.
- Padmadi B. 2009. Identifikasi sifat aroma tanaman padi menggunakan marka berbasis gen aromatik [skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Rizkiany HN. 2013. Identifikasi karakter aromatik secara molekuler dan kimia pada galur padi BC3F2 Ciherang X Mentikwangi [skripsi] Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Sambrook J, Russell DW. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Ed ke-2*. New York: Cold-Spring Harbor Laboratory Pr.
- Xu K, Deb R, Mackill DJ. 2004. A microsatellite Marker and a Codominant PCR-Based Marker for Marker-assisted selection of Submergence Tolerance in Rice. *Crop Sci.* 44:248-253.