

Korelasi Kandungan Antosianin Total dengan Peubah Warna (L^* , a^* , dan b^*) dan Penanda Mikrosatelit pada Beras Hitam

Correlation Between Total Anthocyanin Content and Microsatellite Markers with L^ , a^* , and b^* Color Variables on Black Grain Rice Varieties*

Kristamtini^{1*}, Taryono², Panjisakti Basunanda², dan Rudi Hari Murti²

¹Balai Pengkajian Teknologi Pertanian (BPTP) Yogyakarta
Jl. Stadion Maguwoharjo No 22, Wedomartani, Ngemplak, Sleman, Yogyakarta, Indonesia

²Fakultas Pertanian Universitas Gajahmada Yogyakarta

*E-mail: krisniur@yahoo.co.id

Naskah diterima 14 Februari 2017, direvisi 7 Juni 2017, disetujui diterbitkan 3 Juli 2017

ABSTRACT

Black rice is considered as a functional food for its high anthocyanin content, expressed as purple-black grain rice color. The study was aimed to determine the correlation between total anthocyanin content with L^ , a^* , and b^* color variables, total anthocyanin content with color morphology and total anthocyanin content with microsatellite markers. Eleven local black rice varieties derived from the Yogyakarta Assesment Institute of Agriculture Technology collections and two varieties of white rice (Situbagendit and Inpari 6 Jete) were planted on plastic pots in green house. The trial was arranged in a completely randomized design with five replications. At three weeks after planting, leaf samples were taken for DNA isolation and further PCR amplifications using four microsatellite markers (RM 180, RM 220, RM 224 and RM 252). The black rice grains were observed based on color morphology using a chromameter and analyzed for their anthocyanin content. Regression, correlation, and path analyses were conducted to determine the relationship between total anthocyanin content and L^* , a^* , b^* color variable, color morphology, and microsatellite markers. Results showed that there were correlation between total anthocyanin content and color variables ($r_{L^*} = -0.568$, $r_{a^*} = -0.561$, $r_{b^*} = 0.844$). The total anthocyanin content were also correlated with color scores of morphology and total microsatellite markers ($r_{RM 180} = -0.419$, $r_{RM 220} = 0.27$, $r_{RM 224} = -0.493$, $r_{RM 252} = 0.265$) and color scores of morphology, $r = -0.442$. Selection of high-anthocyanin content on rice could use the color variable criteria (L^* and a^* low, and b^* high). Microsatellite markers RM 220 and RM 252 can be used as molecularr markers for identification of rice having high anthocyanin content.*

Keywords: *Black rice, anthocyanin, color variables, microsatellite markers.*

ABSTRAK

Beras hitam merupakan pangan fungsional karena mengandung antosianin tinggi yang diekspresikan pada beras berwarna ungu kehitaman. Penelitian bertujuan untuk mengetahui korelasi antara kandungan antosianin total dengan karakter warna L^* , a^* , b^* ,

kandungan antosianin total warna secara morfologi, dan korelasi kandungan antosianin total dengan penanda mikrosatelit. Sebelas varietas padi beras hitam lokal koleksi BPTP Yogyakarta dan dua varietas padi beras putih ditanam dalam pot plastik di rumah plastik hingga panen, menggunakan rancangan acak lengkap dengan lima ulangan. Pada umur 3 minggu setelah tanam, daun tanaman dipanen sebagai sampel untuk isolasi DNA dan selanjutnya untuk bahan amplifikasi PCR menggunakan empat penanda mikrosatelit (RM 180, RM 220, RM 224, dan RM 252). Tanaman dipelihara hingga panen dan diamati warna beras secara morfologi (skoring) dan menggunakan chroma meter serta dianalisis kandungan antosianinnya. Analisis regresi korelasi dan analisis jalur (path analysis) dilakukan untuk mengetahui korelasi antara kandungan antosianin total dengan karakter warna L^* (lightness), a^* (redness – greenness), dan b^* (yellowness – blueness), warna secara morfologi dan penanda mikrosatelit. Hasil penelitian menunjukkan terdapat korelasi antara kandungan antosianin total dengan variabel warna ($r_{L^*} = -0,568$, $r_{a^*} = -0,561$, $r_{b^*} = 0,844$). Kandungan antosianin total juga berkorelasi dengan penanda mikrosatelit (RM 180 $r = -0,419$, RM 220 $r = 0,27$, RM 224 $r = -0,493$, RM 252 $r = 0,265$), dan skor warna $r = -0,442$. Seleksi padi dengan kandungan antosianin tinggi dapat menggunakan kriteria variabel warna (L^* dan a^* rendah, dan b^* tinggi). Penanda mikrosatelit RM 220 dan RM 252 dapat digunakan sebagai penanda molekuler untuk padi dengan kandungan antosianin tinggi.

Kata kunci: Beras hitam, korelasi, parameter warna, penanda mikrosatelit.

PENDAHULUAN

Kebutuhan akan padi/beras terus meningkat seiring dengan meningkatnya jumlah penduduk. Sebagian besar beras yang dikonsumsi adalah beras putih, meskipun terdapat banyak jenis beras, termasuk yang mengandung pigmen warna, seperti beras merah (*red rice*) dan beras hitam (*black rice*). Warna beras hitam, merah, dan ungu dibentuk oleh antosianin pada lapisan perikarp, kulit biji (*seed coat*) dan aleuron (Chaudhary 2003).

Beras hitam mulai populer dan dikonsumsi sebagai pangan fungsional seiring dengan meningkatnya kesadaran akan pentingnya kesehatan. Beras berwarna memiliki potensi sebagai sumber antioksidan dan layak sebagai sumber pangan fungsional (Yawadio *et al.* 2007). Beras hitam memiliki kandungan antosianin tinggi pada lapisan perikarp, yang memberikan warna ungu gelap (Ryu *et al.* 1998, Takashi *et al.* 2001). Antosianin telah diakui sebagai bahan pangan fungsional kesehatan karena mengandung antioksidan (Satue-Gracia *et al.* 1997, Nam *et al.* 2006, Philpot *et al.* 2006).

Beras hitam di Indonesia dikenal dengan beberapa nama, antara lain beras wulung dari Surakarta dan beras gadog dari Cibeusi, Subang, Jawa Barat. Menurut Sasongko *et al.* (2008), di Sleman Yogyakarta, beras hitam dikenal dengan nama cempo ireng (Kristamtini 2008) dan ada yang menyebutnya beras jlitheng (Kristamtini 2009). Di Bantul, beras hitam dikenal dengan nama beras melik, sementara di Nusa Tenggara Timur (NTT) disebut aen metan dan hare kwa (Suhartini dan Suardi 2010), dan di Magelang dikenal dengan nama jawa melik (berbulu dan tidak berbulu). Perbedaan nama beras hitam tersebut diduga karena keragaman warna beras, dari hitam cerah sampai hitam pekat. Perbedaan warna beras terjadi akibat perbedaan kandungan antosianin. Warna beras dapat dibedakan antara satu individu dengan individu lainnya (Kaplan 2001).

Keragaman genetik tanaman dapat diketahui dengan penanda morfologis, biokimia, dan molekuler (Solouki *et al.* 2008). Penyandian sifat morfologi banyak dipengaruhi oleh lingkungan dan memberi manfaat dalam membentuk sejumlah kultivar unggul sejak tahun 1950-an. Penyifatan secara morfologi dapat digunakan untuk mengenali koleksi plasma nutfah ganda, menduga keragaman genetik dan korelasi antara sifat morfologi dengan sifat agronomi penting lainnya (Ciat 1993, Rimoldi *et al.* 2010, Talebi *et al.* 2008). Penyifatan pada tingkat morfologi diperlukan, terutama untuk mengenal fenotipe dan perubahan terkait dengan ekotipenya (Marzuki *et al.* 2008).

Identifikasi keragaman genetik sekelompok varietas dapat dilakukan secara konvensional maupun bioteknologi. Teknik bioteknologi yang dapat digunakan adalah teknologi penanda DNA karena hampir tidak terbatas dalam jumlah dan tidak dipengaruhi oleh lingkungan dan atau tahap perkembangan tanaman. Azrai (2006) menyatakan salah satu penanda DNA yang dapat digunakan adalah berdasarkan urutan DNA menggunakan primer yang menggabungkan urutan komplementer spesifik dalam DNA sasaran, seperti *Sequence Tagged Sites (STS)*, *Sequence Characterized*

Amplified Regions (SCARs), *Simple Sequence Repeats (SSR)* atau marka mikrosatelit (*microsatellites*), dan *Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)*.

Penanda mikrosatelit atau penanda SSR adalah susunan DNA dengan motif 1-6 pasang basa, berulang lima kali atau lebih secara *tandem* atau berurutan (Vigouroux *et al.* 2002). Mikrosatelit banyak digunakan untuk penciri dan pemetaan genetik tanaman, di antaranya jagung, padi, anggur, kedelai, jawawut, gandum, dan tomat (Gupta *et al.* 1996, Powell *et al.* 1996). Penanda mikrosatelit telah digunakan untuk mengidentifikasi keragaman genetik beberapa plasma nutfah tanaman, seperti jagung (Pabendon *et al.* 2005), terung-terungan (Nunome *et al.* 2003, Vosman *et al.* 2001), dan gandum (Zawko 2003).

Analisis kesejajaran (alignment) urutan basa nukleotida menunjukkan penanda RC12 menandai posisi ekson ke-7 dari gen *rc-bHLH*, sesuai untuk sifat padi beras merah. Penanda RC3 dan RC9 menandai posisi ekson ke-8 dan secara berturut-turut sesuai untuk sifat beras hitam-ungu dan beras putih (Utami dan Somantri 2009). Menurut Utami *et al.* (2009), terdapat beberapa penanda mikrosatelit yang diketahui terpaut dengan sifat kuantitatif (QTL/ Quantitative Trait Loci) warna merah pada beras terutama pada perikarpnya. Penanda mikrosatelit tersebut adalah RM 180 yang terdapat pada kromosom 7 genom padi, terpaut dengan QTL accID : AQGD029, dan RM 224 yang terdapat pada kromosom 11 genom padi untuk sifat warna/pigmen pada perikarp, RM 220 yang terdapat pada kromosom 1 genom padi, terpaut dengan QTL accID : AQGF019. Hasil penelitian Wiriyasuk (2005) menunjukkan lokasi gen pengendali sifat warna beras ada pada kromosom 4 dan terpetakan pada posisi RM 317–RM 241 dan RM 252–RM 241.

Utami *et al.* (2009) mengatakan penggunaan 4 penanda mikrosatelit (RM 252, RM 220, RM 180 dan RM 224) dapat membedakan lima varietas padi beras merah asal Yogyakarta (DIY), yaitu mandel handayani, segreng cempo merah, andel merah, dan saodah berdasarkan alel yang berkaitan dengan warna/pigmen pada bagian perikarp. Kristamtini dan Purwaningsih (2009) mengatakan penggunaan penanda mikrosatelit RM 220 dapat membedakan antara varietas padi merah mandel, segreng, dan aeksibundong.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan antara kandungan antosianin total dengan komponen warna (L^* , a^* , b^*), kandungan antosianin total warna secara morfologi, dan kandungan antosianin total dengan penanda mikrosatelit.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan pada Januari sampai Agustus 2013 di Balai Pengkajian Teknologi Pertanian (BPTP) Yogyakarta dan Laboratorium Genetika dan Pemuliaan Tanaman, Fakultas Pertanian UGM Yogyakarta. Bahan tanaman yang digunakan adalah benih 11 varietas padi beras hitam lokal koleksi BPTP Yogyakarta dan dua varietas beras putih sebagai tetua (Tabel 1).

Benih padi yang digunakan dalam penelitian ini ditanam dalam pot plastik di rumah plastik hingga panen, menggunakan rancangan acak lengkap, dengan lima ulangan. Media yang digunakan adalah tanah sawah dengan pupuk organik dan pupuk kimia (NPK dan urea). Pada umur 3 minggu setelah tanam, daun padi dipanen sebagai sampel untuk isolasi DNA. Sampel daun diambil dari masing-masing varietas kemudian *dibulk*. Pertumbuhan varietas yang ditanam telah seragam karena telah dilakukan pemurnian.

Tabel 1. Varietas dan daerah asal padi yang digunakan dalam penelitian. Yogyakarta, Januari-Agustus 2013.

| Nama varietas | Kode | Daerah asal |
|--|------|-------------------------------|
| Melik | A | Bantul, Yogyakarta |
| Jlitheng | B | Sleman, Yogyakarta |
| Cempo Ireng | C | Sleman, Yogyakarta |
| Sembada hitam | D | Sleman, Yogyakarta |
| Beras hitam NTT | E | Alor – NTT |
| Beras hitam Bantul | O | Bantul, Yogyakarta |
| Beras hitam Magelang (berbulu) | R | Magelang, Jawa Tengah |
| Beras hitam Magelang (tak berbulu) | S | Magelang, Jawa Tengah |
| Beras hitam Sragen | T | Sragen, Jawa Tengah |
| Beras hitam Banjarnegara berbatasan Wonosobo | W | Wonosobo, Jawa Tengah |
| Beras hitam Banjarnegara | Y | Banjarnegara, Jawa Tengah |
| Beras putih Situbagendit | G | Varietas unggul baru Kementan |
| Beras putih Inpari 6 | I | Varietas unggul baru Kementan |

Isolasi DNA menggunakan metode *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) sesuai protokol yang direkomendasikan Doyle dan Doyle (1990). Selanjutnya hasil isolasi DNA digunakan sebagai bahan amplifikasi PCR menggunakan empat penanda SSR (Tabel 2). Amplifikasi PCR dilakukan dalam volume 10 μ l dengan konsentrasi DNA 5 ng/ μ l sebanyak 2,5 μ l, ditambah PCR mix Go Taq Green 5 μ l, dan primer F/R (10 mM) 0,25 μ l. Program PCR yang digunakan adalah (1) denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit, (2) dilanjutkan 35 siklus yang terdiri atas denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, (3) penempelan primer pada suhu 55°C selama 1 menit dan suhu 72°C selama 2 menit, (4) pengulangan langkah 2–4 sebanyak 13 kali dengan program *touchdown* (penurunan suhu secara teratur) dengan perbedaan suhu 0,5°C setiap siklus, kemudian diikuti dengan pemanjangan primer akhir pada suhu 72°C selama 7 menit.

Hasil amplifikasi PCR dipisahkan pada gel metafora agarosa 2% dalam bufer TBE 1x dan dipanaskan perlahan-lahan sampai semua bahan larut dan ditambah pewarna DNA (*fluoroSafe*®) 0,01%. Larutan gel dipadatkan di dalam cetakan, disimpan pada suhu 4°C selama 30–60 menit sebelum digunakan untuk mendapatkan resolusi yang lebih baik. Setelah gel siap digunakan, hasil PCR dimasukkan ke dalam sumur gel yang direndam dalam larutan bufer TBE 1x pada alat elektroforesis horizontal dengan tegangan 80 V selama 60 menit. Kemudian hasilnya divisualisasikan di bawah transiluminator UV dan difoto.

Hasil amplifikasi DNA pada empat penanda mikrosatelit (profil DNA) yang dihasilkan diterjemahkan menjadi data biner (1 = ada pita DNA, 0 = tidak ada pita DNA). Tanaman percobaan tetap dipelihara sampai menghasilkan dan gabah hasil panen dikupas (kurang lebih 40 g beras) untuk diamati warnanya menggunakan alat Chroma Meter-Konica Minolta-Minolta CM-2006 dan diamati secara morfologis serta dilakukan analisis kandungan antosianin total. Analisis kandungan antosianin total menggunakan metode Lees dan Francis

Tabel 2. Primer-primer mikrosatelit yang bertautan dengan warna beras dan digunakan untuk amplifikasi PCR.

| Nama | Kromosom | Ukuran produk (bp) | Urutan basa |
|--------|----------|--------------------|--|
| RM 180 | 7 | 110 | F: CTACATCGGCTTAGGTGTAGCAACACG R: ACTTGCTCTACTTGTGGTGAGGGACTG |
| RM 224 | 11 | 157 | F: ATCGATCGATCTTCACGAGG R: TGCTATAAAAGGCATTCGGG |
| RM 220 | 1 | 127 | F: GGAAGGTAAGTGTTCACAC R: GAAATGCTTCCCACATGTCT |
| RM 252 | 4 | 216 | F: TTCGCTGACGTGATAGGTTG R: ATGACTTGATCCCGAGAACG |

Sumber: McCouch *et al.* (2002).

(1972) berdasarkan nilai absorbansi ekstrak tepung beras pada panjang gelombang 535 nm dengan alat spektrofotometer - Spectro Simadzu UV VIS tipe 1601 dengan pelarut metanol. Kandungan antosianin total dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Total antosianin} = \frac{\text{OD x faktor pengenceran}}{98,2} \times \frac{100}{\text{berat contoh}} = x \text{ mg antosianin / 100 g}$$

OD = nilai absorbansi yang terbaca pada spektrofotometer
 98,2 = nilai absorbansi dari etanol-HCL dengan konsentrasi 1% pada panjang gelombang 535 nm

Parameter yang diamati meliputi pita DNA hasil amplifikasi DNA, kandungan antosianin total, dan warna beras.

Warna Beras

Pengamatan kuantifikasi warna beras menggunakan Chroma Meter-Konica Minolta–Minolta CM-2006 pada tiga komponen warna. Komponen warna beras yang diamati adalah L^* (*lightness*), a^* (*redness–greenness*), dan b^* (*yellowness–blueness*). L^* menunjukkan kecerahan (*lightness*), a^* (*redness–greenness*) mengindikasikan kemerahan sampai kehijauan dan b^* (*yellowness–blueness*) menunjukkan kekuningan-kebiruan (Bao *et al.* 2005). Selain pengamatan warna menggunakan chroma meter, juga dilakukan pengamatan warna secara morfologi/visual dengan skoring seperti pada Tabel 3.

Analisis Data

Korelasi antara kandungan antosianin total dengan variabel warna

Korelasi antara kandungan antosianin total dengan variabel warna L^* , a^* , dan b^* diketahui melalui analisis regresi terhadap semua hasil pengamatan pada materi penelitian. Model analisis regresi menggunakan regresi linier berganda mengikuti Gomez dan Gomez (2007):

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3$$

Y = kandungan antosianin total
 $\beta_1 - \beta_3$ = koefisien regresi
 X_1 = parameter warna L^*
 X_2 = parameter warna a^*
 X_3 = parameter warna b^*

Tabel 3. Skoring warna beras secara morfologi.

| Ciri | Skor | Sifat |
|----------------|------|---|
| Hitam | 1 | Dominasi warna hitam dalam satu butir beras $\geq 50\%$; disebut hitam (H) |
| Hitam sebagian | 2 | Dominasi warna hitam dalam satu butir beras $< 50\%$; disebut strip hitam (SH) |
| Merah | 3 | Dominasi warna merah dalam satu butir beras 100%, disebut merah (M) |
| Putih | 4 | Dominasi warna putih dalam satu butir beras 100%, disebut putih (P) |

Sumber: Kristantini (2014).

Model yang digunakan tidak menyertakan intersep/konstanta dan analisis dilakukan dengan bantuan software SPSS 16.1.

Korelasi penanda mikrosatelit dengan warna beras

Profil DNA yang dihasilkan diterjemahkan menjadi data biner (1 = ada pita DNA, 0 = tidak ada pita DNA). Hasil skoring data biner digunakan untuk analisis korelasi kandungan antosianin total dengan penanda molekuler, melalui analisis regresi terhadap data hasil pengamatan semua materi penelitian. Analisis ini bertujuan untuk mengetahui korelasi antara kandungan antosianin dengan penanda mikrosatelit. Kandungan antosianin total sebagai variabel Y dan penanda mikrosatelit sebagai variabel X , dengan model regresi linier berganda (Gomez and Gomez 2007). Model yang digunakan tidak menyertakan intersep/konstanta dan analisis dilakukan dengan bantuan software SPSS 16.1.

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4$$

Y = kandungan antosianin total
 $\beta_1 - \beta_4$ = koefisien regresi
 X_1 = penanda mikrosatelit RM 180
 X_2 = penanda mikrosatelit RM 220
 X_3 = penanda mikrosatelit RM 224
 X_4 = penanda mikrosatelit RM 252

Korelasi kandungan antosianin total dengan variabel warna, penanda molekuler, dan warna secara morfologi

Selain analisis regresi juga dilakukan analisis jalur (*path analysis*) terhadap data hasil pengamatan semua materi penelitian. Analisis bertujuan untuk mengetahui variabel bebas atau variabel independen atau variabel eksogen atau variabel X yang paling efisien atau paling dominan terhadap variabel terikat atau variabel dependen atau variabel endogen atau variabel Y . Kandungan antosianin total (hasil tahap sebelumnya) sebagai variabel endogen

disebut sebagai variabel Y , sedangkan skoring penanda mikrosatelit (RM 180, RM 220, RM 224 dan RM 252) adalah untuk skor warna beras dan variabel warna (L^* , a^* , dan b^*) beras sebagai variabel independen atau variabel eksogen, disebut sebagai variabel X . Ukuran pita DNA hasil amplifikasi menggunakan 4 penanda mikrosatelit, variabel warna (L^* , a^* , dan b^*) dibuat skor seperti pada Lampiran 1. Sedangkan dasar skoring warna beras seperti pada Tabel 3. Dasar analisis jalur adalah analisis regresi dengan model regresi linier berganda dengan koefisien regresi yang digunakan *Standardized Regression Weights* (Ghozali 2008).

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_6 X_6 + \beta_7 X_7 + \beta_8 X_8$$

Y = kandungan antosianin total

β_1, \dots, β_8 = koefisien regresi

X_1 = parameter warna L^*

X_2 = parameter warna a^*

X_3 = parameter warna b^*

X_4 = penanda mikrosatelit RM 180

X_5 = penanda mikrosatelit RM 220

X_6 = penanda mikrosatelit RM 224

X_7 = penanda mikrosatelit RM 252

X_8 = skor warna secara morfologi

Analisis jalur dilakukan menggunakan perangkat lunak Amos 16 dan SPSS 16.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Korelasi Kandungan Antosianin Total dengan Variabel Warna

Berdasarkan hasil pengamatan pada warna beras (variabel L^* , a^* , b^*) dan kandungan antosianin total (Tabel 4) maka hubungan antara variabel warna secara

kuantitatif (L^* , a^* , b^*) dengan kandungan antosianin total dapat dilihat dari koefisien regresi masing-masing variabel warna. Model linier hubungan antara sifat kandungan antosianin total (variabel Y) dengan warna yang dikuantifikasi dengan variabel (L^* , a^* , b^*) sebagai variabel X diperoleh persamaan regresi:

$Y = 14,85^* L^* + 9,16 a^* - 67,94^* b^*$ ($R^2 = 0,77$ dengan $L^* = \text{lightness}$ = intensitas cahaya, a^* = variabel warna (kehijauan bernilai negatif sampai kemerahan bernilai positif), b^* = variabel warna (kebiruan bernilai negatif sampai kekuningan bernilai positif, * = nyata pada taraf 5%). Persamaan regresi tersebut memiliki nilai koefisien determinasi (R^2) 0,77^{*}. Artinya, 77,0% keragaman yang muncul pada kandungan antosianin total dapat dijelaskan oleh variabel warna (L^* , a^* , dan b^*) dan 23,0% sisanya faktor lain selain variabel warna L^* , a^* , dan b^* . Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Yodmanee *et al.* (2011) yang menyatakan adanya hubungan regresi linier antara variabel warna L^* , a^* , dan b^* dengan kandungan polifenol (antosianin merupakan bagian senyawa polifenol) dengan nilai koefisien determinasi (R^2), masing-masing 0,807; 0,728; dan 0,858.

Korelasi Kandungan Antosianin Total dengan Penanda Mikrosatelit

Analisis regresi untuk mengetahui hubungan antara warna dengan kandungan antosianin total telah dilakukan dengan nilai R^2 0,77 atau 77,0% keragaman yang muncul pada kandungan antosianin total dapat dijelaskan oleh warna beras untuk variabel L^* , a^* , dan b^* . Oleh karena itu, untuk mengetahui keterpautan antara kandungan antosianin total dengan penanda mikrosatelit dilakukan analisis regresi menggunakan skor data ukuran pita DNA, hasil amplifikasi menggunakan penanda mikrosatelit (RM 180, RM 220,

Tabel 4. Variabel warna dan kandungan antosianin total varietas padi beras hitam dan beras putih. Yogyakarta, 2013.

| Kultivar padi | Variabel warna | | | Kandungan antosianin total (mg/100 g) |
|--|----------------|-------|-------|---------------------------------------|
| | L^* | a^* | b^* | |
| Melik | 18,21 | 5,71 | 2,63 | 100,06 |
| Jlitheng | 18,10 | 4,81 | 1,51 | 53,22 |
| Cempo Ireng | 18,46 | 4,40 | 1,18 | 428,38 |
| Sembada hitam | 17,07 | 3,61 | 1,02 | 230,48 |
| Beras hitam NTT | 16,39 | 3,72 | 1,13 | 264,43 |
| Beras hitam Bantul | 27,64 | 7,54 | 6,31 | 90,22 |
| Beras hitam Magelang (berbulu) | 19,70 | 6,41 | 2,42 | 196,34 |
| Beras hitam Magelang (tak berbulu) | 18,19 | 3,72 | 1,50 | 288,53 |
| Beras hitam Sragen | 19,28 | 7,12 | 2,72 | 65,037 |
| Beras hitam Banjarnegara berbatasan Wonosobo | 21,26 | 5,07 | 1,46 | 179,09 |
| Beras Hitam Banjarnegara | 24,81 | 4,97 | 5,49 | 165,78 |
| Beras putih Situbagendit | 58,94 | 5,72 | 12,59 | 0,50 |
| Beras putih Inpari 6 | 52,54 | 7,12 | 12,73 | 0,47 |

RM 224 dan RM 252) sebagai peubah bebas (X) dan data kandungan antosianin total sebagai variabel Y (Tabel 4). Persamaan regresi kandungan antosianin total (Y) = $104,17 \text{ RM180}^* + 221,26 \text{ RM220}^{**} + 102,96 \text{ RM224}^* + 0,10 \text{ RM252}^*$, dengan nilai koefisien determinasi R^2 79,77%. Masing-masing koefisien regresi nyata pada α 5% (*) dan nyata pada 10% (**).

Koefisien determinasi (R^2) 79,77% berarti 79,77% keragaman kandungan antosianin total disebabkan oleh penanda mikrosatelit dan 20,23% disebabkan oleh faktor lain di luar empat penanda mikrosatelit tersebut. Hal ini menunjukkan kandungan antosianin total memiliki keterpautan yang kuat dengan penanda mikrosatelit RM 220 dan diikuti oleh RM 180, RM 224, dan RM 252. Data ini berbeda apabila masing-masing penanda mikrosatelit dianalisis secara terpisah. Nilai koefisien determinasi R^2 untuk masing-masing penanda mikrosatelit adalah 59,92% (RM 180); 70,84% (RM 224); 88,88% (RM 220); dan 90,88% (RM 252). Penanda mikrosatelit RM 252 memiliki keterpautan yang kuat terhadap kandungan antosianin total, diikuti oleh RM 220, RM 224, dan RM 180. Data ini menunjukkan keempat

penanda mikrosatelit lebih optimal digunakan sebagai penanda sifat kandungan antosianin total dibandingkan jika digunakan secara individu.

Korelasi Kandungan Antosianin Total dengan Penanda Mikrosatelit dan Warna

Untuk mengetahui pengaruh langsung masing-masing penanda mikrosatelit, dilakukan analisis jalur (*path analysis*) terhadap warna beras (L^* , a^* , dan b^*), atau skor warna secara morfologi. Gambar 1 menunjukkan hubungan pengaruh mikrosatelit terhadap kandungan antosianin total dan warna beras (L^* , a^* , dan b^*). Analisis jalur tersebut memiliki koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,931, yang menunjukkan 93,1% keragaman kandungan antosianin total dapat dijelaskan oleh warna (L^* , a^* , dan b^*), penanda mikrosatelit (RM180, RM220, RM224, dan RM252) dan skor warna (Tabel 5 dan 6) dan sisanya 6,9% dijelaskan oleh variabel lain yang tidak diteliti.

Koefisien jalur (*path coefficient*) untuk variabel warna terhadap kandungan antosianin total tertinggi terdapat pada variabel $b^* = 0,844$ diikuti oleh variabel

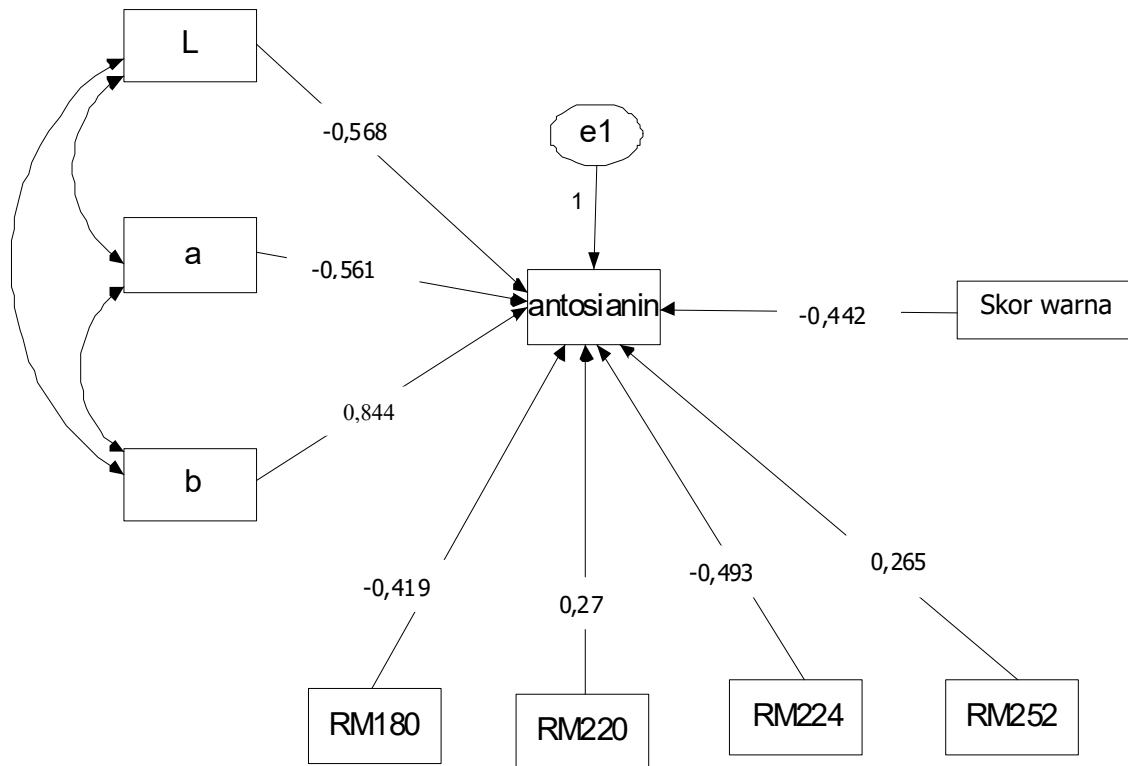
Tabel 5. Data skor variabel warna (L^* , a^* , b^*), kandungan antosianin total, skor warna secara morfologi dan skor berdasarkan ukuran pita DNA hasil amplifikasi menggunakan 4 penanda mikrosatelit pada varietas padi beras hitam dan padi beras putih. Yogyakarta, 2013.

| Varietas padi | Penanda mikrosatelit | | | | Warna | | | Skor warna secara morfologi | Skor kandungan antosianin total |
|---------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------------------|---------------------------------|
| | RM 180 | RM220 | RM224 | RM252 | L^* | a^* | b^* | | |
| A | 1 | 3 | 6 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 3 |
| B | 5 | 3 | 7 | 10 | 1 | 2 | 1 | 1 | 4 |
| C | 1 | 9 | 2 | 18 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| D | 1 | 3 | 7 | 12 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| E | 1 | 2 | 7 | 13 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| O | 1 | 2 | 7 | 14 | 3 | 3 | 2 | 1 | 4 |
| R | 1 | 13 | 8 | 15 | 1 | 3 | 1 | 1 | 2 |
| S | 1 | 2 | 9 | 15 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| T | 6 | 10 | 1 | 16 | 1 | 3 | 1 | 1 | 4 |
| W | 1 | 11 | 4 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| Y | 1 | 11 | 10 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 |
| G | 1 | 5 | 10 | 17 | 5 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| I | 1 | 12 | 10 | 17 | 5 | 3 | 3 | 4 | 5 |

Keterangan: Padi beras hitam (A. Melik; B. Jilitheng; C. Cempo Ireng; D. Sembada hitam; E. Beras hitam NTT; O. Beras hitam Bantul; R. Beras hitam Magelang berbulu; S. Beras hitam Magelang tak berbulu; T. Beras hitam Sragen; W. Beras hitam Banjarnegara berbatasan Wonosobo; Y. Beras hitam Banjarnegara); dan Kelompok beras putih (G. Beras putih Situbagendit; I. Beras putih Inpari 6).

Tabel 6. Koefisien jalur (*path coefficient*) antara variabel warna (L^* , a^* , dan b^*); penanda mikrosatelit (RM 180, RM 220, RM 224, RM 252) dan skor warna dengan kandungan antosianin total. Yogyakarta, 2013.

| | L^* | a^* | b^* | RM252 | RM224 | RM220 | RM180 | Skorwarna | R^2 |
|------------------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-----------|-------|
| Antosianin total | -0,568 | -0,561 | 0,844 | 0,265 | -0,493 | 0,27 | -0,419 | -0,442 | 0,931 |
| R^2 | 0,279* | 0,464* | 0,083 | 0,475* | 0,377* | 0,475* | 0,183* | 0,184* | |



Keterangan: → pengaruh langsung variabel X terhadap variabel Y (koefisien lintas).
 ↔ Korelasi atau hubungan antara variabelvariabel X, e1 = residual, faktor lain di luar X.

Gambar 1. Diagram jalur hubungan antara warna beras (L^* , a^* , dan b^*), skor ukuran pita DNA hasil amplifikasi penanda mikrosatelit dan skor warna secara morfologi dengan kandungan antosianin total. Yogyakarta, 2013.

a^* , dan L^* . Data ini linier dengan hasil analisis regresi sebelumnya, antara kandungan antosianin total sebagai variabel Y dan variabel warna L^* , a^* , dan b^* sebagai variabel X ($Y = 14,85^* L^* + 9,16 a^* - 67,95^* b^*$, $R^2 = 0,77$).

Koefisien jalur atau koefisien *path* untuk penanda mikrosatelit terhadap kandungan antosianin total tertinggi terdapat pada penanda mikrosatelit RM252, diikuti oleh RM 220, RM 224, dan RM 180. Hasil ini linier dengan hasil analisis regresi untuk masing-masing penanda mikrosatelit sebelumnya (nilai koefisien determinasi R^2 untuk penanda mikrosatelit RM 252 = 0,9088; RM 220 = 0,8888; RM 224 = 0,7084; dan RM 180 = 0,5992). Berdasarkan data tersebut maka penanda mikrosatelit RM 252 dan RM 220 memiliki keterpautan yang kuat dengan kandungan antosianin total, sehingga diduga terdapat dua gen pengendali sifat antosianin yang diungkapkan sebagai warna beras yang terletak pada kromosom yang berbeda. Hal ini sesuai dengan temuan Wang dan Qingyao (2007) bahwa hasil analisis genetik klasik menunjukkan dua lokus *Pb* (*Prp—b*) dan *Pp* (*Prp—a*) yang masing-masing berlokasi di kromosom

4 dan kromosom 1, terkait dengan warna perikarp dengan antosianin pada beras hitam (*purple rice*). Penjelasan tersebut sesuai dengan pendapat McCouch *et al.* (2002) yang menyatakan penanda mikro satelit RM 220 terletak pada kromosom 1 dan penanda mikrosatelit RM 252 pada kromosom 4.

KESIMPULAN

Terdapat korelasi antara kandungan antosianin total dengan variabel warna ($L^* = -0,568$, $a^* = -0,561$, $b^* = 0,844$) (L^* , a^* , dan b^*). Kandungan antosianin total juga berkorelasi dengan penanda mikrosatelit ((RM 180 = 0,265, RM 220 = -0,493, RM 224 = 0,27, RM 252 = -0,419) dan skor warna = -0,442). Seleksi tanaman padi berkandungan antosianin tinggi dapat menggunakan kriteria variabel warna (L^* dan a^* rendah, dan b^* tinggi). Penanda mikrosatelit RM 220 dan RM 252 dapat digunakan sebagai penanda molekuler untuk tanaman padi berkandungan antosianin tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Azrai, M. 2006. Sinergi teknologi marka molekuler dalam pemuliaan tanaman jagung. *J. Litbang Pertanian* 25(3):81-89.
- Bao, J.S., Y. Cai, M. Sun, G. Wang, and H. Corke. 2005. Anthocyanins, flavonols, and free radical scavenging activity of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) extracts and their color properties and stability. *J. Agric. Food Chem.* 53(6):2327-2332.
- Chaudhary, R.C. 2003. Speciality rices of the world: Effect of WTIO and IPR on its production trend and marketing. *J. Food Agric. Env.* 1(2):34-41.
- Ciat. 1993. Biotechnology Research Unit. Annual Report, Cali, Colombia International Potato Centre (CIP) and Asian Vegetable Research and Development Centre (AVRDC), International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), 1991. *In Z. Huaman* (ed.), *Descriptors for Sweet Potato*, pp.43-130. IBPGR, Rome, Italy.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus Moscow.* 12(1):13-15.
- Ghozali, I. 2008. Model Persamaan Struktural : Konsep Aplikasi dengan Program Amos 16.0. Badan Penerbit Universitas Diponegoro. Semarang.
- Gomez, K.A. and A.A. Gomez. 2007. Prosedur Statistik untuk Penelitian Pertanian. Edisi Kedua. Penerjemah E. Sjamsuddin dan J.S. Baharsjah. Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press), Jakarta.
- Gupta, P.K., H.S. Balyan, P.C. Sharma, and B. Ramesh. 1996. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Current. Sci.* 70:45-54.
- Kaplan. 2001. The Science of Plant Morphology: Definition, history and role in modern biology (On line). *Ameri J. Bota.* 88(10):1711-1741. <http://www.American Journal of Botany.com/journal/morphology/v88>.
- Kristantini. 2008. Penampilan cempo ireng sebagai sumberdaya genetik lokal beras hitam. Pros. Semnas. Pengembangan Produk Berbasis Sumber Pangan Lokal untuk Mendukung Kedaulatan Pangan. Program Studi Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Agroindustri. Universitas Mercu Buana, Yogyakarta, bekerjasama dengan Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan (PATPI) Yogyakarta dan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Yogyakarta. 18 Desember 2008. hal.
- Kristantini. 2009. Keragaan beras hitam sebagai sumberdaya genetik lokal. Pros. Risalah Aplikasi Paket Teknologi "Mendukung Hari Pangan Sedunia. BPTP Yogyakarta, Yogyakarta.
- Kristantini dan H. Purwaningsih. 2009. Potensi pengembangan beras merah sebagai plasma nutfah Yogyakarta. *J. Litbang Pertanian* 2(3):88-95.
- Kristantini. 2014. Kajian Genetik Warna Beras Padi. Disertasi. Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Lees, D.H and F.G. Francis. 1972. Standardization of pigment analysis in cranberries. *Hortscience Alexandria* 7(1):83-84.
- Marzuki, I., M.R. Uluputty, A.A. Sandra, dan S. Memen. 2008. Karakterisasi morfoekotipe dan proksimat pala Banda (*Myristica fragrans* Houtt). *Bul. Agron.* 36(2):145-151.
- McCouch, S.R., L. Teytelman, Y. Xu, K.B. Lobos, K. Claire, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z. Li, Y. Xing, Q. Zhang, I. Kono, M. Yano, R.F. Jellestrom, G. Declerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware, and L. Stein. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for Rice (*Oryza sativa* L). *DNA Res.* 9:199-207.
- Nam, S., S.P. Choi, M.Y. Kang, H.J.Koh, N. Kozukue, and M. Friedman. 2006. Antioxidative activities of bran from twenty one pigmented rice cultivars. *Food Chem.* 94:613-620.
- Nunome, T., K. Suwabe, H. Iketani, M. Hirai, and G. Wricke. 2003. Identification and characterization of microsatellites in eggplant. *Plant Breeding* 122(3):256-262.
- Pabendon, M.B., M.J. Mejaya, Subandi, dan M. Dahlan. 2005. Sidik jari empat varietas jagung hibrida beserta tetuanya berdasarkan marka mikrosatelit. *Zuriat* 16(2):192-201.
- Philpot, M., K. S. Gould, C. Lim and L. R. Ferguson. 2006. In situ and in vitro antioxidant activity of sweetpotato anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 54:1710-1715.
- Powell, W., G.C. Macharay, and J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1:215-222.
- Rimoldi, F., P.D.V. Filho, M.V. Kvitschal M.C. Gonzalvesvidigal, A.J. Pioli, S.M.A.P. Prioli, and T.R. DA Costa. 2010. Genetic divergence in sweet cassava cultivars using morphological agronomic traits and RAPD molecular markers. *Brazil Arch. Biol. Technol.* 53(6): 1447-1487.
- Ryu, S.N., S.Z. Park and C.T.Ho. 1998. High performances liquid chromatographic determination of anthocyanin pigments in some varieties of black rice. *J. Food and Drug Anal.* 6:1710-1715.
- Sasongko, T., D.P. Ferianti, dan W. Widya. 2008. Berkunjung ke Punclut: Menikmati nasi hitam dengan pesona Bandung di malam hari. [http : //www.bango-mania](http://www.bango-mania.com). Diunduh 26 September 2008.
- Satue-Gracia, M., I.M. Heinonen and E.N. Frankel. 1997. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lechthin-liposome system. *J. Agric. Food Chem.* 45: 3362-3367.
- Solouki, M., H., Mehdikhani, H. Zeinali dan A.A. Emamjomeh. 2008. Study of genetic diversity in Chamomile (*Matricaria chamomilla*) based on morphological traits and molecular markers. *Sci. Horti.* 117:281-287.
- Suhartini, T dan D. Suardi. 2010. Potensi beras hitam lokal Indonesia. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian* 32(1):9-10.
- Takashi, I., X. Bing, Y. Yoichi , N. Masaharu and K. Tetsuya. 2001. Antioxidant activity of anthocyanin extract from purple black rice. *J. Med. Food.* 4:211-218.
- Talebi, R., F. Fayaz, M. Mardi, S. M. Pirsyedi, and A.M. Naji. 2008. Genetic relationships among chickpea (*Cicer arietinum*) elite lines based on RAPD and agronomic markers. *Internat. J. Agric. Biol.* 10(3):301-305.
- Utami, D.W. dan I.H. Somantri. 2009. Sifat spesifik plasma nutfah padi beras warna. *Warta Biogen* 5(1):11-12.
- Vigouroux, Y., J.S. Jaqueth, Y. Matsuko, O.S. Smith, W.D. Beavis, J.S.C. Smith and J. Doebley. 2002. Rate and pattern of mutation at microsatellite loci in maize. *Mol. Biol. Evol.* 19(8):1251-1260.
- Vosman, B., D. Esselink, and R. Smoulders. 2001. Microsatellite markers for identification and registration of rose varieties. Document for UPOV working Group on Biochemical and Molecular Techniques and DNA-Profiling in Particular (BMT-TWO/Rose/1/1). Wageningen University and Research Centre, Netherlands.

- Wiriyasuk, K. 2005. Regulation of Genes Controlling Grain Anthocyanin and Proanthocyanidin (Condensed Tannins) Accumulation in Rice. Thesis. Graduate School. Kasetsart University, Thailand.
- Yawadio, R., S. Sanimori and N. Morita. 2007. Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rices and their aldose reductase inhibitory activities. *Food Chem.* 101 (4):1616-1625.
- Yodmanee, S., T.T. Karrila, and P. Pakdeechanuan. 2011. Physical, chemical and antioxidant properties of pigmented rice grown in Southern Thailand. *Internat'l. Food Research J.* 18(3):901-906.
- Zawko, G. 2003. Protein and DNA methods for variety identification. *Theoret. Appl. Genet.* 77: 353–359. *Agribusiness Crops Updates.*
-

Lampiran 1. Skoring parameter warna dan kandungan antosianin total.

| No | Variabel | Skor | Keterangan |
|----|-------------------------------|------|----------------------------------|
| 1 | Parameter warna L^* | 1 | Sangat rendah 15,0–20,0 |
| | | 2 | Rendah 20,1–25,0 |
| | | 3 | Sedang 25,1–30,0 |
| | | 4 | Tinggi 30,1–40,0 |
| | | 5 | Sangat Tinggi >40,1 |
| 2 | Parameter warna a^* | 1 | Rendah 1,0–3,0 |
| | | 2 | Sedang 3,1–6,0 |
| | | 3 | Tinggi 6,1–9,0 |
| 3 | Parameter warna b^* | 1 | Rendah 1,0–5,0 |
| | | 2 | Sedang 5,1–10,0 |
| | | 3 | Tinggi 10,1–15,0 |
| 4 | Kandungan antosianin total | 0 | Sangat tinggi >300,0 mg/100g |
| | | 1 | Tinggi 200,1–300,0 mg/100g |
| | | 2 | Agak tinggi 150,1–200,0 mg/100 g |
| | | 3 | Sedang 100,1–150,0 mg/100 g |
| | | 4 | Rendah 50,1–100,0 mg/100 g |
| 5 | Sangat rendah < 50,0 mg/100 g | | |
| 5 | Penanda mikrosatelit RM 180 | 1 | Pita ukuran 110 bp |
| | | 2 | Pita ukuran 180 bp |
| | | 3 | Pita ukuran 190 bp |
| | | 4 | Pita ukuran 250 bp |
| | | 5 | Pita ukuran 110 + 190 bp |
| | | 6 | Pita ukuran 110 + 180 + 250 bp |
| 6 | Penanda mikrosatelit RM 220 | 1 | Pita ukuran 110 bp |
| | | 2 | Pita ukuran 120 bp |
| | | 3 | Pita ukuran 125 bp |
| | | 4 | Pita ukuran 130 bp |
| | | 5 | Pita ukuran 140 bp |
| | | 6 | Pita ukuran 290 bp |
| | | 7 | Pita ukuran 300 bp |
| | | 8 | Pita ukuran 320 bp |
| | | 9 | Pita ukuran 110 + 300 bp |
| | | 10 | Pita ukuran 130 + 320 bp |
| | | 11 | Pita ukuran 120+ 320 bp |
| | | 12 | Pita ukuran 140 + 320 bp |
| | | 13 | Pita ukuran 110 + 130 + 290 bp |
| 7 | Penanda mikrosatelit RM 224 | 1 | Pita ukuran 100 bp |
| | | 2 | Pita ukuran 125 bp |
| | | 3 | Pita ukuran 140 bp |
| | | 4 | Pita ukuran 150 bp |
| | | 5 | Pita ukuran 125 +150 bp |
| | | 6 | Pita ukuran 125 + 160 bp |
| | | 7 | Pita ukuran 140 + 150 bp |
| | | 8 | Pita ukuran 100 + 150 bp |
| | | 9 | Pita ukuran 100 + 140bp |
| | | 10 | Pita ukuran 130 + 320 bp |
| 8 | Penanda mikrosatelit RM 252 | 1 | Pita ukuran 200 bp |
| | | 2 | Pita ukuran 210 bp |
| | | 3 | Pita ukuran 220 bp |
| | | 4 | Pita ukuran 230 bp |
| | | 5 | Pita ukuran 240 bp |
| | | 6 | Pita ukuran 250 bp |
| | | 7 | Pita ukuran 260 bp |
| | | 8 | Pita ukuran 300 bp |
| | | 9 | Pita ukuran 400 bp |
| | | 10 | Pita ukuran 220 + 240 bp |
| | | 11 | Pita ukuran 250 +400 bp |
| | | 12 | Pita ukuran 200 + 220 bp |
| | | 13 | Pita ukuran 200 + 210 bp |
| | | 14 | Pita ukuran 200 + 230 bp |
| | | 15 | Pita ukuran 200 +240 bp |
| | | 16 | Pita ukuran 260 + 300 bp |
| | | 17 | Pita ukuran 210 + 220 bp |
| | | 18 | Pita ukuran 250 + 400 bp |