



## **ANALISIS KOMPARATIF MINERAL MIKRO DAN ANTI NUTRISI PADA BERAS ANTARA PADI REKAYASA GENETIK DAN TETUANYA**

### **Comparative Analysis of Micro-Minerals and Anti-Nutrients in Brown Rice between Transgenic Rice and Its Non-Transgenic Counterpart**

**Enny Rimita Sembiring<sup>1,2</sup>, Puspo Edi Giriwono<sup>2,3</sup>, Satya Nugroho<sup>1</sup>, Maggy Thenawidjaja Suhartono<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup>Pusat Riset Bioteknologi, OR-IPH BRIN, Jl. Raya Bogor Km. 46, Cibinong 16911, Jawa Barat, Indonesia

<sup>2</sup>Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB University, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680, Indonesia

<sup>3</sup>SEAFast Center, LPPM IPB University, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680, Indonesia

\*Email: [thenawidjaja@yahoo.com](mailto:thenawidjaja@yahoo.com)

#### **ABSTRACT**

*Comparative analysis is important aspect in food safety of transgenic crops to determine the effect of transgene on nutritional and anti-nutritional contents. This research was aimed to determine the concentration of Fe, Zn, phytic acid, and anti-trypsin activity, then assess the equivalence between transgenic rice and non-transgenic rice. Fe and Zn concentration was carried out using energy-dispersive x-ray fluorescence spectrometry. Anti-nutritional phytic acid and anti-trypsin activity were performed using visible light spectrophotometry. The data obtained were statistically tested using Independent sample t-test. These results indicated that the concentration of Fe, Zn, phytic acid, and anti-trypsin activity in 6 transgenic rice events were equivalent to non-transgenic rice. In conclusion, the transgene did not affect Fe, Zn, phytic acid, and anti-trypsin activities in brown rice of 6 transgenic rice events carrying cry1B::cry1Aa fusion genes.*

**Keywords:** anti-trypsin, cry1B::cry1Aa, micro-mineral, phytic acid, substansial equivalence

#### **ABSTRAK**

Analisis komparatif adalah salah satu aspek penting dalam keamanan pangan tanaman produk rekayasa genetik (PRG) untuk mengetahui pengaruh transgen terhadap kandungan nutrisi dan anti nutrisi. Pada penelitian ini dilakukan analisis komparatif konsentrasi mineral mikro Fe, Zn, asam fitat, dan aktivitas anti tripsin pada beras pecah kulit dari 6 galur padi PRG pembawa fusi gen cry1B::cry1Aa terhadap padi non-PRG Rojolele tetuanya. Analisis konsentrasi mineral mikro Fe dan Zn menggunakan metode *energy-dispersive x-ray fluorescence spectrometry* (ED-XRF) dengan 3 ulangan. Analisis konsentrasi anti nutrisi asam fitat dan aktivitas anti tripsin dilakukan menggunakan metode spektrofotometri sinar tampak dengan 8 ulangan. Data yang diperoleh diuji secara statistik menggunakan *Independent sample t-test*. Hasil yang diperoleh menunjukkan konsentrasi mineral mikro Fe, Zn, asam fitat, dan aktivitas anti tripsin pada beras dari 6 galur padi PRG pembawa fusi gen cry1B::cry1Aa setara dengan padi non-PRG Rojolele tetuanya. Kesimpulannya bahwa transgen tidak mempengaruhi kandungan mineral mikro Fe, Zn, asam fitat, dan aktivitas anti tripsin pada beras dari 6 galur padi PRG pembawa fusi gen cry1B::cry1Aa.

**Kata Kunci:** anti tripsin, asam fitat, cry1B::cry1Aa, kesepadanan substansial, mineral mikro

## PENDAHULUAN

Padi (*Oryza sativa* L.) termasuk salah satu tanaman yang memerlukan banyak sasaran program perbaikan karena merupakan makanan pokok bagi lebih dari setengah penduduk dunia dan makanan pokok utama di Indonesia (Chakraborty et al. 2016). Salah satu hama dominan di Asia yang intensitas serangannya cukup tinggi adalah penggerek batang padi kuning (*Scirpophaga incertulas* Wlk.), famili Pyralidae, ordo Lepidoptera (Renuka et al. 2017, Kumar et al. 2020). Hama penggerek batang padi kuning (PBK) ini dapat menimbulkan kerugian 5–10% per tahun, namun pada masing-masing lahan bisa mencapai 50–60% (Kattupalli et al. 2021). Ketiadaan sumber gen ketahanan terhadap hama PBK pada padi dan kerabatnya, menyebabkan teknik rekayasa genetika merupakan satu-satunya cara yang dapat dilakukan dalam merakit padi tahan hama PBK (Dutta et al. 2016). Perakitan padi tahan hama PBK umumnya menggunakan gen dari *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). *Bt* adalah bakteri penghasil kristal protein (*Bt* toksin) yang disandi oleh gen *cry*. *Bt* toksin bersifat spesifik, salah satunya toksik terhadap hama PBK namun tidak toksik bagi serangga non target, burung, ikan, dan mamalia termasuk manusia (Saxena et al. 2020, Loutfi et al. 2021).

Meskipun tanaman padi produk rekayasa genetika (PRG) memiliki potensi dalam mengatasi masalah pertanian, namun prinsip kehati-hatian diperlukan (Adenle et al. 2017). Regulasi PRG di Indonesia tentang keamanan hayati PRG mencakup keamanan lingkungan, pangan, dan pakan (Ulum 2021). Ketentuan keamanan pangan tanaman PRG berpedoman pada kesepadanan substansial tanaman PRG terhadap tanaman tetuanya. Studi komparatif kandungan nutrisi dan anti nutrisi padi PRG dibandingkan dengan tetuanya bertujuan untuk memastikan kandungan nutrisi dan anti nutrisi tidak berubah akibat penyisipan transgen (Brune et al. 2021).

Pusat Riset Bioteknologi, OR-IPH BRIN telah memiliki 6 galur padi kultivar Rojolele PRG tahan hama PBK yang mengekspresikan fusi gen *cry1B::cry1Aa* di bawah kendali promotor *ubiquitin* (Nugroho et al. 2020). Padi PRG ini mengandung 2

gen yang mengekspresikan 2 toksin dengan situs pengikatan yang berbeda, sehingga dapat menunda resistensi pada hama (Peralta dan Palma 2017). Hal ini dapat terjadi karena untuk mematahkan efektivitas dua atau lebih toksin *Bt* dengan situs pengikatan yang berbeda memerlukan beberapa mutasi pada hama (Manikandan et al. 2016).

Ruang lingkup pada penelitian ini adalah analisis komparatif mineral mikro Fe dan Zn serta anti nutrisi asam fitat dan aktivitas anti tripsin antara padi PRG Rojolele pembawa fusi gen *cry1B::cry1Aa* terhadap padi non-PRG Rojolele tetuanya. Analisis kandungan Fe dan Zn menjadi penting karena menurut data prevalensi kekurangan Fe dan Zn masih tinggi di dunia termasuk di Indonesia (Wessells dan Brown 2012, Stelle et al. 2019, Manikam 2021). Asam fitat dan anti tripsin merupakan anti nutrisi yang direkomendasikan untuk dibandingkan antara padi PRG dan non-PRG oleh lembaga internasional yang menerbitkan konsensus mengenai studi keamanan pangan varietas baru pada padi dan merupakan anti nutrisi yang kandungannya banyak di biji padi (Choi et al. 2012, Wang et al. 2012, OECD 2016). Dampak negatif asam fitat dapat membentuk kompleks dengan mineral-mineral esensial seperti Ca, Mg, Fe, Zn, asam amino/protein, dan pati sehingga mengganggu penyerapannya (Wang dan Guo 2021). Dampak negatif anti tripsin dapat menyebabkan penurunan pertumbuhan dan hipertrofi pankreas pada hewan coba (Samtiya et al. 2020).

Penelitian ini bertujuan melakukan analisis komparatif kandungan mineral mikro Fe dan Zn serta anti nutrisi asam fitat dan aktivitas anti tripsin pada beras pecah kulit antara padi Rojolele PRG pembawa fusi gen *cry1B::cry1Aa* dan padi Rojolele non-PRG yang merupakan tanaman asalnya.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Sampel yang diuji adalah beras pecah kulit dari 6 galur padi PRG pembawa fusi gen *cry1Aa::cry1B* generasi ketujuh (T6) koleksi Pusat Riset Bioteknologi, OR-IPH BRIN dan padi Rojolele non-PRG tetuanya.

Bahan yang digunakan meliputi: kit *magnetic DNA purification system for food* (Promega), *PCR master mix* (Thermo Fisher Scientific), *benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide* (Sigma Aldrich), dimetil sulfoksida (Merck), *trypsin from bovine pancreas* (Sigma Aldrich), asam asetat 30% (Merck), HNO<sub>3</sub> 0,5 M, FeCl<sub>3</sub> (Merck), n-amil alkohol (Merck), NaOH 0,01 N pH 9,0, amonium tiosianat (Merck), *phytic acid sodium salt hydrate* (Sigma Aldrich).

Alat yang digunakan meliputi: tabung reaksi bertutup, alat-alat gelas, *multipurpose microcentrifuge* (Eppendorf), instrumen PCR (Eppendorf), *high-speed refrigerated centrifuge* (Hitachi), *gel documentation system* (UVITEC), *spectrophotometer nanodrop* (IMPLEN), instrumen X-Supreme 8000 (Hitachi), *incubator shaker* (IKA), penangas air (VWR Scientific), *UV/Vis spectrophotometer* (Fisher Scientific).

### Preparasi sampel

Padi ditanam di areal persawahan kawasan Cibinong Science Center (CSC) dengan perlakuan pemupukan, pengairan, dan pemanenan yang sama. Gabah dikeringkan dan dikemas dalam plastik, kemudian disimpan di ruang penyimpanan benih pada suhu sekitar 10 °C. Gabah tersebut dipisahkan dari sekam dengan cara manual sehingga diperoleh beras pecah kulit. Beras pecah kulit dihaluskan menggunakan mortar dan alu hingga diperoleh tepung beras.

### Konfirmasi Keberadaan dan Kestabilan Fusi Gen

Kit *magnetic DNA purification system for food* digunakan untuk mengisolasi DNA dari tepung beras. Sebanyak 200 mg tepung beras ditimbang lalu dimasukkan ke dalam tabung mikro. Sebanyak 500 µL buffer lisis A, 250 µL buffer lisis B, dan 5 µL RNase A ditambahkan, kemudian campuran divorteks. Larutan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang, selanjutnya ditambahkan 750 µL larutan presipitasi dan divorteks. Larutan disentrifus dengan kecepatan 13000 xg selama 10 menit, kemudian supernatan dipindahkan ke tabung mikro yang baru, lalu ditambahkan 50 µL partikel *silica-paramagnetic* dan divorteks. Isopropanol dingin ditambahkan sebanyak 0,8 kali volume sampel, lalu tabung mikro dibolak-balik. Suspensi diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang, kemudian tabung mikro ditempatkan pada *magnetic stand* selama 1 menit hingga partikel *silica-paramagnetic* yang

mengandung DNA dan supernatan memisah, lalu supernatan dibuang. Sebanyak 250 µL buffer lisis B ditambahkan, divorteks, kemudian tabung mikro ditempatkan pada *magnetic stand* selama 1 menit hingga partikel dan supernatan memisah, lalu supernatan dibuang. Pelet dicuci dengan menambahkan 1 mL etanol 70%, lalu tabung mikro ditempatkan pada *magnetic stand* selama 1 menit hingga partikel dan supernatan memisah, kemudian supernatan dibuang. Pencucian dilakukan sebanyak 3 kali. Pelet dikeringkan pada suhu ruang selama 15–30 menit. DNA yang terikat pada partikel *silica-paramagnetic* dilarutkan dengan menambahkan 100 µL buffer TE pH 8,0, lalu divorteks dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 65 °C. Tabung mikro ditempatkan pada *magnetic stand* selama 1 menit hingga partikel dan supernatan memisah. Supernatan yang mengandung DNA dipipet dan dipindahkan ke tabung mikro yang bersih dan steril. Tabung mikro disimpan di *freezer* –20 °C.

Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA dilakukan menggunakan *spectrophotometer Nanodrop*. Konfirmasi adanya gen target dilakukan dengan teknik PCR (*polymerase chain reaction*) menggunakan sepasang primer fusi gen *cry1B::cry1Aa* *forward* 5' – GCTGTCAACGCTCTCTTCAC–3' dan *reverse* 5' –CGATGTCGAGAACTGTAAGG–3'. Campuran reaksi PCR terdiri dari 0,3125 U *tag polymerase*; 0,8 µM primer *forward*; 0,8 µM primer *reverse*; 20–125 µg sampel DNA; dan 3,25 µL *nuclease free water* dengan total reaksi 12,5 µL per sampel. Hasil PCR divisualisasi menggunakan elektroforesis dengan konsentrasi gel agarosa 1%. Alat elektroforesis diatur dengan tegangan listrik 100 *volt* selama sekitar 100 menit hingga sampel bergerak dari sumur sepanjang ±8 cm pada gel agarosa. Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel agarosa dalam larutan etidium bromida selama ±30 menit, selanjutnya langsung diamati dan didokumentasikan menggunakan instrumen *gel documentation system*.

### Pengukuran konsentrasi mineral mikro

Analisis mineral mikro Fe dan Zn dilakukan menggunakan instrumen Oxford X-Supreme 8000. Instrumen ini menggunakan metode *energy-dispersive x-ray fluorescence spectrometry* (ED-XRF) yang telah divalidasi

dengan *inductively coupled plasma – optical emission spectroscopy* (ICP-OES). Metode ini merupakan teknik analisis non destruktif. Prinsipnya adalah semua elemen memancarkan sinar-x sekunder ('fluoresen') dari energi karakteristiknya ketika terkena sinar-x primer dari instrumen. Energi dan intensitas pancaran sinar-x primer yang diaplikasikan pada sampel dapat menentukan unsur-unsur yang terkandung dalam sampel tersebut berdasarkan karakteristik fluoresensinya yang berbeda (Paltridge et al. 2012).

Sebanyak 50 g gabah digiling dan dipisahkan sekam dari beras menggunakan *testing husker* (Satake), lalu disortir Hanya beras pecah kulit yang utuh dan bagus yang diuji. Sebanyak 3 g beras dimasukkan ke dalam *spinner sample holder* kemudian dikocok perlahan untuk mendistribusikan beras hingga merata. *Spinner sample holder* dimasukkan ke dalam instrumen X-Supreme 8000. Program untuk pengukuran Fe dan Zn dipilih pada layar monitor. Ulangan dilakukan sebanyak 3 kali. Kandungan Fe dan Zn dinyatakan dalam satuan ppm ( $\text{mg kg}^{-1}$ ).

#### Penetapan kadar asam fitat

Metode yang digunakan untuk menetapkan kadar asam fitat diadopsi dari metode Davies dan Reid (1979). Prinsipnya adalah ion-ion ferri yang telah membentuk kompleks dengan asam fitat, tidak dapat lagi bereaksi dengan ion-ion tiosianat untuk membentuk kompleks yang berwarna merah. Absorbansi yang diperoleh berbanding terbalik dengan konsentrasi asam fitat. Metode ini memiliki kelebihan karena dapat digunakan pada sampel dan reagen yang lebih sedikit, selain itu penggunaan n-amil alkohol menyebabkan intensitas warna dapat dipertahankan, dan meningkatkan linieritas kurva kalibrasi. Penetapan kadar asam fitat menggunakan Thermo Scientific™ Multiskan™ GO *microplate spectrophotometer* (Fisher Scientific).

Sebanyak 1 g tepung beras ditimbang lalu disuspensikan dalam 25 mL larutan  $\text{HNO}_3$  0,5 M. Suspensi diaduk selama 3 jam di *incubator shaker* dengan kecepatan 400 rpm pada suhu ruang. Suspensi disaring menggunakan kertas saring dan supernatannya disimpan di lemari pendingin suhu 4 °C.

Tahap pertama dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum larutan standar *phytic acid sodium salt hydrate*. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang sinar tampak yaitu 450–700 nm. Pembuatan kurva kalibrasi dilakukan dengan mengukur absorbansi 6 konsentrasi standar yaitu 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; dan 0,09 mM dengan 8 ulangan untuk masing-masing konsentrasi.

Sebanyak 1 mL filtrat hasil ekstraksi tepung beras dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup, lalu ditambahkan 0,9 mL larutan  $\text{HNO}_3$  0,5 M dan 1 mL larutan  $\text{FeCl}_3$  yang mengandung  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  Fe. Tabung reaksi ditutup dan dikocok. Tabung reaksi dipanaskan dalam air mendidih selama 20 menit untuk mempercepat reaksi. Selanjutnya, tabung reaksi dikeluarkan dari air mendidih dan didiamkan sekitar 5–10 menit hingga mencapai suhu ruang. Sebanyak 5 mL n-amil alkohol dan 1 mL larutan amonium tiosianat ditambahkan, dikocok, dibiarkan bereaksi selama 15 menit, lalu dipindahkan ke tabung sentrifus. Sampel disentrifus dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit pada suhu ruang. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 494 nm dengan n-amil alkohol sebagai blanko. Hasil yang diperoleh dibandingkan dengan kurva kalibrasi standar. Pengukuran dilakukan sebanyak 8 ulangan.

#### Penetapan aktivitas anti tripsin

Penetapan aktivitas anti tripsin menggunakan metode *in vitro* didasarkan atas prinsip penghambatan atau penurunan kecepatan hidrolisis substrat sintesis *benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide* oleh enzim tripsin akibat adanya anti tripsin (Yalcin dan Basman 2015). Reaksi enzimatik ini diukur menggunakan spektrofotometer pada  $\lambda$  410 nm. Instrumen yang digunakan Thermo Scientific™ Multiskan™ GO *microplate spectrophotometer* (Fisher Scientific).

Sebanyak 1 g tepung beras ditimbang, lalu disuspensikan dalam 25 mL larutan NaOH 0,01 N pH 9,0. Suspensi diaduk selama 3 jam di *incubator shaker* dengan kecepatan 400 rpm pada suhu ruang. Suspensi disaring menggunakan kertas saring dan supernatannya disimpan di lemari pendingin suhu 4 °C.

Penetapan aktivitas anti tripsin dilakukan pada suhu 37 °C. Semua tabung

sentrifus dimasukkan ke dalam penangas air suhu 37 °C selama 10 menit sebelum digunakan. Sebanyak 2 mL ekstrak tepung beras dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus. Sebanyak 2 mL larutan enzim *trypsin from bovine pancreas* ditambahkan dan diaduk, lalu larutan dibiarkan bereaksi selama 10 menit di dalam penangas air suhu 37 °C. Sebanyak 5 mL larutan *benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide* (BAPNA) dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus. Larutan diaduk dan dibiarkan bereaksi selama 10 menit di dalam penangas air suhu 37 °C. Larutan ditambahkan 1 mL asam asetat 30% untuk menghentikan reaksi, lalu diaduk. Larutan disaring menggunakan kertas saring. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 410 nm. Blanko sampel dan blanko standar dibuat dengan cara yang sama, namun penambahan larutan BAPNA dilakukan setelah reaksi dihentikan dengan menambahkan larutan asam asetat 30%. Pada larutan standar digunakan *aquabidest* sebagai pengganti sampel.

#### Analisis data

Pengolahan data menggunakan *Microsoft Excel 2010*. Metode statistik *Independent sample t-test* digunakan untuk menentukan apakah ada perbedaan nyata konsentrasi antara masing-masing galur padi PRG pembawa fusi gen *cry1Aa::cry1B* dibandingkan dengan padi Rojolele non-PRG. Perbedaan ditentukan oleh nilai *p*, jika nilai *p* > 0,05 tidak ada perbedaan nyata dan

jika nilai *p* < 0,05 maka ada perbedaan nyata. Analisis statistik menggunakan perangkat lunak SPSS 17.0 *for Windows*.

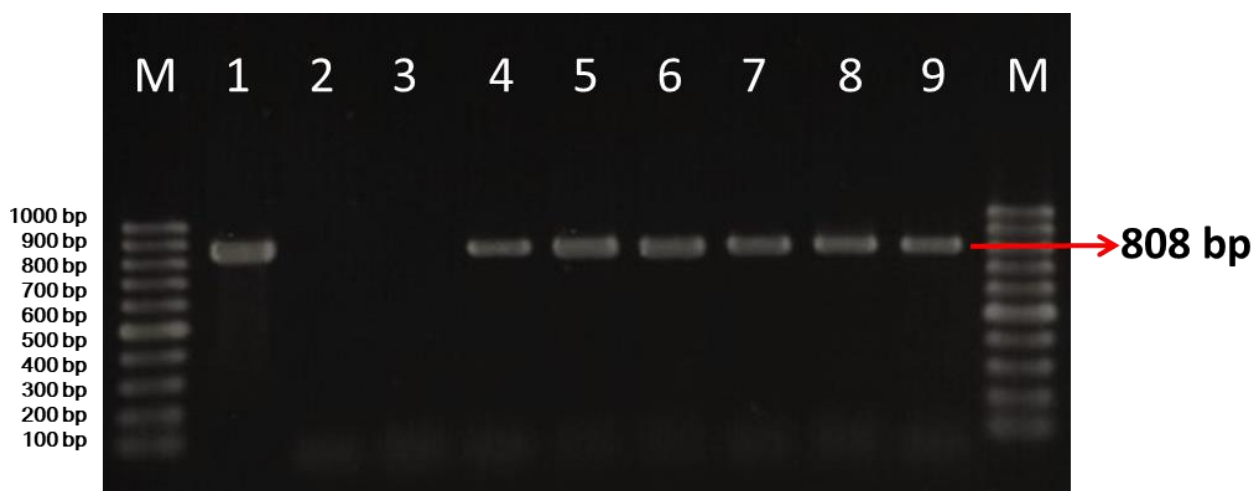
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Konfirmasi keberadaan dan kestabilan fusi gen

Hasil PCR pada beras pecah kulit dari 6 galur padi PRG pembawa fusi gen *cry1B::cry1Aa* generasi ketujuh (T6) menunjukkan adanya pita DNA dengan ukuran amplicon 808 pb sesuai harapan, sedangkan beras pecah kulit dari Rojolele non-PRG tidak menghasilkan amplicon (Gambar 1). Hasil ini mengindikasikan bahwa fusi gen *cry1B::cry1Aa* terintegrasi secara stabil di dalam genom tanaman padi generasi ketujuh (T6). Data pengujian pada minimal tiga generasi cukup untuk menunjukkan stabilitas transgen dalam genom tanaman (Qin et al. 2014). Enam galur padi PRG pembawa fusi gen *cry1B::cry1Aa* ini merupakan hasil seleksi dengan tingkat ketahanan tertinggi terhadap hama PBK (Nugroho et al. 2020).

### Analisis Fe dan Zn

Hasil analisis mineral mikro menunjukkan bahwa rata-rata konsentrasi Fe pada beras pecah kulit dari 6 galur padi PRG pembawa fusi gen *cry1B::cry1Aa* sebesar 20,1–21,7 mg kg<sup>-1</sup>, sedangkan beras pecah kulit dari Rojolele non-PRG sebesar 20 mg kg<sup>-1</sup>. Hasil analisis statistik menunjukkan kandungan Fe pada beras pecah kulit dari 6 galur padi PRG tidak berbeda nyata dengan beras pecah kulit dari Rojolele non-PRG



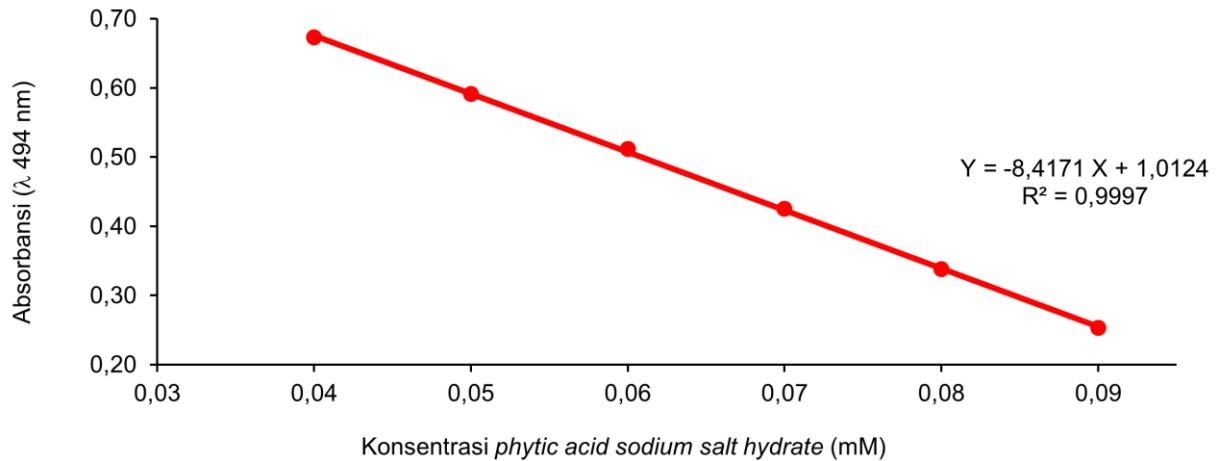
**Gambar 1.** Hasil PCR. M = Marker 100 pb; 1 = Plasmid pCAMBIA-*cry1B::cry1Aa*; 2 = H<sub>2</sub>O; 3 = Padi Rojolele non-PRG; 4 – 9 = Enam galur Padi Rojolele PRG fusi gen *cry1B::cry1Aa* (T6)

**Tabel 1.** Konsentrasi mineral mikro Fe dan Zn

Ulangan	Padi Rojolele PRG Fusi Gen <i>cry1B::cry1Aa</i> (mg kg <sup>-1</sup> )												Padi Rojolele non-PRG (mg kg <sup>-1</sup> )	
	P-10		Q-28		U-10		W-3		X-23		Y-7		Fe	Zn
	Fe	Zn	Fe	Zn	Fe	Zn	Fe	Zn	Fe	Zn	Fe	Zn		
1	21,7	33,9	20,7	34,3	19,1	36,3	20,5	33,7	19,1	32,6	20,1	32,2	19,6	32,4
2	22,8	33,6	20,0	33,4	20,3	32,8	19,7	35,3	21,7	32,1	19,8	32,6	20,3	30,8
3	20,6	32,0	19,8	32,6	21,2	35,3	20,0	33,1	20,8	32,9	21,1	32,3	20,0	32,1
Rata-rata	21,7	33,2	20,2	33,4	20,2	34,8	20,1	34,0	20,5	32,5	20,3	32,4	20,0	31,8

Keterangan:

P-10; Q-28; U-10; W-3; X-23; dan Y-7 adalah 6 galur padi Rojolele PRG pembawa fusi gen *cry1B::cry1Aa* yang merupakan event transformasi



**Gambar 2.** Kurva kalibrasi standar *phytic acid sodium salt hydrate*

(Tabel 1). Kandungan Fe pada beras pecah kulit dalam penelitian ini relatif sama dengan yang diperoleh Gregorio et al. (2000) yaitu 6,3–24,4 mg kg<sup>-1</sup> yang dilakukan terhadap padi tipe liar, padi aromatik, padi populer, dan padi lokal dari China, India, Bhutan, dan Bangladesh serta beberapa varietas koleksi IRRi dan *University of Adelaide* (Gregorio et al. 2000), namun lebih tinggi daripada penelitian Rohaeni dan Susanto (2021) yaitu 10–17,4 mg kg<sup>-1</sup> yang dilakukan terhadap berbagai kultivar padi di Indonesia.

Analisis terhadap Zn menunjukkan bahwa rata-rata konsentrasi Zn pada beras pecah kulit dari 6 galur padi PRG pembawa fusi gen *cry1B::cry1Aa* sebesar 32,4–34,8 mg kg<sup>-1</sup>, sedangkan beras pecah kulit dari Rojolele non-PRG sebesar 31,8 mg kg<sup>-1</sup>. Hasil analisis statistik menunjukkan kandungan Zn pada beras pecah kulit dari 6 galur padi PRG tidak berbeda nyata dengan beras pecah kulit dari Rojolele non-PRG (Tabel 1). Kandungan Zn pada beras pecah kulit dalam penelitian ini berada pada rentang konsentrasi Zn yang diperoleh Gregorio et al. (2000) yaitu 13,5–58,4 mg kg<sup>-1</sup> yang dilakukan terhadap padi tipe liar, padi aromatik, padi populer, dan padi

lokal dari China, India, Bhutan, dan Bangladesh serta beberapa varietas koleksi IRRi dan *University of Adelaide* (Gregorio et al. 2000), namun lebih tinggi daripada penelitian Rohaeni dan Susanto (2021) yaitu 15,8–31,1 mg kg<sup>-1</sup> yang dilakukan terhadap berbagai kultivar padi di Indonesia. Berdasarkan hasil analisis komparatif Fe dan Zn pada beras pecah kulit dari padi PRG pembawa fusi gen *cry1B::cry1Aa* menunjukkan tidak ada perubahan konsentrasi Fe dan Zn oleh transgen, sehingga padi PRG pembawa fusi gen *cry1B::cry1Aa* dapat menggantikan tetuanya dalam diet tanpa dampak yang berarti terhadap kesehatan (Brune et al. 2021).

**Analisis kadar asam fitat**

Berdasarkan hasil penentuan panjang gelombang larutan standar *phytic acid sodium salt hydrate* diperoleh serapan maksimum berada pada panjang gelombang 494 nm. Panjang gelombang tersebut digunakan untuk mengukur konsentrasi asam fitat pada sampel. Persamaan regresi linier yang diperoleh dari kurva kalibrasi standar adalah  $Y = -8,4171 X + 1,0124$  dan koefisien determinasi = 0,9997 (Gambar 2).

**Tabel 2.** Konsentrasi asam fitat

Ulangan	Padi Rojolele PRG Fusi Gen <i>cry1B::cry1Aa</i> (mg g <sup>-1</sup> )						Padi Rojolele non-PRG (mg g <sup>-1</sup> )
	P-10	Q-28	U-10	W-3	X-23	Y-7	
1	1,230	1,240	1,250	1,259	1,232	1,212	1,240
2	1,263	1,242	1,257	1,240	1,242	1,244	1,253
3	1,252	1,252	1,244	1,234	1,236	1,228	1,242
4	1,248	1,259	1,255	1,232	1,234	1,230	1,244
5	1,255	1,250	1,255	1,226	1,242	1,240	1,246
6	1,244	1,275	1,257	1,236	1,244	1,253	1,230
7	1,244	1,244	1,244	1,228	1,240	1,232	1,263
8	1,253	1,238	1,236	1,246	1,230	1,238	1,232
Rata-rata	1,249	1,250	1,250	1,238	1,237	1,235	1,244

**Tabel 3.** Persentase hambatan dan aktivitas anti tripsin

Ulangan	Padi Rojolele PRG Fusi Gen <i>cry1B::cry1Aa</i>										Padi Rojolele non-PRG			
	P-10		Q-28		U-10		W-3		X-23		Y-7			
	%	TIU mg <sup>-1</sup>	%	TIU mg <sup>-1</sup>	%	TIU mg <sup>-1</sup>	%	TIU mg <sup>-1</sup>	%	TIU mg <sup>-1</sup>	%	TIU mg <sup>-1</sup>	%	TIU mg <sup>-1</sup>
1	53,00	0,0027	50,00	0,0025	57,00	0,0029	53,50	0,0027	51,50	0,0026	51,00	0,0026	52,50	0,0026
2	51,24	0,0026	52,24	0,0026	56,22	0,0028	51,74	0,0026	53,23	0,0027	51,74	0,0026	54,23	0,0027
3	48,72	0,0024	50,26	0,0025	51,79	0,0025	45,13	0,0022	50,26	0,0025	50,77	0,0025	52,31	0,0026
4	49,74	0,0024	47,18	0,0023	49,74	0,0024	46,67	0,0023	48,72	0,0024	49,23	0,0024	50,77	0,0025
5	51,47	0,0026	52,94	0,0027	56,37	0,0029	52,94	0,0027	52,94	0,0027	51,47	0,0026	52,94	0,0027
6	52,00	0,0026	49,50	0,0025	56,00	0,0028	50,50	0,0025	51,00	0,0026	48,50	0,0024	51,50	0,0026
7	49,49	0,0025	46,97	0,0023	53,54	0,0027	48,48	0,0024	49,49	0,0025	50,00	0,0025	50,51	0,0025
8	49,25	0,0025	48,76	0,0025	53,73	0,0027	50,25	0,0025	51,24	0,0026	51,24	0,0026	52,24	0,0026
Rata-rata	50,61	0,0025	49,73	0,0025	54,30	0,0027	49,90	0,0025	51,05	0,0025	50,49	0,0025	52,13	0,0026

Pada penelitian ini diperoleh rata-rata konsentrasi asam fitat pada beras pecah kulit dari 6 galur padi PRG pembawa fusi gen *cry1B::cry1Aa* sebesar 1,235–1,250 mg g<sup>-1</sup> (0,124–0,125%), sedangkan beras pecah kulit dari Rojolele non-PRG sebesar 1,244 mg g<sup>-1</sup> (0,124%). Hasil analisis statistik menunjukkan kandungan asam fitat pada beras pecah kulit dari 6 galur padi PRG tidak berbeda nyata dengan beras pecah kulit dari Rojolele non-PRG (Tabel 2). Kandungan asam fitat pada beras pecah kulit yang diperoleh dalam penelitian ini lebih kecil daripada penelitian Liang et al. (2007) terhadap 56 varietas padi China yaitu 7,1–11,9 mg g<sup>-1</sup>, penelitian Park et al. (2012) terhadap padi PRG pembawa gen *cry1Ac* sintetik dan padi non-PRG kultivar Korea, yaitu 0,69–0,73%, serta penelitian yang dilakukan Wang et al. (2012) terhadap padi PRG fusi gen *cry1Ab::cry1Ac* dan padi non-PRG kultivar China yaitu 0,20–0,23%. Kesetaraan konsentrasi asam fitat pada beras pecah kulit dari padi PRG pembawa

fusi gen *cry1B::cry1Aa* terhadap tetuanya menunjukkan transgen tidak mengubah konsentrasi asam fitat sehingga padi PRG seaman tetuanya terhadap kandungan asam fitat (Delaney 2015). Asumsi yang mendasari pendekatan ini adalah bahwa pangan yang berasal dari tanaman yang dibudidayakan secara konvensional memiliki sejarah yang aman bagi manusia (Domingo 2016).

### Analisis aktivitas anti tripsin

Sebelum penetapan aktivitas anti tripsin, dilakukan optimasi pengenceran tepung beras yang memberikan persentase hambatan anti tripsin sebesar 40–60%. Tujuannya adalah menghasilkan pengukuran yang akurat karena persentase hambatan anti tripsin diluar rentang 40–60% menghasilkan kurva yang non linier antara absorbansi dan konsentrasi (Hamerstrand et al. 1981). Hasil optimasi diperoleh volume ekstraksi sebesar 25 mL untuk melarutkan 1 g tepung beras yang menghasilkan persentase hambatan anti tripsin sebesar 40–60% (Tabel 3).

Hasil pengukuran menunjukkan rata-rata aktivitas anti tripsin yang diperoleh pada beras pecah kulit dari 6 galur padi PRG pembawa fusi gen *cry1B::cry1Aa* sebesar 0,0025–0,0027 TIU mg<sup>-1</sup> (< 1,0 TIU mg<sup>-1</sup>), sedangkan beras pecah kulit dari Rojolele non-PRG sebesar 0,0026 TIU mg<sup>-1</sup> (< 1,0 TIU mg<sup>-1</sup>). Hasil analisis statistik menunjukkan aktivitas anti tripsin pada beras pecah kulit dari 6 galur padi PRG tidak berbeda nyata dengan beras pecah kulit dari Rojolele non-PRG (Tabel 3). Aktivitas anti tripsin pada beras pecah kulit dalam penelitian ini relatif sama dengan aktivitas anti tripsin pada padi PRG pembawa gen *cry1Ac* sintetik dan padi non-PRG kultivar Korea, padi PRG fusi gen *cry1Ab::cry1Ac* dan padi non-PRG kultivar China, serta padi PRG fusi gen *sck::cry1Ac* dan padi non-PRG varietas *indica* China yaitu < 1,0 TIU mg<sup>-1</sup> (Li et al. 2007, Park et al. 2012, Wang et al. 2012). Kesetaraan aktivitas anti tripsin beras pecah kulit dari 6 galur padi PRG pembawa fusi gen *cry1B::cry1Aa* terhadap tetuanya menunjukkan tidak ada pengaruh transgen terhadap aktivitas anti tripsin. Aktivitas anti tripsin berada pada level yang aman karena tidak hanya setara dengan tetuanya, namun juga berada dalam rentang aktivitas anti tripsin pada padi PRG maupun padi non-PRG kultivar Korea dan China (Li et al. 2007, Park et al. 2012, Wang et al. 2012). Dasar dari anggapan tersebut adalah fakta bahwa pangan yang berasal dari tanaman konvensional memiliki sejarah yang aman bagi manusia (Domingo 2016).

## KESIMPULAN

Konsentrasi mineral mikro Fe dan Zn, serta anti nutrisi asam fitat dan aktivitas anti tripsin pada beras pecah kulit dari 6 galur padi Rojolele PRG pembawa fusi gen *cry1B::cry1Aa* setara dengan beras pecah kulit dari Rojolele non-PRG tetuanya.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh kolaborasi kegiatan DIPA OR-IPH BRIN tahun 2021 dan dana pribadi.

## DAFTAR PUSTAKA

Adenle AA, Morris EJ, Murphy DJ (2017) Genetically Modified Organisms in

Developing Countries: Risk Analysis and Governance. 306 p. Cambridge University Press, New York. doi: 10.1017/9781316585269

- Brune P, Chakravarthy S, Graser G, Mathesius CA, McClain S, Petrick JS, Sauve-Cienciewicki A, Schafer B, Silvanovich A, Brink K, Burgin K, Bushey D, Cheever ML, Edrington T, Fu H, Habex V, Herman R, Islamovic E, Lipscomb EA, Motyka S, Privalle L, Ranjan R, Roper J, Song P, Tilton G, Zhang J, Waters S, Ramos A, Culler AH, Hunst P, Gast R, Mahadeo D, Goodwin L (2021) Core and supplementary studies to assess the safety of genetically modified (GM) plants used for food and feed. *J Regul Sci* 9: 45–60. doi: 10.21423/jrs-v09i1brune
- Chakraborty M, Reddy PS, Mustafa G, Rajesh G, Laxmi Narasu VM, Udayasuriyan V, Rana D (2016) Transgenic rice expressing the *cry2AX1* gene confers resistance to multiple Lepidopteran pests. *Transgenic Res* 25: 665–678. doi: 10.1007/s11248-016-9954-4
- Choi H, Moon J-K, Park B-S, Park H-W, Park S-Y, Kim T-S, Kim D-H, Ryu T-H, Kweon S-J, Kim J-H (2012) Comparative nutritional analysis for genetically modified rice, Iksan483 and Milyang204, and nontransgenic counterparts. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 55:19–26. doi: 10.1007/s13765-012-0004-5
- Davies NT, Reid H (1979) An evaluation of the phytate, zinc, copper, iron and manganese contents of, and Zn availability from, soya-based textured-vegetable-protein meat-substitutes or meat-extenders. *Br J Nutr* 41: 579–589. doi: 10.1079/BJN19790073
- Delaney B (2015) Safety assessment of foods from genetically modified crops in countries with developing economies. *Food Chem Toxicol* 86: 132–143. doi: 10.1016/J.FCT.2015.10.001
- Domingo JL (2016) Safety assessment of GM Plants: An updated review of the scientific literature. *Food Chem Toxicol* 95: 12–18. doi: 10.1016/j.fct.2016.06.013
- Dutta SS, Das S, Pale G, langrai B, Aochen C, Rai M, Pattanayak A (2016) Current



- status and future prospects of research on genetically modified rice: A Review. *Agric Rev* 37: 10–18. doi: 10.18805/AR.V37I1.9259
- Gregorio GB, Senadhira D, Htut H, Graham RD (2000) Breeding for trace mineral density in rice. *Food Nutr Bull* 21: 382–386. doi: 10.1177/156482650002100407
- Hamerstrand GE, Black LT, Glover JD (1981) Trypsin inhibitors in soy products: Modification of the standard analytical procedure. *Cereal Chem* 58: 42–45
- Kattupalli D, Barbadikar KM, Balija V, Ballichatla S, Athulya R, Padmakumari AP, Saxena S, Gaikwad K, Yerram S, Kokku P, Madhav MS (2021) The draft genome of yellow stem borer, an agriculturally important pest, provides molecular insights into its biology, development and specificity towards rice for infestation. *Insects* 12: 563. doi: 10.3390/INSECTS12060563
- Kumar K, Gambhir G, Dass A, Tripathi AK, Singh A, Jha AK, Yadava P, Choudhary M, Rakshit S (2020) Genetically modified crops: Current status and future prospects. *Planta* 251: 91. doi: 10.1007/s00425-020-03372-8
- Li X, Huang K, He X, Zhu B, Liang Z, Li H, Luo Y (2007) Comparison of nutritional quality between chinese indica rice with *sck* and *cry1Ac* genes and its nontransgenic counterpart. *J Food Sci* 72: S420–S424. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00416.x
- Liang J, Han BZ, Han L, Nout MJR, Hamer RJ (2007) Iron, zinc and phytic acid content of selected rice varieties from China. *J Sci Food Agric* 87: 504–510. doi: 10.1002/jsfa.2747
- Loutfi H, Fayad N, Pellen F, Le Jeune B, Chakroun M, Benfarhat D, Lteif R, Kallassy M, Le Brun G, Abboud M (2021) Morphological study of *Bacillus thuringiensis* crystals and spores. *Appl Sci* 11: 155. doi: 10.3390/app11010155
- Manikam NR (2021) Known facts: Iron deficiency in Indonesia. *World Nutr J* 5: 1–9. doi: 10.25220/wnj.v05.s1.0001
- Manikandan R, Balakrishnan N, Sudhakar D, Udayasuriyan V (2016) Transgenic rice plants expressing synthetic *cry2AX1* gene exhibits resistance to rice leaffolder (*Cnaphalocrosis medinalis*). *Biotech* 6: 10. doi: 10.1007/s13205-015-0315-4
- Nugroho S, Sari DI, Zahra F, Rachmawati S, Maulana BS, Estiati A (2020) Resistant performance of T10 Rojolele transgenic rice events harboring *cry1B::cry1Aa* fusion genes against the rice yellow stem borer *Scirpophaga incertulas* Wlk. In: IOP Conf Ser: Earth Environ Sci 762: 012067. doi: 10.1088/1755-1315/762/1/012067
- OECD (2016) Revised consensus document on compositional considerations for new varieties of rice (*Oryza sativa*): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and other constituents. No. 28. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris
- Paltridge NG, Palmer LJ, Milham PJ, Guild GE, Stangoulis JCR (2012) Energy-dispersive X-ray fluorescence analysis of zinc and iron concentration in rice and pearl millet grain. *Plant Soil* 361: 251–260. doi: 10.1007/s11104-011-1104-4
- Park SY, Lee SM, Lee JH, Ko HS, Kweon SJ, Suh SC, Shin KS, Kim JK (2012) Compositional comparative analysis between insect-resistant rice (*Oryza sativa* L.) with a synthetic *cry1Ac* gene and its non-transgenic counterpart. *Plant Biotechnol Rep* 6: 29–37. doi: 10.1007/s11816-011-0192-1
- Peralta C, Palma L (2017) Is the insect world overcoming the efficacy of *Bacillus thuringiensis*? *Toxins* 9: 39. doi: 10.3390/TOXINS9010039
- Qin Y, Ahn H-I, Park S-Y, Lim M-H, Woo H-J, Shin K-S, Lee J-H, Cho H-S, Baek S-H, Park S-K, Kweon S-J (2014) T-DNA inheritance stability of resveratrol rice Iksan526 over multi-generations. *Plant Breed Biotechnol* 2: 268–275. doi: 10.9787/PBB.2014.2.3.268
- Renuka P, Madhav MS, Padmakumari AP, Barbadikar KM, Mangrauthia SK, Sudhakara Rao KV, Marla SS, Babu VR (2017) RNA-seq of rice yellow stem borer *Scirpophaga incertulas* reveals molecular insights during four larval developmental stages. *G3: Genes, Genomes, Genet* 7: 3031–3045. doi: 10.1534/g3.117.043737
- Rohaeni WR, Susanto U (2021) Fe and Zn

- content of various genetic background of released rice varieties in Indonesia. IOP Conf Ser: Earth Environ Sci 752: 012057. doi: 10.1088/1755-1315/752/1/012057
- Samtiya M, Aluko RE, Dhewa T (2020) Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: An overview. Food Prod Process and Nutr 2: 6 (2020). doi: 10.1186/s43014-020-0020-5
- Saxena AK, Kumar M, Chakdar H, Anuroopa N, Bagyaraj DJ (2020) *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. J Appl Microbiol 128: 1583–1594. doi: 10.1111/jam.14506
- Stelle I, Kalea AZ, Pereira DIA (2019) Iron deficiency anaemia: Experiences and challenges. Proc Nutr Soc 78: 19–26. doi: 10.1017/S0029665118000460
- Ulum MB (2021) Regulating biosafety of genetically modified crops in Indonesia: Limits and challenges. UUM J Legal Studies 12: 157–177. doi: 10.32890/uumjls2021.12.1.7
- Wang R, Guo S (2021) Phytic acid and its interactions: Contributions to protein functionality, food processing, and safety. Compr Rev Food Sci Food Saf 20: 2081–2105. doi: 10.1111/1541-4337.12714
- Wang Y, Xu W, Zhao W, Hao J, Luo Y, Tang X, Zhang Y, Huang K (2012) Comparative analysis of the proteomic and nutritional composition of transgenic rice seeds with Cry1ab/ac genes and their non-transgenic counterparts. J Cereal Sci 55: 226–233. doi: 10.1016/j.jcs.2011.12.004
- Wessells KR, Brown KH (2012) Estimating the global prevalence of zinc deficiency: Results based on zinc availability in national food supplies and the prevalence of stunting. PLoS One 7: e50568. doi: 10.1371/journal.pone.0050568
- Yalcin S, Basman A (2015) Effects of infrared treatment on urease, trypsin inhibitor and lipoxygenase activities of soybean samples. Food Chem 169: 203–210. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.07.114