

# **Analisa Nutrisi dan Senyawa Bioaktif Padi Merah**



# **Analisa Nutrisi dan Senyawa Bioaktif Padi Merah**

**Maria G. M. Purwanto  
Ida Bagus Made Artadana  
Steven Sutanto**

 **GRAHA ILMU**

**Analisa Nutrisi dan Senyawa Bioaktif Padi Merah**

*Oleh Maria G.M. Purwanto; Ida Bagus Made Artadana; Steven Sutanto*

Hak Cipta © 2018 pada penulis

Edisi Pertama: Cetakan I ~ 2018



**GRAHA ILMU**

Ruko Jambusari 7A Yogyakarta 55283

Telp: 0274-889398; 0274-882262; Fax: 0274-889057;

Hak Cipta dilindungi undang-undang. Dilarang memperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apa pun, secara elektronis maupun mekanis, termasuk memfotokopi, merekam, atau dengan teknik perekaman lainnya, tanpa izin tertulis dari penerbit.

ISBN: 978-602-262-987-0

Buku ini tersedia sumber elektronisnya

**DATA BUKU:**

Format: 17 x 24 cm; Jml. Hal.: xii + 46; Kertas Isi: HVS 70 gram; Tinta Isi: BW; Kertas Cover: Ivori 260 gram; Tinta Cover: Colour; Finishing: Perfect Binding; Laminasi Doff.



## **KATA PENGANTAR**

**B**uku tentang analisa nutrisi padi merah ini merupakan karya yang dituliskan berdasarkan pengalaman meneliti padi dari tim penulis beberapa tahun terakhir. Buku ini mengulas analisa nutrisi padi secara umum yang merupakan makanan pokok di Indonesia dengan titik berat ulasan pada padi/beras merah, setelah melakukan banyak optimasi metode.

Melalui buku ini kami berharap untuk dapat berbagi pengetahuan mengenai pendekatan-pendekatan yang dapat dilakukan dalam mempelajari nutrisi padi, yang seringkali diperlukan untuk berbagai tujuan, termasuk dalam upaya-upaya pengembangan teknologi budidaya padi maupun upaya-upaya perbaikan varietas dan karakter padi terkait kandungan nutrisinya.

Pada kesempatan ini kami juga menyampaikan terimakasih sebanyak-banyaknya kepada rekan-rekan peneliti maupun para mahasiswa yang telah ikut membantu dengan terlibat dalam penelitian padi yang dilakukan. Terimakasih juga kepada berbagai pihak, termasuk pimpinan Universitas Surabaya yang memberikan dorongan dan fasilitas bagi kami untuk menyelesaikan penulisan buku ini, juga kepada DIKTI, yang melalui Hibah Penelitian Riset KLN (Kerjasama Luar Negeri) 2017-2019, telah mendanai penelitian mengenai upaya perbaikan karakter beras merah Barak Cenana).

Semoga buku ini dapat menjadi referensi bagi yang membutuhkan dan juga memunculkan berbagai ide inovatif untuk penelitian-penelitian selanjutnya.

Surabaya, November 2018

Tim Penulis



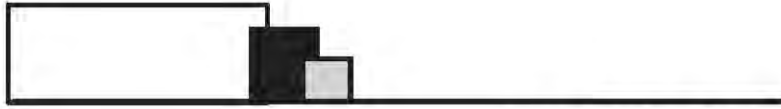


# DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	xi
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	<b>1</b>
<b>BAB 2 KUALITAS BERAS</b>	<b>5</b>
2.1 Ketahanan terhadap Penggilingan	5
2.2 Penampakan Fisik Beras	6
2.3 Derajat Pengapuran	6
2.4 Kualitas Nasi	7
2.5 Kadar Amilosa	8
2.6 Suhu Gelatinisasi	8
2.7 Aroma	9
<b>BAB 3 BERAS MERAH</b>	<b>11</b>
3.1 Karakter Beras Merah	11
3.2 Manfaat Beras Merah dan Preferensi Masyarakat terhadap Beras Merah sebagai Bahan Pangan Pokok	12
<b>BAB 4 METODE PENENTUAN KANDUNGAN NUTRISI BERAS MERAH</b>	<b>19</b>
4.1 Persiapan Sampel	19

4.2	Penentuan Aktivitas Antioksidan	19
4.3	Penentuan Kandungan Antosianin Total	20
4.4	Penentuan Kandungan Proantosianidin	21
4.5	Penentuan Kandungan Fenolik Total	22
4.6	Penentuan Kandungan Vitamin B1 (Tiamin)	22
4.7	Penentuan Kandungan Vitamin E (Tokoferol dan Tokotrienol)	23
4.8	Profil Proantosianidin	23
4.9	Profil Senyawa Antosianin	24
4.10	Penentuan Nilai Indeks Glikemik (IG) secara In-vitro	24
4.11	Kandungan Amilosa	25
4.12	Analisis Komposisi Proksimat	26
4.13	Evalusasi Sensori	26
<b>BAB 5</b>	<b>PENGARUH PERBEDAAN LOKASI GEOGRAFIS PENANAMAN TERHADAP KARAKTER TANAMAN PADI</b>	<b>27</b>
5.1	Suhu Lingkungan	27
5.2	Intensitas Cahaya	27
5.3	Ketinggian	28
<b>BAB 6</b>	<b>PEMULIAAN MUTASI TANAMAN PADI UNTUK MENGHASILKAN VARIETAS UNGGUL</b>	<b>29</b>
6.1	Mutation Breeding	29
6.2	Agen Mutasi	30
6.3	Ethyl Methanesulfonate (EMS)	31
6.4	Varietas Padi Hasil Mutagenesis	32
<b>BAB 7</b>	<b>KESIMPULAN</b>	<b>35</b>
	<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	<b>37</b>





## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2.1</b>	Ukuran dan bentuk beras	6
<b>Gambar 2.2</b>	Perbandingan antara biji berkapur (a) dengan biji normal (b). Sumber: Yang et al., 2012	7
<b>Gambar 3.1</b>	Perbandingan antara beras putih dan beras merah.	12
<b>Gambar 3.2</b>	Struktur Senyawa Fenolik yang Terdapat dalam Beras Pecah Kulit	13
<b>Gambar 6.1</b>	Ilustrasi persilangan konvensional.	30
<b>Gambar 6.2</b>	Struktur kimia Ethyl Methanesulfonate (Sega, 1984)	32
<b>Gambar 6.3</b>	Reaksi mutasi induksi oleh EMS (Suzuki et al., 2008)	32





## **DAFTAR TABEL**

<b>Tabel 1.1</b>	Klasifikasi ukuran beras	6
<b>Tabel 1.2</b>	Klasifikasi bentuk beras	6
<b>Tabel 6.1</b>	Varietas Padi Mutan yang Memiliki Peningkatan Kualitas dan Nutrisi	34



### PENDAHULUAN

**N**asi adalah salah satu jenis makanan pokok yang paling populer di dunia. Nasi menjadi makanan pokok bagi setengah dari populasi manusia di dunia, dan sebagian besar dari populasi tersebut merupakan penduduk Asia. Dari 450 juta ton konsumsi nasi di dunia pada tahun 2010-2011, sekitar 90% dikonsumsi oleh masyarakat Asia (Mohanty, 2013; USDA, 2013). Dalam bahasa Indonesia, nasi merupakan istilah untuk beras yang telah dimasak dengan cara ditanak atau dikukus (KBBI, 2017), sedangkan beras adalah istilah untuk biji dari tanaman padi (*Oryza sativa* atau *Oryza glabberina*). Masyarakat Asia Tenggara sangat bergantung pada beras dalam kehidupannya, baik dalam hal lapangan pekerjaan maupun sebagai bahan pangan pokok. Pada tahun 2014, produksi beras di Asia Tenggara (209.893.536 ton) menyumbang kurang lebih seperempat dari produksi beras dunia (741.477.711 ton). Selain itu, beras adalah komoditas dengan kapasitas produksi terbesar ketiga di dunia, setelah tebu (1.884.246.253 ton) dan jagung (1.037.791.518 ton) (FAOSTAT, 2014).

Secara umum ada dua jenis beras berdasarkan dari warnanya, yaitu beras tidak berpigmen dan beras berpigmen. Jenis yang paling umum dan paling banyak dikonsumsi adalah beras tidak berpigmen. Beras ini tidak memiliki akumulasi senyawa berwarna. Biasanya jenis beras ini diproses dengan penggilingan dan pemolesan untuk menghilangkan kulit ari (gabah) dan lapisan dedak, menyisakan bagian endosperm yang

berwarna putih. Beras berpigmen adalah biji padi yang memiliki akumulasi senyawa pigmen yang menyebabkan biji padi berwarna. Beras berpigmen biasanya dikonsumsi sebagai biji padi utuh yang hanya mengalami proses penggilingan untuk melepaskan biji padi dari gabah. Lapisan dedak pada biji padi kaya akan kandungan protein, serat, minyak, mineral, vitamin, dan senyawa fitokimia (Yokoyama, 2004). Pada beras berpigmen senyawa fitokimia tersebut adalah antosianin dan proantosianidin yang menyebabkan dedak padi berwarna. Proses penggilingan yang berlebihan dan proses pemolesan padi menyebabkan pengikisan pada lapisan kariopsis padi dan menyebabkan kandungan senyawa bioaktif dan kapasitas antioksidannya berkurang secara signifikan (Finocchiaro *et al.*, 2007).

Beras berpigmen memiliki kandungan senyawa fitokimia yang diyakini memiliki efek sebagai antioksidan. Berdasarkan beberapa penelitian, kandungan senyawa fenolik dalam beras berpigmen jauh lebih tinggi daripada beras tidak berpigmen (Shen *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). Pada beberapa varietas beras merah ditemukan bahwa kandungan fenolik total dan kapasitas antioksidan total memiliki korelasi yang cukup tinggi, sehingga dapat diasumsikan bahwa aktivitas antioksidan pada beras merah sebagian besar disebabkan oleh senyawa-senyawa fenolik yang terakumulasi di dalamnya (Gunaratne *et al.*, 2013). Komponen fenolik yang terakumulasi di dalam beras merah diidentifikasi sebagai tokol, asam fenolik, proantosianidin, dan  $\alpha$ -orizanol (Finocchiaro *et al.*, 2007; Gunaratne *et al.*, 2013). Antosianin dan proantosianidin merupakan golongan senyawa fenolik yang menunjukkan potensi aktivitas antioksidan dan memiliki manfaat kesehatan yaitu menurunkan risiko penyakit kronis (Liu, 2004).

Setiap varietas beras merah varietas bisa memiliki karakteristik nutrisi yang berbeda satu dengan lainnya. Indrasari (2011) menyebutkan bahwa kandungan vitamin B2 dan B6 pada beras merah lokal Tabanan, misalnya, lebih tinggi daripada varietas dari Jawa Barat, namun kandungan vitamin B1 dan B3-nya lebih rendah. Selain itu, kandungan antosianin pada beras merah lokal Tabanan juga 25% lebih rendah dibandingkan varietas lokal Jawa Barat (Indrasari *et al.*, 2010).

Perbaikan karakter tertentu seperti peningkatan kandungan vitamin B dan antosianin, dapat meningkatkan mutu dan nilai ekonomis dari beras merah. Mutasi merupakan salah satu metode rekayasa genetika yang efektif

dalam menghasilkan varietas baru dengan fenotip unggul, dibandingkan dengan metode konvensional, seperti kawin silang. Pemuliaan mutasi telah banyak digunakan pada tanaman untuk meningkatkan karakter agronomik dan kualitas nutrisi. Karakter agronomik yang dapat ditingkatkan antara lain tinggi tanaman, waktu berbunga, sterilitas jantan, kualitas biji, toleransi stres abiotik dan biotik, dan rendemen (Tai, 2007). Sedangkan, peningkatan kualitas nutrisi tersebut dapat berupa peningkatan makronutrien dan mikronutrien (biofortifikasi), alterasi profil protein dan asam lemak, perubahan karakter fisikokimia, peningkatan fitonutrien, dan penurunan senyawa anti-nutrien (Jain & Suprasanna, 2011).

Informasi tentang kandungan nutrisi beras Barak Cenana, terutama mutu gizi, aktivitas antioksidan, dan kandungan senyawa bioaktif masih sangat terbatas. Perbedaan kualitas nutrisi beras Barak Cenana yang dihasilkan dari padi yang ditanam pada lokasi yang berbeda juga menjadi informasi yang penting dalam rangka penyebar-luasan benih padi. Seperti yang juga telah diketahui, ketinggian daerah penanaman dapat mempengaruhi pertumbuhan dan kualitas nutrisi padi (Jing & Jichao, 2012 dan Artadana et al., 2017)).

-oo0oo-





**B**eras adalah bagian dari padi yang dikonsumsi oleh manusia. Beras diperoleh dari pemisahan sekam dengan bijinya melalui proses penggilingan. Umumnya beras yang dikonsumsi melewati dua tahapan penggilingan. Penggilingan pertama akan menghasilkan beras coklat yaitu beras yang masih dibungkus kulit arinya/dikenal dengan nama bekatul. Penggilingan kedua memisahkan beras dengan bekatulnya. Kualitas beras yang dihasilkan oleh padi diukur berdasarkan beberapa kriteria antara lain ketahanan terhadap penggilingan, penampakan fisik, kualitas setelah dimasak, dan kandungan nutrisi tambahan (Mackill et al., 1996; Sing et al., 2000).

### 2.1 KETAHANAN TERHADAP PENGGILINGAN

Ketahanan terhadap penggilingan didefinisikan sebagai kemampuan beras untuk tetap utuh ketika digiling (Singh et al., 2000). Ketahanan terhadap penggilingan menentukan head rice yield yaitu persentase berat beras utuh setelah penggilingan dibagi total beras hasil penggilingan. Salah satu faktor yang mempengaruhi rendahnya ketahanan terhadap penggilingan adalah pengapuran pada beras. Beras yang mengalami pengapuran gampang hancur pada proses penggilingan (IRRI, 2006).

## 2.2 PENAMPAKAN FISIK BERAS

Ukuran, bentuk dan penampakan biji merupakan karakter yang menjadi target pemuliaan padi. Setiap kelompok masyarakat memiliki kriteria ukuran, bentuk dan penampakan beras yang disukainya.

Ukuran dan bentuk beras diklasifikasikan berdasarkan panjang beras dan rasio antara panjang dan lebar beras (Gambar 2.1). Klasifikasi ukuran dan bentuk beras tersaji pada Tabel 2.1 dan 2.2.

Tabel 1.1. *Klasifikasi ukuran beras*

Kategori ukuran	Panjang (mm)
Sangat panjang	>7.5
Panjang	6.61-7.50
Sedang	5.51-6.60
Pendek	Kurang atau sama dengan 5.50

Tabel 1.2. *Klasifikasi bentuk beras*

Kategori bentuk	Rasio panjang/lebar
Ramping	>3,0
Sedang	2,0-3,0
Bulat	d' 2,0



(<http://bbpadi.litbang.pertanian.go.id>)

Gambar 2.1. *Ukuran dan bentuk beras*

## 2.3 DERAJAT PENGAPURAN

Sebagian besar masyarakat menyukai beras dengan endoperm yang seluruhnya bening. Pengapuran pada beras disebabkan oleh pembentukan pati yang kurang sempurna pada biji (Gambar 2). Pengapuran ditandai de-

ngan adanya struktur putih menyerupai kapur pada endosperm. Terdapat tiga jenis pengapuran yang didasarkan pada lokasinya yaitu white belly, white center, atau white back (Singh et al., 2000; Mackill, 1996).

Munculnya pengapuran pada beras dapat disebabkan oleh faktor genetik ataupun faktor lingkungan. Suhu tinggi selama fase reproduktif meningkatkan tingkat chalkiness pada beras. Selain itu chalkiness juga dipengaruhi oleh kesuburan tanah dan pengaturan air (Mackill et al., 1996).

Berikut ini adalah skala yang dipergunakan untuk menentukan derajat pengapuran pada beras:

Skala	Area yang mengalami pengapuran (%)
0	-
1	<10
5	10-20
9	>20



**Gambar 2.2.** Perbandingan antara biji berkapur (a) dengan biji normal (b).  
Sumber: Yang et al., 2012

## 2.4 KUALITAS NASI

Kualitas pemasakan dan konsumsi berkaitan erat dengan karakteristik dari pati yang menyusun endosperm. Karakteristik pati yang mempengaruhi kualitas pemasakan dan konsumsi adalah suhu geleatinasi, kadar amilosa, dan konsistensi gel (Singh et al., 2000; Mackill et al., 1996).

## 2.5 KADAR AMILOSA

Pati yang terdapat pada endosperm beras tersusun dari dua jenis molekul pati yaitu amilosa dan amilopektin. Amilosa merupakan molekul yang berbentuk rantai lurus sedangkan amilopektin adalah jenis pati yang membentuk rantai bercabang. Komposisi antara amilosa dan amilopektin berkaitan erat dengan kulit nasi yang dihasilkan antara lain:

1. Derajat kelengketan
2. Tingkat kepulenan
3. Warna

Berdasarkan kadar amilosanya, beras dikategorikan menjadi:

Kategori	Kandungan amilosa (%)
Lengket (waxy)	0-2
Amilosa rendah	8-20
Amilosa sedang	21-25
Amilosa tinggi	>25

## 2.6 SUHU GELATINISASI

Beras yang dimasak menjadi nasi akan menyerap air dan butiran patinya mengembang. Suhu yang menyebabkan kedua peristiwa terjadi disebut dengan suhu gelatinisasi. Berdasarkan suhu gelatinisasinya, beras dikelompokkan menjadi tiga yaitu:

Kategori	Suhu gelatinisasi
Rendah	<70
Sedang	70-74
Tinggi	>74

Suhu gelatinisasi berkaitan erat dengan kandungan amilosa. Beras dengan kandungan amilosa tinggi memiliki suhu gelatinisasi yang tinggi juga, oleh sebab itu uji suhu gelatinisasi kadang-kadang dipakai sebagai pengganti uji kadar amilosa.

Kualitas nasi yang dihasilkan sangat tergantung pada suhu gelatinisasinya. Nasi dari beras dengan suhu gelatinisasi yang tinggi akan sangat lembek dan hancur jika mengalami overcooking. Beras dengan suhu

gelatinisasi yang tinggi juga membutuhkan lebih banyak air dan waktu yang lebih lama untuk menanakinya. Karakteristik-karakteristik tersebut menyebabkan beras dengan suhu gelatinisasi tinggi kurang diminati dimasyarakat.

## **2.7 AROMA**

Sebagian penduduk di dunia menyukai nasi yang mengeluarkan aroma tertentu. Pandan wangi, Khao Daw Mali dan Basmati merupakan contoh varietas padi yang menghasilkan nasi dengan aroma. Pandan wangi dan Khao Daw Mali menghasilkan nasi dengan aroma pandan.

-oo0oo-



### 3.1 KARAKTER BERAS MERAH

Secara umum ada dua jenis beras berdasarkan dari warnanya, yaitu beras tidak berpigmen dan beras berpigmen. Jenis yang paling umum dan paling banyak dikonsumsi adalah beras tidak berpigmen. Beras ini tidak memiliki akumulasi senyawa berwarna. Biasanya jenis beras ini dikonsumsi dalam bentuk beras sosoh yang berwarna putih atau beras putih. Namun, karena meningkatnya tren kesehatan pangan saat ini terutama berkaitan dengan penyakit diabetes melitus tipe II, jenis pecah kulit dari beras ini atau disebut beras coklat juga mulai dikonsumsi karena banyak nutrisi yang tersimpan pada lapisan dedaknya yang memiliki sifat antidiabetik (Sun *et al.*, 2010). Beras berpigmen adalah biji padi yang memiliki akumulasi senyawa pigmen yang menyebabkan biji padi berwarna. Beras berpigmen biasanya dikonsumsi sebagai beras pecah kulit yang hanya mengalami proses penggilingan untuk melepaskan biji padi dari gabah. Kandungan senyawa pigmen biasanya paling banyak terakumulasi pada lapisan dedak, tepatnya pada lapisan aleuron. Pigmen pada biji padi dapat digolongkan menjadi hitam, ungu, dan merah sesuai dengan jenis senyawa pigmennya, seperti antosianin dan proantosianidin (Finocchiaro *et al.*, 2010; Pereira-Caro *et al.*, 2013a, 2013b). Proses penggilingan yang berlebihan dan proses pemolesan padi menyebabkan hilangnya lapisan perikarp biji padi dan menyebabkan kandungan senyawa bioaktif dan kapasitas antioksidannya berkurang secara signifikan (Finocchiaro *et al.*, 2007).



Endosperma dari biji padi merah biasanya dilapisi oleh perikarp berwarna merah yang sulit untuk dilepaskan dengan penggilingan tanpa merusak bentuk biji (Smith, 1981; Webb, 1985). Warna merah pada perikarp tersebut disebabkan oleh akumulasi senyawa pigmen proantosianidin (Gunaratne *et al.*, 2013). Oki *et al.* (2002) melaporkan bahwa aktivitas antioksidan pada ekstrak aseton beras merah berhubungan dengan senyawa oligomer proantosianidin (PA). PA atau juga disebut *condensed tannin* adalah polimer flavonoid kompleks yang secara alamiah terkandung dalam beberapa sereal dan biji tanaman polong serta ditemukan cukup melimpah pada beberapa buah (Santos, Buelga & Scalbert, 2000). Senyawa ini memiliki sifat antioksidan yang sudah dibuktikan oleh Koga *et al.* (1999) dan Stevens *et al.* (2002). PA dapat mengalami proses oksidatif yang mengubah struktur dan kondensasi molekulnya, sehingga menghasilkan senyawa kompleks yang disebut *phlobatannins* atau *phlobaphenes*. Senyawa ini mengalami perubahan reaktivitas, memiliki kelarutan lebih rendah daripada PA (Harborne, 2013), serta memiliki warna merah bata (Bate-Smith, 1969).



Sumber: <https://www.dokter.id>

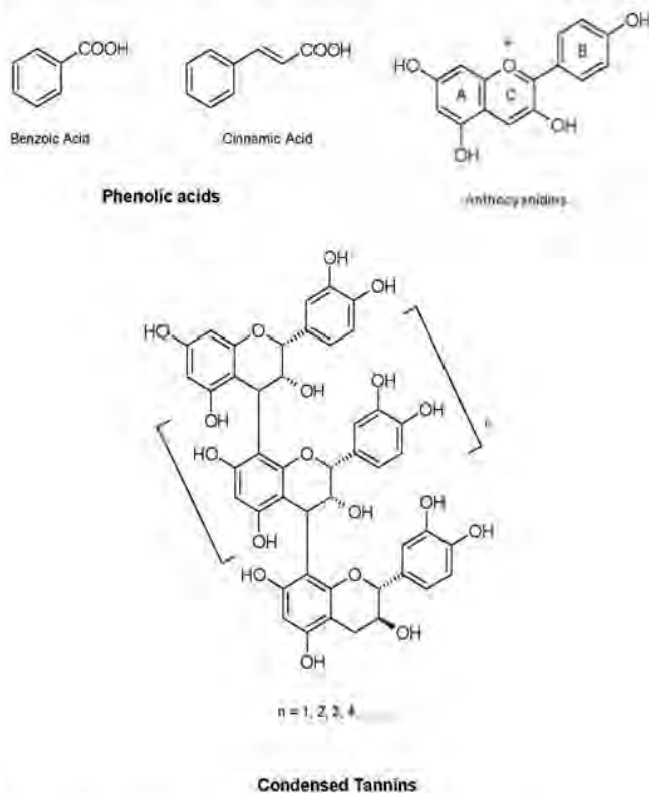
**Gambar 3.1** Perbandingan antara beras putih dan beras merah.

### **3.2 MANFAAT BERAS MERAH DAN PREFERENSI MASYARAKAT TERHADAP BERAS MERAH SEBAGAI BAHAN PANGAN POKOK**

Beras merupakan makanan yang mengandung banyak energi dan nutrisi. Oleh sebab itu, beras menjadi makanan pokok bagi banyak masyarakat di berbagai daerah, terutama di negara-negara Asia. Selain beras putih, juga dikenal beras berpigmen, seperti beras merah dan beras hitam. Kedua jenis beras ini diketahui memiliki kandungan nutrisi lebih



kaya daripada beras putih yang umum dikonsumsi (Abdel-Aal *et al.*, 2006; Thitipramote *et al.*, 2016). Beras berpigmen mengandung banyak senyawa bioaktif, seperti polifenol dan vitamin E, yang berfungsi sebagai antioksidan. Oleh karena itu, beras berpigmen mulai mendapatkan popularitas sebagai bahan pangan fungsional (Yawadio *et al.*, 2007). Tidak hanya kandungan senyawa antioksidannya, beras juga kaya akan kandungan vitamin B kompleks (Indrasari & Adnyana, 2007). Biji padi Barak Cenana memiliki kandungan antosianin sebesar 9,14% (Indrasari *et al.*, 2010) dan vitamin B1, B2, B3, dan B6 sebesar 0,45%; 0,17%; 1,42%; dan 0,24% secara berurutan (Indrasari, 2011). Vitamin B kompleks merupakan nutrisi yang penting untuk tubuh karena berperan penting dalam fungsi-fungsi fisiologis, seperti sebagai kofaktor enzim, prekursor enzim, prekursor antibiotik, dan berperan pada metabolisme karbohidrat dan lemak.



Sumber: Dykes & Rooney (2007)

**Gambar 3.2** Struktur Senyawa Fenolik yang Terdapat dalam Beras Pecah Kulit

Berdasarkan studi intervensional dan epidemiologi, beras memiliki efek kesehatan yang cukup signifikan ketika dikonsumsi sebagai beras pecah kulit, antara lain dengan mengurangi risiko penyakit kronis, seperti penyakit kardiovaskular, diabetes tipe II, obesitas, dan beberapa jenis kanker (Shao *et al.*, 2011). Manfaat kesehatan pada beras sebagian besar berasal dari kandungan senyawa polifenol yang terdapat di dalamnya.

Secara alamiah, ada tiga jenis polifenol yang terdapat pada beras pecah kulit (Gambar 3.2), yaitu: (1) asam fenolat, yang merupakan senyawa metabolit sekunder paling melimpah pada beras pecah kulit; (2) antosianin, yang hanya terdapat pada beras hitam; dan (3) proantosianidin atau condensed tannin, yang terdapat pada beras merah dan dianggap sebagai antioksidan paling efektif di alam (Gunaratne *et al.*, 2013; Qiu *et al.*, 2010). Asam fenolat merupakan senyawa turunan dari asam benzoat dan sinamat dan biasanya terdapat pada tanaman serealia. Terdapat dua kelas asam fenolat, yaitu asam hidroksibenzoat dan asam hidroksisinamat. Yang termasuk ke dalam golongan asam hidroksibenzoat, antara lain asam galat, asam p-hidroksibenzoat, asam vanilat, asam siringat, dan asam prokatekuat. Golongan asam hidroksisinamat memiliki struktur C6-C3. Yang termasuk ke dalam golongan ini, antara lain asam p-kumarat, asam kafeat, asam ferulat, dan asam sinapat. Asam fenolat yang terkandung di dalam serealia dapat ditemukan dalam bentuk bebas dan terikat. Asam fenolat bebas terdapat pada lapisan luar perikarp dan dapat diekstraksi menggunakan pelarut organik. Di dalam usus, asam fenolat bebas akan cepat terserap dan beredar ke seluruh tubuh (Dykes & Rooney, 2007). Asam fenolat bebas memiliki beberapa manfaat kesehatan, contohnya dapat menghambat oksidasi kolesterol buruk (lipoprotein dengan kepadatan rendah/ LDL) dan liposom (Chandrasekara & Shahidi, 2011). Selain itu, asam fenolat bebas yang terkandung dalam beras merah diketahui memiliki efek penghambatan enzim *angiotensin-I-converting* yang lebih tinggi dibandingkan beras putih (Massaretto *et al.*, 2011). Asam fenolat terikat teresterifikasi pada dinding sel, sehingga dibutuhkan asam atau basa untuk menghidrolisis ikatan ester tersebut agar asam fenolat dapat terbebas dari matriks sel (Dykes & Rooney, 2007). Asam fenolat ini akan terlepas secara enzimatis di dalam kolon karena bahan pangan berserat sulit dicerna di lambung dan usus. Oleh karena itu, asam fenolat terikat memiliki peran penting dalam pencegahan kanker

kolon dan memiliki efek anti-inflamasi (Dipti *et al.*, 2012). Asam fenolat yang paling banyak ditemukan dalam sereal adalah asam ferulat dan asam p-kumarat. Namun, kadar asam fenolat bervariasi pada setiap jenis sereal dan biasanya paling banyak ditemui pada dedaknya (Dykes & Rooney, 2007).

Antosianin termasuk ke dalam golongan senyawa flavonoid yang memiliki ciri khas struktur C6-C3-C6, yaitu tersusun dari dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh rantai tiga karbon (Gambar 3.2). Antosianin adalah senyawa pigmen pada tumbuhan yang larut dalam air dan berperan dalam munculnya warna biru, ungu, dan merah pada bagian-bagian tumbuhan tergantung pada pH (Dykes & Rooney, 2007). Antosianin secara alami ditemui dalam bentuk glikosida. Namun, bentuk aglikon bebasnya atau yang disebut antosianidin memiliki bioaktivitas yang lebih tinggi daripada bentuk glikosidanya (He & Giusti, 2010; Koide *et al.*, 1996). Hal ini disebabkan ukuran molekulnya yang lebih kecil dan lebih hidrofobik, sehingga dapat lebih mudah menembus lapisan epitel (He & Giusti, 2010). Ada enam jenis antosianidin yang umumnya ditemukan di alam, yaitu sianidin, delphinidin, malvinidin, pelargonidin, petunidin, dan peonidin. Antosianidin biasanya terkandung pada lapisan perikarp biji sereal (Dykes & Rooney, 2007). Antosianin banyak terkandung di dalam sereal berwarna biru, ungu hingga kehitaman, seperti beras hitam. Sedangkan pada beras merah, antosianin hanya ditemukan dalam jumlah kecil hingga tidak terdeteksi (Abdel-Aal *et al.*, 2006; Gunaratne *et al.*, 2013). Sejak zaman dahulu, diversitas bioaktivitas antosianin sudah dikenal. Hal ini terlihat dari perannya sebagai komponen penting dalam obat-obatan herbal tradisional dari berbagai negara (Konczak & Zhang, 2004). Pencernaan antosianin di dalam tubuh dimulai dari pengunyahan di mulut hingga penyerapan di usus. Sebagian besar antosianin terserap di usus halus dalam bentuk aglikonnya atau melalui transpor glukosa tergantung-natrium. Proses hidrolisis glikosida menjadi aglikon dan gula dikatalisis oleh enzim  $\alpha$ -glukosidase (He and Giusti, 2010). Ukuran molekul yang besar dan tidak adanya gugus gula untuk berikatan dengan transporter menyebabkan bentuk utuh dari antosianin yang terasetilasi tidak dapat diserap oleh usus halus (He *et al.*, 2006). Antosianin yang tidak terserap mengalir hingga ke kolon, dimana terdapat banyak jenis mikroba, proses katalisis, dan hidrolisis

yang dapat menyebabkan antosianin terserap. Antosianin yang terserap menunjukkan aktivitas penghambatan mobilitas dan kemampuan invasi beberapa jenis kanker pada manusia (Chen *et al.*, 2006). Bentuk terhidrolisis antosianin, yaitu antosianidin, dari ekstrak kulit buah anggur dan beras merah memiliki efek penghambatan pertumbuhan sel tumor kolon HCT-15 (Koide *et al.*, 1996). Selain itu, antosianin juga memiliki manfaat kesehatan terhadap penyakit kardiovaskular, diabetes tipe II, dan obesitas (Dipti *et al.*, 2012).

Proantosianidin, atau disebut juga condensed tannin, adalah senyawa polimer fenolik yang tersusun sebagian besar dari monomer flavan-3-ol (Gambar 2.2), seperti afzelekin, epiafzelekin, katekin, epikatekin, galokatekin, dan epigalokatekin (Jaiswal *et al.*, 2012). Ada dua tipe proantosianidin, yaitu tipe A dan B. Keduanya dibedakan dari struktur polimer flavan-3-olnya. Proantosianidin tipe A memiliki unit flavan-3-ol yang diikat rangkap oleh C4-C8 dan C2-O7 atau C4-C6 dan C2-O7. Sedangkan, unit flavan-3-ol proantosianidin tipe B diikat rangkap oleh C4-C8 dan C4-C6 (Gu *et al.*, 2003). Proantosianidin tipe B lebih banyak ditemui di alam; pada beras merah, proantosianidannya merupakan tipe B dan tersusun atas unit-unit katekin dan epikatekin (Gunaratne *et al.*, 2013; Qiu *et al.*, 2009). Namun, Pereira-Caro *et al.* (2013a) melaporkan bahwa proantosianidin tipe A dan B dalam bentuk dimer, trimer, tetramer, pentamer, dan heksamer ditemukan pada beras hitam dan beras merah. Hal ini kemungkinan disebabkan variasi genotip dari beras yang digunakan. Proantosianidin dianggap sebagai antioksidan alami yang paling efektif karena derajat polimerisasi dan galloilasinya yang tinggi. Menurut laporan, anggur beras merah memiliki kemampuan antioksidasi kolesterol yang tinggi, sehingga dapat memberikan manfaat kesehatan dalam mencegah penyakit kardiovaskular. Selain itu, katekin yang terkandung dalam anggur merah dapat berperan lebih penting daripada resveratrol dalam menghambat oksidasi kolesterol (Tian *et al.*, 2011). Selain itu, proantosianidin juga dilaporkan memiliki kemampuan antikarsinogenik, gastroprotektif, anti-ulcerogenik, penurunan jumlah kolesterol, dan menjaga kesehatan saluran kencing (Dykes & Rooney, 2007).

Beras telah menjadi makanan pokok bagi sebagian besar masyarakat di dunia, terutama di negara-negara Asia. Konsumsi beras di negara-negara Afrika dan Amerika Latin menunjukkan peningkatan yang signifikan

dalam beberapa dekade, yang disebabkan oleh urbanisasi dan perubahan kebiasaan makan. Selain itu, masyarakat Eropa, Amerika Serikat, dan Australia juga menunjukkan peningkatan konsumsi beras akhir-akhir ini, yang kemungkinan disebabkan oleh peningkatan ketertarikan terhadap masakan Asia (Shao & Bao, 2015). Beras merah sendiri memiliki daya tarik tersendiri di kalangan masyarakat karena perannya sebagai bahan pangan fungsional selain sebagai bahan pangan pokok. Studi preferensi konsumsi yang dilakukan oleh Indrasari & Adnyana (2007) menunjukkan bahwa secara umum responden di beberapa daerah di Indonesia (Jawa Tengah, Jawa Timur, Bali, dan NTB) menyatakan bahwa beras merah relatif lebih baik dibandingkan dengan beras yang biasa dikonsumsi dalam hal rasa, warna, ukuran, dan kandungan gizinya.

-oo0oo-



## Bab 4

# METODE PENENTUAN KANDUNGAN NUTRISI BERAS MERAH

### 4.1 PERSIAPAN SAMPEL

Sampel beras merah perlu digerus terlebih dahulu hingga menjadi bubuk. Penggerusan dapat dilakukan dengan mesin blender. Temperatur mesin dijaga agar tidak terlalu tinggi dengan menjaga waktu penggerusan tidak lebih dari 1 menit. Selanjutnya, bubuk yang diperoleh diayak dengan ayakan berukuran 70 Mesh atau 210 mikron agar diperoleh tepung beras dengan ukuran partikel yang homogen.

### 4.2 PENENTUAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN

Ekstraksi senyawa antioksidan dapat dilakukan berdasarkan metode yang dilaporkan oleh Finocchiaro *et al.* (2007) dan dilakukan dalam dua tahap, yaitu ekstraksi senyawa antioksidan bebas terlarut (senyawa antioksidan yang tidak terikat secara kovalen dengan komponen seluler dan tidak memerlukan hidrolisis sebelum ekstraksi) serta ekstraksi senyawa fenolik terikat (senyawa polifenol yang terikat secara kovalen dengan seluler komponen). Untuk mengekstraksi senyawa antioksidan bebas terlarut, sebanyak 0,5 gram tepung beras diekstraksi dengan 5 mL metanol dan digoyang menggunakan pengocok horisontal selama 20 menit. Campuran dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 4.000 rpm selama 10 menit, lalu supernatan diambil ke wadah lain. Residu diekstraksi kembali sebanyak 2 kali dengan cara yang sama. Supernatan dari ketiga ekstraksi dikumpulkan menjadi satu. Selanjutnya, residu diekstraksi dengan 5 mL



larutan aseton 70% (v/v) dengan cara yang sama. Ekstraksi dengan larutan aseton 70% diulangi sebanyak 2 kali, lalu supernatan dari ketiga ekstraksi dikumpulkan menjadi satu. Residu yang tersisa kemudian digunakan untuk ekstraksi senyawa fenolik terikat. Sebanyak 10 mL NaOH 2 M ditambahkan ke dalam residu dan digoyang pada suhu ruang selama 1 jam. Selanjutnya, pH campuran dinetralkan dengan 10 mL asam asetat 3 M. Campuran tersebut kemudian diekstraksi dengan 10 mL etil asetat sebanyak tiga kali. Etil asetat dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 4.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh dari ketiga ekstraksi dikumpulkan menjadi satu, lalu diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C dan kondisi vakum. Residu yang tersisa kemudian dilarutkan kembali dengan akuades. Semua ekstrak antioksidan yang diperoleh diencerkan hingga volume tertentu menggunakan pelarutnya masing-masing agar diperoleh kadar antioksidan yang sesuai untuk analisa.

Aktivitas antioksidan ekstrak ditentukan berdasarkan aktivitas penangkapan radikal DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) seperti yang dideskripsikan oleh Thaipong *et al.* (2006) dengan sedikit penyesuaian. Larutan stok disiapkan dengan melarutkan 24 mg DPPH dengan 100 mL metanol dan disimpan pada suhu -20°C hingga digunakan. Larutan kerja dibuat dengan mencampurkan 10 mL larutan stok dengan 45 mL metanol. Larutan kerja ini memiliki nilai absorbansi  $1,1 \pm 0,02$  unit jika diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 515 nm. Sebanyak 10  $\mu$ L ekstrak atau larutan standar direaksikan dengan 190  $\mu$ L larutan DPPH selama 30 menit dalam ruang gelap pada suhu ruang. Absorbansi campuran diukur pada panjang gelombang 515 nm. Asam askorbat digunakan untuk membuat kurva standar linear dan aktivitas antioksidan ekstrak dinyatakan dalam miligram ekuivalen asam askorbat per 100 gram sampel (mg ek-Ask/100 g sampel).

### 4.3 PENENTUAN KANDUNGAN ANTOSIANIN TOTAL

Tepung beras merah diekstraksi kandungan antosianinnya sesuai dengan metode yang dideskripsikan oleh Abdel-Aal *et al.* (2006) dengan sedikit perubahan. Sebanyak 1 gram tepung beras diekstraksi dua kali dengan 8 mL metanol yang diasamkan dengan HCl 1 N (85:15, v/v, pH 1,0) di dalam tabung sentrifugasi. Campuran tersebut kemudian digoyang dengan



kecepatan maksimal menggunakan pengocok horisontal selama 30 menit. Ekstrak yang diperoleh dipisahkan dari residu dengan sentrifugasi pada kecepatan 15.000 rpm selama 20 menit. Ekstrak dari ekstraksi pertama dan kedua dicampur menjadi satu dalam labu ukur, lalu volumenya digenapkan menjadi 20 mL dengan metanol yang diasamkan.

Kandungan antosianin total beras merah ditentukan menggunakan metode spektrofotometri seperti yang telah dioptimasi oleh Abdel-Aal dan Hucl (1999). Ekstrak kasar tepung beras yang telah diencerkan hingga volume 20 mL diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 535 nm. Kandungan antosianin total (KAT) dinyatakan dalam miligram per 100 gram sampel (mg/100 gr sampel) dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

$$KAT = \frac{A}{\varepsilon} \times \frac{V}{1000} \times MW \times \frac{1}{B} \times 10^5$$

di mana, A = absorbansi pada panjang gelombang 535 nm  
 $\varepsilon$  = koefisien ekstingsi molar (sianidin-3-glukosida = 25965 cm<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>)  
 V = volume total ekstrak (mL)  
 MW = berat molekul (sianidin-3-glukosida = 449)  
 B = berat sampel (g)

#### 4.4 PENENTUAN KANDUNGAN PROANTOSIANIDIN

Kandungan proantosianidin total ditentukan dengan metode depolimerisasi butanol-HCl yang telah diimprovisasi oleh Shay *et al.* (2017). Sebanyak 75  $\mu$ L metanol (dengan 0,05% TFA) ditambahkan ke dalam 10 mg sampel, lalu dihomogenkan dengan vorteks. Selanjutnya, sebanyak 425  $\mu$ L larutan aseton 60% (dengan 0,05% TFA) ditambahkan ke dalam campuran, lalu dihomogenkan dengan vorteks. Setelah itu, sebanyak 2 mL reagen butanol (51,5% aseton/43% butanol/5% HCl pekat/0,5% H<sub>2</sub>O) dan 67  $\mu$ L reagen Fe (2% b/v FeNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> dalam HCl 2N) ditambahkan ke dalam campuran, lalu dihomogenkan dengan vorteks, dan disonikasi selama 10 menit. Campuran kemudian dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 5 menit. Sebanyak 200  $\mu$ L supernatan dari campuran tersebut dialikuot untuk dibaca absorbansinya sebagai kontrol sampel yang tidak

dipanaskan, sebelum campuran dihomogenkan kembali dengan vorteks. Selanjutnya, campuran dipanaskan dengan *water bath* pada suhu 70°C selama 2,5 jam. Campuran kemudian dibiarkan hingga suhu ruang sebelum dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm menggunakan *microplate reader*. Untuk menentukan konsentrasi proantosianidin total dalam ekstrak, nilai absorbansi sampel yang dipanaskan dikurangi dengan absorbansi kontrol yang tidak dipanaskan, lalu disubstitusikan ke dalam persamaan regresi kurva standar ( $y = 0,0056x + 0,0646$ ) sebagai  $y$ , dimana  $x$  adalah konsentrasi proantosianidin dalam ekstrak (mg/L). Kandungan proantosianidin total dalam sampel (mg/100 g sampel) dihitung dengan mengalikan kadar proantosianidin total dalam ekstrak dengan volume ekstrak (0,0025 L) dan membaginya dengan berat sampel ( $2 \times 10^{-4}$  g).

#### 4.5 PENENTUAN KANDUNGAN FENOLIK TOTAL

Kandungan fenolik total dalam ekstrak antioksidan beras (ekstrak metanol, aseton, dan hidrolisis) ditentukan dengan metode seperti yang dideskripsikan oleh Loizzo et al. (2010). Sebanyak 0,5 mL ekstrak direaksikan dengan 0,2 mL reagen Folin-Ciocalteu, 2 mL akuades, dan 1 mL natrium karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 15% (w/v). Campuran tersebut diinkubasi dalam ruang gelap selama 1 jam pada suhu ruang. Lalu, dilakukan pengukuran absorbansi campuran pada panjang gelombang 765 nm. Asam galat digunakan sebagai referensi standar dan kandungan fenolik total dinyatakan dalam miligram ekuivalen asam galat per miligram sampel (mg ek-AG/100 g sampel). Persamaan regresi kurva standar yang digunakan untuk perhitungan konsentrasi fenolik total dalam ekstrak adalah:  $y = 0,0153x - 0,1011$ , dimana  $y$  adalah nilai absorbansi, sedangkan  $x$  adalah konsentrasi asam galat (10 mg/L hingga 100 mg/L) dengan koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,9995.

#### 4.6 PENENTUAN KANDUNGAN VITAMIN B1 (TIAMIN)

Kandungan tiamin dalam beras diekstraksi menggunakan metode yang dideskripsikan oleh Ndaw et al. (2000). Sebanyak 10 mL larutan HCl 0,1 N ditambahkan ke dalam 1 gram sampel tepung beras. Campuran tersebut kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 30 menit. Setelah didinginkan, ekstrak tersebut diatur pH-nya hingga 4,5 menggunakan

larutan natrium asetat 2,5 M dan disentrifugasi untuk mengendapkan partikel sebelum dilakukan pemisahan dengan KCKT fase terbalik.

Sebanyak 20  $\mu\text{L}$  ekstrak dipisahkan dengan kolom C18 (4,6 mm  $\times$  250 mm; 3,5  $\mu\text{m}$ ) pada laju alir 1 mL/menit. Fase gerak yang digunakan adalah campuran metanol, asam asetat glasial, dan akuabides dengan rasio 24,5:0,5:75 (v/v/v). Tiamin pada efluen dideteksi dan diukur dengan detektor UV pada panjang gelombang 234 nm. Senyawa murni tiamin yang dilarutkan dengan akuabides digunakan sebagai referensi standar dalam pembuatan kurva kalibrasi.

#### 4.7 PENENTUAN KANDUNGAN VITAMIN E (TOKOFEROL DAN TOKOTRIENOL)

Tepung beras diekstraksi dengan heksana untuk analisis kandungan vitamin E. Ekstraksi dilakukan sesuai dengan metode yang dideskripsikan oleh Heinemann *et al.* (2008). Sebanyak 0,5 gram tepung beras diekstraksi dengan 3 mL heksana dalam tabung reaksi. Tabung reaksi tersebut divorteks, lalu diinkubasi pada *water bath* bersuhu 60°C selama 20 menit dan divorteks kembali sebanyak dua kali selama waktu inkubasi. Setelah itu, campuran disentrifugasi dengan kecepatan 3000 g selama 10 menit, lalu diambil supernatannya. Residu yang tersisa diekstraksi kembali sebanyak dua kali dengan heksana pada kondisi yang sama. Ekstrak yang diperoleh dikumpulkan menjadi satu, lalu diuapkan pelarutnya pada suhu 60°C. Sebelum dianalisa dengan KCKT fase normal, ekstrak tersebut dilarutkan kembali dalam sejumlah heksana sehingga diperoleh ekstrak pekat.

Kandungan vitamin E pada beras merah ditentukan dengan metode KCKT fase normal dengan detektor UV/Vis. Fase gerak yang digunakan adalah campuran heksana, etil asetat, asam asetat, dan isopropanol dengan rasio 97,6:0,8:0,8:0,8 (v/v/v/v). Volume injeksi adalah 20  $\mu\text{L}$  dengan laju alir 0,7 mL/menit. Tokoferol dan tokotrienol dideteksi dan diukur pada panjang gelombang 290 nm.

#### 4.8 PROFIL PROANTOSIANIDIN

Ekstrak kasar proantosianidin tepung beras (3.4.4) dipisahkan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) sesuai dengan metode yang dideskripsikan

oleh Pegg *et al.* (2008) dengan sedikit perubahan. Sebanyak 5  $\mu\text{L}$  ekstrak ditotol pada pelat silika gel pada posisi yang telah ditetapkan. Penotolan dilakukan sebanyak 4 kali, dimana penotolan berikutnya dilakukan setelah totolan sebelumnya kering. Kloroform-metanol- $\text{H}_2\text{O}$  (65:35:10, v/v/v) digunakan sebagai fase gerak. Setelah itu, pelat silika disemprot dengan larutan vanilin 0,5% (b/v) dalam HCl 4% (b/v) untuk membentuk warna fraksi-fraksi yang terpisah.

#### 4.9 PROFIL SENYAWA ANTOSIANIN

Senyawa antosianin yang terkandung dalam beras diidentifikasi dengan teknik pemisahan kromatografi lapis tipis (KLT) sesuai dengan metode yang dideskripsikan oleh Vica<sup>o</sup> *et al.* (2008). Sebanyak 5  $\mu\text{L}$  ekstrak ditotol pada pelat silika gel pada posisi yang telah ditetapkan. Penotolan dilakukan sebanyak 4 kali, dimana penotolan berikutnya dilakukan setelah totolan sebelumnya kering. Fase atas dari campuran butanol-asam asetat- $\text{H}_2\text{O}$  (4:1:5, v/v/v) digunakan sebagai fase gerak. Pelat silika gel kemudian divisualisasi di bawah sinar UV.

#### 4.10 PENENTUAN NILAI INDEKS GLIKEMIK (IG) SECARA IN-VITRO

Nilai indeks glikemik (IG) beras merah ditentukan secara *in vitro* dengan metode yang dideskripsikan oleh David Barine & Yorte (2016). Sebanyak 25 mg bubuk beras merah dilarutkan dalam 6 mL kalium hidroksida 2 M dan digoyang dengan kuat selama 30 menit pada suhu ruang. Larutan stok  $\alpha$ -amilase disiapkan dengan melarutkan 20 mg  $\alpha$ -amilase pankreatik babi dalam 50 mL buffer fosfat 0,2 M (pH 6,9). Sebanyak 1 mL larutan  $\alpha$ -amilase tersebut ditambahkan ke dalam suspensi sampel dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit dengan *shaking water bath*. Setelah inkubasi, sebanyak 1 mL asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) segera ditambahkan ke dalam campuran sampel dan dipanaskan pada air mendidih selama 5 menit untuk menginaktivasi enzim. Setelah didinginkan, campuran tersebut dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 3.000 g selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh dikonversi menjadi konsentrasi glukosa menggunakan kurva kalibrasi standar glukosa

yang telah disiapkan sebelumnya. Konsentrasi glukosa kemudian dikali dengan faktor pengkali 0,9 sehingga diperoleh konsentrasi pati total atau *total starch* (TS).

Sebanyak 50 mg bubuk beras merah dilarutkan dalam 10 mL buffer HCl-KCl (pH 1,5). Lalu, sebanyak 0,2 mL larutan yang mengandung 1 g pepsin dalam 10 mL buffer HCl-KCl, ditambahkan ke dalam sampel dan diinkubasi pada suhu 40°C selama 1 jam dengan *shaking water bath*. Setelah itu, volume campuran digenapkan menjadi 25 mL dengan buffer Tris-Maleat (pH 6,9). Selanjutnya, sebanyak 5 mL larutan  $\alpha$ -amilase dalam buffer Tris-Maleat (2,6 UI) ditambahkan ke dalam sampel dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 120 menit dengan *shaking water bath*. Setelah didinginkan, campuran dipisahkan dengan sentrifugasi lalu dibuang supernatannya. Residu yang tersisa dianalisis kandungan patinya dengan prosedur analisis pati total seperti dideskripsikan pada paragraf sebelumnya. Kandungan pati yang terukur merupakan kandungan pati resisten atau *resistant starch* (RS), sedangkan kandungan pati yang dapat dicerna atau *digestible starch* (DS) adalah selisih antara nilai pati total dengan pati resisten.

Untuk menentukan nilai prediksi indeks glikemik (PIG) juga dibutuhkan data laju cerna pati. Penentuan laju cerna ini dilakukan dengan mengambil 1 mL alikuot sampel pada saat inkubasi pertama proses analisis pati resisten setiap 30 menit sekali dari jam ke-0 hingga jam ke-3. Alikuot sampel ini dipanaskan pada air mendidih dan dikocok kuat untuk menginaktivasi enzim lalu disimpan pada kulkas hingga waktu inkubasi berakhir. Setelah itu, alikuot sampel tersebut dianalisis kandungan patinya dengan menambahkan 1 mL larutan  $\alpha$ -amilase, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit dengan *shaking water bath* dan dilanjutkan dengan pengukuran konsentrasi glukosa seperti yang dideskripsikan sebelumnya.

#### 4.11 KANDUNGAN AMILOSA

Kandungan amilosa dalam beras dianalisa dengan metode seperti yang dideskripsikan oleh Sompong *et al.* (2011). Sebanyak 1 mL etanol 96% dan 9 mL NaOH 1 N dicampur dengan 100 mg tepung beras. Setelah itu, campuran dipanaskan selama 10 menit pada air mendidih untuk menggelatinisasi pati yang terdapat dalam sampel. Setelah didinginkan, 5 mL campuran dipindahkan ke labu ukur 100 mL, lalu ditambahkan 1 mL



asam asetat 1 N dan 2 mL larutan iodin. Volume campuran digenapkan hingga 100 mL dengan akuades, lalu dikocok dan dibiarkan selama 20 menit. Absorbansi campuran dibaca pada panjang gelombang 620 nm menggunakan spektrofotometer. Kandungan amilosa ditentukan dengan persamaan regresi kurva standar yang telah dibuat sebelumnya:  $Abs = 0,009 [amilosa] + 0,068$  (Ambouroue Avaro *et al.*, 2009).

#### 4.12 ANALISIS KOMPOSISI PROKSIMAT

Analisis komposisi proksimat dilakukan sesuai dengan metode Standar Nasional Indonesia (SNI) 01-2891-1992 (BSN, 1992). Komposisi proksimat yang dianalisis antara lain, kadar air (SNI 01-2891-1992 butir 5.1), kandungan abu (SNI 01-2891-1992 butir 6.1), kandungan protein total (SNI 01-2891-1992 butir 7.1), kandungan lemak total (SNI 01-2891-1992 butir 8.2), dan kandungan serat kasar (SNI 01-2891-1992 butir 11). Kandungan karbohidrat ditentukan berdasarkan kalkulasi dari selisih total hasil analisis protein, lemak, air, dan abu.

#### 4.13 EVALUSASI SENSORI

Evaluasi sensori dilakukan dengan metode seperti yang dideskripsikan oleh Yu *et al.* (2009) dengan modifikasi. Sebanyak 200 gram sampel beras merah dicuci dengan air sebanyak tiga kali, lalu dimasak dengan 500 mL air menggunakan penanak nasi listrik selama 30 menit. Nasi yang telah dimasak dibiarkan di dalam penanak nasi agar tetap hangat hingga uji sensori dilakukan. Setiap panelis disajikan 30 gram sampel dengan identitas terkode pada piring plastik. Panelis diminta untuk memberikan skor terhadap parameter sensori: aroma, warna, kelembutan, kelengketan dan penerimaan secara keseluruhan; dengan angka 3 hingga 5 skala hedonik.

## Bab 5

# PENGARUH PERBEDAAN LOKASI GEOGRAFIS PENANAMAN TERHADAP KARAKTER TANAMAN PADI

## 5.1 SUHU LINGKUNGAN

Padi adalah tanaman termofilik hari pendek yang membutuhkan kondisi suhu tertentu pada tahap-tahap pertumbuhan dan reproduksi yang berbeda. Dua tipe padi, *indica* dan *japonica*, membutuhkan suhu rerata harian yang berbeda pada tahap penyemaian, yaitu  $>12^{\circ}\text{C}$  untuk *indica* dan  $>10^{\circ}\text{C}$  untuk *japonica* (Zhang, 1983). Sedangkan pada periode pembesaran, suhu rerata harian untuk *japonica* harus dijaga di atas  $20^{\circ}\text{C}$ , dan untuk *indica* di atas  $22^{\circ}\text{C}$ . Jika suhu rerata harian kurang dari  $22^{\circ}\text{C}$  selama 3 hari berturut-turut, akan menyebabkan fenomena *cryogenic false* (Yuan *et al.*, 2008). Semakin tinggi ketinggian suatu area, maka semakin sedikit hari dengan suhu rerata harian di atas  $20^{\circ}\text{C}$  dan semakin banyak hari dengan suhu rerata di atas  $15^{\circ}\text{C}$ . Dengan demikian, semakin tinggi area penanaman padi, maka periode pertumbuhan padi akan semakin panjang dan perundukan akan tertunda dengan laju perundukan yang rendah. Pengaruh ketinggian penanaman pada pertumbuhan padi lebih besar pada padi jenis *japonica* daripada *indica* (Gu, 1997).

## 5.2 INTENSITAS CAHAYA

Pencahayaan adalah faktor ekologis paling signifikan yang mempengaruhi proses fotosintesis. Semakin tinggi area, radiasi sinar matahari semakin kuat dan proses fotosintesis akan sangat terpengaruh. Beberapa studi menyebutkan bahwa titik saturasi cahaya dan titik

kompensasi cahaya pada padi yang ditanam pada area yang lebih tinggi lebih besar daripada padi yang ditanam di area yang lebih rendah (Cunxin & Dehui, 1986; Wang & Liu, 1992). Selain itu, titik kompensasi karbon dioksida dan laju aspirasi cahaya semakin menurun dengan semakin tingginya daerah penanaman. Oleh karena itu, padi pada dataran tinggi memiliki efisiensi fotosintesis yang lebih rendah daripada padi pada daerah dataran rendah (Cunxin & Dehui, 1986). Ketinggian daerah penanaman juga akan berdampak pada karakter tanaman padi. Wang *et al.* (1984) melaporkan bahwa tanaman padi akan lebih pendek seiring dengan semakin tingginya daerah penanaman; daun pada tangkai utama cenderung lebih pendek dan kurus. Temperatur yang semakin rendah pada daerah yang lebih tinggi menyebabkan penurunan jumlah serbuk sari fertil, sehingga mempengaruhi laju pembentukan biji.

### 5.3 KETINGGIAN

Ketinggian daerah penanaman juga memiliki pengaruh terhadap kualitas dan nutrisi beras yang dihasilkan. Yuanhong & Qiyuan (1991) melaporkan bahwa pada daerah penanaman yang lebih tinggi, kualitas beras memiliki tren yang lebih baik. Derajat pengaruh dan tren kualitas beras karena ketinggian penanaman tergantung dari varietasnya. Ketinggian penanaman tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap tingkat beras pecah kulit dan beras sosoh (Huang *et al.*, 2005), namun menyebabkan peningkatan beras kepala secara signifikan seiring dengan semakin tingginya daerah penanaman (Liu *et al.*, 1986; Su *et al.*, 2008). Berkaitan dengan kenampakan beras, ketinggian daerah penanaman tidak terlalu berpengaruh pada bentuk biji, namun menyebabkan penurunan pengapuran seiring dengan semakin tingginya daerah penanaman (Fan *et al.*, 1989; Huang *et al.*, 2004). Berkaitan dengan kualitas nutrisi, Liu *et al.* (1986) melaporkan bahwa kadar protein pada beras jenis japonica dan indica akan meningkat seiring dengan semakin tingginya daerah penanaman. Namun, Zhou *et al.* (1997) melaporkan bahwa kadar protein akan semakin meningkat seiring dengan peningkatan ketinggian penanaman hingga 800 m, dan setelah itu mengalami penurunan.



## Bab 6

# PEMULIAAN MUTASI TANAMAN PADI UNTUK MENGHASILKAN VARIETAS UNGGUL

### 6.1 MUTATION BREEDING

Persilangan konvensional masih menjadi ujung tombak dalam pemuliaan tanaman. Persilangan bertujuan untuk menggabungkan dua atau lebih karakter yang terdapat pada tanaman berbeda ke dalam satu tanaman (Pathirana, 2011; Pierce, 2004). Dengan persilangan, berbagai karakter yang diinginkan dapat dikumpulkan dalam satu tanaman sehingga diperoleh tanaman unggul (Gambar 6.1). Persilangan konvensional sangat tergantung pada variasi karakter yang ada di alam (Novak and Brunner, 1992; Pathirana, 2011). Seringkali karakter yang diharapkan tidak ada atau hilang selama proses domestifikasi atau pemuliaan sebelumnya sehingga produksi tanaman unggul seperti yang diharapkan tidak dapat dilakukan melalui persilangan konvensional (Zhong-hua et al., 2014).

Keanekaragaman makhluk hidup merupakan produk dari mutasi. Mutasi merupakan peristiwa perubahan susunan materi genetik yang terdapat didalam sel makhluk hidup yang dapat memicu terjadinya perubahan fenotip/karakter (Pierce, 2004). Secara alami, laju mutasi tanaman berkisar antara  $10^{-5}$  dan  $10^{-8}$ . Laju tersebut sangat rendah untuk mampu menghasilkan variasi yang dibutuhkan untuk persilangan konvensional (Zhong-hua et al., 2014).

Mutasi pada tumbuhan dan organisme lainnya dapat dipercepat dengan melakukan mutasi terinduksi. Mutasi terinduksi dilakukan dengan memaparkan jaringan, organ atau biji tanaman dengan dengan agent

mutagenesis. Agen mutagenesis menyebabkan perubahan secara acak pada genom tumbuhan sehingga memicu terjadinya variasi. Produksi tumbuhan dengan variasi baru melalui mutase kemudian dikenal dengan mutation breeding (Pathirana, 2011; Novak and Brunner, 1992; FAO, 2011).



**Gambar 6.1.** Ilustrasi persilangan konvensional.

Secara garis besar, pemuliaan tanaman melalui *mutation breeding* melibatkan tahapan berikut (Pathirana, 2011):

1. Penentuan letal doses (LD)
2. Mutagenesis menggunakan dosis mutagen sama dengan atau di bawah LD.
3. Observasi adanya mutasi dengan mengamati adanya perubahan fenotip.
4. Konfirmasi terjadinya mutasi menggunakan teknik biologi molekuler.
5. Menguji kesetabilan mutasi pada keturunan-keturunannya

## 6.2 AGEN MUTASI

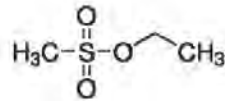
Mutagen adalah agen yang memicu terjadinya mutasi pada makhluk hidup. Terdapat dua jenis mutagen yaitu mutagen fisik dan mutagen kimia (Pathirana, 2011; Novak and Brunner, 1992; FAO, 2011). Mutagen fisik seperti sinar X dan sinar gamma berperan sebagai agen pengionisasi yang menghasilkan radikal bebas di dalam sel. Keberadaan radikal bebas ini kemudian memicu terjadinya kerusakan pada DNA berupa pemotongan satu atau kedua rantai DNA. Kerusakan DNA yang disebabkan oleh sinar gamma dan sinar X dapat mengakibatkan terjadinya peristiwa delesi,

inversi, duplikasi atau translokasi kromosom. Secara umum mutagenesis menggunakan mutagen fisik menghasilkan perubahan yang lebih besar daripada mutagen kimia (Pathirana, 2011). Mutagen kimia umumnya menyebabkan perubahan yang lebih kecil dan spesifik daripada mutase fisik. Mutagen kimia, seperti Ethyl Methanesulfonate (EMS), Diethyl Sulphat (DES), Methyl Methane Sulphonat (MMS), Hydroxil Amine, dan Nitrous Acid, memicu terjadinya mutasi titik pada satu gen dengan cara mengganti jenis pasangan basa, menghilangkan atau menambahkan basa pada area pengkode atau regulator dari sebuah gen. Hasil dari perubahan basa ini dapat berupa silent mutation, missense mutation, nonsense mutation atau frameshift mutation. Selain silent mutation, semua jenis mutase tersebut dapat memicu terjadinya perubahan fenotip (Pathirana, 2011; Zhong-hua et al., 2014).

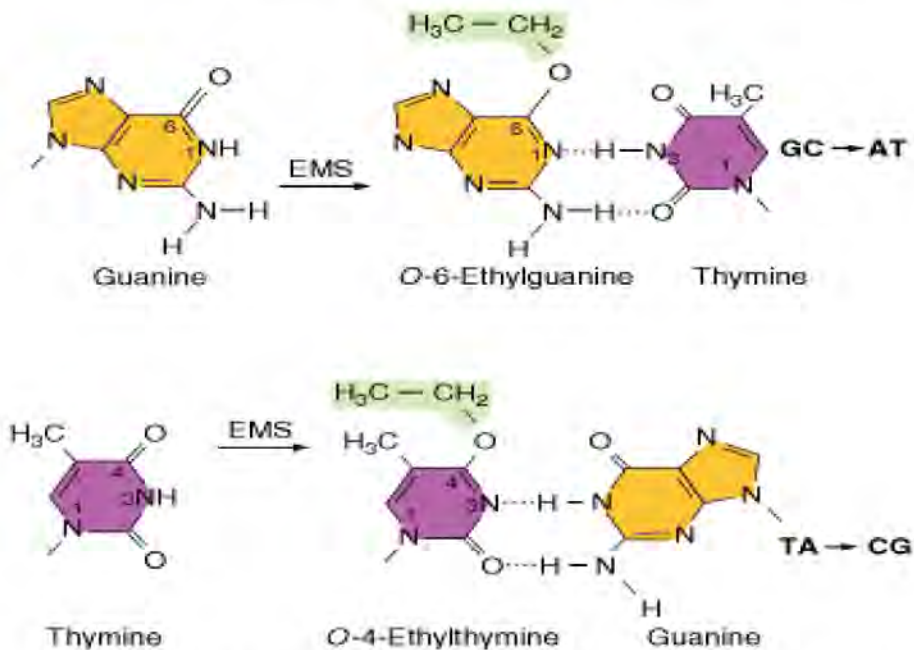
### **6.3 ETHYL METHANESULFONATE (EMS)**

EMS merupakan mutagen kimia yang paling banyak digunakan dalam mutation breeding. EMS memiliki efektifitas yang tinggi dalam menginduksi mutase dan mudah didetoksifikasi melalui reaksi hidrolisis (Van Harten, 1998). Mutasi yang ditimbulkan EMS adalah mutasi titik intregenik yang dapat menimbulkan hilang atau pulihnya fungsi dari suatu gen dan terjadi secara acak di dalam genom. Oleh sebab itu, mutasi menggunakan EMS menghasilkan keberagaman yang tinggi (Sega, 1984).

EMS (Gambar 6) merupakan agen alkilasi yang memicu terjadinya pergantian pasangan basa pada DNA (Pathirana, 2011; Zhong-hua et al., 2014). DNA yang terpapar EMS dapat mengalami penambahan gugus etil pada atom O6 dari basa guanine dan atau penambahan gugus etil pada atom O4 dari basa timin (Gambar 6.2). Normalnya ketika replikasi DNA berlangsung, basa guanine akan berpasangan dengan sitosin (C-G) sedangkan timin berpasangan dengan Adenin (A-T), namun ketika guanine atau sitosin mendapat penambahan gugus etil maka etil guanine berpasangan dengan timin sedangkan etil timin berpasangan dengan guanine. Perubahan pasangan basa ini akhirnya akan memicu terjadinya mutase pergantian basa dari C-G ke A-T atau A-T ke C-G (Sega, 1984).



**Gambar 6.2.** Struktur kimia Ethyl Methanesulfonate (Sega, 1984)



**Gambar 6.3.** Reaksi mutasi induksi oleh EMS (Suzuki et al., 2008)

## 6.4 VARIETAS PADI HASIL MUTAGENESIS

Saat ini terdapat 828 varietas padi yang dihasilkan dari pemuliaan mutasi atau kawin-silang mutan yang terdaftar di FAO/IAEA Mutant Variety Database (FAO/IAEA, 2018). Dua varietas padi mutan pertama dihasilkan pada tahun 1957 di Tiongkok, dengan nama KT 20-74 dan SH 30-21. Kemudian diikuti dengan varietas Yehhsing-1 pada tahun 1963, yang merupakan hasil kawin silang pertama mutan dengan varietas lain (Rutger, 1992). Tidak lama setelah itu, mutan semidwarf pertama, Reimei, dikeluarkan di Jepang dan menjadi varietas mutan pertama yang dikenal luas serta berperan dalam pengembangan sedikitnya 21 varietas mutan Jepang dan 1 varietas mutan Tiongkok (Futsuhara, 1968; Rutger, 1992). Calrose76 adalah



varietas mutan pertama yang ditumbuhkan secara komersial di Amerika Serikat dan merupakan jenis mutan semidwarf (Rutger *et al.*, 1977). Varietas Zhefu 802 dari Tiongkok dan RD6 dari Thailand merupakan dua varietas mutan padi terbesar yang telah ditanam pada lahan seluas 10 juta dan 2 juta hektar secara berurutan (Ahloowalia & Maluszynski, 2001; Rutger, 1992). Selain itu, terdapat juga varietas mutan padi resisten herbisida berbasis imidazolinon (Tan *et al.*, 2005). Balai Besar Penelitian Tanaman Padi (BB Padi, 2018), Badan Litbang Pertanian telah mengembangkan beberapa galur beras merah mutan, di antaranya BP1924-1E-5-2 yang telah dilepas dengan nama Aek Sibundong. Beberapa keunggulan galur-galur tersebut antara lain produksi 6-8 ton/ha GKG, umur genjah 110-120 hari, tahan hama wereng coklat biotipe 1, 2, dan 3 serta hawar daun strain IV, rasa nasi enak dan pulen (Indrasari & Adnyana, 2007).

Selain hasil panen dan karakter agronomik, kualitas dan nutrisi biji padi yang dihasilkan juga penting, terutama bagi kesehatan konsumen. Beras sebagai bahan pangan pokok yang memiliki karakter nutrisi yang baik dan memberikan manfaat kesehatan bagi konsumennya adalah hal yang penting. Peningkatan kualitas dan nutrisi tersebut dapat berupa peningkatan makronutrien dan mikronutrien (biofortifikasi), alterasi profil protein dan asam lemak, perubahan karakter fisikokimia, peningkatan fitonutrien, dan penurunan senyawa anti-nutrien (Jain & Suprasanna, 2011). Mutasi terinduksi memiliki peran penting dalam menginduksi mutasi dalam rangka peningkatan kualitas nutrisi pada beras. Saat ini terdapat 270 varietas padi yang dihasilkan dari pemuliaan mutasi atau kawin-silang mutan yang memiliki peningkatan kualitas dan nutrisi yang terdaftar di FAO/IAEA Mutant Variety Database (FAO/IAEA, 2018).

Dari semua varietas mutan tersebut, kebanyakan memiliki peningkatan kualitas kuliner (proses masak dan parameter sensori). Sedangkan sebagian kecil memiliki peningkatan nutrisi dan penurunan senyawa anti-nutrien (Tabel 6.1). Selain itu, terdapat lima mutan embrio padi berukuran besar yang dilaporkan memiliki peningkatan kadar protein, vitamin B1, vitamin B2, vitamin E, asam amino esensial (seperti arginin, asam aspartat, asam glutamat, lisin, dan metionin), dan mineral (seperti kalsium, besi, kalium, fosfor, dan seng) (Zhang *et al.*, 2007).

**Tabel 6.1** Varietas Padi Mutan yang Memiliki Peningkatan Kualitas dan Nutrisi

Nama Varietas	Karakter yang Ditingkatkan	Metode Induksi Mutasi	Negara Asal/Pengembang
Heugkwangchalbyeo	Peningkatan kadar antosianin	Iradiasi biji padi dengan sinar gamma (200 Gy)	Korea Atomic Energy Research Institute
KBNT Ipa1-1 germplasm	Penurunan kadar asam fitat sebesar 40% dibandingkan indukan	Iradiasi biji padi dengan sinar gamma (200 Gy)	Amerika Serikat
Nogwonchalbyeo	Peningkatan kadar klorofil (biji berwarna hijau) dan asam amino	Iradiasi biji padi dengan sinar gamma (200 Gy)	Korea Selatan/Kang SiYong
Akane-fuji	Kadar amilosa rendah	Perlakuan biji padi dengan mutagen kimiawi EMS	Jepang/IB + Institute of Processing Rice Breeding
Atomita 4	Kualitas masak yang lebih baik, produktivitas tinggi, resisten hawar daun dan hama wereng coklat (biotipe 1 dan 2), umur genjah lebih pendek (110-120 hari)	Iradiasi biji padi dengan sinar gamma (200 Gy)	Indonesia/Mugiono <i>et al.</i>

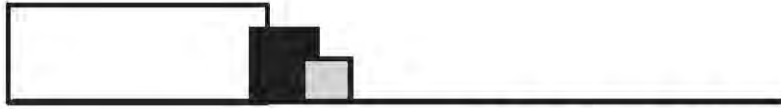
Sumber: (FAO/IAEA, 2018)

**A**nalisa nutrisi padi meliputi kualitas kuliner, nutrisi dasar maupun nutrisi spesifik (bioaktivitas). Beras merah dari berbagai varietas memiliki kandungan antosianin, aktivitas antioksidan, dan vitamin B1 yang berbeda-beda, demikian pula varietas yang sama dapat menghasilkan karakter nutrisi yang berbeda jika ditanam pada lokasi geografis yang berbeda. Beras merah varietas Barak Cenana mutan yang dihasilkan melalui mutasi acak memiliki kandungan antosianin, aktivitas antioksidan, dan vitamin B1 yang berbeda juga dengan varietas galur murninya dan varietas lokal lainnya.

Secara praktis, optimasi metode analisa nutrisi maupun data hasil penelitian ini semoga dapat bermanfaat untuk membantu pengenalan beras merah varietas lokal hasil pembiakan secara mutasi pada masyarakat sebagai alternatif beras merah impor. Informasi yang diperoleh dari penelitian ini dapat menjadi sumber referensi atau bukti nyata dari kualitas beras merah varietas lokal hasil mutasi induktif yang tidak kalah dengan beras merah impor. Dengan demikian, nama produk beras merah lokal dapat terangkat dan bersaing dengan beras merah impor.







## DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Aal, E.M., Young, J.C., Rabalski, I., 2006. Anthocyanin Composition in Black, Blue, Pink, Purple, and Red Cereal Grains. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4696-4704.
- Abdel-Aal, E.S.M., Hucl, P., 1999. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chem.* 76, 350-354. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1999.76.3.350>
- Ahloowalia, B.S., Maluszynski, M., 2001. Induced mutations—A new paradigm in plant breeding. *Euphytica* 118, 167-173.
- Ambouroué Avaro, M.R., Tong, L., Yoshida, T., 2009. A Simple and Low-Cost Method to Classify Amylose Content of Rice Using a Standard Color Chart. *Plant Prod. Sci.* 12, 97-99. <https://doi.org/10.1626/pps.12.97>
- Artadana, I. B. M., Gilang Bintang Fajar Suhono, G. B. F., Popy Hardjo, P. H., Purwanto, M. G. M., Wang Y. B., Kanyaratt Supaibulwatana, K., 2017. Plant regeneration induced from mature embryo -derived callus of Balinese Red Rice (*Oryza sativa* cv. Barak Cenana), *Bali Medical Journal*, Vol.3 (3).
- BB padi, 2018. Klasifikasi Umur Padi. Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Subang. <http://bbpadi.litbang.pertanian.go.id/index.php/tahukah-anda/120-kalsifikasi-umur-padi>
- Bate-Smith, E.C., 1969. Luteoforol (3',4,4',4,7-pentahydroxy flavan) in *Sorghum vulgare* L. *Phytochemistry* 8, 1803-1810.

- BSN, 1992. SNI 01-2891-1992 Cara uji makanan dan minuman. Badan Standardisasi Nasional, Jakarta.
- Chandrasekara, A., Shahidi, F., 2011. Bioactivities and antiradical properties of millet grains and hulls. *J. Agric. Food Chem.* 59, 9563-9571.
- Chen, P.-N., Kuo, W.-H., Chiang, C.-L., Chiou, H.-L., Hsieh, Y.-S., Chu, S.-C., 2006. Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression. *Chem. Biol. Interact.* 163, 218-229.
- Cunxin, L., Dehui, L., 1986. Comparisons of photosynthetic characteristics of the leaf blade of rice grown at the different altitude localities. *Acta Bot. Yunnanica* 8, 459-466.
- David Barine, K.-K., Yorte, G.S., 2016. In Vitro Starch Hydrolysis and Prediction of Glycemic Index (PGI) in "Amala" and Plantain Based Baked Products. *J. Food Res.* 5, 73. <https://doi.org/10.5539/jfr.v5n2p73>
- Dipti, S.S., Bergman, C., Indrasari, S.D., Herath, T., Hall, R., Lee, H., Habibi, F., Bassinello, P.Z., Graterol, E., Ferraz, J.P., 2012. The potential of rice to offer solutions for malnutrition and chronic diseases. *Rice* 5, 16.
- Dykes, L., Rooney, L., 2007. Phenolic Compounds in Cereal Grains and Their Health Benefits. *Cereal Foods World* 52, 105-111. <https://doi.org/10.1094/CFW-52-3-0105>
- Fan, Y., Zhou, M., Tang, Q., 1989. The relationship of rice endosperm cell structure and grain quality: Effect of different ecological conditions on the rice endosperm starch cells. *Crop Res.* 3, 19-23.
- FAO/IAEA, 2018. FAO/IAEA Mutant Variety Database [WWW Document]. URL <https://mvd.iaea.org/#!/Home> (accessed 5.8.18).
- FAO/IAEA, 2011. Plant Mutation Breeding and Biotechnology. FAO, Rome.
- FAOSTAT, 2014. Food and Agriculture Data [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (accessed 7.14.17).
- Finocchiaro, F., Ferrari, B., Gianinetti, A., 2010. A study of biodiversity of flavonoid content in the rice caryopsis evidencing simultaneous

- accumulation of anthocyanins and proanthocyanidins in a black-grained genotype. *J. Cereal Sci.* 51, 28-34.
- Finocchiaro, F., Ferrari, B., Gianinetti, A., Dall'Asta, C., Galaverna, G., Scazzina, F., Pellegrini, N., 2007. Characterization of antioxidant compounds of red and white rice and changes in total antioxidant capacity during processing. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 1006-1019. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700011>
- Futsuhara, Y., 1968. Breeding of a new rice variety Reimei by gamma-ray irradiation., in: *Gamma Field Symp. No. 7*, 87-109 (1968). Nagoya Univ., Japan.
- Gu, L., Kelm, M.A., Hammerstone, J.F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Prior, R.L., 2003. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7513-7521.
- Gu, M., 1997. The impact of altitude on the growth and development of rice. *Tillage Cultiv.* 5, 61-63.
- Gunaratne, A., Wu, K., Li, D., Bentota, A., Corke, H., Cai, Y.Z., 2013. Antioxidant activity and nutritional quality of traditional red-grained rice varieties containing proanthocyanidins. *Food Chem.* 138, 1153-1161. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.129>
- Harborne, J.B., 2013. *The flavonoids: advances in research since 1980*. Springer.
- He, J., Giusti, M.M., 2010. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 1, 163-187.
- He, J., Magnuson, B.A., Lala, G., Tian, Q., Schwartz, S.J., Giusti, M.M., 2006. Intact anthocyanins and metabolites in rat urine and plasma after 3 months of anthocyanin supplementation. *Nutr. Cancer* 54, 3-12.
- Heinemann, R.J.B., Xu, Z., Godber, J.S., Lanfer-marquez, U.M., Samples, R., 2008. Tocopherols, tocotrienols, and  $\gamma$ -oryzanol contents in japonica and indica subspecies of rice (*Oryza sativa* L.) cultivated in Brazil. *Cereal Chem.* 85, 243-247. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-85-2-0243>

- Huang, W., Zhao, Z., Yan, M., Yuan, X., Lei, S., Lv, Z., Ran, Y., 2005. Studies on the variation of rice quality characters. *Southwest China J. Agric. Sci.* 18, 871-873.
- Huang, Z., Zhou, W., Wang, J., Xiang, G., Gan, Y., Yang, Z., Chen, F., Luo, D., 2004. Effect of different ecological conditions on the quality of hybrid rice Liangyou 363. *China Rice* 4, 26-27.
- Indrasari, S.D., 2011. Pengaruh Penyosohan Gabah dan Pemasakan terhadap Kandungan Vitamin B Beras Merah. *Penelit. Gizi dan Makanan* 30, 182-188.
- Indrasari, S.D., Adnyana, M.O., 2007. Preferensi Konsumen terhadap Beras Merah sebagai Sumber Pangan Fungsional. *Iptek Tanam. Pangan* 2, 227-241.
- Indrasari, S.D., Wibowo, P., Purwani, E.Y., 2010. Evaluasi Mutu Fisik, Mutu Giling, dan Kandungan Antosianin Kultivar Beras Merah. *J. Penelit. Pertan. Tanam. Pangan* 29, 56-62.
- IRRI, 2006. Breeding program management. [http://www.knowledgebank.irri.org/ricebreedingcourse/Grain\\_quality.htm](http://www.knowledgebank.irri.org/ricebreedingcourse/Grain_quality.htm)
- Jain, S.M., Suprasanna, P., 2011. Induced mutations for enhancing nutrition and food production. *Geneconserve* 40, 201 - 215.
- Jaiswal, R., Jayasinghe, L., Kuhnert, N., 2012. Identification and characterization of proanthocyanidins of 16 members of the *Rhododendron* genus (*Ericaceae*) by tandem LC-MS. *J. Mass Spectrom.* 47, 502-515.
- Jing, L., Jichao, Y., 2012. Research Progress in Effects of Different Altitude on Rice Yield and Quality in China. *Greener J. Agric. Sci.* 2, 340-344.
- KBBI, 2017. Nasi [WWW Document]. URL <http://kbbi.web.id/nasi> (accessed 7.14.17).
- Koga, T., Moro, K., Nakamori, K., Yamakoshi, J., Hosoyama, H., Kataoka, S., Ariga, T., 1999. Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1892-1897.
- Koide, T., Kamei, H., Hashimoto, Y., Kojima, T., Hasegawa, M., 1996. Antitumor effect of hydrolyzed anthocyanin from grape rinds and red

- rice. *Cancer Biother. Radiopharm.* 11, 273–277. <https://doi.org/DOI.10.1089/cbr.1996.11.273>
- Konczak, I., Zhang, W., 2004. Anthocyanins—more than nature's colours. *Biomed Res. Int.* 2004, 239–240.
- Liu, J., Wang, Q., Huang, X., 1986. Study on effect of altitude conditions on the quality of rice. *Yunnan Agr. Sci. Technol* 5, 27–30.
- Liu, R.H., 2004. Whole grain phytochemicals and health. *J. Cereal Sci.* 46, 207–219.
- Loizzo, M.R., Tundis, R., Chandrika, U.G., Abeysekera, A.M., Menichini, F., Frega, N.G., 2010. Antioxidant and antibacterial activities on foodborne pathogens of artocarpus heterophyllus lam. (Moraceae) leaves extracts. *J. Food Sci.* 75, 291–295. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01614.x>
- Massaretto, I.L., Alves, M.F.M., de Mira, N.V.M., Carmona, A.K., Marquez, U.M.L., 2011. Phenolic compounds in raw and cooked rice (*Oryza sativa* L.) and their inhibitory effect on the activity of angiotensin I-converting enzyme. *J. Cereal Sci.* 54, 236–240.
- Mackill, D.J., Coffman, W.R., and Garity, D.P. (1996). Rainfed lowland rice improvement. International Rice Research Institute, Manila
- Mohanty, S., 2013. Trends in global rice consumption [WWW Document]. URL <http://irri.org/rice-today/trends-in-global-rice-consumption> (accessed 7.14.17).
- Ndaw, S., Bergaentzlé, M., Aoudé-Werner, D., Hasselmann, C., 2000. Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B6 in foodstuffs. *Food Chem.* 71, 129–138. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00135-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00135-7)
- Novak F.J. and Bunner, H., 1992. Plant breeding: Induced mutation technology for crop improvement. *IAEA Bulletin* 4: 25–33
- Oki, T., Masuda, M., Kobayashi, M., Nishiba, Y., Furuta, S., Suda, I., Sato, T., 2002. Polymeric procyanidins as radical-scavenging components in red-hulled rice. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7524–7529. <https://doi.org/10.1021/jf025841z>



- Pathirana, R., 2011. Plant mutation breeding in agriculture. CAB Review 6 (032).1-20
- Pegg, R.B., Rybarczyk, A., Amarowicz, R., 2008. Chromatographic Separation of Tannin Fractions From a Bearberry-Leaf (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Sprengel) Extract By SE-HPLC – a Short Report. Polish J. Food Nutr. Sci. 58, 485-490.
- Pereira-Caro, G., Cros, G., Yokota, T., Crozier, A., 2013a. Phytochemical profiles of black, red, brown, and white rice from the Camargue region of France. J. Agric. Food Chem. 61, 7976-7986.
- Pereira-Caro, G., Watanabe, S., Crozier, A., Fujimura, T., Yokota, T., Ashihara, H., 2013b. Phytochemical profile of a Japanese black-purple rice. Food Chem. 141, 2821-2827.
- Pierce, B., 2004. Genetics; conceptual approach 2nd ed. Freeman, W. H. & Company
- Qiu, Y., Liu, Q., Beta, T., 2010. Antioxidant properties of commercial wild rice and analysis of soluble and insoluble phenolic acids. Food Chem. 121, 140-147.
- Qiu, Y., Liu, Q., Beta, T., 2009. Antioxidant activity of commercial wild rice and identification of flavonoid compounds in active fractions. J. Agric. Food Chem. 57, 7543-7551.
- Rutger, J.N., 1992. Impact of mutation breeding in rice.
- Rutger, J.N., Peterson, M.L., Hu, C.H., 1977. Registration of Calrose 76 Rice1 (Reg. No. 45). Crop Sci. 17, 978.
- Santos Buelga, C., Scalbert, A., 2000. Proanthocyanidins and tannin like compounds–nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. J. Sci. Food Agric. 80, 1094-1117.
- Sega, G. A., 1984. A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. Mutat Res.134(2-3):113-42
- Shao, Y., Bao, J., 2015. Polyphenols in whole rice grain: Genetic diversity and health benefits. Food Chem. 180, 86-97. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.027>

- Shao, Y., Jin, L., Zhang, G., Lu, Y., Shen, Y., Bao, J., 2011. Association mapping of grain color, phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity in dehulled rice. *Theor. Appl. Genet.* 122, 1005–1016.
- Shay, P.E., Trofymow, J.A., Constabel, C.P., 2017. An improved butanol-HCl assay for quantification of water-soluble, acetone: Methanol-soluble, and insoluble proanthocyanidins (condensed tannins). *Plant Methods* 13, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0213-3>
- Shen, Y., Jin, L., Xiao, P., Lu, Y., Bao, J., 2009. Total phenolic, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. *J. Cereal Sci.* 49, 106–111.
- R. K. Singh, U. S. Singh, and G. S. Khush. (2000). *Aromatic rice*. New Delhi: Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd.
- Smith, R.J., 1981. Control of red rice (*Oryza sativa*) in water-seeded rice (*O. sativa*). *Weed Sci.* 29, 663–666.
- Sompong, R., Siebenhandl-Ehn, S., Linsberger-Martin, G., Berghofer, E., 2011. Physicochemical and antioxidative properties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka. *Food Chem.* 124, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.115>
- Stevens, J.F., Miranda, C.L., Wolthers, K.R., Schimerlik, M., Deinzer, M.L., Buhler, D.R., 2002. Identification and in vitro biological activities of hop proanthocyanidins: inhibition of nNOS activity and scavenging of reactive nitrogen species. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3435–3443.
- Su, Z., Liao, X., Zhao, G., Shi, R., Jiang, C., Zou, Q., Dai, L., 2008. Analysis of grain qualities in Japonica rice (*Oryza sativa* L.) under different altitudes in highland region. *Ecol. Env.* 17, 1157–1162.
- Sun, Q., Spiegelman, D., Dam, R.M., Holmes, M.D., Malik, V.S., Willett, W.C., 2010. White rice, brown rice, and risk of type 2 diabetes in US men and women. *Arch. Intern. Med.* 170, 961–970.
- Suzuki, T., M. Eiguchi, T. Kumamaru, H. Satoh, H. Matsusaka, K. Moriguchi, Y. Nagato and N. Kurata. 2008. MNU-induced mutant pools and high performance TILLING enable finding of any gene mutation in rice. *Mol. Genet. Genomics* 279:213–223.

- Tai, T.H., 2007. Induced mutations in rice (*Oryza sativa* L.). *Isr. J. Plant Sci.* 55, 137–145. <https://doi.org/10.1560/IJPS.55.2.137>
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2002). *Plant physiology*. Sunderland: Sinauer
- Tan, S., Evans, R.R., Dahmer, M.L., Singh, B.K., Shaner, D.L., 2005. Imidazolinone tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manag. Sci.* 61, 246–257.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins Byrne, D., 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* 19, 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
- Thitipramote, N., Pradmeeteekul, P., Nimkamnerd, J., Chaiwut, P., Pintathong, P., Thitilerdecha, N., 2016. Bioactive compounds and antioxidant activities of red (Brown Red Jasmine) and black (Kam Leum Pua) native pigmented rice. *Int. Food Res. J.* 23, 410–414.
- Tian, L., Wang, H., Abdallah, A.M., Prinyawiwatukul, W., Xu, Z., 2011. Red and white wines inhibit cholesterol oxidation induced by free radicals. *J. Agric. Food Chem.* 59, 6453–6458.
- USDA, 2013. Production, Supply, and Distribution (PSD) Online [WWW Document]. URL <https://www.fas.usda.gov/databases/production-supply-and-distribution-online-psd> (accessed 7.14.17).
- Van Harten., 1998. *Mutation breeding : theory and practical applications*, New York : Cambridge University Press.
- Vica<sup>o</sup>, S.I., Purcãrea, C., Ruszkai, L., Laslo, V., 2008. Separation of pigments from petunia's petals using thin layer chromatography. *Fasc. Protecþia Mediu.* XIII, 229–233.
- Wang, S., Liu, Z., 1992. Some photosynthetic characteristics and respiration of rice varieties from different altitudes. *J. Mt. Agric. Biol.* 11, 1–5.
- Wang, T., Li, J., Yu, X., 1984. Regional effects of altitude ceiling areas' ecological environment in region of northwest Yunnan on rice growth and yield structure. *Tillage Cultiv.* 4, 22–27.
- Webb, B.D., 1985. *Criteria of rice quality in the United States*.



- Yawadio, R., Tanimori, S., Morita, N., 2007. Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rices and their aldose reductase inhibitory activities. *Food Chem.* 101, 1616-1625.
- Yokoyama, W., 2004. Nutritional properties of rice bran, in: Champagne, E.T. (Ed.), *Rice Chemistry and Technology*. American Association of Cereal Chemist, St. Paul, MN, pp. 595-609.
- Yu, S., Ma, Y.Y., Sun, D.W., 2009. Impact of amylose content on starch retrogradation and texture of cooked milled rice during storage. *J. Cereal Sci.* 50, 139-144.
- Yuan, J., Yang, S., Wang, M., Wu, Y., Zhu, Q., Yang, J., 2008. Changes in growth duration of rice with altitude and its temperature accumulation effect in Panxi region, China. *Acta Agron. Sin.* 34, 247.
- Yuanhong, X., Qiyuan, T., 1991. Effects of elevation on rice grain quality by grey relational grade analysis. *Chinese J. Rice Sci.*
- Zhang, L., Shu, X., Wang, X., Lu, H., Shu, Q., Wu, D., 2007. Characterization of indica-type giant embryo mutant rice enriched with nutritional components. *Cereal Res. Commun.* 35, 1459-1468.
- Zhang, M.W., Zhang, R.F., Zhang, F.X., Liu, R.H., 2010. Phenolic profiles and antioxidant activity of black rice bran of different commercially available varieties. *J. Agric. Food Chem.* 58, 7580-7587.
- Zhang, Y., 1983. The upper planted limit and their temperature conditions of different climatic and ecological rice varieties in China. *Resour. Sci.* 5, 65-72.
- Zhong-hua, W., Xin-chen, Z., Yu-lin, J., 2014. Development and Characterization of Rice Mutants for Functional Genomics Studies and Breeding. *Rice Science*, 21(4).
- Zhou, G., Xu, M., Tan, Z., Li, X., 1997. Effects of ecological factors of protein and amino acids of rice. *Acta Ecol. Sin.* 17, 537-542.

