

**PENGARUH KOPIGMENT KATEKOL DAN TANIN TERHADAP
STABILITAS WARNA ANTOSIANIN EKSTRAK BEKATUL BERAS
KETAN HITAM (*Oryza sativa glutinosa*)**

Oleh

DIAN WULANDARI



**PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2016**

ABSTRACT

EFFECT COPIGMENTS CATECHOL AND TANNIN ON STABILITY OF ANTHOCYANIN COLOR FROM EXTRACT GLUTINOUS BLACK RICE BRAN (*Oryza sativa glutinosa*)

By

Dian Wulandari

Extract glutinous black rice bran contains anthocyanins. The application of anthocyanins as a natural dyes is necessary to be examined due to its unstability. Copigmentation method can improve the stability of anthocyanins during storage. Catechol and tannin can be used as a copigment to stabilize the color of anthocyanins. This reseach aims were (a) to determine the effect of copigment types to the copigmented anthocyanins color; (b) to identify the best molar ratio of catechol during storage; c) to identify the best molar ratio of tannins during storage.

Research method was arranged using factorial Randomized Complete Block Design (RCBD) with three replications. First factor were molar ratio 0:1, 50:1, 100:1; and second factor were time of storage 0, 10, 20, 30, 40 days at temperature ($28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Variables observed and determined were the bathochromic and hiperkormik effects, the changes of anthocyanin concentration during storage, color retention, and half-life. The bathochromic and hyperchromic effects and half-life were analyzed descriptively. Another variables were analyzed by Tuckey test, Bartlet test, and Polynomial Orthogonal test.

The results showed that the anthocyanin content of extract glutinous black rice bran contains was 426 mg/100g. Catechol copigment affected the bluish color (hypsochromic), while tannins copigment affected the reddish color (bathochromic) after copigmentation. The best molar ratio of catechol copigment was 50: 1 with the decrease of anthocyanin concentration of 0,35mM/day or 39,29mg/100g/day, the rate of color retention was 12.78%/hour, and the half-life was 8.66 hours. The best molar ratio of tannins copigment was 100: 1 with the decrease of anthocyanin concentration of 0,07mM/day or 7,86mg/100g/day, the rate of color retention was 2.39%/day, and the half-life of 19.80 hours.

Key words: Copigmentation. catechol, tannin, anthocyanins, glutinous black rice bran

ABSTRAK

PENGARUH KOPIGMENT KATEKOL DAN TANIN TERHADAP STABILITAS WARNA ANTOSIANIN EKSTRAK BEKATUL KETAN BERAS HITAM (*Oryza sativa glutinosa*)

Oleh

Dian Wulandari

Ekstrak bekatul beras ketan hitam mengandung antosianin. Penggunaan antosianin sebagai bahan pewarna alami perlu dipelajari lebih lanjut karena sifatnya yang kurang stabil. Metode kopigmentasi dapat digunakan untuk memperbaiki stabilitas antosianin selama penyimpanan. Katekol dan tanin dapat digunakan sebagai kopigmen untuk menstabilkan warna antosianin. Penelitian ini bertujuan untuk a) mengetahui pengaruh jenis kopigmen terhadap warna antosianin terkopigmentasi; b) mengetahui rasio molar katekol terbaik selama penyimpanan; c) mengetahui rasio molar tanin terbaik selama penyimpanan.

Metode penelitian disusun menggunakan Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) faktorial dengan tiga ulangan. Faktor pertama adalah rasio molar 0:1, 50:1, 100:1, dan factor kedua adalah lama penyimpanan selama 0, 10, 20, 30, 40 hari. Data hasil pengamatan diamati menggunakan efek batokromik dan hiperkromik, perubahan konsentrasi antosianin selama penyimpanan, retensi warna, dan waktu paruh. Efek batokromik dan hiperkromik, dan waktu paruh dianalisis secara deskriptif. Data lainnya dianalisis menggunakan uji Tuckey, uji Bartlet dan uji Polinomial Ortogonal.

Hasil penelitian menunjukkan kandungan antosianin awal adalah 426 mg/100 g. Kopigmen katekol memberikan pengaruh warna kebiruan (hipsokromik), sedangkan kopigmen tanin memberikan warna kemerahan (bathokromik) setelah proses kopigmentasi antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam (*Oryza sativaglutinosa*). Rasio molar terbaik pada kopigmen katekol adalah 50:1 dengan penurunan konsentrasi antosianin sebesar 0,35mM/hari atau 39,29mg/100g/hari, laju penurunan retensi warna sebesar 12,78%/hari, dan waktu paruh 8,66 jam. Rasio molar terbaik pada kopigmen tanin adalah 100:1 dengan penurunan konsentrasi antosianin sebesar 0,07mM/hari atau 7,86mg/100g/hari, laju penurunan retensi warna sebesar 2,39%/hari, dan waktu paruh 19,80.

Kata Kunci: Kopigmentasi, katekol, tanin, antosianin, bekatul beras ketan hitam

**PENGARUH KOPIGMENT KATEKOL DAN TANIN TERHADAP
STABILITAS WARNA ANTOSIANIN EKSTRAK BEKATUL BERAS
KETAN HITAM (*Oryza sativa glutinosa*)**

Oleh

DIAN WULANDARI

Tesis

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
MAGISTER SAINS**

Pada

**PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN UNIVERSITAS LAMPUNG**



**PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2016**

Judul Skripsi

**: PENGARUH KOPIGEMEN KATEKOL DAN
TANIN TERHADAP STABILITAS WARNA
ANTOSIANIN EKSTRAK BEKATUL KETAN
BERAS HITAM (*Oryza sativa glutinosa*)**

Nama Mahasiswa

: Dian Wulandari

No. Pokok Mahasiswa : 1324051002

Program Study

: Magister Teknologi Industri Pertanian

Fakultas

: Pertanian



1. Komisi Pembimbing

Prof. Dr. Ir. Tirza Hanum, M.S.
NIP 19470203 197502 2 001

Drs. Azhari Rangka, M.App.Sc.
NIP 19550804 198112 1 001

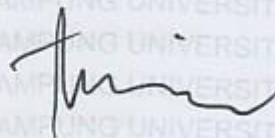
2. Ketua Program Studi
Magister Teknologi Industri Pertanian

Dr. Sri Hidayati, S.T.P., M.P.
NIP. 19710930 199512 2 001

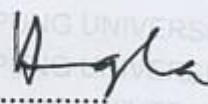
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

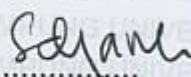
Ketua : Prof. Dr. Ir. Tirza Hanum, M.S.



Sekretaris : Drs. Azhari Rangga, M.App.Sc.



**Penguji
Bukan Pembimbing : Dr. Ir. Siti Nurdjanah, M.Sc.**



2. Dekan Fakultas Pertanian



Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si.
NIP 19611020 198603 1 002



3. Direktur Program Pascasarjana Universitas Lampung



Prof. Dr. Sudjarwo, M.S.
NIP 19530528 198103 1 002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 16 November 2016

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya bahwa:

1. Tesis dengan judul: **Pengaruh Kopigmen Katekol Dan Tanin Terhadap Stabilitas Warna Antosianin Ekstrak Bekatul Ketan Beras Hitam (*Oryza sativa glutinosa*)** adalah karya saya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan karya tulis lain dengan cara yang tidak sesuai dengan etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut plagiatisme.
2. Hal intelektual atas karya ilmiah saya ini diserahkan sepenuhnya kepada Universitas Lampung.

Atas pernyataan ini, apabila dikemudian hari ternyata ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibatnya dan sanksi yang diberikan kepada saya.

Bandar Lampung, 16 November 2016
Pembuat Pernyataan,



Dian Wulandari
NPM 1324051002

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Desa Tempuran pada tanggal 10 Oktober 1988, merupakan anak kedua dari tiga bersaudara, buah cinta pasangan Bapak Warsono dan Ibu Jamirah. Penulis memiliki satu saudara perempuan (Eva Salina) yang telah berkeluarga dengan Mulya Mulyana dan satu saudara laki laki (Nur Viki Reza).

Penulis menyelesaikan pendidikan dasar di Sekolah Dasar Negeri (SD N) 1 Tempuran pada tahun 2000, Sekolah Lanjutan Tingkat Pertama Negeri (SLTP N) 1 Trimurjo pada tahun 2003, Sekolah Menengah Atas Negeri (SMA N) 2 Metro pada tahun 2006 dan pada tahun 2012 menyelesaikan program sarjana pada Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung dengan judul skripsi “Aktivitas Antikanker Senyawa Brusein-A yang Dikapsulasi Liposom Terhadap Sel Kanker Payudara (T47D) Secara *In-Vitro*”.

Ya Rabb,

Kupersembahkan tesis ini untuk, untuk yang tak kan lelah memberikan yang terbaik untukku, mendoakan keberhasilan hidupku, untukmu duhai pahlawanku seluruh kasih sayang dan hormatku; Bapak Warsono dan Mama Jamirah, Saudara tersayangku (Mbak Eva, Aa' Mulya, Adikku Vigi, Guruku, Sahabatku, dan Almamaterku tercinta.

“Sesungguhnya shalatku, ibadahku, hidupku dan matiku hanyalah untuk Allah Rabb semesta alam”.

-Al-An'am : 162-

Sai orang-orang mukmin, jika kamu menolong (agama) Allah, niscaya Dia akan menolongmu dan meneguhkanmu’.

-Muhammad : 7-

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai kesanggupannya. Ia mendapatkan pahala (dari kebajikan) yang diusahakan dan mendapat siksa (dari kejahatan) yang dikerjakan.”

-Al-Baqarah : 86-

“Bukan kita yang memilih takdir. Takdirilah yang memilih kita. Bagaimanapun, takdir bagaikan angin bagi seorang pemanah. Kita harus selalu mencoba membidik dan melesatkannya di saat yang paling tepat”.

- Shalahuddin Al Ayyubi-

“Di hutan, ku lihat dua cabang jalan terbentang. Kuambil jalan yang jarang dilalui orang. Dan itu yang membuat segala berbeda”.

-Robert Frost, The Road Not Taken-

“Mimpi hari ini adalah kenyataan hari esok”.

-Hasan Al Banna-

“La Tahzan, Innaloha ma’ana. Di setiap aliran darah, hembusan nafas dan detak jantung kita, sekarang dan selamanya”.

-didi dirina-

”Suatu ketika Imam Hambali ditanyakan oleh seseorang, mengapa ia bisa menjadi orang yang berilmu. Alih-alih menjawabnya, sang imam malah membenamkan kepala orang tersebut ke air. ”Apa yang kau rasakan?”, tanyanya. ”Aku tidak bisa bernafas”, jawab orang tersebut. Sang imam berkata ”Kehausanku akan ilmu sama seperti kehausanku akan udara”.

-Tarbiyah Madal Hayah-

SANWACANA

Rasa syukur teriring sembah, teruntuk Illah semesta alam, yang dengan kemuliaan-Nya hingga detik ini masih memberikan indahnya nikmat kehidupan, Iman dan Islam yang mengalir dalam darah ini, sehingga dengan kasih sayang dan kemurahanNya penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “Pengaruh Kopigmen Katekol dan Tanin Selama Proses Kopigmentasi Terhadap Stabilitas Warna Antosianin Ekstrak Bekatul Ketan Beras Hitam (*Oryza sativa glutinosa*)”. Shalawat dan salam senantiasa tercurah kepada Murabbi terbaik sepanjang masa Nabi Muhammad SAW yang telah mengeluarkan kita dari jaman kebodohan menuju jaman terang benderang.

Tesis ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains di Universitas Lampung. Proses penyelesaian tesis ini mendapatkan bantuan dari berbagai pihak, untuk itu dalam kesempatan ini Penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Tirza Hanum. M.S. selaku pembimbing utama dan Pembimbing Akademik atas bimbingan, arahan, nasihat, motivasi, dan ilmu yang telah diberikan selama pelaksanaan penelitian dan penulisan tesis ini.
2. Drs. Azhari rangga, M.App.Sc., selaku pembimbing kedua atas bimbingan, dan sarannya selama pelaksanaan penelitian dan penulisan tesis ini.
3. Dr. Ir. Siti Nurdjanah, M.Sc., selaku pembahas atas saran, motivasi, dan bimbingannya selama penulisan tesis ini.

4. Dr. Sri Hidayati, S.T.P., M.P., selaku Ketua Program Magister Teknologi Industri Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung yang telah mendukung penulis dalam penyusunan tesis ini.
5. Bapak dan Mama yang selalu mendukungku dalam segala hal, atas cinta serta pengorbanannya, serta saudara-saudaraku.
6. Bu Susilawati, Pak Erdi, Bu Dewi, Bu Diah, Bu Fibra, Mbak Pita, Mbak Pita, Mbak Mita, Mbak Fiza, Mika, Adik Thifa, Rinda dan dosen-dosen THP lainnya atas ilmu, motivasi yang tak kunjung henti.
7. Kawan seperjuanganku “Laskar Antosianin” Feni Widianasari, Herlina Wahyuni, dan Hafid Nurudin atas kebersamaan dan semangatnya dalam menyelesaikan penelitian.
8. Rekan-rekan MTIP angkatan 2013 (Arafat, Mbak Mumpuni, Mbak Dian, Mbak Sinta, Zana, Rio, Mbak Nur), Mbak Nisa, dan yang tak dapat ku sebutkan namanya, kalian membuatku selalu ingin belajar. Semoga ikatan doa selalu membuat kita semakin baik.

Semoga Allah SWT membalas kebaikan yang telah diberikan dan semoga stasis ini bermanfaat bagi kita semua. Amin Ya Robbal Alamin.

Bandar Lampung, 16 November 2016

Dian Wulandari

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
I. PENDAHULUAN	
1.1.Latar Belakang dan Masalah.....	1
1.2.Tujuan Penelitian.....	4
1.3.Kerangka Pemikiran.....	5
1.4.Hipotesis.....	7
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1.Beras Ketan Hitam.....	8
2.2.Antosianin.....	10
2.3.Kopigmen.....	13
2.3.1. Tanin	15
2.3.2. Katekol.....	17
2.4.Kopigmentasi	18
III. BAHAN DAN METODE	
3.1.Tempat dan Waktu Penelitian.....	21
3.2.Bahan dan Alat.....	21
3.3.Metode Penelitian.....	22
3.4.Pelaksanaan Penelitian.....	22
3.4.1. Ekstraksi pigmen antosianin bekatul ketan hitam.....	22
3.4.2. Penentuan konsentrasi ekstrak antosianin sebagai Sianidin-3-glukosida.....	23
3.4.3. Kopigmentasi antosianin bekatul beras ketan hitam.....	25
3.5.Pengamatan.....	26

3.5.1. Efek batokromik dan hiperkromik ekstrak antosianin dan antosianin terkopigmentasi.....	26
3.5.2. Retensi Warna.....	27
3.5.3. Waktu Paruh.....	28
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
4.1.Kadar Antosianin Bekatul Beras Ketan Hitam.....	29
4.2.Efek Kopigmentasi dengan Katekol Terhadap Stabilitas Antosianin Ekstrak Bekatul Beras Ketan	30
4.2.1. Pengaruh Terhadap Batokromik dan Hiperkromik.....	30
4.2.2. Perubahan Konsentrasi Antosianin selama Penyimpanan.....	31
4.2.3. Perubahan Retensi Warna.....	32
4.2.4. Waktu Paruh	33
4.3.Efek Kopigmentasi dengan Tanin Terhadap Stabilitas Antosianin Ekstrak Bekatul Beras Ketan	35
4.3.1. Pengaruh Terhadap Batokromik dan Hiperkromik.....	35
4.3.2. Perubahan Konsentrasi Antosianin selama Penyimpanan.....	36
4.3.3. Perubahan Retensi Warna	37
4.3.4. Waktu Paruh	38
V. SIMPULAN DAN SARAN.....	40
5.1. Simpulan	40
5.2. Saran	40
DAFTAR PUSTAKA.....	41
LAMPIRAN.....	49

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Gugus substitusi pada antosianidin	11
2. Data pengamatan absorbansi antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam terkopigmentasi katekol dan tannin selama 40 hari.....	50
3. Konsentrasi antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam terkopigmentasi katekol.....	51
4. Uji kesamaan ragam (Bartlett's test) konsentrasi antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam terkopigmentasi katekol.....	52
5. Analisis ragam konsentrasi antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam terkopigmentasi katekol.....	53
6. Uji Polinomial Ortogonal – Perbandingan Ortogonal konsentrasi antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam terkopigmentasi katekol.....	53
7. Konsentrasi antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam terkopigmentasi tannin.....	55
8. Uji kesamaan ragam (Bartlett's test) konsentrasi antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam terkopigmentasi tannin.....	56
9. Analisis ragam konsentrasi antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam terkopigmentasi tannin.....	57
10. Uji Polinomial Ortogonal – Perbandingan Ortogonal konsentrasi antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam terkopigmentasi tanin	58
11. Retensi warna antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam terkopigmentasi katekol.....	59
12. Uji kesamaan ragam (Bartlett's test) retensi warna antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam terkopigmentasi katekol.....	60
13. Analisis ragam retensi warna antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam terkopigmentasi katekol.....	61
14. Uji Polinomial Ortogonal – Perbandingan Ortogonal retensi warna antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam terkopigmentasi katekol	62
15. Retensi warna antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam terkopigmentasi tannin.....	63

16. Uji kesamaan ragam (Bartlett's test) retensi warna antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam terkopigmentasi tannin.....	64
17. Analisis ragam konsentrasi antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam terkopigmentasi tannin.....	65
18. Uji Polinomial Ortogonal – Perbandingan Ortogonal retensi warna antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam terkopigmentasi tanin	66
19. Data pengamatan kinetika degradasi antosianin terkopigmentasi katekol.....	67
20. Data pengamatan kinetika degradasi antosianin terkopigmentasi tannin.....	68

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Charge transfer complex</i> antosianin dengan senyawa pirokatekol...	6
2. Beras Ketan Hitam	8
3. Sianidin-3-glukosida	9
4. Struktur dasar antosianin	10
5. Berbagai bentuk struktur antosianidin.....	11
6. Struktur antosianin pada kondisi pH yang berbeda	13
7. Struktur Tanin.....	16
8. Struktur Katekol	17
9. Mekanisme kopigmentasi pada antosianin.....	19
10. Diagram alir ekstraksi antosianin bekatul beras ketan hitam	23
11. Ekstraksi antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam	29
12. Pengaruh kopigmentasi katekol terhadap batokromik dan hiperkromik antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam	30
13. Pengaruh kopigmentasi asam rosmarinat terhadap batokromik dan hiperkromik sianidin-3-glukosida.....	31
14. Pengaruh kopigmentasi katekol terhadap konsentrasi antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam selama waktu penyimpanan	32
15. Pengaruh kopigmentasi katekol terhadap retensi warna antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam selama waktu penyimpanan	33
16. Grafik hubungan antara $\ln C_t/C_0$ dengan waktu pemanasan pada suhu 65°C ekstrak antosianin terkopigmentasi katekol	34

17. Pengaruh kopigmentasi tanin terhadap penguatan warna dan pergeseran panjang gelombang maksimal	36
18. Pengaruh kopigmentasi tanin terhadap konsentrasi antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam selama waktu penyimpanan	37
19. Pengaruh kopigmentasi tanin terhadap retensi warna antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam selama waktu penyimpanan	38
20. Grafik hubungan antara $\ln C_t/C_0$ dengan waktu pemanasan pada suhu 65°C ekstrak antosianin terkopigmentasi tanin	39
21. Gambar 20. Bekatul beras ketan hitam.....	69
22. Penyaringan (kain saring dan kertas saring).....	69
23. Ekstraksi (<i>shaker</i> 125 rpm, suhu ruang, 2 jam).....	70
24. Hasil penyaringan; a). filtrate, b). ampas.....	70
25. Pemekatan dengan <i>Roraty vacumevaporator</i>	71
26. Kopigmentasi.....	71
27. Penyimpanan (suhu ruang, terpapar cahaya, botol gelap dan tertutup).....	72
28. Persiapan sampel untuk pengujian.....	72
29. Spektrofotometer merk <i>varian type cary 50 probe</i>	73

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang dan Masalah

Penggunaan pewarna sintetis semakin sering digunakan karena zat pewarna sintetis memiliki beberapa kelebihan seperti mudah diproduksi, murah, kekuatan warna dan variasi warna yang lebih baik dibandingkan zat pewarna alami (Nielsen *et al.*, 2002). Meskipun pewarna sintetis memiliki banyak kelebihan, pewarna ini memiliki efek negatif pada kesehatan, karena mengandung residu logam berat (Herman, 2010). Lebih lanjut Jenie *et al.* (1994) menyatakan bahwa pewarna makanan sintetis bersifat toksik dan karsinogenik. Oleh karena itu, perlu ditingkatkan pencarian alternatif sumber zat pewarna yang aman. Hanum (2000) menyatakan bahwa di antara zat pewarna alami yang aman dan berpotensi untuk diekstrak adalah antosianin.

Antosianin merupakan jenis pigmen merah ungu dari golongan flavonoid yang tersebar luas pada berbagai jenis tanaman (Castaneda *et al.*, 2009). Menurut Mateus dan Freitas (2009), antosianin telah digunakan secara luas sebagai pewarna alami untuk pangan. Salah satu sumber pewarna alami adalah bekatul beras ketan hitam yang merupakan produk samping dari industri beras ketan hitam, yang belum banyak dimanfaatkan. Bekatul beras ketan hitam, yang merupakan hasil samping proses penggilingan gabah ketan hitam berpotensi untuk

diekstrak karena pada satu bulir nya mengandung 8% bekatul (bran) dan memiliki kandungan antosianin yang tinggi yaitu 1,89% berat basah (Mahkamah, 2004). Permasalahan yang sering dihadapi adalah ketidakstabilan antosianin selama pengolahan dan penyimpanan (Giusti dan Wrolstad, 2003). Stabilitas antosianin terutama dipengaruhi oleh pH, suhu, cahaya, oksigen, struktur dan konsentrasi antosianin, dan kehadiran komponen lain seperti flavonoid lain, protein, dan mineral (Rein, 2005).

Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk memperbaiki stabilitas antosianin adalah dengan kopigmentasi (Rein, 2005; dan Kalisz, 2013). Kopigmentasi bisa menjadi metode alamiah dalam memperbaiki warna produk pangan karena warna antosianin distabilkan dengan menambahkan ekstrak tanaman yang mengandung kopigmen (dari tanaman yang sama atau berbeda). Bahkan dilaporkan juga bahwa penambahan ekstrak kasar kopigmen lebih baik dari ekstrak murni (Wilska-Jeszka dan Korzuchowska, 1996).

Kopigmentasi merupakan pembentukan ikatan antara senyawa pigmen dengan senyawa kopigmen (flavonoid, alkaloid, flavonol, fenolik dan asam organik) melalui pembentukan ikatan yang memperkuat dan menstabilkan warna (Talcot *et al.*, 2003; Darias-Martin *et al.* 2005; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Berké *et al.*, 2005). Menurut Castaneda-Ovando *et al.* (2009), reaksi kopigmentasi dapat berlangsung melalui empat mekanisme pembentukan ikatan, yaitu kopigmentasi intermolekul, kopigmentasi intramolekular, kompleks dengan logam, ataupun asosiasi antar molekul sejenis.

Kopigmen antosianin adalah suatu senyawa yang tidak berwarna atau berwarna lemah, pada umumnya agak kekuningan, atau senyawa berwarna yang terdapat secara alami pada sel tanaman di sekitar antosianin (Jackman dan Smith, 1996). Jenis kopigmen yang telah diteliti antara lain berasal dari golongan flavonoid (katekin dan epikatekin), alkaloid (kafein), polifenol (tanin), fenolik (katekol dan metil katekol), asam amino, asam organik, nukleotida, polisakarida, logam bahkan antosianin sendiri (Mazza dan Brouillard, 1990; Jackman *et al.*, 1996; Bakoswa *et al.*, 2003; Kopjar and Pilizota, 2009). Hal ini diperkuat oleh hasil penelitian Talcot *et al.* (2005) bahwa penambahan polifenol sebagai kopigmen dalam larutan antosianin mampu meningkatkan stabilitas antosianin selama proses pemanasan dan penyimpanan pada model minuman (jus) buah.

Penambahan kopigmen yang sama pada jenis antosianin yang berbeda dapat menunjukkan pengaruh yang berbeda; demikian juga sebaliknya. Hal ini dibuktikan oleh Scheffeldt dan Hrazdina (1978) yang melaporkan bahwa penambahan kopigmen rutin pada malvidin-3-glucoside, malvidin-3-p-coumarylglucoside, malvidin-3,5-diglucoside dan malvidin-3-p-coumarylglucoside-5-glukosida pada kondisi yang sama menunjukkan peningkatan intensitas warna yang berbeda. Walaupun sudah banyak penelitian tentang efektivitas kopigmen flavonoid, masih diperlukan penelitian untuk kopigmen lainnya seperti golongan plifenol (tanin) dan fenolik (katekol). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efektivitas jenis kopigmen tanin dan katekol terhadap antosianin bekatul ketan hitam.

Sebagian besar jenis kopigmen yang diteliti menggunakan senyawa kimia sintesis yang penggunaannya dalam produk pangan kurang aplikatif dan masih memerlukan penelitian dan pengawasan (Castaneda, *et al.*, 2009), namun dalam aplikasinya dapat digantikan oleh sumber alam (tanaman, limbah, dan mikroba) yang mengandung senyawa tersebut. Untuk menghindari penggunaan sumber kopigmen dari bahan pangan, maka perlu dicari alternatif kopigmen yang berasal dari tanaman non pangan, sehingga apabila efektif sebagai kopigmen tidak akan mengurangi sumber pangan. Katekol dan tanin merupakan senyawa yang banyak ditemukan pada bahan non pangan (kulit kayu, dan daun). Dalam proses kopigmentasi, penggunaan rasio molar kopigmen yang terlalu rendah menyebabkan kopigmentasi tidak efektif karena lemahnya ikatan yang terbentuk, namun rasio molar terlalu tinggi tidak efisien terhadap penggunaan kopigmen (Boulton, 2001). Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dipelajari lebih lanjut pengaruh jenis dan rasio molar kopigmen yang tepat terhadap antosianin yang dapat menguatkan dan menstabilkan warna antosianin.

1.2. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

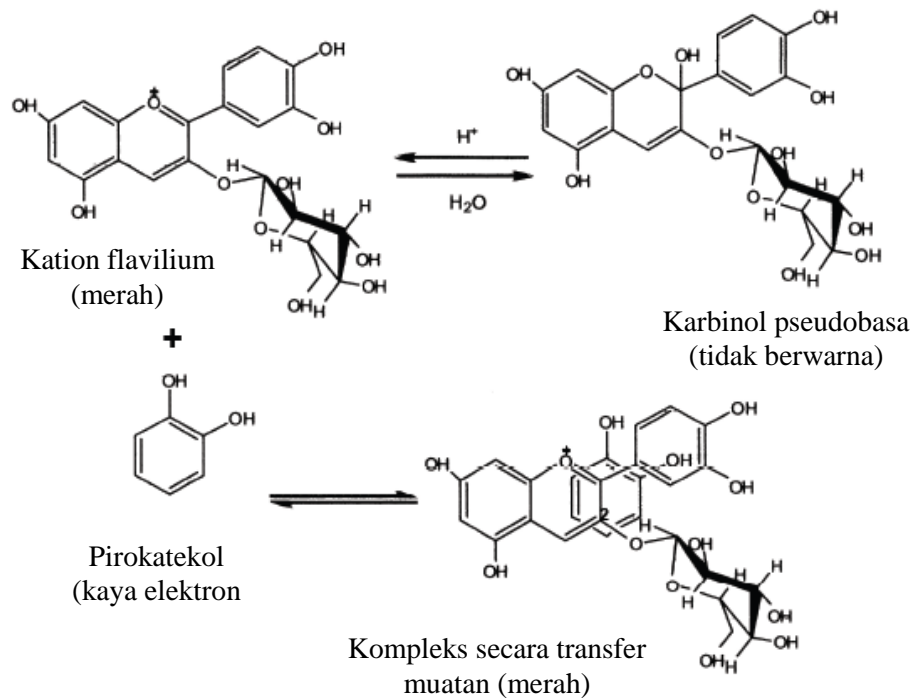
1. Mengetahui pengaruh jenis kopigmen (tanin atau katekol) terhadap warna antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam (*Oryza sativa glutinosa*) terkopigmentasi.

2. Mengetahui rasio molar kopigmen katekol terbaik yang dapat meningkatkan stabilitas antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam (*Oryza sativa glutinosa*) terkopigmentasi selama penyimpanan.
3. Mengetahui rasio molar kopigmen tanin terbaik yang dapat meningkatkan stabilitas antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam (*Oryza sativa glutinosa*) terkopigmentasi selama penyimpanan.

1.3. Kerangka Pemikiran

Struktur kation flavilium dari antosianidin dan pola substitusi (jumlah dan posisi gugus hidroksil dan metoksil pada antosianidin) menyebabkan senyawa antosianin reaktif dan mudah dipengaruhi oleh kondisi lingkungan (Schwarz, *et al.*, 2005). Menurut Castaneda-Ovado *et al.* (2009), stabilitas antosianin dapat diperbaiki antara lain melalui reaksi kopigmentasi secara intermolekular sehingga intensitas warna antosianin dapat meningkat dan lebih stabil. Kopigmentasi intermolekular dapat terjadi melalui ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, atau interaksi ionik (elektrostatik) (Williams dan Hrazdina, 1979; Chen dan Hrazdiza, 1981). Castaneda-Ovado *et al.* (2009) menjelaskan bahwa reaksi intermolekular dapat juga membentuk kompleks antosianin-kopigmen melalui pindah muatan. Lebih lanjut Castaneda-Ovado *et al.* (2009) menjelaskan bahwa kopigmen merupakan senyawa kaya elektron yang dapat berinteraksi dengan ion flavilium yang kekurangan elektron membentuk ikatan yang lemah. Ion flavinium dari antosianin yang bermuatan positif merupakan senyawa yang sesuai untuk

pembentukan kompleks dengan substrat kaya elektron (kopigmen) melalui transfer muatan seperti yang terjadi pada kopigmentasi pirokatekol (Gambar 1).



Gambar 1. Pembentukan kompleks antosianin dengan senyawa pirokatekol secara pindah muatan (Castenada *et al.*, 2009)

Jenis dan rasio molar kopigmen berpengaruh terhadap optimalisasi proses kopigmentasi. Penggunaan rasio molar kopigmen terhadap antosianin yang terlalu rendah menyebabkan kompleks kopigmentasi yang terbentuk tidak kuat karena transfer muatan dari kopigmen kurang, sebaliknya apabila ratio mol terlalu besar, transfer muatan tidak akan terjadi lagi karena sudah melebihi muatan yang diperlukan untuk membentuk kompleks kopigmentasi yang kuat. Efek tersebut baru teramati apabila konsentrasi antosianin lebih besar dari $35 \mu\text{M}$ dan konsentrasi kopigmen lebih besar dibandingkan dengan konsentrasi antosianin (Scheffeldt dan Hrazdina, 1978). Menurut Boulton (2001),

penggunaan rasio molar 10 sampai 100 menghasilkan respon yang kuat terhadap kopigmentasi, sedangkan pada rasio molar tinggi (1000) selain penggunaan kopigmen tidak efisien juga menghasilkan respon yang lemah terhadap kopigmentasi.

Penggunaan katekol dan tanin sebagai kopigmen belum banyak diteliti, sehingga belum diketahui jumlah rasio molar yang tepat untuk meningkatkan stabilitas antosianin. Katekol merupakan salah satu kopigmen yang berasal dari senyawa fenolik yang banyak terdapat pada jaringan tanaman, seperti apel, anggur, dan buah pir (Pudjaatmaka, 2002). Tanin merupakan senyawa golongan polifenol yang banyak terdapat pada tanaman (kulit kayu, daun, akar, dan buah) (Supriyati, 1999) seperti pada daun teh yang mengandung 30% tanin (Bokuchava, 1969). Kopigmentasi kedua senyawa ini dengan antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam diharapkan dapat meningkatkan intensitas warna (hyperkromik) dan menstabilkan antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam (*Oryza sativa glutinosa*).

1.4. Hipotesis

1. Jenis kopigmen (tanin atau katekol) berpengaruh terhadap warna antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam (*Oryza sativa glutinosa*) terkopigmentasi.
2. Terdapat rasio molar terbaik kopigmen katekol terhadap antosianin yang efektif meningkatkan stabilitas antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam (*Oryza sativa glutinosa*).

3. Terdapat rasio molar terbaik kopigmen tanin terhadap antosianin yang efektif meningkatkan stabilitas antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam (*Oryza sativa glutinosa*).

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Beras Ketan Hitam

Menurut Steenis (1988), ketan adalah sejenis beras yang diklasifikasikan dalam Kingdom *Plantae*, Divisio *Spermatophyta*, Kelas *Angiospermae*, Ordo *Graminales*, Famili *Graminea*, Genus *Oryza*, Spesies *Oryza sativa* L., varietas *Oryza sativa* L. *glutinosa* (Gambar 2).

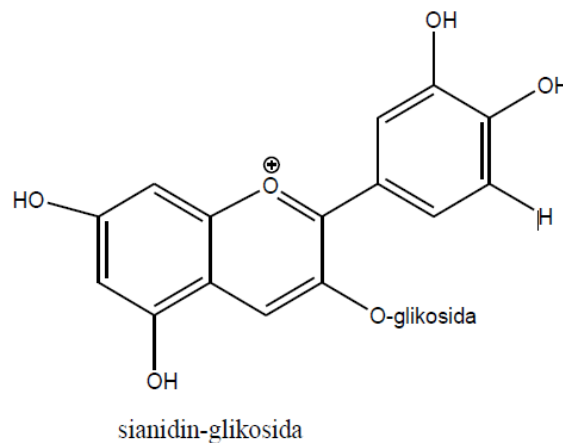


Gambar 2. Beras Ketan Hitam

Ketan hitam merupakan salah satu komoditi yang sangat potensial sebagai sumber karbohidrat, antioksidan, senyawa bioaktif, dan serat yang penting bagi kesehatan (Yanuar, 2009). Beras ketan hitam dapat diolah antara lain menjadi beberapa produk makanan seperti tape ketan, cake ketan hitam, bubur ketan hitam, onde-

onde, gemblong. Hanum (2000), melaporkan bahwa dalam beras ketan hitam (*Oryza sativa glutinosa*) terdapat zat warna antosianin yang dapat digunakan sebagai pewarna alami pada makanan. Selain butir beras yang berwarna merah kehitaman, kulit luar dan kulit ari (bekatul) dari beras ketan hitam (*Oryza sativa glutinosa*) juga memiliki warna yang sama. Astawan dan Leomitro (2009) melaporkan bahwa bekatul merupakan lapisan sebelah dalam butiran beras (lapisan aleuron/kulit ari) dan sebagian kecil endosperma berpati. Lebih lanjut dijelaskan oleh Astawan dan Leomitro (2009) bahwa proses penggilingan padi di Indonesia menghasilkan dedak pada proses penyosohan pertama, dan bekatul pada proses penyosohan kedua. Kulit ari (bekatul) menjadi produk samping yang belum dimanfaatkan secara optimal.

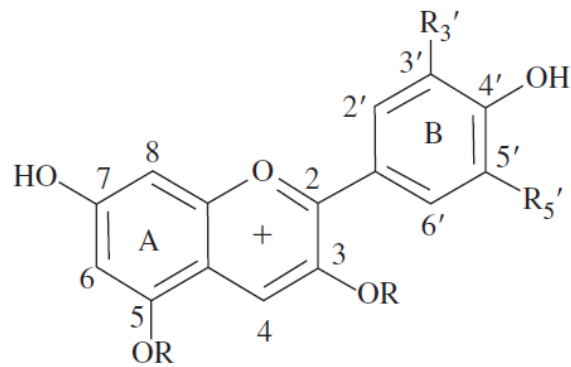
Komponen antosianin utama yang terdapat pada beras hitam (*Oryza sativa L*) adalah sianidin-3-glikosida dan peonidin-3-glikosida (Hu *et al.*, 2003; Abdel-Aal *et al.*, 2006; Zawistowski *et al.*, 2009) (Gambar 3). Berbeda dengan hasil yang ditunjukkan sebelumnya, Hiemori *et al.* (2009), mengidentifikasi adanya antosianin jenis lain pada beras merah (*Oryza sativa L. japonicavar SBR*) yaitu sianidin diheksosida (dalam 3 isomer yang berbeda) dan satu jenis sianidin heksosida selain sianidin-3-glukosida dan peonidin-3-glukosida. Total antosianin dalam ketan hitam adalah 146,47 mg/100 g (Nailufar *et al.*, 2012), dan 25 mg/100 g (Suhartatik *et al.*, 2013). Phetpornpaisan *et al.* (2014) melaporkan bahwa bekatul beras ketan hitam memiliki kandungan tinggi sianidin-3-glucosida, asam kafeat dan asam ferulat dan antioksidan yang tinggi.



Gambar 3. Sianidin-3-glukosida (Santoni, 2013)

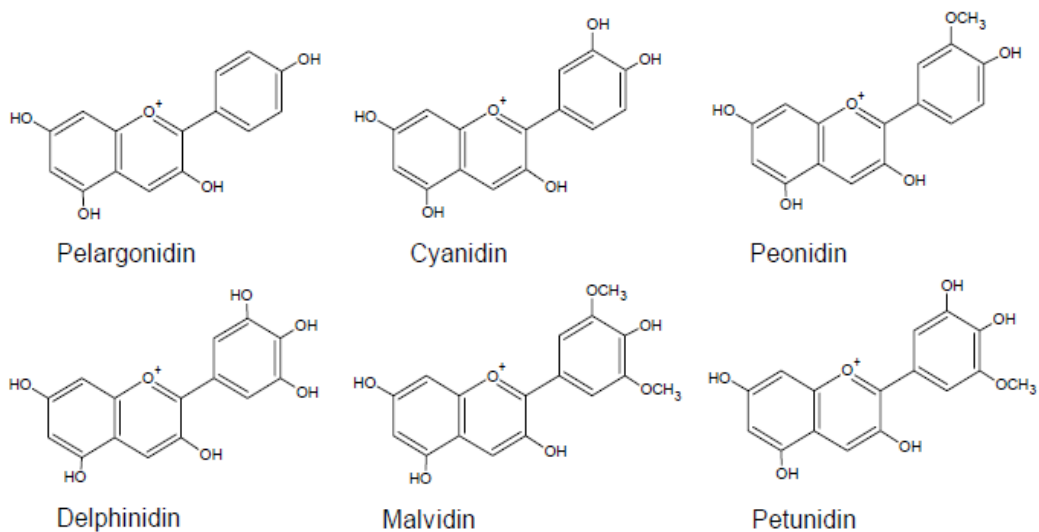
2.2. Antosianin

Antosianin adalah pigmen warna merah, biru dan ungu yang ada pada tanaman. Senyawa ini termasuk golongan flavonoid (Castaneda *et al.*, 2009). Struktur antosianin terdiri dari dua cincin aromatik benzena (C_6H_6) yang dihubungkan oleh tiga atom karbon. Antosianin disusun dari sebuah aglikon (antosianidin) yang teresterefikasi dengan satu atau lebih gugus gula (glikon) dan gugus asil. Kebanyakan antosianin ditemukan dalam enam bentuk antosianidin, yaitu pelargonidin, sianidin, peonidin, delphinidin, petunidin, dan malvidin. Gugus gula pada antosianin bervariasi, namun kebanyakan dalam bentuk glukosa, ramnosa, galaktosa, atau arabinosa. Gugus gula ini bisa dalam bentuk mono atau disakarida dan dapat diasilasi dengan asam fenolat atau asam alifatik. Struktur umum antosianin disajikan pada Gambar 4. Terdapat 22 bentuk antosianin, namun hanya enam yang memegang peranan penting dalam bahan pangan, yaitu sianidin, malvidin, petunidin, pelargonidin, delphinidin, dan peonidin (Francis, 1989). Enam jenis antosianidin terpenting dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 4. Struktur dasar antosianin

Keterangan : R^{3'} dan R^{5'} : Gugus substitusi (Tabel 1)
 R : Jenis glikon (gula atau gula terasilasi)



Gambar 5. Berbagai bentuk struktur antosianidin (Rein, 2005)

Pada setiap inti kation flavilium (Gambar 4) terdapat molekul yang berperan sebagai gugus substitusi yang dapat dilihat pada Tabel 1 (Devia et al., 2002). Inti kation flavilium dari pigmen antosianin kekurangan elektron, sehingga sangat reaktif. Reaksi yang terjadi umumnya mengakibatkan terjadinya degradasi warna.

Laju kerusakan antosianin tergantung pada pH, semakin tinggi pH semakin tinggi laju kerusakannya.

Tabel 1. Gugus substitusi pada antosianidin

Struktur Antosianidin	Gugus substitusi pada atom karbon nomor	
	R3'	R5'
Pelargonidin	H	H
Sianidin	OH	H
Delpinidin	OH	OH
Peonidin	OCH3	H
Petunidin	OH	OCH3
Malvinidin	OCH3	OCH3

Sumber : Devia et al., 2002

Antosianin banyak ditemukan pada tanaman memiliki ciri berwarna merah, biru dan ungu. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa antosianin terdapat pada buah-buahan seperti terung belanda (Sembiring, 2011), buah buni (Suzery, 2010), dan duwet (Puspita, 2006). Pada sayuran, antosianin banyak terdapat pada bayam merah (Pebrianti, 2015), ubi jalar ungu (Yudiono, 2011), turi merah (Muliawati, 2007), dan kubis merah, dan wortel ungu (Delgado-Vargas dan Paredes Lopez, 2003). Beberapa tanaman hias seperti rosella (Khusna, 2009), bunga sepatu (Setyadi, 2014), bunga telang (Mastuti, 2013), dan bunga kana merah (Mar'atusshalihah, 2007) juga dilaporkan memiliki antosianin. Selain buah, sayur, dan tanaman hias, antosianin juga terdapat pada bahan non pangan yang merupakan hasil samping seperti kayu secang (Kristie, 2008), kulit buah manggis (Supiyanti *et.al.*, 2010), kulit anggur (Delgado-Vargas dan Paredes Lopez, 2003), dan bekatul ketan hitam (Hanum, 2000). Kandungan antosianin yang terdapat

bahan pangan maupun non pangan tersebut memiliki sifat yang mudah rusak karena pengaruh lingkungan.

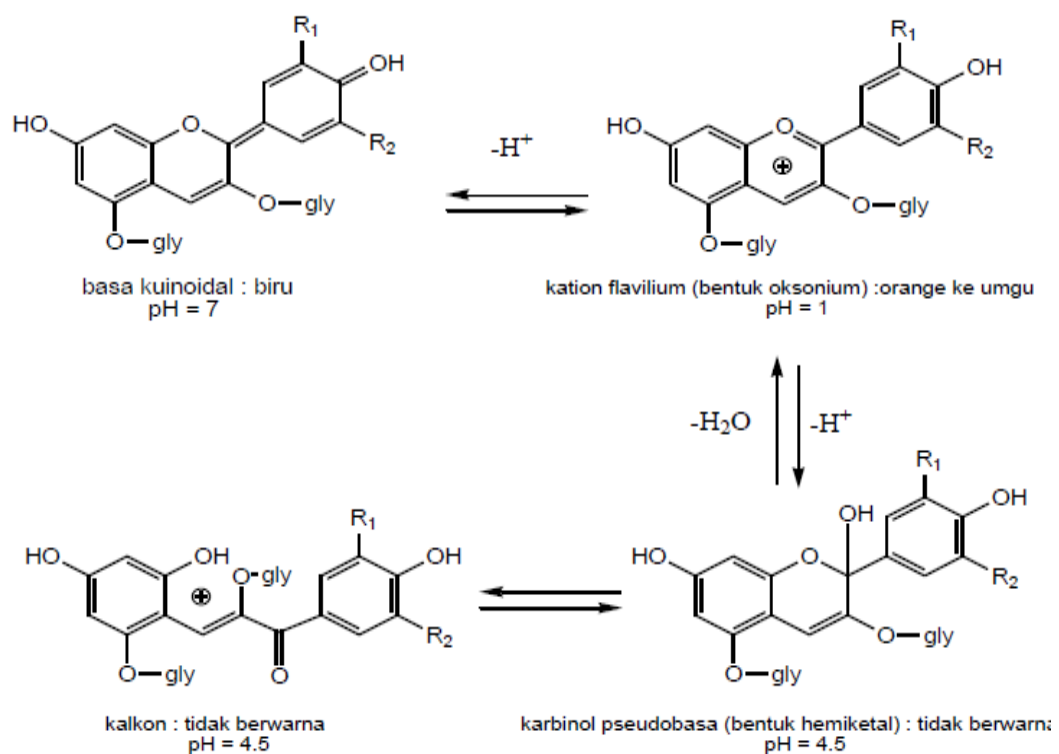
Lingkungan mempengaruhi warna dan stabilitas antosianin. Stabilitas warna antosianin dipengaruhi oleh pH, suhu, konsentrasi dan struktur antosianin, oksigen, cahaya, enzim, dan zat lain yang ada didalamnya. Kondisi pH dapat merubah struktur antosianin sehingga dapat menghasilkan perbedaan warna pada nilai pH yang berbeda-beda (Gambar 6) (Von Elbe and Schwartz, 1996). Suhu dan pH yang tinggi dapat mendegradasi antosianin (Seeram *et. al.*, 2001).

Peningkatan konsentrasi antosianin dapat meningkatkan stabilitas warna (Giusti and Wrolstad, 2003). Pengaruh oksigen lebih tinggi dari pada pH dan suhu tinggi dalam proses degradasi antosianin (Markakis, 1982). Furtado (1993) melaporkan bahwa cahaya mengakibatkan degradasi antosianin sama seperti degradasi yang diakibatkan oleh suhu. Oleh karena itu, diperlukan perlakuan yang tepat untuk mencegah terjadinya degradasi antosianin saat mengekstraksi antosianin.

2.3. Kopigmen

Kopigmen banyak ditemui dalam bentuk senyawa flavonoid, polifenol, alkaloid, asam amino, dan asam organik. Sebagian besar kopigmen yang telah diteliti merupakan golongan flavonoid, yaitu flavon, flavonol, dan flavanon, (Chen dan Hrazdina, 1981). Golongan asam fenolik seperti asam hidroksinat, asam hidrobenzoat, telah diteliti dapat meningkatkan stabilitas antosianin (Markovic, 2000). Schwarz *et al.* (2005) melaporkan bahwa penambahan senyawa flavanol (*rutin*) pada anggur merah terfermentasi mampu meningkatkan absorbansi warna

pada $\lambda 520$ nm dan pH 3,5 (hiperkromik), tetapi sebaliknya penambahan asam kumarat dan asam kafeat memberikan pengaruh terhadap penurunan warna. Malien *et. al.* (2001), Eiro (2002), Brenes (2005), dan Talcott *et. al.* (2005) melaporkan bahwa penambahan polifenol sebagai kopigmen dalam larutan antosianin dapat meningkatkan stabilitas antosianin selama proses pemanasan dan penyimpanan jus buah.



Gambar 6. Struktur antosianin pada kondisi pH yang berbeda (Giusti & Wrolstad, 2001)

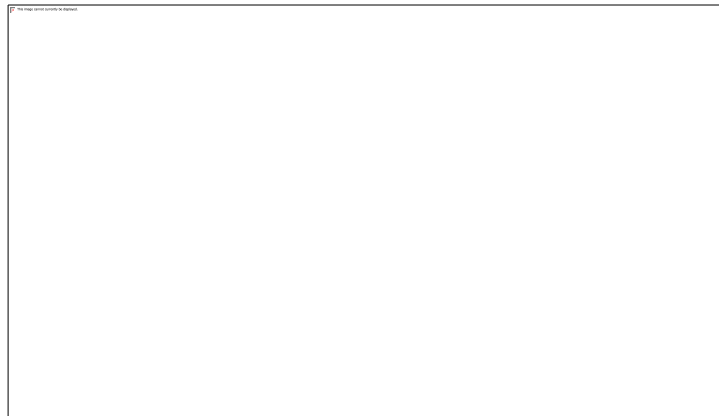
Penambahan satu jenis kopigmen terhadap beberapa jenis antosianin tertentu dapat mengaktifkan proses penguatan dan peningkatan stabilitas antosianin. Penguatan warna ekstrak antosianin karena reaksi kopigmentasi telah banyak dilaporkan, antara lain oleh Jackman *et.al.* (1996) yang melaporkan bahwa

penambahan tanin sebagai kopigmen menstabilkan ekstrak buah anggur, (Bakowska, 2003; dan Brenes, 2005), katekol (Liao, *et. al.* 1992; Miniati *et. al.* 1992; dan Gris, 2007) pada jus anggur dan Khusna (2009) pada rosella. Sebagian kopigmen yang telah diteliti berasal dari bahan pangan seperti yang dinyatakan oleh Mazza dan Brouilard (1990) serta Kopjar dan Pilizota (2009) bahwa diantara kopigmen yang umum digunakan adalah asam-asam organik seperti kafeat, ferulat, khlorogenat, dan asam galat. Sehubungan dengan eratnya kebutuhan pangan terhadap keberlangsungan kehidupan, maka pencarian alternatif kopigmen dari bahan non pangan sangat diperlukan. Meskipun beberapa penelitian sebelumnya telah menggunakan bahan non pangan seperti kayu secang (Kristie, 2008), kulit buah manggis (Supiyanti *et.al.*, 2010), kulit anggur (Delgado-Vargas dan Paredes Lopez, 2003), namun hal ini dirasa belum cukup karena masih banyak kemungkinan terdapat bahan non pangan lain yang lebih baik dalam menstabilkan antosianin.

2.3.1. Tanin

Tanin merupakan senyawa organik yang terdiri dari campuran senyawa polifenol kompleks, dibangun dari elemen C, H, dan O serta sering membentuk polimer besar dengan berat molekul lebih besar dari 2000 (Risnasari, 2001) (Gambar 7). Tanin disebut juga asam tanat dan asam galotanat. Tanin dapat tidak berwarna sampai berwarna kuning atau coklat, dan memiliki panjang gelombang maksimum 724,5 nm (Mailoa *et al.*, 2013).

Winarno (1992) menerangkan bahwa tanin terdiri dari katekin, leukoantosianin, dan asam hidroksi yang masing-masing dapat menimbulkan warna bila bereaksi dengan ion logam. Secara struktural tanin adalah suatu senyawa fenol yang memiliki berat molekul besar yang terdiri dari gugus hidroksi dan beberapa gugus yang bersangkutan seperti karboksil untuk membentuk kompleks kuat yang efektif dengan protein dan beberapa makromolekul. Jackman dan Smith (1996) melaporkan bahwa jumlah gugus hidroksil yang dominan menyebabkan warna cenderung biru dan relatif tidak stabil, sedangkan jumlah gugus metoksi yang dominan akan menyebabkan warna merah dan relatif stabil.



Gambar 7. Struktur Tanin

Tanin banyak ditemukan pada beberapa jenis tanaman karena diperlukan untuk melindungi diri dari serangan ternak, bakteri atau insekta (Cheeke and Shull, 1985). Tanin dapat di ekstraksi dari kulit kayu, buah dan daun.

Struktur molekul tanin yang terdiri dari beberapa macam gugus fungsional pada protein dan karbohidrat menyebabkan terbentuknya senyawa kompleks tanin.

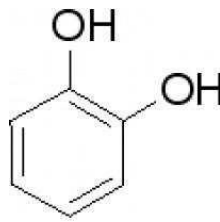
Interaksi tanin dengan protein atau zat lain yang mungkin terjadi adalah ikatan

hidrogen, interaksi hidrofobik, ikatan ionik dan ikatan kovalen (Hagerman, 1992; Makkar, 1993). Ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik merupakan dua bentuk interaksi yang paling banyak membentuk kompleks protein-tanin (Hagerman, 1992). Tanin digolongkan menjadi dua grup yaitu tanin terkondensasi (condensed tannin) dan tanin terhidrolisa (hydrolyzable tannin). Kedua jenis tanin ini dibedakan dari unit monomer penyusunnya. Tanin terkondensasi memiliki berat molekul sangat tinggi yaitu lebih dari 20.000 sedangkan tannin terhidrolisis memiliki berat molekul 500 sampai 5000 (Hagerman, 1992). Tanin terkondensasi menghasilkan warna hijau kehitaman sedangkan tanin terhidrolisis memberikan biru kehitaman (Etherington, 2002). Unit terkecil dari tanin yang berperan aktif dalam proses polimerisasi adalah unit katekin yang termasuk flavonoid. Pada unit katekin cincin A (Gambar 4) adalah cincin yang paling reaktif dan akan terjadikondensasi pada ikatan C6 dan C8 (Pizzi, 1994).

2.3.2. Katekol

Katekol termasuk dalam turunan flavon tereduksi yang memiliki berat molekul 110,11 dengan rumus molekul $C_6H_6O_2$ dan rumus kimia 1,2 - (HO) $2C_6H_4$ atau 1-2 dihydroxybenzene (Gambar 8) (Pudjaatmaka, 2002). Katekol berbentuk kristal tidak berwarna; memiliki titik didih $245^\circ C$ (750 mm Hg), titik lebur $105^\circ C$, densitas $1,1493 \text{ g / cm}^3$ ($21^\circ C$), titik nyala $137^\circ C$, *autoignition* $510^\circ C$, tekanan uap 10 mmHg pada $118,3^\circ C$, larut dalam 2,3 bagian air, alkohol, benzen, kloroform, eter, sangat larut dalam piridin, dan memiliki panjang gelombang maksimum (λ_{max}) antara 470 nm (Puspita, 2008), . Katekol reaktif jika bereaksi

dengan cahaya dan akan menghasilkan warna. Katekol bersifat reduktor sangat kuat, digunakan untuk obat dan zat cita rasa. Nama lain dari katekol yaitu 1,2-Benzendiol; 1,2-Dihidroksibenzen; 2-Dihidroksifenol; o-Benzendiol; o-Dihidroksibenzen; Dioksibenzen; Katekin; Pthalhidrokuinon; Pirokatekin;Pirokatekol.

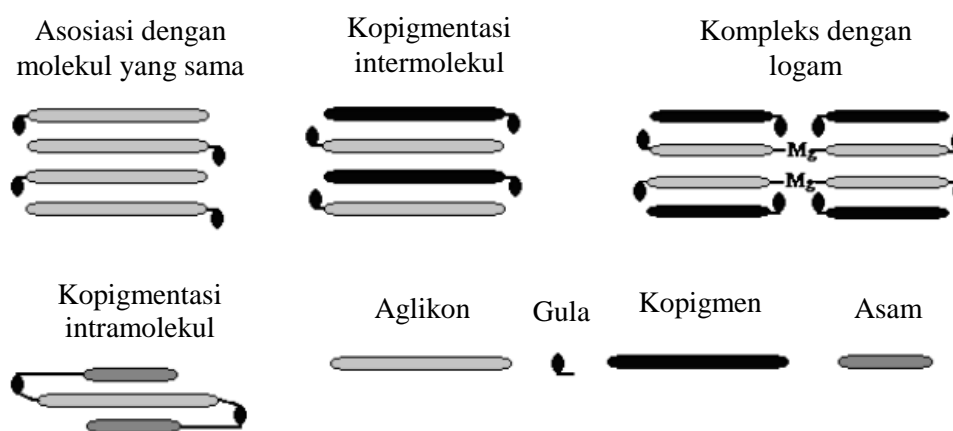


Gambar 8. Struktur Katekol

Meskipun katekol memiliki dua gugus hidoksil, namun Kopjar dan Pilizota (2009) melaporkan bahwa kopigmentasi jus *red currant* dengan penambahan katekol dan 4 - metil katekol tidak mampu mempertahankan warna antosianin yang ditunjukkan oleh warna yang lebih rendah dari sampel kontrol (sampel tanpa penambahan katekol) setelah 15 hari penyimpanan. Hal ini diduga karena konsentrasi antosianin pada jus *red currant* di bawah konsentrasi efektif ($3,5 \times 10^{-5}$ M) yaitu $9,87 \times 10^{-6}$ M. Sehingga pada penelitian ini katekol akan ditambahkan ke dalam ekstrak bekatul beras ketan hitam (*Oryza sativa glutinosa*) yang lebih besar dari konsentrasi antosianin tersebut. Industri tekstil menggunakan katekol sebagai pewarna, sedangkan di bidang pertanian digunakan menjadi pestisida. Selain itu, katekol juga dapat digunakan di industri kecantikan dan farmasi. Katekol banyak terdapat pada jaringan tanaman, seperti apel, anggur, dan buah pir (Pudjaatmaka, 2002).

2.4. Kopigmentasi

Kopigmentasi adalah pembentukan ikatan yang melindungi kation flavilium antosianin yang reaktif dari serangan molekul air sehingga menyebabkan warna pigmen antosianin menjadi lebih stabil (Rein, 2005). Reaksi kopigmentasi bersifat eksoterm, terjadi penumpukkan (stacking) molekul kopigmen yang tidak berwarna di permukaan gugus planar polar antosianidin (Escribano-Bailón & Santos-Buelga, 2012). Menurut Castaneda-Ovando *et al.* (2009), reaksi kopigmentasi dapat terjadi melalui empat mekanisme pembentukan ikatan, yaitu asosiasi dengan molekul yang sama, kopigmentasi intermolekul, kompleks dengan logam, ataupun kopigmentasi intramolekular (Gambar 9).



Gambar 9. Mekanisme kopigmentasi pada antosianin (Rein, 2005)

Gaya Van der Waals, efek hidrofobik, dan interaksi ionik merupakan *driving force* pada kopigmentasi intermolekuler yang ditandai dengan efek hiperkromik dan batokromik. Dangles *et al.* (1993) menjelaskan bahwa adanya pergeseran batokromik dan hiperkromik dikarenakan oleh kopigmentasi intermolekuler antara

antosianin dengan senyawa kopigmen. Batokromik (*red shift* atau *bathochromic effect*) adalah pergeseran panjang gelombang maksimum antosianin setelah dikopigmentasi ke arah panjang gelombang yang lebih besar yang menunjukkan telah terjadi perubahan struktur antosianin terkopigmentasi akibat ikatan dengan senyawa kopigmen. Sebaliknya, hipsokromik (*blue shift* atau *hypsochromic effect*) adalah pergeseran ke arah panjang gelombang yang lebih kecil.

Hiperkromik adalah peningkatan absorbansi antosianin setelah dikopigmentasi yang menunjukkan peningkatan intensitas warna (penguatan) warna yang disebabkan oleh gugus fungsi. Sebaliknya, hipokromik menunjukkan penurunan absorbansi antosianin setelah dikopigmentasi. Kopigmentasi yang tidak stabil belum mampu menghambat reaksi degradasi antosianin selama penyimpanan waktu tertentu, sehingga dapat menyebabkan pergeseran hipsokromik dan hipokromik

Lingkungan dapat mempengaruhi proses kopigmentasi. Faktor yang mempengaruhi kopigmentasi antara lain pH, suhu dan cahaya, konsentrasi, dan keberadaan senyawa lain (Kopjar dan Pilizola, 2009). Salah satu faktor fisik yang dapat mempengaruhi stabilitas antosianin adalah kondisi keasaman, dimana asam kation flavium mengalami kekurangan elektron sehingga sangat reaktif (Francis, 1982). Pada kondisi suhu tinggi, pemanasan dapat menstimulasi pembentukan senyawa hasil degradasi antosianin seperti karbinol dan turunannya yang tidak berwarna sehingga menyebabkan terjadinya penurunan nilai retensi warna selama perlakuan pemanasan (Francis 1989; Von Elbe and Schwartz 1996; Jackman and Smith 1996. Menurut De Man (1997), konsentrasi gula yang lebih tinggi dan

adanya oksigen akan mengakibatkan kerusakan pigmen yang lebih besar. Davies dan Mazza (1993) yang mengemukakan bahwa hasil kopigmentasi antosianin dengan asam klorogenat, asam kafeat dan rutin lebih tinggi antara pH 3,3-3,6, (Wilska-Jeska dan Korzuchowska, 1996). Zang *et. al.*, (2015) melaporkan hasil penelitiannya yang menunjukkan bahwa kopigmen asam ferulat yang kuat dibandingkan dengan dua asam kumirat, dan asam kafeat terhadap malvidin-3-O-glukosida

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia/Biokimia Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Laboratorium Pengolahan Limbah Agroindustri Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian, dan Laboratorium Biomassa Universitas Lampung pada bulan Desember 2014 sampai Oktober 2015.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bekatul beras ketan hitam (*Oryza sativa glutinosa*) yang diperoleh dari Tanjung Bintang Lampung Selatan, tanin (SIGMA Aldrich), katekol (SIGMA Aldrich), pelarut organik (metanol), KCl, HCl, NaHCO₃, asam sitrat, natrium sitrat, dan bahan pendukung lainnya. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *rotary vacuum evaporator*, spektrofotometer merk *varian type cary 50 probe*, *centrifuge merk hitachi type CF16RX II*, *shaker*, oven, *revigerator*, pH meter, kertas saring Whatman No.42, kain saring, dan alat gelas untuk analisis.

3.3. Metode Penelitian

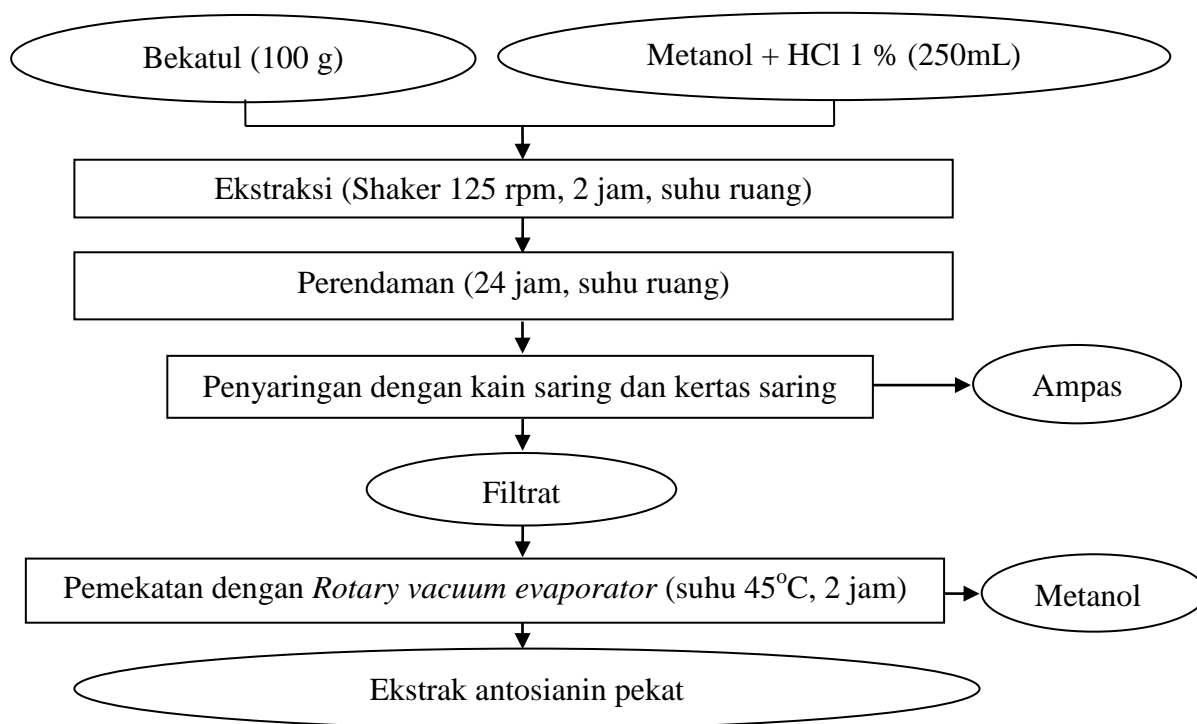
Penelitian dilakukan dalam 2 percobaan terpisah (tanin atau katekol) yang masing-masing menggunakan Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) disusun secara faktorial (3x5) dalam 3 ulangan dengan faktor pertama adalah perbandingan rasio molar kopigmen dan antosianin 0:1, 50:1, 100:1 dan faktor kedua adalah lama penyimpanan yaitu 0, 10, 20, 30, dan 40 hari. Data efek batokromik dan hiperkromik, dan waktu paruh dianalisis secara deskriptif. Data perubahan konsentrasi antosianin selama penyimpanan pada suhu ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) dan perubahan perubahan retensi warna diuji kemenambahan datanya dengan menggunakan uji Tuckey dan kesamaan ragam data diuji dengan menggunakan uji Bartlet. Data dianalisis menggunakan analisis ragam untuk mendapatkan penduga ragam galat dan mengetahui ada tidak pengaruh perlakuan, kemudian pengujian dilanjutkan dengan perbandingan ortogonal dan polinomial ortogonal pada taraf nyata 5% dan 1% (Steel dan Torrie, 1991).

3.4. Pelaksanaan Penelitian

3.4.1. Ekstraksi pigmen antosianin bekatul ketan hitam

Ekstraksi antosianin dari bekatul beras ketan hitam dilakukan dengan metode ekstraksi Francis dan Bassa (1987) dan Gao dan Mazza (1996) yang disajikan pada Gambar 10. Sebanyak 100 g bekatul beras ketan hitam ditimbang dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 mL (yang telah dibungkus dengan kertas alumunium foil), kemudian ditambahkan 250 mL metanol yang telah diasamkan

dengan 2,5 mL HCl 1%. Selanjutnya ekstraksi berlangsung dengan bantuan *shaker* kecepatan 125 rpm selama 2 jam. Proses ekstraksi dilanjutkan sampai 24 jam pada suhu ruang (erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil), setelah itu larutan disaring dengan menggunakan kain saring lalu filtrat disaring kembali dengan menggunakan kertas saring. Filtrat yang dihasilkan dipekatkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 45°C selama 2 jam, dan dihasilkan pekatan ekstrak antosianin bekatul beras ketan hitam.



Gambar 10. Diagram alir ekstraksi antosianin bekatul beras ketan hitam
Sumber : Gao dan Mazza (1996).

3.4.2. Penentuan konsentrasi ekstrak antosianin

Sampel pekat hasil ekstraksi sebanyak 3 mL diencerkan menggunakan buffer 3,5 gingga 120 mL dan disentrifus 2 kali dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 5°C

selama 10 menit. Sampel hasil sentrifus di encerkan hingga berada pada absorbansi dengan selang nilai 0,4 – 0,8 pada panjang gelombang 520nm. Panjang gelombang 520 nm digunakan karena antosianin dalam ekstrak bekatul beras ketan hitam dinyatakan sebagai sianidin 3-glukosida sebagaimana yang dilaporkan oleh Shao *et al.* (2014) yang menyatakan bahwa lebih dari setengah antosianin pada bekatul beras ketan hitam, merupakan sianidin 3-glukosida (3,576 mg/g dari 6,281 mg/g antosianin).

Ekstrak antosianin bekatul beras ketan hitam dimasukkan ke dalam 2 buah tabung reaksi yang masing-masing telah diisi dengan larutan buffer pH 1 dan pH 4,5. Nilai absorbansi setiap sampel dibaca dengan spektrofotometer pada λ 520 nm dan λ 700 nm, menggunakan air suling sebagai blanko. Konsentrasi dihitung menggunakan persamaan berikut :

$$\text{Absorban sampel (A)} = (A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

$$\text{Total antosianin (mM)} = (A \times \text{DF} \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

$$\text{Total antosianin (mg/L)} = (A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

Keterangan:

$A_{\lambda_{\text{max}}}$ = Absorban pada panjang gelombang maksimal

MW Sianidin 3-glukosida = 449,2 g/mol

DF = Faktor pengenceran,

Absortivitas Molar = ϵ = 26.900 L/mol/cm

Antosianin hasil perhitungan kemudian digunakan untuk menghitung jumlah kopigmen (tanin dan katekol) yang harus ditambahkan sesuai dengan rasio molar yang ditentukan.

3.4.3. Kopigmentasi antosianin bekatul beras ketan hitam

Ekstrak antosianin bekatul beras ketan hitam yang telah diketahui jumlah antosianinnya diencerkan hingga 0,2 mM. Selanjutnya, larutan antosianin tersebut direaksikan dengan kopigmen (tanin atau katekol) sesuai dengan perlakuan rasio molar masing-masing. Perhitungan molaritas senyawa kopigmen yang akan ditambahkan, dihitung sesuai dengan persamaan berikut:

$$\text{Jumlah kopigmen} = C \times \text{BM} \times V/1000 \times R$$

Keterangan:

C = Konsentrasi antosianin awal (mM)

BM = Berat molekul kopigmen (BM katekol = 110,11 mg/mM dan BM tanin = 1701 mg/mM)

V = Volume ekstrak (35 mL)

R = Rasio (0:50:100)

Berdasarkan perhitungan rumus di atas, maka jumlah kopigmen yang harus ditambahkan adalah katekol sebanyak 38,535 mg untuk rasio mol 50:1 dan 77,070 mg untuk rasio molar 100:1; tanin sebanyak 595,350 mg untuk rasio molar 50:1 dan 1.190,700 mg untuk rasio molar 100:1. Masing-masing kopigmen ditambahkan ke dalam botol gelap tertutup yang telah diisi dengan ekstrak antosianin. Ekstrak antosianin yang telah dicampur dengan kopigmen selanjutnya disimpan pada suhu ruang ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) di tempat yang terpapar cahaya dan dianalisis pada hari ke 0, 10, 20, 30, dan 40.

3.5. Pengamatan

3.5.1 Efek batokromik dan hiperkromik ekstrak antosianin dan antosianin terkopigmentasi

Sampel antosianin yang tidak dikopigmentasi (rasio molar 0) dan antosianin yang dikopigmentasi (rasio molar 50:100), masing-masing dimasukkan ke dalam 6 mL larutan buffer pH 3,5 sampai absorbansi pada pembacaan λ 520 nm berada antara 0,4 – 0,8. Kemudian absorbansi sampel dibaca dengan spektrofotometer (*Scanning*) pada berbagai panjang gelombang 450 nm – 600 nm sampai diperoleh Absorbansi tertinggi ($A_{\lambda_{max}}$) (Rein, 2005). *Scanning* dilakukan pada hari ke – 10 untuk mengamati perubahan absorbansi maks (hiperkromik) dan pergeseran λ maks (batokromik). Analisis *scanning* awal dilakukan pada hari ke – 10 dengan asumsi kopigmentasi antosianin dengan katekol sudah berjalan sempurna.

3.5.2. Perubahan konsentrasi antosianin selama penyimpanan

Ekstrak antosianin bekatul beras ketan hitam dimasukkan ke dalam 2 buah tabung reaksi yang masing-masing telah diisi dengan larutan buffer pH 1 dan pH 4,5.

Absorbansi pada spektrofotometer setiap sampel dibaca pada λ 520 nm dan λ 700 nm, menggunakan air suling sebagai blanko. Konsentrasi dihitung menggunakan persamaan berikut :

$$\text{Absorbansi sampel (A)} = (A_{\lambda_{max}} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{\lambda_{max}} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

$$\text{Total antosianin (mM)} = (A \times \text{DF} \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

$$\text{Total antosianin (mg/L)} = (A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

Keterangan:

$A_{\lambda_{\max}}$ = Absorban pada panjang gelombang maksimal

MW Sianidin 3-glukosida = 449,2 g/mol

DF = Faktor pengenceran,

Absortivitas Molar = ϵ = 26.900 L/mol/cm

3.5.3. Retensi warna

Absorban warna ekstrak antosianin bekatul beras ketan hitam tidak dikopigmentasi maupun dikopigmentasi selama penyimpanan dibaca pada larutan buffer 3,5 dan λ 520 nm. Warna ekstrak antosianin merupakan gabungan dari warna yang bersumber dari antosianin dan warna dari senyawa flavonoid (λ_{700}) lain. Pada pH 3,5 antosianin dan flavonoid lainnya berada dalam struktur yang stabil sehingga pengamatan retensi warna dibaca pada pH 3,5. Retensi warna selama penyimpanan dihitung dengan rumus :

$$\text{Retensi Warna (\%)} = (A_t/A_0) \times 100\%$$

Keterangan :

A_0 : absorban pada hari ke-0

A_t : absorban pada hari ke-t (Rein dan Heinonen, 2004)

3.5.4. Waktu paruh

Perhitungan waktu paruh dari degradasi antosianin berdasarkan pada jumlah konsentrasi antosianin pada suhu pemanasan 65°C dalam jangka waktu 8 jam yang dibaca secara spektrofotometri. Larutan antosianin yang dipanaskan menggunakan waterbath dibaca absorbansinya dengan interval waktu 2 jam.

Penentuan konsentrasi antosianin dilakukan dengan melarutkan 0,5 ml pekatan antosianin bekatul beras ketan hitam ke dalam 6 ml larutan buffer untuk pH 1 dan 4,5 (Shi *et al.*, 1992).

Konstanta laju reaksi ordo pertama (k), waktu paruh ($t_{1/2}$) dari antosianin, yang dihitung dengan menggunakan persamaan laju reaksi ordo satu sebagai berikut:

$$\frac{dc}{dt} = -k c$$

$$\frac{dc}{c} = -k dt$$

$$\int_0^t \frac{dc}{c} = -k \int_0^t dt$$

$$\ln \frac{c_t}{c_0} = -k (t - t_0)$$

$$\ln \frac{c_t}{c_0} = -k t$$

pada $t = t_{1/2}$

$$\ln 0,5 = -k t_{1/2}$$

$$t_{1/2} = - \frac{\ln 0,5}{k}$$

Keterangan :

C_0 adalah konsentrasi awal antosianin

C_t adalah konsentrasi antosianin setelah pemanasan waktu t (Kopjar dan Pilizota 2009).

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut:

1. Kopigmen katekol memberikan pengaruh warna kebiruan (hipsokromik), sedangkan kopigmen tanin memberikan warna kemerahan (batokromik) setelah proses kopigmentasi antosianin ekstrak bekatul beras ketan hitam.
2. Rasio molar terbaik pada kopigmen katekol adalah 50:1 dengan laju penurunan konsentrasi antosianin sebesar 0,35mM/hari atau 39,29mg/100g/hari, laju penurunan retensi warna sebesar 12,78%/hari dan waktu paruh pada suhu 65°C 8,66 jam.
3. Rasio molar terbaik pada kopigmen tanin adalah 100:1 dengan laju penurunan konsentrasi antosianin sebesar 0,07mM/hari atau 7,86mg/100g/hari, laju penurunan retensi warna sebesar 2,39%/hari, dan waktu paruh pada suhu 65°C 19,80 jam.

5.2. Saran

Berdasarkan kesimpulan penelitian bahwa penambahan senyawa kimia tanin dan katekol mampu menghasilkan kopigmentasi maka penelitian ini perlu dilanjutkan untuk mengetahui pengaruh penambahan ekstrak kasar tanaman yang banyak mengandung tanin dan katekol terhadap efektifitas kopigmentasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Aal E.M., J.C. Young and I. Rabalski. 2006. Anthocyanin Composition in Black, Blue, Pink, Purple and Res Cereal Grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:4696-4704.
- AOAC. 2005. *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists. Benjamin Franklin Station. Washington.
- Astawan, M. 2009. *Sehat dengan Hidangan Kacang dan Biji-bijian*. Jakarta. Penebar Swadaya.
- Barber, S., C. Benedito, and Barber. 1980. *Chemistry and Technology*. in: B.S. Luh (Ed.) *Rice: Production and Utilization*. AVI Publishing Company. Westport CT, 1980:790–862.
- Bąkowska A., A.Z. Kucharska, and J. Oszmiański. 2003. The Effects of Heating, Uv Irradiation and Storage on Stability of The Anthocyanin-Polyphenol Copigment Complex. *Food Chemistry*, 81(3):349-355.
- Berké B. and V.A.P. Freitas. 2005. Influence of Procyanidin Structures on Their Ability to Complex with Oenin. *Food Chemistry*, 90(3): 453–460.
- Boulton, R. 2001. The Copigmentation of Anthocyanins and its Role in The Color of Red Wine: A Critical Review *Journal Enology and Viticulture*, 52(2): 67-84.
- Brenes, C., D. Del Pozo-Insfran and S. Talcott. 2005. Stability of Copigmented Anthocyanins and Ascorbic Acid in a Grape Juice Model System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1): 49- 56.
- Butler, L.G. and P. Pushpamma. 1991. Tannin in Betel Nut and Its Products Consumed in India: Comparison with High Tannin Sorghum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39:322-326.
- Cai, Y., T.H. Lilley, and E. Haslam. 1990. Polyphenol-Anthocyanin Copigmentation. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 5:380-383.
- Castaneda-Ovando A., M.L. Pacheco-Hernandez, M.E. Paez-Hernandez, J.A. Rodrigue and C.A. Galan-Vidal. 2009. Chemical Studies of Anthocyanins: A Review. *Food Chemistry*, 133: 859-971.

- Cheeke, P. R. and L. R. Shull. 1985. Natural Toxicants in Feed and Poisanous Plants. Avi Publishing Company. INS, 332 – 357.
- Chen L.J and G. Hrazdina. 1981. Structural Aspects of Anthocyanin Flavonoid Complex Formation and Its Role in Plant Colour. *Phytochemistry*, 20:297-301.
- Dangles, O., N. Saito, and R. Brouillard. 1993. Kinetic and Thermodynamic Control of Flavilium Hydration in The Pelargonidin– Cinnamic Acid Complexation. Origin of the extraordinary Flower Colour Diversity of *Pharbitis nil*. *Journal of the American Chemical Society*, 115:3125–3132.
- Darias-Martin, J., M.C. Lopez, J.F.E.Granado and C.D. Romero. 2005. The Magnitude of Copigmentation In The Colour Of Aged Red Wines Made in the Canary Islands. *European Food Research and Technology*, 212(2):254-259.
- Davies, A.J. and G. Mazza. 1993. Copigmentation of Simple and Acylated Anthocyanins with Colorless Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41:716–720.
- De Man, M. J. 1997. *Kimia Makanan; Edisi kedua*. ITB. Bandung
- Delgado-Vargas, F. and O. Paredes-Lopez. 2003. *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*. CRC Press LLC. Florida.
- Eiro M. J. and M. Heinonen. 2002. Anthocyanin Color Behavior and Stability During Storage: Effect on Intermolecular Copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:7461-7466.
- Escribano-Bailón, T. and Santos-Buelga. 2012. Anthocyanin Copigmentation - Evaluation, Mechanisms and Implications for the Colour of Red Wines. *Current Organic Chemistry*, 16 (6):715-723.
- Etherington, R. 2002. *A Dictionary of Descriptive Terminology. Vegetable Tanin*. New York.
- Francis, F. J. 2002. *Pigment and Other Colorants*. Marcel Dekker Inc. New York.
- Francis, F. J. 1989. Food Colorants: Anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28:273–314.
- Francis, F.J. and I.A. Bassa. 1987. Stability of Anthocyanin from Sweet Potatoes in a Model Beverages. A research note. *Journal of Food Science*, 52: 1753–1754.

- Francis, F. 1982. Analysis of Anthocyanins. In P. Markakis (Ed.), Anthocyanins as Food Colors. New York. Academic Press.
- Furtado, P., P. Figueiredo, H. Chaves, and F. Pina. 1993. Photochemical and Thermal Degradation of Anthocyanidins. *Journal Photochem Photobiology*, 75:113-118.
- Gao, K., and G. Mazza. 1996. Extraction on Anthocyanin Pigments from Purple Sunflower Hulls. *Journal Food Science*, 61: 600-603.
- Gauce C., E.S. Malagoli, and M. T.B. Luiz. 2010. Effect of pH on The Copigmentation of Anthocyanins from Carbernet Sauvignon Grape Extracts with Organic Acid. *Science Agricuture (Piracicaba, Braz.)*, 67(1):41-46.
- Giusti M.M and R.E. Wrolstad. 2003. Acylated Anthocyanins from Ediblesources and Their Applications in Food Systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14: 217-225.
- Giusti, M. M., and R. E. Wrolstad. 2001. Unit F1.2.1-13. Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible spectroscopy. In R.E. Wrolstad(Ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: Wiley.
- Gris, E.F., E.A. Ferreira, L.D.Falcão and M.T. Bordignon-Luiz. 2007. Influence of Ferulic Acid on Stability of Anthocyanins From Cabernet Sauvignon Grapes in A Model System and A Yogurt System. *International Journal of Food Science and Technology*, 42:992-998.
- Hagerman, A.E., C.T. Robbins, Y. Weerasuriya, T.C. Wilson, and C. McArthur. 1992. Tannin Chemistry in Relation to Digestion. *Journal of Range Management*, 45 (1):57-62.
- Hanum, T. 2000. Ekstraksi dan Stabilitas Zat Pewarna Alami Dari Bekatul Beras Ketan Hitam. *Buletin Teknologi dan Industri Pangan*, 11:17-23.
- Herman. 2010. Identifikasi Pewarna Rhodamin B pada Minuman Ringan Tanpa Merk yang Dijual di Pasar Sentral Kota Makasar. 1 (1): 33-36.
- Hiemori M, E. Koh, and A.E.Mitchell. 2009. Influence of Cooking Onanthocyanins in Black Rice (*Oryza sativa* L. japonica var.SBR). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:1908-1914.
- Hu C., J. Zawistowski, W.H. Ling, and D.D.Kitts. 2003. Black rice (*Oryza sativa* L. indica) Pigmented Fraction Suppresses Both reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Chemical Andbiological Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 5271-5277.

- Ibnu, K., Erlidawati, dan Munzir. 2013. Kestabilan Zat Warna Alami dari Umbi Ketela Ungu (*Ipomoea batatas*). *Jurnal Critical Discourse Analysis*, 1 (1):34-40.
- Jackman, R.L., and J.L Smith. 1996. Anthocyanin and Betalains. *Natural Food Colourants*. Second Edition. Blackie Academic and Professionals. London.
- Jenie, B.S., K. D. Mitrajanty, dan S. Fardiaz. 1997. Produksi Konsentrat dan Bubuk Pigmen Angkak dari *Monascus purpureus* serta Kestabilannya Selama Penyimpanan. *Buletin Teknologi dan Industri Pangan*, 7(2):39-46.
- Kalisz S., J. Oszmianski, J. Hladyszowski, and M. Mitek. 2013. Stabilization of Anthocyanin and Skullcap Flavone Complexes – Investigations with Computer Simulation and Experimental Methods. *Polandia. Food Chemistry*, 138(1):491–500.
- Kahlon, T.S., F.I. Chow, and R.N. Sayre. 1994. Cholesterol-Lowering Properties of Rice Bran. *Cereal Food World*, 39 (2):99-103.
- Khusna, A. 2009. Stabilitas Warna Antosianin Rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) Selama Penyimpanan dengan Metode Kopigmentasi. (Skripsi). Universitas Brawijaya. Malang.
- Kopjar M. and V. Pilizota. 2009. Copigmentation Effect of Phenolic Compounds on Red Currant Juice Anthocyanins During Storage. *Journal of Food Science Technology*, 1(2):16-20.
- Kopjar M. and V. Pilizota. 2011. Prevention of Thermal Degradation of Anthocyanins in Blackberry Juice with Addition of Different Sugars. *CyTA Journal of Food*, 9(3):237-242.
- Kristie, A. 2008. Efek Pencampuran Ekstrak Zat Warna Kayu Secang dengan Beberapa Sumber Antosianin terhadap Kualitas Warna Merah dan Sifat Antimikrobanya. Skripsi. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian IPB.
- Liao, H., Y. Cai, and E. Haslam. 1992. Polyphenol Interactions. Anthocyanins: Copigmentation and Colour Changes in Red Wines. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 59:299-305.
- Mahkamah, S. 2004. Perbandingan Stabilitas Panas Ekstrak Antosianin Bekatul Beras Ketan Hitam (*Oryza sativa glutinosa*) dan Tanaman Hati Ungu (*Tradescantia pallida*). Skripsi. Universitas Lampung. Lampung.
- Mailoa M. N., M. Mahendradatta, A. Laga, and N.Djide. 2013. Tannin Extract of Guava Leaves (*Psidium guava L*) Variation with Concentration Organic

- Solvent. *International Journal of Scientific and Technology Research*, 2 (9):106-110.
- Makkar, H. P. S. 1993. Antinutritional Factors in Foods for Livestock. *British Society of Anim. Production*, 16:69-85.
- Malien-Aubert C., O. Dangles and M.J. Amiot. 2001. Color Stability of Commercial Anthocyanin-Based Extracts in Relation to The Phenolic Composition. Protective Effects by Intra- And Intermolecular Copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1):170-176.
- Mar'atusshaliha, E. 2007. Identifikasi dan Uji Stabilitas Pigmen Antosianin Bunga Kana (*Canna coccinea mill*) Merah Muda (Kajian Suhu dan Lama Pemanasan, Penambahan Logam, Kondisi Simpan). Thesis. Universitas Muhammadiyah Malang. Malang.
- Markakis, P. 1982. Anthocyanins as Food Additives. Di dalam *Anthocyanins as Food Colors*. Markakis, P. (ed). Academic Press. New York.
- Markovic, J.M.D., N.A. Petranovic, and J.M. Baranac. 2000. A Spectrophotometric Study of the Copigmentation of Malvin with Caffeic and Ferulic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:5530-5536.
- Mastuti, E., G. Fristianingrum, dan Y. Andika. 2013. Ekstraksi dan Uji Kestabilan Warna Pigmen Antosianin Dari Bunga Telang (*Clitoria ternatea L.*) sebagai Bahan Pewarna Makanan. Simposium Nasional RAPI XII. ISSN1412-9612. Universitas Sebelas Maret.
- Mateus N., and V. Freitas. 2009. Anthocyanins as Food Colorants. Di dalam: Gould K, Davies K, Winefield C, editor. *Anthocyanins: Bioynthesis, Functions, and Applications*. Springer Science Business Media. LLC. New York.
- Mazza G. and R. Brouillard. 1990. The Mechanism of Copigmentation of Anthocyanins in Aqueous Solutions. *Phytochemistry*, 29:1097-1102.
- Miniati E., P. Damiani and G. Mazz. 1992. Copigmentation and Self Association of Anthocyanin in Food Model Systems. *Italian Journal of Food Science*, 4:109-116.
- Mistry, T.V., Y. Cai, T.H. Lilley and E. Haslam. 1991. Polyphenol Interactions. Part 5. Anthocyanin Co-Pigmentation. *Perkin Trans. Journal of the Chemical Society*, 2:1287-1296.
- Muliawati, T. A. 2007. Uji Stabilitas Pigmen Antosianin Bunga Turi Merah (*Sesbania grandiflora (L) Pers*) (Kajian Pemanasan, Cahaya dan logam).

- Skripsi Sarjana Teknologi Pertanian. Universitas Muhamadiyah. Malang:56.
- Nailufar, A.A., Basito, dan C. Anam. 2012. Kajian Karakteristik Ketan Hitam (*Oryza sativa glutinosa*) Pada Beberapa Jenis Pengemas Selama penyimpanan. Surakarta. Jurnal Teknosains Pangan, 1 (1):122-132.
- Nielsen S. R. and S. Holst. 2002. Developments in Nature Colourings. In: MacDougall DB (ed). Colour in Food. Boca Raton. CRC Press.
- Palamidis, N. and P. Markakis. 1978. Stability of Grape Anthocyanin in Carbonated Beverages. Semana Vitivicola, 33: 2633-2639.
- Pebrianti, C., RB. Ainurrasyid dan S.L. Purnamaningsih. 2015. Uji Kadar Antosianin dan Hasil Enam Varietas Tanaman Bayam Merah (*Alternanthera amoena voss*) pada Musim Hujan. Jurnal Produksi Tanaman, 3 (1):27-33.
- Pizzi, A. 1994. Advanced Wood Adhesives Technology. Dekker. New York.
- Phetpornpaisan P., T. Patcharaporn, J. Michael, and S. Khaetthareeya. 2014. A local Thai Cultivar Glutinous Black Rice Bran: A Source of Functional Compounds in Immunomodulation, Cell Viability and Collagen Synthesis, and Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Inhibition. Journal Science Direct. 7:650-661.
- Pratiwi A., 2014. Analisis Antosianin dan Kandungan Nutrien pada Bekatul Beras Hitam (*Oryza sativa L cv cempo Ireng Sayegan*, Yogyakarta.). Electronic Theses and Dissertations (ETD) Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Pudjaatmaka, A. Hendayana. 2002. Kamus Kimia. Balai Pustaka; 180. Jakarta.
- Puspita R. L. 2008. Identifikasi Senyawa Produk Oksidatif Koping Isoeugenol dengan Katalis Enzim Laktase dari Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*) dan Uji Aktivasnya sebagai Antioksidan. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia. Depok.
- Rein, M.J. 2005. Copigmentation Reactions and Color Stability of Berry Anthocyanins. Doctoral Manuscript. University of Helsinki Department of Applied Chemistry and Microbiology Food Chemistry Division. Helsinki. 87 pp.
- Rein, M.J. and M. Heinonen. 2004. Stability and Enhancement of Berry Juice Color. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(25):3106-3114.
- Risnasari, I. 2001. Pemanfaatan Tanin Sebagai Bahan Pengawet Kayu. Skripsi. Universitas Sumatera Utara. Medan.

- Santoni, A., D. Darwis, dan S. Syahrir. 2013. Isolasi Antosianin dari Buah Pucuk Merah (*Syzygium campanulatum* korth.) serta Pengujian dan Aplikasi sebagai Pewarna. Prosiding Semirata FMIPA. Universitas Lampung. Lampung.
- Sari P., A. Fitriyah, K. Mukhamad, Unus, F. Mukhamad dan L Triana. 2005. Ekstraksi dan Stabilitas Antosianin dari Kulit Buah Duwet (*Syzygium cumini*). Jurnal Teknologi dan Industri Pangan, 16 (2).
- Seeram, N.P., R.A. Momin, M.G. Nair, and L.D. Bourquin. 2001. Cyclooxygenase Inhibitory And Antioxidant Cyanidin Glycosides in Cherries and Berries. International Journal of Phytomedicine and Phytopharmacology. Michigan State University, 8 (5):326-329.
- Setyadi, R. 2014. Penentuan Kandungan Total Antosianin pada Berbagai Bunga dengan Metoda Spektrofotometriph Differential. Thesis. Universitas Andalas. Padang.
- Scheffeldt, P., and G. Hrazdina. 1978. Co-Pigmentation of Anthocyanins Under Physiological Conditions. Journal of Food Science, 43 (2):517-520.
- Schwarz, M. J., P.Picazo-Bacete, Winterhalter, and I. Herмосín-Gutiérrez. 2005. Effect of Copigments and Grape Cultivar on the Color of Red Wines Fermented after Addition of Copigments. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53:8372-8381.
- Sembiring, LR., L.M.E.Pujiantininggih, dan S. Pranata. 2011. Pemanfaatan Ekstra Biji Teurng Belanda (*Cyphomandra betacea sendtn*) Sebagai Pewarna Alami Es Krim. Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Yogyakarta.
- ShaoY., F. Xu, X. Sun, J. Bao, and T. Beta. 2014. Identification and Quantification of Phenolic Acid and Anthocyanins As Antioxidants in Bran, Embryo, and Endosperm of Whine, Red, and Black Rice Kernels (*Oryza sativa* L). Journal Cereal Science. 59:211-218.
- Shi, Z., and F.J. Francis. 1992. Anthocyanins of *Tradescantia pallida*: Potential Food Colorants. Journal Food Science. 67(3): 761-766.
- Steenis, V.J. 1988. Flora untuk Sekolah Indonesia. Moeso Surjowinoto. PT. Pradnya Paramita. Halaman 66-93. Jakarta.
- Sudarmadji, S., dan K.R. Kuswanto. 1987. Proses-proses Mikrobiologi Pangan. PAU Pangan dan Gizi. UGM. Yogyakarta.
- Suhartatik, N., M. Karyantina, A. Mustofa, M.N. Cahyanto, S. Raharjo, dan E. S. Rahayu. 2013. Stabilitas Ekstrak Antosianin Beras Ketan (*Oryza sativa*

- var. *glutinosa*) Hitam Selama Proses Pemanasan dan Penyimpanan. Yogyakarta. Jurnal Agritech, 33 (4): 384-390.
- Suzery M., Sri L., dan C. Bambang. 2010. Penentuan Total:Antosiain dari Kelopak Bunga Rosela (*Hibiscus sabdariffa* L) dengan Metode Maserasi dan Sokhletasi. Artikel Penelitian 1(1):6-18.
- Steel R.G.D. dan J.H. Torrie. 1991. Prinsip dan Prosedur Statistika. PT. Gramedia. Jakarta.
- Talcott ST, C.H. Brenes, D.M. Pires and D. Del Pozo-Insfran. 2003. Phytochemical Stability and Color Retention of Copigmented and Processed Muscadine Grape Juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51:957-963.
- Wilska-Jeszka J and A. Korzuchowska. 1996. Anthocyanins and Chlorogenic Acid Copigmentation. Influence on The Color of Strawberry and Chokeberry Juices. Lebensm Unters Forsch, 203(1):38-42.
- Von E. J. H., and S. J. Schwartz. 1996. In Colorants in Food Chemistry (R. Owen and E. Fennema, Eds.), pp. 685–691. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong.
- Williams M. and G. Hrazdina. 1979. Anthocyanins as Food Colorants: Effect of pH on The Formation of Anthocyanin-Rutin Complex. Journal of Food Science, 44:66-68.
- Winarno, F.G. 1992. Kimia Pangan dan Gizi. PT. Gramedia Pustaka. Jakarta.
- Yanuar W. 2009. Aktivitas Antioksidan dan Imunomodulator Serealia. Disertasi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Yudiono, K. 2011. Ekstraksi Antosianin dari Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* Cv. *ayamurasaki*) dengan Teknik Ekstraksi Subcritical Water. Jurnal Teknologi Pangan, 2 (1):1 –30.
- Zang B., Fei H., Pan-Pan Z., Yue L., and Chang-Qing D. 2015. Copigmentation Between Malvidin-3-O-Glucoside and Hydroxycinnamic Acids in Red Wine Model Solutions: Investigations with Experimental and Theoretical Methods. Journal Food Reseach International. 78:313-320.
- Zawistowski J., Kopec A., and Kitts DD. 2009. Effects of Black Rice Extrac (*Oryza sativa* L. *indica*) on Cholesterol Levels AND Plasma Lipid Parameters in Wistar Kyoto Rats. Journal Funct Foods, 1:50–56.