

PENENTUAN KANDUNGAN TOTAL ANTOSIANIN YEAST BERAS HITAM (*Oryza sativa L. Indica*) MENGGUNAKAN METODE pH DIFFERENSIAL

DETERMINATION OF THE TOTAL ANTHOCYANINS CONTENT IN YEAST BLACK RICE (*Oryza sativa L. Indica*) USING pH DIFFERENTIAL METHOD

Fatimatuz Zahroh dan Rudiana Agustini*

*Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
State University of Surabaya*

Jl. Ketintang Surabaya (60231), telp 031-8298761

**Corresponding author, e-mail: rudianaagustini@yahoo.co.id*

Abstrak. Beras hitam memiliki berbagai kandungan komponen bioaktif yang berperan sebagai antioksidan meliputi senyawa fitokimia dan antosianin. Kandungan pigmen atau zat warna pada beras hitam disebabkan oleh senyawa antosianin dan proantosianidin. Salah satu produk diversifikasi berbahan dasar beras hitam yang dapat dikembangkan adalah fermentasi menggunakan ragi roti (*bakery's yeast*). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi yeast beras hitam sebagai antioksidan dalam senyawa fitokimia dengan Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS), serta mengetahui kestabilan kandungan total antosianin dari berbagai pH asam menggunakan metode pH differensial. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dengan larutan etanol 96% ditambah pelarut HCl 1% hingga pH (1, 1,5, 2, dan 2,5) yang dilakukan selama 24 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa yeast beras hitam dapat dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan yang baik, dikarenakan mengandung 20 senyawa turunan fitokimia dan antosianin yang tinggi. Kandungan total antosianin yeast beras hitam pada variasi pH 1 sebesar 60,132 mg/100g, pH 1,5 127,045 mg/100g, pH 2 47,566 mg/100g, dan pH 2,5 29,790 mg/100g. Senyawa antosianin bekerja secara optimum dalam pelarut asam pada pH 1,5, sehingga dapat disimpulkan bahwa pH dapat mempengaruhi stabilitas pigmen antosianin.

Kata Kunci : *Yeast beras hitam, antosianin, fitokimia, antosianin, pH differensial.*

Abstract. Black rice contains various bioactive components that act as antioxidants including phytochemical compounds and anthocyanins. The pigment or dye content in black rice is caused by anthocyanin and proanthocyanidin compounds. One of the diversified products made from black rice that can be developed is fermentation using *bakery's yeast*. This study aims to identify black rice yeast as an antioxidant in phytochemical compounds with Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS), as well as to determine the stability of the total anthocyanin content of various acidic pH using differential pH methods. The extraction method used was maceration with 96% ethanol solution plus 1% HCl solvent to pH (1, 1.5, 2, and 2.5) which was carried out for 24 hours. The results showed that black rice yeast can be used as a good source of antioxidants, because it contains 20 high levels of phytochemical and anthocyanin derivatives. The total content of black rice yeast anthocyanin at various pH 1 was 60.132 mg / 100g, pH 1.5 127.045 mg / 100g, pH 2 47.566 mg / 100g, and pH 2.5 29.790 mg / 100g. Anthocyanin compounds work optimally in acidic solvents at pH 1.5, so it can be concluded that pH can affect the stability of anthocyanin pigments.

Key Words : *Yeast black rice, anthocyanins, phytochemicals, pH differential.*

PENDAHULUAN

Beras merupakan komoditas pangan sereal yang digunakan sebagai bahan makanan pokok utama bagi sebagian besar penduduk Indonesia, utamanya beras putih dan sisanya beras berpigmen. Pigmen yang diproduksi beras disebabkan oleh senyawa bioaktif yang terkandung di dalamnya. Tingginya resiko

penyakit kronis dapat dihambat dengan mengonsumsi makanan sehat dengan memilih varietas beras berpigmen yang mempunyai kandungan senyawa fungsional yang baik, misalnya beras hitam [1].

Beras hitam (*Oryza sativa L. Indica*) memiliki kandungan gizi yang tinggi dengan kandungan 7,16% protein, 58,31% karbohidrat,

28,46% serat kasar, 4,23% kadar air, 1,59% kadar abu, dan sebanyak 0,25% lemak [2]. Beras hitam mempunyai efek positif bagi kesehatan karena mengandung komponen bioaktif yang berperan sebagai antioksidan meliputi senyawa flavonoid, fenolik, antosianin, proantosianidin, asam fitat, tokotrienol, dan tokoferol [3]. Keberadaan pigmen antosianin, fitokimia dan fenolik pada beras hitam banyak ditemukan pada bagian aleuron dan endospermia [4].

Kandungan pigmen atau zat warna pada beras hitam disebabkan oleh adanya senyawa antosianin dan proantosianidin. Jenis kandungan antosianin dalam beras hitam adalah *peonidin-3-glucoside* dan *cyanidin-3-glucoside* [5]. Senyawa antosianin pada bentuk glikon diikat secara glikosidik sebagai gula dan pada bentuk aglikon sebagai antosianidin [6]. Kandungan antosianin pada beras hitam lebih tinggi dibandingkan pada beras merah, yaitu berkisar antara 19,4–140,8 µg/100g, sedangkan pada beras merah hanya 0,3–1,4 µg/100g [7] [8]. Antosianin tergolong kedalam senyawa flavonoid yang larut dengan baik pada pelarut polar, seperti air dan etanol.

Antosianin memiliki kandungan antioksidan yang dapat mencegah berbagai masalah kesehatan yang berperan dalam meredam radikal bebas yang berlebih [9]. Antosianin juga terbukti dapat menghambat penyakit stress oksidatif, memperlambat pertumbuhan dan penyebaran sel kanker, kardiovaskular, komplikasi diabetes serta penyakit degeneratif lainnya [5]. Aktivitas antidiabetik yang dimiliki antosianin dapat merangsang sekresi insulin dari sel pankreas serta menekan kadar glukosa darah dan trigliserida [10].

Salah satu produk diversifikasi berbahan dasar beras hitam yang dapat dikembangkan adalah fermentasi menggunakan ragi roti (*bakery's yeast*). *Yeast* merupakan jenis khamir atau jamur uniseluler, salah satu jamur yang terkandung adalah *Saccharomyces cerevisiae*. Ekstrak *yeast* mengandung peptida, asam amino, karbohidrat, dan garam yang berasal dari sel *yeast* yang dapat larut dalam air [11]. *Indian standarts Institution* berspesifikasi bahwa ekstrak *yeast* dapat berfungsi sebagai sumber nitrogen yang digunakan sebagai suplemen nutrisi dalam medium mikrobiologi.

Yeast beras hitam dibuat secara enzimatis dengan penambahan enzim α -amilase dan glukoamilase untuk menghidrolisis amilum. Pati

amilase dihidrolisis menjadi penyusun yang lebih sederhana seperti isomaltosa, maltosa, dekstrin, dan glukosa. Selanjutnya dihidrolisis oleh enzim glukoamilase untuk menghasilkan glukosa yang digunakan untuk pertumbuhan jamur [12].

Pengaruh proses fermentasi mengakibatkan *yeast* beras hitam memiliki pH yang rendah. pH rendah (keadaan asam) baik digunakan dalam mengidentifikasi kandungan antosianin dalam bentuk kation flavilium berwarna merah-oranye. Penentuan kandungan antosianin dilakukan menggunakan metode pH differensial yang didasarkan pada perubahan struktur antosianin yang kromofor antara pH 1 dan pH 4,5. Pada pH 1, antosianin berada pada bentuk kation flavilium atau oxonium berwarna. Sedangkan pada pH 4,5, antosianin berada pada bentuk karbinol atau hemiketal tak berwarna. Prinsip tersebut menghasilkan pengukuran total kandungan antosianin cukup akurat dan tepat [13].

Yeast beras hitam dapat berpotensi sebagai senyawa aktif dalam pembuatan obat antidiabetes [14]. Namun, aktivitasnya sebagai antioksidan yang berkaitan dengan senyawa antosianin belum pernah diteliti, maka diperlukan juga untuk mengidentifikasi kandungan fitokimia yang meliputi senyawa flavonoid, fenolik, steroid, terpenoid yang juga memiliki aktivitas antioksidan. Sehingga pada studi penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi kandungan fitokimia dengan Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) serta mengetahui kestabilan kandungan antosianin dari berbagai pH asam menggunakan metode pH differensial pada ekstrak *yeast* beras hitam.

METODE PENELITIAN

Alat

Beberapa alat yang digunakan adalah peralatan gelas, lap, pH meter, kertas saring, plastik wrap, corong buchner, ayakan 100 mesh, blender, inkubator (Memmert), *sentrifuge* (Hettich), mikropipet, *blue tip*, *rotary evaporator* (Buchi B-491), *freeze dryer* (Buchi), *vacuum pump* (Gast DOA-P-504-BN), magnetik *stirrer* (Dlab), neraca analitik (Adventurer ohaus), LC-MS (Shimadzu LCMS-8040), spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu UV-1800).

Bahan

Beberapa bahan yang digunakan adalah 25 gram tepung beras hitam, 250 mL aquademin, aquades, enzim glukoamilase, enzim α -amilase, 10 gram ragi roti (*bakery's yeast*), 1 Liter etanol

96%, 100 mL etanol p.a, 5 mL HCl pekat, 1,49 gram KCl, 8,2 gram Natrium asetat, 250 mL HCl 1%.

PROSEDUR PENELITIAN

Identifikasi senyawa fitokimia dengan *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS) menggunakan pelarut etanol 96%. Penentuan kandungan total antosianin dan λ maksimum dilakukan dengan metode pH differensial pada pH 1 dan 4,5, menggunakan pelarut etanol 96% yang sudah diasamkan dengan HCl 1%. Berikut penjelasan prosedur penelitian ini :

a. Pembuatan media fermentasi tepung beras hitam

Beras hitam sebanyak 50 gram dicuci dengan 500 mL air dan dikeringkan selama 7 jam, kemudian dihaluskan dengan blender dan disaring lolos ayakan 100 *mesh*, menghasilkan tepung beras hitam yang halus.

b. Fermentasi yeast dari tepung beras hitam

25 gram tepung beras hitam ditambahkan 250 mL aquademin pada suhu 100°C dan didiamkan hingga dingin, lalu ditambahkan 5 gram enzim α -amilase dan enzim glukamilase, dilakukan inkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya, ditambahkan 10 gram ragi roti (*bakers's yeast*) dan difermentasi pada suhu 27°C selama 10 hari secara anaerob. Setelah itu, *yeast* beras hitam di *freeze dry* sampai kering dan siap untuk dimaserasi.

c. Preparasi sampel

Yeast beras hitam di maserasi menggunakan pelarut etanol 96% pada suhu ruang ($\pm 25^\circ\text{C}$) selama 3 hari dalam 24 jam, setelah itu filtrat diuapkan dengan alat *rotary evaporator*, diperoleh ekstrak kental.

d. Identifikasi senyawa fitokimia dengan LC-MS

Identifikasi senyawa fitokimia menggunakan *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS). 0,5 gram ekstrak etanol *yeast* beras hitam dilarutkan kedalam 50 mL etanol p.a. Larutan kemudian disaring menggunakan filter syringe 0,22 mikron, setelah itu sebanyak 1 μL diinjeksikan ke sistem LC-MS.

e. Ekstraksi antosianin yeast beras hitam

Yeast beras hitam dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% yang sudah diasamkan dengan HCl 1% pada pH (1, 1,5, 2,

dan 2,5), kemudian diaduk dengan *stirrer* berkecepatan 500 rpm selama 30 menit. Setelah itu didiamkan pada suhu 25°C selama 24 jam. Filtrat dari hasil penyaringan diuapkan dengan alat *rotary evaporator*, diperoleh ekstrak kental.

f. Penentuan λ maksimum ekstrak

λ maksimum ekstrak dihitung menggunakan spektrometri UV-Vis. 1 mL ekstrak dilarutkan kedalam 5 mL etanol, setelah itu nilai absorbansi dihitung pada rentang panjang gelombang 400-800 nm.

g. Perhitungan kandungan total antosianin dengan metode pH differensial

Ekstrak yeast beras hitam sebanyak 25 mg diencerkan dengan 5,0 mL etanol yang sudah diasamkan hingga pH 1,0. Larutan ekstrak sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam 2 vial, masing-masing ditambahkan 5 mL *buffer* KCl pH 1,0 dan 5 mL *buffer* Na-asetat pH 4,5. Kemudian dikocok hingga larut dan dilakukan *operating time* selama 30 menit–1 jam. Setelah itu, dihitung nilai absorbansi pada panjang gelombang maksimum dan 700 nm [7]. Pengukuran dilakukan dua kali pengulangan uji (*duplo*).

Perhitungan nilai absorbansi larutan sampel (A) sebagai berikut [15] :

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

Kandungan total antosianin (mg/100g) :

$$\frac{A \times MW \times DF \times V \times 100}{\epsilon \times I \times W}$$

Keterangan :

A = Nilai absorbansi sampel

MW = Berat molekul sianidin-3-glukosida (449,2 g/mol)

DF = Faktor pengenceran

V = Volume larutan induk

W = Berat ekstrak (g)

100 = Faktor konversi perhitungan dalam mg/100g sampel

ϵ = Absortivitas molar Sianidin-3-glukosida = 26.900 L/(mol.cm)

I = Lebar kuvet = 1 cm

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan tepung beras hitam sebagai media fermentasi melewati beberapa tahap

preparasi, meliputi tahap pencucian, pengeringan, penghalusan, dan pengayakan dengan lolos ayakan 100 mesh. Setelah itu dilakukan pembuatan *yeast* beras hitam.

Fermentasi dilakukan setelah melewati proses gelatinisasi. Gelatinisasi merupakan proses transisi fisik yang bersifat endotermis, keteraturan dari molekuler granula dirusak sehingga mengakibatkan terjadinya proses pembengkakan dan terlarutnya pati [15]. Tahap gelatinisasi tepung beras hitam dilakukan dengan menambahkan 250 mL aquademin mendidih bersuhu 100°C pada 25 gram tepung beras hitam dan menghasilkan tekstur kental seperti bubur. Amilum merupakan senyawa kompleks yang tidak dapat langsung digunakan sebagai media pertumbuhan, senyawa tersebut harus dihidrolis terlebih dahulu menjadi senyawa yang sederhana, seperti glukosa. Penambahan 5 gram enzim α -amilase dan enzim glukamilase berperan sebagai katalis dalam hidrolisis pati amilum menjadi glukosa. Hasilnya bubur beras hitam kembali mencair, pada proses tersebut menunjukkan hidrolisis pati telah terbentuk, selanjutnya akan dilakukan proses fermentasi.

Adonan sampel didinginkan pada suhu ruang kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya, ditambahkan sebanyak 10 gram ragi roti (*bakery's yeast*) dan difermentasi secara anaerob pada suhu 27°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) selama 10 hari, proses tersebut bertujuan untuk mengembangbiakkan *yeast* agar dapat menyesuaikan dengan keadaan lingkungannya. Ragi roti mengandung jamur *Saccharomyces cerevisiae* yang dapat berkembang pada media yang kaya akan pati juga dapat bertahan terhadap

alkohol yang dihasilkan [17]. Hasil dari proses fermentasi menghasilkan banyak busa yang menunjukkan proses hidrolisis bereaksi dengan baik [17]. *Yeast* beras hitam kemudian di *freeze dryer* hingga kering.

Metode ekstraksi senyawa fitokimia yang digunakan adalah maserasi. Metode maserasi bertujuan untuk mengambil komponen bioaktif yang terkandung dalam *yeast* beras hitam dengan cara pelarut etanol akan menembus membran sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, sehingga akan terjadi pembengkakan. Senyawa golongan fitokimia memiliki tingkat kepolaran yang sama dengan etanol, yaitu bersifat polar. Senyawa bersifat polar dapat larut dengan baik dalam pelarut polar atau biasanya dikenal dengan istilah *like dissolve like*. Digunakan pelarut etanol karena mampu menarik lebih banyak senyawa daripada metanol dan air [18].

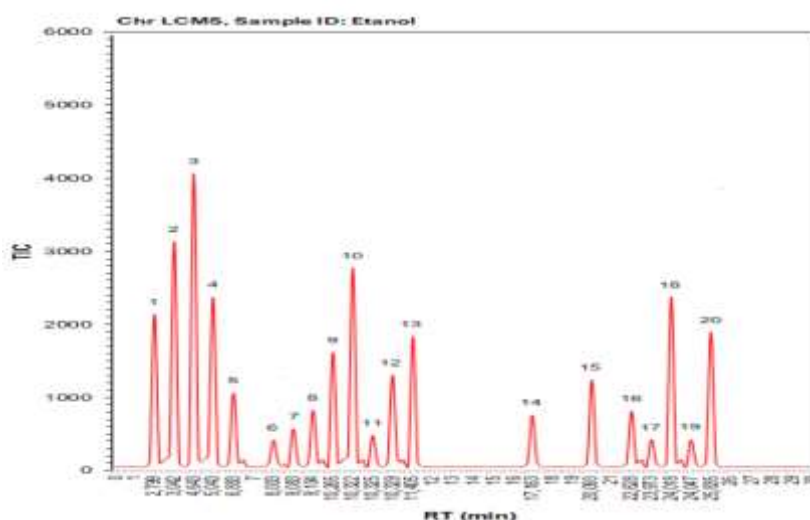
Senyawa fitokimia pada *yeast* beras hitam diidentifikasi menggunakan *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry* (LC–MS) yang merupakan metode analisis kualitatif dengan memanfaatkan gabungan prinsip kerja dari metode pemisahan fisik menggunakan kromatografi cair dan kemampuan analisis menggunakan metode spektrometer massa [19]. Metode LC–MS sangat efisiensi karena hanya memerlukan sedikit sampel analisis dan mampu mengetahui berbagai senyawa dalam rentang yang luas dan memiliki kepekaan yang tinggi.

Identifikasi senyawa Fitokimia dari ekstrak etanol *yeast* beras hitam ditentukan bersamaan dengan waktu retensi (tR), presentase area (%area), berat molekul (m/z) dan jenis senyawa. Hasil identifikasi senyawa fitokimia dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan Senyawa Fitokimia *Yeast* Beras Hitam

tR (min)	% Area	m/z	Senyawa
2,799	1,60525	168,0423	Vanilic acid
3,042	2,35041	170,0215	Gallic acid
4,643	3,04504	180,0423	Caffeic acid
5,043	1,77871	194,0579	Ferulic acid
6,883	0,79505	220,1827	Spathulenol
8,003	0,31168	254,0579	Chrysin
9,083	0,43011	268,0372	Coumestrol
9,104	0,61729	268,0736	3-hydroxy-4-methoxyflavone
10,265	1,21384	286,0477	Luteolin
10,322	2,08082	286,0477	Kaempferol
10,325	0,35989	286,0477	Fisetin
10,329	0,97913	286,0477	Scutellarein
11,405	1,37667	302,0427	Morin

17,163	0,56705	414,3862	β -sitosterol
20,093	0,92718	432,1056	Apigenin-7-glucoside
22,628	0,60871	448,1006	Luteolin 7 glucoside
23,973	0,31702	462,3345	Dolichosterone
24,018	1,77871	464,0955	Isoquercitrin
24,047	0,31361	464,3502	Castasterone
25,835	1,42049	478,0747	Quercituron
Keterangan :			
 : Asam fenolik	 : Flavonoid	 : Terpenoid	 : Steroid

Gambar 1. Kromatogram LC-MS Ekstrak Etanol 96% *Yeast* Beras Hitam

Data di atas menunjukkan *yeast* beras hitam positif mengandung senyawa flavonoid, fenolik, terpenoid, dan steroid. Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian Ramadhan (2016) [20], bahwa pada beberapa waktu retensi diatas memang ditemukan senyawa turunan dari flavonoid, fenolik, steroid dan terpenoid.

Terdapat 5 jenis turunan senyawa fenolik, yaitu vanillic acid (1,60%) yang terekspresi pada menit ke 2,799, gallic acid (2,35%) pada menit ke 3,042, caffeic acid (3,04%) pada menit ke 4,643, ferulic acid (1,77%) pada menit ke 5,043 dan β -sitosterol (0,56%) pada menit ke 17,163. Terdapat 12 jenis turunan senyawa flavonoid, yaitu chrysin (0,31%) yang terekspresi pada menit ke 8,003, coumestrol (0,43%) pada menit ke 9,083, 3-hydroxy-4-methoxyflavone (0,61%) pada menit ke 9,104, luteolin (1,21%) pada menit ke 10,265, kaempferol (2,08%) pada menit ke 10,322, fisetin (0,36%) pada menit ke 10,325, scutellarein (0,97%) pada menit ke 10,329, morin (1,37%) pada menit ke 11,405, apigenin-7-glucoside (0,92%) pada menit ke 20,093, luteolin-7-glucoside (0,60%) pada menit ke 22,628, isoquercitrin (1,77%) pada menit ke 24,018, dan quercituron (1,42%) pada menit ke 25,835.

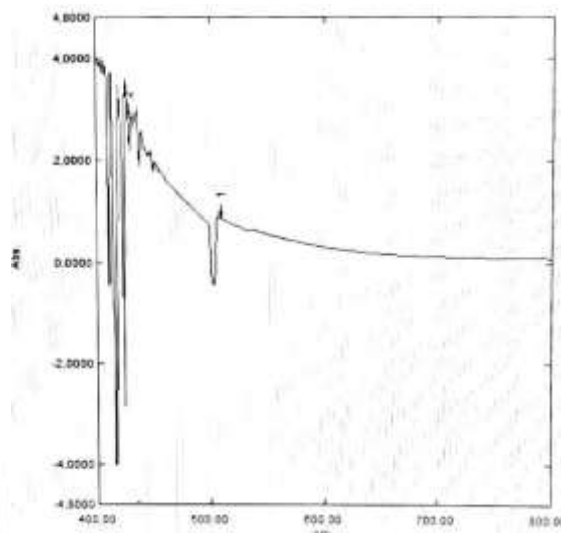
Terdapat 1 jenis turunan terpenoid yaitu spathulenol (0,79%) terekspresi pada menit ke 6,883. Serta terdapat 2 jenis turunan steroid yaitu dolichosterone (0,31%) yang terekspresi pada menit ke 23,973 dan castasterone (0,31%) pada menit ke 24,047). Berdasarkan hasil tersebut konsentrasi senyawa aktif paling terendah adalah chrysin yang merupakan turunan senyawa flavonoid dan konsentrasi tertinggi adalah caffeic acid yang merupakan turunan senyawa fenolik.

Adanya senyawa turunan flavonoid yaitu luteolin menunjukkan bahwa senyawa tersebut juga merupakan senyawa turunan aglikon antosianidin dari antosianin. Antosianin merupakan senyawa turunan flavonoid sub-kelompok senyawa polifenol yang paling mudah teroksidasi [4], dimana pada bentuk glikon diikat secara glikosidik sebagai gula dan pada bentuk aglikon sebagai antosianidin [6]. Luteolin memiliki struktur yang sama dengan aglikon antosianidin pada bentuk Luteolinidin yaitu 5,7,3',4'-OH [21]. Antosianin merupakan senyawa yang mudah terdegradasi [22]. Pengaruh adanya senyawa quercetin yang merupakan turunan dari flavonoid dapat mempengaruhi stabilitas warna antosianin, dimana akan terjadi

kopigmentasi antara antosianin dengan quarcetin yang diiringi dengan pergeseran batokromik [23][24]. Quarcetin merupakan pigmen tanaman yang mengandung senyawa antioksidan yang hampir sama dengan senyawa antosianin[23].

Senyawa antosianin diekstraksi menggunakan pelarut etanol yang diasamkan dengan HCl 1% pada pH 1, pH 1,5, pH 2, dan pH 2,5. Senyawa antosianin sangat stabil pada pH rendah (keadaan asam) jika dibandingkan dengan larutan netral atau alkali, sehingga perlu diberi penambahan larutan HCl 1% yang merupakan larutan pengasam paling efektif. Keadaan yang asam dapat mengakibatkan banyaknya dinding sel vakuola yang pecah, akibat adanya proses denaturasi pada membran sel tanaman, sehingga pigmen antosianin semakin banyak yang keluar dari sel dan terlarut dengan baik [25]. Keadaan yang semakin asam juga akan menyebabkan tingginya kandungan total antosianin yang ditunjukkan dengan nilai absorbansi yang tinggi [26].

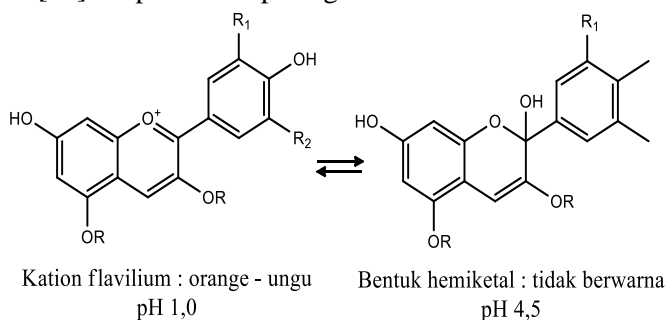
Panjang gelombang maksimum antosianin secara teoritis yaitu pada rentang panjang gelombang 505-545 nm [27]. Pada penelitian ini didapatkan panjang gelombang maksimum pada 509 nm yang merupakan panjang gelombang dari senyawa antosianin jenis sianidin-3-glukosidase, dimana pada panjang gelombang tersebut dapat mengidentifikasi kandungan senyawa antosianin secara optimum dalam bentuk kation flavilium, karena serapan cahaya tampak berada dalam rentang warna merah-oranye [28]. Panjang gelombang 700 nm digunakan untuk mengoreksi adanya kekeruhan atau kontaminan lain yang masih berada dalam sampel dan juga sebagai pengontrol uji apakah sudah dilakukan dengan benar. Pengukuran kandungan total antosianin yang memberikan nilai absorbansi 0 menunjukkan bahwa sampel benar-benar jernih [29]. Hasil pengukuran nilai absorbansi pada panjang gelombang 700 nm dari penelitian ini tidak memberikan nilai absorbansi 0, hal tersebut dikarenakan sampel masih keruh atau terdapat partikel-partikel pengotor lain dan juga dimungkinkan masih terdapat pati dari beras hitam yang belum terlarut dengan sempurna sehingga diperlukan proses penyaringan kembali [30]. Hasil spektrum UV-Vis pada pengukuran panjang gelombang maksimum antosianin dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Spektrum UV-Vis.

Salah satu faktor yang mempengaruhi kandungan antosianin adalah perubahan pH, konsentrasi pigmen, jumlah gugus hidroksi dan metoksi serta adanya campuran dengan senyawa-senyawa lain. Pigmen antosianin berwarna merah disebabkan oleh sifat larutan yang asam ($\text{pH} < 7$), dan gugus metoksi yang lebih dominan sehingga relatif lebih stabil. Sedangkan pigmen antosianin yang berwarna biru disebabkan oleh sifat larutan yang basa ($\text{pH} > 7$), dan gugus hidroksi yang lebih dominan yang menyebabkan relatif tidak stabil. Antosianin mudah terdegradasi selang kenaikan pH dan suhu [22].

Perhitungan kandungan total antosianin menggunakan metode pH differensial spektrofotometri didasarkan pada perbedaan absorbansi sinar tampak dari pH 1,0 dan 4,5, seiring dengan berubahnya pH, maka antosianin mudah mengalami perubahan warna secara *reversible*. Pada pH 1 antosianin berbentuk kation flavilium berwarna merah, sedangkan pH 4,5 antosianin berbentuk hemiketal tidak berwarna [15]. Dapat dilihat pada gambar 3.

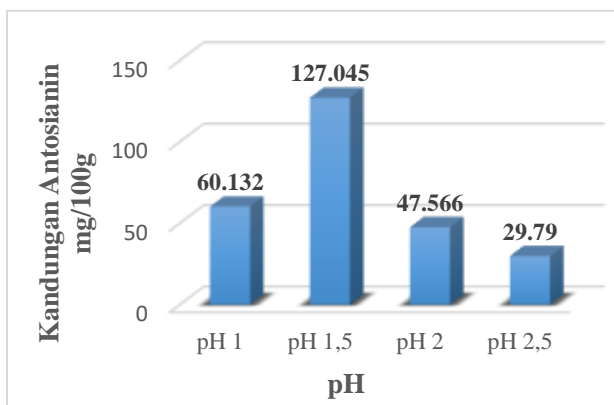


Gambar 3. Struktur Kation Flavilium dan Bentuk Hemiketal

Berdasarkan metode pH differensial dengan dua kali pengulangan uji (*duplo*), didapatkan rata-rata kandungan total antosianin yang dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata Kandungan Total Antosianin *Yeast* Beras Hitam

Pelarut	pH 1	pH 1,5	pH 2	pH 2,5
Etanol	60,132	127,045	47,566	29,790
+ HCl 1%	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g	mg/100g g



Gambar 4. Kandungan Total Antosianin *Yeast* Beras Hitam pada pH 1 – pH 2,5 dengan Pelarut Etanol+HCl 1%

Pada tabel 2 dan gambar 4 dapat diketahui bahwa senyawa antosianin paling efektif dalam larutan asam pada pH 1,5, dikarenakan kandungan total antosianin pada pH 1,5 lebih tinggi dibandingkan dengan larutan pH lainnya. Hasil dari penelitian ini didukung oleh penelitian Pratiwi & Priyani (2019) [31] yang juga mengatakan antosianin lebih optimum pada pH 1,5. Kondisi yang semakin asam mendekati pH 1 menyebabkan pigmen antosianin pada bentuk kation flavilium atau oksonium berwarna semakin banyak dan besarnya pengukuran nilai absorbansi menunjukkan jumlah kandungan antosianin yang tinggi [13]. Keadaan yang semakin asam juga dapat memecah banyaknya dinding sel vakuola akibat adanya proses denaturasi pada membran sel tanaman, sehingga pigmen antosianin semakin banyak yang keluar dari sel dan terlarut dengan baik [25]. Pelarut yang melebihi nilai kesetimbangan antara senyawa antosianin dengan pelarut pH 1 atau lebih rendah akan memberikan nilai absorbansi yang kecil dikarenakan senyawa antosianin telah terdegradasi. Peningkatan pH

juga berdampak pada kandungan antosianin yang semakin kecil, seperti hasil pada pelarut pH 2 dan pH 2,5. Stabilitas kandungan total antosianin dipengaruhi oleh banyak faktor seperti, perubahan pH, suhu, proses preparasi sampel, kondisi serta masa penyimpanan sampel yang terlalu lama sehingga mengakibatkan senyawa antosianin dapat terdegradasi [32].

KESIMPULAN

Yeast beras hitam dapat dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan yang baik, dikarenakan mengandung 20 senyawa turunan fitokimia dan antosianin yang tinggi. Senyawa antosianin bekerja dengan baik dalam larutan asam yaitu pada pH 1,5. Hasil kandungan total antosianin tertinggi pada pH 1,5 sebesar 127,045 mg/100 g, pada pH 1 sebesar 60,132 mg/100g, pH 2 sebesar 47,566 mg/100g dan pH 2,5 sebesar 29,79 mg/100g.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] 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. *Chemico-Biological Interactions*, 218-229.
- [2] Nurhidajah, Ulvie, Y., & Suyanto, A. 2018. Karakteristik Fisik dan Kimia Beras Hitam dengan Variasi Metode Pengolahan. *Prosiding Seminar Nasional Unimus*, 1, 216-221.
- [3] Goufo, P., & Trindade, H. 2013. Rice Antioxidants: Phenolic Acids, Flavonoids, Anthocyanins, Proanthocyanidins, Tocopherols, Tocotrienols, γ -Oryzanol, and Phytic Acid. *Food Science & Nutrition*, 2 (2), 75-104.
- [4] Wanti, S., Andriani, M., & Parnanto, N. 2015. Pengaruh Berbagai Jenis Beras Terhadap Aktivitas Antioksidan pada Angkak oleh *Monascus purpureus*. *Biofarmasi*, 13 (1), 1-5.
- [5] Walter, M., & Marchesan, E. 2011. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Rice. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54 (2), 371-377.
- [6] Lao, F. Giusti, M. 2016. Quantification of Purple Corn (*Zea mays L.*) Anthocyanins Using Spectrophotometric and HPLC Approaches: Method Comparison and Correlation. *Food Anal. Methods*, 9, 1367-1380.

- [7] 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 Chemistry* 124, 132-140.
- [8] Pengkumsri, N., Chaiyasut, C., Saenjum, C., Sirilun, S., Peerajan, S., Suwannalert, P., . . . Sivamaruthi, B. 2015. Physicochemical and Antioxidative Properties of Black, Brown and Red Rice Varieties of North Thailand. *Food Sci*, 35(2), 331-338.
- [9] Hosoda, K., Sasahara, H., Matsushita, K., Tamura, Y., Miyaji, M., & Matsuyama, H. 2018. Anthocyanin and Proanthocyanidin Contents, Antioxidant Activity and *in situ* Degradability of Black and Red Rice Grains. *Asian-Australas Journal of Animal Sciences*, 31 (8), 1213-1220.
- [10] Daeli, E., Ardiaria, M., & Candra, A. 2018. Pengaruh Pemberian Nasi Beras Merah (*Oryza nivara*) dan Nasi Beras Hitam (*Oryza sativa L.indica*) terhadap Perubahan Kadar Gula Darah dan Trigliserida Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Diabetes Melitus Tipe 2. *JNH(Journal of Nutrition and Health)*, 6 (2), 42-56.
- [11] Milic, T., Rakin, V., & Slavica S.M., M. 2007. Utilization of Baker's Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) for the Production of Yeast Extract : Effect of Different Enzymatic Treatment on Solid, Protein and Carbohydrate Recovery. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72 (5), 451-457.
- [12] Agustini, R., Sanjaya, I., & Lupita. 2018. Characterization of Yeast Hydrolysate Enzymatic (YHE) from Yeast Fermented in the Variation of Rice Flour. *International Conference of Chemistry (ICCHEM)*, 1-8.
- [13] Vankar, P.S., Srivastava, J. 2010. Evaluation of Anthocyanin Content in Red and Blue Flowers. *International Journal of Food Engineering*. Vol. 6 (4), 1-11.
- [14] Agustini, R., Sanjaya, I.G.M., Lupita. 2018. Characterization of Yeast Hydrolysate Enzymatic (YHE) from Yeast Fermented in The Variation of Rice Flour. *Journa of Physics : Conference Series*. 1-8.
- [15] Giusti, M., & Worlsted, R. 2001. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Vis Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical*, F1.2.1 - F1.2.13.
- [16] Shamekh, S. 2002. Effects of Lipids, Heating and Enzymatic Treatments on Starches. *Technical Research Center of Finland*, 44 p. +app. 33 p.
- [17] Gao, z., Song, N., Zhang, Y., Schwab, Y., He, J., Li, X. 2018. Carbon Nanotubes Derived from Yeast-Fermented Wheat Flour and Their Energy Storage Application. *ACS Sustainable Chemistry Engineering*, 6, 11386-11396.
- [19] Julia P, C., Yanping, X., Hong, C., Min-Hsiung Pan, Chi-Tang Ho, Rodolfo Juliani, . . . Qingli Wu. 2013. Determination of Flavonoids by LC/MS and Anti-inflammatory Activity in *Moringa oleifera*. *Journal of Functional Food*, 1892-1899.
- [20] Ramadhan, R. 2016. *Aktivitas Antioksidan dan Potensi Obat Oral Senyawa Nanopartikel Ekstrak Pegagan (Centella asiatica) Tersulut Kitosan Berdasarkan Hasil Analisis LC-MS*. Skripsi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- [21] Markham, K.R., 1988. Cara Mengidentifikasi Flavonoid, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, 15. Bandung : Penerbit ITB.
- [22] Alvionita, J., Darwis, D., & Efdi, M. 2016. Ekstraksi dan Identifikasi Senyawa Antosianin dari Jantung Pisang Raja (*Musa X paradisiaca L.*) serta Uji Aktivitas Antioksidannya. *J. Ris. Kim.*, 9 (2), 21-28.
- [23] Lestario, L.N., Andini, S., 2016. Kopigmentasi Kuersetin Apel (*Pyrus malus*) terhadap Stabilitas Warna Ekstrak Buah Duwet (*Syzygium cumini*). *Prosiding Konser Karya Ilmiah*, Vol.2, 37-42.
- [24] Asen, S., Stewart, R.N., Norris, K.H., 1970. Co-pigmentation Effect of Quercetin Glycosides on Absorption Characteristics of Cyanidin Glycosides Colour of Red Wing Azalea. *Phytochemistry*, 10. 171-175.
- [25] Fennema, O. 1996. *Food Chemistry 3rd ed*. New York: Marcel Dekker, Inc .
- [26] Gao, L., & Mazza, G. 1996. Extraction of Anthocyanin Pigments from Purple Sunflower Hulls. *Journal Of Food Science*, 61, No. 3, 600-603.
- [27] Harborne J.B. 1987. Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan. *Terbitan Kedua ITB*.

- [28] Farahmandazad, H. 2015. *Recovery and Purification of Anthocyanins from Purple-Blue Potato*. Thesis. Lappeenranta: Lappeenranta University of Technology.
- [29] Suzery, M., Lestari, S., & Cahyano, B. 2010. Penentuan Total Antosianin dari Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dengan Metode Maserasi dan Soxhletasi. *Jurnal Sains dan Matematika (JSM)*, 18 (1), 1-6.
- [30] Anggraeni, V.J., Ramdanawati, L., Ayuantika, W. 2018. Penetapan Kadar Antosianin Total Beras Merah (*Oryza nivara*). *Jurnal Kartika Kimia*, 1 (1), 11-16.
- [31] Pratiwi, S.W., Priyani, A.A.. 2019. Pengaruh Pelarut Dalam Berbagai Ph Pada Penentuan Kadar Total Antosianin dari Ubi Jalar Ungu dengan Metode pH Diferensial Spektrofotometri. *Educhemia*, Vol. 4 (1), 89-96.
- [32] Suhartatik, N., Cahyanto, M., Raharjo, S., & Rahayu, E. 2013. Antioxidant Activity of Black Sticky Rice During Fermentation. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, XXIV (1), 110-115.

