

Studi Kopigmentasi Antosianin Beras Hitam (*Oryza sativa* L. *indica*) Dengan Polifenol Kacang Kedelai (*Glycine max* L.)

Aprilya Kumala Shary^{a, 1}, Kintoko^{a, 2*}, Wahyu Widyaningsih^{a, 3}, Hari Susanti^{a, 4}, Rizky Gustinanda^{b, 5}, Meki Pranata^{c, 6}

^a Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Daerah Istimewa Yogyakarta, 55164, Indonesia

^{b, c} Fakultas Industri Halal, Universitas Nahdlatul Ulama Yogyakarta, Daerah Istimewa Yogyakarta, 55162, Indonesia

¹aprilayakumalashary20@gmail.com, ²kintoko@pharm.uad.ac.id*, ³wahyu.widyaningsih@pharm.uad.ac.id, ⁴susantihari@gmail.com, ⁵

rizky.gustinanda@unu-jogja.ac.id, ⁶meki.pranata@unu-jogja.ac.id

*korespondensi penulis

INFO ARTIKEL	ABSTRAK
Sejarah artikel: Diterima : 20-12-2025 Revisi : 03-01-2026 Disetujui : 05-01-2026 Kata kunci: Antioksidan Antosianin Beras Hitam Kacang Kedelai Kopigmentasi	Antosianin merupakan pigmen alami yang berperan penting sebagai antioksidan namun stabilitasnya relatif rendah terhadap faktor lingkungan seperti cahaya, pH dan suhu. Upaya untuk meningkatkan stabilitas antosianin dapat dilakukan melalui mekanisme kopigmentasi dengan senyawa polifenol. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh kopigmentasi antara antosianin beras hitam (<i>Oryza sativa</i> L. <i>indica</i>) dengan polifenol yang diperoleh dari rebusan kacang kedelai (<i>Glycine max</i> L.) terhadap kestabilan warna dan aktivitas antioksidan. Ekstraksi antosianin dilakukan menggunakan pelarut asam sitrat, sedangkan polifenol kacang kedelai diperoleh melalui ekstraksi maserasi dari rebusan kacang kedelai yang diperkaya senyawa fenolik. Kopigmentasi dilakukan dengan variasi rasio perbandingan 1:1, 1:2 dan 1:3, kemudian dianalisis melalui spektrofotometri UV-Vis untuk menentukan pergeseran λ_{maks}, intensitas warna, serta kestabilan pigmen. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan polifenol kacang kedelai mampu meningkatkan intensitas warna pada antosianin beras hitam. Selain itu, aktivitas antioksidan menunjukkan peningkatan dibandingkan antosianin tunggal, menandakan adanya sinergi antara kedua senyawa bioaktif. Dengan demikian, kopigmentasi antosianin beras hitam dengan polifenol kacang kedelai berpotensi meningkatkan kestabilan pigmen alami, dengan rasio 1:1 menunjukkan keseimbangan terbaik antara stabilitas warna dan aktivitas antioksidan.
Key word: Antioxidants Anthocyanins Black Rice Soybeans Copolymerization	ABSTRACT Anthocyanins are natural pigments that serve as antioxidants but are relatively unstable against environmental factors such as light, pH, and temperature. Efforts to improve anthocyanin stability can be achieved through copigmentation with polyphenolic compounds. This study aims to evaluate the effect of copigmentation between black rice anthocyanins (<i>Oryza sativa</i> L. <i>indica</i>) and polyphenols derived from boiled soybeans (<i>Glycine max</i> L.) on color stability and antioxidant activity. Anthocyanins were extracted using a citric acid solvent, while soybean polyphenols were obtained via maceration extraction from soybean decoction enriched with phenolic compounds. Copigmentation was performed with specific ratio 1:1, 1:2 and 1:3, and analyzed through UV-Vis spectrophotometry to determine λ_{max} shift, color intensity, and pigment stability. Results showed that adding soybean polyphenols increased the color intensity of black rice anthocyanins. Additionally, antioxidant activity increased compared to single anthocyanins, indicating synergy between the two bioactive compounds. Therefore, copigmentation of black rice anthocyanins with soybean polyphenols has the potential to improve the stability of natural pigments, with a 1:1 ratio showing the best balance between color stability and antioxidant activity. This is an open access article under the CC-BY-SA license. 

Pendahuluan

Antosianin merupakan kelompok flavonoid berwarna yang banyak ditemukan pada jaringan

perikarp buah dan biji, dan berperan sebagai pigmen alami sekaligus senyawa bioaktif dengan aktivitas antioksidan yang tinggi (Khoo *et al.*, 2017). Antosianin diketahui rentan terhadap degradasi oleh

faktor lingkungan seperti pH, suhu, cahaya, dan oksidasi sehingga membatasi aplikasinya sebagai pewarna alami pada produk pangan dan minuman (Trouillas *et al.*, 2016).

Antosianin adalah salah satu jenis polifenol sekunder dengan aktivitas antioksidan tinggi dapat mengurangi stres oksidatif dan melindungi sel dari kerusakan akibat radikal bebas (Tena, Martín and Asuero, 2020). Beras hitam (*Oryza sativa* L. *indica*) juga dikenal karena kandungan antioksidannya yang tinggi (Abida and Fadhillah, 2022) dan potensinya sebagai sumber pangan fungsional (Arifa, Syamsir and Budijanto, 2021).

Beras hitam (*Oryza sativa* L. *indica*) telah diidentifikasi sebagai salah satu sumber antosianin yang melimpah khususnya senyawa seperti cyanidin-3-glucoside sehingga menarik perhatian untuk pengembangan pangan fungsional dan pewarna alami (Fitriyah *et al.*, 2022) (Das *et al.*, 2023). Kandungan antosianin dan profil fitokimia pada beras hitam juga dipengaruhi varietas dan kondisi budidaya, sehingga banyak studi karakterisasi dan optimasi ekstraksi yang dipublikasikan dalam dekade terakhir (Yamuangmorn and Prom-U-thai, 2021) (Arifa, Syamsir and Budijanto, 2021).

Menurut Salati *et al.*, (2025) untuk meningkatkan stabilitas antosianin, berbagai pendekatan teknis telah diusulkan termasuk pengubahan formulasi, pengikatan kompleks, dan terutama kopigmentasi dengan senyawa polifenolik atau kofaktor lain yang dapat membentuk interaksi non-kovalen (stacking π - π , hidrofobik, atau hidrogen) sehingga menimbulkan efek bathochromic/hyperchromic dan menurunkan laju degradasi pigmen (Trouillas *et al.*, 2016). Penelitian lain menunjukkan bahwa antosianin memiliki keanekaragaman struktural yang memungkinkan aplikasi industri yang luas terutama dalam industri makanan sebagai pewarna alami (Husna, Novita and Rohaya, 2018).

Kopigmentasi antosianin merupakan fenomena yang menarik di mana interaksi antara antosianin dan senyawa lain dapat meningkatkan stabilitas dan bioaktivitasnya. Antosianin yang merupakan pigmen alami yang memberikan warna pada berbagai jenis buah dan sayuran memiliki potensi sebagai pewarna alami dan agen kesehatan. Beras hitam (*Oryza sativa*

L. *indica*) dikenal sebagai sumber antosianin yang kaya dengan kandungan antosianin yang signifikan yang dapat memberikan manfaat kesehatan, termasuk sifat antioksidan dan anti-inflamasi (Sholihah, Aini and Dwiyantri, 2021).

Kedelai (*Glycine max* L.), khususnya varietas hitam, kaya akan berbagai senyawa fenolik termasuk isoflavon (genistein, daidzein), flavonoid, dan polifenol lain yang memiliki aktivitas antioksidan dan kemampuan berinteraksi secara molekular dengan pigmen fenolik (Cunha *et al.*, 2023). Beberapa kajian komprehensif dan review menunjukkan potensi polifenol kedelai untuk aplikasi nutrasetikal dan fungsional; selain itu berbagai metode ekstraksi (termal, pelarut, fraksinasi) telah diadaptasi untuk mendapatkan fraksi kaya polifenol dari kedelai atau rebusan kedelai (Choi *et al.*, 2020) (Kim, 2022).

Kacang kedelai (*Glycine max* L.) adalah komoditas penting di Indonesia karena kandungan proteinnya yang tinggi. Kacang kedelai mengandung polifenol yang berpotensi sebagai minuman isotonik dengan aktivitas antioksidan dan kemampuan menghambat sel kanker (Cahyaning *et al.*, 2022). Kombinasi antosianin dari beras hitam dan polifenol dari kacang kedelai dapat meningkatkan stabilitas warna dan aktivitas antioksidan minuman isotonik (Pertiwi, Hasbullah and Affandi, 2022).

Di Indonesia, sejumlah penelitian karakterisasi kandungan antosianin beras hitam dan kajian kandungan polifenol pada kedelai/kedelai hitam telah dipublikasikan pada jurnal nasional dan prosiding; namun integrasi kedua bahan tersebut dalam skema kopigmentasi untuk aplikasi pangan fungsional masih merupakan area penelitian yang menjanjikan dan relatif belum tuntas. Pendekatan lokal ini relevan karena ketersediaan bahan baku (beras hitam dan kedelai) dan kebutuhan solusi pewarna alami serta produk fungsional yang stabil di iklim tropis (Pratiwi, Widiyanti and Sari, 2024).

Berdasarkan uraian tersebut, studi ini dirancang untuk mengevaluasi efek kopigmentasi antara antosianin beras hitam (*Oryza sativa* L. *indica*) dan polifenol dari kacang kedelai (*Glycine max* L.) terhadap sifat spektrofotometri (pergeseran λ maks, perubahan intensitas warna), stabilitas (termal, pH, penyimpanan) serta aktivitas antioksidan sistem terkopigmentasi (Yudiono, 2023).

Metode

I. Alat dan Bahan

Spektrofotometri UV-Vis (*Shimadzu*), alat vakum/pompa, corong buchner, rotary evaporator (*heidolph*), peralatan gelas (beaker glass, toples kaca, erlenmeyer, labu alas bulat) (*Pyrex®*), waterbath (*Memmert®*), timbangan analitik (*Pyrex®*), aluminium foil (*BestFresh*), kertas saring (*Whatman*), batang pengaduk, cawan porselin, kaca arloji, sudip, sendok tanduk. Beras hitam (*Oryza sativa* L. *indica*) var. Cempo Ireng (Eka Farm Bantul, Yogyakarta). Kacang kedelai (*Glycine max* L.) var. Argomulya (Balitkabi, Malang Jawa Timur). Etanol 96% (*Bratachem*), asam sitrat.

2. Jalannya Penelitian

Ekstraksi beras hitam

Beras hitam diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% ditambahkan asam sitrat 2 g. Sampel direndam dalam pelarut dan diaduk secara berkala selama 24 jam, kemudian disaring untuk memisahkan residu dan filtrat. Filtrat selanjutnya diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60°C dan kecepatan 60 rpm hingga diperoleh ekstrak kental, kemudian diuapkan kembali menggunakan waterbath pada suhu 50°C. Ekstrak disimpan dalam wadah kaca kedap udara (Azman *et al.*, 2022).

Ekstraksi kacang kedelai

Ekstraksi kacang kedelai dilakukan dengan metode maserasi menggunakan tiga jenis pelarut yaitu etanol 90%, etanol 96% dan etanol 70%, dengan perbandingan bahan terhadap pelarut sebesar 1:3. Sampel terlebih dahulu direbus dan dihomogenkan menggunakan blender hingga diperoleh pasta, kemudian dimaserasi menggunakan pelarut sesuai perlakuan. Filtrat yang diperoleh diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 60°C dengan kecepatan 60 rpm hingga diperoleh ekstrak kental, selanjutnya diuapkan kembali menggunakan waterbath pada suhu 50°C dengan pengadukan sesekali. (Azman *et al.*, 2022).

Kopigmentasi

Ekstrak flaviliun antosianin beras hitam dan polifenol kacang kedelai dicampurkan dalam etanol dengan perbandingan 1:1, 1:2 dan 1:3, kemudian dihomogenkan pada kecepatan 500 rpm selama 10 menit dan diinkubasi pada suhu ruang (25 °C) selama 24 jam untuk proses kopigmentasi. Stabilitas kopigmentan dievaluasi berdasarkan stabilitas warna, perubahan pH, dan aktivitas antioksidan selama penyimpanan pada suhu 4 °C, 25 °C, dan 37 °C (Suhartatik and Mustofa, 2018). Hal ini

untuk memastikan bahwa kopigmentasi berhasil meningkatkan stabilitas antosianin dalam kondisi yang berbeda (Courtney, 2012).

Uji aktivitas antioksidan

Aktivitas antioksidan hasil kopigmentasi antosianin beras hitam dan polifenol kacang kedelai ditentukan menggunakan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Larutan DPPH dibuat dengan cara melarutkan 10 mg DPPH ke dalam etanol p.a hingga mencapai volume 250 mL sehingga diperoleh konsentrasi 0,10 mM, kemudian disimpan dalam wadah tertutup yang dilapisi aluminium foil. Sampel kopigmentasi ditimbang sebanyak 10 mg, dilarutkan dalam etanol p.a, dan diencerkan hingga 10 mL sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 0,1%. Dari larutan stok tersebut dibuat seri konsentrasi 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm. Sebagai baku pembanding digunakan vitamin C yang dilarutkan menjadi larutan stok 0,1% dan diencerkan dalam seri konsentrasi 2, 4, 8, 12, dan 18 ppm. Pengujian dilakukan dengan memipet 1 mL larutan sampel dari setiap konsentrasi, kemudian ditambahkan 4 mL larutan DPPH 0,10 mM dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dalam kondisi gelap. Absorbansi campuran diukur pada panjang gelombang maksimum (λ_{max}) 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan etanol sebagai blanko (Prasetyo, Kiromah and Rahayu, 2021). Rumus untuk menghitung % Inhibisi sebagai berikut :

$$\%Inhibisi = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Hasil dan Pembahasan

Beras hitam (*Oryza sativa* L. *indica* var. Cempo Ireng) diketahui kaya akan pigmen antosianin terutama sianidin-3-glukosida dan peonidin-3-glukosida, yang berperan penting sebagai antioksidan alami melalui mekanisme penangkapan radikal bebas dan penghambatan reaksi oksidatif (Meganingtyas and Alauhdin, 2021). Keberadaan gugus hidroksil pada struktur antosianin memungkinkan senyawa ini bersifat reaktif terhadap spesies oksigen reaktif, namun pada saat yang sama menjadikannya rentan terhadap degradasi akibat perubahan pH, suhu, dan paparan cahaya.

Proses ekstraksi antosianin beras hitam pada penelitian ini dilakukan dengan metode maserasi menggunakan kombinasi pelarut etanol 70% dan asam sitrat. Penggunaan etanol dengan konsentrasi menengah diketahui optimal untuk mengekstraksi

senyawa fenolik yang bersifat semi-polar, sedangkan penambahan asam sitrat berfungsi mempertahankan antosianin dalam bentuk flavilium kation yang lebih stabil. Hal ini tercermin dari rendemen ekstrak yang diperoleh sebesar 7,92% dengan kadar antosianin total mencapai 27,386 mg/100 g. Nilai tersebut

menunjukkan efisiensi ekstraksi yang baik dan sebanding dengan hasil penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa kondisi asam mampu meningkatkan stabilitas dan kelarutan antosianin selama proses ekstraksi. Hasil dari uji aktivitas antioksidan beras hitam dapat dilihat pada tabel I.

Tabel I. Hasil Pengukuran % Inhibisi Ekstrak Beras Hitam dan Pengukuran Nilai IC₅₀

Konsentrasi (ppm)	% Inhibisi		
	RI	R2	R3
50	22,584	20,828	19,573
100	26,850	30,489	31,744
150	44,291	43,287	41,907
175	55,708	54,830	53,826
200	69,761	65,000	67,126
Korelasi (r)	0,9624	0,9839	0,9784
Regresi Linear	$y = 0,3150x + 1,3113$	$y = 0,2939x + 3,3033$	$y = 0,3013x + 2,1481$
Nilai IC ₅₀ (µl/mL)	154,567	0,9839	158,818
		$\bar{x}$	157,423
		SD	2,4741
		%CV	1,5716

Aktivitas antioksidan ekstrak beras hitam yang berada pada kategori sedang (IC₅₀ = 157,423 µg/mL) mengindikasikan bahwa kandungan antosianin berkontribusi signifikan terhadap kemampuan antioksidan, meskipun aktivitas tersebut masih dipengaruhi oleh stabilitas senyawa selama proses dan penyimpanan.

Kacang kedelai (*Glycine max* L. var. Argomulya) digunakan sebagai sumber polifenol, khususnya isoflavon seperti genistein dan daidzein yang dikenal memiliki aktivitas antioksidan tinggi. Hasil ekstraksi menunjukkan rendemen sebesar 13,05% dengan kadar polifenol total mencapai

20,374 mg GAE/g. Data ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi etanol mampu meningkatkan jumlah polifenol yang terekstraksi, karena senyawa isoflavon memiliki kelarutan yang baik dalam pelarut organik.

Aktivitas antioksidan ekstrak kacang kedelai tergolong sedang dengan nilai IC₅₀ sebesar 123,899 µg/mL (Tabel 2), yang lebih rendah dibandingkan ekstrak beras hitam. Hal ini menunjukkan bahwa polifenol kedelai memiliki potensi antioksidan yang lebih kuat, sehingga berpotensi berperan sebagai kopigmen dalam meningkatkan stabilitas antosianin.

Tabel 2. Hasil Pengukuran % Inhibisi Ekstrak Kacang Kedelai dan Pengukuran Nilai IC₅₀

Konsentrasi (ppm)	% Inhibisi		
	RI	R2	R3
20	16,370	17,005	17,385
40	32,868	28,299	28,807
80	43,527	37,309	37,817
120	53,680	53,807	51,522
180	62,817	62,563	60,152
Korelasi (r)	0,9585	0,9807	0,9799
Regresi Linear	$y = 0,2705x + 18,048$	$y = 0,2830x + 14,8893$	$y = 0,2618x + 16,0940$
Nilai IC ₅₀ (µl/mL)	118,121	124,067	129,511
		$\bar{x}$	123,899
		SD	5,6968
		%CV	4,5979

Proses kopigmentasi dilakukan dengan mencampurkan ekstrak antosianin beras hitam dan polifenol kacang kedelai pada berbagai rasio (1:1, 1:2, dan 1:3). Kopigmentasi merupakan interaksi non-kovalen antara antosianin dan senyawa kopigmen melalui ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan gaya π - π stacking. Interaksi ini dapat melindungi inti kromofor antosianin dari serangan molekul air dan faktor lingkungan yang merusak, sehingga meningkatkan intensitas dan kestabilan warna. Hasil analisis menunjukkan bahwa kopigmentasi mampu meningkatkan kestabilan warna antosianin, yang ditunjukkan oleh perubahan absorbansi yang lebih stabil selama penyimpanan.

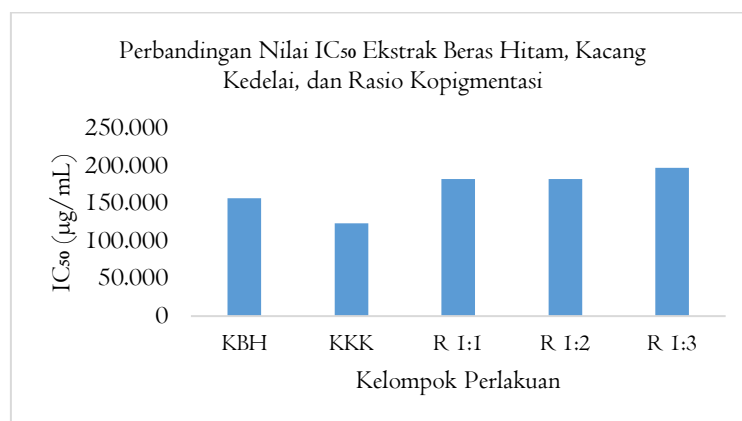
Namun demikian, kadar polifenol total pada hasil kopigmentasi tercatat lebih rendah (10,824 mg GAE/g) dibandingkan ekstrak polifenol kacang

kedelai tunggal. Fenomena ini kemungkinan disebabkan oleh terbentuknya kompleks antosianin-polifenol yang tidak sepenuhnya terdeteksi oleh reagen Folin-Ciocalteu, karena sebagian gugus fenolik terlibat dalam interaksi kompleks sehingga tidak bereaksi optimal. Temuan ini sejalan dengan laporan sebelumnya yang menyatakan bahwa metode *Folin-Ciocalteu* cenderung mengukur polifenol bebas, bukan polifenol yang terikat dalam kompleks.

Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH menunjukkan bahwa seluruh sampel, baik ekstrak tunggal maupun hasil kopigmentasi, berada dalam kategori aktivitas antioksidan sedang. Ekstrak kacang kedelai menunjukkan aktivitas tertinggi, diikuti oleh ekstrak beras hitam.

Tabel 3. Hasil % Inhibisi dan Nilai IC₅₀ Antosianin Beras Hitam yang Dikopigmentasi Polifenol Kacang Kedelai

Kopigmentasi						
Konsentrasi (ppm)	50	100	150	200	250	
Rasio (1:1)	Rep.1	17,833	30,118	43,196	49,933	66,578
	Regresi Linear	IC ₅₀ (μl/mL) = 186,103				
	y = 0,2346x + 6,3401					
	Rep.2	17,040	26,287	39,498	59,048	66,974
	Regresi Linear	IC ₅₀ (μl/mL) = 181,068				
	y = 0,2652x + 1,9807					
Rasio (1:2)	Rep.3	17,305	25,231	39,498	57,463	68,031
	Regresi Linear	IC ₅₀ (μl/mL) = 181,816				
	y = 0,2673x + 1,4004					
		$\bar{x}$	SD	%CV		
		182,995	2,716	1,484		
	Rep.1	16,582	25,569	39,620	55,569	65,696
Rasio (1:3)	Regresi Linear	IC ₅₀ (μl/mL) = 186,666				
	y = 0,2564x + 2,1388					
	Rep.2	17,721	27,088	42,025	55,316	66,962
	Regresi Linear	IC ₅₀ (μl/mL) = 182,283				
	y = 0,2534x + 3,8094					
	Rep.3	17,974	27,468	40,379	55,822	69,113
Rasio (1:3)	Regresi Linear	IC ₅₀ (μl/mL) = 180,085				
	y = 0,2612x + 2,9616					
		$\bar{x}$	SD	%CV		
		183,011	3,350	1,830		
	Rep.1	8,636	23,751	41,295	50,742	62,618
	Regresi Linear	IC ₅₀ (μl/mL) = 196,658				
Rasio (1:3)	y = 0,2699 + (-3,0781)					
	Rep.2	15,924	22,672	36,977	49,527	64,642
	Regresi Linear	IC ₅₀ (μl/mL) = 198,546				
	y = 0,2485x + 0,6611					
	Rep.3	16,599	22,537	37,112	50,067	65,182
	Regresi Linear	IC ₅₀ (μl/mL) = 196,989				
Rasio (1:3)	y = 0,2493x + 0,8906					
		$\bar{x}$	SD	%CV		
		197,397	1,008	0,510		



Gambar 1. Grafik Perbandingan Nilai IC₅₀ Ekstrak Beras Hitam, Kacang Kedelai, dan Rasio Kopigmentasi

Hasil kopigmentasi (Tabel 3) memiliki nilai IC₅₀ pada kisaran 182,995–197,397 µg/mL, yang sedikit lebih tinggi dibandingkan ekstrak tunggal. Penurunan aktivitas ini dapat dikaitkan dengan terbentuknya kompleks antosianin–polifenol yang membatasi ketersediaan gugus hidroksil bebas untuk bereaksi dengan radikal DPPH. Meskipun demikian, aktivitas antioksidan masih berada pada tingkat yang relevan secara biologis.

Rasio kopigmentasi 1:1 menunjukkan nilai IC₅₀ paling rendah dibandingkan rasio lainnya, yang mengindikasikan keseimbangan optimal antara antosianin dan polifenol dalam membentuk kompleks yang stabil tanpa terlalu mengurangi aktivitas antioksidan. Rasio yang lebih tinggi (1:2 dan 1:3) cenderung menurunkan aktivitas antioksidan, kemungkinan akibat kelebihan polifenol yang memperkuat kompleksasi sehingga menurunkan reaktivitas senyawa aktif.

Penurunan aktivitas antioksidan yang diamati setelah kopigmentasi antosianin beras hitam dengan polifenol kedelai sesuai dengan teori kopigmentasi yang menjelaskan pembentukan kompleks non-kovalen melalui interaksi π – π stacking dan ikatan hidrogen antara antosianin dan ko-pigmen. Interaksi ini diketahui dapat meningkatkan stabilitas warna namun sekaligus dapat mengurangi ketersediaan kelompok hidroksil bebas yang diperlukan untuk aktivitas penangkapan radikal (Khare, Jha and Gandhi, 1994). Beberapa studi melaporkan bahwa kopigmentasi dapat menyebabkan hambatan sterik dan fenomena asosiasi diri yang membatasi donasi elektron atau hidrogen ke radikal DPPH dan mengakibatkan nilai IC₅₀ yang lebih tinggi (Castañeda-ovando et al., 2009; He and Giusti, 2010). Selain itu, pada rasio polifenol yang lebih tinggi interaksi kompetitif di antara molekul antioksidan untuk spesies radikal yang sama dapat lebih mengurangi efisiensi

penangkapan radikal menjelaskan peningkatan progresif nilai IC₅₀ yang diamati pada rasio kopigmentasi yang lebih tinggi (Rock and Brunswick, 2005; Kartakoullis et al., 2018). Oleh karena itu, meskipun kopigmentasi meningkatkan stabilitas fisiko-kimia, hal ini tidak selalu berarti peningkatan aktivitas antioksidan (Gambar 1), menyoroti pentingnya mengoptimalkan keseimbangan komposisi tergantung pada aplikasi fungsional yang diinginkan.

Tabel 4. Analisis SPSS Dari Nilai IC₅₀ pada Ekstrak Beras Hitam, Kacang Kedelai dan Kopigmentasi

Sampel	IC ₅₀ (µL/mL)
Ekstrak Beras Hitam	157,423*
Ekstrak Kacang Kedelai	123,899*
Kopigmentasi 1:1	182,995
Kopigmentasi 1:2	183,011
Kopigmentasi 1:3	197,397*

Hasil analisis statistik menggunakan SPSS menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ ekstrak kacang kedelai (123,899 µg/mL*) berbeda signifikan dibandingkan dengan ekstrak beras hitam (157,423 µg/mL*). Perlakuan kopigmentasi pada rasio 1:1 (182,995 µg/mL) dan 1:2 (183,011 µg/mL) tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan satu sama lain ($p > 0,05$), namun keduanya memiliki nilai IC₅₀ yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak tunggal. Kopigmentasi pada rasio 1:3 menunjukkan nilai IC₅₀ tertinggi (197,397 µg/mL*) dan berbeda signifikan dibandingkan perlakuan lainnya ($p < 0,05$), yang mengindikasikan penurunan aktivitas antioksidan yang bermakna pada rasio polifenol tertinggi.

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kopigmentasi antosianin beras hitam dengan polifenol kacang kedelai merupakan strategi yang efektif untuk meningkatkan stabilitas warna pigmen alami, meskipun terdapat sedikit

penurunan aktivitas antioksidan. Temuan ini memiliki implikasi penting dalam pengembangan produk pangan fungsional, khususnya minuman atau produk berbasis pewarna alami yang membutuhkan kestabilan warna selama penyimpanan tanpa menghilangkan manfaat kesehatan.

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan, antara lain penggunaan vitamin C sebagai satu-satunya kontrol positif pada uji aktivitas antioksidan yang meskipun umum digunakan tetapi belum sepenuhnya merepresentasikan mekanisme antioksidan senyawa polifenolik dan antosianin. Selain itu, penelitian ini belum menggunakan senyawa standar spesifik sebagai pembanding, serta evaluasi aktivitas antioksidan masih terbatas pada metode DPPH. Karakterisasi kopigmentasi juga masih didasarkan pada pendekatan spektrofotometri tanpa konfirmasi struktur kompleks secara molekuler, dan pengujian stabilitas belum dilakukan pada sistem pangan nyata atau jangka penyimpanan yang lebih panjang.

Simpulan dan Saran

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstraksi beras hitam (*Oryza sativa* L. *indica*) dengan pelarut etanol 70% dan asam sitrat mampu menghasilkan ekstrak dengan kadar antosianin yang cukup tinggi sebesar 27,386 mg/100g dan aktivitas antioksidan dalam kategori sedang dengan nilai IC_{50} sebesar 157,423 μ l/mL. Sementara itu, ekstraksi kacang kedelai (*Glycine max* L.) menggunakan etanol 96% menghasilkan kadar polifenol total yang lebih tinggi serta aktivitas antioksidan lebih kuat dibandingkan beras hitam. Proses kopigmentasi antara antosianin beras hitam dan polifenol kacang kedelai pada berbagai rasio menghasilkan kompleks yang mampu meningkatkan stabilitas warna pigmen, meskipun aktivitas antioksidan sedikit menurun dibandingkan ekstrak tunggal. Rasio 1:1 menunjukkan hasil terbaik dalam menjaga aktivitas antioksidan sekaligus memperbaiki kestabilan pigmen. Dengan demikian, kombinasi antosianin beras hitam dan polifenol kacang kedelai berpotensi dikembangkan sebagai bahan aktif dalam formulasi minuman fungsional berbasis pewarna alami yang stabil dan memiliki manfaat kesehatan.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih ditujukan pula kepada dosen pembimbing, rekan peneliti, serta semua pihak yang telah membantu secara langsung maupun tidak langsung dalam penyelesaian penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Abida, A. and Fadhilah, A. (2022) 'Literature Review: Efektivitas Beras Hitam (*Oryza Sativa* L. *Indica*) Sebagai Antidiabetes', *Usadha Journal of Pharmacy*, 1(3), pp. 375–386. Available at: <https://doi.org/10.23917/ujp.v1i3.104>.
- Arifa, A.H., Syamsir, E. and Budijanto, S. (2021) 'Karakterisasi Fisikokimia Beras Hitam (*Oryza sativa* L.) dari Jawa Barat, Indonesia', *agriTECH*, 41(1), p. 15. Available at: <https://doi.org/10.22146/agritech.53307>.
- Azman, E.M. *et al.* (2022) 'Stability Enhancement of Anthocyanins from Blackcurrant (*Ribes Nigrum* L.) Pomace through Intermolecular Copigmentation', *Molecules*, 27(17), pp. 1–18. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules27175489>.
- Cahyaning, W. *et al.* (2022) 'Analisis Aktivitas Antioksidan, Total Senyawa Fenolik Dan Kandungan Cemarkan Aflatoksin Pada Tempe Dari Berbagai Varietas Kedelai (*Glycine Max* L. Merrill)', *Jurnal BisTek Pertanian*, 9(2), pp. 18–25.
- Castañeda-ovando, A. *et al.* (2009) 'Chemical studies of anthocyanins: A review', *Food Chemistry*, 113(4), pp. 859–871. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>.
- Choi, Y.M. *et al.* (2020) 'Isoflavones, anthocyanins, phenolic content, and antioxidant activities of black soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill) as affected by seed weight', *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76985-4>.
- Courtney, A. (2012) 'Formularies', *Pocket Handbook of Nonhuman Primate Clinical Medicine*, pp. 213–218. Available at: <https://doi.org/10.1201/b12934-13>.
- Cunha, N.L. *da et al.* (2023) 'Soybean dependence on biotic pollination decreases with latitude', *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 347(July 2022). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2023.108376>.
- Das, M. *et al.* (2023) 'Black rice: A comprehensive review on its bioactive compounds, potential health benefits and food applications', *Food Chemistry Advances*, 3(September), p. 100462. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.10>

- 0462.
- Fitriyah, D. *et al.* (2022) 'Analisis Kandungan Senyawa Bioaktif, Nutrisi dan Aktivitas Antioksidan pada Minuman Ekstrak Beras Hitam', *ARTERI: Jurnal Ilmu Kesehatan*, 3(1), pp. 21–30. Available at: <https://doi.org/10.37148/arteri.v3i1.204>.
- He, J. and Giusti, M.M. (2010) 'Anthocyanins : Natural Colorants with Health-Promoting Properties'. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.food.08.0708.100754>.
- Husna, N. El, Novita, M. and Rohaya, S. (2018) 'Anthocyanins Content and Antioxidant Activity of Fresh Purple Fleshed Sweet Potato and Selected Products', *Agritech*, 33(3), pp. 296–302.
- Kartakoullis, A. *et al.* (2018) 'Feasibility study of smartphone-based Near Infrared Spectroscopy (NIRS) for salted meat composition diagnostics at different temperatures', *Food Chemistry* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.054>.
- Khare, S.K., Jha, K. and Gandhi, A.P. (1994) 'Preparation of soya bean meal protein hydrolysate by agarose-entrapped *Bacillus subtilis* cells', 50, pp. 121–123.
- Khoo, H.E. *et al.* (2017) 'Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits', *Food and Nutrition Research*, 61(1). Available at: <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>.
- Kim, I.S. (2022) 'Current perspectives on the beneficial effects of soybean isoflavones and their metabolites on plants', *Food Science and Biotechnology*, 31(5), pp. 515–526. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10068-022-01070-7>.
- Meganingtyas, W. and Alauhdin, M. (2021) 'Ekstraksi Antosianin dari Kulit Buah Naga (*Hylocereus costaricensis*) dan Pemanfaatannya sebagai Indikator Alami Titirasi Asam-Basa', *agriTECH*, 41(3), p. 278. Available at: <https://doi.org/10.22146/agritech.52197>.
- Pertiwi, R.B., Hasbullah, U.H.A. and Affandi, A.R. (2022) 'Copigmentation of Anthocyanin Extract from Parijoto Fruit (*Medinilla speciosa*) and Its Stability at Different Temperatures and Heating Durations', *Indonesian Food and Nutrition Progress*, 18(2), p. 50. Available at: <https://doi.org/10.22146/ifnp.65771>.
- Prasetyo, E., Kiromah, N.Z.W. and Rahayu, T.P. (2021) 'Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Terhadap Ekstrak Etanol Kulit Buah Durian (*Durio zibethinnus* L.) dari Desa Alasmalang Kabupaten Banyumas', *Jurnal Pharmascience*, 8(1), p. 75. Available at: <https://doi.org/10.20527/jps.v8i1.9200>.
- Pratiwi, D.E., Widiyany, F.L. and Sari, P.M. (2024) 'Efikasi Pemberian Susu Kacang Kedelai Hitam (*Glycine Soja*) Terhadap Kadar Kolesterol Total Lansia', *Journal of Nutrition College*, 13(1), pp. 89–95. Available at: <https://doi.org/10.14710/jnc.v13i1.39767>.
- Rock, L. and Brunswick, N. (2005) 'Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements', pp. 4290–4302. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf0502698>.
- Salati, S. *et al.* (2025) 'Enhanced Stability of Extracted Sour Cherry Anthocyanins Copigmented With Tannic Acid and Encapsulated by Spray Drying', *Food Science and Nutrition*, 13(6). Available at: <https://doi.org/10.1002/fsn3.70365>.
- Sholihah, A., Aini, N. and Dwiyaniti, H. (2021) 'Optimasi Ekstraksi Antosianin Pada Beras Hitam Sirampog Menggunakan Metode Ultrasound Extract Assist (UAE)', *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 10(3), pp. 71–76.
- Suhartatik, N. and Mustofa, A. (2018) 'Stabilitas Minuman Isotonik Antosianin Beras Ketan Hitam dengan Senyawa Kopigmentasi Ekstrak Bunga Belimbing (*Averrhoa Carambola*)', *Agritech*, 38(1), p. 1. Available at: <https://doi.org/10.22146/agritech.15395>.
- Tena, N., Martín, J. and Asuero, A.G. (2020) 'State of the art of anthocyanins: Antioxidant activity, sources, bioavailability, and therapeutic effect in human health', *Antioxidants*, 9(5). Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox9050451>.
- Trouillas, P. *et al.* (2016) 'Stabilizing and

- Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment', *Chemical Reviews*, 116(9), pp. 4937–4982. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00507>.
- Yamuangmorn, S. and Prom-U-thai, C. (2021) 'The potential of high-anthocyanin purple rice as a functional ingredient in human health', *Antioxidants*, 10(6), pp. 1–21. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox10060833>.
- Yudiono, K. (2023) 'Aktivitas antioksidan, total polifenol, total flavonoid, dan sifat sensoris inovasi tempe kedelai dengan substitusi tepung daun kelor', *Agrointek*, 17(4), pp. 746–754. Available at: <https://doi.org/10.21107/agrointek.v17i4.17146>.