

## PROFILING MARKER AKTIF SIANIDIN-3-O-GLUKOSIDA PADA EKSTRAK ETANOL BEKATUL BERAS HITAM DAN BEKATUL BERAS MERAH

<sup>1</sup>Annie Rahmatillah\*, <sup>2</sup>Anna Fitriawati, <sup>3</sup>Sindy Avita Sari  
<sup>1,2,3</sup>Universitas Duta Bangsa Surakarta, annie\_rahmatillah@udb.ac.id  
\*Penulis Korespondensi

### ABSTRAK

Bekatul beras merupakan salah satu bahan obat alam yang telah terbukti memiliki berbagai aktivitas farmakologi secara *in vitro* dan *in vivo*. Bekatul beras kaya akan serat, tocopherol, tocotrienol, oryzanol, vitamin B kompleks dan berbagai macam senyawa fenolik seperti antosianin. Aktivitas farmakologi bekatul beras dipengaruhi oleh kadar senyawa yang bertanggung jawab didalamnya. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Analisis kualitatif dengan membandingkan waktu retensi senyawa target dan standar yang berada antara 2,0-2,1 menit. Kuantifikasi kadar didasarkan pada kurva baku dari isolat sianidin-3-O-glukosida dari range  $2.10^{-4} - 1.10^{-3}$  % b/v, didapatkan koefisien korelasi lebih dari 0.99. Didapatkan konsentrasi sianidin-3-O-glukosida didalam ekstrak etanol BBH dan BBM secara berturut-turut 0.012 %b/b dan  $1.38 \times 10^{-3}$  %b/b. Terbukti bahwa kandungan sianidin-3-O-glukosida dalam ekstrak BBH lebih besar dari ekstrak BBM. Pada ekstrak etanol, kadar antosianin total paling tinggi terdapat pada bekatul beras hitam, yaitu  $328,4 \pm 34,76$  mg/100g ekstrak, sedangkan untuk ekstrak etanol bekatul beras hanya sebesar  $214,3 \pm 17,39$  mg/100g ekstrak.

**Kata Kunci:** ekstrak etanol, bekatul beras hitam, bekatul beras merah, sianidin-3-O-glukosida

### ABSTRACT

Rice bran is a natural medicinal ingredient that has been proven to have various pharmacological activities *in vitro* and *in vivo*. Rice bran is rich in fiber, tocopherol, tocotrienol, oryzanol, vitamin B complex and various phenolic compounds such as anthocyanins. The pharmacological activity of rice bran is affected by the levels of the compounds responsible for it. This research is experimental research. Qualitative analysis by comparing the retention times of target compounds and standards which are between 2.0-2.1 minutes. Quantification of levels was based on a standard curve for cyanidin-3-O-glucoside isolates in the range  $2.10^{-4} - 1.10^{-3}$  % w/v, a correlation coefficient of more than 0.99 was obtained. The concentration of cyanidin-3-O-glucoside in the ethanol extract of Black Rice Bran (BRB) and Red Rice Bran (RRB) was found to be 0.012%w/w and  $1.38 \times 10^{-3}$ %w/w, respectively. It was proven that the cyanidin-3-O-glucoside content in BRB extract was greater than RRB extract. In the ethanol extract, the highest total anthocyanin content was found in black rice bran, namely  $328.4 \pm 34.76$  mg/100g of extract, while for the ethanol extract of red rice bran it was only  $214.3 \pm 17.39$  mg/100g of extract.

**Keywords:** ethanol extrac, black rice bran, red rice bran, cyanidin-3-O-glucoside

### PENDAHULUAN

Padi (*Oryza sativa* L.) merupakan komoditi terbesar karena lebih dari 50% populasi masyarakat dunia mengkonsumsi beras. Konsumsi beras menghasilkan produk samping diantaranya sekam dan bekatul beras. Bekatul beras kaya akan serat, tocopherol, tocotrienol, oryzanol, vitamin B kompleks dan berbagai macam senyawa fenolik (Zhang *et al.*, 2010). Salah satu senyawa polifenol yang ditemukan dalam tanaman berpigmen adalah antosianin (Giusti & Wrolstad, 2003). Antosianin merupakan turunan flavonoid dengan kerangka dasar berupa C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Senyawa ini mampu mengabsorpsi gelombang cahaya pada kisaran 500 nm sehingga bertanggung jawab sebagai pemberi pigmen warna (Welch *et al.*, 2009).

Kandungan antosianin yang ada dalam bekatul beras, banyak diuji dalam beberapa penelitian terkait dengan aktivitasnya sebagai antioksidan yang poten dan juga dapat mencegah

obesitas, penyakit kardiovaskuler, inflamasi serta kanker (Mazza, 2007; Santos-buelga & Scalbert, 2000).

Obat konvensional umumnya merupakan suatu senyawa tunggal yang memiliki aktivitas farmakologi sedangkan bahan obat alam mengandung berbagai macam komponen kimia didalamnya. Bekatul beras merupakan salah satu bahan obat alam yang telah terbukti memiliki berbagai aktivitas farmakologi secara *in vitro* dan *in vivo*. Sulistiowati (2014) menyebutkan bahwa pemberian ekstrak etanol bekatul beras hitam terhadap tikus galur wistar memberikan efek signifikan ( $p < 0,05$ ) dalam menurunkan kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN). Salah satu komponen aktif di dalamnya yang telah terbukti memiliki aktifitas farmakologi yaitu sianidin-3-O-glukosida, diantaranya mampu memperbaiki kerja insulin pada penderita diabetes tipe II melalui peningkatan regulasi ekspresi gen GLUT4 (Inaguma *et al.*, 2011). Selain itu juga isolat ini secara aktif mampu menekan respon inflamasi yang diinduksi oleh sitokin melalui jalur COX-2 dan iNOS (Serra *et al.*, 2013).

Penggunaan obat herbal dalam masyarakat seringkali didapati dalam bentuk seduhan dengan air. Pelarut lain yang diperbolehkan dalam industri jamu atau obat herbal adalah etanol (Saifudin *et al.*, 2011). Etanol dimanfaatkan untuk menarik sebanyak mungkin kandungan kimia yang berkhasiat dalam suatu bahan obat alam sehingga mudah untuk diolah dan dikemas dalam bentuk sediaan farmasi. Jaminan atas khasiat dan keamanan menjadi salah satu syarat pengembangan produk bahan alam (Saifudin *et al.*, 2011). Khasiat bahan obat didasarkan pada kebenaran identitas bahan dan jumlah zat aktif yang terkandung didalamnya. Belum adanya data lengkap perbandingan kadar total golongan dalam bentuk ekstrak dan kadar marker aktif dari bekatul beras hitam dan bekatul beras merah menjadi latar belakang yang mendasari penelitian ini dilakukan.

## METODE

**Alat.** Alat-alat gelas, Maspion *electric stove*, Lutron *electronic scale* GM-500, Hanna Instruments *pH 211 Microprocessor* pH Meter, *Micropipette* SOCOREX Accura 825, Kuvet Hellma Analytic (type: 100.600 QG), *Spectrophotometer* UV Mini-1240 SHIMADZU, *vacuum Buchner, vacuum rotary evaporator* IKA Heidolph, kompresor, oven, *waterbath* WNB 14 Memmert-Binder, neraca analitik A&D Co. Ltd., sonikator 1510-MTH Bronson, sistem HPLC Waters e2695, detektor *Photodiode Array Detector* (PDA) Waters 2998 dan kolom Cosmoil 5C18-MS-II (4.6ID x 150 mm).

**Bahan dan reagensia.** Serbuk bekatul beras hitam dan beras merah yang diperoleh dari Kabupaten Klaten, sianidin-3-O-glukosida (Sigma Aldrich, *purity* 99%), lempeng silika GF<sub>254</sub>, HCl 2M, NaOH 2M, HCl 1%, dapar KCl pH 1,0, dapar natrium asetat pH 4,5, akuades, etanol 96% (tk), larutan DPPH (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil), vitamin E, *aqua bidestilata*, asam asetat glasial (*p.a.*), n-butanol (*p.a.*), metanol (*p.a.*), metanol *grade* HPLC, asetonitril *grade* HPLC, etil asetat (*p.a.*), asam format (*p.a.*), asam fosforik (*p.a.*) (Merck).

**Ekstraksi Simplisia menggunakan Etanol 96%.** Masing-masing bekatul yang telah diperkecil ukurannya, dilewatkan ayakan no.60, ditimbang seberat 1 kg, dimasukkan dalam bejana, ditambahkan penyari yaitu etanol 96% sebanyak 7 L, ditutup rapat dan didiamkan selama 5 hari, bila perlu dilakukan pengadukan. Disaring kemudian ampas diremaserasi (2x) dan difilter kembali, selanjutnya ekstrak dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*.

**Uji Pendahuluan.** Uji ini dimaksudkan untuk mendeteksi keberadaan flavonoid/Antosianin dalam ekstrak. Uji tabung, masing-masing bekatul beras diambil secukupnya ditambahkan HCl 2 M dipanaskan suhu 100<sup>0</sup> C akan timbul warna merah dan saat ditambahkan NaOH 2 M pertetes akan memudahkan warnanya (Supiyanti *et al.*, 2010). Uji KLT, masing-masing ekstrak ditimbang 200 mg, dilarutkan dalam metanol *p.a.* sebanyak 1 mL (20 %b/v) kemudian disaring. Sampel dapat digunakan untuk uji KLT. Sistem yang digunakan sebagai berikut:

Fase diam : Silika GF<sub>254</sub>

Fase gerak : n-Butanol:Asam asetat glasial:air (40:10:20)

Deteksi : sitroborat-UV 254 nm → flavonoid (Mabry *et al.*, 1970)  
 AlCl<sub>3</sub>- UV 366 nm → antosianin (Harborne, 1996).

**Penetapan kadar antosianin total dalam ekstrak etanol 96%.** Larutan uji dibuat dengan cara menimbang seksama 10 mg ekstrak etanol bekatul beras hitam maupun bekatul beras merah kemudian dilarutkan dalam 10 mL etanol 96% sehingga diperoleh konsentrasi 0,1 %. Kemudian 2 mL larutan ekstrak yang sudah dibuat masing-masing dimasukkan dalam labu takar 10 mL. Ditambahkan larutan buffer kalium klorida pH 1,0 dan larutan buffer natrium asetat pH 4,5 hingga tanda batas. Larutan yang berbeda tersebut diukur serapannya setelah waktu 20 menit pada  $\lambda$  520 nm dan 700 nm, sebagai blanko digunakan masing-masing larutan buffer (Lee *et al.*, 2005).

**Uji aktivitas antioksidan.** Ditimbang seksama 10 mg ekstrak etanol bekatul beras hitam maupun bekatul beras merah yang dilarutkan dalam 10 mL etanol 96%. Larutan stok vitamin E dibuat dengan cara menimbang seksama 10 mg Vitamin E dilarutkan dalam 10 mL etanol 96%. Sedangkan larutan stok DPPH dibuat dengan cara menimbang 15,8 mg DPPH dilarutkan dalam 100 mL etanol 96% untuk segera digunakan dan terlindung dari cahaya langsung. Panjang gelombang maksimum DPPH ditetapkan pada rentang panjang gelombang 475-550 nm dengan menggunakan etanol 96% sebagai blanko. Didapatkan  $\lambda$  maksimumnya pada 515 nm. Pengukuran aktivitas antioksidan menggunakan larutan stok 0,1 % dari masing-masing ekstrak. Senyawa antioksidan sintetis yang digunakan sebagai kontrol positif adalah vitamin E.

**Tabel 1.** Perlakuan untuk uji aktivitas antioksidan

	Bekatul Beras Hitam	Bekatul Beras Hitam	Vitamin E
Larutan stok yang digunakan	20 $\mu$ L	80 $\mu$ L	20 $\mu$ L
	40 $\mu$ L	100 $\mu$ L	30 $\mu$ L
	60 $\mu$ L	120 $\mu$ L	40 $\mu$ L
	80 $\mu$ L	140 $\mu$ L	50 $\mu$ L
	100 $\mu$ L	160 $\mu$ L	60 $\mu$ L
Ditambahkan 1 mL larutan DPPH dan etanol 96 % hingga 5 mL			
Konsentrasi Dalam PPM	4	16	4
	8	20	6
	12	24	8
	16	28	10
	20	32	12

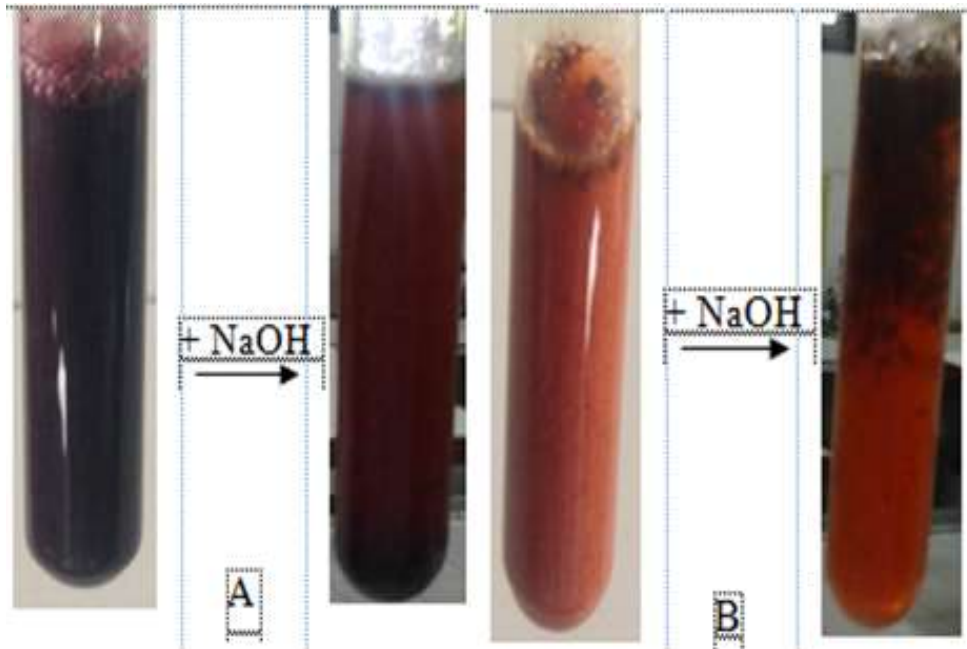
Larutan yang telah dibuat diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dan kedap cahaya, setelah itu absorbansi dibaca pada  $\lambda$  515 nm menggunakan etanol 96% sebagai blanko.

**Penetapan kadar sianidin-3-O-glukosida.** Sianidin-3-O-glukosida sebesar 1 mg dilarutkan dalam 1 mL asam format 0,1% sehingga didapatkan konsentrasi stok 0,1 %. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi kurva baku dengan rentang  $2 \cdot 10^{-4}$  –  $1 \cdot 10^{-3}$  % b/v. Sampel sebanyak 1.5 g ekstrak baik bekatul beras hitam maupun bekatul beras merah dilarutkan dalam 10 mL air yang diasamkan (0,1% asam format dalam air), dilarutkan dengan bantuan sonikasi lalu disaring. Filtrat diambil 200  $\mu$ L dan ditambahkan asetonitril/asam asetat glasial dan asam fosforik (10:90) sampai 1,5 mL. Sampel disaring menggunakan *membrane filter* 0.20  $\mu$ m dan dimasukkan dalam *tube* sampel auto injektor dan dianalisis menggunakan HPLC-PDA. Sistem yang digunakan diadopsi dari Lee *et al.* (2005), menggunakan 100% asetonitril (solven A) dan asam asetat glasial 10%:asam fosforik 1% (solven B) dalam aqua bidestilata dengan sistem linear gradien dari 2% sampai 20% A pada menit 0-25 menit, 20% sampai 40% solven A selama 5 menit. Deteksi dilakukan secara simultan pada dua panjang gelombang maksimum 280 nm dan 520 nm. Dilakukan pembacaan secara duplo pada masing-masing sampel.

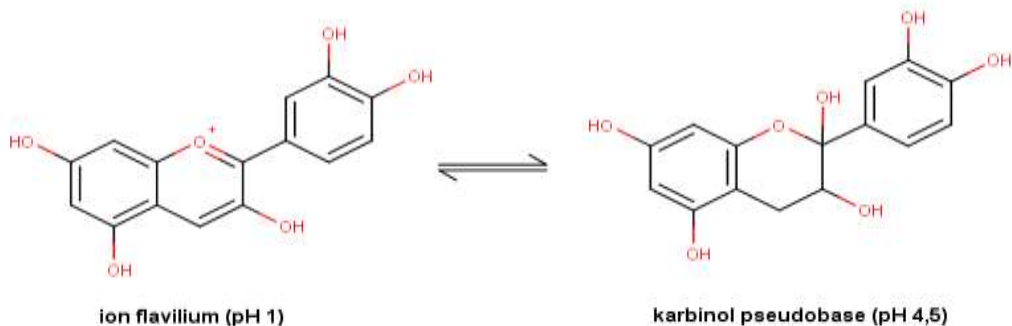
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Antosianin merupakan senyawa pigmen yang pembentukan warnanya sangatlah dipengaruhi oleh pH lingkungan atau larutan. Antosianin lebih stabil dalam kondisi asam dan peningkatan pH dapat menurunkan intensitas warna yang dihasilkan (Patras *et al.*, 2010). Perlakuan dengan menambahkan asam (HCl 2 M) memperlihatkan adanya peningkatan warna menjadi lebih

pekat daripada penambahan basa (NaOH 2M) yang menjadikan warna larutan menjadi memudar (**Gambar 1**). Hal ini disebabkan karena pada kondisi basa akan terbentuk ion karbinol yang selanjutnya menjadi karbinol *pseudobase* yang berwarna pucat (Wirida *et al.*, 2011; Welch *et al.*, 2009). Hal ini terjadi karena adanya proses adisi gugus hidroksi dari lingkungan yang cenderung basa.



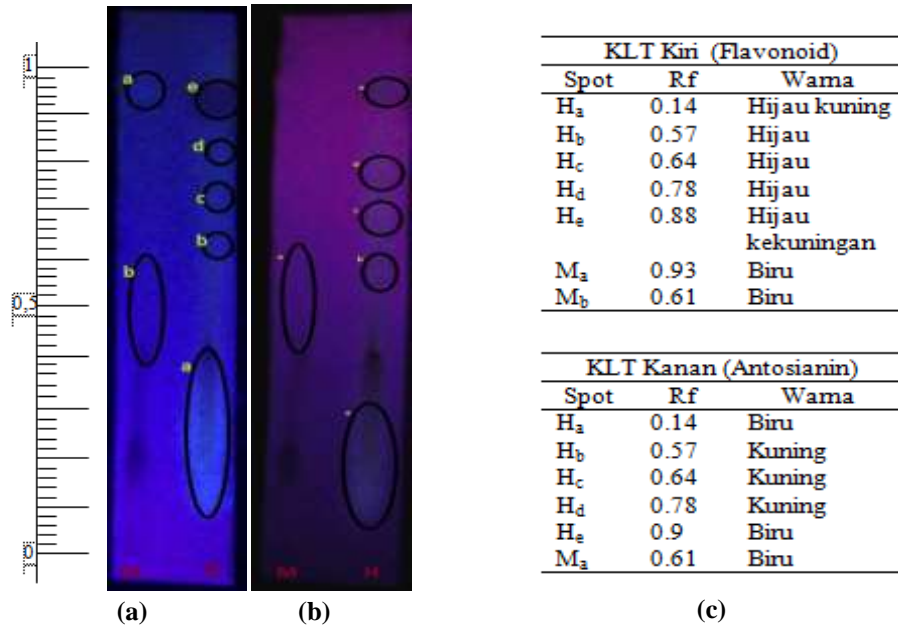
**Gambar 1.** Uji Warna Antosianin. (A) Ekstrak Etanol Bekatul Beras Hitam; (B) Ekstrak Etanol Bekatul Beras Merah. Hasil positif dengan adanya perubahan warna larutan dari warna pekat (lingkungan asam) menjadi pudar (lingkungan basa) karena kenaikan pH.



**Gambar 2.** Perubahan struktur antosianin dalam kondisi lingkungan pH 1 dan pH 4,5.

Uji pendahuluan menggunakan kromatografi lapis tipis (**Gambar 3**) dapat diketahui bahwa ekstrak etanol 96% bekatul beras hitam dan bekatul beras merah mengandung senyawa flavonoid dan derivatnya yaitu antosianin. Uji KLT flavonoid setelah disemprot sitroborat menunjukkan adanya bercak berfluoresensi kuning hingga kehijauan pada UV 366 nm setelah dipaparkan reagen semprot sitroborat (Mabry *et al.*, 1970), dengan hasil harga Rf: 0,14 sampai 0,88 untuk ekstrak bekatul beras hitam. Pada ekstrak bekatul beras merah juga memperlihatkan hasil positif untuk deteksi flavonoid yang ditunjukkan dengan terlihatnya bercak berwarna hijau pada kisaran Rf: 0,61 dan 0,93. Pada uji KLT antosianin menunjukkan hasil positif dengan adanya spot berwarna biru dengan reagen semprot  $AlCl_3$  diamati dibawah sinar UV 366 dan menunjukkan adanya kisaran Rf antara 0,10-0,40 (Harborne, 1996). Pada ekstrak etanol bekatul beras hitam diperoleh harga Rf: 0,14

dan 0,90, sedangkan untuk ekstrak etanol bekatul beras didapatkan harga Rf 0,61 disertai dengan adanya bercak berwarna biru pada kedua sampel tersebut.



**Gambar 3.** Uji KLT flavonoid (a) dan antosianin (b) pada ekstrak etanol bekatul beras hitam (H) dan bekatul beras merah (M). Sistem KLT fase diam: silika GF 254 nm; Fase gerak: n-Butanol:Asam asetat glasial:air (40:10:20); dengan reagen semprot sitroborat (a); dengan deteksi reagen semprot AlCl<sub>3</sub> pada UV 366 nm (b). Nilai Rf yang diperoleh (c).

Penetapan total antosianin juga dilakukan terhadap ekstrak etanol 96% bekatul beras hitam dan bekatul beras merah. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak etanol bekatul beras hitam memiliki nilai total antosianin tertinggi yaitu sebesar 328,4 ±0,34 mg/100g ekstrak dan nilai total antosianin dari ekstrak etanol bekatul beras merah sebesar 214,3 ±0,17 mg/100g ekstrak. Penelitian total antosianin sebelumnya di daerah Bali terhadap varietas yang sama didapatkan hasil sebesar 33,19 mg/100g dalam bekatul beras hitam dan untuk bekatul beras merah sebesar 22,25 mg/100g (Widarta *et al.*, 2013). Hal ini memperlihatkan adanya perbedaan tempat tumbuh atau asal simplisia mempengaruhi kadar senyawa kimia didalamnya.

Total antosianin yang terkuantifikasi dalam bekatul beras hitam atau merah yang diekstrak secara infundasi lebih kecil dari pada nilai total antosianin yang didapatkan dari ekstrak etanol 96% bekatul beras hitam dan merah.

Antosianin merupakan salah satu senyawa flavonoid (Santoso, 2006). Flavonoid merupakan senyawa fenol yang berfungsi sebagai antioksidan, senyawa dengan suatu gugus -OH yang terikat pada karbon cincin aromatik. Produk radikal bebas senyawa ini terstabilkan secara resonansi dan bersifat tidak reaktif dibandingkan dengan kebanyakan radikal bebas lain sehingga dapat berfungsi sebagai antioksidan yang efektif (Fessenden dan Fessenden, 1994). Aktivitas antioksidan kedua ekstrak bekatul beras dinyatakan sebagai nilai IC<sub>50</sub> menggunakan metode serapan radikal DPPH terhadap vitamin E, yang merupakan senyawa pembanding.

**Tabel 2.** Hasil perolehan nilai IC<sub>50</sub> (n=3)

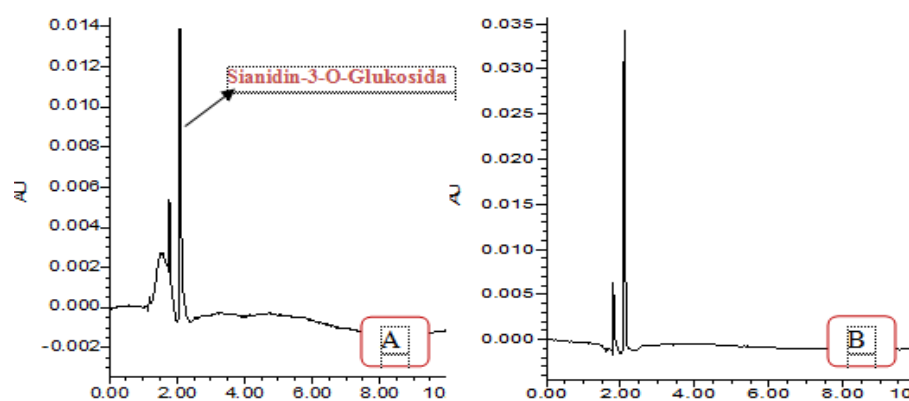
		Bekatul Beras Hitam	Bekatul Beras Merah	Vitamin E
Nilai IC <sub>50</sub> (ppm)	Replikasi 1	10,8	20,74	7,76
	Replikasi 2	9,31	20,12	7,36

	Bekatul Beras Hitam	Bekatul Beras Merah	Vitamin E
Replikasi 3	9,81	21,45	7,19
Rata-rata nilai IC <sub>50</sub> ± SD (ppm)	9,97±0,76	20,77±0,6	7,44±0,29

Aktivitas antioksidan ekstrak etanol bekatul beras hitam lebih tinggi dibandingkan dengan bekatul beras merah, hal tersebut sebanding dengan kadar total antosianin. Aktivitas antioksidan berbanding lurus dengan total antosianinnya. Menurut Goufo & Trindade (2014) varietas beras hitam utamanya terdiri dari antosianin dengan jenis sianidin-3-O-glukosida, sedangkan varietas beras merah lebih banyak mengandung proantosianidin, hal tersebut menyebabkan perbedaan dalam jumlah total antosianin. Sehingga dengan adanya perbedaan jenis antosianin di dalam bekatul beras tersebut mempengaruhi tingginya aktivitas antioksidan.

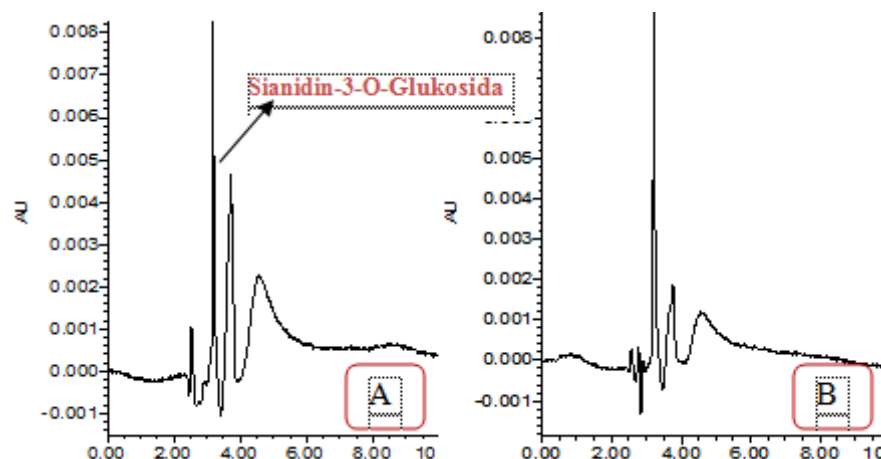
Senyawa aktif yang termasuk dalam total antosianin dari bekatul beras berpigmen yang telah terbukti memberikan berbagai aktifitas farmakologi yaitu sianidin-3-O-glukosida. Hasil analisis secara kualitatif didapatkan dengan membandingkan *Retention Time* (RT) puncak dari sampel terhadap puncak senyawa murni, *active marker* yaitu sianidin-3-glukosida. Komponen target pada bekatul beras hitam dan bekatul beras merah muncul pada kisaran RT antara 2,0-2,1 menit (**Gambar 5&6**), begitu pula puncak senyawa penanda. Analisis kadar sianidin-3-glukosida dalam kedua sampel dimasukkan dalam persamaan kurva baku standard yang memiliki koefisien korelasi sama dengan 0.998, menghasilkan kadar sianidin-3-glukosida dalam ekstrak bekatul beras hitam lebih besar dari ekstrak bekatul beras merah secara berturut-turut didapatkan konsentrasi pada ekstrak bekatul beras hitam sebesar 12 mg/100 g dan 1,38 mg/100 g untuk ekstrak bekatul beras merah.

Hasil penetapan kadar diatas selaras dengan Sampong *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa total antosianin pada beberapa varietas beras hitam lebih besar dari pada beras merah dimana komponen yang mendominasi adalah sianidin-3-glukosida dan peonidin-3-glukosida. Hal ini didukung pula dengan penetapan kadar total antosianin dengan metode perbedaan pH yang menghasilkan bahwa total antosianin pada bekatul beras merah lebih kecil dari pada bekatul beras hitam.



**Gambar 4.** Kromatogram standar sianidin-3-glukosida (A); Ekstrak etanol 96% BBH (B).

Fase gerak: asam asetat 10%:asam fosforik 1% dan asetoniitril 100%; Flow rate: 1 mL/menit; sistem elusi linear gradient; kolom: C-18 Cosmoil 5C18-MS-II deteksi pada  $\lambda$  maksimum 520 nm.



**Gambar 5.** Kromatogram standar sianidin-3-glukosida (A); Ekstrak etanol 96% BBM (B).  
Fase gerak: asam asetat 10%:asam fosforik 1% dan asetonitril 100%; Flow rate: 1 mL/menit; sistem elusi linear gradient; kolom: C<sub>18</sub> Cosmoil 5C18-MS-II deteksi pada  $\lambda$  maksimum 520 nm

Kadar sianidin-3-O-glukosida dalam ekstrak bekatul beras hitam terbukti lebih besar daripada ekstrak bekatul beras merah seperti yang telah dilaporkan oleh Goufo & Trindade (2014). Hal ini membuktikan bahwa total antosianin dari ekstrak bekatul beras hitam didominasi oleh sianidin-3-O-glukosida sedangkan pada bekatul beras merah tidak demikian. Penetapan senyawa marker aktif termasuk dalam parameter spesifik untuk pengembangan bahan obat alam menjadi obat herbal terstandar atau fitofarmaka sehingga meningkatkan manfaatnya dibidang pengobatan medis.

## SIMPULAN

Antosianin total dari ekstrak etanol bekatul beras hitam lebih besar dari pada dalam bekatul beras merah. Aktivitas antioksidan yang dihasilkan sebanding dengan kadar total antosianin yang dimiliki dengan kadar marker aktif sianidin-3-O-glukosida mendominasi antosianin total dalam ekstrak bekatul beras hitam.

## DAFTAR PUSTAKA

- Fessenden, R. J., & Fessenden, J. S., 1994, *Kimia Organik*, Jilid I Edisi ketiga, 223-239, Penerbit Erlangga, Jakarta
- Giusti, M.M. & Wrolstad, R.E., 2003, Acylated Anthocyanins from Edible Sources and Their Applications in Food System, *Biochemical engineering journal*, 14(3), pp.217-225.
- Goufo, P. & Trindade, H., 2014, Rice Antioxidant: Phenolic Acid, Flavonoids, Anthocyanins, Proanthocyanidins, Tocopherol, Tocotrienols,  $\gamma$ -oryzanol, and Phytic acid, *Food Science and Nutrition*, 2(2), pp.75-104.
- Goufo, P. & Trindade, H., 2014, Rice Antioxidant: Phenolic Acid, Flavonoids, Anthocyanins, Proanthocyanidins, Tocopherol, Tocotrienols,  $\gamma$ -oryzanol, and Phytic acid, *Food Science and Nutrition*, 2(2), pp.75-104.
- Harborne, J.B., 1996, *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan edisi 2*, Bandung;ITB, hal.79; 84.
- Inaguma, T., Han, J. & Isoda, H., 2011. Improvement of insulin resistance by Cyanidin 3-glucoside, anthocyanin from black beans through the up-regulation of GLUT4 gene expression. *BMC Proceedings*, 5(Suppl 8), p.P21. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1753-6561/5/S8/P21>.
- Kırca, A., Özkan, M. & Cemerog˘lu, B., 2006, Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars, *Food Chemistry*, 97 (4), 598–605.
- Lee, J., Eisele, T., Giusti, M. M., Hofsommer, H., Koswig, S., Krueger, D. A. & Wightman, J. D., 2005, Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices,

- Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study, *Journal of AOAC International*, 88 (5), 1269–1278.
- Mabry, T.J., Markham, K.R., & Thomas, M.B., 1970, *The systematic identification of flavonoid*, Berlin:Springer-Verlag, hal.50-52.
- Mazza, G.J., 2007, Anthocyanins and heart health, *Ann Ist Super Sanita*, 43 (4), 369–374.
- Patras, A., Brunton, N.P., O'Donnell, C. & Tiwari, B.K., 2010, Effect of Thermal Processing on Anthocyanin Stability in Foods; Mechanism and Kinetics of Degradation, *Trends in Food Science and Technology*, 21, pp.3-11
- Saifudin, A., Rahayu, V. & Teruna, H.Y., 2011, *Standardisasi bahan obat alam*, Yogyakarta: Graha Ilmu, hal.4, 14-16, 22.
- Santos-buelga, C. & Scalbert, A., 2000, Review Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature , occurrence , dietary intake and effects on nutrition and health, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1094–1117.
- Santoso, U., 2006, *Antioksidan*, Yogyakarta: Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada.
- Serra, D., Paixa, J., Nunes, C., Dinis, T. & Almeida, L., 2013. Cyanidin-3-Glucoside Suppresses Cytokine-Induced Inflammatory Response in Human Intestinal Cells : Comparison with 5-Aminosalicylic Acid. *Plosone*, 8(9), pp.1–9.
- Sompong, R., Siebenhandle-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(1), pp.132–140. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.115>.
- Sulistyowati, F. & Wahyuni, A.S., 2014, Kemampuan Perbaikan Fungsi Ginjal Setelah Pemberian Oral Ekstrak Etabol Bekatul Beras Hitam Pada Tikus Nefropati Diabetik, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, UMS.
- Supiyanti, W., Wulansari, E.D. & Kumita, L., 2010, Uji Aktivitas Antioksidan dan Penentuan Kandungan Antosianin Total Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.), *Majalah Obat Tradisional*, 15 (2), 64–70.
- Voigt, R., 1984, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Welch, C.R., Wu, Q. & Simon, J.E., 2009, Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization, *Curr Anal Chem*, 4(2), pp.75-101.
- Widarta, I.W.R., Nociantri, K.A. & Sari, L.P.I.P., 2013, Ekstraksi Komponen Bioaktif Bekatul beras Lokal dengan Beberapa Jenis Pelarut, *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 2 (2), 75–79.
- Wirada, Z., Halim, H., Millati, P. & Zulhidiana, R., 2011, Pengaruh Berbagai Jenis Pelarut dan Asam Terhadap Rendemen Antosianin Kubis Merah (*Brassica oleraceae capitata*), *Agroscentiae*, 18(2), pp.57-63.
- Zhang, M., Zhang, F., Zhang, R. & Liu, R., 2010, Phenolic Profiles and Antioxidant Activity of Black Rice Bran of Different Commercially Available Varieties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, pp.7580–7587.