

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Karakteristik dan Potensi Antioksidan Ketan Hitam sebagai Bahan Baku Fermentasi Minuman Beralkohol

Menurut Kadirantau (2000), ketan hitam merupakan salah satu komoditas pangan yang sangat potensial sebagai sumber karbohidrat, antioksidan, senyawa bioaktif dan serat yang penting bagi kesehatan. Pati merupakan karbohidrat utama pada ketan. Pati adalah homopolimer glukosa dengan ikatan  $\alpha$ -glikosida. Protein sebagai penyusun terbesar kedua setelah pati mempunyai ukuran granula 0,5-5,0  $\mu\text{m}$  terdiri dari 5% fraksi albumin, 10% globulin, 5% prolamin dan 80% glutelin. Fraksi protein yang paling dominan adalah glutelin yang bersifat tidak larut air sehingga dapat menghambat penyerapan air dan pengembangan butir pati selama pemanasan.

Ketan hitam telah diketahui mengandung senyawa golongan antosianin yang memiliki beberapa aktivitas farmakologi, salah satunya adalah aktivitas antioksidan. Serbuk simplisia diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut metanol yang mengandung 1% asam hidroklorida pekat. Ekstrak pekat difraksinasi secara kromatografi kolom dengan fase gerak butanol-asam asetat glasial-air (4:1:5) kemudian isolat dikarakterisasi dengan KLT. Hasil KLT menunjukkan adanya gugus  $-\text{OH}$ ,  $-\text{CH}$ ,  $>\text{C}=\text{C}<$  aromatik dan  $\text{C}=\text{O}$  yang diduga merupakan antosianin terasilasi jenis sianidin 3-glukosida dengan pola hidroksilasi tersubstitusi pada posisi 3 (Aligita, 2007).

Nailufar dkk. (2012) telah mengukur total antosianin dan aktivitas antioksidan dari ketan hitam Desa Tawangsari, Boyolali. Total antosianin pada

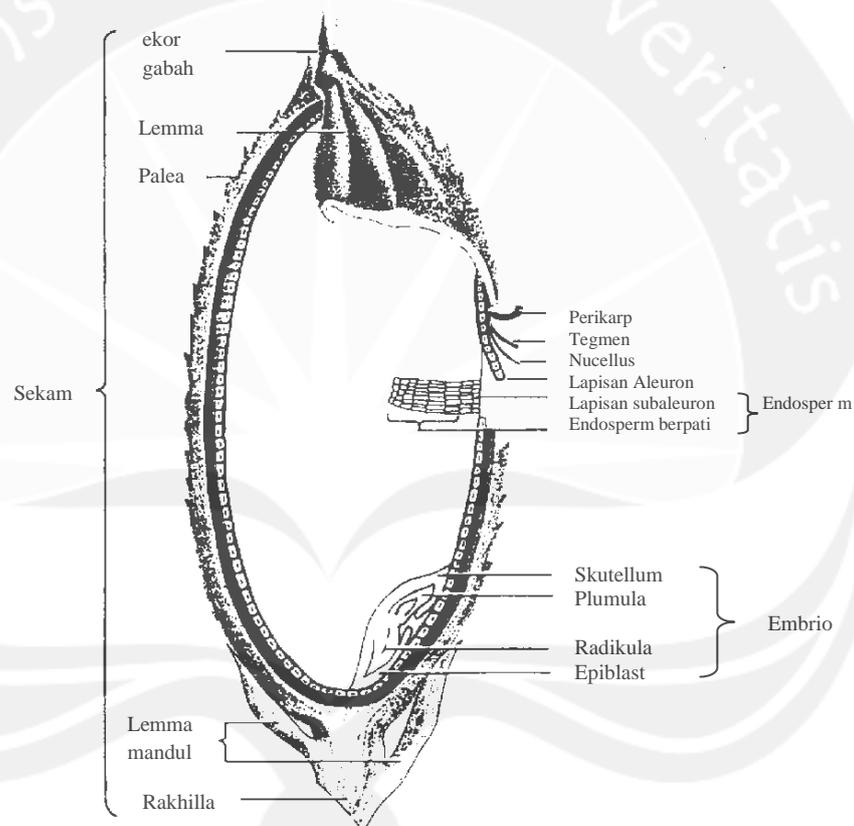
ketan hitam terukur sebesar 146,47 mg/100 g. Aktivitas antioksidan terukur sebesar 35,73%. Penurunan total antosianin dapat terjadi dan dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain cahaya, oksigen dan suhu. Penurunan total antosianin akan berpengaruh pada aktivitas antioksidan ketan hitam. Pengemas yang dapat mempertahankan aktivitas antioksidan selama penyimpanan adalah plastik polipropilen (PP).

#### **B. Karakteristik dan Potensi Antioksidan Beras Hitam sebagai Bahan Baku Fermentasi Minuman Beralkohol**

Beras merupakan makanan pokok masyarakat Indonesia. Beras terdiri dari beberapa komponen yang meliputi karbohidrat (74,9-77,8%) sebagai penyusun utama, protein (7,1-8,3%), lemak (0,5-0,9%) dan vitamin (Kusmiadi, 2008). Beras juga dapat dimanfaatkan sebagai pangan fungsional, yaitu bahan pangan yang mengandung satu atau lebih komponen yang mempunyai fungsi fisiologi tertentu dan bermanfaat bagi kesehatan. Berdasarkan warnanya beras dibedakan menjadi tiga jenis yaitu beras putih, beras merah, dan beras hitam. Perbedaan warna ini dipengaruhi oleh ada tidaknya antosianin dan tinggi rendahnya kadar antosianin tersebut (Harini dkk., 2013).

Susunan anatomi biji beras secara garis besar terdiri atas perikarp dan tegmen, aleuron dan testa, lembaga serta endosperm. Secara skematis struktur biji beras dapat dilihat pada Gambar 1. Perikarp dan tegmen merupakan selubung karopsis beras. Perikarp terdiri atas 6 lapis sel, 5 di antaranya panjang melintang. Perikarp dibedakan menjadi epikarp luar, mesokarp, *cross sel* dan sel tabung (Gardjito dan Hastuti, 1988).

Dinding sel pada sel-sel perikarp umumnya tebal karena berfungsi sebagai sel pelindung jaringan dalam. Jaringan dalam di sebelah perikarp terdapat 2 lapis sel yang disebut tegmen atau pelapis biji yang mengandung lemak. Lapisan ini juga dinamakan spermoden dan perisperm. Lapisan ini dinding selnya lemah dan sel-sel satu dengan yang lain berderet memanjang. Sel-sel perisperm mempunyai bentuk sel yang bulat (Gardjito dan Hastuti, 1988).



Gambar 1. Penampang longitudinal dari bulir beras  
Sumber : FAO (1997)

Beras hitam merupakan varietas lokal yang mengandung pigmen (terutama antosianin) paling baik, berbeda dengan beras putih atau beras warna lain. Beras hitam memiliki rasa dan aroma yang baik dengan penampilan yang spesifik dan unik. Bila dimasak, nasi beras hitam warnanya menjadi pekat dengan rasa dan

aroma yang menggugah selera makan (Suardi dan Ridwan, 2009). Beras hitam dikenal oleh masyarakat dengan nama yang berbeda-beda. Penduduk di Solo mengenal beras ini dengan nama Beras Wulung, sedangkan di Cibeusi, Jawa Barat lebih dikenal dengan beras Gadog, di Sleman dikenal dengan beras Cempo Ireng atau beras Jlitheng, dan di Bantul dikenal sebagai beras Melik (Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, 2010).

Beras hitam berasal dari tanaman padi hitam. *Oryza sativa* L. adalah nama ilmiah padi. Menurut Tjitrosoepomo (2005), kedudukan taksonomi dari *Oryza sativa* adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledoneae
Bangsa	: Poales (Glumiflorae)
Famili	: Poaceae (Graminea)
Marga	: <i>Oryza</i>
Spesies	: <i>Oryza sativa</i> L.

Salah satu kultivar padi lokal Indonesia adalah Cempo Ireng di Sleman. Kultivar ini memiliki berbagai keunggulan, yaitu memiliki kandungan antosianin yang lebih tinggi (warna bulir beras hitam pekat) bila dibandingkan dengan beras berwarna putih ataupun merah. Kandungan antosianin yang tinggi merupakan antioksidan yang baik untuk mencegah terjadinya penyakit degenerasi. Akan tetapi, kultivar ini memiliki kelemahan, yaitu waktu panen yang sangat lama, sekitar 5-6 bulan (Anggraeni, 2012).

Hou dkk. (2013) mengidentifikasi antosianin hasil isolasi beras hitam menggunakan HPLC dan menemukan empat antosianin berbeda yaitu sianidin-3-

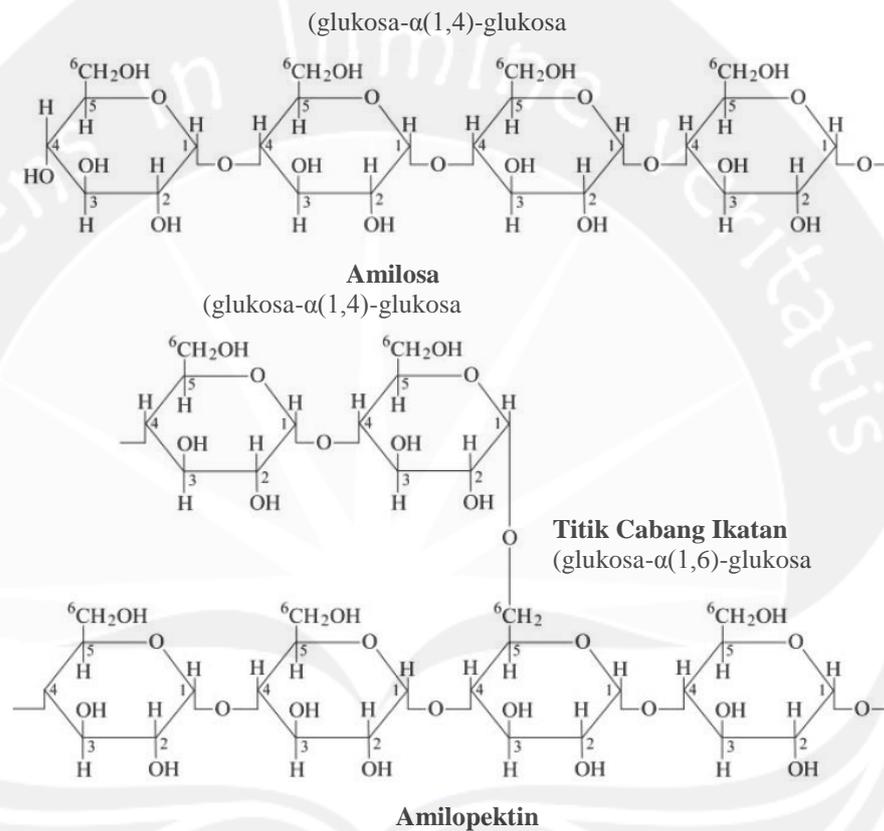
glukosida, peonidin-3-glukosida, sianidin-3,5-diglukosida, dan sianidin-3-rutinosida. Kandungan antosianin pada beras hitam daerah Sleman dan Bantul yang berkisar antara 159,31-359,51 mg/100 g dan aktivitas antioksidan pemerangkapan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) sebesar 68,968 - 85,287% (Ratnaningsih, 2010)

Penelitian juga dilakukan oleh Park dkk. (2008) terhadap kandungan antosianin beras hitam (*Heugjijubyeo*) yang terdiri dari sianidin 3-O-glukosida, peonidin 3-O-glukosida, malvidin 3-O-glukosida, pelagonidin 3-O-glukosida dan delfinidin 3-O-glukosida. Antosianin yang dominan adalah sianidin 3-glukosida (95%) dan peonidin 3-O-glukosida (5%). Ekstrak sebanyak 10, 50 dan 100 µg/ml menghasilkan penghambatan DPPH sebesar 17,65, 40,39, dan 55,20%.

Penyusun utama beras adalah pati. Pati merupakan polimer glukosa yang mempunyai 2 macam struktur, yaitu amilosa, rantai lurus 1-4 $\alpha$  glukosida dan amilopektin, rantai polimer 1-4 $\alpha$  glukosida dengan percabangan 1-6 $\alpha$ . Struktur amilosa dan amilopektin dapat dilihat pada Gambar 2. Perbandingan amilosa dan amilopektin ini akan menentukan sifat berasnya, beras yang mempunyai kandungan amilosa tinggi pada umumnya menghasilkan nasi yang kering dan tidak pulen (Gardjito dan Hastuti, 1988).

Beras hitam berbeda dengan ketan hitam. Secara kimia beras dan ketan dapat dibedakan dari komposisi (kadar) amilosa dan amilopektinnya. Pati terdiri dari dua fraksi yang dapat dipisahkan dengan air panas, yaitu fraksi terlarut adalah amilosa sedangkan yang tidak larut adalah amilopektin. Kadar amilosa dalam ketan sekitar 1-2% sedangkan dalam beras berkisar antara 7-38% (Winarno,

2002). Komposisi pati pada ketan yang hampir semuanya terdiri dari amilopektin menyebabkan ketan mempunyai sifat lengket, tidak mengembang dalam pemasakan dan tidak banyak menyerap air serta tetap lunak setelah dingin (Mambrasar dkk., 2010).



Gambar 2. Perbedaan antara struktur kimia amilosa dan amilopektin  
Sumber : Buleon dkk (1998)

### C. Peran Antioksidan dalam Pemerangkapan Radikal Bebas DPPH

Secara umum, antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menunda, memperlambat, dan mencegah proses oksidasi. Dalam arti khusus, antioksidan adalah zat yang dapat menunda atau mencegah terjadinya reaksi oksidasi radikal bebas. Antioksidan dinyatakan sebagai senyawa yang secara

nyata dapat memperlambat oksidasi walaupun dengan konsentrasi yang lebih rendah dibanding substrat yang dapat dioksidasi (Pokorny dkk., 2008).

Antioksidan sangat beragam jenisnya, berdasarkan sumbernya antioksidan digolongkan menjadi dua kelompok, yaitu antioksidan sintetik yang diperoleh dari sintesis reaksi kimia dan antioksidan alami. Antioksidan alami di dalam makanan dapat berasal dari senyawa antioksidan yang sudah ada dari satu atau dua komponen makanan yang terbentuk dari reaksi-reaksi selama proses pengolahan atau yang diisolasi dari sumber alami dan ditambahkan ke makanan sebagai bahan tambahan pangan (Pokorny dkk., 2008).

Senyawa polifenol seperti fenol, asam fenolik, flavonoid, dan tanin dapat berfungsi sebagai antioksidan. Menurut Pietta (2000), mekanisme aktivitas antioksidan meliputi :

1. Menekan pembentukan spesies oksigen reaktif melalui penghambatan aktivitas enzim atau mengkelat elemen yang terlibat dalam produksi radikal bebas
2. Pemerangkapan spesies oksigen reaktif (ROS)
3. Melindungi pertahanan antioksidan tubuh

Salah satu metode yang banyak digunakan untuk menentukan kapasitas antioksidan suatu bahan adalah metode DPPH. Menurut Benabadji dkk. (2004), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) merupakan senyawa radikal bebas yang stabil dalam larutan metanol (berwarna ungu tua). Mekanisme reaksi yang terjadi adalah proses reduksi senyawa DPPH oleh antioksidan yang menghasilkan pengurangan intensitas warna dari larutan DPPH sehingga warna ungu dari radikal menjadi

memudar (warna kuning). Pemudaran warna akan mengakibatkan penurunan nilai absorbansi sinar tampak dari spektrofotometer. Semakin pudar warna DPPH setelah direaksikan dengan antioksidan menunjukkan kapasitas antioksidan yang semakin besar pula.

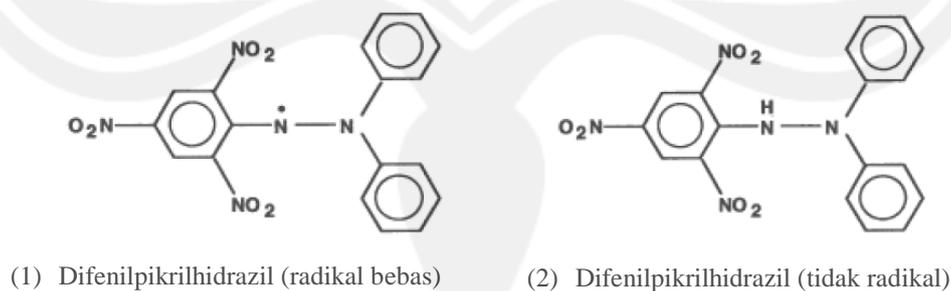
DPPH menunjukkan absorpsi yang kuat pada panjang gelombang 517 nm karena elektron yang tidak berpasangan dan absorpsi berkurang ketika elektron telah berpasangan. Larutan alkoholik akan berwarna ungu pekat pada konsentrasi 0,5 mM dan hukum Lambert-Beer berlaku dalam rentang absorpsi yang terukur. Konsentrasi awal DPPH (50 sampai 100  $\mu\text{M}$ ) harus memberikan absorbansi kurang dari 1,0 (Blois, 1958). Metode ini tergolong cepat, sederhana, tidak mahal dan banyak digunakan untuk mengukur kemampuan komponen sebagai pemerangkap radikal bebas serta dapat mengevaluasi aktivitas antioksidan dari makanan (Prakash, 2001).

Pemerangkapan DPPH kerap dilakukan untuk pengujian antioksidan dari sistein, glutathione, asam askorbat, tokoferol, dan komponen aromatik polihidroksil, minyak zaitun, buah-buahan, sari buah dan fermentasi anggur (Sanchez-Moreno, 2002). Kelebihan dari metode ini adalah DPPH akan bereaksi dengan sampel secara keseluruhan dalam waktu tertentu dan DPPH dapat bereaksi secara perlahan meskipun dengan antioksidan yang lemah (Prakash, 2001). Metode DPPH dapat direaksikan dalam pelarut encer dan nonpolar organik dan dapat digunakan untuk menguji antioksidan hidrofilik dan lipofilik. Antioksidan dalam makanan dapat larut dalam air, larut dalam lemak, tidak larut dan terikat pada dinding sel dan mungkin tidak bebas untuk bereaksi dengan DPPH, reaksi akan

terjadi pada tingkat yang berbeda dan mengikuti perbedaan kinetik dan reaksi terkadang tidak mencapai hasil yang sempurna (Kedare dan Singh, 2011).

DPPH ( $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ) sebagai radikal bebas yang stabil mengalami delokalisasi elektron bebas pada molekul utuh sehingga molekul tidak terdimerisasi seperti yang biasanya terjadi pada radikal bebas lain. Ketika suatu larutan bercampur dengan DPPH dan ada substansi yang mampu mendonorkan atom hidrogen maka terjadi perubahan formasi yang mengakibatkan hilangnya warna ungu karena terbentuk warna kuning pucat yang menandakan keberadaan grup pikril (Molyneux, 2004).

Radikal bebas yang terbentuk akan direaksikan lebih lanjut dan mengatur stokiometri keseluruhan sehingga dihitung sebagai jumlah molekul DPPH yang tereduksi (dekolorisasi) oleh satu molekul pereduksi. Reaksi yang pertama terjadi akan memperkuat hubungan dengan reaksi dalam sistem oksidasi, seperti autooksidasi dari lemak atau substansi tidak jenuh lain (Molyneux, 2004). Gambar 3 menunjukkan DPPH dalam keadaan tidak radikal dan radikal.

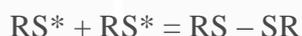


Gambar 3. Formasi DPPH sebagai radikal bebas (1) dan tidak radikal (2)  
Sumber : Molyneux (2004)

Metode DPPH pertama kali diperkenalkan 50 tahun lalu oleh Marsden Blois. Beliau menggunakan asam amino sistein yang mengandung thiol sebagai model antioksidan. DPPH dilambangkan dengan  $Z^*$  dan molekul sistein dilambangkan RSH sehingga reaksi yang terjadi adalah :

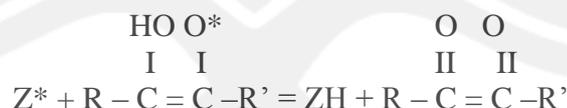
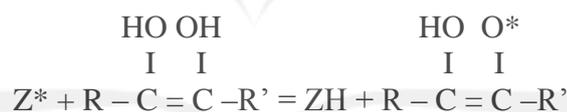


Radikal bebas  $RS^*$  kemudian akan bereaksi dengan molekul sejenis lain yang dihasilkan oleh reaksi paralel sehingga terjadi reaksi sebagai berikut :



Reaksi yang terjadi mengarah pada perolehan reduksi dari dua molekul DPPH oleh dua molekul sistein yang dinyatakan sebagai stokiometri 1:1 (Molyneux, 2004).

Jika molekul memiliki dua sisi untuk hidrogen yang berdekatan dan terhubung secara internal, seperti pada kasus asam askorbat (vitamin C), maka akan terjadi reaksi pemisahan lanjut setelah reaksi pertama terjadi :



Reaksi yang terjadi merupakan stokiometri 2:1, dua molekul DPPH direduksi oleh satu molekul asam askorbat. Stokiometri yang serupa terjadi pada reaksi dengan hidrokuinon (1,4-dihidroksibenzena) yang memproduksi kuinon (1,4-benzokuinon) melalui mekanisme reaksi dua langkah yang serupa (Molyneux, 2004).

Komponen yang aktif bereaksi dengan DPPH antara lain glutathion, amina aromatik (p-fenilen diamin dan p-aminofenol) dan  $\alpha$ -tokoferol (Vitamin E - stokiometri 2:1) dan komponen aromatik polyhidroksil (hidrokuinon dan pirogalol). Komponen lain seperti fenol monohidrat (tyrosin), gula sederhana (glukosa), purin dan primidin tidak bereaksi, sedangkan protein akan terpresipitasi. Pengencer yang biasanya digunakan adalah metanol atau etanol karena pengencer yang lain akan mengganggu reaksi (Molyneux, 2004).

Pembacaan absorbansi dari DPPH awal harus menghasilkan nilai kurang dari 1,0 (respon intensitas cahaya yang tereduksi tidak lebih dari 10 kali ketika melewati sampel). Panjang gelombang maksimum atau  $\lambda_{\max}$  yang digunakan bervariasi antara 515 nm – 520 nm. Meskipun demikian nilai absorbansi absolut tidak penting dan panjang gelombang dapat disesuaikan dengan absorbansi maksimum dari instrumen yang digunakan (Molyneux, 2004). Absorbansi DPPH pada 517 nm dalam metanol dan aseton berkurang 20 dan 35% selama 120 menit pada suhu 25°C di bawah cahaya sedangkan absorbansi tidak berkurang secara signifikan selama 150 menit dalam gelap. Evaluasi aktivitas antioksidan berdasarkan perubahan absorbansi DPPH harus hati-hati diinterpretasikan karena absorbansi DPPH pada 517 nm berkurang karena dipengaruhi cahaya, oksigen, pH dan tipe pelarut (Ozcelik dkk., 2003).

Pendekatan sederhana untuk interpretasi data adalah membandingkan absorbansi dengan konsentrasi substrat. Metode alternatif lain yang sering digunakan adalah persentase reduksi DPPH (Q) yang dikenal dengan “*inhibition*” atau “*quenching*” yang dihitung dengan rumus :

$$Q = 100 (A_0 - A_c) / A_0$$

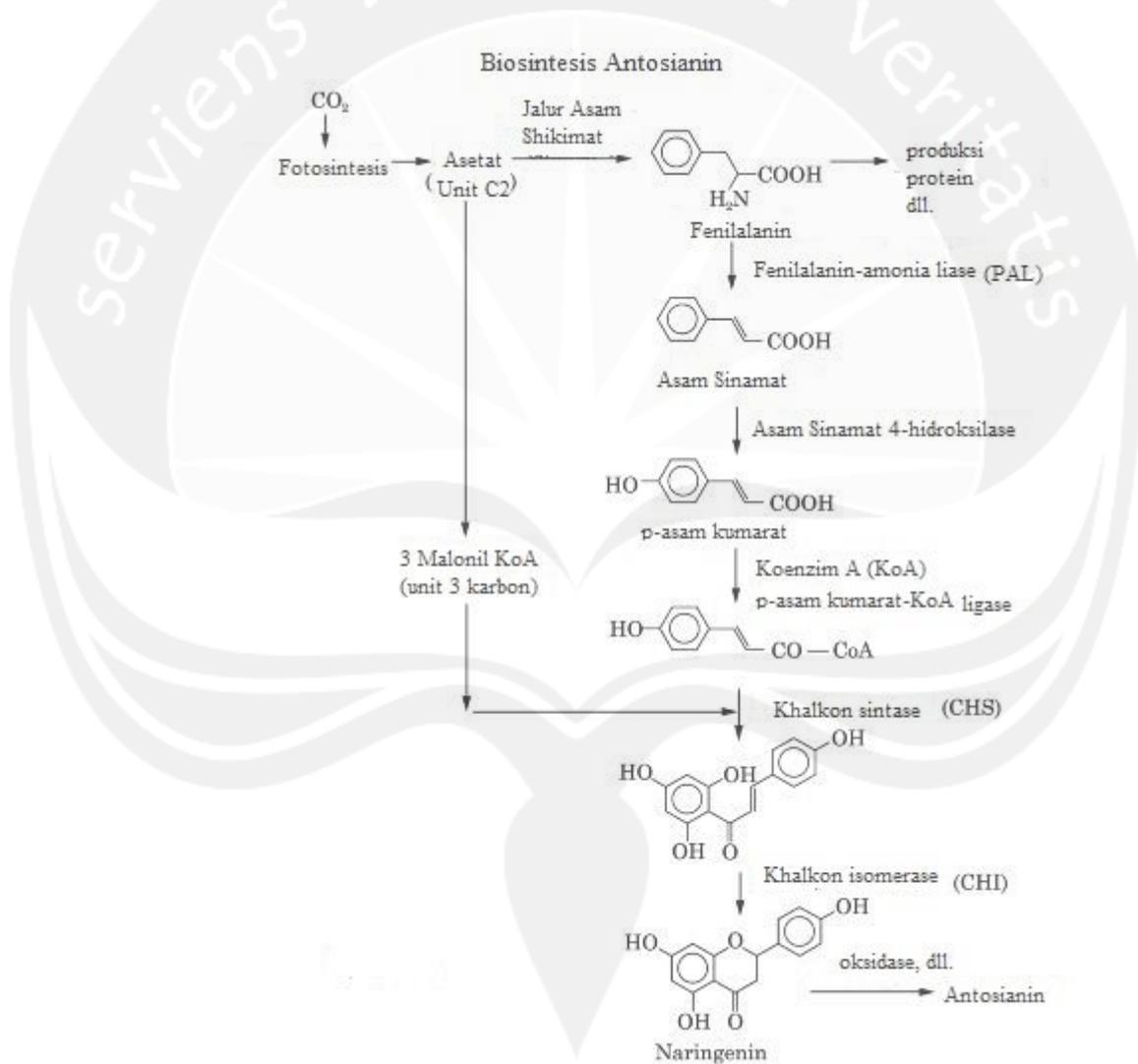
Lambang  $A_0$  adalah absorbansi awal dan  $A_c$  adalah nilai absorbansi terhadap penambahan sampel dengan konsentrasi  $c$  (Molyneux, 2004).

Hasil penelusuran dari beberapa literatur mengenai metode penentuan aktivitas pemerangkapan radikal bebas dengan DPPH menunjukkan perbedaan substansial pada pelarut yang digunakan, konsentrasi DPPH, nisbah antara volume sampel/reagen, durasi reaksi, panjang gelombang pada pengukuran absorbansi, larutan standar, dan perhitungan hasil. Penentuan pengaruh dari berbagai kondisi metode berdasarkan pengujian menunjukkan bahwa akurasi metode dipengaruhi oleh pelarut yang digunakan (etanol atau metanol) dan rasio volume sampel/reagen (1:1). Pengujian telah dilakukan pada sampel bir dan minuman lain terhadap DPPH. Nilai aktivitas pemerangkapan radikal bebas lebih tinggi pada penggunaan etanol dan lebih presisi dibandingkan penggunaan metanol. Aktivitas antioksidan utama dari bir berasal dari bahan baku yaitu malt dan teknologi pengolahan yang digunakan (Marinova dan Batchvarov, 2011).

#### **D. Peran dan Karakteristik Antosianin yang Terkandung dalam Tanaman**

Antosianin adalah senyawa fenolik yang masuk kelompok flavonoid dan berfungsi sebagai antioksidan, berperan penting, baik bagi tanaman itu sendiri maupun bagi kesehatan manusia. Kadar antosianin tinggi umumnya diperoleh pada padi yang warnanya mendekati hitam akibat reaksi pigmen antosianin terhadap pH yang menghasilkan warna ungu. Semakin tinggi kadar antosianin maka warna ungu pada bulir beras akan semakin pekat hingga menjadi warna kehitaman (Suliantini dkk., 2011).

Jalur Biosintesis antosianin telah dideskripsikan dalam *Arabidopsis* dan *Petunia* dan banyak gen yang sesuai telah dikloning. Biosintesis antosianin pada tanaman mengikuti jalur yang terlihat pada Gambar 4. Meskipun demikian biosintesis dalam beras relatif belum diketahui. Kim dkk. (2007) telah melakukan tahap awal penelitian mengenai ekspresi gen dalam dua kultivar dan meneliti pengaruh suhu dalam regulasi biosintesis antosianin.



Gambar 4. Jalur biosintesis antosianin dalam tanaman  
Sumber : Sulivan (1998)

Kim dkk. (2007), meneliti keterlibatan lima gen dalam biosintesis antosianin, yaitu fenilalanin amonia lyase (PAL), kalkon sintase (CHS), flavanon 3 $\beta$ -hidroksilase (F3H), dihidroflavonol 4-reduktase (DFR), dan antosianidin sintase (ANS). PAL adalah enzim pertama dalam jalur fenilpropanoat yang mengkonversi fenilalanin menjadi asam sinamat dan tirosin menjadi asam p-kumarat. Enzim CHS selanjutnya akan mengkatalisis langkah awal jalur flavonoid. Tiga enzim yang dikode oleh gen lain yaitu F3H, DFR, dan ANS akan langsung mengkonversi naringenin menjadi dihidrokaemferol (dihidroflavonol), leukopelargonidin (leukoantosianidin), dan pelargonidin (antosianin).

Kelima gen memberikan ekspresi yang tinggi dalam bulir beras sehingga akumulasi antosianin berhubungan dengan ekspresi dari gen yang terlibat dalam biosintesisnya. Penelitian dilanjutkan dengan melihat level transkripsi dari gen biosintesis selama pematangan benih (2, 7, dan 13 hari setelah pembungaan). Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan drastis dari ekspresi CHS, F3H, DFR, dan ANS selama pematangan benih. Pemantauan terhadap pengaruh suhu (21, 24, dan 27°C) terhadap ekspresi gen biosintesis antosianin ternyata menurunkan level transkripsi pada suhu 21°C apabila dibandingkan dengan benih dari pertumbuhan tanaman pada suhu 27°C (Kim dkk., 2007).

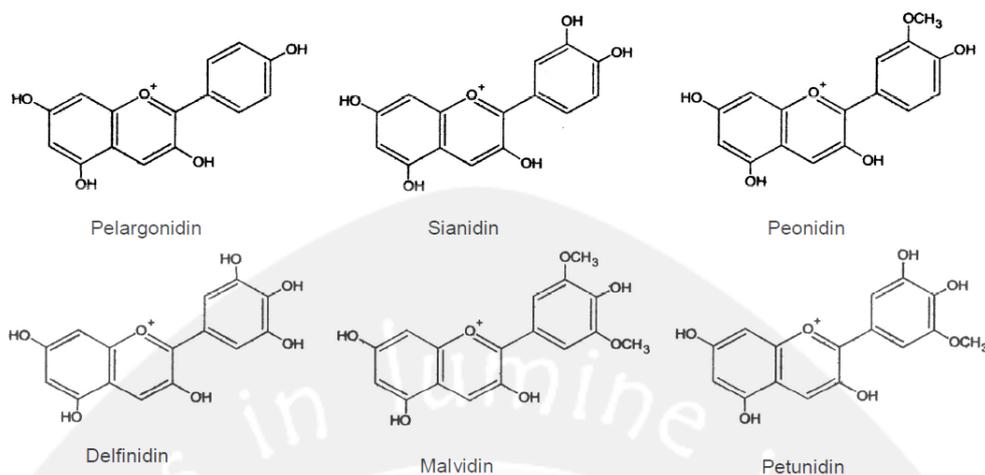
Biosintesis antosianin diregulasi dalam dua jalur. Jalur pertama adalah uridin difosfat-glukosa : flavonoid 2-O-glukotransferase (UFGT), sayangnya homolog UFGT yang berperan untuk mentransfer grup glukosa tidak ditemukan dalam beras. Jalur kedua adalah supresi (penekanan) ekspresi DFR dan ANS. Faktor transkripsi spesifik yang meregulasi biosintesis flavonoid dan antosianin

telah ditemukan dalam bonggol *Arabidopsis* dan *Petunia*. MYB tipe R2R3 menunjukkan kemampuan mengikat DNA dan interaksi protein-protein yang terlibat dalam biosintesis (Kim dkk., 2007).

Protein MYB berinteraksi dengan protein dasar *helix-loop-helix* (bHLH). Aktivasi jalur antosianin dalam bonggol bergantung pada hubungan antara protein MYB dan bHLH. Produksi antosianin dalam beras dimediasi oleh spesifik regulator transkripsi. Ekspresi berlebihan dari C1 (MYB protein) menghasilkan peningkatan kandungan flavonoid dalam beras. Faktanya, gen bHLH yang menginduksi jalur antosianin telah dikloning, namun interaksi antara MYB dan bHLH masih belum jelas (Kim dkk., 2007).

Secara kimiawi, antosianin merupakan turunan dari struktur aromatik tunggal yaitu sianidin yang terbentuk dari pigmen sianidin dengan penambahan atau pengurangan gugus hidroksil, metilasi atau glikosilasi. Antosianidin adalah aglikon antosianin yang terbentuk apabila antosianin dihidrolisis dengan asam. (Harborne, 1987). Enam antosianidin yang umum ditemukan di alam terutama dalam bahan pangan adalah pelargonidin, sianidin, peonidin, delphinidin, malvidin, dan petunidin dengan struktur dalam Gambar 5.

Antosianidin bersifat tidak stabil di air dan sedikit larut dibandingkan antosianin. Glikosilasi menjadikan pigmen lebih mudah larut dan stabil (Brouillard, 1982). Antosianin termasuk dalam kelompok flavonoid dari senyawa polifenol yang memiliki tipe rangka karbon  $C_6C_3C_6$ . Antosianin merupakan glikosida dari turunan polihidroksi dan polimetoksi kation 2-fenilbenzopirilium atau kation flavilium (Brouillard, 1982; Kong dkk., 2003).

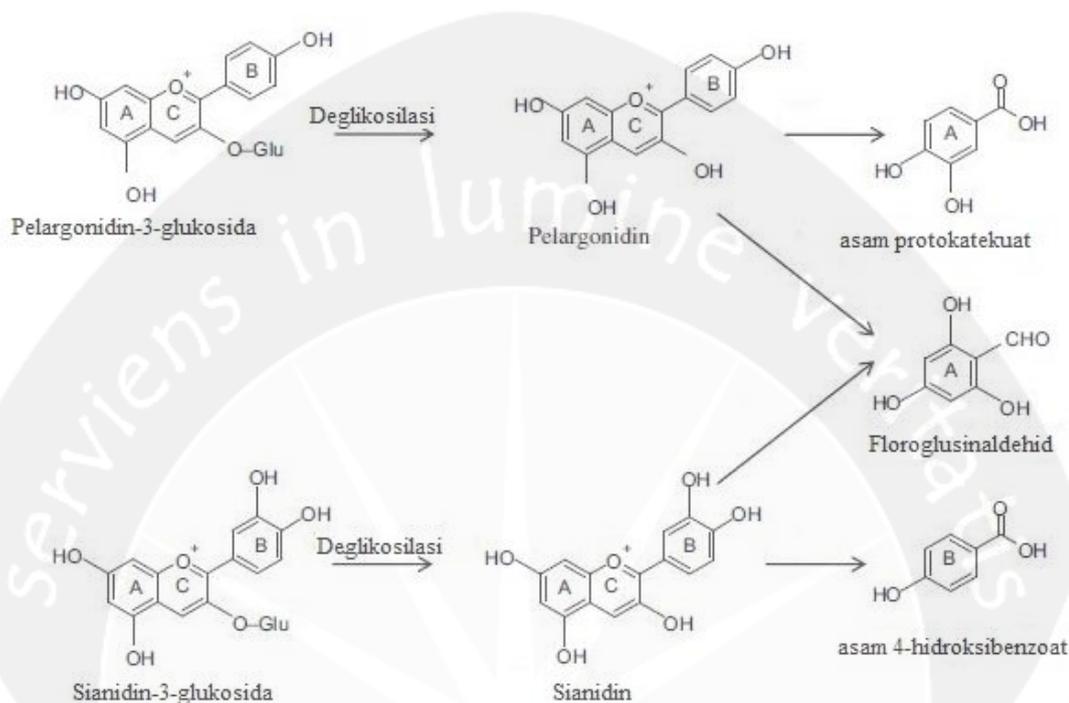


Gambar 5. Antosianidin umum pada bahan pangan  
Sumber : Brouillard, 1982

Antosianin secara umum tersusun dari aglikon (antosianidin), molekul gula, dan pada beberapa antosianin, residu gula diasilasi oleh asam-asam organik. Kebanyakan gugus gula adalah monosakarida seperti glukosa, galaktosa, ramnosa, xilosa, dan arabinosa. Di- dan trisakarida yang dibentuk oleh kombinasi dari monosakarida juga dijumpai. Gugus gula terletak pada C-3 dari aglikon. Pada diglikosida, dua monosakarida terletak pada C-3 dan C-5 dan jarang terletak pada C-3 dan C-7, tetapi ada kemungkinan 2 monosakarida keduanya terletak pada C-3. Pada triglikosida, monosakarida terletak pada aglikon dimana 2 monosakarida pada C-3 dan satu monosakarida pada C-5 atau C-7 (Brouillard, 1982).

Variasi struktur kimia ini dipengaruhi oleh perbedaan letak dari grup hidroksil dalam molekul, derajat metilasi dari grup OH, letak gula yang terikat pada molekul fenolik dan letak asam alifatik atau aromatik yang terikat. Gula terikat sebagai 3-monosida, 3-biosida, 3-triosida, 3,5-digliosida, 3,7-diglikosida. Degradasi terutama terjadi karena oksidasi, pemisahan ikatan kovalen atau peningkatan reaksi oksidasi akibat proses termal (Patras dkk., 2010). Degradasi

termal dari antosianin menghasilkan berbagai bentuk tergantung tingkat



pemanasan seperti yang terlihat pada Gambar 6.

Gambar 6. Mekanisme degradasi termal dari dua antosianin umum  
Sumber : Patras dkk. (2010)

Laju degradasi antosianin meningkat selama proses dan penyimpanan seiring dengan meningkatnya suhu yang akan membuka cincin pirilium dan formasi kalkon sebagai langkah awal degradasi. Antosianin akan terdekomposisi dengan pemanasan menjadi struktur kalkon yang akan ditransformasi lebih lanjut menjadi turunan kumarin glikosida yang kehilangan cincin B. Ikatan aglikon gula lebih labil dibanding ikatan glikosida lain pada pH 2-4 (Patras dkk., 2010).

Seperti kebanyakan pewarna alami lainnya, antosianin relatif bersifat tidak stabil dan umumnya antosianin lebih stabil dalam kondisi asam. Warna dan stabilitas antosianin sangat dipengaruhi oleh substituen gugus gula dan asil pada

aglikon (Elbe dan Schwartz, 1996). Antosianin mengalami degradasi dengan beberapa kemungkinan mekanisme yang mengubah warna antosianin menjadi produk larut tidak berwarna atau berwarna coklat serta produk tidak larut. Faktor-faktor utama yang mempengaruhi degradasi antosianin adalah struktur dan konsentrasi antosianin, pH, suhu, serta keberadaan oksigen, dan cahaya (Jackman dan Smith, 1996).

Banyak faktor yang mempengaruhi kandungan intrinsik antosianin yaitu spesies, lingkungan, dan faktor agronomik. Makanan yang mengandung antosianin tentunya melalui proses termal sebelum dikonsumsi dan proses ini akan berpengaruh pada kandungan antosianin produk. Proses termal makanan melibatkan pemanasan dengan suhu mulai 50-150°C serta tergantung pada pH produk dan masa simpan yang diinginkan (Patras dkk., 2010).

Tingkat dan durasi pemanasan memiliki pengaruh yang kuat terhadap stabilitas antosianin. Antosianin pada buah *elderberry* sangat sensitif terhadap pemanasan sehingga setelah tiga jam pemanasan, hanya 50% pigmen yang tertahan pada suhu 95°C. Beberapa penelitian menyatakan hubungan logaritmik dari kerusakan antosianin dengan hubungan aritmatika peningkatan suhu. Selain itu cara pemasakan seperti blansing, direbus, dan dikukus menghasilkan kehilangan sebesar 59%, 41%, dan 29% kandungan antosianin kubis merah (Patras dkk., 2010).

Sama seperti polifenol lain, antosianin terdegradasi secara enzimatik dengan keberadaan polifenol oksidase. Enzim ini dapat dinaktivasi dengan pemanasan ringan. Selain itu terjadinya ko-pigmentasi juga berperan dalam

stabilitas antosianin seperti pada kubis merah yang stabil terhadap pemanasan apabila dibandingkan dengan kulit anggur dan eldeberi karena ada perlindungan dari sistem flavilium melalui ko-pigmentasi. Stabilitas antosianin juga dipengaruhi oleh pH seperti pada wortel hitam (Patras dkk., 2010).

Antosianin dalam wortel hitam relatif stabil pada pemanasan dan perubahan pH karena adanya di-asilasi dari struktur antosianin. Asilasi molekul dipercaya meningkatkan stabilitas antosianin dengan melindunginya dari hidrasi. Sianidin-3-rutinosida dalam *blackcurrant* memperlihatkan stabilitas tertinggi terhadap efek perlakuan pemanasan pada suhu 95°C. Metoksilasi dari bagian asil akan meningkatkan integritas struktural terhadap panas. Tingkat degradasi antosianin meningkat seiring dengan peningkatan padatan terlarut selama pemanasan (Patras dkk., 2010).

Perlakuan saat penyimpanan juga berpengaruh pada degradasi antosianin. Kehilangan total antosianin monomerik disertai dengan peningkatan nilai warna polimerik. Kondisi ini menunjukkan bahwa antosianin terpolimerisasi secara ekstensif selama penyimpanan. Besarnya peningkatan nilai warna polimerik dan respon kehilangan antosianin monomerik dipengaruhi berbagai faktor, termasuk aktivitas enzim residual atau reaksi kondensasi dengan fenolik lain seperti flavan-3-ols atau poliflavan-3-ols. Asam fenolik seperti asam ferulat dan siringat juga dapat bereaksi dengan antosianin dalam jus stroberi dan rasberi (Patras dkk., 2010).

Antosianin dan komponen fenolik lain mudah teroksidasi sehingga rentan terhadap degradasi oksidatif dalam berbagai langkah proses dan penyimpanan.

Keberadaan oksigen dapat mempercepat degradasi antosianin melalui mekanisme oksidatif langsung atau melalui aksi enzim pengoksidasi. Enzim seperti PPO mengkatalisasi oksidasi asam klorogenat (CG) menjadi o-kuinon (CGQ) yang bereaksi dengan antosianin membentuk produk berwarna coklat. Sianidin 3-glukosida (antosianin ortho-difenolik) terdegradasi oleh mekanisme oksidasi berpasangan yang melibatkan o-kuinon hasil enzimatik dengan ko-substrat o-difenolik (Patras dkk., 2010).

Menurut Patras dkk. (2010), antosianin pelargonidin-3-glukosida terdegradasi dengan mekanisme yang melibatkan reaksi antara o-kuinon atau produk sekunder hasil oksidasi dari kuinon dan pigmen antosianin. Degradasi sianidin-3-glukosida dan malvidin-3-glukosida menghasilkan asam kafeoltartarat dan gugus antosianin. Produk degradasi ini secara bertahap tergantikan oleh produk tidak berwarna dari hasil degradasi oksidatif. Bentuk hemiasetal dari pigmen lebih reaktif dibanding bentuk flavilum.

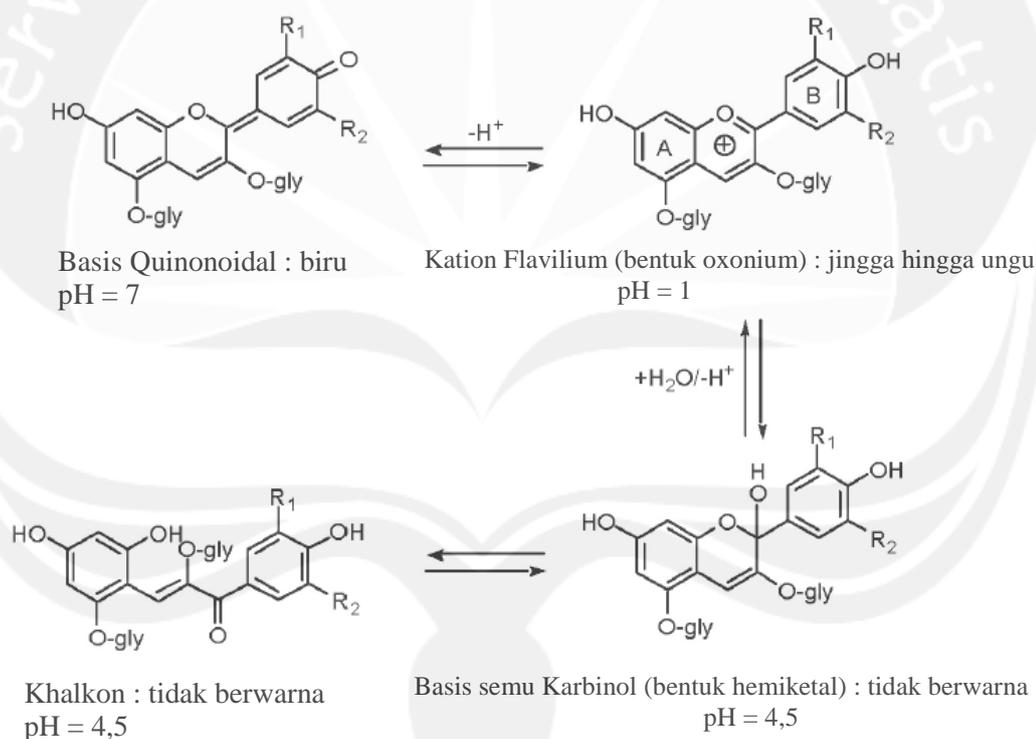
Secara umum, faktor yang berpengaruh selama preparasi, proses, dan penyimpanan meliputi pH, suhu, cahaya, oksigen, ion logam, enzim, dan gula-gula. Selama penyimpanan produk hasil pengalengan, pelargonidin-3-glukosida (antosianin utama dalam stroberi) dapat terhidrolisis oleh asam menjadi pelargonidin dan terdegradasi lanjut menjadi asam hidrobenzoat. Degradasi sangat cepat terjadi pada suhu penyimpanan 37°C dan penyimpanan dalam lemari pendingin menurunkan degradasi antosianin. Stabilitas antosianin yang lebih tinggi diperoleh dengan menggunakan suhu yang lebih rendah dan pemanasan

dengan waktu yang lebih singkat selama proses dan penyimpanan (Patras dkk., 2010).

Selain sebagai pewarna, antosianin juga memiliki peranan penting untuk kesehatan manusia (Kong dkk., 2003). Konsumsi bahan pangan dan minuman yang mengandung antosianin dapat mengurangi resiko dari beberapa penyakit degeneratif seperti aterosklerosis, penyakit jantung, kanker, dan diabetes. Antosianin dikenal sebagai senyawa penangkap radikal bebas dan juga dilaporkan potensial sebagai agensia kemopreventif (Jayaprakasam dkk., 2005). Beberapa penelitian telah melaporkan aktivitas biologis dari antosianin seperti aktivitas antioksidan dan pemerangkapan radikal (Kong dkk., 2003; Bao dkk., 2005), antiinflamasi, antikarsinogenik (Katsube dkk., 2003); antitumor (Kong dkk., 2003), antidiabetik (Jayaprakasam dkk., 2005), neuroprotektif (Galli dkk., 2002), antimutagenik, dan hepatoprotektif (Kong dkk., 2003). Antosianin juga dapat mengurangi resiko penyakit jantung koroner melalui penghambatan agregasi platelet (Ghiselli dkk., 1998) dan penghambatan oksidasi lipoprotein LDL (*low density lipoprotein*) (Heinonen dkk., 1998).

Metode perbedaan pH telah digunakan dalam teknologi pangan untuk menguji kualitas kesegaran dan proses pada buah-buahan dan sayur-sayuran. Metode ini dapat digunakan untuk menentukan kandungan total monomer antosianin berdasarkan perubahan struktural kromofor antosianin antara pH 1,0 dan 4,5 yang terlihat pada Gambar 7. Antosianin monomerik mengalami perubahan struktural yang reversibel yaitu bentuk oksonium berwarna pada pH 1,0 dan bentuk hemiketal tidak berwarna pada pH 4,5 (Lee dkk., 2005).

Perbedaan absorbansi pada  $\lambda_{\text{vis-max}}$  (520 nm) dari pigmen akan proporsional dengan konsentrasi pigmen. Antosianin yang terdegradasi dalam bentuk polimerik lebih tahan terhadap perubahan warna pada perubahan pH. Oleh sebab itu, pigmen antosianin polimerik tidak diukur dengan metode ini karena akan mengabsorpsi cahaya baik pada H 4,5 dan 1,0. Kandungan pigmen dihitung dengan menggunakan berat molekul dan koefisien ekstingsi molar dari antosianin mayor dalam matriks. Matriks alami biasanya mengandung campuran antosianin dan proporsi dari antosianin yang ada akan bervariasi (Lee dkk., 2005).



Gambar 7. Bentuk struktural antosianin pada perbedaan aras ph  
Sumber : Lee dkk., 2005

### E. Biosintesis dan Peran Fenolik sebagai Antioksidan

Fenolik atau polifenol berasal dari kata poli (banyak) dan fenol (senyawa fenol) sehingga polifenol dapat dikatakan sebagai suatu senyawa yang terdiri dari

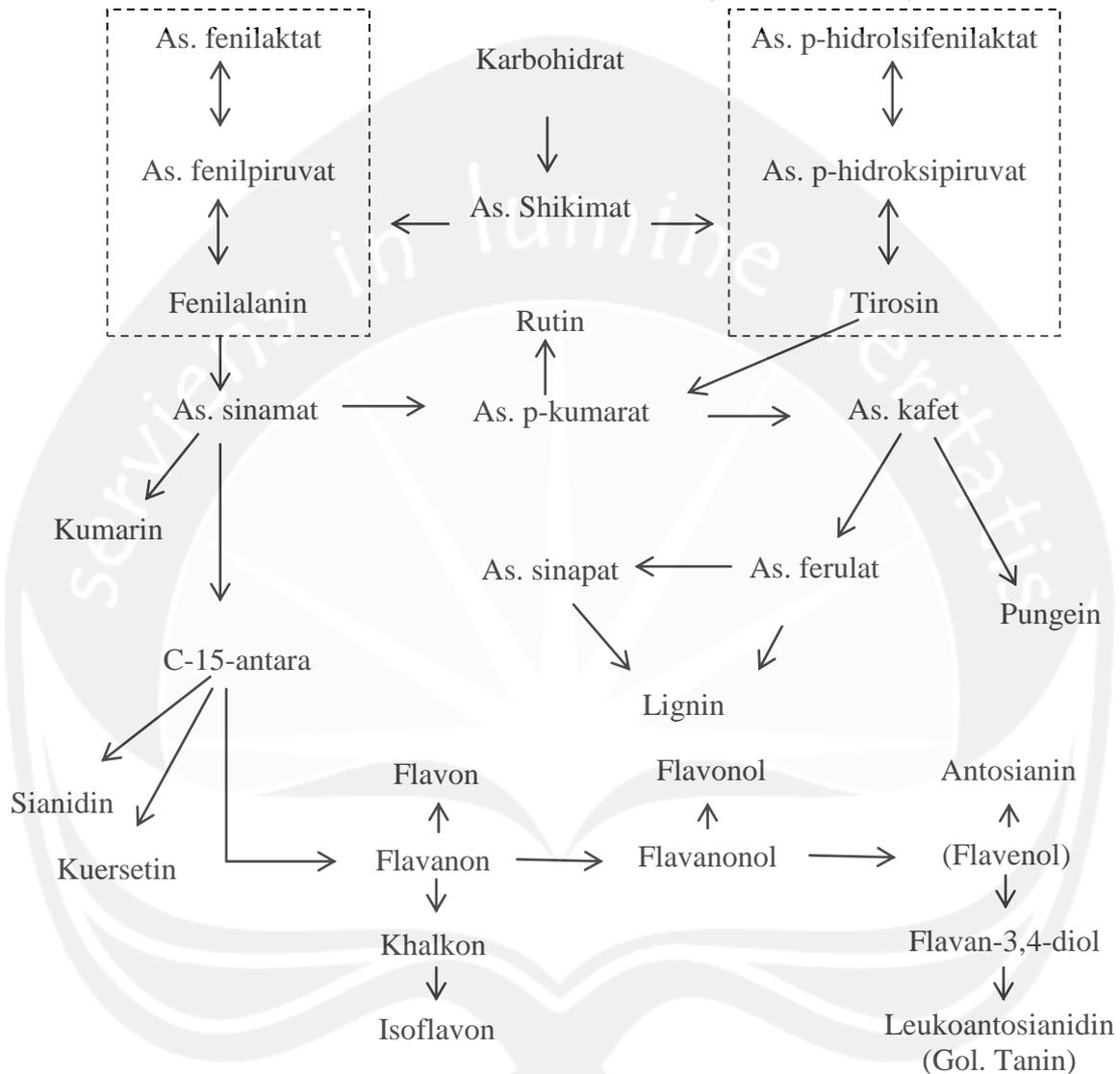
gugus-gugus fenol yang banyak. Polifenol merupakan suatu senyawa yang terjadi dari polimerisasi fenol yang begitu kompleks dan umumnya mempunyai rantai panjang. Pembentukan polifenol dalam tanaman dimulai dengan proses fotosintesis melalui terbentuknya karbohidrat yang melalui jalur asam shikimat menjadi fenilalanin dan tirosin. Salah satu jalur dari bentuk fenilalanin dan tirosin akan membentuk golongan fenilpropanoid (Makfoeld, 1992).

Tanaman mengandung berbagai komponen fenolik yang diturunkan dari fenilpropanoat dan fenilpropanoat-asetat. Jalur fenilpropanoat adalah salah satu metabolisme sekunder yang penting. Fenilalanin di awal akan masuk ke dalam biosintesis lignin, flavonoid, dan kumarin. Lignin adalah komponen utama dari dinding sel yang menguatkan struktur sel. Flavonoid terdiri dari berbagai grup dari sekitar 6000 komponen dan terbagi dalam subgrup antosianin, proantosianin atau tanin terkondensasi, dan isoflavonoid. Kumarin berperan sebagai pelindung bakteri dan jamur patogen (Kim dkk., 2007).

Ada jalur khusus melalui amonialisasi dan hidroksilasi-metilasi yang membentuk turunan-turunan asam sinamat. Asam sinamat merupakan senyawa kunci terbentuknya berbagai fenolat lain. Asam sinamat dengan bantuan asetil-koA akan membentuk senyawa inti C-15-antara yang juga merupakan kunci pembentukan golongan flavonoid, antosianin, golongan tanin seperti yang ditunjukkan pada Gambar 8 (Makfoeld, 1992).

Fenolik tanaman menarik perhatian peneliti karena manfaatnya untuk kesehatan manusia. Isoflavonoid dan stilbene diketahui berperan sebagai fitoestrogen yang mempengaruhi respon yang dimediasi oleh estrogen. Flavonoid

dapat menghalangi pertumbuhan sel kanker dengan meningkatkan aktivitas antioksidan, anti inflamasi, dan aktivitas vaskuler (Kim dkk., 2007).



Gambar 8. Biosintesis polifenol dan fenolat dari jalur asam sikimat  
Sumber : Makfoeld (1992)

Fenolik bertanggung jawab penuh atas kapasitas oksigen dalam kebanyakan produk dengan bahan baku tanaman seperti fermentasi anggur. Selain kandungan karoten, antioksidan dalam pangan adalah fenolik sehingga pengujian total fenol perlu dilakukan. Pengujian total fenol yang umum digunakan adalah metode menggunakan reagen Folin-Ciocalteu (FC). Reagen FC dibuat dengan

campuran sodium tungstat ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), sodium molibdat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), HCl, 85% asam fosforik, dan  $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  yang menghasilkan larutan berwarna kuning yang jernih. Hasil pengukuran biasanya dinyatakan setara dengan asam galat (GAE). Asam galat digunakan karena tidak mahal, larut dalam air, mudah terekristalisasi, kering, dan stabil dalam bentuk kering (Singleton dkk., 1999).

Reaksi kimia dari tungstat dan molibdat sangat rumit. Senyawa isopolifosfat dalam keadaan tidak berwarna apabila keenam valensi ( $6^+$ ) logamnya teroksidasi sempurna dan komponen molibdenum analog berwarna kuning. Kedua senyawa ini membentuk campuran heteropolitungstat-molibdat. Campuran ini berada dalam larutan asam dengan kompleks oktahedral terhidrasi dari oksidator logam terkoordinasi di sekeliling fosfat pusat. Reduksi dari satu atau dua elektron akan memunculkan senyawa biru seperti  $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{-4}$ . Pada prinsipnya, penambahan elektron ke orbital yang tidak terikat akan mereduksi nominal  $\text{MoO}^{+4}$  menjadi isostruktural  $\text{MoO}^{+3}$  (Singleton dkk., 1999).

Struktur tungstat cenderung mudah direduksi, namun cukup transfer satu elektron. Kondisi ketidakberadaan molibdenum membuat fosfatungstat digunakan untuk menentukan fenol orto-dihidrat secara selektif tanpa melibatkan monofenol atau meta-dihidrat. Molibdat cenderung mudah direduksi menjadi senyawa biru yang dapat berupa  $\text{Mo}^{+6}$  atau  $\text{Mo}^{+5}$  yang stabil. Puncak absorpsi berkisar pada kemurnian senyawa biru. Luasnya puncak ini dan tidak adanya komponen dalam sampel biologi yang dapat mengabsorpsi pada daerah ini membuat analisis dilakukan pada panjang gelombang 760 nm. Warna biru yang terbentuk pada suhu ruang berasal dari reaksi turunan fenolik yang terdata sebanyak 29 monofenol, 22

katekol, 11 pirogalol, 4 floroglusinol, 9 resorsinon, 9 *para*-hidrokuinol, 11 naftol, 6 antrasenes, 17 aglikon flavonoid, 9 glikosida, 5 hidroksikumarin, 7 aminofenol, dan 19 substansi nonfenolik (Singleton, 1999).

Pengujian total fenol dengan metode Folin-Ciocalteu dilakukan pada 16 sampel anggur merah dari Yunani yang diproduksi dari satu atau lebih varietas anggur. Hasil total fenol yang terkandung dalam anggur berkisar antara 1360 ppmGAE hingga 3820 ppm GAE (Gougoulis dkk., 2010). Total fenol dari 38 anggur merah yang dijadikan sampel secara acak berkisar antara 1.648 mg/L – 4.495 mg/L. Secara keseluruhan, kandungan fenol yang tinggi tidak menghasilkan aktivitas pemerangkapan radikal bebas yang tinggi. Hal ini berkaitan dengan kemampuan reagen Folin-Ciocalteu yang dapat bereaksi dengan vitamin, thiol, dihidroksiaseton, garam tidak organik, dan komponen yang mengandung nitrogen. Kemampuan komponen fenolik untuk memerangkap radikal bebas tergantung pada struktur dari fenol (Lugemwa dkk., 2013).

Beberapa komponen fenolik telah diidentifikasi dalam beras. Komponen fenolik berhubungan dengan perikarp pada beras walaupun penggilingan mengurangi konsentrasi dari komponen dalam butiran beras. Butiran beras dengan warna perikarp yang gelap seperti beras merah dan hitam akan mengandung kandungan polifenol yang tinggi. Butir padi dengan warna perikarp coklat muda mengandung fenolik dengan berat molekul rendah (85%) sedangkan beras merah dan hitam mengandung komponen dengan berat molekul yang lebih tinggi (Walter dan Marchesan, 2011).

Beras dengan perikarp berwarna hitam mengandung fenolik berupa antosianin sianidin-3-O- $\beta$ -D-glukosida dan peonidin-3-O- $\beta$ -D-glukosida. Komponen lain yang teridentifikasi termasuk antosianidin sianidin dan malvidin, antosianin pelargonidin-3,5-diglukosida dan sianidin-3,5-diglukosida serta asam fenolik seperti asam ferulik, kafeat, dan protokatekuat. Total fenolik yang terkandung pada beras hitam sekitar 1,90 – 50,32 mg GAE/g (Walter dan Marchesan, 2011).

Menurut Velkov dkk. (2007), fungsi antioksidan sebagai pemerangkap radikal bebas ( $R^*$ ) terbagi dalam jalur berbeda di organisme tingkat atas. Antioksidan mencegah kerusakan kimia dalam sel dan mencegah keberadaan penyakit seperti kanker, atherosclerosis, inflamasi, dan sebagainya. Reaksi pemerangkapan antioksidan fenolik diilustrasikan sebagai berikut :



Molekul antioksidan berubah menjadi radikal yang tidak memiliki kapasitas untuk mengawali rantai proses radikal yang tidak diinginkan. Radikal ini mengambil peran dalam pemerangkapan radikal aktif yang disebut pemerangkapan radikal kedua yang diilustrasikan sebagai berikut :



Mekanisme reaksi pada langkah pertama masih menjadi perdebatan, namun banyak variasi alternatif yang dapat didiskusikan dalam literatur, yaitu transfer langsung atom H, transfer elektron yang diikuti transfer proton, hilangnya proton bertahap, dan transfer elektron dan sebagainya (Velkov dkk., 2007).

Reaksi dalam pelarut polar lebih memungkinkan terjadinya mekanisme transfer elektron-proton dua langkah dibandingkan pemindahan atom hidrogen (satu langkah). Penelitian telah dilakukan terhadap 20 antioksidan fenolik terhadap aktivitas pemerangkapan DPPH yang dinyatakan dalam aktivitas relatif pemerangkapan (%RSA). Penelitian aktivitas pemerangkapan menggunakan etanol sebagai pelarut. Tiga parameter yang digunakan sebagai pendeskripsi reaksi adalah kedudukan orbital molekuler tertinggi (HOMO) dari komponen, panjang ikatan C-O, dan densitas putaran atom dari atom oksigen dalam radikal. Hasil aktivitas pemerangkapan antioksidan fenolik disajikan dalam Tabel 1 (Velkov dkk., 2007).

Tabel 1. Aktivitas antioksidan 20 senyawa fenolik

No	Komponen	RSA, %SA	Energi HOMO, eV (E)	Panjang C-O, Å(BL)	Densitas putaran atom O (SD)
1	Asam Dihidrokafeat	93,9	-0,2221	1,2601	0,3461
2	Asam Rosmarinat	88,4	-0,2212	1,2523	0,2856
3	Asam Kafeat	76,6	-0,2291	1,2843	0,3801
4	Asam Klorogenat	52	-0,2270	1,2528	0,2869
5	Asam Sinapat	56,1	-0,2238	1,2453	0,3151
6	Asam Ferulat	30,9	-0,2226	1,2515	0,3159
7	Asam Isoferulat	3,5	-0,2243	1,2510	0,3754
8	Asam p-kumarat	3,6	-0,2336	1,2497	0,3350
9	Hidroksitirosol	57,0	-0,2195	1,2603	0,3446
10	Oleuropein	41,3	-0,2218	1,2599	0,3405
11	Tirosol	2,7	-0,2256	1,2594	0,4049
12	A-tokoferol	54,0	-0,1927	1,2603	0,3511
13	Trolox	53,4	-0,1975	1,2597	0,3552
14	TBHQ	58,7	-0,2099	1,2588	0,3621
15	BHA1	22,3	-0,2064	1,2598	0,3794
16	BHA2	22,3	-0,2058	1,2592	0,3577
17	BHT	8,0	-0,2294	1,2575	0,3476
18	Asam o-kumarat	3,5	-0,2376	1,2518	0,3698
19	Asam m-kumarat	2,6	-0,2421	1,2597	0,4234
20	Asam Sinamat	0,5	-0,2495	1,2706	0,5507

Sumber : Velkov dkk., 2007

Berdasarkan hasil penelitian Velkov dkk. (2007), ada korelasi linear antara aktivitas pemerangkapan dan densitas putaran. Syarat prediksi aktivitas pemerangkapan antara lain :

1. Kemampuan grup O-H yang masuk dalam sistem aromatik. Syarat ini berasal dari pengaruh yang kuat dari aktivitas pemerangkapan dengan delokalisasi densitas putaran. Keberadaan cincin benzena adalah kondisi yang cukup dalam aktivitas.
2. Terjadinya substitusi positif mesomerik dan efek elektronik induktif. Substitusi meningkatkan reduksi komponen. Alkil dan grup metoksi mesomerik memberikan efek induktif yang positif yang memiliki fungsi tertentu.
3. Keberadaan ikatan hidrogen (DHG) dan grup fungsional. Ikatan hidrogen dari DHG oksigen dan hidrogen dari grup hidroksi dinyatakan efektif.

#### **F. Kualitas Organoleptik dari Anggur Beras**

Anggur tape ketan telah dikenal sejak berabad-abad yang lalu di Indonesia dan digunakan dalam perjamuan lepas panen. Anggur tape ketan yang disebut brem di Bali mempunyai peranan penting untuk upacara-upacara keagamaan dan pembuatan obat-obatan secara tradisional sehingga minuman ini banyak digunakan dalam dunia kepariwisataan. Anggur beras di Jepang disebut sake sedangkan di Filipina dinamakan tapuy (Mika dan Winarno, 1983).

Anggur beras ketan adalah minuman beralkohol yang diperoleh dari peragian beras ketan yang telah dimasak, dengan atau tanpa penambahan bahan makanan lain dan bahan tambahan makanan yang diizinkan. Syarat mutu anggur

beras ketan tersaji dalam Tabel 2. Aroma menentukan kualitas dari anggur beras melalui keberadaan komponen volatil yang dihasilkan selama fermentasi (Palaniveloo dan Vairappan, 2013).

Tabel 2. Spesifikasi persyaratan mutu anggur beras ketan

Jenis Uji	Persyaratan
Bau	Khas anggur ketan
Rasa	Normal
Etanol	Maksimal 8-15%
Metanol	Negatif

Sumber : SNI 01-4984, 1999

Anggur beras biasanya dibuat dari beras putih atau ketan putih dan didestilasi setelah fermentasi alkohol dan menghasilkan minuman keras jernih dengan rasa yang hambar. Jenis lain dari anggur beras menggunakan ketan hitam yang difermentasi dan tidak didestilasi sehingga dijual dalam keadaan keruh yang mengandung endapan atau dalam keadaan telah disaring. Biasanya kandungan alkohol dari anggur yang tidak didestilasi sekitar 7-10% sehingga belum cukup untuk mengawetkan anggur dari mikroorganisme yang tidak diinginkan. Anggur ketan hitam menarik karena berwarna coklat kemerahan dan memiliki cita rasa *sherry-like* yang semakin menarik perhatian. Anggur beras ini dua kali lipat lebih mahal dibanding anggur yang jernih karena mahalanya harga ketan hitam (Dung, 2013).

Kualitas, aroma, dan rasa anggur dipengaruhi oleh komposisi hidrokarbon volatil dan produksi metabolit sekunder selama fermentasi. Ada sekitar 16 volatil organik yang terdeteksi dalam anggur beras. Komponen volatil dikelompokkan menjadi alkohol, asetal heterosiklik, alkana, alkena, dan asam organik. Alkohol yang terdapat dalam sampel anggur adalah isoamil alkohol, 1-butanol, dan

feniletilalkohol. Isoamil adalah produk sampingan yang dihasilkan oleh sebagian besar strain *S. cerevisiae* sementara feniletil alkohol dapat menjelaskan aroma dari anggur yang dihasilkan. Feniletil alkohol adalah komponen yang memberikan aroma mirip bunga (Palaniveloo dan Vairappan, 2013).

Asam laktat juga ditemukan dalam anggur beras dengan komposisi rata-rata 14%. Volatil yang terdeteksi adalah hidrokarbon dan 1,3-dioxolane. Senyawa 1,3-dioxolane adalah hasil asetilasi asetaldehid dan gliserol. Komponen ini dapat menjadi indikator umur anggur. Asam organik yang terkandung dalam fermentasi ketan adalah asam asetat, asam palmitat, dan asam 9,12-oktadekanoat ditambah dengan 6-oktadekanoat, heksadekanoat, dan asam tetradekanoat. Keberadaan asam asetat menjelaskan adanya rasa asam dalam fermentasi (Palaniveloo dan Vairappan, 2013).

Hidrokarbon yang dihasilkan dalam fermentasi dipengaruhi terutama oleh tipe beras. Hidrokarbon yang terbentuk berasal dari membran luar gabah atau hasil antara fermentasi. Keberadaan khamir dan bakteri asam laktat yang berasal dari kultur starter dalam ragi berperan penting karena volatil adalah produk sampingan dari fermentasi dari kedua mikrobia ini (Palaniveloo dan Vairappan, 2013).

Penggunaan tipe beras sebagai bahan baku dalam fermentasi juga akan mempengaruhi kuantitas dan kualitas dari anggur beras. Ketan secara instan adalah sumber yang kaya akan pati, protein, dan berbagai elemen mikro yang akan digunakan oleh mikrobia selama proses fermentasi untuk menghasilkan anggur beras yang lebih banyak. Ada pola konsisten bahwa ketan menghasilkan

dua kali volume anggur beras dibanding beras pada umumnya. Volume anggur yang lebih banyak dipengaruhi oleh kandungan pati yang lebih tinggi dalam ketan. Rasa dan kualitas anggur yang dihasilkan juga dipengaruhi resep dari produsen lokal yang bergantung pada ketersediaan bahan mentah dan kultur starter (Palaniveloo dan Vairappan, 2013).

Penilaian terhadap kualitas sensori dari anggur beras dilakukan dengan evaluasi sensori. Evaluasi sensori atau organoleptik adalah penggunaan indera manusia untuk mengukur tekstur, penampakan, aroma, dan flavor produk pangan. Uji organoleptik oleh panelis (pencicip) perlu dilakukan untuk menentukan penerimaan suatu produk oleh konsumen. Pada prinsipnya terdapat 3 jenis uji organoleptik, yaitu uji perbedaan (*discriminative test*), uji deskripsi (*descriptive test*), dan uji afektif (*affective test*) (Anonim, 2006).

Uji perbedaan bertujuan untuk memeriksa apakah ada perbedaan di antara contoh-contoh yang disajikan. Uji deskripsi digunakan untuk menentukan sifat dan intensitas perbedaan tersebut. Kedua kelompok uji ini membutuhkan panelis yang terlatih atau berpengalaman. Uji afektif didasarkan pada pengukuran kesukaan (atau penerimaan) atau pengukuran tingkat kesukaan relatif. Pengujian afektif membutuhkan jumlah panelis yang tidak perlu dilatih dalam jumlah yang banyak yang dianggap mewakili kelompok konsumen tertentu. Pengujian ini akan mengukur sikap subjektif konsumen terhadap produk berdasarkan sifat-sifat organoleptik. Hasil yang diperoleh adalah penerimaan (diterima atau ditolak), kesukaan (tingkat suka atau tidak) atau pilihan (pilih satu dari yang lain) terhadap produk (Anonim, 2006).

Metode afektif terdiri atas uji perbandingan pasangan (*paired comparison*), uji hedonik, dan uji peringkat. Uji hedonik merupakan pengujian yang paling banyak digunakan untuk mengukur tingkat kesukaan terhadap produksi. Tingkat kesukaan ini disebut skala hedonik, misalnya sangat suka, suka, agak suka, agak tidak suka, tidak suka, sangat tidak suka, dan lain-lain. Skala hedonik dapat direntangkan atau diciutkan menurut rentangan skala yang dikehendaki. Dalam analisis data, skala hedonik ditransformasikan ke dalam skala angka dengan angka menurut tingkat kesukaan (5, 7 atau 9 tingkat) yang dapat dilakukan analisa statistik (Anonim, 2006).

Uji peringkat memerlukan 3 atau lebih contoh untuk diurutkan secara menurun atau meningkat oleh panelis berdasarkan tingkat kesukaannya. Panelis diminta mengurutkan peringkat kesukaan secara keseluruhan terhadap atribut tertentu seperti warna atau flavor. Sampel diberi kode dan disajikan secara seragam bersamaan kemudian sampel diurutkan berdasarkan tingkat kesukaan oleh panelis (Anonim, 2006).

#### **G. Proses Fermentasi Etanol dalam Pembuatan Anggur Beras**

Fermentasi adalah metode transformasi tertua yang digunakan untuk mengawetkan dan meningkatkan cita rasa, aroma, dan nilai nutrisi pangan. Fermentasi beras untuk menghasilkan minuman beralkohol adalah proses kuno yang dilakukan di kebanyakan negara-negara Asia (Palaniveloo dan Vairappan, 2013). Salah satu minuman beralkohol hasil peragian beras ketan adalah tuak asli Dayak. Pembuatan tuak memerlukan keterampilan dan kesabaran sehingga kebanyakan dilakukan oleh kaum perempuan yang mewarisinya turun temurun

dari keluarganya. Tidak diketahui pasti mulai kapan orang Dayak mengenal teknologi fermentasi tuak karena sudah menjadi bagian dari tradisi selama beratus-ratus tahun (Simanjuntak, 2010).

Anggur beras dibuat dan digunakan selama upacara kebudayaan oleh suku Dayak yang tersebar di pulau Kalimantan. Anggur beras ini dibuat pada umumnya dari beras ketan dengan variasi starter sesuai dengan kesukaan. Pembuat minuman menggunakan tiga kultur starter yang berbeda yaitu pahit, pahit-manis dan manis. Strain mikrobia yang digunakan dalam setiap kultur itu sama namun bervariasi densitasnya. Penambahan bumbu seperti kayu manis, lada, cabai kering, dan herba lokal menghasilkan cita rasa yang unik (Palaniveloo dan Vairappan, 2013).

Pembuatan tuak dayak memerlukan ragi tuak yang dicampur dengan bahan beras. Ragi digunakan sebagai sumber mikrobia yang ditambahkan ke dalam bahan sebagai pelaku fermentasi alkohol. Khamir selama ini dikenal sebagai mikrobia pangan yang menguntungkan bagi manusia karena dapat membuat adonan roti mengembang dan berperan dalam fermentasi minuman beralkohol seperti bir, anggur dan sake. Tidak seperti bakteri, khamir tidak dianggap sebagai agen penyebab penyakit melalui makanan (Junaidah dan Bakar, 2000).

Khamir dapat tumbuh pada kisaran pH yang luas (pH 1,5 – 11) dan hidup hingga kadar etanol 18%. Kemampuan beberapa khamir untuk mengkonversi glukosa menjadi etanol dan komponen volatil lain membuat organisme ini penting dalam fermentasi alkohol. Alkohol tingkat tinggi, ester, dan komponen lain berkontribusi pada aroma dari pangan fermentasi seperti tape dan bersama dengan asam dan gula yang terdapat selama fermentasi akan berkontribusi pada cita rasa

pangan. Khamir seringkali ditemukan bersama mikroorganisme lain sebagai bagian dari kultur starter. Kultur starter dapat berupa campuran berbagai tipe mikroorganisme atau satu kultur murni dari organisme yang digunakan untuk memulai proses fermentasi (Junaidah dan Bakar, 2000).

Total mikrobial yang terkandung dalam starter akan memegang peranan penting dalam dinamika fermentasi. Variasi kandungan bakteri terbukti berpengaruh pada pertumbuhan mikrobial selama fermentasi dan hubungannya dengan reduksi berat *rice cake*, volume, dan pH dari anggur yang dihasilkan. Aras pH yang rendah dalam anggur beras dipengaruhi oleh keberadaan alkohol, berbagai asam organik, dan hasil sampingan selama proses anaerobik (Chiang dkk., 2006). Kandungan mikrobial dari setiap kultur starter bervariasi pada densitasnya namun diversitas strain serupa antar kultur. Perbedaan densitas mikrobial dari starter dipengaruhi oleh herba sebagai promotor atau inhibitor dinamika mikrobial. Bumbu dan herba diketahui dapat meningkatkan aroma, rasa, dan mencegah pertumbuhan dari mikroorganisme yang tidak diinginkan (Dung dkk, 2005).

Ragi tape adalah kultur starter yang mengandung berbagai mikroorganisme termasuk bakteri, kapang, dan khamir yang melakukan pemecahan enzimatik pada substrat pati (beras atau singkong) dalam fermentasi tape. Salah satu organisme yang ada dalam fermentasi tape adalah khamir *Saccharomyces fibuligera*. Khamir ini seringkali diisolasi dari ragi dan produknya (Junaidah dan Bakar, 2000). *S. fibuligera* kerap ditemukan dalam substrat yang mengandung pati dan merupakan khamir pemecah pati dalam

berbagai pangan fermentasi yang menggunakan beras dan singkong. Khamir ini berasal dari makanan dan merupakan khamir *dimorphous* yang memperbanyak diri melalui pertunasan multipolar dan pembentukan miselium (Chi dkk., 2009).

Genus *Saccharomycopsis* dapat membentuk sel-sel khamir, pseudomiselium (dengan keberadaan metionin) dan miselium sejati dengan blastopora dalam keadaan berlimpah. Artrospora dapat terbentuk dan hifa yang bersepta memiliki plasmodesmata. Pembentukan askus diawali dengan terjadinya konjugasi antara sel-sel khamir, antara sel-sel hifa atau antara blastospora. Askospora berbentuk sperikel seperti topi, halus atau berkulit dengan pinggiran yang tidak teratur. Beberapa spesies dalam genus *Saccharomycopsis* ada yang mampu memfermentasikan glukosa dan ada pula yang tidak mampu. Spesies dalam genus ini tidak mengasimilasi  $\text{NO}_3^-$  (Singleton dan Sainsbury, 2006). Genus ini memiliki 7 spesies yaitu *S. synnaedebdra*, *S. lypolytica*, *S. fibuligera*, *S. capsularis*, *S. malanga*, *S. crataegensis*, dan *S. vini* (Wibowo, 1991).

*Saccharomycopsis fibuligera* memiliki sinonim antara lain *Endomyces fibuligera*, *Endomycopsis fibuligera*, dan *Pichia fibuligera*. Spesies ini menghasilkan miselium bersepta yang bercabang. Sel yang berdekatan pada hifa dapat mengalami peleburan melalui tonjolan di dekat dinding pemisah. Setelah terjadi peleburan, sel-sel ini membentuk dinding baru dan selanjutnya memisahkan diri (Wibowo, 1991).

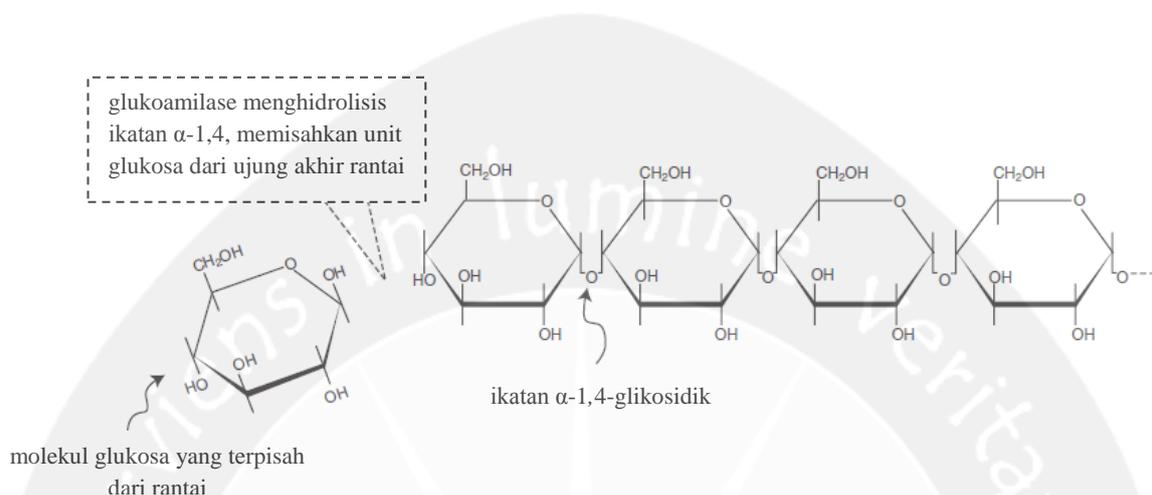
Beras dan ketan tersusun secara dominan oleh pati (polisakarida). Polisakarida tersusun atas dua komponen molekul besar yaitu amilosa linear (ikatan  $\alpha$ -1,4 residu D-glukosa) dan amilopektin bercabang (terdiri atas ikatan  $\alpha$ -

1,4 dan  $\alpha$ -1,6 residu glukosa) yang didegradasi secara dominan oleh enzim hidrolitik yang bernama enzim amilolitik (Hostinova, 2002). *Saccharomycopsis fibuligera* adalah sekretor protein kuat yang menghasilkan dua enzim ekstraseluler yaitu glukoamilase dan  $\alpha$ -amilase. Enzim  $\alpha$ -amilase memecah pati menjadi maltosa, sementara glukoamilase menghasilkan glukosa. Kedua enzim ini penting dalam industri dalam pencairan pati dan fermentasi etanol (Yuan, 2010).

Enzim  $\alpha$ -amilase merupakan glikoprotein dengan berat molekul 54 dan pH optimum 5-6,2 (Hostinova, 2002). Enzim  $\alpha$ -Amilase (endo-1,4- $\alpha$ -D-glukan glukohidrolase, 1,4- $\alpha$ -D-glukan glukabohidrolase atau glikogenase) adalah enzim ekstraseluler yang secara acak memutus ikatan 1,4- $\alpha$ -D-glukosidik antara unit glukosa yang terikat dalam rantai linear amilase. Enzim ini memutuskan rantai panjang karbohidrat (pati) dengan hidrolisis acak di sepanjang rantai, menghasilkan maltotriosa dan maltosa dari amilosa atau maltosa, glukosa, dan dekstrin yang terbatas dari amilopektin. Enzim amilolitik lainnya adalah glukoamilase yang memiliki nama lain glukan 1,4- $\alpha$ -glukosidase, amiloglukosidase, ekso-1,4- $\alpha$ -glukosidase, lisosomal  $\alpha$ -glukosidase atau 1,4- $\alpha$ -D-glukan glukohidrolase (McKelvey dan Murphy, 2011).

Enzim glukoamilase menghidrolisis glukosa monomer tunggal pada cabang akhir non-reduksi dari amilosa dan amilopektin seperti yang terlihat pada Gambar 9. Pada umumnya glukoamilase juga mampu memutuskan ikatan 1,6- $\alpha$  pada cabang amilopektin. Glukosa, maltosa, dan sedikit dekstrin adalah hasil akhir dari hidrolisis oleh glukoamilase. Enzim glukoamilase adalah enzim yang

memiliki banyak sisi dengan sisi katalis terhubung sisi pengikatan pati (McKelvey dan Murphy, 2011).

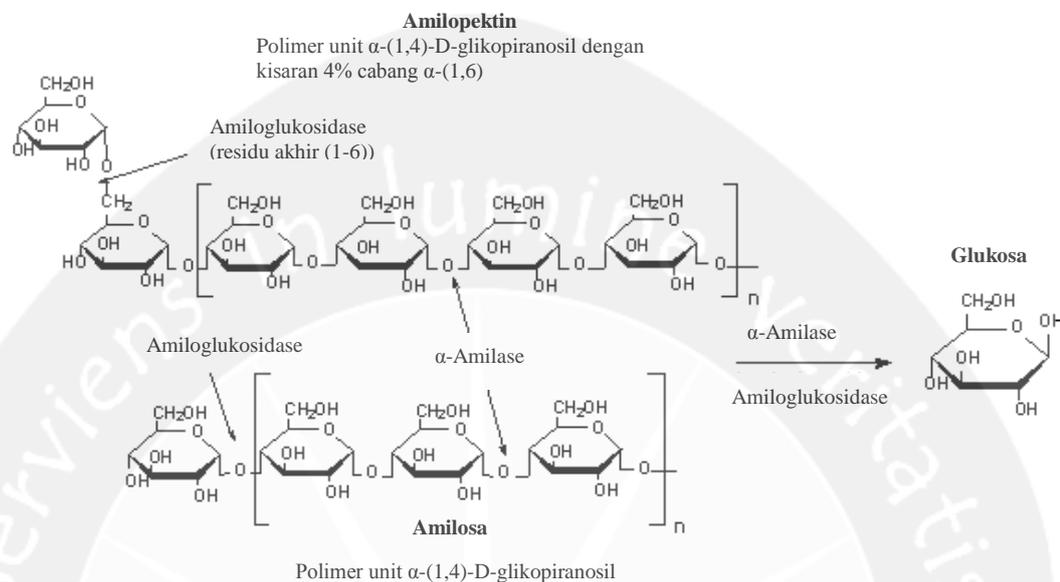


Gambar 9. Degradasi amilum oleh amilase menjadi gula bebas  
Sumber: Kavanagh (2005)

Glukoamilase dari *S. fibuligera* adalah enzim yang terutama terlibat dalam sakarifikasi pati beras dan singkong. Produksi amilase yang tinggi oleh *S. fibuligera* dilakukan ketika pati terlarut dan maltosa digunakan sumber karbon namun aktivitas amilase menurun apabila glukosa digunakan sebagai sumber karbon. Penurunan aktivitas amilolitik dalam keberadaan glukosa yang tinggi disebabkan adanya represi enzim yang menyebabkan represi katabolik dalam produksi amilase. Beberapa strain *S. fibuligera* menghasilkan aktivitas ekstraseluler yang tinggi selama fase stasioner (Junaidah dan Bakar, 2000).

Penggunaan glukoamilase bersama dengan  $\alpha$ -amilase dengan aktivitas *debranching* dalam degradasi pati membuat *S. fibuligera* bekerja dengan efektif seperti yang terlihat pada Gambar 10. Enzim  $\alpha$ -amilase berperan penting dalam

pencairan molekul pati. Aktivitas  $\alpha$ -amilase *S. fibuligera* adalah yang paling maksimum dibanding khamir lain, yaitu 6,56 unit/ml (Chi dkk., 2009).



Gambar 10. Hidrolisis pati (amilopektin dan amilosa) oleh enzim amilase  
Sumber : Webb (2010)

Khamir *S. fibuligera* diaplikasikan dalam produksi anggur beras dalam industri pangan. *S. fibuligera* memiliki kemampuan untuk mengasimilasi glukosa, sukrosa, selobiosa, trehalosa, dan pati terlarut (Yuan, 2010). Trehalosa (1- $\alpha$ -D-glukopir: Amiloglukosidase osida) adalah disakarida non reduksi yang terdiri dari dua molekul glukosa yang terikat pada C-1. Trehalosa berperan sebagai karbohidrat cadangan dan pelindung yang sangat efisien karena dapat meningkatkan ketahanan komponen seluler untuk melawan kondisi yang merugikan seperti suhu tinggi, pembekuan, dehidrasi rendah, tekanan osmotik yang tinggi, dan konsentrasi etanol yang tinggi. *S. fibuligera* aktif mentransformasi pati dalam selnya dan dapat mengakumulasi trehalosa dalam jumlah yang banyak (Chi dkk., 2009).

Menurut Kavanagh (2005), khamir memiliki kemampuan untuk menghasilkan etanol dari gula melalui fermentasi semi-anaerob seperti dalam pembuatan bir, anggur atau sider (anggur apel). Khamir juga menghasilkan komponen-komponen yang mempengaruhi organoleptik seperti isoamil alkohol, etil asetat dan butanol yang memberikan cita rasa akhir dari produk. Selama proses fermentasi, khamir mengkonversi glukosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) menjadi piruvat melalui proses glikolisis. Piruvat kemudian dikonversi menjadi asetaldehid oleh enzim piruvat dekarboksilase yang melepaskan karbon dioksida. Asetaldehid kemudian dikonversi menjadi etanol oleh alkohol dehidrogenase. Reaksi yang terjadi secara keseluruhan diringkas dalam persamaan berikut :



Anggur dan sider diproduksi dari anggur dan apel dengan karbohidrat berupa gula sederhana (glukosa atau fruktosa) yang dapat digunakan dalam fermentasi. Fermentasi dalam pembuatan bir lebih rumit karena sumber karbon yang berasal dari *barley* yaitu pati tidak dapat difermentasi oleh kebanyakan khamir karena tidak adanya amilase dan glukoamilase sehingga memerlukan proses *malting* dengan penambahan  $\alpha$ ,  $\beta$ , dan gluko-amilase (Kavanagh, 2005). Proses pemecahan pati menjadi gula yang akan difermentasi menjadi etanol dalam pembuatan tuak dibantu oleh keberadaan enzim amilase yang dihasilkan oleh *S. fibuligera* yang ditemukan dalam ragi tape di Indonesia.

Meskipun *S. fibuligera* mampu menghasilkan amilase dalam jumlah besar yang dapat menghidrolisis pati menjadi glukosa, khamir ini tidak dapat memfermentasi glukosa menjadi etanol (tidak memiliki enzim untuk fermentasi

glukosa). *Saccharomyces cerevisiae* adalah khamir primer dalam starter dan paling dominan karena kemampuannya untuk bertahan pada tingkat keasaman yang rendah. Khamir lain yang berperan adalah *Candida krusei*, *C. pelliculosa*, *C. utilis*, *C. sphaerica*, *C. magnolia*, dan *Rhodoturula glutinis*. *Lactobacillus plantarum* dan *L. brevis* adalah bakteri asam laktat mayor yang terdeteksi dalam kultur starter (Chiang dkk., 2006). Khamir dan kapang yang kerap ditemukan dalam produk brem bali, tuak, dan ciu yang terbuat dari nasi, ketan atau gula tebu adalah *Amylomyces* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Candida* spp., dan *Saccharomyces* spp. (Dung, 2013)

Selama ini telah diketahui bahwa *Saccharomyces cerevisiae* adalah produsen etanol dari glukosa atau sukrosa yang sering digunakan dalam industri fermentasi yang tidak dapat memproduksi amilase (Chi dkk., 2009). Selama tahap utama fermentasi, jumlah konversi pati menjadi gula (glukosa) berlangsung sebelum konversi alkohol (Dung dkk., 2007). Selama konversi gula menjadi alkohol, ketika fermentasi tiba-tiba dihentikan setelah empat minggu, sebagian gula bebas hasil konversi akan berlimpah hadir dan langsung berkontribusi terhadap manisnya anggur selain kehadiran senyawa volatil dan gula yang tidak difermentasi (Navarro dkk., 2000). Penambahan starter mikrobial di awal akan mempengaruhi kandungan gula dalam anggur beras (Palaniveloo dan Vairappan, 2013).

Semakin banyak mikrobial, maka semakin banyak konversi glukosa menjadi alkohol yang terjadi dan pada saat penghentian fermentasi, molekul glukosa yang tidak dikonversi akan langsung berkontribusi pada tingginya

kandungan glukosa dalam anggur beras. Kandungan pati yang lebih rendah akan membuat kandungan gula tidak cukup tinggi untuk menghentikan produksi alkohol (Palanivello dan Vairappan, 2013). Kadar gula yang sangat tinggi hingga mencapai keseimbangan dengan persentase alkohol akan mengganggu transformasi lebih lanjut dari gula menjadi alkohol (Navarro dkk., 2000). Kandungan gula reduksi merujuk pada aktivitas enzim mikroorganisme dalam fermentasi. Khamir mendegradasi gula sederhana menjadi etanol dan karbon dioksida, gliserol, aldehyd, asam laktat, dan asam suksinat (Sanchez, 2008).

Derajat asam (pH) dan total asam tertitrisasi adalah indikasi keberadaan asam organik (Sanchez, 2008). Keasaman anggur berpengaruh pada keseimbangan alkohol dan gula reduksi. Derajat keasaman (pH) yang rendah penting untuk meningkatkan aktivitas antimikrobia, meningkatkan warna, seleksi mikroorganisme yang diinginkan, menjaga keseimbangan warna anggur. Asam tertitrisasi mengukur jumlah total proton yang ada dalam anggur sedangkan pH mengukur konsentrasi ion hidrogen dalam anggur. Asam-asam yang ditemukan dalam anggur adalah asam laktat (produk minor khamir), asam asetat (dihasilkan semua khamir dan beberapa bakteri), asam suksinat, asam piruvat, asam karbonat ( $\text{CO}_2$ ) dan asam *sulphurous* ( $\text{SO}_2$ ) (McCarthy, 2011).

#### **H. Kualitas Mikrobiologis Produk Fermentasi Anggur Beras**

Produksi anggur beras melibatkan konversi pati (gula) menjadi alkohol melalui fermentasi oleh khamir, kapang, dan bakteri asam laktat. Penggunaan kultur yang berbeda dengan kandungan mikrobial yang bervariasi dan bahan beras yang bervariasi berperan penting dalam produksi anggur berkualitas baik dan

dengan jumlah yang banyak. Variasi *Saccharomyces cerevisiae* telah dilaporkan menghasilkan anggur dengan cita rasa yang beragam. Kualitas mikrobiologis suatu bahan pangan sangat penting untuk mengetahui kelayakan konsumsi suatu produk. Adapun batas maksimum cemaran mikroba dalam minuman beralkohol tersaji dalam Tabel 3.

Tabel 3. Batas maksimum cemaran mikrobia minuman beralkohol

Jenis Cemaran Mikroba	Batas Maksimum
ALT (30°C, 72 jam)	$2 \times 10^2$ koloni/ml
APM koliform	20/ml
APM <i>Escherichia coli</i>	< 3/ml
<i>Salmonella</i> sp.	Negatif/25 ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negatif/ml
Kapang dan Khamir	$1 \times 10^2$ koloni/ml

Sumber : SNI 7388, 2009

Angka lempeng total (ALT) menunjukkan jumlah mikroba dalam produk. ALT secara umum tidak terkait dengan bahaya keamanan pangan namun kadang bermanfaat untuk menunjukkan kualitas, masa simpan, kontaminasi, dan status higienis pada saat produksi. Uji *Staphylococcus aureus* terkait dengan pengujian keamanan pangan terhadap keberadaan bakteri yang mampu menghasilkan enterotoksin yang menyebabkan keracunan pada manusia. *S. aureus* sering ditemukan sebagai mikroflora normal pada kulit dan selaput lendir pada manusia. Bakteri ini dapat tumbuh baik pada pangan yang disimpan dalam suhu ruang serta menghasilkan toksin yang menyebabkan radang lapisan saluran usus (BSNI, 2009).

Bakteri *S. aureus* ada di udara, debu, limbah, air, susu, pangan, peralatan makan, lingkungan, manusia, dan hewan. Walaupun pengolahan pangan merupakan sumber pencemaran pangan yang utama, peralatan dan lingkungan

dapat juga menjadi sumber pencemaran *S. aureus*. Dosis infeksi toksin kurang dari 10  $\mu\text{g}$  pada pangan tercemar akan menimbulkan gejala intoksikasi stafilokokal. Kadar toksin ini dicapai saat populasi *S. aureus* melebihi 100.000/g. Mencuci tangan dengan teknik yang benar dan membersihkan peralatan adalah pencegahan masuknya bakteri ke pangan terutama pangan yang tidak dipanaskan sebelum disiapkan (BSNI, 2009).

Pengujian mikrobiologi yang lain adalah uji kapang dan khamir. Kebanyakan kapang dan khamir bersifat aerob (memerlukan oksigen bebas untuk pertumbuhan), persyaratan derajat keasaman berkisar antara pH 2-9. Kisaran suhu sekitar 10°C-35°C. Persyaratan kelembaban khamir relatif rendah dan banyak spesies dapat tumbuh pada aktivitas air ( $a_w$ ) 0,85 atau kurang, meskipun kapang biasanya memerlukan aktivitas air lebih tinggi. Indikasi adanya invasi kapang dan khamir dalam pangan tergantung pada jenis pangan, mikroba terlibat dan tingkat invasi (BSNI, 2009).

Pangan tercemar yang sedikit rusak, sangat rusak atau sepenuhnya didekomposisi ditandai oleh noda dengan berbagai ukuran dan warna, berbau apek, miselium kapas putih atau kapang dengan spora yang berwarna serta rasa, aroma dan bau tidak normal. Seperti halnya bakteri, kapang dapat menimbulkan penyakit yang dibedakan atas dua golongan, yaitu infeksi oleh kapang (mikosis) dan keracunan (mikotoksikosis). Cara pengolahan atau fermentasi yang salah dapat mengakibatkan kontaminasi yang tidak diinginkan (BSNI, 2009).

## **I. Hipotesis**

1. Penggunaan beras hitam yang dikombinasikan dengan ketan hitam akan memberikan pengaruh yang berbeda pada aktivitas antioksidan minuman beralkohol yang dihasilkan.
2. Penggunaan 100% beras hitam dalam kombinasi akan menghasilkan minuman beralkohol dengan aktivitas antioksidan yang paling tinggi.

