

**JURNAL**

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MINUMAN BERALKOHOL DARI RAGI  
TUAK DAYAK DENGAN KOMBINASI KETAN HITAM  
(*Oryza sativa* L. var. *glutinosa*) DAN BERAS HITAM  
(*Oryza sativa* L.) KULTIVAR CEMPO IRENG**

**Disusun Oleh:  
Martha Florencia Endika  
NPM: 100801161**



**UNIVERSITAS ATMA JAYA YOGYAKARTA  
FAKULTAS TEKNOBIOLOGI  
PROGRAM STUDI BIOLOGI  
YOGYAKARTA  
2014**

**Aktivitas Antioksidan Minuman Beralkohol dari Ragi Tuak Dayak dengan Kombinasi Ketan Hitam (*Oryza sativa* L. var. *glutinosa*) dan Beras Hitam (*Oryza sativa* L.) Kultivar Cempo Ireng**

**Antioxidative Activity of Alcoholic Beverage made from Tuak Dayak Yeast with Combination of Black Glutinous Rice (*Oryza sativa* L. var. *glutinosa*) and Black Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivar Cempo Ireng**

Martha Florencia Endika<sup>1</sup>, Ekawati Purwijantiningsih<sup>2</sup>, Sinung Pranata<sup>3</sup>  
Universitas Atma Jaya Yogyakarta  
Jl. Babarsari no 44 Yogyakarta  
martha\_endika@yahoo.com

**Abstrak**

Penelitian fermentasi ketan hitam dan beras hitam dengan ragi tuak bertujuan untuk melihat aktivitas antioksidan minuman beralkohol (anggur beras) yang dihasilkan. Ketan hitam dan beras hitam diketahui kaya akan pigmen antosianin (3-glukosida dan peonidin 3-glukosida) yang memberikan warna ungu pekat pada bulir berasnya serta diketahui memiliki aktivitas antioksidan. Serangkaian pengujian yang dilakukan pada minuman beralkohol dari lima kombinasi bahan, yaitu penggunaan 100% ketan hitam (kombinasi A), 75% ketan hitam dan 25% beras hitam (kombinasi B), 50% ketan hitam dan 50% beras hitam (kombinasi C), 25% ketan hitam dan 75% beras hitam (kombinasi D) dan 100% beras hitam (kombinasi E). Kelima kombinasi memberikan persen inhibisi terhadap DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dengan kisaran 70,61 - 88,61%. Kandungan total antosianin monomerik berkisar antara 6,96 - 18,37 mg/L dan total fenolik berkisar antara 751,51 - 1.215,30 GAE (*Gallic Acid Equivalent*) mg/L. Kadar etanol minuman beralkohol yang dihasilkan berkisar antara 8,40 - 13,66% dengan kandungan gula reduksi berkisar antara 12.900,00 - 30.085,67 mg/100 ml. Total asam tertitrasi berkisar antara 0,94 - 1,02 g/100 ml dengan derajat keasaman terukur pada kisaran 3,88-4,07. Secara keseluruhan, kombinasi ketan hitam dan beras hitam yang tepat untuk membuat minuman beralkohol dengan aktivitas antioksidan tertinggi adalah kombinasi E (100% beras hitam). Namun kombinasi ketan hitam dan beras hitam yang memberikan kualitas yang baik berdasarkan standar SNI (SNI 01-4984:1999 dan SNI 7388:2009) adalah kombinasi C (50% ketan hitam dan 50% beras hitam).

Kata kunci : aktivitas antioksidan, minuman beralkohol, tuak dayak, beras hitam

**Pendahuluan**

Secara internasional terdapat peningkatan perhatian pada potensi kesehatan pangan, terutama perhatian pada makanan atau minuman yang tidak

hanya berfungsi untuk mensuplai zat-zat gizi, tetapi juga mengandung bahan yang diperkirakan atau telah terbukti dapat meningkatkan status kesehatan dan mencegah timbulnya penyakit tertentu (Muchtadi, 2012). Beras hitam adalah salah satu jenis beras yang mulai populer dan mulai dikonsumsi sebagai pangan fungsional karena manfaatnya dalam kesehatan. Beras hitam berkhasiat meningkatkan daya tahan tubuh terhadap penyakit, memperbaiki kerusakan sel hati (hepatitis dan sirosis), mencegah gangguan fungsi ginjal, mencegah kanker atau tumor, memperlambat penuaan, mencegah anemia, membersihkan kolesterol dalam darah, dan sebagai antioksidan (Suardi dan Ridwan, 2009). 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 (Walter dan Marchesan, 2011).

Beras hitam di Indonesia masih belum dikembangkan secara optimal menjadi produk pangan meskipun khasiatnya sudah diketahui. Salah satu pilihan pengolahan beras dalam produk pangan adalah pengolahan minuman fermentasi dari beras atau anggur beras khas Indonesia, yaitu tuak yang merupakan minuman khas suku Dayak di Kalimantan. Tuak Dayak umumnya terbuat dari fermentasi ketan putih atau ketan hitam. Tidak diketahui pasti mulai kapan orang Dayak mengenal teknologi fermentasi tuak karena sudah menjadi bagian dari tradisi selama beratus-ratus tahun (Simanjuntak, 2010).

Pengolahan beras hitam melalui kombinasi ketan hitam dalam fermentasi dengan ragi tuak Dayak diharapkan dapat memberikan nilai keunggulan yang mampu memperkenalkan tuak sebagai minuman tradisional yang menyehatkan serta menambah konsumsi beras hitam di masyarakat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pengaruh dari kombinasi ketan hitam dan beras hitam terhadap aktivitas antioksidan produk minuman beralkohol yang dihasilkan, mengetahui kombinasi ketan hitam dan beras hitam yang tepat untuk membuat minuman beralkohol dengan aktivitas antioksidan tertinggi dan yang menunjukkan kualitas yang baik berdasarkan standar SNI.

### **Metode Penelitian**

#### **Alat dan Bahan**

Instrumen yang digunakan untuk analisis yaitu pH meter Lovibond pH110, Shimadzu UV-1800, *color reader* Konica Minolta CR-10, dan Kromatografi Gas Shimadzu 8A. Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan minuman beralkohol ialah beras hitam kultivar Cempo Ireng yang diperoleh dari PT Indmira, ketan hitam dalam kemasan yang diperoleh dari Lotte Mart Ring Road Utara, ragi tuak yang diperoleh dari rumah makan khas Dayak di Nologaten, gula pasir dan air. Bahan-bahan yang digunakan untuk analisis adalah akuades, potasium klorida (KCl), sodium asetat ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), etanol *Pro Analysis*, 0,1 N NaOH, indikator fenoltalein, reagen Nelson A, reagen Nelson B, reagen Arsenomolibdat, Asam Gallat, larutan Natrium Karbonat, reagen *Folin-Ciocalteu*, medium *plate count agar*,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,

medium *Baird-Parker Agar*, *peptone water*, dan medium *Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol*.

### Tahapan penelitian

1. Pembuatan Tuak Dayak dengan Modifikasi (Komunikasi Pribadi dengan Nara Sumber Pembuat Tuak Dayak Berinisial G, 2013)

Beras hitam dan ketan hitam dibersihkan kemudian direndam dalam air selama 12 jam. Bahan dimasukkan ke dalam wadah kemudian ditambahkan air sebanyak 1 liter untuk 1 kg bahan kemudian dimasak dalam *rice cooker* sampai matang. Gula pasir sebanyak 750 gram ditambahkan ke dalam campuran beras dan ketan hitam yang telah masak. Bahan didinginkan di atas tampah sampai uap panas hilang. Ragi tuak dayak dalam bentuk bubuk sebanyak 75 gram ditaburkan di atas bahan hingga merata. Kombinasi bahan yang digunakan tersaji dalam Tabel 1.

Bahan dimasukkan ke dalam toples plastik kemudian ditutup dengan kain serbet dan penutup toples. Tanggal pembuatan serta variasi kombinasi dicatat pada toples. Fermentasi dilakukan dalam wadah tertutup selama 60 hari (2 bulan). Beras dan ketan yang telah terfermentasi disaring kemudian diperam selama seminggu untuk memisahkan air tuak. Air tuak dimasukkan ke dalam botol dan disimpan dalam kulkas.

Tabel 1. Kombinasi bahan-bahan pembuat tuak dayak

Bahan	Perbandingan Ketan Hitam : Beras Hitam				
	100% : 0% (A)	75% : 25% (B)	50% : 50% (C)	25% : 75% (D)	0% : 100% (E)
Ketan Hitam	2000 gram	1500 gram	1000 gram	500 gram	0 gram
Beras Hitam	0 gram	500 gram	1000 gram	1500 gram	2000 gram
Gula Pasir	750 gram	750 gram	750 gram	750 gram	750 gram
Ragi Tuak	75 gram	75 gram	75 gram	75 gram	75 gram

2. Pengukuran Aktivitas Antioksidan terhadap Pemerangkapan DPPH (Modifikasi Marinova dan Batchvarov, 2011)

Minuman beralkohol sebanyak 500 µl dicampur dengan 500 µl larutan 500 µM DPPH dalam etanol (konsentrasi akhir 250 µM). Campuran ditambahkan etanol sebanyak 4 ml kemudian digojog dengan kuat dan didiamkan selama 20 menit pada suhu ruang (25°C) dalam ruangan yang gelap. Etanol digunakan untuk mengembalikan pembacaan spektrofotometer ke angka 0. Absorbansi campuran radikal DPPH tanpa antioksidan digunakan sebagai kontrol. Absorbansi oleh DPPH diukur dengan UV-Vis spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm. Persentase penghambatan (*inhibition*) radikal DPPH oleh sampel dihitung berdasarkan rumus :

$$\% \text{ inhibition} = ((A_{C(0)} - A_{A(t)}) / A_{C(0)}) \times 100$$

Keterangan :

$A_{C(0)}$  = Absorbansi kontrol pada t = 0 menit

$A_{A(t)}$  = Absorbansi antioksidan pada t = 20 menit

### 3. Penentuan Kandungan Total Antosianin Monomerik (Lee dkk., 2005)

Dua pengenceran sampel uji dengan faktor pengenceran yang sama disiapkan, tabung pertama diencerkan dalam larutan penyangga pH 1,0 (larutan KCl) dan tabung kedua diencerkan dalam larutan penyangga pH 4,5 (larutan sodium asetat). Absorbansi dari kedua perlakuan pH (1,0 dan 4,5) diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm dan 700 nm. Pembacaan absorbansi sampel uji dibandingkan dengan sel blanko berisis air destilasi. Pengukuran absorbansi dilakukan dalam waktu 20-50 menit persiapan.

Konsentrasi antosianin dihitung sebagai sianidin-3-glukosida dengan koefisien ekstingsi molar 26.900 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> dan berat molekul 449,2 (He dkk., 2010) menggunakan rumus:

$$\text{Konsentrasi antosianin (mg/L)} = \frac{A \times \text{BM} \times \text{fp} \times 1000}{\text{...}}$$

$$\epsilon \times L$$

Keterangan :

A = Absorbansi [(A<sub>520</sub>-A<sub>700</sub>)pH<sub>1</sub>-(A<sub>520</sub>-A<sub>700</sub>)pH<sub>4,5</sub>]

BM = Berat molekul (449,2 g/mol)

fp = faktor pengenceran

□ = koefisien ekstingsi molar (26.900 Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)

L = diameter kuvet (1 cm)

4. Penentuan Total Komponen Fenolik dengan Metode Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2012)

Larutan standar asam galat dibuat pada konsentrasi 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 dan 500 GAE mg/L. Larutan standar, sampel tuak dan blanko diambil sebanyak masing-masing 20 µL ke dalam kuvet yang terpisah dan ditambahkan 1,58 ml air destilasi. Reagen *Folin-Ciocalteu* ditambahkan sebanyak 100 µL ke dalam kuvet dan dihomogenkan. Campuran didiamkan antara 30 detik sampai 8 menit kemudian ditambahkan 300 µL larutan sodium karbonat dan digojog hingga tercampur. Campuran didiamkan selama 2 jam pada suhu 20°C kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 765 nm. Grafik dibuat antara parameter absorbansi dan konsentrasi. Kurva kalibrasi standar dibuat dan hasil pengujian dilaporkan sebagai *Gallic Acid Equivalent* (GAE).

5. Analisis Kimia Umum

Kadar etanol dari minuman beralkohol diujikan oleh Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada dengan kromatografi gas (Shimadzu 8A) dengan menggunakan kolom GP 10% SP-1200/1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> on 80/100 mes chromosorb W AW. Kandungan gula reduksi diuji dengan metode Nelson-Somogy. Perhitungan total asam tertitrasi dilakukan dengan metode titrasi dengan larutan NaOH 0,1 N sebagai titran. Derajat keasaman minuman

beralkohol diukur dengan instrumen pH meter. Analisis warna diujikan dengan instrumen *color reader*.

6. Uji Kualitas Mikrobiologis

Penentuan angka lempeng total (ALT) diujikan dengan medium *plate count agar*. Sampel diencerkan dengan pelarut *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water* ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Maturin dan Peeler, 2001). Pengujian terhadap *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan menggunakan medium *Baird-Parker Agar* (Bennett dan Lancette, 2001). Pengujian kapang dan khamir dengan metode *spread plate* menggunakan medium *Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar* (Tournas dkk., 2001).

7. Uji Organoleptik (Anonim, 2006)

Uji organoleptik dilakukan dengan tujuan mengetahui tingkat kesukaan dari panelis sebanyak 30 orang yang terbiasa mengonsumsi minuman beralkohol terhadap produk tuak kombinasi ketan hitam dan beras hitam. Uji organoleptik meliputi uji hedonik terhadap warna, aroma, rasa yang dirasakan. Skor yang digunakan adalah : 5 = sangat suka, 4 = suka, 3 = agak suka, 2 = kurang suka, dan 1 = sangat tidak suka. Uji dilanjutkan dengan uji ranking dengan memberikan skor 1 pada sampel yang memiliki kualitas keseluruhan yang paling baik hingga skor 5 untuk yang kurang baik.

8. Analisis Data (Lund dan Lund, 2013)

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANOVA, dan untuk mengetahui letak beda nyata antar perlakuan digunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan tingkat kepercayaan 95%. Data uji organoleptik dianalisis dengan uji Friedman dan hasil uji peringkat dilanjutkan oleh uji



Wilcoxon pada signifikansi ( $\alpha$ ) hasil koreksi Bonferroni 0,01 (0,05/5 kombinasi).

### **Hasil dan Pembahasan**

Ragi tuak dayak dibuat dari campuran rempah-rempah dan beras (biasanya ketan putih) hasil fermentasi yang kemudian dijemur hingga berbentuk tepung. Belum ada penelitian lebih lanjut terhadap ragi tuak dayak sehingga belum diketahui jenis mikrobial apa saja yang ada dalam ragi tersebut. *Saccharomycopsis fibuligera* adalah khamir yang kerap ditemukan dalam pembuatan anggur beras karena khamir ini dapat menghasilkan enzim amilase sehingga fermentasi etanol dapat berjalan lebih efisien (Yuan, 2010). Ragi tuak adalah ragi campuran yang tidak hanya terdiri dari satu mikroorganisme saja. Spesies dari genus *Saccharomyces* yang secara umum dikenal berperan dalam fermentasi alkohol pada minuman beralkohol adalah *Saccharomyces cerevisiae* (Chidk., 2009).

Karakteristik minuman beralkohol dari kombinasi ketan hitam dan beras hitam tersaji dalam Tabel 2. Aktivitas antioksidan minuman beralkohol dengan kombinasi ketan hitam dan beras hitam berkisar antara 70,61 - 88,61%. Berdasarkan perbandingan persen inhibisi DPPH antar kombinasi, ada kecenderungan peningkatan persen inhibisi DPPH dari kombinasi A (100% ketan hitam) hingga kombinasi E (100% beras hitam). Aktivitas antioksidan cenderung bertambah seiring dengan penambahan persentase beras hitam dalam kombinasi bahan baku pembuatan minuman beralkohol.

Aktivitas pemerangkapan DPPH terjadi karena adanya kandungan antioksidan dalam minuman beralkohol yang mampu mendonorkan atom

hidrogen sehingga terjadi perubahan formasi DPPH menjadi tidak radikal karena elektron telah berpasangan (Molyneux, 2004). Aktivitas antioksidan berhubungan dengan tipe beras. Beras mengandung senyawa seperti tokoferol, orizanol dan polifenol. Polifenol seperti asam vanili, kuersetin, dan fenolik lain diketahui berpotensi sebagai antioksidan. Polisakarida dengan berat molekul rendah, protein atau peptida juga berpengaruh terhadap antioksidan (Palaniveloo dan Vairappan, 2013).

Ketan hitam dan beras hitam diketahui mengandung senyawa antosianin yang memberikan warna hitam pada lapisan perikarpnya. Berdasarkan perbandingan hasil pengujian total antosianin monomerik dengan kisaran 6,96 - 18,37 mg/L, pola kandungan total antosianin monomerik antar kombinasi menunjukkan adanya kecenderungan penurunan kandungan total antosianin dari kombinasi A (100% ketan hitam) ke kombinasi E (100% beras hitam). Penambahan persentase beras hitam yang lebih banyak dalam kombinasi bahan menunjukkan adanya kondisi yang berbanding terbalik antara aktivitas antioksidan yang cenderung meningkat dengan total antosianin yang cenderung menurun. Hasil ini menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan dari minuman beralkohol tidak dipengaruhi secara langsung oleh kandungan antosianin, melainkan dipengaruhi oleh kandungan antioksidan lain.

Total antosianin yang terkandung dalam minuman beralkohol hasil kombinasi kedua bahan memang mengalami penurunan karena adanya tahap pemanasan dalam pembuatan minuman beralkohol. Salah satu faktor yang terjadi selama pemasakan adalah pengembangan bulir pati dari ketan dan beras yang

berdampak pada kerusakan fisik lapisan perikarp. Pemasakan menyebabkan pengembangan bulir pati yang berdampak pada kerusakan fisik lapisan perikarp. Komposisi pati yang hampir semuanya terdiri dari amilopektin menyebabkan ketan tidak mengembang dalam pemasakan (Mambrasar 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. Antosianin sianidin-3-glukosida akan mengalami deglikosilasi menjadi antosianidin sianidin, sedangkan antosianin pelargonidin-3-glukosida akan terdeglukosilasi menjadi antosianidin pelargonidin (Patras dkk., 2010).

Butiran beras dengan warna perikarp yang gelap seperti ketan hitam dan beras hitam akan mengandung kandungan polifenol yang tinggi dengan berat molekul yang tinggi (Walter dan Marchesan, 2011). Kandungan total fenolik yang tetap tinggi dalam minuman beralkohol inilah yang menjelaskan tingginya aktivitas antioksidan dalam pemerangkapan DPPH meskipun terjadi kecenderungan penurunan total antosianin. Kandungan fenolik yang lebih tinggi tidak selalu menghasilkan aktivitas pemerangkapan radikal bebas yang lebih tinggi karena kemampuan reagen Folin-Ciocalteu yang dapat bereaksi dengan vitamin, thiol, *dihydroxyacetone*, garam anorganik dan komponen yang mengandung nitrogen. Kemampuan komponen fenolik untuk memerangkap radikal bebas tergantung pada struktur dari fenol (Lugemwa dkk., 2013).

Tabel 2. Karakteristik minuman beralkohol dari kombinasi ketan hitam dan beras hitam

Sifat	Parameter	Kode Kombinasi Bahan Minuman Beralkohol				
		A	B	C	D	E
Kimia	Persen Inhibisi DPPH	70,61 <sup>a</sup>	75,50 <sup>a</sup>	79,96 <sup>a</sup>	81,61 <sup>a</sup>	88,61 <sup>a</sup>
	Total Antosianin Monomerik (mg/L)	15,92 <sup>a</sup>	18,37 <sup>a</sup>	13,86 <sup>a</sup>	6,96 <sup>a</sup>	7,74 <sup>a</sup>
	Total Fenolik (GAE mg/L)	896,97 <sup>a</sup>	1.215,30 <sup>a</sup>	751,51 <sup>a</sup>	933,33 <sup>a</sup>	1.093,94 <sup>a</sup>
	Kadar Etanol	13,10% <sup>c</sup>	13,66% <sup>c</sup>	12,58% <sup>bc</sup>	9,96% <sup>ab</sup>	8,40% <sup>a</sup>
	Gula Reduksi (mg/100 ml)	12.900 <sup>a</sup>	14.966,67 <sup>ab</sup>	15.841,67 <sup>ab</sup>	24.008,33 <sup>bc</sup>	30.085,67 <sup>c</sup>
	Total Asam Teritrasi (mg/100 ml)	0,94 <sup>a</sup>	0,99 <sup>a</sup>	0,95 <sup>a</sup>	1,02 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>
	Derajat Keasaman (pH)	4,07 <sup>a</sup>	3,89 <sup>a</sup>	4,00 <sup>a</sup>	4,03 <sup>a</sup>	3,88 <sup>a</sup>
Mikrobiologis	Angka Lempeng Total (koloni/ml)	< 25	< 25	< 25	6 x 10 <sup>2</sup>	1x 10 <sup>2</sup>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negatif	Positif (2 koloni/ml)	Negatif	Positif (2 koloni/ml)	Positif (8 koloni/ml)
	Kapang dan Khamir (koloni/ml)	< 10	2 x 10 <sup>2</sup>	< 10	3 x 10 <sup>3</sup>	1 x 10 <sup>4</sup>
Fisik dan Organoleptik	Analisis Warna ( <i>Color Reader</i> )	Jingga	Jingga	Jingga	Jingga	Jingga Kekuningan
	Kesukaan Warna	3,00	3,30	2,80	3,53	2,90
	Kesukaan Aroma	3,43	3,23	2,83	3,43	3,17
	Kesukaan Rasa	2,87	3,57	3,20	2,97	3,47
	Peringkat Kualitas	2,47	2,33	3,13	3,97	3,10

Keterangan :

1. Kode kombinasi : A = 100% ketan hitam, B = 75% ketan hitam dan 25% beras hitam, C = 50% ketan hitam dan 50% beras hitam, D = 25% ketan hitam dan 75% beras hitam, E = 100% beras hitam.
2. Kesukaan (hedonik) : 5 sangat suka, 4 suka, 3 agak suka, 2 tidak suka, 1 sangat tidak suka
3. Peringkat : 1 paling baik – 5 kurang baik
4. Angka yang diikuti huruf yang sama dalam baris yang sama tidak beda nyata pada tingkat kepercayaan 95%.

Fermentasi bahan selama dua bulan telah menghasilkan minuman air tuak atau air tape yang mengandung alkohol. Kadar etanol minuman beralkohol dengan kombinasi ketan hitam dan beras hitam dalam fermentasi selama 2 bulan berkisar antara 8,40% sampai dengan 13,66%. Alkohol yang dihasilkan berasal dari konversi gula oleh mikrobia dan dengan keberadaan substrat yang cukup bagi mikrobia untuk digunakan, maka gula akan terus dikonsumsi dan alkohol akan diproduksi (Dung dkk., 2007). Faktor yang mempengaruhi fermentasi oleh khamir antara lain tekanan osmotik, penambahan substrat, suplementasi nutrisi, temperatur dan akumulasi etanol intraseluler (Dung, 2013).

Kandungan gula reduksi dengan kisaran menunjukkan pola yang meningkat dari kombinasi A (100% ketan hitam) hingga kombinasi E (100% beras hitam). Hasil ini sesuai dengan pernyataan Dung dkk. (2007) bahwa tingkat alkohol dalam anggur beras berbanding terbalik dengan kadar gula dalam anggur beras. Semakin banyak beras hitam yang ditambahkan dalam kombinasi, semakin rendah kadar etanol dan semakin tinggi kandungan gula reduksi.

Selama tahap utama fermentasi, jumlah konversi pati menjadi gula (glukosa) berlangsung sebelum konversi alkohol (Dung dkk., 2007). Penambahan starter mikrobia di awal akan mempengaruhi kandungan gula dalam anggur beras. Semakin banyak mikrobia, 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 (Palaniveloo dan Vairappan, 2013).

Asam organik adalah komponen esensial untuk rasa di dalam minuman beralkohol. Total asam titrasi adalah salah satu uji yang mewakili keberadaan asam organik dalam anggur beras. Total asam tertitrasi yang terhitung sebagai asam asetat pada minuman beralkohol dari ketan hitam dan beras hitam berkisar antara 0,94 – 1,02  $\frac{g}{100ml}$ . Berdasarkan penelitian Palanivello dan Vairappan, (2013), asam organik yang terkandung dalam fermentasi anggur beras adalah asam asetat, asam palmitat asam 9,12-oktadekadienoik, 6-oktadekanoik, heksadekanoik dan asam tetradekanoik. Keberadaan asam asetat menjelaskan adanya rasa asam pada anggur beras (McCarthy, 2011).

Derajat keasaman minuman beralkohol dengan kombinasi ketan hitam dan beras hitam dalam fermentasi selama 2 bulan berkisar antara 3,88 – 4,07. Aras pH yang rendah dalam anggur beras dipengaruhi oleh keberadaan alkohol, berbagai asam organik dan hasil sampingan selama proses anaerobik (Chiang dkk., 2006). Derajat keasaman (pH) yang rendah penting untuk meningkatkan aktivitas antimikrobial, meningkatkan warna, seleksi mikroorganisme yang diinginkan, menjaga keseimbangan warna anggur (McCarthy, 2011).

Berdasarkan peletakan koordinat pada diagram CIE, warna kombinasi A, B, C, dan D adalah jingga sedangkan kombinasi E berwarna jingga kekuningan. Berdasarkan hasil pengujian mikrobiologi, minuman beralkohol dari kombinasi D (25% ketan hitam dan 75% beras hitam dan kombinasi E (100% beras hitam) memiliki kualitas mikrobiologis yang lebih buruk dibandingkan kombinasi lainnya. Kadar etanol keduanya yang berada di bawah 10% dengan kandungan gula tinggi dan sulitnya pemisahan air tuak dengan endapan membuat produk

minuman beralkohol dari kedua kombinasi ini tidak memenuhi syarat kualitas mikrobiologi oleh SNI 7388 (2009) karena nilai ALT (angka lempeng total) serta kapang dan khamir di atas  $1 \times 10^2$  koloni/ml serta kerap ditemukan koloni *Staphylococcus aureus*.

Analisis Friedman dari parameter warna dalam uji kesukaan menunjukkan adanya beda nyata dari perlakuan kombinasi bahan terhadap kesukaan warna produk minuman beralkohol oleh konsumen. Warna minuman beralkohol yang paling disukai adalah hasil dari kombinasi A dengan rata-rata skor 3,90. Perlakuan kombinasi bahan berdasarkan uji Friedman ternyata tidak berbeda nyata terhadap kesukaan aroma (skor kelima kombinasi berkisar antara 2,83 - 3,43) dan rasa dari minuman beralkohol (skor kelima kombinasi berkisar antara 2,87 - 3,57). Urutan kualitas minuman beralkohol berdasarkan peringkat terbaik (rata-rata peringkat terkecil) hingga peringkat terburuk (rata-rata peringkat terbesar) adalah kombinasi B (rata-rata peringkat 2,33), diikuti oleh kombinasi A (rata-rata peringkat 2,47), kombinasi E (rata-rata peringkat 3,10), kombinasi C (rata-rata peringkat 3,13) dan kualitas terburuk adalah kombinasi D (rata-rata peringkat 3,97).

Secara keseluruhan, kombinasi ketan hitam dan beras hitam yang menghasilkan minuman beralkohol dengan aktivitas antioksidan tertinggi adalah kombinasi E yang menggunakan 100% beras hitam. Hasil minuman beralkohol dari kombinasi ini memberikan aktivitas pemerangkapan DPPH sebesar 88,612% dengan kandungan total antosianin monomerik sebanyak  $7,74 \text{ mg/L}$  dan total fenolik sebanyak  $1.093,94 \text{ GAE mg/L}$ . Hanya saja penggunaan beras hitam sebagai

bahan baku utama dalam fermentasi minuman beralkohol ini memerlukan penyesuaian resep yang tepat untuk menghasilkan air tuak yang lebih banyak.

Kombinasi ketan hitam dan beras hitam yang memberikan kualitas minuman beralkohol yang baik berdasarkan standar SNI (SNI 01-4984:1999 dan SNI 7388:2009) adalah kombinasi C dengan penggunaan 50% ketan hitam dan 50% beras hitam. Hasil minuman beralkohol dari kombinasi ini memberikan bau khas anggur ketan, rasa normal, kadar etanol sebesar 13,10% (memenuhi syarat kadar etanol antara 8-15%) dengan hasil ALT serta kapang dan khamir kurang dari  $1 \times 10^2$  koloni/ml dan dinyatakan tidak mengandung *Staphylococcus aureus* (negatif).

### **Simpulan dan Saran**

Penelitian terhadap aktivitas antioksidan minuman beralkohol dari ragi tuak Dayak dengan kombinasi ketan hitam dan beras hitam kultivar Cempo Ireng ini menghasilkan tiga kesimpulan sebagai berikut : (1) tidak ada perbedaan pengaruh dari kombinasi ketan hitam dan beras hitam terhadap aktivitas antioksidan dalam minuman beralkohol yang dihasilkan, (2) kombinasi ketan hitam dan beras hitam yang tepat untuk membuat minuman beralkohol dengan aktivitas antioksidan tertinggi adalah kombinasi E yang menggunakan 100% beras hitam, (3) Kombinasi ketan hitam dan beras hitam yang tepat untuk membuat minuman beralkohol dengan kualitas yang baik berdasarkan standar SNI (SNI 01-4984:1999 dan SNI 7388:2009) adalah kombinasi C dengan penggunaan 50% ketan hitam dan 50% beras hitam.



Penelitian penggunaan beras hitam sebagai bahan baku fermentasi dianjurkan untuk melakukan penyesuaian resep (jumlah ragi, air) atau perlu adanya kombinasi dengan ketan putih untuk menghasilkan volume air tuak yang lebih banyak. Pemasakan bahan dapat digantikan dengan pengukusan untuk mengurangi degradasi antosianin, masa fermentasi juga perlu dijaga dari cahaya dan paparan oksigen dan proses penyaringan dengan kain saring dapat digantikan dengan penyaringan vakum. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan mengenai kandungan mikrobial (identifikasi jenis khamir) dalam ragi, pengaruh lamanya fermentasi serta pengaruh penggunaan ragi lain, identifikasi kandungan antosianin monomerik pada bahan baku (beras hitam dan ketan hitam) serta antosianin yang dominan dalam minuman beralkohol.

### **Ucapan Terima Kasih**

Kelancaran penelitian dan penyusunan skripsi tentu melibatkan dukungan dari berbagai pihak. Ucapan terima kasih ditujukan kepada Universitas Atma Jaya Yogyakarta dan Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada.

### **Daftar Pustaka**

- Anonim. 2006. *Pengujian Organoleptik (Evaluasi Sensori) dalam Industri Pangan*. <http://tekpan.unimus.ac.id/wp-content/uploads/2013/07/Pengujian-Organoleptik-dalam-Industri-Pangan.pdf>. 14 April 2014.
- Bennett, R.W. dan Lanct, G.A. 2001. *Bam: Staphylococcus aureus*. <http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm071429.htm>. 12 November 2013.
- Chi, Z., Chi, Z., Liu, G., Wang, F., Ju, L., dan Zhang, T. 2009. *Saccharomycopsis fibuligera* and its Applications in Biotechnology. *Biotechnology Advances* 27:423-431.
- Chiang, Y.W., Che, F.Y. dan Ismail, A.M.. 2006. Microbial Diversity and Proximate Composition of Tapai, A Sabah's Fermented Beverage. *Malaysian Journal of Microbiology* 2:1-6.

- Dung, N.T.P., Rombout, F.M. dan Nout, M.J.R. 2007. Characteristic of Some Traditional Vietnamese Starch-based Rice Wine Fermentation Starters. *LWT Food Science and Technology* 40:130-135.
- Dung, N.T.P. 2013. Vietnamese Rice-based Alcoholic Beverages. *International Food Research Journal* 20(3):1035-1041.
- Goufo, P. dan Trindade, H. 2014. Rice Antioxidants : Phenolics Acids, Flavonoids, Anthocyanins, Proanthocyanidins, Tocopherols, Tocotrienols,  $\gamma$ -oryzanol and Phytic Acid. *Food Science & Nutrition*. 2(2): 75-104.
- Lee, J., Durst, R.W., dan Wrosted, R.E. 2005. Determination of Total Monomeric Antocyanin Pigment Content of Fruit Juice, Beverages, Natural Colorants and Wines by the pH Differential Method : Collaborative Study. *Journal of AOAC International* 88(5):1269-1278.
- Lugemwa, F.N., Snyder, A.L., dan Shaikh, K. 2013. Determination of Radical Scavenging Activity and Total Phenols of Wine and Spices L A Randomized Study. *Antioxidants* 2:110-121.
- Lund, A. dan Lund, M. 2013. *Friedman Test in SPSS*. <https://statistics.laerd.com/spss-tutorials/friedman-test-using-spss-statistics.php>. 10 April 2014.
- Marinova, G. dan Batchvarov, V. 2011. Evaluation of Methods for Determination of the Free Radical Scavenging Activity by DPPH. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 17(1):11-24.
- Maturin, L. dan Peeler, J.T. 2001. *Bam:Aerobic Plate Count*. <http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm063346.htm>. 12 November 2013.
- McCarthy, M. 2011. *Measurement of TA and pH*. <http://www.crcv.com.au/resources/Grape%20and%20Wine%20Quality/Workshop%20Notes/Measuring%20TA%20and%20pH.pdf>. 14 April 2014.
- Muchtadi, D. 2012. *Pangan Fungsional dan Senyawa Bioaktif*. Alfabeta, Bandung. 1-5.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J. Sci. Technol.* 26(2):211-219.
- Palaniveloo, K dan Vairappan, C.S. 2013. Biochemical properties of rice wine produced from three different starter cultures. *Journal of Tropical Biology and Conservation* 10:31-41.
- Patras, A., Brunton, N.P., O'Donnell, C. dan Tiwari, B.K. 2010. Effect of Thermal Processing on Anthocyanin Stability in Foods; Mechanisms and Kinetics of Degradation. *Trends in Food Science & Technology* 21:3-11.
- Simanjuntak, S.G. 2010. *Tidak Perlu ke Jepang untuk Minum Sake*. <http://wisata.kompasiana.com/jalan-jalan/2010/08/23/tidak-perlu-ke-jepang-untuk-minum-sake-lamandau-yang-eksotik-part-1-235681.html>. 1 Juni 2013.

- Suardi, D. dan Ridwan. I. 2009. Beras Hitam, Pangan Berkhasiat yang Belum Populer. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian* 31(2): 9-10.
- Tournas, V., Stack, M.E., Mislives, P.B., Koch, H.A. dan Bandler, R. 2001. *BAM:Yeast, Mold an Mycotoxins*. <http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm071435.htm>. 12 November 2013.
- Walter, M. dan Marchesan, E. 2011. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Rice. *Brazilian Archives Biology and Technology* 54(1):371-377.
- Waterhouse, A. 2012. *Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine*. <http://waterhouse.ucdavis.edu/faqs/foolin-ciocalteu-micro-method-for-total-phenol-in-wine>. 12 November 2013.
- Yuan, L. C. 2010. *Investigating the Extracellular Amylases of Saccharomycopsis fibuligera*. <http://projectsday.hci.edu.sg/2010/15-FinalsWeb/Cat-01/1-47/introduction.html>. 8 April 2014.

