

**ISOLASI SENYAWA FENOLIK DARI BEKATUL TERFERMENTASI
(*Lactobacillus plantarum*) DAN UJI AKTIVITAS SEBAGAI
ANTIOKSIDAN**

Skripsi

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Sains (S.Si.)
pada Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Yogyakarta



Diajukan oleh :

SUCI SUGIARTI

No Mhs : 16612065

PROGRAM STUDI KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA

YOGYAKARTA

2021

**ISOLASI SENYAWA FENOLIK DARI BEKATUL TERFERMENTASI
(*Lactobacillus plantarum*) DAN UJI AKTIVITAS SEBAGAI
ANTIOKSIDAN**

Skripsi

yang diajukan oleh :

SUCI SUGIARTI

No Mhs : 16612065

Telah dipertahankan dihadapan Panitia Penguji Skripsi
Prodi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia

Tanggal : 27 Januari 2021

Dewan Penguji

1. Dr. Tatang Shabur Julianto, M.Si.
2. Amri Setyawati, S.Si., M.Sc.
3. Dr. Habibi Hidayat, S.Pd., M.Si.

Tanda tangan



Mengetahui,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia



Prof. Riyanto, S.Pd., M.Si., Ph.D.

NIK : 006120101

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Suci Sugiarti

NIM : 16612065

Program Studi : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi saya dengan judul Isolasi Senyawa Fenolik dari Bekatul Terfermentasi (*Lactobacillus plantarum*) dan Uji Aktivitas Sebagai Antioksidan bersifat asli dan tidak berisi material yang telah diterbitkan sebelumnya kecuali referensi yang disebutkan di dalam skripsi ini. Apabila terdapat kontribusi dari penulis lain, maka penulis tersebut secara eksplisit telah disebutkan didalam skripsi ini. Apabila kemudian hari ditemukan ketidaksesuaian dengan pernyataan ini, maka saya bersedia dituntut dan di proses sesuai dengan ketentuan yang berlaku.


Demikian pernyataan ini dibuat dengan sesungguhnya dan penuh tanggung jawab.

Yogyakarta, 27 januari 2021

Yang Menyatakan,

METERAI
TEMPEL
495B6AHF884959671

6000
ENAM RIBURUPIAH


Suci Sugiarti

NIM. 16612065

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Wr. Wb

Alhamdullillaa hirobbil'alamin, penulis hanturkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan berkah dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan Tugas Akhir/Proposal Skripsi yang berjudul "ISOLASI SENYAWA FENOLIK DARI BEKATUL TERFERMENTASI (*Lactobacillus plantarum*) DAN UJI AKTIVITAS SEBAGAI ANTIOKSIDAN". Shalawat dan salam senantiasa tercurahkan kepada Akhiirul anbiyaa' Nabiyallah Muhammad SAW beserta keluarga, sahabat dan seluruh pengikutnya hingga akhir zaman.

Tugas akhir/ Proposal Skripsi adalah salah satu mata kuliah wajib bagi mahasiswa semester VII Program Studi S-1 untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains (S.Si). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui bioavailabilitas antioksidan pada bekatul yang terfermentasi *L.plantarum*.

Proposal skripsi dapat terselesaikan hingga tersusunnya laporan ini, tidak lepas dari bimbingan dan pengarahan berbagai pihak. Untuk itu, dengan segala kerendahan hati, pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Fathul Wahid S.T., M.Sc., Ph.D. selaku Rektor Universitas Islam Indonesia.
2. Prof. Riyanto M.Sc., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.
3. Ibu Prof. Dr. Is Fatimah, S.Si., M.Si., selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.
4. Dr. Dwiarso Rubiyanto, S.Si., M.Si. selaku Ketua Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.
5. Dr. Tatang Shabur Julianto, S.Si., M.Si selaku Dosen Pembimbing Skripsi yang telah banyak meluangkan waktu untuk membimbing dan mengarahkan penulis selama melakukan perencanaan, penelitian hingga penulisan skripsi ini.

6. Orangtua penulis yang sangat berjasa selama ini mendampingi serta senantiasa yang tiada hentinya mendoakan. Penulis sangat berterima kasih yang sebesar-besarnya kepada kedua orangtua penulis yang selalu menemani saat pengerjaan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa Skripsi ini masih banyak kekurangan dan jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan demi kelengkapan dan kesempurnaan Skripsi ini. Semoga Skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi kitasemua. Aamiin

Wassalamu'alaikum Wr.Wb

Yogyakarta, 27 Januari 2021

Penulis



**ISOLASI SENYAWA FENOLIK DARI BEKATUL TERFERMENTASI
(*Lactobacillus plantarum*) DAN UJI AKTIVITAS SEBAGAI
ANTIOKSIDAN**

SUCI SUGIARTI

No. Mahasiswa : 16612065

INTISARI

Telah dilakukan isolasi senyawa fenolik pada bekatul dengan menggunakan bakteri *Lactobacillus plantarum*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bioavailabilitas antioksidan pada bekatul yang terfermentasi *L. plantarum*. *L. plantarum* digunakan untuk mengekstrak senyawa fenolik yang terdapat di dalam bekatul, yang kemudian dianalisis menggunakan GC-MS, dan diuji aktivitas antioksidannya dengan menggunakan uji radikal bebas DPPH, serta menggunakan asam askorbat sebagai pembanding. Hasil dari penelitian ini menunjukkan ekstrak bekatul terfermentasi hari ke-7 menghasilkan senyawa 2-Tert-Butyl-4,6-Bis(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxybenzyl)Phenol dengan nilai IC_{50} 98,746 $\mu\text{g/mL}$, nilai ini menandakan senyawa fenol tersebut tergolong ke dalam antioksidan yang kuat, hal ini sesuai dengan klasifikasi antioksidan dimana dari rentang 50-100 ppm merupakan senyawa yang termasuk kedalam antioksidan kuat.

Kata kunci: *Lactobacillus plantarum*, senyawa fenolik, GC-MS, DPPH, IC_{50} .

**ISOLATION OF PHENOLIC ACID FROM FERMENTED BEKATUL
(*Lactobacillus plantarum*) AND ACTIVITY TEST AS ANTIOXIDANT**

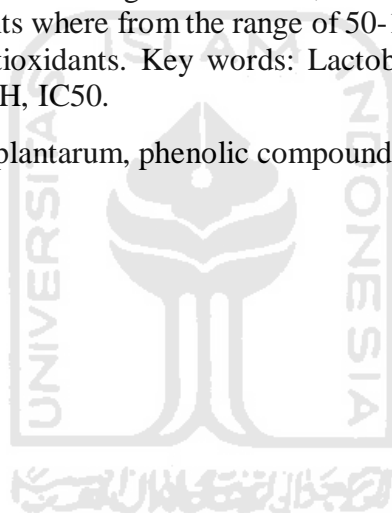
SUCI SUGIARTI

No. Mahasiswa : 16612065

ABSTRACT

The isolation of phenolic compounds on bran has been carried out using *Lactobacillus plantarum* bacteria. This study aims to determine the bioavailability of antioxidants in fermented *L. plantarum* bran. *L. plantarum* is used to extract phenolic compounds contained in rice bran, which are then analyzed using GC-MS, and tested for antioxidant activity using the DPPH free radical test, and using ascorbic acid as a comparison. The results of this study showed that the fermented rice bran extract on the 7th day produced 2-Tert-Butyl-4,6-Bis (3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxybenzyl) Phenol with an IC₅₀ value of 98.746 µg / mL, This indicates that these phenolic compounds are classified as strong antioxidants, this is in accordance with the classification of antioxidants where from the range of 50-100 ppm are compounds that are included in strong antioxidants. Key words: *Lactobacillus plantarum*, phenolic compounds, GC-MS, DPPH, IC₅₀.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, phenolic compounds, GC-MS, DPPH, IC₅₀.



DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR	iv
INTISARI	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
BAB III DASAR TEORI	9
3.1 Bekatul.....	9
3.2 Bakteri Asam Laktat (BAL)	10
3.3 <i>Lactobacillus plantarum</i>	12
3.4 Selulosa.....	12
3.5 Enzim Selulase.....	14
3.6 Fermentasi Asam Laktat.....	15
3.7 Aktivitas Enzim Selulase dari <i>Lactobacillus Plantarum</i>	16
3.8 Potensi <i>Lactobacillus Plantarum</i> dalam Mendegradasi Serat	16
3.9 Radikal Bebas	17
3.10 Antioksidan.....	20
3.11 Asam Fenolat	23
3.12 Asam Ferulat.....	24
3.13 Spektrofotometri UV-Vis	25
3.14 Faktor yang Mempengaruhi Penyerapan UV-Vis.....	25

3.15 Bagian-bagian Spektrofotometer	28
3.17 Prinsip Spektrofotometer	29
3.18 Jenis-jenis Spektrofotometer	30
3.19 GC-MS	30
3.20 Metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	34
3.21 Uji Aktivitas Antioksidan.....	35
3.22 Standar McFarland.....	37
BAB IV METODE PENELITIAN	39
4.1 Alat dan Bahan.....	39
4.1.1 Alat.....	39
4.1.2 Bahan.....	39
4.2 Prosedur Penelitian	39
4.2.1 Sterilisasi Alat	39
4.2.2 Pembuatan Media MRSA.....	39
4.2.3 Pembuatan Media MRSB.....	40
4.2.4 Pembuatan Larutan NaCl 0,85%.....	40
4.2.5 Regenerasi <i>Lactobacillus plantarum</i>	40
4.2.6 Pembuatan Buffer Sitrat pH 5.....	40
4.2.7 Pembuatan Inokulum <i>Lactobacillus plantarum</i>	40
4.2.8 Pembuatan Larutan NaCl 0,9%.....	40
4.2.9 Pembuatan Larutan McFarland 0,5	41
4.2.10 Pengenceran Bakteri.....	41
4.2.11 Fermentasi Bekatul dengan <i>L.plantarum</i>	41
4.2.12 Ekstraksi Menggunakan Eter Teknis	41
4.2.13 Analisia Hasil Ekstraksi dengan GC-MS.....	42
4.2.14 Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH.....	42
4.2.14.1 Pembuatan Larutan DPPH 0,4 Mm	42

4.2.14.2 Pembuatan dan Pengukuran Larutan Blanko	42
4.2.14.3 Pembuatan Kurva Standar Larutan DPPH 100 ppm	42
4.2.14.4 Pengukuran Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat 100 ppm	43
4.2.14.5 Pengukuran Aktivitas Antioksidan Sampel 100 ppm.....	44
BAB V PEMBAHASAN	45
5.1 Pembuatan Media.....	45
5.2 Peremajaan dan Pembuatan Inokulum <i>Lactobacillus plantarum</i>	45
5.3 Inokulasi Bakteri <i>Lactobacillus plantarum</i> Menggunakan MRSB	46
5.4 Larutan Fisiologis (NaCl 0,9% dan NaCl 0,85%)	47
5.5 Perbandingan Bakteri <i>L. plantarum</i> dengan McFarland	48
5.6 Fermentasi Bekatul dengan Menggunakan <i>L. plantarum</i>	49
5.7 Hasil Analisis GC-MS.....	51
5.8 Uji Aktivitas Antioksidan.....	54
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	62
6.1 Kesimpulan.....	62
6.2 Saran.....	62
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN	74

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Perkembangan Luas Panen Padi Nasional Tahun 2012-2016.....	1
Tabel 2. Kandungan Zat Gizi Bekatul.....	9
Tabel 3. Radiasi Elektromagnetik	25
Tabel 4. Karakteristik Berbagai Macam Kromofor	25
Tabel 5. Macam Pelarut dan Panjang Gelombang Tidak Menyerap Sinar UV	27
Tabel 6. Ketentuan Kekuatan Antioksidan.....	36
Tabel 7. Standar Kekeruhan McFarland.....	38
Tabel 8. Perbedaan McFarland dengan Sel Bakteri	48
Tabel 9. Hasil GC-MS Ekstrak Bekatul Hari Ke-2.....	51
Tabel 10. Hasil GC-MS Ekstrak Bekatul Hari Ke-5.....	53
Tabel 11. Hasil GC-MS Ekstrak Bekatul Hari Ke-7	53



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Skema Morfologi Gabah Kering	2
Gambar 2. <i>Lactobacillus Plantarum</i>	12
Gambar 3. Struktur Rantai Selulosa	13
Gambar 4. Mekanisme Antioksidan Endogen Sebagai Pertahanan Tubuh	22
Gambar 5. Struktur Asam Fenolat.....	24
Gambar 6. Struktur Asam Ferulat	24
Gambar 7. Cara Kerja Spektrofotometer	30
Gambar 8. Gas Chromatography Mass Spectrometry	34
Gambar 9. Reaksi Penangkapan Radikal DPPH oleh Antioksidan.....	34
Gambar 10. Resonansi DPPH (<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>).....	35
Gambar 11. Mekanisme Reaksi DPPH dengan Antioksidan.....	36
Gambar 12. Media Penumbuhan Bakteri.....	46
Gambar 13. Media MRSB dengan <i>L. Plantarum</i>	47
Gambar 14. Fermentasi Asam Laktat Oleh BAL.....	50
Gambar 15. Kromatogram GC-MS Ekstrak Bekatul Hari Ke-2.....	51
Gambar 16. Kromatogram GC-MS Ekstrak Bekatul Hari Ke-5	52
Gambar 17. Kromatogram GC-MS Ekstrak Bekatul Hari Ke-7	53
Gambar 18. Spektra MS Senyawa fenol.....	54
Gambar 19. Senyawa Fenol	54
Gambar 20. Gugus Kromofor dan Ausokrom Radikal DPPH	55
Gambar 21. Grafik Kurva Standar DPPH.....	55
Gambar 22. Hasil Scanning Panjang Gelombang Serapan Maksimum DPPH.....	56
Gambar 23. Grafik Penghambat DPPH Ekstrak Bekatul	58
Gambar 24. Reaksi DPPH dan Antioksidan	59
Gambar 25. Reaksi DPPH dengan Antioksidan senyawa Fenolik Ekstrak Bekatul	60



BAB I

PENDAHULUAN

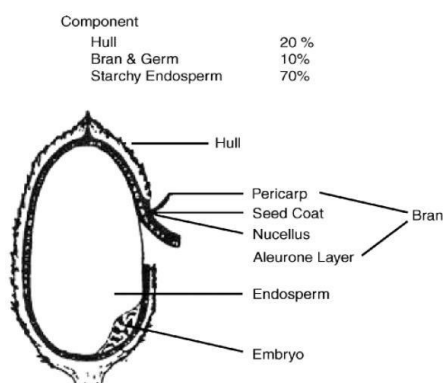
1.1 Latar Belakang

Produksi padi di Indonesia memiliki produktifitas yang cukup besar. Setiap tahunnya produksi padi hampir mengalami peningkatan. Menurut Badan Pusat Statistik mengungkapkan bahwa produksi padi pada tahun 2012 diperkirakan sebesar 68,96 juta ton Gabah Kering Giling (GKG) atau mengalami kenaikan sebesar 3,20 juta ton (4,87 persen) dibandingkan 2011. Dengan kondisi produksi padi yang selalu meningkat seperti ini dapat membawa dampak yang baik bagi masyarakat Indonesia. Di sisi lain, dengan besarnya jumlah produksi padi maka mengakibatkan bertambah besar juga hasil sisa dari penggilingan padi menjadi beras. Hasil penggilingan ini menghasilkan produk samping seperti menir, beras pecah, sekam, dan dedak (dedak padi). Menir dan beras pecah dapat digiling menjadi tepung sebagai bahan berbagai kue dan makanan lainnya. Sekam dapat dimanfaatkan untuk bahan bakar serta kompos. Sementara itu dedak saat ini baru dimanfaatkan untuk pakan ternak dan belum banyak digunakan sebagai sumber pangan manusia (Hapsari, 2013).

Dari data kementerian pertanian selama lima tahun terakhir (2012-2016) luas panen di Indonesia mengalami peningkatan rata-rata luas panen padi mencapai 12.445.524 hektar pada tahun 2012 dan mencapai 15.156.952 hektar ditahun 2016. Selama periode waktu tersebut peningkatan luas cukup signifikan hanya terjadi tiga kali yakni dari tahun 2012-2013 dan 2015-2016, masing masing sebesar 12.445.524, 13.835.252, 14.116.638 dan 15.156.925 sementara pada tahun 2014 mengalami penurunan sebesar 13.797.307. Peningkatan luas panen paling tinggi terjadi pada tahun 2016 meningkat sebesar 14.116.638 hektar. Dapat dilihat pada Tabel 1 (Purnomo, 2018).

Tabel 1. Perkembangan Luas Panen Padi Nasional Tahun 2012-2016

Tahun	Luas Panen Tanaman Padi (Ha)
2012	12.445.524
2013	13.835.252
2014	13.797.307
2015	14.116.638
2016	15.156.952



Gambar 1. Skema Morfologi Gabah Kering (Sumber : Orthoefer, 2005)

Bekatul merupakan hasil samping proses penggilingan padi dengan kandungan serat pangan yang tinggi. Lebih dari 20% pada bekatul adalah serat pangan yang sebagian besar diantaranya tidak dapat larut (Anonymous, 2002a). Bekatul mengandung antioksidan dalam jumlah besar seperti tokoferol, tokotrienol, orizanol dan fenolik (asam ferulat, vanilat dan kumarat). Senyawa fenolik memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi dengan menghambat oksidasi lemak sampai 90% serta dapat mencegah berbagai penyakit (Anonymous, 2002b).

Bekatul diketahui mengandung komponen antioksidan alami yang tinggi dalam jumlah berbeda dan proporsinya tergantung pada varietas padi. (Nam dkk., 2005; Shin dan Godber, 1994; Xu dan Godber, 2001). Varietas dan kondisi tempat tumbuh berpengaruh terhadap komponen antioksidan diakibatkan respon yang berbeda dari tanaman terhadap lingkungan (Butsat dan Siriamornpun, 2010). Arab dkk. (2011) mendapatkan hasil penelitian yang berbeda kandungan total fenolik (total phenolic content) antara 2 varietas padi di Iran. Shen dkk. (2009) menyatakan bahwa terdapat perbedaan yang sangat signifikan antar genotip padi yang diobservasi terhadap kandungan total fenolik, flavonoid dan kapasitas antioksidan radikal kation.

Radikal bebas adalah suatu atom atau molekul yang mempunyai elektron tidak berpasangan. Elektron tidak berpasangan tersebut menyebabkan radikal bebas sangat reaktif yang kemudian akan menangkap atau mengambil elektron dari senyawa lain seperti protein, lipid, karbohidrat, dan DNA untuk menetralkan diri. Radikal bebas dapat masuk ke dalam tubuh dan menyerang sel-sel yang sehat dan menyebabkan sel-sel tersebut kehilangan fungsi dan strukturnya. Akumulasi dari kerusakan tersebut berkontribusi terhadap beberapa penyakit dan menyebabkan kondisi yang biasa disebut sebagai penuaan dini (Liochev, 2013).

Radikal bebas merupakan salah satu molekul yang dianggap bertanggung jawab dalam berbagai penyakit yang diderita manusia, termasuk faktor yang paling berpengaruh pada penuaan dini. 80% penuaan pada wajah merupakan tanda dari pengaruh paparan sinar matahari, walaupun faktor lain seperti merokok, alkohol, stress dan lainnya berperan pula pada proses timbulnya kerut wajah dini (Uitto, 1997).

Efek negatif radikal bebas terhadap tubuh dapat dicegah dengan senyawa yang disebut antioksidan. Antioksidan memiliki kemampuan memberikan elektron, mengikat dan mengakhiri reaksi berantai radikal bebas (Halliwell, 2012). Antioksidan dibagi menjadi dua kelompok, yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetis. Antioksidan alami berasal dari hasil ekstraksi bahan alami yang berpotensi menangkap radikal bebas, sedangkan antioksidan sintetis diperoleh dari hasil sintesis secara kimia (Isfahlan, dkk., 2010). Namun, adanya kekhawatiran terhadap efek samping penggunaan antioksidan sintetis menyebabkan banyak penelitian tentang potensi antioksidan alami yang berasal dari tanaman (Saleh, Clark, Woodard, dan Deolu, 2010).

Antioksidan adalah zat yang dapat menetralkan radikal bebas sehingga atom dengan elektron yang tidak berpasangan mendapat pasangan elektron (Kosasih et al., 2004). Antioksidan atau reduktor berfungsi untuk mencegah terjadinya oksidasi atau menetralkan senyawa yang telah teroksidasi dengan cara menyumbangkan hidrogen atau elektron (Silalahi, 2006).

Antioksidan utama dalam bekatul beras adalah G-oryzanol (62,9%) dan asam fenolat (35,9%) (Laokuldilok dkk., 2011). Aktivitas antioksidan G-oryzanol telah banyak diketahui, sedangkan antioksidan asam fenolat sejauh ini banyak dipublikasikan berasal dari ekstrak gandum dan bekatul jagung. Oleh karena itu penelitian ini akan berkonsentrasi pada asam fenolat. Asam-asam fenolat diketahui dengan baik sebagai antioksidan dan juga mempunyai aktivitas antidiabetik yang telah dilaporkan dalam beberapa studi (Mukherjee dkk., 2006; Aslan dkk., 2007).

Lebih dari 1% antioksidan fenolik berikatan kovalen dengan serat tidak larut sehingga bioavailabilitasnya rendah. Antioksidan fenolik sulit untuk diekstrak karena banyak ikatan kovalen pada serat tidak larut bekatul. Ikatan kovalen pada serat tidak larut bekatul dapat dihidrolisis oleh enzim selulase dari mikroba (Miller, 2001). Bioavailabilitas antioksidan fenolik yang terikat pada serat tidak larut dapat ditingkatkan dengan memanfaatkan mikroba yang memiliki enzim untuk memetabolisme serat, diantaranya adalah bakteri

asam laktat (probiotik). Bakteri asam laktat memiliki enzim hidrolitik untuk memetabolisme serat tidak larut (selulosa, hemiselulosa). Terlepasnya ikatan kovalen pada serat tidak larut bekatul menyebabkan bioavailabilitas antioksidan fenolik meningkat (Karppinen, 2003).

Senyawa fenolat terkonjugasi merupakan senyawa fenolat yang strukturnya teresterifikasi pada gugus gula atau komponen molekul lainnya (Wang dkk., 2015). Berbeda dengan fenolat terkonjugasi, senyawa fenolat terikat merupakan senyawa fenolat yang tidak mudah larut dalam pelarut seperti metanol, etanol, dan aseton tanpa bantuan hidrolisis alkali. Senyawa fenolat terikat pada struktur komponen dinding sel seperti selulosa, hemiselulosa, lignin, pektin, dan protein (Pinelo et al., 2006; Bourvellec et al., 2009; Collinson dan Thielemans, 2010; Wang et al., 2015).

Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri yang banyak ditemukan pada produk fermentasi dan saluran pencernaan hewan ternak (Mulyani, 1996). Di dalam saluran pencernaan hewan ditemukan setidaknya 500 spesies bakteri yang sebagian besar merupakan bakteri asam laktat (Suardana, 2007) dan didominasi oleh genus *Lactobacillus* (Sumarsih dkk., 2009). Secara alami, keberadaan BAL di dalam saluran pencernaan hewan berperan sebagai mikroflora normal. Selain itu, BAL juga mampu bertindak sebagai probiotik dengan karakteristik mampu hidup pada pH rendah, toleransi terhadap garam empedu dan menghasilkan antibiotik serta asam organik. Penelitian Sumarsih dkk. (2012) melaporkan bahwa *L. plantarum* tidak hanya mampu bertindak sebagai probiotik namun juga mampu menghasilkan enzim selulase yang dapat membantu proses pencernaan serat kasar pada pakan ternak.

L. plantarum memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim selulase. Enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri dapat dimanfaatkan untuk membantu memecah sumber karbon selulosa menjadi glukosa selama pertumbuhan bakteri. *L. plantarum* sudah terbukti mampu menghasilkan enzim selulase berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Rosyada (2015).

Potensi *L. plantarum* dalam mendegradasi serat kasar (selulosa) juga sudah banyak dilaporkan. Lamid (2013) melaporkan bahwa penambahan isolat bakteri *L. plantarum* sebanyak 0,3-0,5% mampu menurunkan kandungan selulosa pucuk tebu secara efisien dengan selisih 2,20% dari kandungan selulosa pada perlakuan 0% bakteri *L. plantarum*. Dilaporkan juga dalam penelitian sebelumnya, bahwa *L. plantarum* mampu menurunkan

kadar serat pada bekatul sebesar 0,3% setelah 12 jam fermentasi (Zubaidah dkk., 2010). Fermentasi selama 28 hari menggunakan *L. plantarum* juga menurunkan kadar serat kasar tebon jagung sebesar 2,5% (Widodo, 2014) dan serat kasar rumput kаланjana sebesar 2,7% (Purwaningsih, 2015). Aktivitas enzim selulase dari *L. plantarum* yang diisolasi dari saluran pencernaan mentok juga dilaporkan yaitu sebesar 0,083 U/mL (Rosyada, 2015).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bioavailabilitas atau ketersediaan antioksidan pada bekatul yang terfermentasi *L. plantarum*.

1.2 Rumusan Masalah

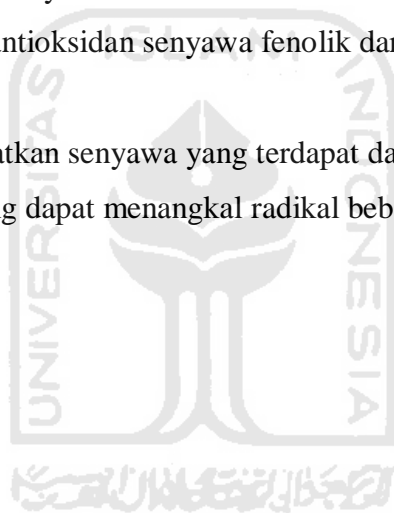
1. Bagaimana metode isolasi senyawa fenolik dari bekatul ?
2. Bagaimana nilai aktivitas antioksidan senyawa fenolik dari bekatul ?

1.3 Tujuan

1. Mengisolasi metode isolasi senyawa fenolik dari bekatul
2. Mengetahui nilai aktivitas antioksidan senyawa fenolik dari bekatul

1.4 Manfaat

Masyarakat dapat memanfaatkan senyawa yang terdapat dalam bekatul yaitu senyawa fenolik sebagai antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Arab dkk. (2011) mendapatkan hasil penelitian yang berbeda kandungan total fenolik antara 2 varietas padi di Iran. Shen dkk. (2009) menyatakan bahwa terdapat perbedaan yang sangat signifikan antar genotip padi yang diobservasi terhadap kandungan total fenolik, flavonoid dan kapasitas antioksidan radikal kation. Kandungan komponen polifenol beras bervariasi antar varietas di Thailand dilaporkan oleh Butsat dkk. (2009), di Australia dilaporkan oleh Zhou dkk. (2004) dan di Taiwan dilaporkan Huang dan Ng, (2012). Varietas padi yang ada di Indonesia sangat beragam baik yang berasal dari bibit lokal maupun bibit unggul dengan berbagai bentuk biji beras yang bermacam-macam. Demikian pula profil komponen bioaktif dari berbagai varietas padi masih sangat terbatas dipublikasikan, sehingga diperlukan penelitian yang menyangkut komposisi kimia bekatul dari berbagai varietas padi dari bentuk biji beras berbeda serta evaluasi pengaruh varietas padi terhadap aktivitas antioksidasi khususnya pada bekatul.

Asam-asam fenolat diketahui dengan baik sebagai antioksidan dan juga mempunyai aktivitas antidiabetik yang telah dilaporkan dalam beberapa studi (Mukherjee dkk., 2006; Aslan dkk., 2007). Taylor dkk., (1995) dan Shin dkk., (1992) melaporkan senyawa antioksidan yang dominan ditemukan pada dedak adalah turunan vitamin E dan orizanol. Riset terdahulu menyebutkan bahwa fermentasi dapat meningkatkan aktifitas antioksidan dari berbagai sumber seperti pada kedelai (Lin dkk., 2006, Esaki dkk., 1997, McCue and Shetty, 2003, Wardhani dkk., 2009), ampas buah cranberry (Vattem & Shetty, 2002), tempe dari kacang faba dan oat (Berghofer dkk., 1998), produk samping minyak zaitun (Bouzid dkk., 2005) dan beras (Bhanja dkk., 2008, Liang dkk., 2009).

Dalam penelitian Hartati, dkk., 2015, yang bertujuan untuk mengetahui komposisi kimia, kadar serat pangan serta aktivitas antioksidan ekstrak hidrofilik bekatul dari empat varietas padi yaitu IR-64, Sintanur, Rajalele dan Menthik wangi. Dimana masing-masing sampel bekatul dianalisis proksimat dan kadar serat pangannya. Ekstrak hidrofilik diperoleh dengan cara mengekstrak masing-masing sampel bekatul dengan pelarut metanol. Ekstrak diuji kandungan total fenol dengan reagen Folin Ciocalteu dan aktivitas

antioksidannya dengan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ke-empat sampel memiliki kadar air, kadar abu, kadar protein dan kadar lemak yang bervariasi. Kadar lemak bervariasi dari $16,80 \pm 0,05$ % - $23,75 \pm 0,04$ %db (% dry basis), dengan kadar tertinggi dimiliki bekatul varietas Sintanur ($23,75 \pm 0,04$ %db) dan terendah bekatul varietas IR-64 ($16,80 \pm 0,05$ %db). Kadar serat larut (soluble fiber, SF) bekatul dari ke-empat varietas padi tidak berbeda secara signifikan yaitu antara 4,07 - 4,14 %db namun terdapat perbedaan pada kandungan serat tak larut (insoluble fiber, IF) yang berpengaruh pada kadar serat total. Kandungan serat tak larut bekatul dari varietas Menthikwangi, Rajalele, IR-64 dan Sintanur berturut-turut adalah $27,64 \pm 0,46$, $28,04 \pm 0,25$, $29,15 \pm 0,26$ dan $30,44 \pm 0,60$ %db. Kandungan total fenol dan aktivitas antioksidan tertinggi dimiliki oleh ekstrak hidrofilik dari bekatul varietas Menthikwangi, masing-masing $2794,28 \pm 181,83$ μ g ekuivalen asam galat (EAG)/g bekatul untuk total fenol dan aktivitas antioksidan menangkal (scavenging) radikal bebas (DPPH) sebesar $41,28 \pm 0,60$ %.

Aktivitas enzim selulase dari genus *Lactobacillus* dilaporkan dalam penelitian Jennifer dan Thiruneelakandan (2015). 5 isolat bakteri *Lactobacillus* sp. yang berhasil diisolasi dari perairan di wilayah India, menghasilkan enzim selulase dengan aktivitas yang berbeda-beda. Waktu inkubasi selama 48 jam menghasilkan aktivitas enzim selulase tertinggi yaitu sebesar 4,098. Selanjutnya penggunaan variasi pH juga menghasilkan aktivitas enzim selulase yang berbeda, dimana pH 9 menghasilkan aktivitas enzim selulase tertinggi yaitu sebesar 0,178.

Kemampuan spesies bakteri *Lactobacillus plantarum* dalam menghasilkan enzim selulase didukung dengan adanya hasil penelitian mengenai aktivitas enzim selulase dari bakteri ini. Rosyada (2015) melaporkan bahwa, isolat *Labctobacillus plantarum* yang berhasil diisolasi dari saluran pencernaan mentok, memiliki aktivitas enzim selulase sebesar 0,083 U/mL.

Menurut Penelitian Widarta, dkk., Bekatul beras merah mengandung komponen bioaktif dalam jumlah yang tinggi termasuk di dalamnya senyawa fenolik. penelitian ini bertujuan untuk mengekstrak komponen bioaktif bekatul beras merah dan menguji stabilitas aktivitas antioksidannya. Penelitian dirancang menggunakan rancangan acak lengkap faktorial dengan 2 faktor. Faktor pertama adalah pH maserasi yang terdiri dari 3 taraf yaitu: 1, 2.5, dan 4. Faktor kedua adalah rasio bekatul dengan pelarut etanol yang ter

diri dari 4 taraf yaitu: 1:4, 1:6, 1:8, dan 1:10. Parameter ekstraksi yang diamati meliputi total fenolik, total antosianin, aktivitas antioksidan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstraksi pada pH 1 dan rasio bekatul dengan pelarut 1:10 memberikan hasil terbaik dengan nilai total antosianin, total fenolik, dan aktivitas antioksidan masing-masing adalah 5.45 mg/100 g bekatul, 743.51 mg/100 g bekatul, dan 92.19% dengan nilai IC50 sebesar 441.74 mg/L. Reduksi aktivitas antioksidan ekstrak bekatul beras merah oleh pemanasan lebih besar dibandingkan oleh oksidator.

Metode yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa antioksidan salah satunya adalah 1,1,-*Diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH). Suhartatik dkk., (2013) menggunakan metode DPPH dalam menentukan aktivitas antioksidan dalam beras ketan hitam. Mumpuni (2013) juga melaporkan tentang penggunaan metode DPPH untuk menentukan komponen antioksidan dalam minyak bekatul kasar. Keuntungan menggunakan metode DPPH adalah metode yang sederhana, mudah dan menggunakan sampel dalam jumlah yang sedikit.



BAB III

DASAR TEORI

3.1 Bekatul

Bekatul atau *rice bran* merupakan hasil samping proses penggilingan padi berasal dari lapisan kulit paling luar dari beras yaitu bagian antara butir beras dan kulit padi. Warna bekatul padi bervariasi dari coklat muda hingga coklat tua. Bekatul yang dihasilkan dari penggilingan padi dapat mencapai 8-12% dari jumlah total padi. Hasil samping lainnya adalah 15-20% sekam yang merupakan kulit luar dan 3% menir (BB Pascapanen, 2007), yaitu bagian yang hancur.

Departemen Pertanian (2015) menginfokan bahwa konsumsi beras masyarakat Indonesia masih tergolong tinggi mencapai 114 kg per kapita per tahun atau 312 g per hari. Peningkatan produksi dan konsumsi padi ini juga akan mengakibatkan meningkatkan produk samping dari penggilingan padi seperti bekatul. Persentase bekatul dari gabah kering giling di Indonesia sekitar 10%. Tahun 2015 produksi gabah Indonesia mencapai 62,5 ton GK (Gabah Kering Giling), sehingga bekatul yang dihasilkan pun mencapai 6,25 ton. Jumlah ini merupakan jumlah yang cukup besar jika hanya dijadikan ampas yang tidak dimanfaatkan. Sehingga diharapkan ampas dengan jumlah besar ini dapat digunakan dalam dunia industri. Hal ini dikarenakan bekatul memiliki kandungan nutrisi yang banyak dan bermanfaat bagi tubuh.

Bekatul mengandung berbagai zat gizi, antara lain adalah :

Tabel 2. Kandungan Zat Gizi Bekatul (Mazza, 1998).

No	Zat gizi	Kadar
1	Protein	11,5-17,2 %
2	Lipid	10-23 %
3	Karbohidrat	51,1-55 %
4	Serat	6,2-31,5 %
5	Abu	8-17,1 %
6	Mineral dan vitamin	

Menurut Astawan (2009) menyatakan bahwa bekatul merupakan sumber serat pangan (*dietary fiber*) yang sangat baik. Serat pangan mempunyai peranan yang sangat penting dalam mengosongkan perut dari sisa makanan yang tidak tercerna. Serat makanan adalah polisakarida yang tidak dapat dicerna oleh enzim yang ada di usus, selain itu juga tidak menghasilkan energi (Tirtawinata, 2006). Lestiani (2009) menyebutkan bahwa yang termasuk serat pangan diantaranya adalah gum, pectin, hemiselulosa dan selulosa. Selulosa merupakan serat-serat panjang dan membentuk struktur jaringan yang memperkuat dinding sel tanaman pada proses diferensiasi (Amalia, 2016). Braig, *et al.*, (2007) menyatakan bahwa serat di dalam bekatul mengandung 27 % selulosa, 37 % hemiselulosa, dan 5 % lignin. Sementara itu, berdasarkan Komara (2007) serat bekatul umumnya mengandung selulosa 8,7-11,4% dan hemiselulosa 9,6-12,8%

Irawadi (1990) menyatakan bahwa limbah pertanian seperti bekatul dan tongkol jagung, mengandung selulosa (40-60%), hemiselulosa (20-30%) dan lignin (15-30%). Berbagai hasil penelitian telah menunjukkan bahwa bekatul mempunyai nilai gizi tinggi, mengandung senyawa bioaktif yang berfungsi sebagai antioksidan yang bermanfaat dalam berbagai pencegahan penyakit termasuk penuaan dini.

Bekatul padi juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku industri farmasi dan makanan manusia, dikarenakan mempunyai kandungan nutrisi yang baik. Widarta, *et al.* (2012) telah membuktikan dalam penelitiannya bahwa ekstrak bekatul mempunyai aktivitas antioksidan. Sedangkan untuk makanan manusia bekatul dapat dimanfaatkan sebagai bahan campuran dalam pembuatan kue, biskuit, dan minuman fungsional (Janathan, 2007). Sedangkan komponen bioaktif yang berperan sebagai antioksidan diantaranya adalah senyawa fenolik, flavonoid, gamma oryzanol, tokoferol, tokotrienol, dan β -sitosterol (Elizabeth (2011) dalam Rashid, *et al.*, 2015).

3.2 Bakteri Asam Laktat (BAL)

Bakteri Asam Laktat (BAL) adalah bakteri yang menguntungkan karena dapat digunakan dalam proses pengawetan bahan pangan. BAL termasuk dalam bakteri Gram positif, tidak berspora, berbentuk bulat maupun batang, dan menghasilkan asam laktat sebagai mayoritas produk akhir selama memfermentasi. BAL dapat tumbuh pada suhu 5-45 °C dan toleran terhadap kondisi asam, dengan sebagian besar strain mampu tumbuh pada pH 4,4. Pertumbuhannya optimum pada pH 5,5–6,5 dan membutuhkan nutrisi kompleks, seperti asam amino, peptida, basa nukleotida, vitamin, mineral, asam lemak dan

karbohidrat (Axelsson, 2004). Metabolit BAL yang berfungsi sebagai senyawa antimikroba antara lain asam organik (asam laktat dan asam asetat), bakteriosin, hidrogen peroksida (Ouweland dan Vesterlund, 2004). BAL merupakan kelompok bakteri yang paling banyak menghasilkan bakteriosin. Secara umum, bakteriosin yang disekresikan oleh BAL merupakan peptida kationik kecil dengan 30 sampai 60 residu asam amino dan tahan terhadap pemanasan (Balasubramanyam, dkk., 1995).

Bakteri Asam laktat (BAL) adalah kelompok bakteri gram positif, katalase negatif dan dapat memproduksi asam laktat dengan cara memfermentasi karbohidrat. Selnya berbentuk kokus, tersusun berpasangan atau berbentuk rantai, tidak bergerak, tidak berspora, anaerob fakultatif, bersifat non motil dan mesofil (Ray, 2004). BAL mempunyai peran utama dalam fermentasi untuk menghasilkan asam pada pangan fermentasi. Asam tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri-bakteri patogen dan bakteri pembusuk makanan (Smid and Gorris, 2007). BAL termasuk dalam kelompok bakteri baik dan umumnya memenuhi status GRAS (Generally Recognized as safe) yaitu aman bagi manusia, sehingga dapat diaplikasikan sebagai agen probiotik (Surono, 2004). Probiotik adalah mikroba menguntungkan dan bermanfaat untuk memperbaiki keseimbangan mikroflora dalam saluran pencernaan dan memberikan pengaruh positif terhadap fisiologi dan kesehatan inangnya (Afrianto dan Liviawaty, 2005).

Berdasarkan tipe fermentasi BAL terbagi menjadi homofermentatif dan heterofermentatif. Kelompok homofermentatif menghasilkan asam laktat sebagai produk utama dari fermentasi gula, sedangkan kelompok heterofermentatif menghasilkan asam laktat dan senyawa lain yaitu CO₂, etanol, asetaldehid, diasetil (Fardiaz, 1995). BAL pada pangan fermentasi dapat menimbulkan efek preservatif disebabkan oleh kondisi asam yang terbentuk selama pemrosesan dan selanjutnya selama penyimpanan. Efek asam tersebut diakibatkan adanya konversi karbohidrat menjadi asam organik (asam laktat dan asam asetat) dan menurunkan pH produk selama fermentasi (Vuyst dan Vandamme, 1994). Menurut (Rahayu, dkk., (1999) dalam Yuliana (2008) asam yang dihasilkan dapat mencegah pertumbuhan mikroba lain yang tidak dikehendaki selama proses fermentasi berlangsung. Keberhasilan proses fermentasi dipengaruhi oleh keberhasilan dalam mengoptimalkan faktor-faktor dari pertumbuhan mikroba yang diinginkan. Selain itu setiap bakteri memiliki perbedaan pola pertumbuhan, periode waktu yang dibutuhkan untuk tumbuh atau beradaptasi juga metabolit yang dihasilkan (Yuliana, 2008).

3.3 *Lactobacillus Plantarum*

L. plantarum merupakan salah satu jenis BAL homofermentatif dengan pertumbuhan yang optimal pada suhu 30-37 °C serta pada pH 5-7 (Emanuel, dkk., 2005). *L. plantarum* berbentuk batang dengan ukuran 0,5-1,5 sampai 1,0-10 µm, tidak bergerak (nonmotil), memiliki sifat katalase negatif, aerob atau fakultatif anerob, mampu mencairkan gelatin, cepat mencerna protein, tidak mereduksi nitrat, toleran terhadap asam, dan mampu memproduksi asam laktat. Dalam media agar, *L. plantarum* membentuk koloni berukuran 2-3 mm, berwarna putih opaque, konveks, dan dikenal sebagai bakteri pembentuk asam laktat (Kuswanto dan Sudarmadji, 1998).

L. plantarum memiliki kemampuan untuk menghambat bakteri patogen dan bakteri pembusuk dalam keadaan asam (Delgado, dkk., 2001). Selain itu juga berguna dalam pembentukan asam laktat, penghasil hidrogen peroksida tertinggi dibandingkan bakteri asam laktat lainnya dan menghasilkan bakteriosin yang merupakan senyawa protein yang bersifat bakterisidal (James, dkk., 1992). Ogunbanwo (2003) melakukan produksi bakteriosin dari *L. plantarum* F1 dan memperoleh hasil produksi maksimum pada kondisi pH 2,0-6,0 dengan aktivitas penghambatan *E. coli* mencapai 12 mm.



Gambar 2. *Lactobacillus Plantarum*.

Bakteri asam laktat biasanya ditumbuhkan pada media de Mann Rogose and Sharpe (MRS). Media MRS merupakan media spesifik untuk pertumbuhan bakteri asam laktat.

3.4 Selulosa.

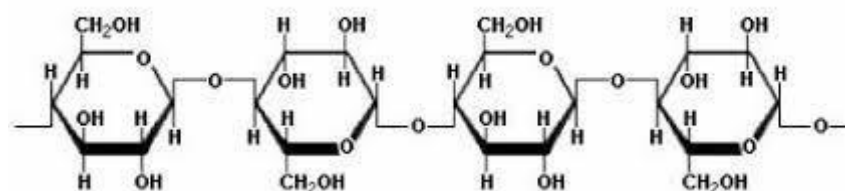
Selulosa merupakan unsur pokok pada tanaman dan biopolymer linier dari molekul anhidroglukopiranosida pada ikatan β -1,4 glukosidik yang berlimpah dialam (Dashtban *et al*, 2009). Struktur linier ini menyebabkan selulosa bersifat kristalin dan tidak mudah larut. Selulosa tidak mudah didegradasi secara kimia maupun mekanis. Dialam, biasanya selulosa berasosiasi dengan polisakarida lain seperti hemiselulosa atau lignin membentuk kerangka utama dinding sel tumbuhan (Holtzapple, 1993). Menurut Gayakor dan Eriksen (1980)

Selulosa tidak pernah ditemukan dalam keadaan murni di alam, tetapi selalu berasosiasi dengan polisakarida lain seperti lignin, pectin, hemiselulosa dan xilan. Selulosa ditemukan sebagai dinding sel tumbuhan, tidak larut dalam air, ditemukan banyak pada batang, dahan, tangkai, daun, dan hampir semua jaringan tumbuhan. Kayu, katun, bambu dan serat tumbuhan mengandung selulosa sebesar (98-99%) (Hawah, 2004). Sedangkan menurut Tjokrokoesoemo (1986) selulosa adalah bahan penyusun utama dari serat dan dinding sel tanaman. Bahan ini terdiri dari sejumlah besar molekul yang saling berikatan melalui gugus β -glukosida dari molekul yang satu dengan gugus hidroksil C-4 dari molekul glukosa yang lain.

Pada tanaman, selulosa dilapisi oleh polimer yang sebagian besar terdiri dari xilan dan lignin. Xilan dapat didegradasi oleh xilanase, akan tetapi lignin sangat sulit terdegradasi. Jika xilan dan lignin dihilangkan, maka selulosa dapat didegradasi oleh selulase dari bakteri atau kapang selulolitik untuk menghasilkan selobiosa dan glukosa (Bayer, *et al.*, 1994).

Ada tiga jenis selulosa yaitu α , β , dan γ selulosa adalah bagian yang tidak larut dalam alkali, β selulosa adalah bagian yang larut dalam alkali, dan kemudian dapat mengendap jika ditambahkan asam, sedangkan γ selulosa bagian yang larut dalam alkali dan tetap larut jika ditambahkan asam (Vengel dan Wegner, 1995).

Rantai molekul selulosa tersusun sejajar dan dipengaruhi oleh ikatan hydrogen antara gugus-gugus OH yang bersebelahan. Dengan adanya ikatan hydrogen dari gugus-gugus hidroksil antar rantai akan terjadi orientasi paralel yang memanjang. Apabila susunannya teratur maka, akan terjadi daerah yang disebut daerah kristalin, disamping susunan yang teratur ini terdapat pula bagian yang kurang teratur, yang disebut amorf. Selulosa mempunyai kemampuan untuk mengikat air yang terabsorpsi pada gugus hidroksil oleh karena terbentuknya ikatan hydrogen (Wirahadikusumah dan Rahwono, 1990). Struktur selulosa dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur Rantai Selulosa

3.5 Enzim selulase

Enzim merupakan protein khusus yang bergabung dengan suatu substrat spesifik untuk mengkatalisis reaksi biokimia dari substrat tersebut (Maier *d.*, 2000), menurut Lehninger (1997), enzim adalah biokatalisator yang mampu meningkatkan kecepatan reaksi spesifik tanpa ikut bereaksi dan tidak menghasilkan produk samping, bersifat jauh lebih efisien dibandingkan dengan katalis lain, disebabkan molekul enzim memiliki spesifitas yang tinggi terhadap substratnya.

Menurut palmer (1985), reaksi antara enzim dengan substrat dapat terjadi menurut dua hipotesis berikut :

a. Hipotesis *Lock and Key*

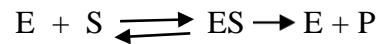
Spesifitas enzim termasuk adanya struktur komplementer antara enzim dengan substrat terjadi karena substrat mempunyai kesesuaian bentuk ruang dengan enzim pada struktur sisi aktif enzim

b. Hipotesis *Induce-Fit*

Substrat mempunyai kesesuaian ruang dengan sisi aktif pada kompleks enzim-substrat, tetapi dalam proses pengikatan substrat enzim mengalami perubahan konformasi sehingga strukturnya sesuai dengan substrat. Proses ini disebut sebagai proses induksi.

Enzim umumnya dihasilkan di dalam sel, beberapa diekstrak melalui dinding sel dan dapat berfungsi di luar sel. Jadi dikenal dua tipe enzim yaitu enzim ekstraseluler (berfungsi di luar sel) dan enzim intraseluler (berfungsi di dalam sel). Fungsi utama enzim ekstraseluler adalah mengubah nutrien di sekitarnya sedemikian rupa sehingga nutrien tersebut masuk ke dalam sel. Sedangkan enzim intraseluler mensintesis bahan seluler atau menguraikan nutrien untuk menyediakan energi yang dibutuhkan sel. Untuk memisahkan protein enzim tertentu dari ekstrak kasar yang mengandung banyak unsur lain maka dilakukan isolasi atau pemurnian enzim (Aulanni'am, 2005).

Enzim selulase merupakan enzim yang memegang peranan penting dalam proses biokenversi limbah-limbah organik berselulosa menjadi glukosa (Chalal, 1983). Pembentukan glukosa secara enzimatis sesuai dengan reaksi katalitik berikut:



Keterangan :

- E : enzim
 S : substrat
 ES : enzim-substrat
 P : produk

Reaksi diatas menunjukkan bahwa terjadi reaksi sementara antara enzim dengan substrat. Ikatan ini sifatnya labil dan hanya terjadi dalam waktu yang singkat. Kemudian ikatan ini putus kembali menjadi enzim dan produk, dalam hal ini berupa glukosa. Pembentukan glukosa ini terjadi karena adanya degradasi selulosa dalam substrat CMC oleh enzim selulase.

Kerja enzim selulase dihambat dengan adanya glukanolakton dan logam- logam berat seperti tembaga dan merkuri, tetapi penghambatan dengan logam ini dapat dinetralsir dengan penambahan sistein, sehingga aktivitas enzim akan kembali normal. Penghambatan oleh glukanolaktan lebih banyak terjadi pada substrat selobiosa dan oligosakarida lain yang lebih sederhana dan lebih kecil pengaruhnya pada substrat selulosa (Kulp, 1975).

3.6 Fermentasi Asam Laktat

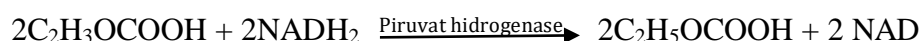
Fermentasi asam laktat yaitu fermentasi dimana hasil akhirnya adalah asam laktat. Peristiwa ini dapat terjadi di otot dalam kondisi anaerob (Effendi, 2015).

Reaksinya : $C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{Enzim}} 2C_2H_5OCOOH + \text{Energi}$

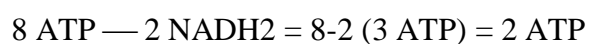
Prosesnya

- a. Glukosa $\xrightarrow{\text{Enzim}}$ asam piruvat (proses Glikolisis)
 $C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{Enzim}} 2C_2H_5OCOOH + \text{Energi}$

- b. Dehidrogenasi asam piruvat akan terbentuk asam laktat.



Energi yang terbentuk dari glikolisis hingga terbentuk asam laktat :



3.7 Aktivitas Enzim Selulase dari *Lactobacillus plantarum*

Sejumlah mikroba probiotik menghasilkan senyawa atau zat-zat yang diperlukan untuk membantu proses pencernaan substrat bahan makanan tertentu dalam saluran pencernaan, senyawa tersebut adalah enzim. Mikroba-mikroba probiotik penghasil asam laktat dari spesies *Lactobacillus* menghasilkan enzim selulase yang membantu proses pencernaan. Enzim ini mampu memecah molekul- molekul kompleks menjadi molekul sederhana akan mempermudah pencernaan lanjutan dan penyerapan oleh saluran pencernaan hewan. Di sisi lain, mikroorganisme pelaku pemecah ini mendapat keuntungan berupa energi yang diperoleh dari hasil perombakan molekul kompleks tersebut (Effendi, 2002).

Aktivitas enzim selulase dari genus *Lactobacillus* dilaporkan dalam penelitian Jennifer dan Thiruneelakandan (2015). 5 isolat bakteri *Lactobacillus* sp. yang berhasil diisolasi dari perairan di wilayah India, menghasilkan enzim selulase dengan aktivitas yang berbeda-beda. Waktu inkubasi selama 48 jam menghasilkan aktivitas enzim selulase tertinggi yaitu sebesar 4,098. Selanjutnya penggunaan variasi pH juga menghasilkan aktivitas enzim selulase yang berbeda, dimana pH 9 menghasilkan aktivitas enzim selulase tertinggi yaitu sebesar 0,178.

3.8 Potensi *Lactobacillus plantarum* dalam Mendegradasi Serat

Lactobacillus plantarum dilaporkan dapat menurunkan kadar serat kasar pada bekatul. Selama fermentasi pada media bekatul, terjadi penurunan kadar serat kasar sejalan dengan total kenaikan BAL, diduga semakin meningkat jumlah BAL semakin banyak BAL yang memanfaatkan serat untuk metabolisme sel (Zubaidah dkk., 2012). Dilaporkan dalam penelitian sebelumnya, bahwa *L. plantarum* mampu menurunkan kadar serat pada bekatul sebesar 0,3 % setelah 12 jam fermentasi. Bakteri asam laktat memanfaatkan serat untuk metabolisme sel. Serat kasar tersebut dihidrolisis menjadi senyawa sederhana selanjutnya difermentasi oleh BAL melalui glikolisis menjadi asam piruvat dan akhirnya menghasilkan asam lemak rantai pendek (Zubaidah dkk., 2010).

Selama fermentasi, bakteri asam laktat akan memanfaatkan nutrisi seperti karbohidrat, protein dan serat pangan sebagai sumber energi untuk pertumbuhan, pembentukan sel dan biosintesa produk-produk metabolit (Zubaidah dkk., 2010; 2012). Karppinen (2003) menjelaskan bahwa serat kasar dapat difermentasi oleh bakteri asam laktat meskipun kecepatan fermentasinya lebih lambat dari pada serat pangan larut. Hal ini disebabkan karena keterbatasan enzim hidrolitik pemecah serat pangan tidak larut.

Penambahan bakteri *Lactobacillus plantarum* sebanyak 0,3-0,5% mampu menurunkan kandungan selulosa pucuk tebu secara efisien dengan selisih 2,20% dari kandungan serat kasar pada perlakuan 0% bakteri *L.plantarum* (Lamid, 2013). Waren (1996) menjelaskan bahwa mikroorganisme sangat efisien dalam mendegradasi pati, kitin dan polisakarida dinding sel tanaman. McDonald *et al.* (2004) menambahkan bahwa bakteri dapat berkembang dengan menggunakan isi sel tanaman maupun karbohidrat terlarut sebagai media tumbuhnya. Hal ini karena mikroorganisme menghasilkan enzim yang dapat mencerna komponen polisakarida yaitu selulosa dan hemiselulosa menjadi karbohidrat sederhana.

3.9 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah sekelompok bahan kimia baik berupa atom maupun molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan pada lapisan luarnya atau kehilangan elektron, sehingga apabila dua radikal bebas bertemu, mereka bisa memakai bersama elektron tidak berpasangan membentuk ikatan kovalen. Molekul biologi pada dasarnya tidak ada yang bersifat radikal. Apabila molekul non radikal bertemu dengan radikal bebas, maka akan terbentuk suatu molekul radikal yang baru. Dapat dikatakan, radikal bebas bersifat tidak stabil dan selalu berusaha mengambil elektron dari molekul di sekitarnya, sehingga radikal bebas bersifat toksik terhadap molekul biologi/sel. Radikal bebas dapat mengganggu produksi DNA, lapisan lipid pada dinding sel, mempengaruhi pembuluh darah, produksi prostaglandin, dan protein lain seperti enzim yang terdapat dalam tubuh.

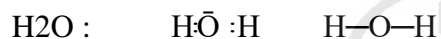
Beberapa oksidan dalam biologi yang dapat menyebabkan radikal bebas adalah kelompok molekul oksigen reaktif (ROS) seperti, anion superoksida (O_2^{*-}) dan radikal hidroksil ($*OH$) serta kelompok non-radikal reaktif, seperti hidrogen peroksida (H_2O_2) atau oksigen singlet ($1O_2$). Pham-Huy *et al* (2008) mengatakan bahwa oksidan anion superoksida dianggap sebagai molekul yang paling kuat dan merusak. Ini dikarenakan adanya rantai transportasi mitokondria dan sumber fisiologis utama (O_2^{*-}) (Labola, 2017). Hal ini dapat dilihat misalnya pada air (H_2O). Ikatan atom oksigen dengan hidrogen pada air merupakan ikatan kovalen, yaitu ikatan kimia yang timbul karena sepasang elektron dimiliki bersama oleh dua atom. Elektron yang tidak memiliki pasangan cenderung akan menarik elektron dari senyawa lainnya, sehingga elektron tersebut akan dimiliki bersama oleh dua atom atau senyawa dan terbentuk suatu senyawa radikal bebas baru yang lebih reaktif. Reaktivitas yang meningkat tersebut menyebabkan senyawa radikal bebas menjadi lebih mudah untuk menyerang sel-sel sehat dalam tubuh. Jika pertahanan

tubuh lemah maka sel-sel tersebut menjadi sakit atau rusak (Uppu, Murthy, Pryor, dan Parinandi, 2010).

Sumber radikal bebas terbagi menjadi 2 macam, yaitu endogenus dan eksogenus yang terjadi melalui sederetan mekanisme reaksi. Radikal bebas endogenus merupakan radikal bebas yang di hasilkan dari proses metabolisme tubuh, sedangkan sumber radikal bebaseksogenus merupakan radikal bebas yang di hasilkan dari luar tubuh seperti asap rokok, beberapa logam, hasil penyinaran ultra violet, radiasi, zat kimiawi dalam makanan dan polutan lain. Misalnya pada molekul air, ikatan atom oksigen dengan atom hidrogen berupa ikatan kovalen (Krisna, 2017).

Atom Hidrogen : $\bullet\text{H}$

Atom Oksigen : $\bullet\text{O}\bullet$



Bila terdapat sumber energi yang cukup besar, misalnya karena radiasi, molekul air dapat mengalami pembelahan homolitik



Radikal bebas tersebut memiliki 2 sifat yaitu:

1. Reaktivitasnya yang tinggi karena akan cenderung menarik elektron dari senyawa yang lainnya lagi.
2. Memiliki kemampuan untuk mengubah suatu molekul, atom, atau senyawa untuk menjadi suatu radikal baru (Amarowicz, dkk., 2002).

Target utama radikal bebas adalah protein, karbohidrat, asam lemak tak jenuh dan lipoprotein, serta unsur-unsur DNA. Dari molekul-molekul target tersebut, yang paling rentan terhadap serangan radikal bebas adalah asam lemak tak jenuh. Senyawa radikal bebas di dalam tubuh dapat merusak asam lemak tak jenuh ganda pada membran sel sehingga dinding sel menjadi rapuh, merusak basa DNA sehingga mengacaukan sistem genetika, dan berlanjut pada pembentukan sel kanker. Radikal bebas akan terus mencari elektron dari molekul-molekul di sekitarnya dan apabila tidak dikendalikan reaksi berantai ini dapat berlangsung secara terus menerus (Halliwell dan Gutteridge, 2000).

Radikal bebas dapat dihasilkan dari metabolisme tubuh yang merupakan faktor internal. Selain itu juga dihasilkan oleh faktor eksternal seperti asap rokok, hasil penyinaran ultra violet, zat pemicu radikal dalam makanan dan polutan lainnya. Penyakit yang disebabkan radikal bebas bersifat kronis yaitu dibutuhkan waktu bertahun-tahun untuk penyakit tersebut menjadi nyata atau bersifat akumulatif. Contoh penyakit yang sering dihubungkan dengan radikal bebas adalah serangan jantung, kanker, katarak, dan menurunnya fungsi ginjal. Untuk mencegah penyakit kronis karena radikal bebas diperlukan antioksidan.

Radikal bebas yang mengambil elektron dari tubuh manusia dapat menyebabkan perubahan struktur DNA (Deoxy Nucleic Acid) sehingga timbullah sel-sel mutan. Kerusakan sel yang diakibatkan serangan radikal bebas antara lain:

1. Kerusakan struktur DNA (deoxy nucleic acid) pada inti sel. Senyawa radikal bebas merupakan salah satu penyebab kerusakan DNA di samping penyebab lain seperti virus, radiasi dan zat kimia karsinogen. Akibatnya pembelahan sel terganggu. Terjadi perubahan abnormal yang mengenai gen tertentu dalam tubuh yang menyebabkan penyakit kanker.
2. Kerusakan membran sel. Komponen terpenting membran sel mengandung asam lemak tak jenuh ganda yang sangat rentan terhadap serangan radikal bebas. Akibatnya, struktur dan fungsi membran akan berubah, yang lebih ekstrim adalah mematikan sel-sel pada jaringan tubuh. Misalnya kerusakan sel organ tubuh.
3. Kerusakan Protein. Terjadinya kerusakan akibat serangan radikal bebas ini termasuk oksidasi protein yang menyebabkan kerusakan jaringan tempat protein itu berada. Contohnya: kerusakan protein pada lensa mata yang mengakibatkan katarak.
4. Kerusakan lipid peroksida. Ini terjadi bila asam lemak tak jenuh terserang radikal bebas, sehingga reaksi antar zat gizi dalam tubuh menghasilkan peroksida yang menyebabkan kerusakan sel sehingga dianggap salah satu penyebab terjadinya berbagai penyakit degeneratif (kemerosotan fungsi tubuh).
5. Dapat menimbulkan Autoimun. Dalam keadaan normal, antibodi hanya terbentuk bila ada antigen yang masuk dalam tubuh. Autoimun adalah terbentuknya antibodi terhadap suatu sel tubuh biasa dan hal ini dapat merusak jaringan tubuh.
6. Proses Penuaan Paparan radikal bebas bagi tubuh manusia bersifat akumulatif yang akan muncul sebagai penyakit apabila sistem imunitas tubuh tidak lagi dapat mentoleransi keberadaan senyawa radikal bebas. Hal ini dipengaruhi oleh keseimbangan kinerja radikal bebas yang berada dalam tubuh ataupun yang masuk

ke dalam tubuh melalui lingkungan dengan kadar antioksidan dalam tubuh. Bila kadar radikal bebas melampaui kemampuan tubuh untuk mengelolanya maka akan timbul kondisi stress oksidatif (*oxidative stress*). Stress oksidatif ini lah yang menjadi penyebab utama penyakit stroke, jantung, tekanan darah tinggi, preeklamsia, kanker dan lainnya (Fakriah, 2019).

Radikal bebas yang mengambil elektron dari DNA dapat menyebabkan perubahan struktur DNA sehingga timbullah sel-sel mutan. Bila mutasi ini terjadi berlangsung lama dapat menjadi kanker. Radikal bebas juga berperan dalam proses menua, dimana reaksi inisiasi radikal bebas di mitokondria menyebabkan diproduksinya *Reactive Oxygen Species (ROS)* yang bersifat reaktif. Radikal bebas dapat dihasilkan dari hasil metabolisme tubuh dan faktor eksternal seperti asap rokok, hasil penyinaran ultra violet, zat kimiawi dalam makanan dan polutan lain. Tubuh manusia dapat menetralsir radikal bebas bila jumlahnya tidak berlebihan. Mekanisme pertahanan tubuh dari radikal bebas adalah berupa antioksidan di tingkat sel, membran, dan ekstra sel.

3.10 Antioksidan

Antioksidan adalah zat yang dapat melawan pengaruh bahaya dari radikal bebas atau *Reactive Oxygen Species (ROS)* yang terbentuk sebagai hasil dari metabolisme oksidatif yaitu hasil dari reaksi-reaksi kimia dan proses metabolik yang terjadi dalam tubuh (Goldberg, 2003). Senyawa antioksidan dapat berfungsi sebagai penangkap radikal bebas, pembentuk kompleks dengan logam-logam prooksidan dan berfungsi sebagai senyawa pereduksi (Andlauer *et al.*, 1998). Menurut Miller *et al.* (2000), antioksidan dapat menangkap radikal bebas sehingga menghambat mekanisme oksidatif yang merupakan penyebab penyakit- penyakit degeneratif seperti penyakit jantung, kanker, katarak, disfungsi otak dan artritis.

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih atom yang tidak berpasangan. Meskipun suatu radikal tidak bermuatan positif atau negatif, spesi semacam ini sangat reaktif karena adanya electron yang tidak berpasangan. Dalam mencapai kestabilan atom atau molekul, radikal bebas akan bereaksi dengan molekul disekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron. Reaksi ini akan terus-menerus berlangsung dalam tubuh, dan apabila tidak segera dihentikan akan menyebabkan timbulnya berbagai penyakit, seperti kanker, katarak, dan berbagai penyakit degeneratif lainnya.

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Winarsi, 2007). Berdasarkan sumbernya antioksidan dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetis. Antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami) secara toksikologi lebih aman untuk dikonsumsi dan lebih mudah diserap oleh tubuh daripada antioksidan sintetis (Madhavi, *et al.*, 1996). Salah satu antioksidan alami adalah vitamin C (L-asam askorbat). Vitamin C secara efektif menangkap radikal-radikal dan juga berperan dalam regenerasi vitamin E. Vitamin C dapat melindungi membrane biologis dan LD dari kerusakan prooksidatif dengan cara mengikat radikal peroksil dalam fase berair dari plasma atau sitosol. Antioksidan sintetis (antioksidan yang diperoleh hasil sintesis). Beberapa contoh antioksidan sintetis yang diizinkan penggunaannya untuk makanan dan penggunaannya telah sering digunakan, yaitu BHT, TBHQ dan tokoferol.

Antioksidan dapat juga digolongkan menjadi antioksidan primer (*Chainbreaking antioxidant*) dan antioksidan sekunder (*preventive antioxidant*) (Gordon, 1990).

1. Antioksidan primer

Antioksidan primer dapat bereaksi dengan radikal lipid dan mengubahnya menjadi bentuk yang lebih stabil. Sebuah senyawa dapat disebut sebagai antioksidan primer apabila senyawa tersebut dapat mendonorkan atom hidrogennya dengan cepat ke radikal lipid dan radikal antioksidan yang dihasilkan lebih stabil dari radikal lipid atau dapat diubah menjadi produk lain yang lebih stabil (Gordon, 1990). Senyawa yang termasuk dalam kelompok antioksidan primer (*Chain-breaking antioxidant*) adalah vitamin E (tokoferol), vitamin C (asam askorbat), β -karoten, glutathione dan sistein (Taher, 2003).

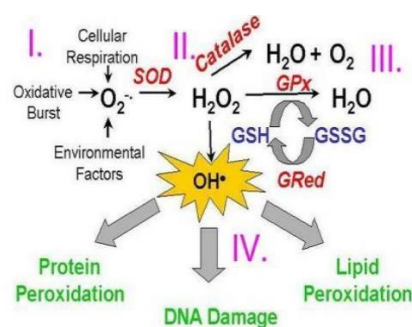
2. Antioksidan sekunder

Antioksidan sekunder berfungsi sebagai antioksidan pencegah yaitu menurunkan kecepatan inisiasi dengan berbagai mekanisme, seperti melalui pengikatan ion-ion logam, penangkapan oksigen dan penguraian hidroperoksida menjadi produk-produk nonradikal (Gordon, 1990). Pada dasarnya tujuan antioksidan sekunder (*preventive antioxidant*) adalah mencegah terjadinya radikal yang paling berbahaya yaitu radikal hidroksil (Taher, 2003). Contoh antioksidan sekunder antara lain turunan-turunan asam fosfat, asam askorbat, senyawa karoten, sterol, fosfolipid dan produk-produk reaksi maillard (Gordon, 1990)

Bekatul diketahui mengandung komponen antioksidan alami yang tinggi dalam jumlah berbeda dan proporsinya tergantung pada varietas padi. (Nam dkk., 2005; Shin dan Godber, 1994; Xu dan Godber, 2001). Bekatul mengandung antioksidan dalam jumlah besar dari golongan senyawa fenolik seperti asam galat, *protocatechuic*, *chlorogenic*, *p-hydroxybenzoic*, *caffeic*, *syringic*, vanilin, *p-coumaric* dan asam ferulat (Schmidt, *et al.*, 2014). Senyawa fenolik pada serealsebagian besar dalam bentuk terikat melalui ikatan ester dengan rantai arabinoxylan atau melalui obligasi eter untuk lignin (Hole, *et al.*, 2012).

Antioksidan Berdasarkan sumbernya, antioksidan dibagi menjadi antioksidan endogen, yaitu enzim-enzim yang bersifat antioksidan, seperti: Superoksida Dismutase (SOD), katalase (Cat), dan glutathione peroksidase (Gpx); serta antioksidan eksogen, yaitu yang didapat dari luar tubuh/makanan. Berbagai bahan alam asli Indonesia banyak mengandung antioksidan dengan berbagai bahan aktifnya, antara lain vitamin C, E, pro vitamin A, organosulfur, .-tocopherol, flavonoid, thymoquinone, statin, niasin, phycocyanin, dan lain-lain. Berbagai bahan alam, baik yang sudah lama digunakan sebagai makanan sehari-hari atau baru dikembangkan sebagai suplemen makanan, mengandung berbagai antioksidan tersebut(Werdhasari, 2014).

Antioksidan diperlukan untuk mencegah stres oksidatif. Stres oksidatif adalah kondisi ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas yang ada dengan jumlah antioksidan di dalam tubuh. Radikal bebas merupakan senyawa yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan dalam orbitalnya, sehingga bersifat sangat reaktif dan mampu mengoksidasi molekul di sekitarnya (lipid, protein, DNA, dan karbohidrat). Antioksidan bersifat sangat mudah dioksidasi, sehingga radikal bebas akan mengoksidasi antioksidan dan melindungi molekul lain dalam sel dari kerusakan akibat oksidasi oleh radikal bebas atau oksigen reaktif.



Gambar 4. Mekanisme Antioksidan Endogen Sebagai Pertahanan Tubuh (Werdhasari, 2014).

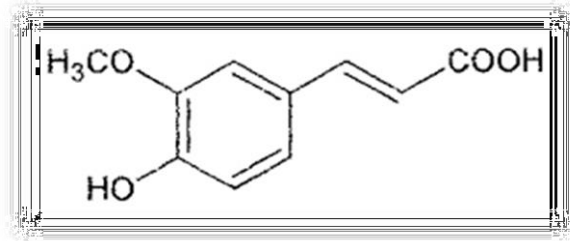
Gambar 4 menerangkan mekanisme pertahanan tubuh yang diperankan oleh antioksidan endogen. Enzim superoksida dismutase (SOD) akan mengubah radikal superoksida (O_2^-) yang dihasilkan dari respirasi serta yang berasal dari lingkungan, menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2), yang masih bersifat reaktif. SOD terdapat di dalam sitosol dan mitokondria.5 Peroksida dikatalisis oleh enzim katalase dan glutathion peroksidase (GPx). Katalase mampu menggunakan satu molekul H_2O_2 sebagai substrat elektron donor dan satu molekul H_2O_2 menjadi substrat elektron akseptor, sehingga 2 molekul H_2O_2 menjadi 2 H_2O dan O_2 . 8 Di dalam eritrosit dan jaringan lain, enzim glutathion peroksidase (GPx) mengkatalisis destruksi H_2O_2 dan lipid hidroperoksida dengan menggunakan glutathion tereduksi (GSH), melindungi lipid membran dan hemoglobin dari serangan oksidasi oleh H_2O_2 , sehingga mencegah terjadinya hemolisis yang disebabkan oleh serangan peroksida.8 GSH akan dioksidasi menjadi GS-SG. Agar GSH terus tersedia untuk membantu kerja enzim GPx, maka GS-SG ini harus direduksi lagi menjadi GSH(Werdhasari, 2014).

Fungsi ini diperankan oleh enzim glutathion reduktase (GRed).8 H_2O_2 yang tidak dikonversi menjadi H_2O , dapat membentuk radikal hidroksil reaktif (OH^\cdot) apabila bereaksi dengan ion logam transisi (Fe^{2+}/Cu^+). OH^\cdot bersifat lebih reaktif dan berbahaya karena dapat menyebabkan kerusakan sel melalui peroksidasi lipid, protein dan DNA. Dipihak lain, tubuh tidak mempunyai enzim yang dapat mengubah OH^\cdot menjadi molekul yang aman bagi sel. Tubuh manusia dapat menetralsir radikal bebas bila jumlahnya tidak berlebihan, dengan mekanisme pertahanan antioksidan endogen. Bila antioksidan endogen tidak mencukupi, tubuh membutuhkan antioksidan dari luar. Berbagai tanaman maupun obat sintetis dapat berperan sebagai antioksidan, antara lain bawang-bawangan, spirulina dan Nasetil sistein (NAC) (Werdhasari, 2014).

3.11 Asam Fenolat

Asam fenolat merupakan salah satu jenis metabolit sekunder yang banyak ditemukan dalam berbagai jenis tumbuhan. Turunan asam hidroksibenzoat dan asam hidroksisinamat adalah jenis asam fenolat yang banyak terdapat pada tumbuhan. Senyawa mudah larut merupakan senyawa fenolat bebas dan terkonjugasi, sedangkan senyawa tidak terlarut, atau senyawa fenolat terikat yang strukturnya teresterifikasi pada dinding sel (Wang et al., 2015; Chen et al., 2017).

Pada asam fenolat tidak larut air, asam fenolat terikat kovalen pada polimer dinding sel seperti selulosa, hemiselulosa (arabinoxilan), lignin, pektin (Luo et al., 2013). Asam fenolat bebas dapat diekstrak dengan larutan solvolisis seperti air, methanol, etanol, dan aseton. Metanol 80% merupakan pelarut yang paling sering digunakan untuk mengekstrak fenolat bebas dari sampel beras. Fenolat terikat pada umumnya dapat diekstrak dengan basa kuat dari residu hasil ekstraksi asam fenolat bebas (Alves et al., 2016).

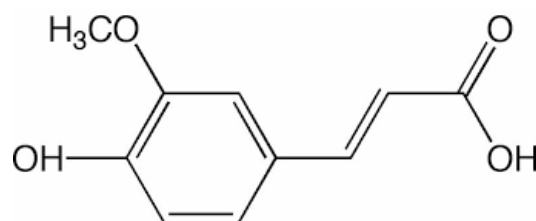


Gambar 5. Struktur Asam Fenolat.

3.12 Asam Ferulat

Asam ferulat merupakan salah satu asam fenolik yang paling melimpah pada tanaman dan dapat ditemukan dalam konsentrasi tinggi yang terdapat pada makanan seperti dedak jagung, dedak gandum, terong dan buah bit (Rosazza, et al., 1995; Kroon, et al., 1997; Rechner, et al., 2001; D'archivio, v., 2007). Asam ferulat ditemukan bebas, atau dalam bentuk dimer dan juga diesterifikasi dengan polisakarida dan protein pada dinding sel (Fazary dan Ju, 2007). Dedak mengandung jumlah asam ferulat yang signifikan. Asam ferulat merupakan antioksidan potensial dan berikatan ester dengan polimer dinding sel dan ditemukan dalam berbagai bentuk.

Asam ferulat biasanya ditemukan dalam bentuk fraksi yang tidak larut. Ikatan ester asam ferulat pada dinding sel membutuhkan hidrolisis asam atau basa untuk melepaskan ikatan senyawa tersebut dari matriks dinding sel (Gani, et al., 2012).



Gambar 6. Struktur Asam Ferulat (Ou, S.Y, 2012).

3.13 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis merupakan salah satu teknik analisis spektroskopi yang memakai sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dekat (190-380 nm) dan sinar tampak (380-780 nm) dengan memakai instrumen spektrofotometer (Mulja dan Suharman, 1995; Cazes, 2005)

Tabel 3. Radiasi elektromagnetik (Mulja dan Suharman, 1995)

Macam sinar	Panjang gelombang
Sinar X	10-100 pkm
Ultra-violet jauh	10-200 nm
Ultra-violet dekat	200-400 nm
Sinar tampak	400-750 nm
Infra-merah dekat	0,75-2 μm
Infra-merah tengah	2,5-50 μm
Infra-merah jauh	50-1000 μm
Gelombang mikro	0,1-100 cm
Gelombang radio	1-1000 cm

Spektrofotometri UV-Vis melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometri UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif (Skoog *et al.*, 2007; Mulja dan Suharman, 1995).

3.14 Faktor yang Mempengaruhi Penyerapan UV-Vis

1. Kromofor

Kromofor merupakan semua gugus atau atom dalam senyawa organik yang mampu menyerap sinar ultra-violet dan sinar tampak. Beberapa contoh kromofor dan panjang gelombang maksimalnya:

Tabel 4. Karakteristik berbagai macam kromofor (Skoog *et al.*, 2007)

Kromofor	Contoh	Pelarut	λ_{maks} (nm)	ϵ_{maks}	Tipe Transisi
Alkena	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}=\text{CH}_2$	n-Heptana	177	13.000	$\pi \rightarrow \pi^*$

Alkuna	C ₅ H ₁₁ C ₂ CCH ₃	n-Heptana	178	10.000	$\pi \rightarrow \pi^*$
			196	2.000	–
			225	160	–
Karbonil	CH ₃ CCH ₃ O	n-Heksana	186	1.000	$n \rightarrow \sigma^*$
			280	16	$n \rightarrow \pi^*$
Karboksil	CH ₃ COOH	Etanol	204	41	$n \rightarrow \pi^*$
Amida	CH ₃ CNH ₂ O	Air	214	60	$n \rightarrow \pi^*$
Azo	CH ₃ N=NCH ₃	Etanol	339	5	$n \rightarrow \pi^*$
Nitro	CH ₃ NO ₂	Isooktana	280	22	$n \rightarrow \pi^*$
Nitroso	C ₄ H ₄ NO	Etil eter	300	100	–
			665	20	$n \rightarrow \pi^*$
Nitrat	C ₂ H ₅ ONO ₂	Dioksan	270	12	$n \rightarrow \pi^*$

Selain kromofor, pada molekul organik juga dikenal istilah auksokrom yang merupakan gugus fungsional yang mempunyai elektron bebas, seperti: -OH, -O, NH₂ dan -OCH₃. Terikatnya gugus auksokrom pada gugus kromofor akan mengakibatkan pergeseran pitaabsorpsi menuju ke panjang gelombang yang lebih besar (Gandjar dan Rohman, 2012; Pavia *et al.*, 2009).

2. Pemilihan pelarut

Spektrum serapan UV sebagian besar tergantung pada pelarut yang digunakan untuk melarutkan obat. Suatu obat akan menyerap sinar UV secara maksimal pada suatu pelarut dan menyerap sinar UV secara minimal pada pelarut yang lain, sehingga pemilihan pelarut sangat penting (Gandjar dan Rohman, 2012).

Kriteria pemilihan suatu pelarut:

- Tidak menyerap sinar UV pada daerah yang sama dengan daerah obat akan dianalisis. Biasanya pelarut yang tidak mengandung sistem terkonjugasi merupakan pelarut pilihan.

Tabel 5. Macam pelarut dan panjang gelombang minimal pelarut tidak menyerap sinar UV(Gandjar dan Rohman, 2012)

Pelarut	UV <i>cut-off</i> (nm)
n-heksan	195
Sikloheksan	200
Tetraklorometan	265
Metilbenzen	285
Triklorometan	245
Diklorometan	230
Tetrahidrofuran	212
Propanon	330
Asetonitril	190
Iso-propanol	205
Etanol	205
Metanol	205
Asam etanoat	255
Air	190
1,4-dioksan	215
Isooktana	195
Trimetilfosfat	210

- b. Pengaruh pada struktur halus dan tajam (*fine structure*) pada pita serapan. Pelarut non polar tidak berikatan hidrogen dengan senyawa yang terlarut, dengan demikian spektrum senyawa mendekati spektrum senyawa dalam keadaan gasnya, yang mana struktur halus dan tajam yang teramati. Dalam pelarut polar, ikatan hidrogen membentuk kompleks dengan senyawa pelarut, dan struktur halus dan tajam tidak muncul.
- c. Kemampuan mempengaruhi panjang gelombang dari sinar UV yang diabsorpsi dalam keadaan dasar dan tereksitasi. Pelarut polar dalam keadaan tereksitasi tidak membentuk ikatan hidrogen semudah dalam keadaan dasar, sehingga meningkatkan energi transisi elektronik molekul. Pelarut polar menggeser transisi dari $n \rightarrow \pi^*$ sehingga panjang gelombang menjadi lebih pendek. Namun dalam

kasus tertentu, keadaan tereksitasi dapat membentuk ikatan hidrogen lebih kuat dari keadaan dasar. Dalam kasus seperti itu, pelarut polar menggeser panjang gelombang menjadi lebih panjang karena energi dari transisi elektronik menurun. Pelarut polar menggeser transisi dari $\pi \longrightarrow \pi^*$ sehingga panjang gelombang menjadi lebih panjang (Gandjar dan Rohman, 2012; Pavia *et al.*, 2009).

3. Pengaturan suhu

Suhu rendah menawarkan pita serapan senyawa obat yang lebih tajam daripada suhu kamar. Resolusi vibrasional akan lebih baik karena level vibrasional yang ditempati lebih sedikit dan tingkat interaksi solut- pelarut diminimalkan (Gandjar dan Rohman, 2012).

4. Ion-ion organik

Sifat kromoforik yang terdapat dalam senyawa anorganik ada 2, yaitu melibatkan beberapa atom seperti MnO_4^- dan $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ dan yang melibatkan atom tunggal yang memiliki kulit elektron terluar d- yang tidak lengkap (Gandjar dan Rohman, 2012).

Spektrofotometer adalah alat untuk mengukur transmitan atau absorban suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang, tiap media akan menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu tergantung pada senyawa atau warna yang terbentuk (Cairns, 2009).

Spektrofotometer merupakan alat yang digunakan untuk mengukur absorbansi dengan cara melewatkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu pada suatu objek kaca atau kuarsa yang disebut kuvet. Sebagian dari cahaya tersebut akan di serap dan sisanya akan dilewatkan. Nilai absorbansi dari cahaya yang di serap sebanding dengan konsentrasi larutan di dalam kuvet (Sastrohamidjojo, 2007). Spektrofotometer UV-VIS adalah pengukuran serapan cahaya di daerah ultraviolet (200-350nm) dan sinar tampak (350-800nm) oleh suatu senyawa. Serapan cahaya UV atau VIS (cahaya tampak) mengakibatkan transisi elektronik, yaitu promosi elektron-elektron dari orbital keadan dasar yang berenergi rendah ke orbital keadaan tereksitasi berenergi lebih rendah.

3.15 Bagian-bagian Spektrofotometer

a. Sumber cahaya

Spektrofotometri Sinar Tampak (UV-Vis) adalah pengukuran energi cahaya oleh suatu sistem kimia pada panjang gelombang tertentu (Day, 2002). Sinar ultraviolet (UV) mempunyai panjang gelombang antara 200-400 nm, dan sinar tampak (visible) mempunyai panjang gelombang 400-750 nm. Pengukuran spektrofotometri menggunakan

alat spektrofotometer yang melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometer UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibandingkan kualitatif. Spektrum UV-Vis sangat berguna untuk pengukuran secara kuantitatif. Konsentrasi dari analit di dalam larutan bisa ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer (Rohman, 2007).

b. Monokromator

Monokromator adalah alat yang berfungsi untuk menguraikan cahaya polikromatis menjadi beberapa komponen panjang gelombang tertentu (monokromatis) yang berbeda (terdispersi).

c. Detektor

Peranan detektor penerima adalah memberikan respon terhadap cahaya pada berbagai panjang gelombang. Detektor akan mengubah cahaya menjadi sinyal listrik yang selanjutnya akan ditampilkan oleh penampil data dalam bentuk jarum atau angka digital. Mengukur transmittansi larutan sampel, dimungkinkan untuk menentukan konsentrasinya dengan menggunakan hukum Lambert-Beer. Spektrofotometer akan mengukur intensitas cahaya melewati sampel, dan membandingkan ke intensitas cahaya sebelum melewati sampel. Rasio disebut transmittansi dan biasanya digunakan dalam presentase.

d. Mikroprosesor

Mikroprosesor dan output software dari kalibrator dapat disimpan dan konsentrasi sampel yang tidak diketahui secara otomatis dapat dihitung (KEMENKES,2010).

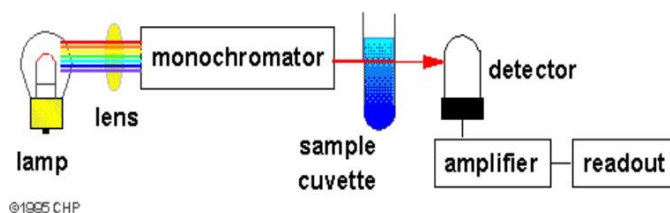
e. Piranti pembaca

Fungsinya adalah membaca sinyal listrik dari detector dimana data digambarkan dalam bentuk yang bisa diinterpretasikan atau disajikan pada display yang dapat dibaca oleh pemeriksa (KEMENKES,2010).

3.16 Prinsip spektrofotometer

Prinsip kerja spektrofotometer adalah penyerapan cahaya pada panjang gelombang tertentu oleh bahan yang diperiksa. Tiap zat memiliki absorbansi pada panjang gelombang tertentu yang khas. Panjang gelombang dengan absorbansi tertinggi digunakan untuk mengukur kadar zat yang diperiksa. Banyaknya cahaya yang diabsorpsi oleh zat berbanding lurus dengan kadar zat. Memastikan ketepatan pengukuran, kadar yang hendak diukur dibandingkan terhadap kadar yang diketahui (standar). Setelah dimasukan blanko

(KEMENKES, 2010) Prinsip kerja dari spektrofotometer dapat di gambarkan sebagai berikut :



Gambar 7. Cara Kerja Spektrofotometer.

3.17 Jenis-jenis Spektrofotometer

Spektrofotometer memiliki 2 tipe yaitu spektrofotometer sinar tunggal dan spektrofotometer sinar ganda. Spektrofotometer sinar tunggal biasanya dipakai untuk kawasan spectrum ultraungu dan cahaya yang terlihat. Spektrofotometer sinar ganda dapat dipergunakan baik dalam kawasan ultraungu dan cahaya yang terlihat maupun dalam kawasan inframerah (Ganjar, 2007).

1. Singel Beam

Single-Beam instrument dapat digunakan untuk kuantitatif dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tunggal. Pengukuran sampel dan larutan blangko atau standar harus dilakukan secara bergantian dengan sel yang sama (Suharti T, 2013)

2. Double Beam

Spektrofotometer memiliki berkas sinar ganda, sehingga dalam pengukuran absorbansi tidak perlu bergantian antara sampel dan larutan blangko, spektrofotometer double beam memakai absorbansi (A) otomatis sebagai fungsi panjang gelombang (Suhartati T, 2013).

3.18 GC-MS

GC merupakan salah satu teknik kromatografi yang hanya dapat digunakan untuk mendeteksi senyawa-senyawa yang mudah menguap. Kriteria menguap adalah dapat menguap pada kondisi vakum tinggi dan tekanan rendah serta dapat dipanaskan (Drozd, 1985). Dasar pemisahan menggunakan kromatografi gas adalah penyebaran cuplikan pada fase diam sedangkan gas sebagai fase gerak mengelusi fase diam. Cara kerja dari GC adalah suatu fase gerak yang berbentuk gas mengalir di bawah tekanan melewati pipa yang dipanaskan dan disalut dengan fase diam cair atau dikemas dengan fase diam cair yang disalut pada suatu penyangga padat. Analit tersebut dimuatkan ke bagian atas kolom

melalui suatu portal injeksi yang dipanaskan. Suhu oven dijaga atau diprogram agar meningkat secara bertahap. Ketika sudah berada dalam kolom, terjadi proses pemisahan antar komponen. Pemisahan ini akan bergantung pada lamanya waktu relatif yang dibutuhkan oleh komponen-komponen tersebut di fase diam (Sparkman et al., 2011).

Seiring dengan perkembangan teknologi maka instrument GC digunakan secara bersama-sama dengan instrumen lain seperti Mass-Spectrometer (MS). Spektrometer massa diperlukan untuk identifikasi senyawa sebagai penentu bobot molekul dan penentuan rumus molekul. Prinsip dari MS adalah pengionan senyawa-senyawa kimia untuk menghasilkan molekul bermuatan atau fragmen molekul dan mengukur rasio massa/muatan. Molekul yang telah terionisasi akibat penembakan elektron berenergi tinggi tersebut akan menghasilkan ion dengan muatan positif, kemudian ion tersebut diarahkan menuju medan magnet dengan kecepatan tinggi.

Medan magnet atau medan listrik akan membelokkan ion tersebut agar dapat menentukan bobot molekulnya dan bobot molekul semua fragmen yang dihasilkan (David, 2005). Kemudian detektor akan menghitung muatan yang terinduksi atau arus yang dihasilkan ketika ion dilewatkan atau mengenai permukaan, scanning massa dan menghitung ion sebagai mass to charge ratio (m/z). Terdapat 4 (empat) proses dalam spektrometri massa yakni ionisasi, percepatan, pembelokkan dan pendeteksian (Darmapatni, 2016).

Kromatografi Gas- Spektrometri Massa (GCMS) adalah metode kombinasi antara kromatografi gas dan spektrometri massa yang bertujuan untuk menganalisis berbagai senyawa dalam suatu sampel. Kromatografi ini memiliki prinsip kerja masing-masing, namun keduanya dapat digabungkan untuk mengidentifikasi suatu senyawa baik secara kualitatif maupun secara kuantitatif. Metode ini merupakan salah satu pemisahan yang sekaligus dapat menganalisis senyawa-senyawa organik maupun anorganik yang bersifat termostabil dan mudah menguap (Sumarno, 2001).

Kromatografi gas-spektrometri massa (GCMS) ini merupakan metode yang dinamis untuk pemisahan dan deteksi senyawa-senyawa yang mudah menguap dalam suatu campuran. Dalam suatu penelitian kromatografi gas spektrometri massa ini digunakan untuk mengetahui komponen kimia minyak atsiri umbi bawang putih (*Allium sativum* Linn.). Tahapannya meliputi pengumpulan bahan, determinasi, penanganan sampel, isolasi

minyak atsiri dengan menggunakan destilasi air dan terakhir identifikasi minyak atsiri menggunakan GCMS (Amin, dkk., 2014).

Kromatografi gas-spektrometri massa dalam banyak hal memiliki banyak kesamaan dalam tekniknya. Untuk kedua teknik tersebut sampel yang dibutuhkan dalam bentuk fase uap dan keduanya juga sama-sama membutuhkan jumlah sampel yang sedikit (umumnya kurang dari 1 mg). Disisi lain kedua teknik tersebut memiliki perbedaan yang besar yakni pada kondisi operasinya. Pada kromatografi gas terdapat gas pembawa dengan tekanan kurang lebih 760 torr, sedangkan spektrometri massa beroperasi pada kondisi vakum dengan tekanan 10^{-6} – 10^{-5} torr (Sastrohamidjo, 2001).

➤ Instrumentasi Gas Chromatography Mass Spectrometry (GCMS)

A. Instrumentasi Gas Kromatografi (Pavia, 2006)

1. Carrier Gas Supply

Gas pembawa (carrier gas) pada kromatografi gas sangatlah penting. Gas yang dapat digunakan pada dasarnya haruslah inert, kering, dan bebas oksigen. Kondisi seperti ini dibutuhkan karena gas pembawa ini dapat saja bereaksi dan dapat mempengaruhi gas yang akan dipelajari atau diidentifikasi.

2. Injeksi Sampel

Sejumlah kecil sampel yang akan dianalisis diinjeksikan pada mesin menggunakan semprit kecil. Jarum semprit menembus lempengan karet tebal (Lempengan karet ini disebut septum) yang mana akan mengubah bentuknya kembali secara otomatis ketika semprit ditarik keluar dari lempengan karet tersebut.

3. Kolom

Ada dua tipe utama kolom dalam kromatografi gas-cair. Tipe pertama, tube panjang dan tipis berisi material padatan; Tipe kedua, lebih tipis dan memiliki fase diam yang berikatan dengan pada bagian terdalam permukaannya. Ada tiga hal yang dapat berlangsung pada molekul tertentu dalam campuran yang diinjeksikan pada kolom:

- a. Molekul dapat berkondensasi pada fase diam.
- b. Molekul dapat larut dalam cairan pada permukaan fase diam

- c. Molekul dapat tetap pada fase gas

B. Instrumentasi Spektroskopi Massa (Pavia, 2006)

1. Sumber Ion

Setelah melewati rangkaian gas kromatografi, sampel gas yang akan diuji dilanjutkan melalui rangkaian spektroskopi massa. Molekul-molekul yang melewati sumber ion ini diserang oleh elektron, dan dipecah menjadi ion-ion positifnya. Tahap ini sangat penting karena untuk melewati filter, partikel-partikel sampel haruslah bermuatan.

2. Filter

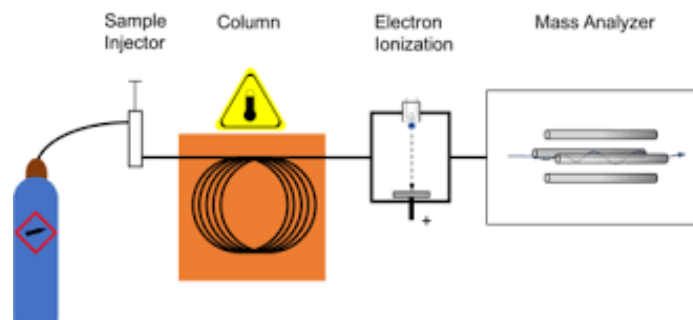
Selama ion melalui rangkaian spektroskopi massa, ion-ion ini melalui rangkaian elektromagnetik yang menyaring ion berdasarkan perbedaan massa. Para ilmuwan memisahkan komponen-komponen massa untuk kemudian dipilih yang mana yang boleh melanjutkan yang mana yang tidak (prinsip penyaringan). Filter ini terus menyaring ion-ion yang berasal dari sumber ion untuk kemudian diteruskan ke detektor.

3. Detektor

Ada beberapa tipe detektor yang biasa digunakan. Detektor ionisasi nyala dijelaskan pada bagian bawah penjelasan ini, merupakan detektor yang umum dan lebih mudah untuk dijelaskan daripada detektor alternatif lainnya.

Dalam mekanisme reaksi, pembakaran senyawa organik merupakan hal yang sangat kompleks. Selama proses, sejumlah ion-ion dan elektron-elektron dihasilkan dalam nyala. Kehadiran ion dan elektron dapat dideteksi. Seluruh detektor ditutup dalam oven yang lebih panas dibanding dengan temperatur kolom. Hal itu menghentikan kondensasi dalam detektor.

Hasil detektor akan direkam sebagai urutan puncak-puncak; setiap puncak mewakili satu senyawa dalam campuran yang melalui detektor. Sepanjang anda mengontrol secara hati-hati kondisi dalam kolom, anda dapat menggunakan waktu retensi untuk membantu mengidentifikasi senyawa yang tampak-tentu saja anda atau seseorang lain telah menganalisa senyawa murni dari berbagai senyawa pada kondisi yang sama.

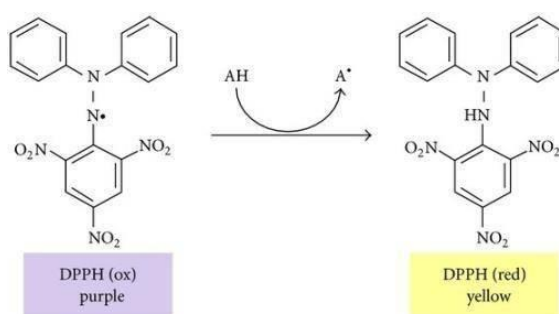


Gambar 8. Gas Chromatography Mass Spectrometry (GCMS).

3.19 Metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Metode DPPH merupakan metode yang cepat, sederhana, dan tidak membutuhkan biaya tinggi dalam menentukan kemampuan antioksidan menggunakan radikal bebas 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Metode ini sering digunakan untuk menguji senyawa yang berperan sebagai *free radical scavengers* atau donor hidrogen dan mengevaluasi aktivitas antioksidannya, serta mengkuantifikasi jumlah kompleks radikal-antioksidan yang terbentuk. Metode DPPH dapat digunakan untuk sampel yang berupa padatan maupun cairan (Prakash, Rigelhof, dan Miller, 2001).

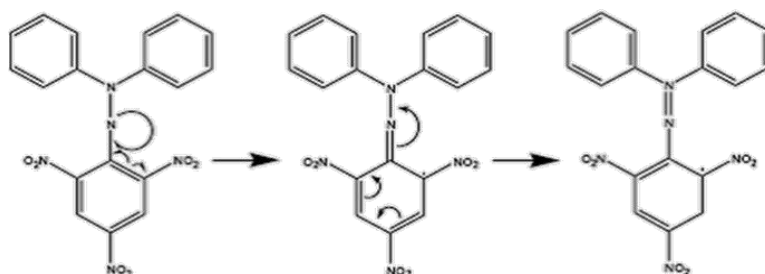
Gugus kromofor dan aoksokrom pada radikal bebas DPPH memberikan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 517 nm sehingga menimbulkan warna ungu. Warna DPPH akan berubah dari ungu menjadi kuning seiring penambahan antioksidan yaitu saat elektron tunggal pada DPPH berpasangan dengan hidrogen dari antioksidan. Hasil dekolerasi oleh antioksidan setara dengan jumlah elektron yang tertangkap. Mekanisme penangkapan radikal ditunjukkan pada reaksi di bawah ini.



Gambar 9. Reaksi penangkapan radikal DPPH oleh antioksidan (AH=Antioksidan, ox=Oksidasi, red=Reduksi) (Dehpour, Ebrahimzadeh, Fazel, dan Mohammad, 2009).

3.20 Uji Aktivitas Antioksidan

DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam (Molyneux, 2003). Resonansi DPPH dapat dilihat pada Gambar 10 (Manik, 2011).



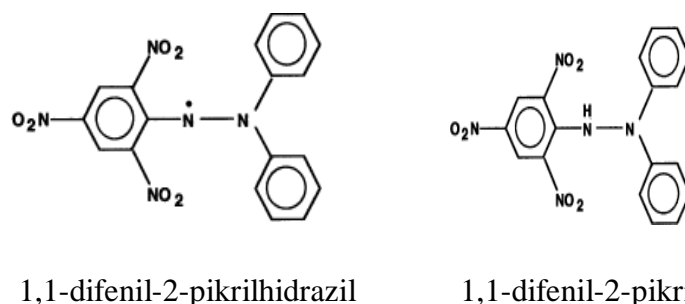
Gambar 10. Resonansi DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*).

Radikal DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) adalah suatu senyawa organik yang mengandung nitrogen tidak stabil dengan absorbansi kuat pada panjang gelombang maksimum (λ_{max}) 517 nm dan berwarna ungu gelap. Setelah bereaksi dengan senyawa antioksidan, DPPH tersebut akan tereduksi dan warnanya akan berubah menjadi kuning. Perubahan tersebut dapat diukur dengan spektrofotometer dan diplotkan terhadap konsentrasi (Reynerston, 2007). Penurunan intensitas warna yang terjadi disebabkan oleh berkurangnya ikatan rangkap terkonjugasi pada DPPH. Hal ini dapat terjadi apabila adanya penangkapan suatu elektron oleh zat antioksidan, menyebabkan tidak adanya penangkapan kesempatan elektron tersebut untuk beresonansi. Metode DPPH merupakan metode yang sederhana, cepat dan mudah untuk skrining aktivitas penangkap radikal beberapa senyawa, selain itu metode ini terbukti akurat, reliable dan praktis (Prakash Dkk., 2001).

Metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan adalah metode serapan radikal DPPH karena merupakan metoda yang sederhana, mudah dan menggunakan sampel dalam jumlah yang sedikit dengan waktu yang singkat. Pemudaran warna mengakibatkan penurunan nilai absorbansi sinar tampak dari spektrofotometer, sehingga semakin rendah nilai absorbansi maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Semakin pudar warna dan semakin rendah nilai absorbansi menunjukkan bahwa semakin banyak radikal bebas yang bereaksi dengan antioksidan yang terdapat dalam serum (Damayanthi, 2010).

Penelitian yang dilakukan oleh Yen dan Chen (1995) yaitu pengujian antioksidan dengan metode DPPH *1,1-difenil-2-pikrihidrazil* yang merupakan radikal bebas, yang jika

direaksikan dengan ekstrak tanaman yang mengandung antioksidan maka akan terjadi reaksi penangkapan hydrogen dari antioksidan oleh radikal bebas DPPH (ungu) yang kemudian berubah 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin (kuning). Mekanisme reaksi metode DPPH adalah sebagai berikut:



Gambar 11. Mekanisme reaksi DPPH dengan antioksidan (Molyneaux, 2004).

Reduksi DPPH menjadi DPPH-H disebabkan adanya donor hidrogen dari senyawa hidroksil baik di dalam ekstrak etanol maupun di dalam fraksi hasil pemisahan. Oleh karena itu terjadi pengurangan jumlah hidrogen yang dapat didonorkan dari fraksi hasil pemisahan pada DPPH. Pada senyawa standar quersetin peredaman warna terjadi lebih efektif jika dibanding ekstrak etanol maupun fraksi hasil pemisahan. Hal ini dikarenakan dalam molekul quersetin mempunyai lima gugus hidroksil. Jumlah ini cukup banyak pada setiap molekulnya untuk mereduksi DPPH (Rahayu, Dkk., 2010).

Dalam metode DPPH terdapat parameter EC_{50} . Parameter EC_{50} merupakan parameter yang menunjukkan konsentrasi ekstrak uji yang mampu menangkap radikal bebas sebanyak 50 % yang diperoleh melalui persamaan regresi. Semakin kecil EC_{50} suatu senyawa uji maka senyawa tersebut semakin efektif sebagai penangkal radikal bebas (Rohman, dkk., 2005). Menurut Armala (2009) dalam Putra (2012), menyatakan tingkat kekuatan antioksidan senyawa uji menggunakan metode DPPH dapat digolongkan menurut nilai IC_{50}/EC_{50} , seperti yang nampak pada Tabel 6.

Tabel 6. Ketentuan kekuatan antioksidan (Putra, 2012).

Intensitas	Nilai IC_{50}/EC_{50}
Sangat kuat	< 50 mg/L
Kuat	50 – 100 mg/L

Sedang	100 – 150 mg/L
Lemah	>150 mg/L

Aktivitas penangkapan radikal bebas dapat dinyatakan dengan satuan persen (%) aktivitas antioksidan. Nilai ini diperoleh dengan persamaan sebagai berikut (Molyneux, 2003):

$$\%Inibisi = \frac{A_{Blanko} - A_{Sampel}}{A_{Blanko}} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Nilai absorbansi

Nilai 0 % berarti sampel tidak mempunyai aktivitas antioksidan, sedangkan nilai 100 % berarti pengujian aktivitas antioksidan perlu dilanjutkan dengan pengenceran sampel untuk mengetahui batas konsentrasi aktivitasnya. Suatu bahan dapat dikatakan aktif sebagai antioksidan bila presentase aktivitas antioksidan lebih atau sama dengan 50 % (Parwata, Dkk., 2009).

3.21 Standar McFarland

Standar McFarland yang digunakan untuk standarisasi perkiraan jumlah bakteri dalam suspensi cair dengan membandingkan kekeruhan suspensi uji dengan Standard McFarland (Anonim, 2014). Standar McFarland adalah larutan kimia barium klorida dan asam sulfat, reaksi antara dua bahan kimia ini menghasilkan endapan halus barium sulfat. Ketika dikocok pelan, kekeruhan Standar McFarland visual sebanding dengan konsentrasi suspensi bakteri seperti yang ditunjukkan pada tabel di bawah.

Mc Farland adalah peyetaraan konsentrasi mikroba dengan menggunakan larutan BaCl₂ 1% dan H₂SO₄ 1%. Standar kekeruhan Mc Farland ini dimaksudkan untuk menggantikan perhitungan bakteri satu per satu dan untuk memperkirakan kepadatan sel yang akan digunakan pada prosedur pengujian antimikroba. Keuntungan dari penggunaan standar Mc Farland adalah tidak dibutuhkannya waktu inkubasi yang cukup untuk memperoleh jumlah kepadatan bakteri yang diinginkan. Sedangkan kerugiannya, akan terjadi perbedaan pandangan untuk menilai tingkat kekeruhan dari sel bakteri. Untuk menilai kekeruhannya dapat digunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm (setara dengan panjang gelombang *E.coli*) (Sutton 2011).

Tabel 7. Standar Kekeruhan McFarland(Sutton, 2011)

Skala McFarland	CFU (10^8 /mL)	1% BaCl ₂ /1% H ₂ SO ₄ (ml)	Absorbansi
0.5	150	0.05/9.95	0.132
1	300	0.1/9.9	0.257
2	600	0.2/9.8	0.451
3	900	0.3/9.7	0.582

Sebelum digunakan standar McFarland harus dikocok dengan baik. Tabung harus tertutup rapat untuk mencegah penguapan terjadi. Sebelum setiap penggunaan, kocok dengan baik untuk memastikan bahwa barium sulfat didistribusikan secara merata di seluruh larutan (Anonim, 2014). Standar yang paling umum digunakan di Laboratorium Mikrobiologi Klinik adalah Standard McFarland 0,5 yang setara dengan jumlah perkiraan suspensi bakteri yaitu $1,5 \times 10^8$ CFU/ml dimana standar tersebut merupakan dasar untuk percobaan kerentanan antimikroba dan percobaan hasil biakan bakteri.

Standar McFarland harus disimpan dalam posisi tegak pada suhu 4°C sampai 25°C dan terhindar dari cahaya. Pada kondisi ini, standar McFarland memiliki waktu paruh sampai 12 minggu dimulai dari tanggal pembuatan (Anonim, 2014). Standar McFarland sensitif terhadap udara dan cahaya, oleh karena itu pastikan tabung tertutup rapat setiap saat dan simpan pada tempat yang gelap. Level standar McFarland harus di periksa berkala untuk memastikan tidak terjadi penguapan. Buang jika ada pengurangan volume. Standar McFarland harus dilakukan pengocokan di mesin vortex setiap kali akan digunakan dan diperiksa keseragaman kekeruhannya. Jika banyak partikel yang muncul atau terjadi penggumpalan, maka standar Mcfarland tersebut dibuang. Jumlah aktual dari suatu bakteri tergantung dari ukuran sediaan yang dibuat, kelangsungan hidup bakteri, dan jumlah bakteri yang digunakan (Anonim, 2014)

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Alat dan Bahan

4.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Erlenmeyer 100 mL, kaca arloji, spatula, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *magnetic stirrer*, cawan petri, ose, Bunsen, gelas ukur 50 mL, gelas ukur 100 mL, pipet ukur 10 mL, pipet ukur 1 mL, corong pisah, gelas beaker 100 mL, *shaker incubator*, *laminar air flow*, sentrifuse mikro, spektrofotometer uv-vis, *autoclaf*, *micropipet*, vortex, neraca analitik, pH meter, aluminium foil, plasti wrap, pipet tetes, corong, batang pengaduk, vial, labu ukur 100 mL, labu ukur 50 mL, labu uku 10 mL, labu ukur 5 mL.

4.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Lactobacillus plantarum*, MRS (*deMann Rogosa and Sharpe*) broth, MRS (*deMann Rogosa and Sharpe*) agar, bekatul, NaCl, akuades, alkohol 70 %, spiritus, kapas, eter teknis, DPPH, methanol, asam askorbat.

4.2 Prosedur Pnenelitian

4.2.1 Sterilisasi Alat (Rosidah, 2018)

Alat-alat yang akan digunakan disterilkan dengan cara dibungkus menggunakan kertas dan plastik. Kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf selama 2 jam pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm.

4.2.2 Pembuatan Media MRSA (Rosidah, 2018)

Media MRSA (*deMann, Rogosa and Sharpe Agar*) ini dibuat dengan menimbang 6,73 gram MRSA kemudian dilarutkan dengan 100 mL akuades dan dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut menggunakan magnetic stirer. Selanjutnya media tersebut disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 2 jam dengan tekanan 1 atm. Larutan tersebut dituangkan pada cawan petri hingga memadat. Media MRSA ini digunakan untuk regenerasi bakteri *Lactobacillus plantarum*.

4.2.3 Pembuatan Media MRSB (Rosidah, 2018)

Media MRSB (*deMann, Rogosa and Sharpe Broth*) ini dibuat dengan menimbang 11.03 gram MRSB kemudian dilarutkan dengan 200 mL akuades dan dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut menggunakan magnetic stirer. Selanjutnya media tersebut disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 2 jam dengan tekanan 1 atm. Media MRSB ini digunakan untuk pembuatan inokulum.

4.2.4 Pembuatan Larutan NaCl 0.85 % (Nurjanna, 2010)

Sebanyak 2.125 gram NaCl ditimbang, kemudian dilarutkan ke dalam 250 mL akuades. Selanjutnya dimasukkan ke dalam autoclave selama 2 jam pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm.

4.2.5 Regenerasi *Lactobacillus plantarum* (Rosidah, 2018)

L. plantarum diinokulasi 2 ose isolat ke dalam media MRSA lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 120 jam sehingga diperoleh kultur aktif. *Lactobacillus plantarum* yang telah diregenerasi digunakan untuk pembuatan stok inokulum.

4.2.6 Pembuatan buffer sitrat Ph 5 (McILVAINE, 1921)

Buffer sitrat Ph 5 dibuat dari 4.8091 asam sitrat yang dilarutkan ke dalam 200 mL akuades dan 3.549 gram Na₂HPO₄·2H₂O yang dilarutkan ke dalam 200 mL akuades. Kemudian sebanyak 25.7 mL Na₂HPO₄·2H₂O dicampurkan dengan 24.3 mL larutan asam sitrat. Jika pHnya belum mencapai 5, ditambahkan dengan larutan terus-menerus sambil diaduk dengan magnetic stirer sampai pHnya 5.

4.2.7 Pembuatan Inokulum *Lactobacillus plantarum* (Rosidah, 2018)

Sebanyak 40 mL larutan MRSB dicampurkan dengan 10 ml buffer Ph 5. Kemudian sebanyak dua ose biakan *L. plantarum* dipindahkan ke dalam 50 mL campuran, selanjutnya di goyangkan dengan shaker pada kecepatan 200 rpm selama 72 jam sampai fase eksponensial pada suhu 37°C.

4.2.8 Pembuatan Larutan NaCl 0.9 % (Nuria, 2010)

Ditimbang sebanyak 2.25 gram NaCl, kemudian dilarutkan ke dalam 250 mL akuades. Selanjutnya dimasukkan ke dalam autoclave selama 2 jam pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm.

4.2.9 Pembuatan Larutan Mcfarland 0.5 (Nuria, 2010)

Larutan Mcfarland 0.5 dibuat dari larutan BaCl₂ 1% dengan menimbang sebanyak 0.1 gram BaCl₂ yang kemudian dilarutkan ke dalam labu ukur 10 mL menggunakan akuades dan larutan H₂SO₄ 1% dengan mengambil sebanyak 0.05 mL H₂SO₄ pekat yang dilarutkan dengan akuades ke dalam labu ukur 10 ml. Kemudian sebanyak 9.95 mL H₂SO₄ 1% dicampurkan dengan 0.05 mL BaCl₂ 1% dan diaduk hingga homogen.

4.2.10 Pengenceran Bakteri (Mubarak dkk., 2016)

Disiapkan tabung reaksi yang telah ditutup dengan kaps dalam keadaan steril sebanyak 6 buah, kemudian diberi label 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ dan 10⁻⁶. Selanjutnya sebanyak 9 mL NaCl 0.9% dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi. Pengerjaan ini dilakukan di dalam *laminar air flow*. Selanjutnya diambil 1 mL inokulum bakteri dari MRSB dengan micropipet dan diaduk dengan *stirer*. Kemudian diambil inokulum bakteri dari pengenceran 10⁻¹ dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi pengenceran 10⁻² dan seterusnya sampai tabung reaksi 10⁻⁶. Selanjutnya diamati penumbuhan bakteri dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis, dimana larutan blankonya adalah akuades dan larutan standarnya adalah larutan mcfarland.

4.2.11 Fermentasi Bekatul dengan *L. plantarum* (Razak dkk., 2015)

Ditimbang sebanyak 18 gram bekatul dan dimasukkan ke dalam 6 Erlenmeyer 100 mL, kemudian disterilisasi dalam oven selama 2 jam. Selanjutnya dilarutkan dengan akuades sebanyak 30 mL, kemudian ditambahkan 1 mL inokulum bakteri *L. plantarum* ke dalam masing-masing Erlenmeyer. Dalam penelitian ini inokulum bakteri diambil dari pengenceran ke-4. Selanjutnya diaduk (shaker) inkubator dengan variasi waktu 2 hari, 5 hari, 7 hari dimana masing-masing hari dilakukan secara duplo.

4.2.12 Ekstraksi Menggunakan Eter Teknis

Hasil fermentasi ditambahkan dengan 30 mL eter teknis dan diaduk, kemudian disaring dengan penyaring vakum. Selanjutnya larutan dimasukkan ke dalam corong pisah, dimana terbentuk dua lapisan, lapisan bawah disimpan ke dalam Erlenmeyer dan lapisan atas disimpan dalam vial. Kemudian dilihat kandungan fenoliknya dengan menggunakan GC-MS.

4.2.13 Analisis Hasil Ekstraksi Dengan GCMS

Hasil ekstrak dilakukan analisis dengan menggunakan Gas Chromatography- Mass Spectroscopy (GC-MS) untuk melihat jenis senyawa fenolik apa saja yang terdapat dalam bekatul tersebut, serta mengetahui seberapa banyak kandungan senyawa fenolik dalam hasil ekstraksinya. Dimana kondisi alat yang digunakan sebagai berikut :

- Ekstrak yang dianalisis : senyawa fenolik
- Kolom : AT-5MS (5% fenilmetilpolisiloksan)
- Dimensi : 30 m × 0,25 mm I.D, dan layar tipis dengan ukuran 0,25 µm
- Temperatur injektor : 230°C
- Gas pembawa : helium 1,0 mL/min
- Temperature oven : diatur mulai dari 60°C dengan kenaikan suhu 3°C/min sampai pada suhu 280°C
- Temperatur sumber ion : 280°C
- Range scan MS : 29-600 m/z
- Arus detector : 1150

4.2.14 Pengujian Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH (Widyastuti, 2010)

4.2.14.1 Pembuatan Larutan DPPH 0,4 Mm (Widyastuti, 2010)

Sebanyak 0,01577 gram serbuk DPPH ditimbang, kemudian dilarutkan ke dalam labu ukur 100 mL menggunakan methanol sampai tanda batas.

4.2.14.2 Pembuatan dan Pengukuran Larutan Blanko (Widyastuti, 2010)

Sebanyak 1 mL DPPH 0,4 Mm dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 5 ml sampai tanda batas. Kemudian larutan didiamkan selama 30 menit, selanjutnya diukur panjang gelombangnya menggunakan spektrofometri uv-vis double beam pada panjang gelombang 515 nm.

4.2.14.3 Pembuatan Kurva Standar Larutan DPPH 100 ppm

Ditimbang 5 mg DPPH, kemudian dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 50 mL sampai tanda batas. Kemudian dibuat variasi konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm sebagai berikut :

- a) Konsentrasi 5 ppm

Dibuat dengan cara mengambil 0,5 mL larutan DPPH 100 ppm dan dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 10 mL.

b) Konsentrasi 10 ppm

Dibuat dengan cara mengambil 1 mL larutan DPPH 100 ppm dan dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 10 mL.

c) Konsentrasi 15 ppm

Dibuat dengan cara mengambil 1,5 mL larutan DPPH 100 ppm dan dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 10 mL.

d) Konsentrasi 20 ppm

Dibuat dengan cara mengambil 2 mL larutan DPPH 100 ppm dan dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 10 mL .

e) Konsentrasi 25 ppm

Dibuat dengan cara mengambil 2,5 mL larutan DPPH 100 ppm dan dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 10 mL.

Kemudian larutan didiamkan selama 30 menit. Setelah itu dianalisis menggunakan spektrofotometri uv-vis double beam dengan panjang gelombang 515 nm.

4.2.14.4 Pengukuran Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat 100 ppm

Ditimbang 5 mg asam askorbat, kemudian dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 50 mL sampai tanda batas. Kemudian dibuat variasi konsentrasi 6 ppm, 8 ppm, 15 ppm, 10 ppm, dan 12 ppm sebagai berikut :

a. Konsentrasi 6 ppm

Dibuat dengan cara mengambil 0,3 mL larutan asam askorbat 100 ppm dan dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 5 mL.

b. Konsentrasi 8 ppm

Dibuat dengan cara mengambil 0,4 mL larutan asam askorbat 100 ppm dan dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 5 mL.

c. Konsentrasi 10 ppm

Dibuat dengan cara mengambil 0,5 mL larutan asam askorbat 100 ppm dan dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 5 mL.

d. Konsentrasi 12 ppm

Dibuat dengan cara mengambil 0,6 mL larutan asam askorbat 100 ppm dan dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 5 mL.

Kemudian larutan didiamkan selama 30 menit. Setelah itu dianalisis menggunakan spektrofotometri uv-vis double beam dengan panjang gelombang 515 nm (Widyastuti, 2010).

4.2.14.5 Pengukuran Aktivitas Antioksidan sampel 100 ppm

Ditimbang 5 mg sampel, kemudian dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 50 mL sampai tanda batas. Kemudian dibuat variasi konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, dan 20 ppm sebagai berikut :

a. Konsentrasi 5 ppm

Dibuat dengan cara mengambil 0,25 mL larutan sampel 100 ppm dan dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 5 mL.

b. Konsentrasi 10 ppm

Dibuat dengan cara mengambil 0,5 mL larutan sampel 100 ppm dan dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 5 mL.

c. Konsentrasi 15 ppm

Dibuat dengan cara mengambil 0,75 mL larutan sampel 100 ppm dan dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 5 mL.

d. Konsentrasi 20 ppm

Dibuat dengan cara mengambil 1 mL larutan sampel 100 ppm dan dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 5 mL.

Kemudian larutan didiamkan selama 30 menit. Setelah itu dianalisis menggunakan spektrofotometri uv-vis double beam dengan panjang gelombang 515 nm (Widyastuti, 2010).

BAB V

PEMBAHASAN

5.1 Pembuatan Media

Media berfungsi untuk menumbuhkan mikroba, isolasi, memperbanyak jumlah, menguji sifat-sifat fisiologi dan perhitungan jumlah mikroba, dimana dalam proses pembuatannya harus disterilisasi dan menerapkan metode aseptis untuk menghindari kontaminasi pada media (Partic, 2008). Dalam penelitian ini digunakan media *deMann Rogosa Sharpe Agar (MRSA)*, *deMannRogosa Sharpe Broth (MRSB)*. *MRS* merupakan media yang paling sesuai untuk media pertumbuhan dan produksi bakteriosin (Mengdkk., 2012). Media *MRS* mengandung nutrisi diantaranya polysorbat, asetat, magnesium dan mangan yang dibutuhkan oleh bakteri *Lactobacillus* (Rustan, 2013). Media tersebut memiliki fungsi dan kandungan yang berbeda. Media *MRSA* dan media *MRSB* merupakan media selektif yang hanya dapat menumbuhkan bakteri asam laktat (BAL) tetapi kedua media ini digunakan pada tujuan yang berbeda. Media *MRSA* digunakan untuk menumbuhkan dan mengisolasi isolat bakteri asam laktat yang tumbuh berkoloni sedangkan media *MRSB* merupakan media berbentuk cair yang digunakan untuk memproduksi dan memudahkan BAL untuk melepaskan bakteriosin pada media cair tersebut.

MRSA dan *MRSB* dalam penelitian digunakan untuk peremajaan dan inokulum *L. plantarum*. Sebelum pemakaian, media disterilisasi terlebih dahulu. Sterilisasi alat maupun media sangat penting untuk menghindari adanya kontaminasi produk (Diasy, 2012). Media siap digunakan untuk peremajaan dan pembuatan inokulum.

5.2 Peremajaan dan Pembuatan Inokulum *Lactobacillus plantarum*

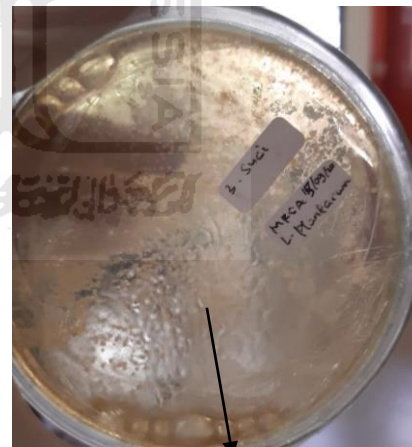
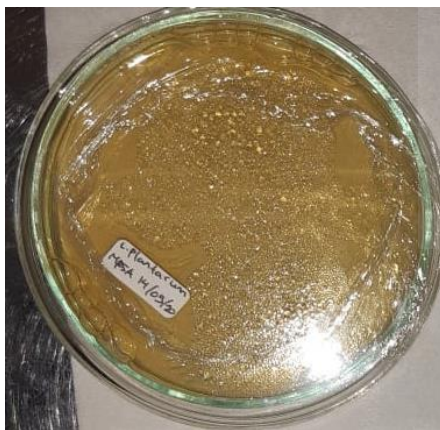
Peremajaan bakteri merupakan hal penting yang harus dilakukan untuk mendapatkan biakan bakteri yang baru dan muda sehingga mampu berkembang biak dengan baik dan optimal dalam proses fermentasi (Mas'ud, 2013). Peremajaan bakteri bertujuan untuk mengaktifkan bakteri yang semula inaktif menjadi aktif kembali. Kondisi bakteri yang inaktif menjadi kurang optimal jika digunakan pada pembuatan inokulum (Zein, 2017). Isolat *L. plantarum* diremajakan di dalam media *MRSA* dan disimpan di lemari pendingin untuk menghambat pertumbuhan bakteri menuju ke fase kematian.

Peremajaan *L. plantarum* dilakukan didalam laminar dengan menggunakan kawat ose yang sudah dipanaskan diatas bunsen untuk mematikan mikroorganisme lain yang

tidak diinginkan (Waluyo, 2011). Sebanyak satu ose isolat bakteridi *streak* pada media *MRSA* dan diinkubasi selama 72 jam pada suhu ruang. Menurut Sutrisna (2012) pada jam ke-48 dimungkinkan bakteri *L. plantarum* dalam fase eksponensial (logaritmik). *L. plantarum* dapat diinokulasikan pada media *MRSB* setelah jam ke-48 untuk pembuatan inokulum.

Inokulum merupakan biakan bakteri yang ditumbuhkan di media *MRSB* (Zein,2017).Pembuatan inokulum pada media *MRSB* bertujuan untuk menumbuhkan bakteri yang siap digunakan sebagai starter dalam suatu proses fermentasi. Pembuatan stok inokulum dilakukan secara aseptis didalam *laminar air flow* untuk menghindari kontaminasi dari bakteri lain.

Hasil peremajaan isolat *Lactobacillus plantarum* yang telah diinkubasi pada suhu 37 °C selama 72 jam yaitudiperoleh isolat bakteri yang tumbuh secara berkoloni kasar bewarna putih pada *MRSA*. Media *MRSA* merupakan media yang digunakan untuk mendukung pertumbuhan bakteri asam laktat termasuk genus *Lactobacillus*, mengandung pepton, beef extract, yeast extract, dekstrosa, tween 80, ammonium sitrat, magnesium sulfat, mangan sulfat, dipotassium fosfat dan sodium asetat (Goktepe dkk., 2005 hal 54).



Bakteri *L. plantarum*

Media *MRSA* sebelum penumbuhan bakteri

Media *MRSA* setelah penumbuhan bakteri

Gambar 12. Media Penumbuhan Bakteri

5.3 Inokulasi Bakteri *Lactobacillus plantarum* Menggunakan *MRSB*

Media *MRSB* yang telah dibuat diambil sebanyak 40 mL dan dimasukkan kedalam Erlenmeyer, setelah itu dicampurkan dengan buffer sitrat pH 5, penambahan buffer ini berfungsi agar penumbuhan bakteri pada media *MRSB* dapat berjalan optimal. Bakteri asam laktat mampu memproduksi bakteriosin untuk menghambat atau membunuh bakteri yang

bersifat selektif hanya terhadap beberapa strain patogen. Salah satu produksi antibakteri dipengaruhi oleh faktor lingkungan yaitu pH, umur bakteri, waktu inkubasi, suhu dan lain – lain. PH optimum diperlukan untuk produksi antibakteri karena pH sangat berpengaruh dalam pembentukan bakteriosin optimum pada pH 5 dan 6 pada media *MRS* (Mogjani dan Amirnia, 2007). Kemudian diambil dua ose bakteri *Lactobacillus plantarum* dari media *MRSA* dan dimasukkan kedalam Erlenmeyer (dilakukan secara duplo), pengerjaan ini dilakukan didalam laminar flow dengan keadaan steril. Media *MRSB* digunakan untuk memproduksi dan memudahkan BAL untuk melepaskan bakteriosin pada media cair tersebut. Bakteriosin merupakan senyawa protein yang memiliki efek bakterisida terhadap mikroorganisme lain. Bakteriosin dari BAL atau BAL yang menghasilkan bakteriosin secara umum dianggap aman untuk konsumsi manusia dan dapat diaplikasikan dalam pengawetan makanan.



Gambar 13. Media *MRSB* dengan *Lactobacillus plantarum*

5.4 Larutan Fisiologis (NaCl 0.9% dan NaCl 0.85%)

Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan bakteri yang biasa digunakan sebagai probiotik. Bakteri ini mempunyai sifat bakterisidal dan bakteriostatik yang dapat digunakan sebagai probiotik (Pennacchia *et al.*, 2004). Syarat probiotik adalah tidak patogen, toleran terhadap asam dan garam empedu, mempunyai kemampuan bertahan pada proses pengawetan dan dapat bertahan pada penyimpanannya serta memiliki kemampuan memberi efek kesehatan yang sudah terbukti (Shortt, 1999).

Menurut Konig dan Frohlich (2009) menyebutkan BAL memerlukan nutrisi untuk dapat tumbuh, diantaranya karbohidrat, asam amino, dan vitamin. Nutrisi lain yang

diperlukan yaitu karbon, nitrogen, sulfur, fosfor dan mineral untuk menunjang viabilitas bakteri asam laktat (Brooks, 2007).

Bakteri probiotik yang ditambahkan ke dalam ransum atau air minum ternak dapat mencegah infeksi dan kolonisasi patogen di dalam saluran pencernaan ternak (Hidayat, 2010). Media untuk mempertahankan daya hidup BAL dapat berupa larutan garam fisiologis yang memiliki kandungan nutrisi yang dibutuhkan oleh BAL.

Menurut Lestari (2014) larutan garam fisiologis merupakan media terbaik untuk menjaga ketahanan hidup isolat bakteri asam laktat, karena NaCl (larutan garam fisiologis yang terbuat dari garam NaCl dengan konsentrasi 0,9% b/v) berfungsi untuk menjaga keseimbangan ion sel mikroba. Fungsi NaCl 0.9% sebagai sumber mineral mikroba karena salah satu factor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroba yaitu sumber mineral dan ini dapat diperoleh dari NaCl 0.9% yang dimana juga menjaga sel mikroba dalam keadaan yang isotonis. Karena jika mikroba dalam keadaan hipotonis atau hipertonis maka sel mikroba akan pecah. Selain itu, larutan NaCl merupakan larutan yang steril dimana tidak ditumbuhi atau tidak adanya mikroba sehingga cocok untuk media.

5.5 Perbandingan Bakteri *Lactobacillus plantarum* dengan McFarland

Larutan McFarland 0,5 buatan merupakan kombinasi campuran larutan BaCl₂ 1 % 0,05 mL dan larutan H₂SO₄ 1 % sebanyak 9,95 mL. McFarland 0,5 buatan digunakan sebagai referensi untuk menyesuaikan atau diasumsikan setara dengan kekeruhan bakteri suspensi sehingga jumlah bakteri dalam kisaran yang diberikan untuk membakukan mikroba pengujian. Dalam penelitian jumlah sel bakteri dihitung dengan cara membandingkan kekeruhan serta nilai absorbansi antara larutan mcfarland dengan bakteri yan ditumbuhkan.

Hasil dari perbandingan antara mcfarland dengan banyaknya sel bakteri dapat dilihat pada table 8 berikut :

Tabel 8. Perbandingan Mcfarland dengan sel bakteri

Nama Sampel	Absorbansi
McFarland	0,004
pengenceran 10 ⁻¹	0,239
pengenceran 10 ⁻²	0,020
pengenceran 10 ⁻³	-0,001
pengenceran 10 ⁻⁴	0,005
pengenceran 10 ⁻⁵	0,002
pengenceran 10 ⁻⁶	0,003

Pada table 8 diatas dapat dilihat pada pengenceran ke-4 nilai absorbansinya adalah 0,005 dimana nilainya mendekati dengan nilai absorbansi mcfarland yaitu 0,004. Dalam hal ini dapat juga dilakukan dengan cara membandingkan kekeruhan antara larutan mcfarland dengan larutan pengenceran sel bakteri. Namun, supaya lebih efektif mengetahui banyaknya bakteri yang dihasilkan tersebut, maka digunakan alat spektrofotometri uv vis.

5.6 Fermentasi Bekatul dengan Menggunakan *Lactobacillus Plantarum*

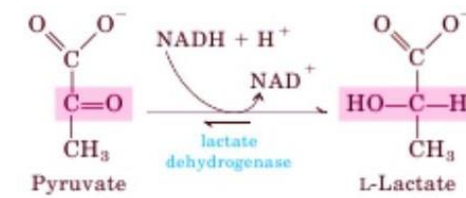
Bekatul ditimbang sebanyak 18 gram kemudian disterilkan dalam oven selama 2 jam pada temperature 162 °C dan ditambahkan dengan akuades sebanyak 30 mL (1:3). Kemudian ditambahkan 10µl inokulum bakteri dari pengenceran ke-4, dimana pengenceran ke-4 ini memiliki nilai absorbansi yang mendekati nilai absorbansi standar mcfarland. Setelah itu bekatul difermentasi dengan variasi waktu 2 hari, 5 hari, dan 7 hari (masing-masing dilakukan secara duplo).

Dari ke-3 variasi tersebut, fermentasi hari ke-7 yang paling bagus, dimana semakin lama bekatul difermentasi maka semakin halus serat-serat bekatul, sehingga lebih maksimal penguraian senyawa oleh bakteri *lactobacillus plantarum*.

Lactobacillus plantarum dilaporkan dapat menurunkan kadar serat kasar pada bekatul. Selama fermentasi pada media bekatul, terjadi penurunan kadar serat kasar sejalan dengan total kenaikan BAL, diduga semakin meningkat jumlah BAL semakin banyak BAL yang memanfaatkan serat untuk metabolisme sel (Zubaidah dkk., 2012). Dilaporkan dalam penelitian sebelumnya, bahwa *L. plantarum* mampu menurunkan kadar serat pada bekatul sebesar 0,3 % setelah 12 jam fermentasi. Bakteri asam laktat memanfaatkan serat untuk metabolisme sel. Serat kasar tersebut dihidrolisis menjadi senyawa sederhana selanjutnya difermentasi oleh BAL melalui glikolisis menjadi asam piruvat dan akhirnya menghasilkan asam lemak rantai pendek (Zubaidah dkk., 2010).

Asam laktat adalah asam organik yang memiliki penggunaan yang luas di bidang industri. Asam laktat dikenal juga dengan nama hidroxyacid (2- hydroxypropionic, CH₃CHOHCOOH), dan diklasifikasikan sebagai GRAS (Generally Recognised as Safe) oleh FDA (Food and Drugs Association) Amerika Serikat dan sering digunakan dalam makanan sebagai penambah asam, perasa, buffer pH, dan sebagai pengawet. Asam laktat umumnya tidak ditemukan dalam makanan, namun dihasilkan selama fermentasi makanan oleh BAL. Sauerkraut, asinan, buah zaitun, beberapa daging dan keju merupakan contoh makanan yang menghasilkan asam laktat (Theron dan Lues, 2011). Asam laktat dihasilkan

oleh BAL melalui jalur fermentasi asam laktat (Gambar 2). Fermentasi ini bertujuan untuk menyediakan NAD^+ pada fase glikolisis. NAD^+ dihasilkan dari NADH dengan mereduksi piruvat menjadi NAD^+ . Piruvat merupakan produk hasil proses glikolisis. Reduksi piruvat dikatalisis oleh enzim laktat dehidrogenase yang membentuk isomer L dari laktat pada pH 7 (Lehninger, 1990).



Gambar 14. Fermentasi Asam Laktat oleh BAL (Lehninger, 1990) Keterangan

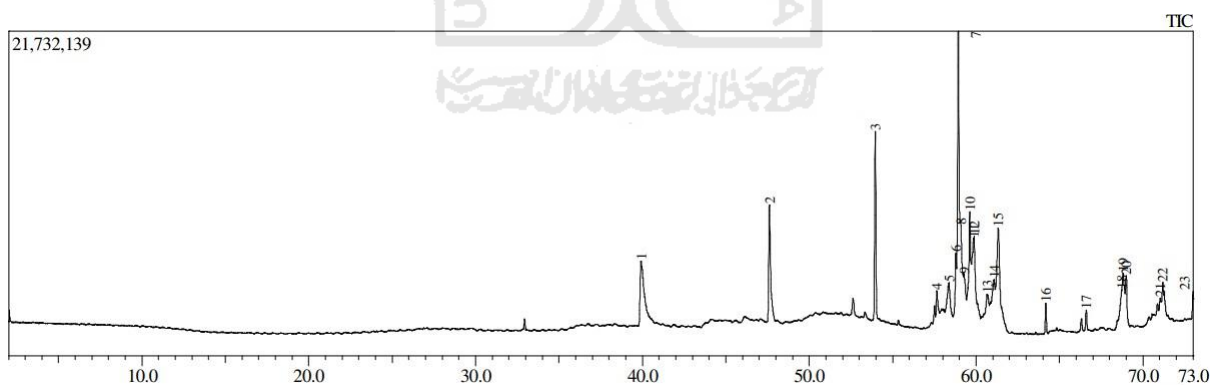
: Kotak merah menunjukkan perbedaan struktur antara piruvat dan asam laktat

Pada media bekatul, selama proses fermentasi terjadi penurunan kadar serat kasar. Karppinen (2003) menjelaskan, serat kasar dapat difermentasi oleh bakteri asam laktat meskipun kecepatan fermentasinya lebih lambat dari pada serat pangan larut. Hal ini disebabkan keterbatasan enzim hidrolitik pemecah serat pangan tidak larut. bakteri asam laktat memiliki kemampuan memfermentasi selulosa menjadi SCFA (*Short Chain Fatty Acid*).

Semakin tinggi penurunan kadar serat kasar semakin tinggi senyawa fenolik yang terdeteksi. Hal ini diduga disebabkan degradasi serat oleh BAL menjadi senyawa yang lebih sederhana, menyebabkan terlepasnya ikatan kovalen senyawa fenolik dengan serat tidak larut bekatul sehingga keberadaannya meningkat. Menurut Miller (2001), antioksidan fenolik sulit untuk diekstrak karena terikat pada serat tidak larut bekatul. Ikatan kovalen pada serat tidak larut bekatul dapat dihidrolisis oleh enzim mikrob. Terlepasnya ikatan kovalen pada serat tidak larut bekatul menyebabkan keberadaan antioksidan fenolik meningkat (Karppinen, 2003). Baublis (2000) menambahkan, modifikasi senyawa fenolik pada bekatul melalui pencernaan yang melibatkan mikrob memberi hasil yang berbeda terhadap bioavailabilitas dan aktivitas antiosidannya. Hidrolisis polisakarida tak larut menyebabkan antioksidan fenolik terbebaskan sehingga bioavailabilitasnya akan meningkat.

Menurut Miller (2001), antioksidan fenolik sulit untuk diekstrak karena terikat pada serat tidak larut bekatul. Ikatan kovalen pada serat tidak larut bekatul dapat dihidrolisis oleh enzim mikrob. Terlepasnya ikatan kovalen pada serat tidak larut bekatul menyebabkan bioavailabilitas antioksidan fenolik meningkat (Karppinen, 2003). Lebih dari 20% dari bekatul adalah serat pangan yang sebagian besar diantaranya tidak dapat larut dan tersusun atas selulosa dan hemiselulosa (Anonymous, 2002a). Komponen utama serat pangan dalam gandum meliputi arabinoxilan, selulosa, β -glukan, lignan, dan fruktan (De Man, 1997). Baublis (2000) menjelaskan bahwa polisakarida tak larut misalnya arabinoxilan terlebih dahulu dihidrolisis oleh enzim xilanase menghasilkan oligosakarida terferulasi lalu dihidrolisis lagi dengan enzim asam ferulat esterase menghasilkan asam ferulat bebas. Hidrolisis polisakarida tak larut menyebabkan antioksidan fenolik terbebaskan sehingga aktivitasnya akan meningkat. Menurut Kroon et al. (1993) asam ferulat terbebaskan dari ikatan kovalen dengan serat pada saat di usus besar. Muller and Wollin (2000) menambahkan, lignan baru akan dimanfaatkan tubuh setelah dikonversi menjadi enterodiol dan enterolaktin oleh fermentasi bakteri di kolon. Berapapun banyaknya lignan yang terdapat pada saluran pencernaan tidak akan dimanfaatkan tubuh sebelum difermentasi oleh mikrob. Peran mikrob menjadi sangat penting untuk memodifikasi senyawa fenolik bekatul guna meningkatkan bioavailabilitas dan aktivitas antioksidan.

5.7 Hasil Analisis GC-MS

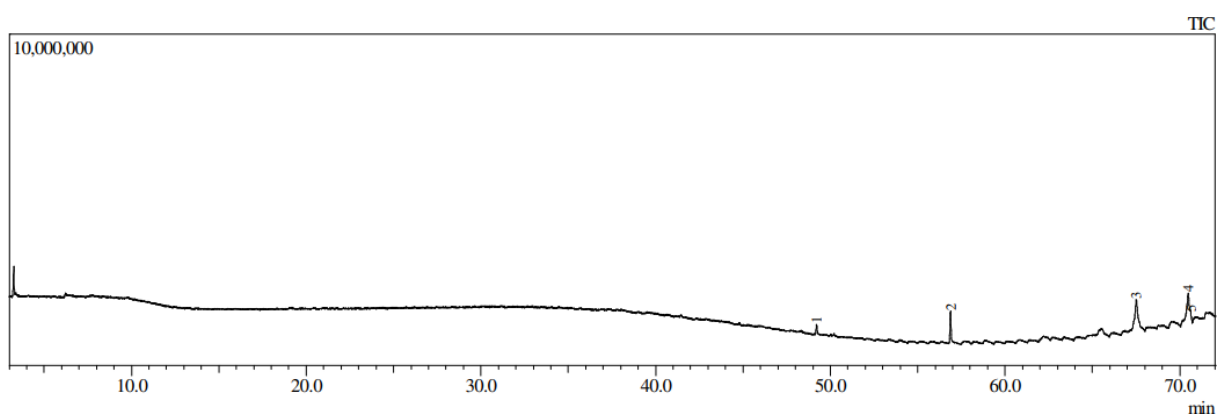


Gambar 15. Kromatogram GC-MS ekstrak bekatul hari ke-2

Tabel 9. Hasil GC-MS Ekstrak Bekatul Hari Ke-2

Peak	Waktu Retensi	% Area	Nama Senyawa
1	39,923	6,25	Hexadecanoic acid
2	47,610	8,37	Octadecanoic acid

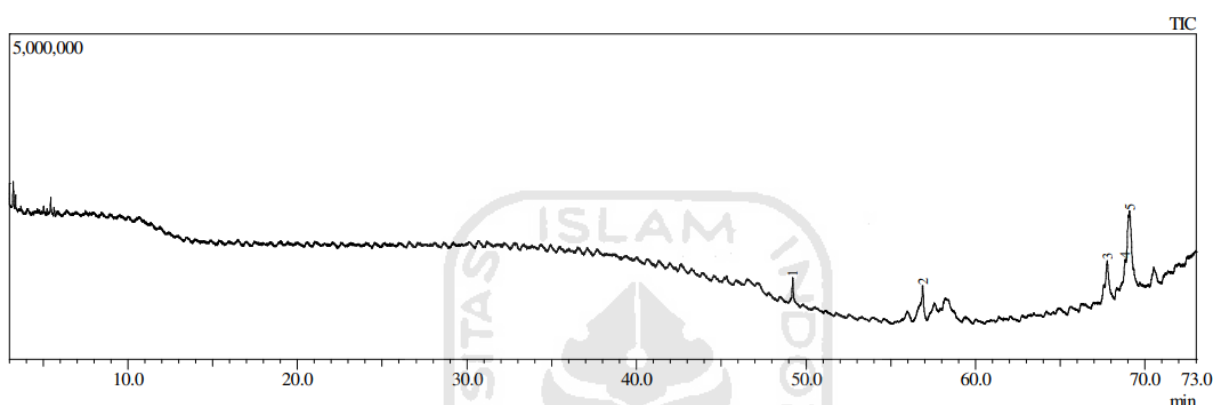
3	53,963	8,52	Hexadecanoic acid
4	57,656	1,49	Octadecanoic acid
5	58,377	3,00	Dodecanoic acid
6	58,790	2,72	Bicyclo[10.1.0]Tridec-1-EN (Isomer 2)
7	58,938	17,42	Di-(9-Octadecenoyl)-Glycerol
8	59,100	5,96	Di-(9-Octadecenoyl)-Glycerol
9	59,300	3,08	Dodecanoic acid
10	59,623	7,61	Hexadecanoic acid
11	59,850	5,40	Dodecanoic acid
12	59,889	4,05	Dodecanoic acid
13	60,678	1,09	Dodecanoic acid
14	61,074	1,38	Dodecanoic acid
15	61,335	7,24	Dodecanoic acid
16	64,184	1,20	12-Tricosanone (CAS) Lauron
17	66,611	0,89	Octanoic acid
18	68,725	2,29	Octanoic acid
19	68,828	4,02	Octanoic acid
20	69,005	3,17	12-Tricosanone (CAS) Lauron
21	71,042	1,18	Glycerine-1,3-Dimyristate
22	71,197	2,65	Dodecanoic acid
23	73,010	1,02	9-Octadecene



Gambar 16. Kromatogram GC-MS ekstrak bekatul hari ke-5

Tabel 10. Hasil GC-MS Ekstrak Bekatul Hari Ke-2

Peak	Waktu Retensi	% Area	Nama Senyawa
1	49,206	5,56	2,8,9-Trioxa-5-aza-1-silabicyclo[3.3.3]undecane
2	56,887	16,64	Hexanedioic acid
3	67,509	39,87	Trans-Stigmasta-5,22-Dien-3.Beta.-ol
4	70,482	30,70	Stigmast-5-en-3-ol, (3.beta.,24S)- (CAS) Clionasterol
5	70,633	7,23	Stigmast-5-en-3-ol, (3.beta.,24S)- (CAS) Clionasterol



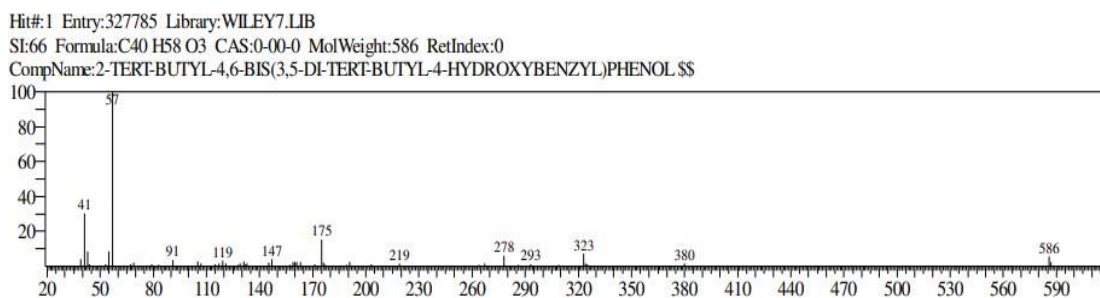
Gambar 17. Kromatogram GC-MS ekstrak bekatul hari ke-7

Tabel 11. Hasil GC-MS ekstrak bekatul Hari Ke-7

Peak	Waktu Retensi	% Area	Nama Senyawa
1	49,219	6,21	2-(Phenyl-piperidin-1-YL-Methyl)-Cyclohexanol
2	56,888	5,15	Hexanedioic acid (Asam palmitat/adipat)
3	67,667	15,21	2-Tert-Butyl-4,6-Bis(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxybenzyl)Phenol
4	68,817	10,03	Dodecanoic acid (asam laurat)
5	69,082	63,41	Dodecanoic acid (asam laurat)

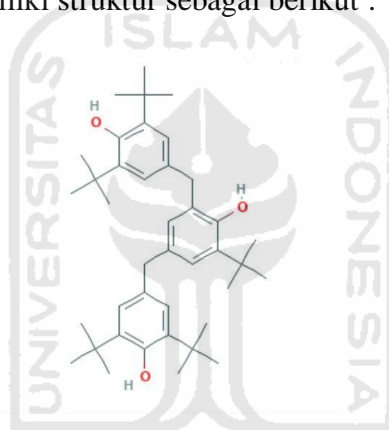
Dari tabel 11 diatas dapat diketahui bahwa pada Sampel ekstrak bekatul terdapat senyawa 2-Tert-Butyl-4,6-Bis(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxybenzyl)Phenol yang muncul pada waktu retensi 15,21 menit dengan berat molekul 586. Hal ini didukung dari hasil analisa MS yang menyatakan bahwa senyawa dengan berat molekul 586 adalah 2-Tert-Butyl-4,6-Bis(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxybenzyl)Phenol dengan nilai similarity index

66% (Library : Wiley7), nilai similar index tersebut menandakan bahwa dalam 100% hasil dari MS diatas 66% merupakan senyawa fenolik, sebagaimana terlihat pada spektrogram berikut ini :



Gambar 18. Spektrogram MS Senyawa 2-Tert-Butyl-4,6-Bis(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxybenzyl)Phenol

Dimana senyawa tersebut memiliki struktur sebagai berikut :

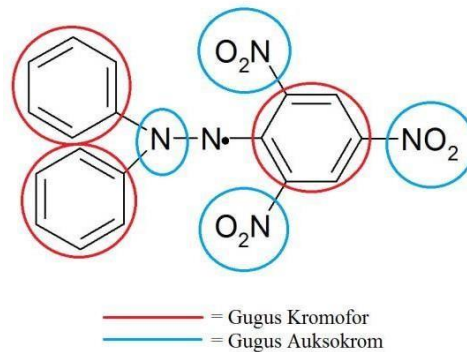


Gambar 19. senyawa 2-Tert-Butyl-4,6-Bis(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxybenzyl)Phenol
 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/545456#section=2D-Structure>)

5.8 Uji Aktivitas Antioksidan

Penentuan panjang gelombang serapan maksimum ini bertujuan untuk menentukan panjang gelombang pada saat senyawa yang ingin diukur memberikan absorbansi yang paling optimum. Pada saat senyawa memberikan absorbansi yang paling optimum, maka pengukuran akan memiliki sensitifitas yang tinggi dan linear sehingga adanya sedikit perubahan pada konsentrasi senyawa akan memberikan perubahan yang besar pada absorbansi yang dihasilkan, dan perubahan konsentrasi senyawa sebanding dengan perubahan absorbansi senyawa yang dihasilkan.

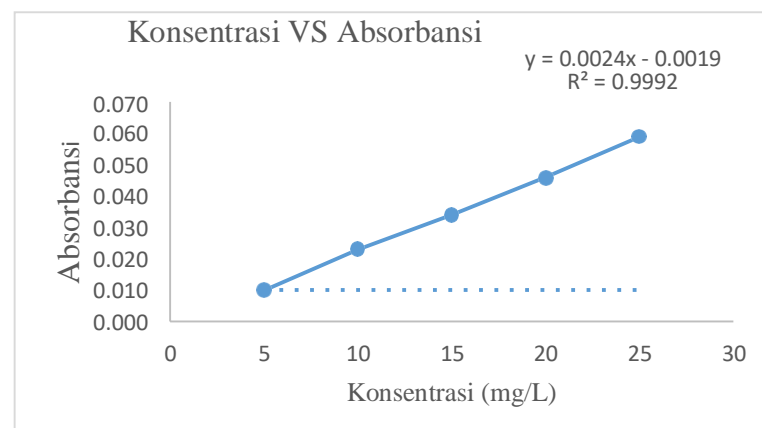
Penentuan panjang gelombang serapan maksimum ini menggunakan senyawa DPPH. DPPH memiliki panjang gelombang serapan maksimum yaitu 515 nm dan memberikan warna violet. Warna ini muncul karena DPPH memiliki gugus kromofor dan auksokrom.



Gambar 20. Gugus kromofor dan auksokrom radikal DPPH

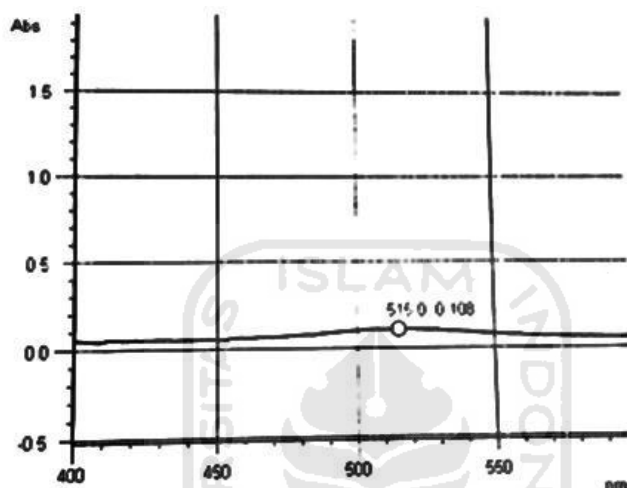
Gugus kromofor dan auksokrom dari radikal DPPH ditunjukkan pada gambar di atas. Kromofor merupakan semua gugus atau atom yang dapat menyerap sinar ultraviolet dan sinar tampak, dimana merupakan gugus tak jenuh yang dapat menjalani transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ dan $n \rightarrow \pi^*$ dan auksokrom adalah gugus yang tidak dapat menjalani transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ tetapi dapat menjalani transisi elektron $n \rightarrow \pi^*$ (Gandjar dan Rohman, 2007).

Pada proses pengukuran spektrofotometer UV dilakukan pembuatan larutan standar DPPH terlebih dahulu, larutan standar DPPH merupakan larutan yang tidak mengandung analit untuk dianalisis. Larutan standar digunakan sebagai kontrol dalam suatu penelitian yang berguna sebagai nilai 100 % transmitans. Dari larutan standar ini hasilnya dapat digunakan untuk menentukan panjang gelombang maksimum untuk mempermudah dalam mengatur range panjang gelombang yang akan digunakan.



Gambar 21. Grafik Kurva Standar DPPH

Pada grafik diatas didapatkan persamaan regresi $y = 0,0024x - 0,0019$ dan nilai R^2 nya adalah 0,9992. Panjang gelombang serapan maksimum ditentukan menggunakan larutan kontrol yaitu larutan DPPH yang dilarutkan dalam metanol dengan tujuan untuk mendapatkan serapan DPPH tanpa gangguan serapan dari senyawa-senyawa lain dalam sampel. *Scanning* panjang gelombang serapan maksimum larutan DPPH dilakukan pada panjang gelombang visibel, yaitu rentang antara 400-800 nm. Hasil penentuan panjang gelombang serapan maksimum ditunjukkan pada tabel di bawah ini.



Gambar 22. Hasil *scanning* panjang gelombang serapan maksimum DPPH

Hasil *scanning* larutan DPPH yang tertera pada gambar diatas dan didapatkan hasil panjang gelombang serapan maksimum adalah 515 nm. Panjang gelombang ini sama dengan panjang gelombang teoritis, yaitu 515 nm.

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis . Uji aktivitas Ekstrak Bekatul dilakukan terhadap Vitamin C sebagai pembanding. Uji aktivitas antioksidan ini dilakukan untuk mengetahui besarnya aktivitas antioksidan masing- masing ekstrak dalam merendam radikal bebas DPPH. Serapan larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-600 nm.

Absorbansi yang ditunjukkan pada panjang gelombang 515 nm merupakan absorbansi maksimum DPPH, Digunakan methanol sebagai blanko. Metode uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan DPPH didasarkan pada pengukuran penurunan serapan DPPH pada

panjang gelombang maksimum yang sebanding dengan konsentrasi penghambat radikal bebas yang ditambahkan kedalam larutan DPPH. Senyawa DPPH bereaksi dengan senyawa antioksidan melalui pengambilan satu atom hydrogen dari senyawa antioksidan untuk mendapatkan pasangan electron, sehingga radikal bebas DPPH akan membentuk senyawa DPPH yang stabil.

Uji aktivitas antioksidan ekstrak bekatul dilakukan dengan menggunakan metode penangkapan radikal bebas DPPH . metode DPPH dipilih karena memerlukan sedikit sampel, sederhana, mudah, cepat dan peka untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan dari senyawa bahan alam (Hanani, dkk., 2005). Pada metode ini DPPH bertindak sebagai model radikal bebas yang akan berikatan dengan senyawa antioksidan (simanjuntak, dkk., 2004). Uji DPPH ekstrak bekatul bertujuan untuk mengetahui kemampuan aktivitas antioksidan ekstrak kental bekatul. Pengukuran dari hasil uji DPPH menggunakan spektrofotometer dan diperoleh nilai IC50 dapat dilihat pada grafik. Sebelum membuat grafik linier, hasil dari absorbansi dirubah ke dalam %inhibisi. Aktivitas penangkapan radikal bebas dapat dinyatakan dengan satuan persen (%) aktivitas antioksidan. Nilai ini diperoleh dengan persamaan sebagai berikut (Molyneux, 2003):

$$\%Inhibisi = \frac{A_{Blanko} - A_{Sampel}}{A_{Blanko}} \times 100\%$$

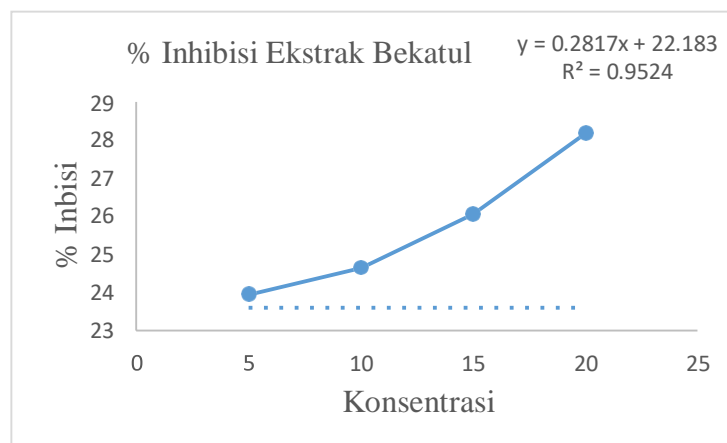
Keterangan :

A = Nilai absorbansi

Nilai 0 % berarti sampel tidak mempunyai aktivitas antioksidan, sedangkan nilai 100 % berarti pengujian aktivitas antioksidan perlu dilanjutkan dengan pengenceran sampel untuk mengetahui batas konsentrasi aktivitasnya. Suatu bahan dapat dikatakan aktif sebagai antioksidan bila presentase aktivitas antioksidan lebih atau sama dengan 50 %

(Parwata, Dkk., 2009).

Dari perhitungan dari rumus diatas didapatkan grafik sebagai berikut :



Gambar 23. Grafik Penghambat DPPH Ekstrak Bekatul

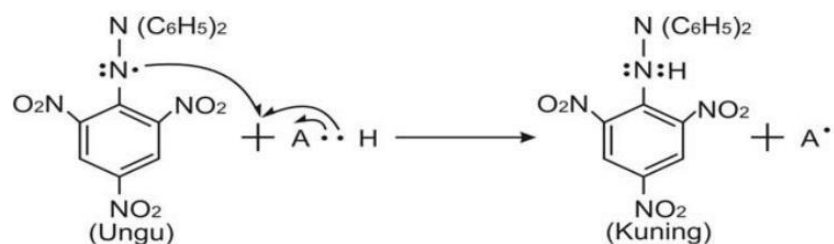
Berdasarkan hasil penelitian terlihat bahwa dari persamaan regresi dari ekstrak bekatul yaitu $Y = 0.2817x + 22.183$ dan $x = 98,746 \mu\text{g/ml}$. nilai IC50 diperoleh dari persamaan regresi linier yaitu nilai x tersebut. Hasil dari perhitungan nilai y sebesar 50 akan memberikan nilai x.

Data absorbansi yang diperoleh di atas menunjukkan bahwa semakin Tinggi konsentrasi, maka semakin kecil nilai absorbansinya. Penurunan absorbansi pada konsentrasi yang berbeda disebabkan oleh perbedaan kandungan senyawa antioksidan, dimana semakin tinggi konsentrasi larutan maka semakin banyak senyawa antioksidan yang terkandung di dalamnya (Arianti, dkk., 2007). Semakin banyaknya senyawa antioksidan akan menyebabkan semakin besar pula peredaman warna ungu dari DPPH sehingga nilai absorbansi yang diperoleh semakin kecil. Peredaman tersebut dihasilkan oleh bereaksinya molekul DPPH dengan atom hidrogen yang dilepaskan satu molekul komponen sampel sehingga terbentuk senyawa 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin (DPPH-H) dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning (Zuhra, dkk., 2008). Aktivitas antioksidan penangkap radikal dapat diketahui melalui penurunan serapan tersebut (Hamburger, dkk., 2002). semakin tinggi konsentrasi ekstrak bekatul maka partikel-partikel senyawa antioksidan yang terkandung akan semakin banyak sehingga semakin besar pula aktivitas antioksidannya dan menyebabkan absorbansinya semakin berkurang (Talapessy, dkk., 2013). Demikian pula dengan pembanding vitamin C, memiliki nilai absorbansi yang lebih kecil dibandingkan nilai absorbansi ekstrak bekatul, hal ini dikarenakan vitamin C merupakan senyawa antioksidan kuat, sehingga nilai

absorbansi yang diperoleh juga semakin kecil seiring dengan bertambahnya konsentrasi vitamin C.

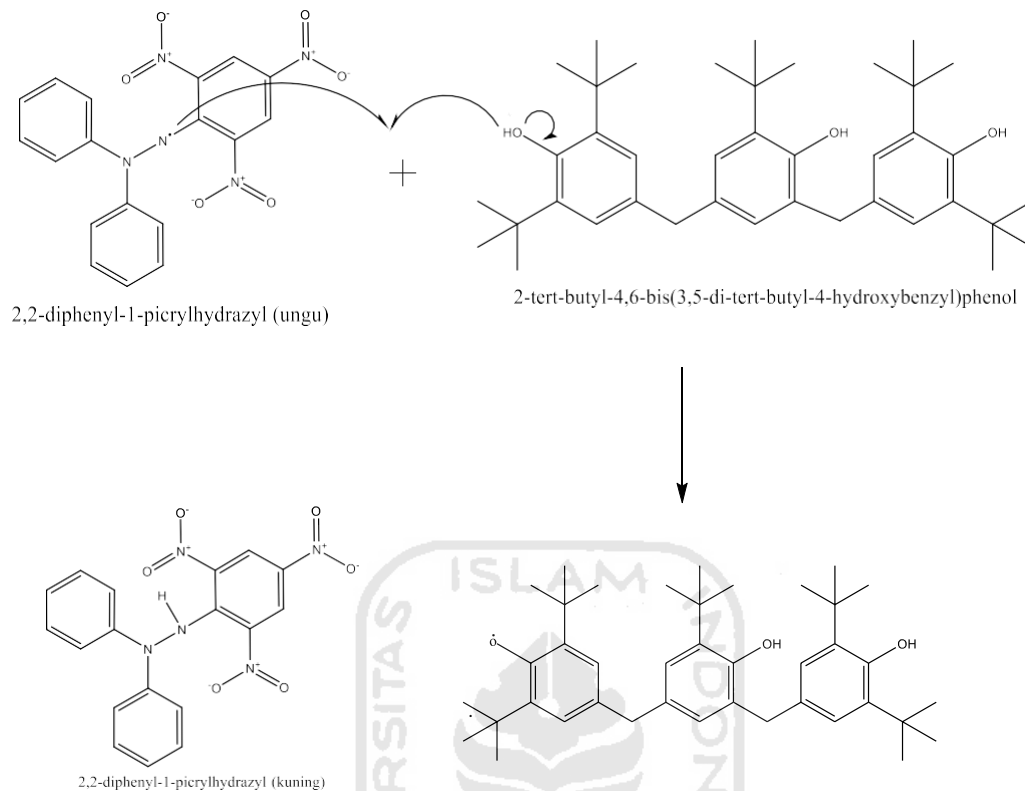
Mekanisme penangkapan radikal DPPH oleh senyawa antioksidan adalah melalui donasi atom hidrogen dimana terjadi rentang waktu masa inkubasi sampel yang bercampur dengan reagen DPPH selama 30 menit sehingga menyebabkan perubahan warna DPPH dari ungu menjadi kuning (Hanani, dkk., 2005). Perubahan warna tersebut disebabkan karena berkurangnya ikatan rangkap terkonjugasi pada DPPH karena adanya penangkapan satu elektron oleh senyawa antioksidan yang menyebabkan tidak adanya kesempatan elektron tersebut untuk beresonansi dimana perubahan ini dapat diukur dan spektrofotometer ekstrak bekatul yang memiliki aktivitas antioksidan. Proses reaksi antara senyawa antioksidan dengan radikal DPPH terjadi melalui mekanisme donasi atom hydrogen (Purwangsih, 2012).

Senyawa DPPH adalah radikal bebas yang stabil berwarna ungu. Ketika direduksi oleh radikal akan berwarna kuning (diphenyl picrylhydrazin) (Gambar 24). Metode DPPH berfungsi untuk mengukur elektron tunggal seperti aktivitas transfer Hx sekaligus juga untuk mengukur aktifitas penghambatan radikal bebas. Campuran reaksi berupa larutan sampel yang dilarutkan dalam etanol absolut dan di inkubasikan pada suhu 37 °C selama 30 menit, dibaca pada panjang gelombang 517 nm. Hasil perubahan warna dari ungu menjadi kuning stokiometrik dengan jumlah elektron yang ditangkap. Metode ini sering digunakan untuk mendeteksi kemampuan artiradikal suatu senyawa sebab hasil terbukti akurat, reliabel dan praktis, selain itu sederhana, cepat, peka dan memerlukan sedikit sampel (Huang et al., 2005; Sanchez-Moreno, 2002). Reaksi DPPH dapat dilihat pada Gambar 24.



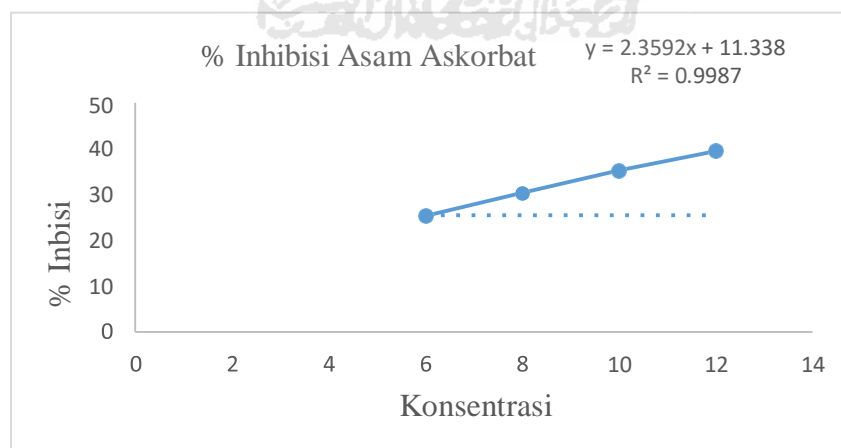
Gambar 24. Reaksi DPPH dan Antioksidan (Yamaguchi, dkk., 1998).

Berikut Reaksi antara DPPH dengan senyawa 2-Tert-Butyl-4,6-Bis(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxybenzyl)Phenol yang disajikan pada gambar 25:



Gambar 25. Reaksi DPPH dengan Antioksidan senyawa Fenolik Ekstrak Bekatul

Gambar 26 adalah grafik asam askorbat yang digunakan sebagai pembanding dalam penelitian ini :



Gambar 26. Grafik Penghambat DPPH Asam Askorbat

Selanjutnya data hasil pengukuran Asam Askorbat pada kontrol positif diperoleh persamaan nilai regresi $y = 2.3592x + 11.338$ dan $x = 16,387 \mu\text{g/ml}$. Nilai IC50 diperoleh kuat untuk menangkal radikal bebas. Larutan standar yang telah diketahui konsentrasi nilai R merupakan bilangan yang menunjukkan tingkat keakuratan dan ketelitian dari larutan standar yang kita buat. Apabila nilai R mendekati 1 maka kurva standar tersebut semakin bagus. R memiliki nilai maksimum 1 tidak pernah lebih dari 1. Menurut Molyneaux (2004) menjelaskan bahwa klasifikasi antioksidan dibagi menjadi 5 yaitu, kuat <50 ppm (sangat kuat), 50-100 ppm (kuat), 100-150 ppm (sedang), 150-200 ppm (lemah), dan >200 ppm adalah sangat lemah. Karena dipengaruhi oleh larutan DPPH tersebut dimana DPPH memiliki sifat hidrofobik, yaitu tidak larut dalam air dan hanya bisa larut dalam pelarut organik. Oleh karena itu, metode DPPH terbatas hanya pada antioksidan. Larutan stok DPPH mudah bereaksi dengan cahaya dan oksigen, sehingga dapat mengalami degradasi. Untuk menghindari atau meminimalisir hal tersebut, maka larutan stok harus ditutup dengan aluminium foil dan disimpan ditempat yang gelap. Dengan begitu, larutan stok DPPH dapat bertahan hingga 1 minggu.



BAB VI

PENUTUP

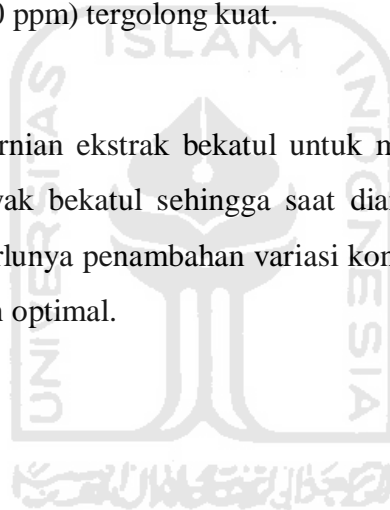
6.1 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa

1. Senyawa yang terkandung dalam ekstrak bekatul berupa senyawa fenolik, dengan rumus kimianya adalah 2-Tert-Butyl-4,6-Bis(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxybenzyl)Phenol .
2. Ekstrak Bekatul memiliki nilai aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} 98,746 ppm dibandingkan dengan nilai IC_{50} vitamin C 16,387 ppm sebagai kontrol positif (IC_{50} 50-100 ppm) tergolong kuat.

6.2 Saran

Perlu dilakukan pemurnian ekstrak bekatul untuk menghasilkan senyawa fenol murni tanpa adanya minyak bekatul sehingga saat dianalisis dengan GC-MS hasil fenolnya terlihat. Serta perlunya penambahan variasi konsentrasi untuk mendapatkan hasil fermentasi yang lebih optimal.



DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, Eddy dan Evi Liviawaty., 2005, *Pakan Ikan*, Yogyakarta: Kanisius.
- Abdul Rohman., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Alves, G, H, Ferreira, C, D, Vivian, P, G, Monks, J, L, F, Elias, M, C, Vanier, L, N, de Oliveira, M., 2016, The revisited levels of free and bound phenolics in rice: Effects of the extraction procedure, *Food Chemistry*, 208:116–123.
- Amalia, R.N., 2016, Pengaruh pH dan Suhu Pada Peningkatan Aktivitas Antioksidan Bekatul Terfermentasi oleh *Bacillus brevis*, *Skripsi*, Malang, UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Amarowicz, R., Naczek, M., Shahidi, F., 2000, Antioxidant Activity of Crude Tannins Of Cannola and Rapeseed Hulls, *JAOCS*, 77, 957-961 cit Rohman, A., Riyanto, S., 2004, Uji Aktivitas Antiradikal Ekstrak Kloroform, Etil Asetat dan Kloroform Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*) dengan Metode DPPH, Laporan penelitian MAK, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Amin, S., Ruswanto dan Yansen I.N., 2014, Analisis Minyak Atsiri Umbi Bawang Putih (*Allium sativum* Linn.) Menggunakan Kromatografi Gas Spektrometer Massa, *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada*, 11(1).
- Andlauer, W. dan Furst., 1998, Antioxidative power of phytochemicals with special reference to cereals dalam Rajeshwar, Y., Kumar, G. P. S., Gupta, M., Mazumder, U.K., 2005, Studies on in vitro antioxidant activities of methanol extract of mucuna pruriens (*Fabaceae*) seeds, *European Bulletin of Drug Research*, 13(1): 176–184.
- Anonymous, 2002, Stabilized Rice Bran, Diakses tanggal 24 September 2019, <<http://www.lifestar.com/Pages/ricebran.html> >
- Anonymous, 2002, Stabilized Rice Bran as a Nutraceutical Food, *Innovations in Food Technology*, Diakses tanggal 24 September 2019. < <http://www.lifestar.com/Pages/ricebran.html> >
- Arab, F., Alemzadehb, I. dan Maghsoudi, V., (2011), Determination of antioxidant component and activity of rice bran extract, *Scientia Iranica, Transactions C: Chemistry and Chemical Engineering* 18(6): 1402-1406.

- Arab, F., Alemzadehb, I. dan Maghsoudi, V., 2011, Determination of antioxidant component and activity of rice bran extract, *Scientia Iranica, Transactions C: Chemistry and Chemical Engineering* 18(6): 1402-1406.
- Arianti, Harsojo, Syafria, Y., & Ermayanti, T. M., (2007), Isolasi dan uji antibakteri batang sambung nyawa (*Gynura procumbens* Lour) umur panen 1, 4 dan 7 bulan, *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, 6(2), 43-45.
- Arikunto, Suharsimi dan Lia Yuliana., 2008, *Manajemen Pendidikan*, Yogyakarta: Aditya Media Yogyakarta.
- Aruben, N.W., Peningkatan Konsentrasi Senyawa Fenolik Antioksidan dari Dedak dengan Cara Fermentasi, Artikel Ilmiah, Jurusan Teknik Kimia Fak. Teknik Universitas Diponegoro.
- Astawan, M. A. dan Mita W., 1991, *Teknologi Pengolahan Pangan Nabati Tepat Guna*, Jakarta: Akademika Pressindo.
- Astawan, M. dan Febrinda, A.E., 2010, Potensi dedak dan bekatul beras sebagai ingredient pangan dan produk pangan fungsional, *Artikel Pangan* 19(1): 14-21.
- Aulanni'am, 2005, *Protein dan Analisisnya*. Malang, Citra Mentari Group.
- Axelsson, L., 1998, Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology dalam S. Salminen and A Von Wright (Ed), *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects*, 2nd ed: Revised and Expanded, New York: Marcell Dekker, Inc.
- Balasubramaniam, J., Bindu., Rao., Ray., Haldar., Brzezczko., 2008, Effect Of Superdisintegrants On Dissolution Of Carionic Drug, (online), (www.rsc.org/ej/JM/2008/b800209f.pdf, diakses tanggal 24 Januari 2011).
- Bayer, E.A., E. Morag, R.Lamed., 1994, *The Cellulosome- A Treasure-Trove for Biotechnology*, *TIBTECH* 12, 379-386.
- Butsat, S. dan Siriamornpun, S., 2010, Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice, *Food Chemistry* 119: 606-613.
- Cazes, J., 2005, *Ewings's Analytical Instrumentation Handbook Third Edition*, New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 127-139.

- Cairns D., 2009, *Essentials of Pharmaceutical Chemistry Second Edition (Intisari Kimia Farmasi Edisi Kedua)*, Penerjemah : Puspita Rini, Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Chahal, D.S., 1983, Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulose production, *Appl, Environ, Microbiol*, 49, 205-210.
- Chen, M.H. dan Bergman, C.J., 2005, A Rapid Procedure for Analysing Rice Bran Tocopherol, Tocotrienol and γ -Oryzanol Contents, *Journal Food Compos Analysis*, Vol. 18 : 139–151.
- Damayanthi, E., Tjing, L.T. dan Arbianto, L., 2007, *Rice Bran*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Damayanthi, E., Kustiyah, L., Khalid, M. dan Fariza, H., 2010, Aktivitas antioksidan bekatul lebih tinggi daripada jus tomat dan penurunan aktivitas antioksidan serum setelah intervensi minuman kaya antioksidan, *Jurnal Gizi dan Pangan* 5(3): 205–210.
- Departemen Pertanian, 2015, *Produksi Pangan Beras*, Jakarta.
- Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T.A., Qin, W., 2009, Fungal Biodegradation and Enzymatic Modification of Lignin, *In.t J. Biochem., Mo., Biol*, 1(1), 36-50.
- David, G. W., 2005, *Analisis Farmasi*, Edisi kedua, EGC, Jakarta.
- Day, R A, dan Underwood, A L., 2002, *Analisis Kimia Kuantitatif Edisi Keenam*, Erlangga, Jakarta.
- Dehpour, A.A., Ebrahimzadeh, M.A., Fazel, N.S., and Mohammad, N.S., 2009, Antioxidant Activity of Methanol Extract of *Ferula Assafoetida* and Its Essential Oil Composition, *Grasas Aceites*, 60(4), 405-412.
- D Elgado, A., D. Brito, P. F Ereiro, C. P Eres and J.F. M Arques, 2001, *Antimicrobial activity of L. Plantarum isolated from a traditional lactic acid fermentation of table olives*, *EDP Sciences* 81: 203–215.
- De Vuyst, L. dan E.J. Vandamme., *Antimicrobial potential of lactic acid bacteria*, 1994, *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*, London, Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall.
- Drozd, J., 1985, Chemical Derivatization in Gas Chromatography, *Journal of Chromatography Library*, 19.

- Effendi, S., 2012, *Teknologi Pengolahan dan Pengawetan Pangan*. Bandung: Alfabeta.
- Elizabeth, G., 2011, *Energi Terbarukan Geothermal*. Fakultas Teknik Industri, Jakarta, Universitas Gunadarma.
- Fakriah., Eka, K., Adriana., Rusydi., 2019, Sosialisasi Bahaya Radikal Bebas dan Fungsi Antioksidan Alami Bagi Kesehatan, *Jurnal Vokasi*, Vol3 No.1 ISSN : 2548-9410 (Cetak) | ISSN : 2548-4117
- Fardiaz, S., 1992, *Mikrobiologi Pangan 1*, PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Fox, P.F., 1991, *Food Enzymology*, New York: Elsevier Applied Science Ltd.
- Gandjar, I. G. dan Rohman, A., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Gandjar, I.G. dan Rohman, A., 2012, *Analisis Obat Secara Spektroskopi dan Kromatografi*, Yogyakarta: Pustaka Pelajar, hal 59-93 dan 468- 490.
- Goldberg, G., 2003, *Plants: Diet and Health*, USA: Blackwell Publishing Company.
- Gordon, M. H., 1990, The Mechanism of Antioksidants Action in Vitro., In: Hudson, B.J.F. (ed), *Food Antioksidants*, Elsevier Applied Science, London-New York.
- Jung, E. H., Kim, S.R., Hwang, I.K. dan Ha, T.Y., 2007, Hypoglycemic effects of a phenolic acid fraction of rice bran and ferulic acid in c57bl/ksj-db/db mice, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55: 9800-9804.
- Hadipernata, 2007, Mengolah dedak menjadi minyak (rice bran oil), *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian*, 29(4): 8-10.
- Hapsari, R. P., Anugerah, F. Y., Siti, Z., Rachimoallah, H. M., 2013, Isolasi dan Karakterisasi Oryzanol dari Minyak Dedak Padi, *Jurnal Teknik Pomits*, Vol. 1, No. 1.
- Hartati, S., Yustinus, M., Umar, S., 2015, Komposisi Kimia Serta Aktivitas Antioksidan Ekstrak Hidrofilik Bekatul Beberapa Varietas Padi, *Agritech*, Vol. 35, No. 1.
- Hole, A. S., Ida, R., Stine, G., Stefanie, S., Judith, N., dan Stefan, S., 2012, Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuter*, *Journal Agriculture, Food Chem*, 60(9): 6369–6375.

- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.; Oxford University Press.: Free Radikal In Biology And Medicine , New York, 2000.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, 2007, Free radicals in biology and medicine, 4th eds, New York: Oxford.
- Hardjono Sastrohamidjojo., 2007, Spektroskopi, Yogyakarta: Liberty.
- Holtzapple., Mark. Moiser., Nathan. Wyman., Charles. Dale., Bruce. Elander., Richard. Lee., Y.Y and Ladisch., Michael., 2003, Features of Promising Thecnologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass, *Bioresource Journal*, Purdue University.
- Huang, S.H. dan Ng, L.T., 2012, Quantification of polyphenolic content and bioactive constituents of some commercial rice varieties in Taiwan, *Journal of Food Composition and Analysis* 26: 122-127.
- Ikram, U.B., Javed, M., Khan, T.S., Siddiq, Z., 2005, Cotton Saccharifying Activity of Cellulases Produced by Co-culture of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*, *Research Journal of Agriculture and Biological Science*, 1(3): 241-245.
- Irawadi, T.T., 1990, *Selulase*, Bogor: IPB PAU Bioteknologi.
- Janathan, 2007, *Kolesterol*, Jakarta: Erlangga.
- Karppinen S., 2003, Dietary Fiber Component of Rye Bran and Their Fermentation In Vitro, Dissertation. Faculty of Science, Department of Bioscience, Divisions of Biochemistry, University of Helsinki, Finlandia.
- Kementrian kesehatan Indonesia., 2010, Profil kesehatan Indonesia tahun 2009, Jakarta: kementerian kesehatan RI.
- Kosasih, E.N., Setiabudhi, T., dan Heryanto, H., 2004, Peranan antioksidan pada lanjut usia, Jakarta: Pusat Kajian Nasional Masalah Lanjut Usia.
- Kulp, K., 1975, *Carbohydrates*, di dalam *Enzymes and Processing*, New York: Academic Press.
- Kuswanto, K.R & S. Sudarmadji.,1998, Proses-Proses Mikrobiologi Pangan, Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, Yogyakarta.
- Labola, Y.A., Dhanang, P., 2017, Peran Antioksidan Karotenoid Penangkal Radikal Bebas Penyebab Berbagai Penyakit, *Majalah Farmasetika*, Vol.2 No.2 Hal, 13.

- Lamid, M., 2013, Potensi *Lactobacillus plantarum* terhadap Kandungan Selulosa dan Bahan Ekstrak tanpa Nitrogen (BETN) Silase Pucuk Tebu (*Saccharum officinarum*, Linn), *Green Technology 3*, Surabaya: Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
- Laokuldilok, T., Shoemaker, C.F., Jongkaewwattana, S. dan Tulyathan, V., 2011, Antioxidants and antioxidant activity of several pigmented rice brans, *Journ.*
- Lehninger, A. L., 1990, *Dasar-Dasar Biokimia*, Jakarta: Erlangga.
- Lehninger, A.L., 1997, *Biochemistry*, New York: Work Publisher Inc.
- Li, S.C., Chou, T.C. dan Shih, C.K., 2011, Effects of brown rice, rice bran, and polished rice on colon carcinogenesis in rats, *Food Research International* 44: 209-216.
- Luo, C., Wang, X., Gao, G., Wang, L., Li, Y., Sun, C., 2013, Identification and quantification of free, conjugate and total phenolic compounds in leaves of 20 sweetpotato cultivars by HPLC–DAD and HPLC–ESI–MS/MS, *Food Chemistry*. 141(3):2697–2706
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Zyl, W.H., Pretorius, I.H., 2002, Microbial Cellulose Utilization, Fundamental and Biotechnology, *Microbiol Molecul Bio Reviews*, 66: 506-577.
- Madhavi, D. L., Deshpande, S. S., dan Salunkhe, D. K., 1996, *Food Antioxidants Technological, Toxicological, and Health Perspective*, New York: Marcell Dekker Inc.
- Malik, A., 2015, *Ekstraksi minyak dari bekatul beras putih dengan variasi pelarut dan pengaruh variasi konsentrasi ekstrak kasar terhadap antioksidan*, Skripsi Tidak Diterbitkan, Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Marsono, Y., Illman, R.J., Clarke, J.M., Trimble, R.P. dan Topping, D.L., 1993, Plasma lipids and large bowel volatile fatty acids in pigs fed on white rice, brown rice and rice bran, *British Journal of Nutrition* 70: 503-513.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., 2004., *Animal Nutrition*, New York: John Willey and Sons Inc.
- McILVAINE, T.C., 1921, A Buffer Solution For Colorimetric Comparison, From the Department of Soils, West Virginia University, Morgantown.

- Miller, H. E., Rigelhof, F., Marquart, L., Prakash, A., dan Kanter, M., 2000, Antioxidant Content of Whole Grain Breakfast Cereals, Fruits and Vegetables, *Journal of The American College of Nutrition*, 19(3): 312– 319.
- Miller, G., 2001, Grain for the health: health effects of newly recognized grain constituent-antioxidants, phenolics, lignans, and phytochemicals, *Journal of the American College of Nutrition* 19: 312S-319S
- Mindasari, R., 2010, Studi Antioksidan pada Pembuatan Tempe dari Kedelai, Jagung dan Dedak Padi, Prodi ITP Fakultas Pertanian USU.
- Moleynaux, P., 200, *The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity*, *J Ssci Technol*; 26(2): 211-9.
- Mubarak, Z., Santi, C., Hafizah, H.D., 2016, Aktivitas Antibakteri Ekstrak Propolis Alami dari Sarang Lebah Terhadap Pertumbuhan *Enterococcus faecalis*, *Jurnal Syiah Kuala Dent Soc*, 2016, 1 (2):175-186.
- Mukherjee, P.K., Maiti, K., Mukherjee, K. dan Houghton, P.J., 2006, Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials, *Journal of Ethnopharmacology* 106: 1-28.
- Mulja, M. dan Suharman., 1995, *Analisis Instrumental*. Surabaya: Airlangga University Press, hal. 19-48.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW., 2003, *Biochemistry*, 6th ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill.
- Muwakhid, B., Salim, S., Maunatin, A., Uji Kemampuan Bakteri Asam Selulolitik Asal Usus Itik Petelur sebagai Probiotik, *Green Technology* 3. 161-167.
- Nam, S.H., Choi, S.P., Kang, M.Y., Kozukue, N. dan Friedman, M., 2005, Antioxidative, antimutagenic, and anticarcinogenic activities of rice bran extracts in chemical and cell assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 816-822.
- Nuria, M.C., 2010, Antibacterial Activities From Jangkang (*Homalocladium platycladum* (F. Muell) Bailey) Leaves, *Jurnal ilmu Pertanian*, VOL 6. NO 2: HAL 9 – 15.

- Nurjanna., Ahmaddirahman, F., 2010, Penentuan Bakteri Sulfat Reducing Bacteri (SRB) dan Sulfur Oxidazing Bacteria (SOB) dengan Menggunakan Pelarut yang Berbeda, Media Akuakultur Volume 5 Nomor 1.
- Ogunbanwo, S.T., A.I. Sanni and A.A. Onilude, 2003, *Influence Of Culture Conditions On The Production Of Bacteriocin By Lactobacillus Brevis Ogl*, African Journal Of Biotechnology Vol.2(7), 179-184.
- Oke, J. M. & Hamburger, M. O., 2002, Screening of some nigerian medicinal plants for activity using 2,2-diphenyl-picrylhidrazil (DPPH) radical, African Journal of Biomedical Research, 5(1), 77-79.
- Orthofer, F.T, 2005, Rice Bran Oil.Di dalam : Shahidi, F, editor. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Edible Oil And Fat Products: Edible oils.Ed ke- 6.Canada: A John Wiley & Sons, Inc. Vol 2, hlm 465-487.
- Ou, S.Y, Teng, J.W, Zhao, Y.Y., dan Zhao, J., 2012, P-Coumaric Acid Production from Lignocelluloses, *Nova Science Journal*, 12(3): 435-440.
- Ouwehand, A.C., Vesterlund, S., 2004, *Antimicrobial Components From Lactic Acid Bacteria, In Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, ed. Salminen, S.A., Von Wright, a., ouwehand, A.C. Marcel Dekker, new york: 375-395.
- Palmer, 2003, Hermeneutika Teori Baru Mengenal Interpretasi, Yogyakarta: Pustaka Belajar.
- Pavia, Donald L., Gary M. Lampman, George S. Kriz, Randall G. Engel., 2006, *Introduction to Organic Laboratory Techniques (4th Ed.)*, Thomson Brooks/Cole. pp. 797-817.
- Pinelo, M, Arnous, A, Meyer, A, S., 2006, Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release, *Trends in Food Science & Technology*, 17(11):579-590.
- Prakash, A., Rigelhof, F., and Miller, E., 2001, Antioxidant Activity: Medallion Laboratories, *Analithical Progress*, 19(2), 1-4.
- Putra, D.A.D., 2012, Identifikasi Komponen Kimia Minyak Atsiri Daun Bunga Tahi Ayam (*Tagetes Erecta L.*) serta Uji Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan. Skripsi Tidak Diterbitkan, Universitas Sumatera Utara.

- Rahayu, D.S, Kusriani, D., dan Fachriyah, E., 2010, Penentuan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Daun Ketapang (*Terminalia catappa L.*) dengan Metode 1,1 difenil 2 Pikrihidrazil (DPPH, Semarang: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro.
- Ray, B., 2004, *Fundamental Food microbiology, 3rd edition*, CRC Press Boca Raton, New York, Whashington D. C. London.
- Rohman, A., dan Riyanto., 2005, Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda Citrifolia L.*) , *Journal Agricultural technology*, Vol. 25(3):131- 136.
- Rosidah, Ria., 2018, Pengaruh pH Media dan Konsentrasi Yeast Ekstrak Terhadap Aktivitas Antibakteri Bakteriosin yang Dihasilkan Oleh *Lactobacillus plantarum*, skripsi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Rosyada, N., 2015, Isolasi Bakteri Asam Laktat dengan Aktivitas Selulolitik pada Saluran Pencernaan Mentok (*Cairina moschata*), *Skripsi*, Surakarta: Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret.
- Sastrohamidjojo, H., 2001, Spektroskopi, Yogyakarta : Liberty.
- Shen, Y., Jin, L., Xiao P., Lu, Y. dan Bao, J., 2009, Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. *Journal of Cereal Science* 49: 106-111.
- Silalahi, J., 2006, Makanan fungsional, Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., and Crouch, S.R., 2007, *Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition*, Canada: Thomson Corporation, pp. 367-390.
- Smid, E. J. & L. G. M. Gorris., 2007, *Natural antimicrobial for food preservation, In: Rahman, M. S. (Editor)*, Handbook of Food Preservation. 2nd Edition. CRC Press, New York.
- Sparkman, O.D., Penton, Z., Fulton, G., 2011, Gas chromatography and mass spectrometry : a practical guide, Elsevier.
- Suhartati T., 2013, Dasar-dasar Spektrofotometri Uv-vis dan spektrometri Massa untuk Penentuan struktur Senyawa organik, Lampung: AURA.
- Sumarno, 2001, Teori Dasar Metode Kromatografi Untuk Analisis Makanan, Yogyakarta : Pustaka Pelajar.

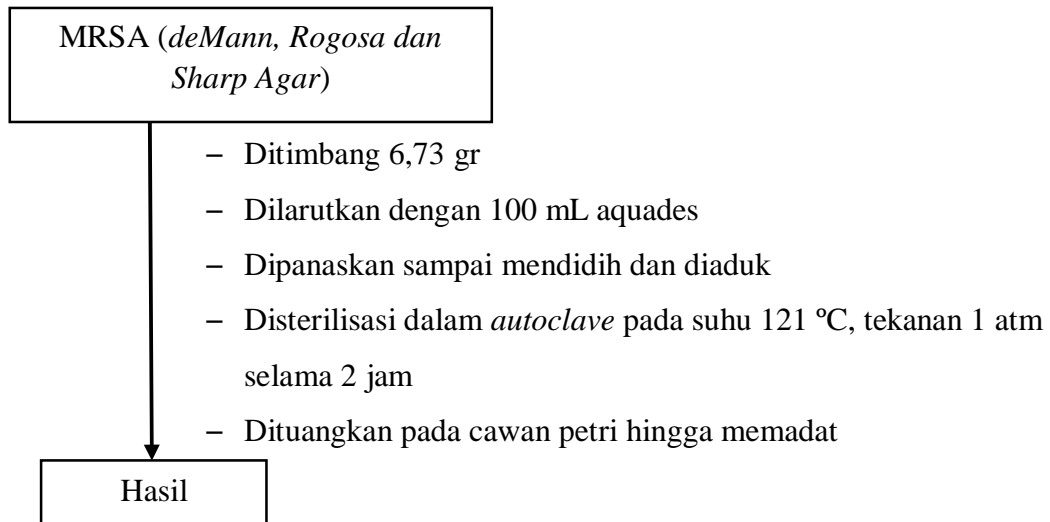
- Surono., 2004, *Yoghurt Untuk Kesehatan*, Yogyakarta : Penebar Swadaya.
- Sutton, S., 2011, *Determination of Inoculum for Microbiological Testing*, Summer Vol. 15 Number 3.
- Talapessy, S., Suryanto, E., & Yudistira, A., 2013, Uji aktivitas antioksidan dari ampas hasil pengolahan sagu (*Metroxylon sagu* Rottb), *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 2(3), 40-44.
- Uitto, J., 1997, *Understanding premature skin aging*, *N. Engl. J. Med.*, 20(337):1463-1465.
- Wang, W, Guo, J, Zhang, J, Peng, J, Liu, T, Xin, Z., 2015, Isolation, identification and antioxidant activity of bound phenolic compounds present in rice bran, *Food Chemistry*, 171:40-49
- Werdhasari, Asri., 2014, *Peran Antioksidan Bagi Kesehatan*, *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*, Vol.3.2.2014: 59-68.
- Widarta, I.W.R., Arnata, I.W., *Stabilitas Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bekatul Beras Merah Terhadap Oksidator dan Pemanasan pada Berbagai pH*, *J. Teknol. dan Industri Pangan* Vol. 25 No. 2 Th. 2014 ISSN: 1979-7788
- Widyastuti, N., 2010, *Pengukuran Aktivitas Antioksidan dengan Metode CUPRAC, DPPH dan FRAP serta Korelasinya dengan Fenol dan Flavonoid pada Enam Tanaman*, Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Zaup, M, Calani, L, Del Rio, D, Brighenti, F, Pellegrini, N., 2015, *Characterization of total antioxidant capacity and (poly) phenolic compounds of differently pigmented rice varieties and their changes during domestic cooking*, *Food Chemistry*, 187:338–347
- Zhang, H, Shao, Y, Bao, J, Beta, T., 2015, *Phenolic compounds and antioxidant properties of breeding lines between the white and black rice*, *Food Chemistry*, 172:630–639
- Zhou, K., Su, L. dan Yu, L.L., 2004, *Phytochemicals and antioxidant properties in wheat bran*, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52: 6108-6114.
- Zubaidah E dan Farida., 2006, *Isolasi, karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat indigenus asal bekatul*. *Prosiding Seminar Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia (PATPI)*, Yogyakarta.
- Zubaidah, E., Aldina, N., Nisa, F.C., 2010, *Studi Aktivitas Antioksidan Bekatul dan Susu Skim Terfermentasi Bakteri Asam Laktat Probiot (*Lactobacillus plantarum* J2 dan *Lactobacillus casei*)*, *Jurnal Teknologi Pertanian*. 11 (1) : 11-17.

Zubaidah, E., Ella, S., dan Josep, H., 2012, Studi Aktivitas Antioksidan pada Bekatul dan Susu Skim Terfermentasi Probiotik (*Lactobacillus plantarum* B2 dan *Lactobacillus acidophilus*), *Jurnal Teknologi Pertanian*, 13(2):111–118.

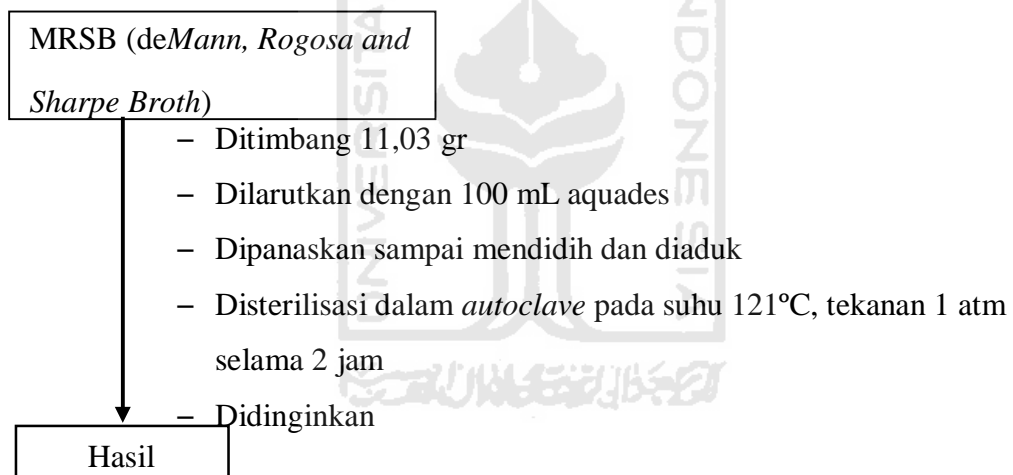


LAMPIRAN 1

1.1 Pembuatan Media MRSA (*deMann, Rogosa and Sharpe Agar*)

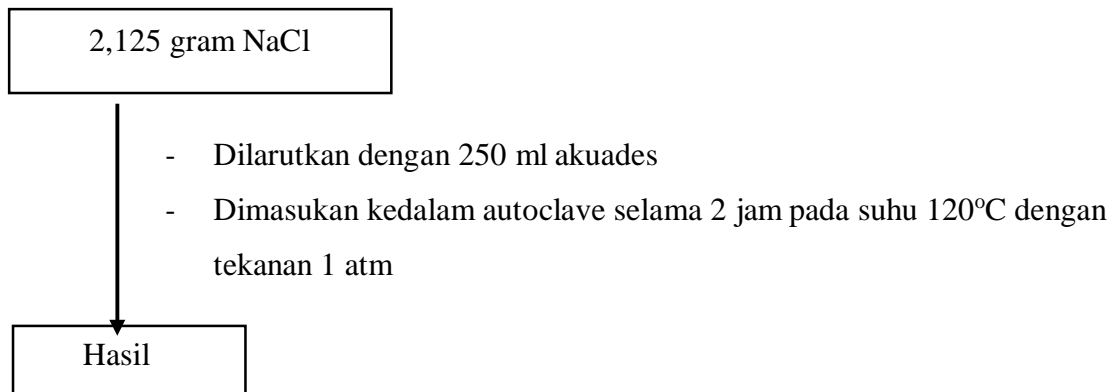


1.2 Media MRSB (*Man, Rogosa and Sharpe Broth*)

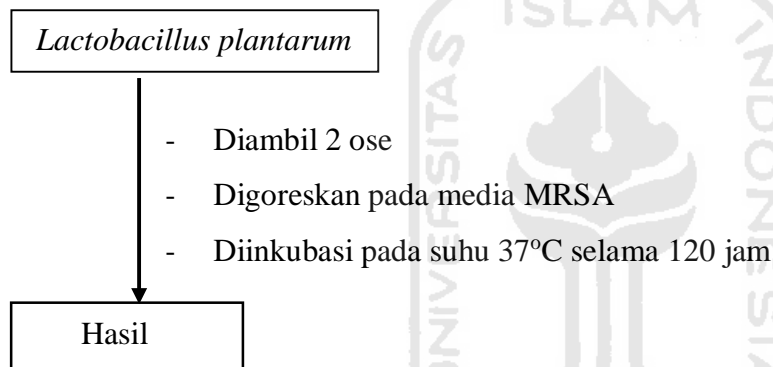


LAMPIRAN 2

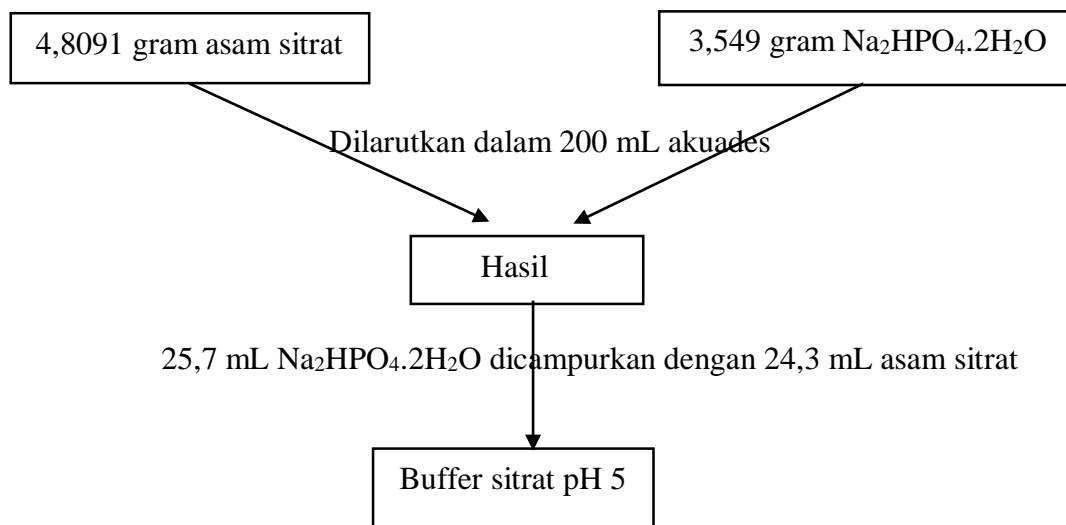
2.1 Pembuatan Larutan NaCl 0,85%



2.2 Regenerasi *Lactobacillus Plantarum*

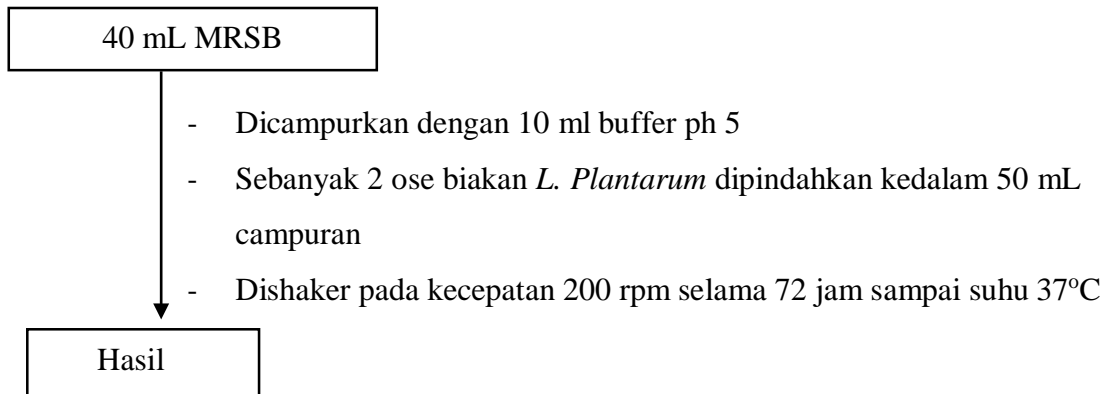


2.3 Pembuatan Buffer Sitrat pH 5

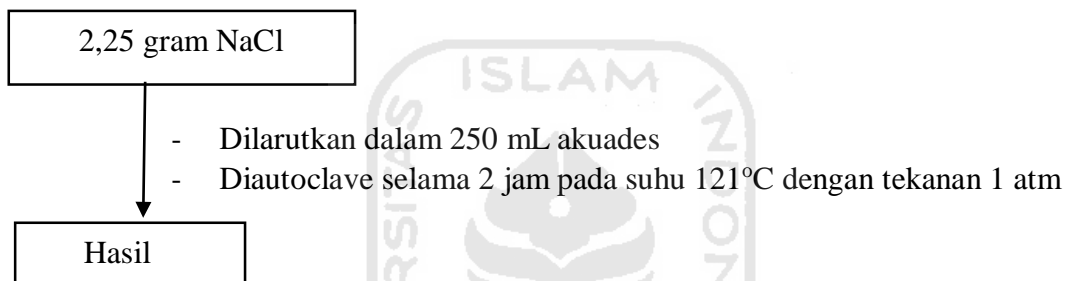


LAMPIRAN 3

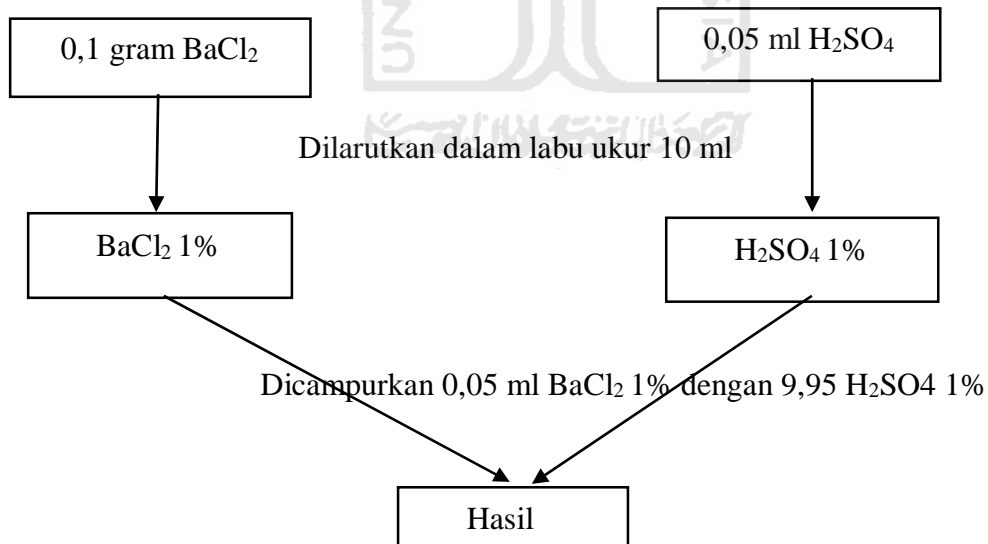
3.3 Pembuatan Inokulum *Lactobacillus Plantarum*



3.4 Pembuatan Larutan NaCl 0,9%

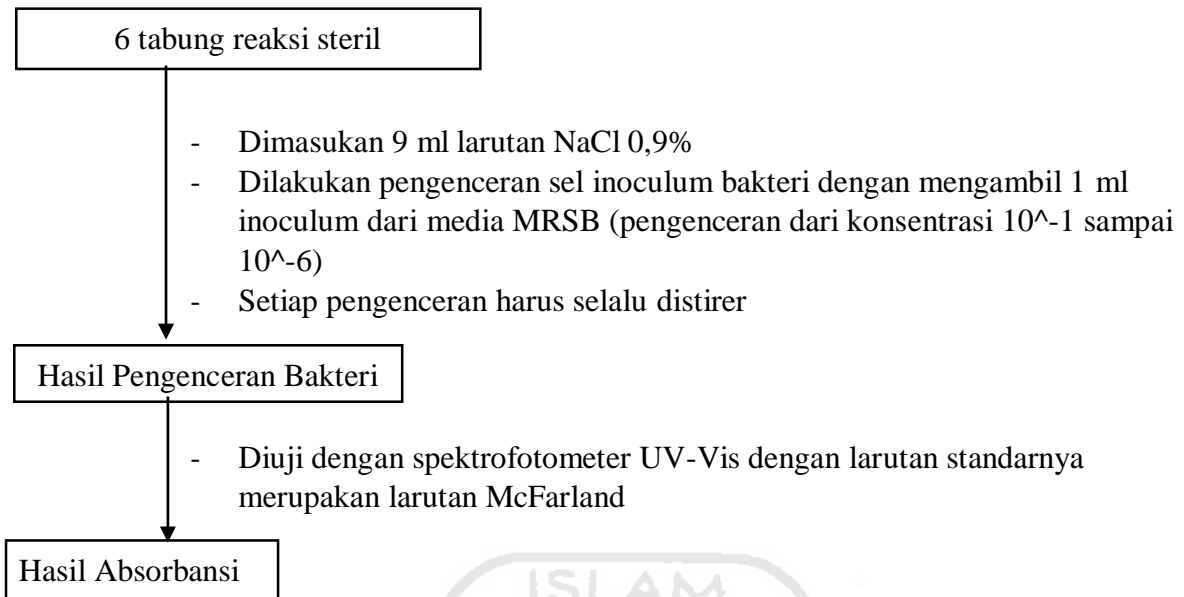


3.5 Pembuatan Larutan McFarland 0,5

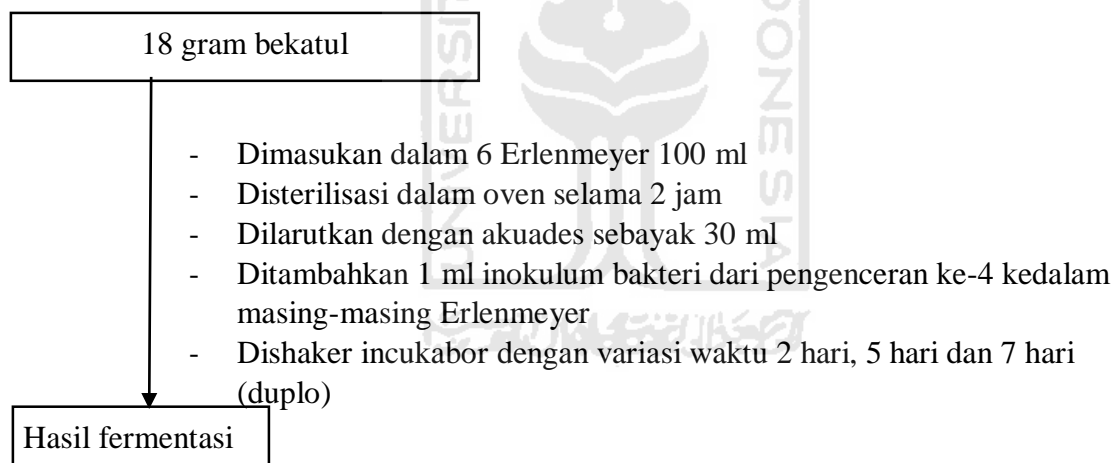


LAMPIRAN 4

4.1 Pengenceran Bakteri

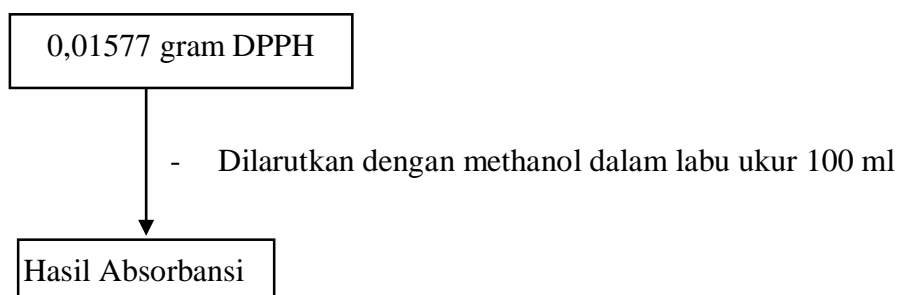


4.2 Fermentasi Bekatul dengan *L. Plantarum*



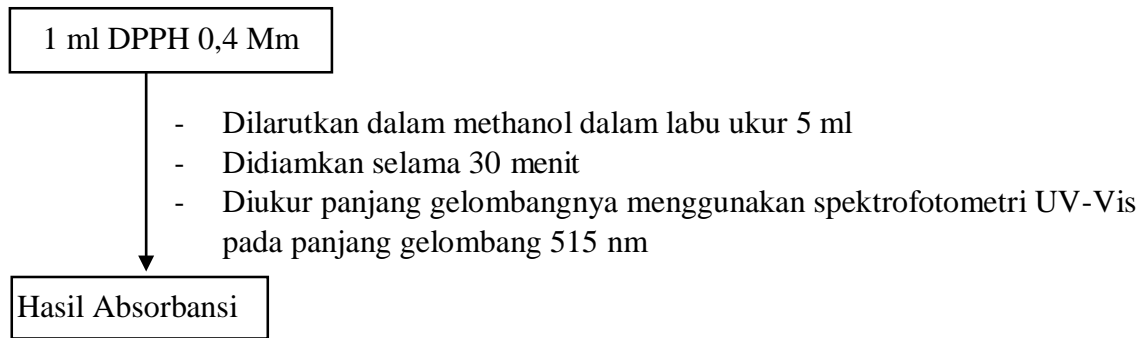
4.3 Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

4.3.1 Pembuat Larutan DPPH 0,4 Mm

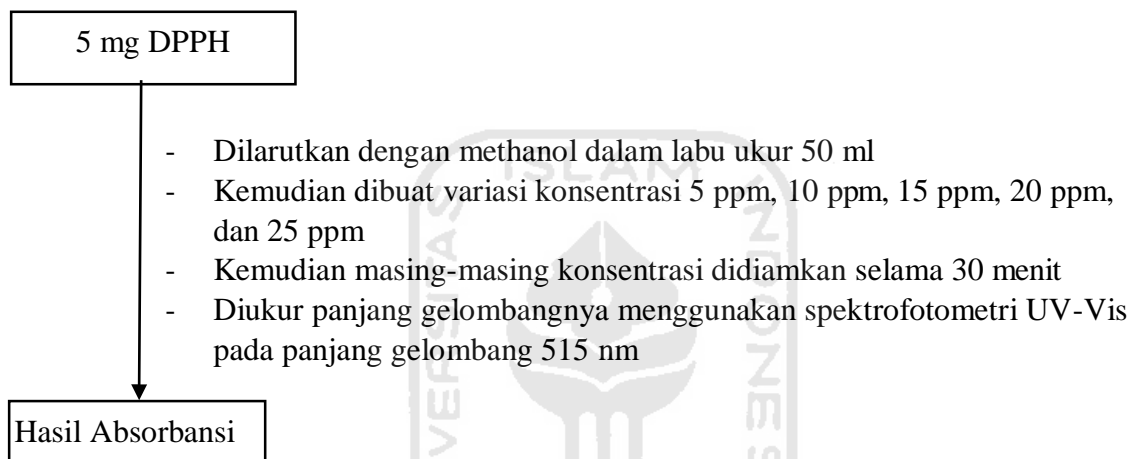


LAMPIRAN 5

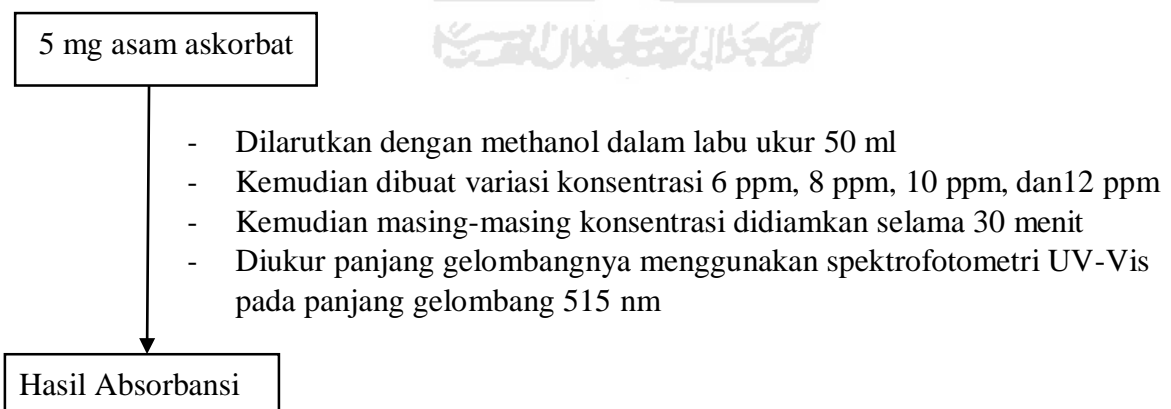
5.1 Pembuatan dan Pengukuran Larutan Blanko



5.2 Pembuatan Kurva Standar DPPH 100 ppm

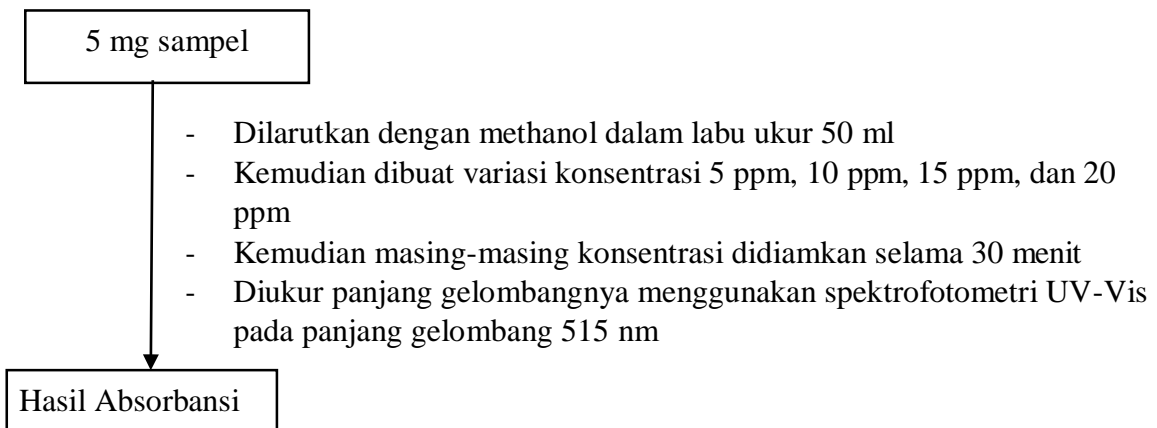


5.3 Pengukuran Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat 100 ppm

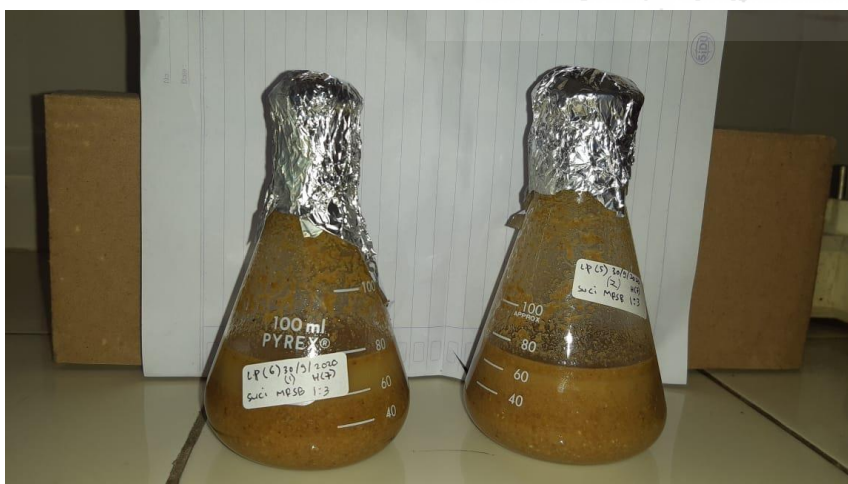


LAMPIRAN 6

6.1 Pengukuran Aktivitas Antioksidan sampel 100 ppm



6.2 Bekatul Sebelum di Fermentasi dengan *Lactobacillus Plantarum*



LAMPIRAN 7

7.1 Bekatul Hari Ke-2 Fermentasi



7.2 Bekatul Hari Ke-5 Fermentasi

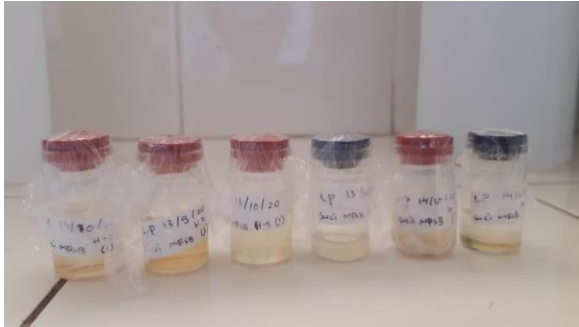


7.3 Bekatul Hari Ke-7 Fermentasi



LAMPIRAN 8

8.1 Ekstrak Bekatul



8.2 Larutan DPPH 0,4 Mm



8.3 Larutan Asam Askorbat 100 ppm



8.4 Pengenceran Asam Askorbat 100 ppm



LAMPIRAN 9

9.1 Pengenceran Sampel Ekstrak Bekatul 100 ppm



9.2 Perhitungan Media MRSA

$$\frac{V1}{W1} = \frac{V2}{W2}$$
$$\frac{1000 \text{ ml}}{67,3 \text{ g}} = \frac{100 \text{ ml}}{W2}$$
$$W2 = \frac{6,730 \text{ g/ml}}{1000 \text{ ml}}$$
$$W2 = 6,73 \text{ g}$$



9.3 Perhitungan Media MRSB

$$\frac{V1}{W2} = \frac{V2}{W2}$$
$$\frac{1000 \text{ ml}}{55,15} = \frac{200 \text{ ml}}{W2}$$
$$W2 = \frac{11,030 \text{ g/ml}}{1000 \text{ ml}}$$
$$W2 = 11,03 \text{ g}$$

9.4 Perhitungan Pembuatan NaCl 0,85%

$$\% \text{ NaCl} = \frac{\text{Massa Zat dalam Campuran}}{\text{Massa Seluruh Campuran}} \times 100\%$$

$$0,85 \% = \frac{\text{Massa Zat dalam Campuran}}{250 \text{ ml}} \times 100\%$$

$$\text{Massa NaCl} = \frac{0,85\% \times 250 \text{ ml}}{100\%}$$

$$\text{Massa NaCl} = 2,125 \text{ g}$$



LAMPIRAN 10

10.1 Perhitungan Pembuatan NaCl 0,9%

$$\%NaCl = \frac{\text{Massa Zat dalam Campuran}}{\text{Massa Seluruh Campuran}} \times 100\%$$

$$0,9\% = \frac{\text{Massa Zat dalam Campuran}}{250 \text{ ml}} \times 100\%$$

$$\text{Massa NaCl} = \frac{0,9\% \times 250 \text{ ml}}{100\%}$$

10.2 Perhitungan Asam Sitrat

$$\text{Massa} = n \times Mr$$

$$\text{Massa} = 0,025 \text{ mol} \times 192,124 \text{ g/mol}$$

$$\text{Massa} = 4,8091 \text{ g}$$

10.3 Perhitungan Na₂HPO₄·2H₂O

$$\text{Massa} = n \times Mr$$

$$\text{Massa} = 0,025 \text{ mol} \times 141,96 \text{ g/mol}$$

$$\text{Massa} = 3,549 \text{ g}$$

10.4 Perhitungan Pembuatan McFarland

10.4.1 Pembuatan BaCl 1%

$$\% = \frac{\text{Massa}}{\text{volume}} \times 100\%$$

$$\text{Massa} = \frac{1\%}{100\%} 10 \text{ ml}$$

$$\text{Massa} = 0,1 \text{ g}$$

10.4.2 Pembuatan H₂SO₄ 1%

- Molaritas H₂SO₄ Pekat

$$M = \frac{10 \times \% \times \text{Berat Jenis}}{BM}$$

LAMPIRAN 11

11.1 Pembuatan H₂SO₄ 1%

$$M = \frac{10 \times 97\% \times 1,84 \text{ g/mol}}{98,08 \text{ g/mol}}$$

$$M = 18,19 \text{ M} \approx 18 \text{ M}$$

11.2 Pembuatan H₂SO₄ 1%

- Molaritas H₂SO₄

$$M = \frac{10 \times \% \times \text{Berat Jenis}}{BM}$$

$$A = 0,18 \text{ M} \approx 0,1 \text{ M}$$

11.3 Pembuatan H₂SO₄ 1%

- Pengenceran H₂SO₄

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$18 \text{ M} \times V_1 = 0,1 \text{ M} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{1 \text{ M/ml}}{18 \text{ M}}$$

$$V_1 = 0,05 \text{ ml}$$

11.4 Pengenceran Variasi Konsentrasi Larutan Standar DPPH 100 ppm

- Konsentrasi 5 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 5 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ ml}$$

- Konsentrasi 10 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 10 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 1 \text{ ml}$$

- Konsentrasi 15 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 15 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 1,5 \text{ ml}$$

- Konsentrasi 20 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

LAMPIRAN 12

12.1 Pengenceran Variasi Konsentrasi Larutan Standar DPPH 100 ppm

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 20 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V1 = 2 \text{ ml}$$

- Konsentrasi 25 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 25 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V1 = 2,5 \text{ ml}$$

12.2 Pengenceran Variasi Konsentrasi Larutan Asam Askorbat 100 ppm

- Konsentrasi 6 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 6 \text{ ppm} \times 5 \text{ ml}$$

$$V1 = 0,3 \text{ ml}$$

- Konsentrasi 8 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 8 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V1 = 0,4 \text{ ml}$$

- Konsentrasi 10 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 10 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V1 = 0,5 \text{ ml}$$

- Konsentrasi 12 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 12 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V1 = 0,6 \text{ ml}$$

12.3 Pengenceran Variasi Konsentrasi Larutan Sampel 100 ppm

- Konsentrasi 5 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 5 \text{ ppm} \times 5 \text{ ml}$$

$$V1 = 0,25 \text{ ml}$$

- Konsentrasi 10 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 10 \text{ ppm} \times 5 \text{ ml}$$

LAMPIRAN 13

13.1 Pengenceran Variasi Konsentrasi Larutan Sampel 100 ppm

- Konsentrasi 15 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$V1 = 0,5 \text{ m}$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 15 \text{ ppm} \times 5 \text{ ml}$$

$$V1 = 0,75 \text{ ml}$$

- Konsentrasi 20 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 20 \text{ ppm} \times 5 \text{ ml}$$

$$V1 = 1 \text{ ml}$$

13.2 Perhitungan %Inhibisi Sampel Ekstrak Bekatul 100 ppm

- 5 ppm

$$\%Inhibisi = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\%$$

$$\%Inhibisi = \frac{0,142 - 0,108}{0,142} \times 100\%$$

$$\%Inhibisi = 23.94366197$$

- 10 ppm

$$\%Inhibisi = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\%$$

$$\%Inhibisi = \frac{0,142 - 0,107}{0,142} \times 100\%$$

$$\%Inhibisi = 24.64788732$$

- 15 ppm

$$\%Inhibisi = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\%$$

$$\%Inhibisi = \frac{0,142 - 0,105}{0,142} \times 100\%$$

$$\%Inhibisi = 26.05633803$$

- 20 ppm

$$\%Inhibisi = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\%$$

$$\%Inhibisi = \frac{0,142 - 0,102}{0,142} \times 100\%$$

$$\%Inhibisi = 28.16901408$$

LAMPIRAN 14

14.1 Perhitungan %Inhibisi Asam Askorbat 100 ppm

- 6 ppm

$$\%Inhibisi = \frac{Absorbansi\ Blanko - Absorbansi\ Sampel}{Absorbansi\ Blanko} \times 100\%$$

$$\%Inhibisi = \frac{0,142 - 0,106}{0,142} \times 100\%$$

$$\%Inhibisi = 25.35211268$$

- 8 ppm

$$\%Inhibisi = \frac{Absorbansi\ Blanko - Absorbansi\ Sampel}{Absorbansi\ Blanko} \times 100\%$$

$$\%Inhibisi = \frac{0,142 - 0,099}{0,142} \times 100\%$$

$$\%Inhibisi = 30.28169014$$

- 10 ppm

$$\%Inhibisi = \frac{Absorbansi\ Blanko - Absorbansi\ Sampel}{Absorbansi\ Blanko} \times 100\%$$

$$\%Inhibisi = \frac{0,142 - 0,092}{0,142} \times 100\%$$

$$\%Inhibisi = 35.21126761$$

- 12 ppm

$$\%Inhibisi = \frac{Absorbansi\ Blanko - Absorbansi\ Sampel}{Absorbansi\ Blanko} \times 100\%$$

$$\%Inhibisi = \frac{0,142 - 0,086}{0,142} \times 100\%$$

$$\%Inhibisi = 39.43661972$$

14.2 Perhitungan IC50 Sampel Ekstrak Bekatul

$$y = 0,2817x + 22,183$$

$$50 = 0,2817x + 22,183$$

$$50 - 22,183 = 0,2817x$$

$$x = 98,74689386$$

LAMPIRAN 15

15.1 Perhitungan IC50 Asam Askorbat

$$y = 2,3592x + 11,338$$

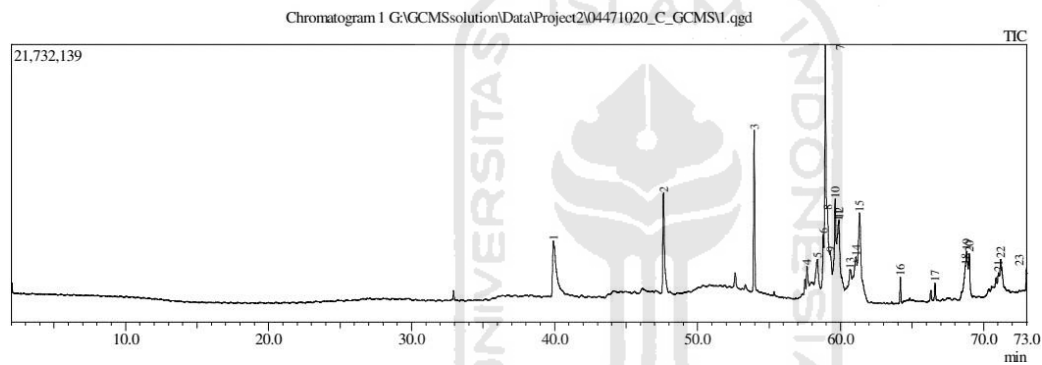
$$50 = 2,3592x + 11,338$$

$$50 - 11,338 = 2,3592x$$

$$x = 16,38775856$$

15.2 Hasil GC-MS Ekstrak Bekatul Hari Ke-2

Sample Information
 Analyzed by : Admin
 Analyzed : 11/12/2020 8:34:56 AM
 Sample Name : 1
 Sample ID :
 Injection Volume : 1.00
 Data File : G:\GCMSsolution\Data\Project2\04471020_C_GCMS1.qgd
 Tuning File : C:\GCMSsolution\System1\1\1\Agus 2019.qgt



Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height
1	39.923	39.783	40.142	46569070	6.25	3870608
2	47.610	47.492	47.933	62353544	8.37	7844800
3	53.963	53.850	54.092	63436597	8.52	12546759
4	57.656	57.575	57.808	11100670	1.49	1748313
5	58.377	58.175	58.608	22368029	3.00	2060066
6	58.790	58.675	58.833	20267152	2.72	4052050
7	58.938	58.833	59.050	129767492	17.42	18930356
8	59.100	59.050	59.217	44395332	5.96	5955387
9	59.300	59.242	59.425	22920567	3.08	2719466
10	59.623	59.425	59.700	56705355	7.61	7018071
11	59.850	59.725	59.875	40213509	5.40	5280944
12	59.889	59.875	60.075	30154086	4.05	5422917
13	60.678	60.550	60.792	8135689	1.09	987662
14	61.074	60.925	61.108	10299152	1.38	1577700
15	61.335	61.150	61.517	53911929	7.24	5204411
16	64.184	64.100	64.292	8972821	1.20	2013862
17	66.611	66.517	66.717	6608542	0.89	1352276
18	68.725	68.550	68.750	17090014	2.29	2316861
19	68.828	68.750	68.925	29975399	4.02	3498174
20	69.005	68.925	69.200	23588133	3.17	3378261
21	71.042	70.933	71.125	8814869	1.18	1088285
22	71.197	71.125	71.433	19708174	2.65	2191842
23	73.010	72.917	73.092	7627608	1.02	1734577
				744983733	100.00	102793648

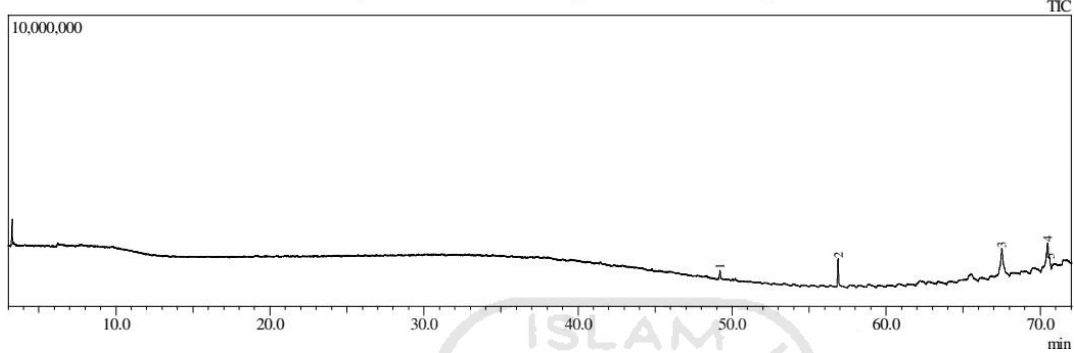
LAMPIRAN 16

16.1 Hasil GC-MS Ekstrak Bekatul Hari Ke-5

Analyzed by : Admin
Analyzed : 11/12/2020 11:15:28 AM
Sample Name : 3
Sample ID :
Injection Volume : 1.00
Data File : G:\GCMSsolution\Data\Project2\04471020_C_GCMS3.qgd
Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune\1\ Agus 2019.qgt

Sample Information

Chromatogram 3 G:\GCMSsolution\Data\Project2\04471020_C_GCMS3.qgd



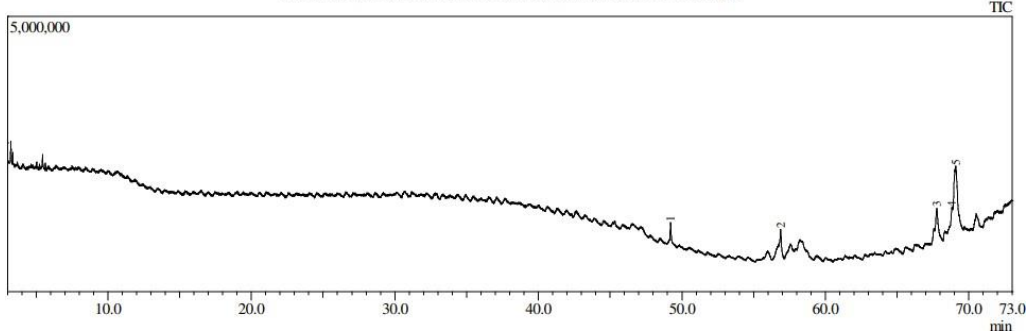
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height
1	49.206	49.133	49.300	1295520	5.56	298447
2	56.877	56.800	56.983	3879682	16.64	953191
3	67.509	67.292	67.775	9293152	39.87	845584
4	70.482	70.292	70.575	7156663	30.70	831072
5	70.633	70.575	70.725	1684264	7.23	284889
				23309281	100.00	3213183

16.2 Hasil GC-MS Ekstrak Bekatul Hari Ke-7

Analyzed by : Admin
Analyzed : 11/12/2020 1:52:41 PM
Sample Name : 5
Sample ID :
Injection Volume : 1.00
Data File : G:\GCMSsolution\Data\Project2\04471020_C_GCMS5.qgd
Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune\1\ Agus 2019.qgt

Sample Information

Chromatogram 5 G:\GCMSsolution\Data\Project2\04471020_C_GCMS5.qgd



LAMPIRAN 17

17.1 Hail GC-MS Ekstrak Bekatul Hari Ke-7

Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Peak Report TIC		
				Area	Area%	Height
1	49.219	49.150	49.317	1359185	6.21	323618
2	56.888	56.833	57.008	1127026	5.15	277288
3	67.758	67.667	67.967	3329792	15.21	397779
4	68.817	68.725	68.900	2196454	10.03	286537
5	69.082	68.900	69.308	13883050	63.41	961676
				21895507	100.00	2246898

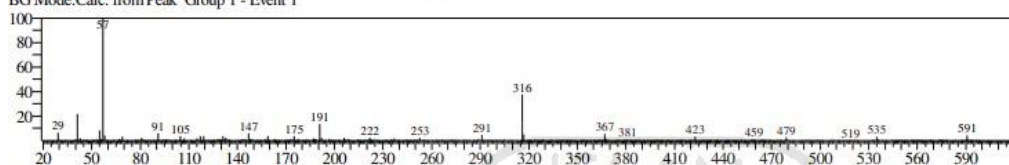
17.2 Data MS Ekstrak Bekatul Hari KE-7 Peak 3

<< Target >>

Line#:3 R.Time:67.758(Scan#:8132) MassPeaks:395

RawMode:Averaged 67.750-67.767(8131-8133) BasePeak:57.00(102468)

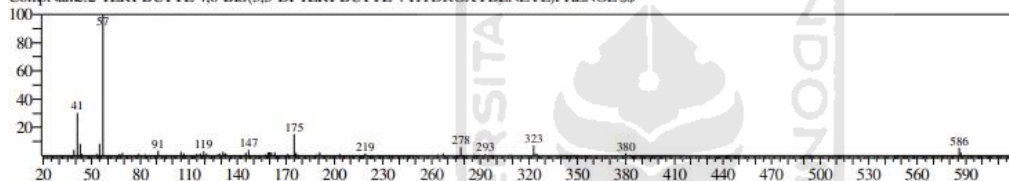
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:327785 Library:WILEY7.LIB

SE:66 Formula:C40 H58 O3 CAS:0-00-0 MolWeight:586 RetIndex:0

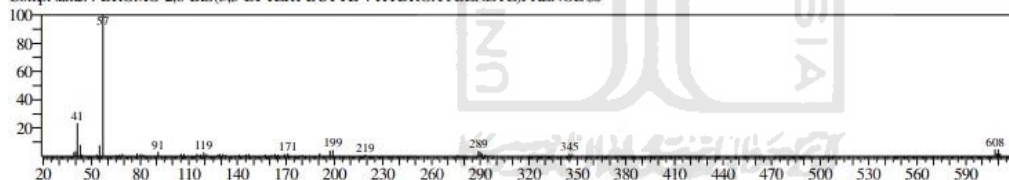
CompName:2-TERT-BUTYL-4,6-BIS(3,5-DI-TERT-BUTYL-4-HYDROXYBENZYL)PHENOL \$\$



Hit#:2 Entry:329613 Library:WILEY7.LIB

SE:66 Formula:C36 H49 BR O3 CAS:0-00-0 MolWeight:608 RetIndex:0

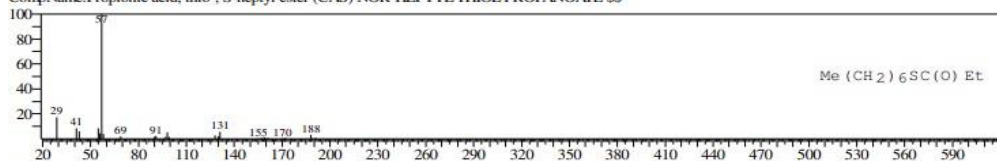
CompName:4-BROMO-2,6-BIS(3,5-DI-TERT-BUTYL-4-HYDROXYBENZYL)PHENOL \$\$



Hit#:3 Entry:81198 Library:WILEY7.LIB

SE:64 Formula:C10 H20 O S CAS:2432-45-3 MolWeight:188 RetIndex:0

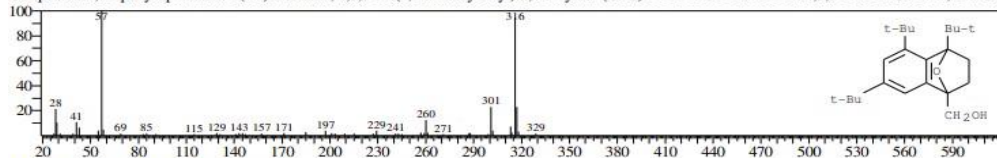
CompName:Propionic acid, thio-, S-heptyl ester (CAS) NOR-HEPTYL THIOL PROPANOATE \$\$



Hit#:4 Entry:249924 Library:WILEY7.LIB

SE:63 Formula:C23 H36 O2 CAS:56771-86-9 MolWeight:344 RetIndex:0

CompName:1,4-Epoxy naphthalene-1(2H)-methanol, 4,5,7-tris(1,1-dimethylethyl)-3,4-dihydro- (CAS) 1-HYDROXYMETHYL-4,5,7-TRI-T-BUTYL-1,4-EPOX



Hit#:5 Entry:329638 Library:WILEY7.LIB

SE:63 Formula:C38 H56 O6 CAS:0-00-0 MolWeight:608 RetIndex:0

CompName:BIS[3-(3,5-DI-TERT-BUTYL-4-HYDROXYPHENYL)PROPYL] MALEATE \$\$

