

STUDI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BEKATUL DAN SUSU SKIM
TERFERMENTASI BAKTERI ASAM LAKTAT PROBIOTIK
(*Lactobacillus plantarum* J2 DAN *Lactobacillus casei*).

*Study on Antioxidant Activity of Fermented Rice Bran and Skim Milk
by Probiotic Lactic Acid Bacteria
(Lactobacillus plantarum J2 and Lactobacillus casei)*

Elok Zubaidah*, Nawa Aldina, dan Fithri Choirun Nisa
Jurusan Teknologi Hasil Pertanian – Fak. Teknologi Pertanian – Universitas Brawijaya
Jl. Veteran – Malang

*Penulis korespondensi: email elzoeba@yahoo.com

ABSTRACT

Rice bran is a by product from rice milling that contains more than 20% of dietary fiber, mostly composed of insoluble fibers. Rice bran also contains antioxidants in high level such as tocopherol, tocotrienol, oryzanol and phenolic. More than 1% of these phenolic antioxidants are covalent bounded with insoluble fibers in rice bran that lowers the bioavailability of phenolic. To increase the bioavailability of phenolic antioxidants, microorganisms such as LAB (probiotic) that can produce enzyme to degrade fibers are used. In this research skimmed milk is also used to compare the antioxidant activity in milk based and rice bran based probiotic products.

*Randomized Block Design was used with 2 factors, type of substrats in 2 level (rice bran and skimmed milk) and type of isolates in 2 level (*L. plantarum* J2 and *L. casei*). The resulted data then were analyzed using ANOVA ($\alpha=5\%$) and differential test BNT ($\alpha=5\%$).*

*The results of this experiment showed that indigenous probiotic isolate *L. plantarum* J2 was more effective to increase the antioxidant activity compared to *L. casei* in fermented rice bran. It was because *L. plantarum* J2 could degrade fibers and increase bioavailability of phenolic antioksidant within 12 hours fermentation. The best treatment was fermented rice bran media with indigenous isolate *L. plantarum* J2. The best treatment had caharacteristics as followed: LAB total amount of $3.68.10^{11}$ cfu/ml, total acid of 1.053%, pH of 3.93, insoluble fiber content of 1.20%, total of phenolic cintent of 52.07 ppm, and antioxidant activity of 88.86%.*

Keywords: indigenous LAB isolate, rice bran, total phenolic, antioxidant activity

PENDAHULUAN

Saat ini di luar negeri telah dikembangkan produk baru berupa pangan probiotik berbasis sereal. Menurut Charalampopoulos *et al.* (2002) aplikasi sereal dalam hal fermentasi sebagai pangan fungsional adalah untuk pertumbuhan bakteri probiotik khususnya *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium*. Sereal digunakan sebagai sumber serat pangan untuk memperoleh efek menguntungkan (prebiotik).

Bekatul merupakan salah satu hasil samping proses penggilingan padi yang mengandung lebih dari 20% serat pangan dan sebagian besar diantaranya tidak dapat larut (Anonymous, 2002). Selain itu bekatul mengandung antioksidan dalam jumlah besar seperti tokoferol, tokotrienol, *oryzanol* dan fenolik. Senyawa fenolik memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Lebih dari 1% antioksidan fenolik berikatan kovalen dengan serat tidak larut sehingga bioavailabilitasnya rendah. Miller *et al.*

(2000) menambahkan antioksidan fenolik sulit untuk diekstrak karena banyak ikatan kovalen pada serat tidak larut bekatul yang hanya dapat dihidrolisis oleh enzim mikrobial. Guna meningkatkan bioavailabilitas antioksidan fenolik yang terikat pada serat tidak larut diperlukan mikroorganisme yang memiliki enzim untuk mendegradasi serat, diantaranya adalah bakteri asam laktat (probiotik).

Aplikasi bakteri asam laktat probiotik indigenus dan komersial pada medium bekatul diduga akan meningkatkan bioavailabilitas antioksidan fenolik. Pada penelitian ini juga digunakan medium susu skim untuk membandingkan aktivitas antioksidan produk probiotik berbasis susu dan sereal.

Penelitian bertujuan untuk adalah mempelajari pengaruh media fermentasi bekatul dan media fermentasi susu skim terhadap bioavailabilitas antioksidan serta mempelajari kemampuan isolat probiotik indigenus *Lactobacillus plantarum* J2 dan isolat probiotik komersial *Lactobacillus casei* dalam memfermentasi bekatul dan susu skim yang efektif meningkatkan bioavailabilitas antioksidan.

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan adalah inkubator, *laminar air flow*, kulkas, pH-meter, spektrofotometer, dan sentrifusa. Bahan-bahan yang digunakan adalah *Lactobacillus plantarum* J2, *Lactobacillus casei*, bekatul, susu skim, MRS Broth dan MRS Agar merk Oxoid, pepton, alkohol 70%, akuades, spiritus, *1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl* (DPPH), etanol 95%, serta buffer pH 4 dan pH 7.

Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok Faktorial dengan 2 faktor, dimana masing-masing faktor terdiri dari 2 level dengan 3 kali ulangan.

Faktor I: Jenis substrat yaitu: bekatul beras dan susu skim

Faktor II: Jenis isolat probiotik yaitu *L. plantarum* J2 dan *L. casei*

Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis dengan analisis varians (ANOVA) dengan selang kepercayaan 5% dan uji beda digunakan uji beda BNT dengan selang kepercayaan 5%. Pemilihan perlakuan terbaik dilakukan dengan metode rangking (Tabucanon, 1988).

Pembuatan Media Fermentasi

Bekatul dan susu skim masing-masing sebanyak 16 g ditambahkan akuades 100 ml. Kemudian dilakukan pemanasan pada suhu 85°C selama 10 menit sambil diaduk untuk homogenisasi larutan. Setelah larutan benar-benar homogen, dilakukan sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan pendinginan dalam ruang aseptis hingga suhu 37°C yaitu suhu pertumbuhan optimal isolat probiotik. Setelah mencapai suhu optimal, dilakukan inokulasi isolat probiotik 2% (v/v) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 12 jam.

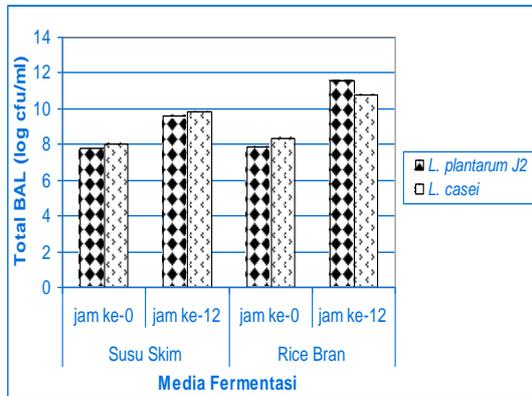
HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis yang dilakukan pada media fermentasi bekatul dan susu skim yaitu analisis total BAL, total asam, analisis pH, serat kasar, total fenol dan aktivitas antioksidan. Media fermentasi (jenis substrat) memberikan pengaruh yang nyata terhadap total asam, pH, serat kasar, total fenol dan aktivitas antioksidan ($\alpha=0,05$). Jenis isolat tidak memberikan pengaruh nyata terhadap total asam, pH, serat kasar, total fenol dan aktivitas antioksidan ($\alpha=0,05$).

Total Bakteri Asam Laktat (BAL)

Rerata total BAL pada media fermentasi bekatul dan susu skim jam ke-0 berkisar $5,99.10^7$ - $2,01.10^8$ cfu/ml dan

pada jam ke-12 mengalami peningkatan menjadi berkisar $3,97.10^9$ - $3,68.10^{11}$ cfu/ml. Pengaruh media fermentasi terhadap pertumbuhan isolat bakteri asam laktat probiotik dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Pengaruh media fermentasi terhadap pertumbuhan isolat BAL probiotik

Total BAL pada media fermentasi *rice bran* lebih tinggi daripada media fermentasi susu skim. Hal ini diduga karena komponen nutrisi yang lebih lengkap pada bekatul dibandingkan susu skim. Selama fermentasi bakteri asam laktat akan memanfaatkan nutrisi seperti karbohidrat, protein dan serat pangan pada bekatul sebagai sumber energi untuk pertumbuhan, pembentukan sel dan biosintesa produk-produk metabolit. Ketersediaan komponen makronutrisi seperti protein, gula dan karbohidrat pada bekatul telah mencukupi kebutuhan nutrisi bagi pertumbuhan BAL sehingga kadar komponen makronutrisi yang tinggi pada susu skim tidak memberikan pengaruh terhadap laju pertumbuhan BAL. Selain itu, unsur mikronutrisi pada bekatul yang meliputi vitamin dan mineral sudah tergolong lengkap.

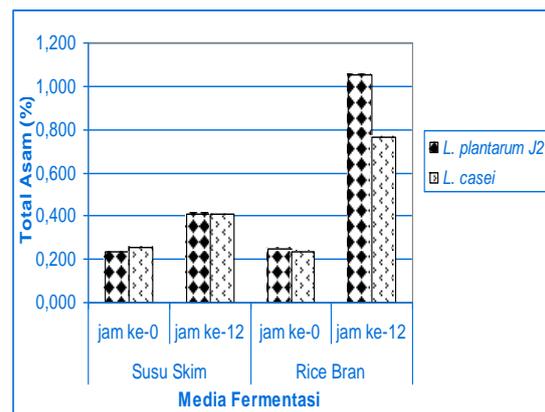
Pada media fermentasi bekatul dan susu skim total *L. plantarum J2* lebih tinggi daripada *L. casei*. Hal ini disebabkan pada media fermentasi bekatul merupakan habitat alami dari *L. plantarum J2*, sehingga diduga ada

kecocokan dan kesesuaian nutrisi pada substrat sebagai sumber energi mikrob.

Selain itu diduga isolat ini memiliki enzim-enzim yang lebih lengkap dan lebih spesifik untuk memetabolisme nutrisi yang ada pada bekatul. *L. plantarum J2* juga memiliki kemampuan yang lebih baik dalam menggunakan nutrisi yang terdapat pada media susu skim. Meskipun media susu skim merupakan habitat alami dari *L. casei*, diduga komponen makronutrisi susu skim lebih banyak terdapat dalam bentuk kompleks dan *L. plantarum J2* memiliki enzim yang lebih lengkap untuk memetabolisme substrat pada susu skim dibanding *L. casei*.

Total Asam

Rerata total asam pada media fermentasi bekatul dan susu skim jam ke-0 berkisar 0,2340-0,2516% dan pada jam ke-12 mengalami peningkatan menjadi berkisar 0,4065-1,053%. Pada gambar juga menunjukkan nilai total asam pada media fermentasi bekatul jam ke-12 lebih tinggi daripada media fermentasi susu skim. Pengaruh media fermentasi terhadap total asam dapat dilihat pada Gambar 2.



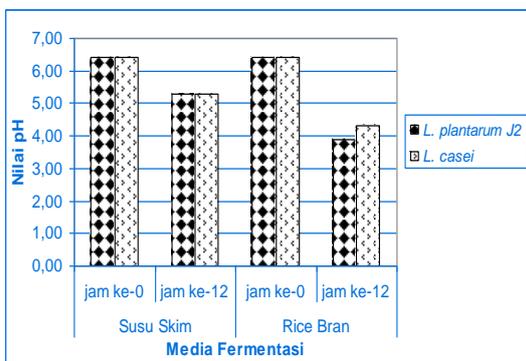
Gambar 2. Pengaruh media fermentasi terhadap total asam

Nilai total asam pada media fermentasi bekatul lebih tinggi daripada media fermentasi susu skim. Hal ini sejalan dengan analisis total BAL yang menyebutkan bahwa media fermentasi

bekatul memiliki nilai total BAL tertinggi dimana aktivitas BAL yang tinggi akan menghasilkan asam organik yang tinggi sebagai hasil proses fermentasi.

Derajat Keasaman (pH)

Rerata nilai pH pada media fermentasi bekatul dan susu skim jam ke-0 berkisar 6,40-6,43, dan pada jam ke-12 mengalami penurunan menjadi berkisar 3,93-5,30. Pengaruh media fermentasi terhadap nilai pH dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Pengaruh media fermentasi terhadap nilai pH

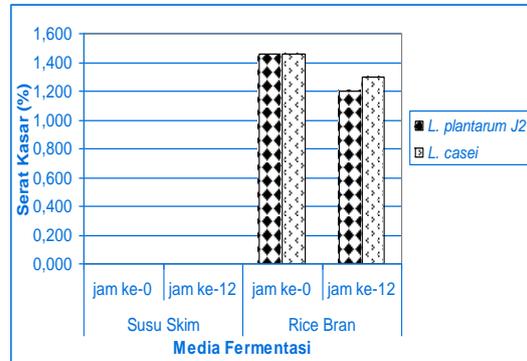
Nilai pH pada media fermentasi bekatul lebih rendah daripada media fermentasi susu skim. Penurunan pH pada media fermentasi bekatul sejalan dengan hasil analisis total BAL dan total asam sehingga dapat dikatakan bahwa aktivitas BAL dalam menghasilkan asam organik, lebih tinggi pada media fermentasi bekatul daripada susu skim yang juga menentukan nilai pH.

Selama proses fermentasi terjadi penurunan derajat keasaman karena akumulasi asam-asam organik yang dihasilkan akibat metabolisme mikrobia pada media fermentasi, diantaranya asam laktat yang menyebabkan terjadinya penurunan pH. Nilai pH media fermentasi juga ditentukan oleh sifat dan karakteristik dari asam organik yang dihasilkan oleh BAL

Serat Kasar

Rerata kadar serat kasar pada media fermentasi bekatul jam ke-0 yaitu

1,46-1,46% dan pada jam ke-12 mengalami penurunan menjadi 1,20-1,30%. Pada media fermentasi susu skim kadar serat kasarnya yaitu nol. Pengaruh media fermentasi terhadap serat kasar dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Pengaruh media fermentasi terhadap serat kasar

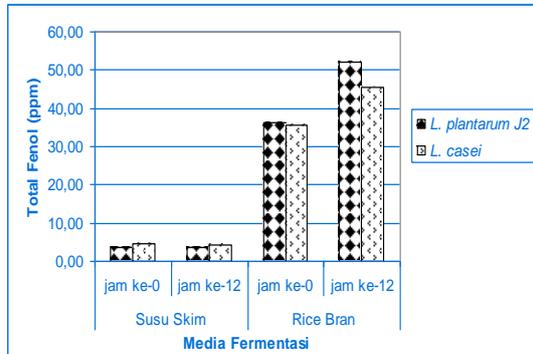
Pada media fermentasi bekatul kadar serat kasar pada jam ke-0 hingga jam ke-12 mengalami penurunan. Hasil analisis ini sejalan dengan analisis total BAL, dimana semakin tinggi total BAL semakin banyak BAL yang memanfaatkan serat untuk metabolisme sel, serat kasar tersebut dihidrolisis menjadi senyawa sederhana selanjutnya difermentasi oleh BAL melalui glikolisis menjadi asam piruvat dan akhirnya menghasilkan asam lemak rantai pendek. Sedangkan pada media fermentasi susu skim diduga tidak mengandung serat pangan karena umumnya serat pangan lebih banyak terdapat pada tanaman.

Media bekatul terfermentasi *L. plantarum J2* kadar serat kasar pada jam ke-12 lebih rendah daripada media *rice bran* terfermentasi *L. casei*. Hal ini diduga karena aktivitas yang tinggi dari *L. plantarum J2* dalam memanfaatkan serat pada *rice bran* dan kesesuaian media tumbuh bagi *L. plantarum J2* yang merupakan habitat alami bekatul (BAL indigenus).

Total Fenol

Rerata total fenol pada media fermentasi bekatul dan susu skim jam ke-

0 berkisar 3,67–36,32 ppm dan pada jam ke-12 menjadi berkisar 3,72–52,07 ppm. Gambar 5 menunjukkan total fenol pada media fermentasi bekatul jam ke-12 lebih tinggi daripada media fermentasi susu skim.



Gambar 5. Pengaruh media fermentasi terhadap total fenol

Total fenol pada media fermentasi bekatul lebih tinggi daripada media fermentasi susu skim. Pada media fermentasi bekatul total fenol pada jam ke-0 hingga jam ke-12 mengalami peningkatan sedangkan pada media fermentasi susu skim tidak mengalami perubahan yang signifikan.

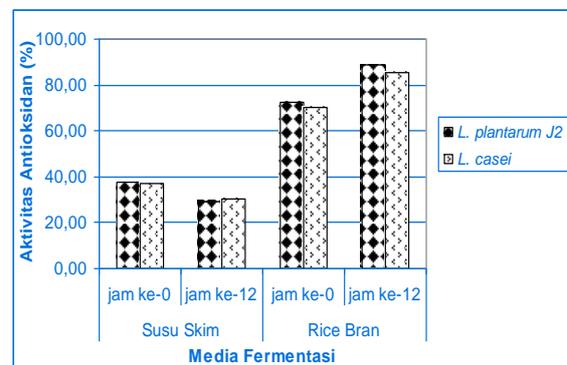
Pada media fermentasi bekatul tingginya total fenol yang terdeteksi diduga disebabkan tingginya kandungan senyawa fenolik pada bekatul yaitu tokoferol, tokotrienol, gama orizanol, beta sitosteril ferulat, senyawa fenolik yang berikatan dengan serat tidak larut (Baublis, 2000). Selama fermentasi terjadi peningkatan total fenol pada media fermentasi bekatul yang sejalan dengan analisis serat kasar, dimana semakin rendah 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 bioavailabilitasnya meningkat. Miller *et al.* (2000) menyatakan sereal atau tepung *bran* mengandung lebih dari 1% senyawa fenolik yang berikatan kovalen dengan serat tidak larutnya,

dalam hal ini peran mikrobial menjadi sangat penting guna meningkatkan bioavailabilitas senyawa fenolik bekatul.

Aktivitas Antioksidan

Rerata aktivitas antioksidan pada media fermentasi bekatul dan susu skim jam ke-0 berkisar 25,57–72,71% dan pada jam ke-12 menjadi berkisar 30,13–88,86%. Gambar 6 menunjukkan aktivitas antioksidan pada media fermentasi *rice bran* jam ke-12 lebih tinggi daripada media fermentasi susu skim.



Gambar 6. Pengaruh media fermentasi terhadap aktivitas antioksidan

Aktivitas antioksidan pada media fermentasi bekatul lebih tinggi daripada media fermentasi susu skim. Pada media fermentasi bekatul jam ke-0 hingga jam ke-12 mengalami peningkatan dan pada media fermentasi susu skim jam ke-0 hingga jam ke-12 mengalami penurunan.

Aktivitas antioksidan pada media fermentasi bekatul sejalan dengan analisis total fenol yaitu semakin tinggi total fenol yang dilepaskan semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Pada jam ke-0 diduga komponen yang terdeteksi memiliki aktivitas antioksidan meliputi tokoferol, tokotrienol, orizanol, beta karoten, protein bekatul yang memiliki gugus sulfhidril (sistin), asam amino seperti asam aspartat dan asam glutamat serta senyawa fenol yang masih terikat pada serat tidak larut namun aktivitas antioksidannya rendah.

Baublis (2000) menentukan kemampuan serat tidak larut pada serat

serealiala dan *bran* dalam menghambat oksidasi lemak. Serat tidak larut yang diekstrak dari serat serealiala dan *bran* tidak signifikan menghambat oksidasi lemak.

Pada jam ke-12 terjadi peningkatan aktivitas antioksidan pada media fermentasi bekatrul yang diduga disebabkan adanya senyawa fenol yang terbebaskan akibat hidrolisis serat oleh bakteri asam laktat selama fermentasi sehingga aktivitas antioksidan fenolik meningkat. Baublis (2000) menjelaskan, asam ferulat bebas (senyawa fenolik) memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi setelah dihidrolisis oleh enzim mikrobia dari polisakarida yang mengikatnya, senyawa fenolik serealiala sebesar 74 µg (0,2% dari fenolik terekstrak) memiliki aktivitas antioksidan dengan menghambat oksidasi lemak sampai 90%.

Pada media fermentasi susu skim, komponen yang berpotensi sebagai antioksidan adalah vitamin A, E, asam amino dan protein yang memiliki gugus sulfhidril. Media fermentasi susu skim mengalami penurunan aktivitas antioksidan. Hal ini diduga antioksidan yang ada pada media fermentasi susu skim telah teroksidasi karena selama inkubasi masih terdapat oksigen di lingkungan fermentasi. Asam-asam organik yang dihasilkan selama fermentasi tergolong rendah (pH setelah fermentasi 5,30) sehingga kemampuan asam organik dalam meregenerasi dan

menstabilkan vitamin E (antioksidan primer) juga rendah.

Peningkatan aktivitas antioksidan tertinggi ditunjukkan oleh *L. plantarum* J2 pada media fermentasi bekatrul. Hasil analisis ini sejalan dengan analisis total fenol, yaitu semakin tinggi total fenol yang dibebaskan semakin tinggi aktivitas antioksidan yang dihasilkan. Media fermentasi susu skim mengalami penurunan aktivitas antioksidan terendah ditunjukkan oleh *L. plantarum* J2. Hasil analisis ini sejalan dengan analisis total fenol yang menunjukkan bahwa total fenol terendah dihasilkan oleh *L. plantarum* J2.

Aktivitas antioksidan pada media fermentasi berhubungan dengan total fenol, yaitu semakin tinggi total fenol maka aktivitas antioksidannya juga semakin tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan pada media fermentasi bekatrul dan susu skim yang paling dominan berpengaruh adalah senyawa fenol yang terkandung pada media fermentasi.

Perlakuan Terbaik

Pemilihan perlakuan terbaik dilakukan dengan metode ranking (Tabucanon, 1998) yang berdasarkan parameter pengujian total bakteri asam laktat, total asam, pengukuaran pH, serat kasar, total fenol dan aktivitas antioksidan (Tabel 1 dan 2).

Tabel 1. Hasil analisis media bekatrul dan susu skim terfermentasi BAL indigenus dan komersial pada jam ke-12

Perlakuan	Total BAL (cfu/ml)	Total Asam (%)	pH	Serat Kasar (%)	Total Fenol (ppm)	Antioksidan (%)
<i>Rice Bran</i>						
<i>L. plantarum</i> J2	3,68.10 ¹¹	1,05	3,93	1,20	52,07	88,86
<i>L. casei</i>	6,17.10 ¹⁰	0,76	4,30	1,29	45,54	85,41
<i>Susu Skim</i>						
<i>L. plantarum</i> J2	3,97.10 ⁹	0,41	5,27	0,00	3,67	29,19
<i>L. casei</i>	6,37.10 ⁹	0,41	5,30	0,00	4,43	30,13

Tabel 2. Pemilihan perlakuan terbaik

Rangking	Parameter					
	Total BAL	Total Asam	pH	Serat Kasar	Total Fenol	Antioksidan
1	RP	RP	RP	RP	RP	RP
2	RC	RC	RC	RC	RC	RC
3	SP	SP	SP	SP	SP	SC
4	SC	SC	SC	SC	SC	SP

Tabel 2 menunjukkan bahwa bekatul terfermentasi *Lactobacillus plantarum* J2 merupakan perlakuan terbaik. Hal ini dikarenakan perlakuan RP menempati posisi rangking pertama paling banyak sehingga dapat disimpulkan bahwa perlakuan RP merupakan perlakuan terbaik berdasarkan 6 parameter yaitu total BAL, total asam, pH, kadar serat kasar, total fenol, dan aktivitas antioksidan.

KESIMPULAN

Aktivitas antioksidan pada media fermentasi bekatul lebih tinggi daripada media fermentasi susu skim. Pada media fermentasi susu skim aktivitas antioksidan mengalami penurunan akibat fermentasi. Isolat probiotik indigenus *L. plantarum* J2 lebih efektif meningkatkan aktivitas antioksidan daripada *L. casei* pada media fermentasi bekatul. Hal ini disebabkan *L. plantarum* J2 dapat meningkatkan bioavailabilitas antioksidan fenolik dengan mendegradasi serat dalam waktu 12 jam fermentasi.

Perlakuan terbaik yang diperoleh yaitu perlakuan jenis media bekatul yang difermentasi isolat indigenus *Lactobacillus plantarum* J2. Hasil perlakuan terbaik memiliki nilai total BAL

sebesar $3,68.10^{11}$ cfu/ml, total asam sebesar 1,053%, pH sebesar 3,93, serat kasar sebesar 1,20%, total fenol 52,07 ppm, dan aktivitas antioksidan sebesar 88,86%.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 2002. Stabilized Rice Bran as a Nutraceutical Food. <http://www.shop.net/innovation.htm>. Tanggal akses 5 Desember 2007
- Baublis, A.J. 2000. Potential of Wheat-Based breakfast Cereals as Source of Dietary Antioxidants. The American College of Nutrition. Massachusetts
- Charalampopoulos, D., S.S. Pandiella and C. Webb. 2002. Growth studies of potentially probiotik lactic acid bacteria in cereal-based substrates. Journal of Applied Microbiology: 851-859
- Miller, T. L. and J. M. Wolin. 2000. Pathway of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. Applied and Environmental Microbiology Journal: 1589-1592
- Tabucanon, M. 1988. Multiple Criteria Decision Making in Industry. Elsevier Science Publisher, New York