

Uji dan identifikasi aktivitas antioksidan isolat BAL CIN-2 hasil isolasi cinalok

Ihdina Isfara Suteja, Wijanarka Wijanarka, dan Endang Kusdiyantini*

Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro

Jl. Prof. Soedarto, SH. Tembalang-Semarang – 50275, Indonesia

*Email: ekusdiyantini@gmail.com

Abstrak: Penelitian ini bertujuan untuk menguji antioksidan yang dihasilkan oleh isolat BAL CIN-2 dengan metode (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) (DPPH) dan fosfomolibdenum, melakukan identifikasi senyawa antioksidan yang dihasilkan isolat BAL CIN-2 menggunakan metode TLC (*Thin Layer Chromatography*) dan spektrofotometer UV-Vis, serta menganalisis gugus fungsional antioksidan isolat BAL CIN-2 menggunakan metode *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR). Kultur ditumbuhkan pada media MRSA dan diamati pertumbuhannya pada media MRSB selama 72 jam, selanjutnya dianalisis dengan metode yang telah ditentukan. Hasil uji TLC untuk isolat BAL CIN-2 menghasilkan empat noda dengan nilai Rf 0,98; 0,91; 0,73; dan 0,6. Uji DPPH menunjukkan sifat antioksidan supernatan isolat BAL CIN-2 sangat lemah. Metode fosfomolibdenum menunjukkan kadar antioksidan dari supernatan isolat BAL CIN-2 sebesar 1,906 mgAAE/ml. Pengujian menggunakan spektrofotometer UV-Vis menghasilkan 4 serapan gelombang dengan absorbansi maksimum 3,943 pada panjang gelombang 290 nm. Diduga senyawa yang terkandung di dalamnya adalah senyawa flavonoid golongan flavanon atau dihidroflavonol. Supernatan isolat BAL CIN-2 diduga mengandung senyawa flavonoid dengan gugus fungsi antioksidan O-H dan C=C aromatik dari analisis menggunakan FTIR. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa di dalam supernatan isolat BAL CIN-2 mengandung senyawa antioksidan golongan flavonoid.

Kata kunci: TLC, DPPH, metode fosfomolibdenum, spektrofotometer UV-Vis, FTIR

Test and identification of antioxidant activity of isolates LAB CIN-2 isolated from cinalok

Abstract: This study aimed to test the antioxidants produced by LAB CIN-2 isolates using α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) and phosphomolybdenum methods, to identify antioxidant compounds produced by LAB CIN-2 isolates using the Thin Layer Chromatography (TLC) and UV-Vis spectrophotometer, as well as to analyse the antioxidant functional groups of LAB CIN-2 isolate using the Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) method. The culture was grown on MRSA media and then the growth was observed on MRSB media for 72 hours, then analyzed using the specified method. TLC test results showed that LAB isolate CIN-2 produced four spots with an Rf value of 0.98; 0.91; 0.73; and 0.6. The DPPH test showed that the antioxidant properties of the supernatant isolates of LAB CIN-2 were very weak. The phosphomolybdenum method showed that the antioxidant content of the supernatant of LAB CIN-2 isolate was 1.906 mgAAE/ml. Analysis using a UV-Vis spectrophotometer produces 4 absorption waves with a maximum absorbance 3,943 at a wavelength of 290 nm. The test is suspected that the compounds contained in it are flavonoid compounds of the flavanone or dihydroflavonol group. Analysis using FTIR showed that antioxidant from supernatant of LAB isolate CIN-2 was suspected to contain flavonoid compounds with aromatic O-H and C=C functional groups. It can be concluded that supernatant from LAB CIN-2 isolates contains weak antioxidants in the form of compounds from the flavonoids group.

Keywords: TLC, DPPH, phosphomolybdenum methods, spektrofotometer UV-Vis, FTIR

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang mempunyai banyak makanan tradisional. Hampir di semua daerah mempunyai makanan khas masing-masing. Cincalok merupakan salah satu makanan tradisional dari Pontianak, Kalimantan Barat. Makanan ini berasal dari fermentasi udang rebon. Bakteri yang berperan dalam proses fermentasi cincalok ini adalah Bakteri Asam Laktat (BAL). Nofiani dan Ardiningsih (2018) menjelaskan bahwa cincalok merupakan makanan yang berasal dari udang yang difermentasi. Bahan-bahan yang dibutuhkan untuk membuat makanan ini terdiri atas udang kecil, garam, dan gula pasir yang kemudian diinkubasi di dalam wadah tertutup selama 3-7 hari. Cincalok adalah lauk tradisional khas dari Kalimantan Barat, Indonesia. Makanan ini disebut ronto di Kalimantan Selatan

BAL merupakan bakteri yang mempunyai peran dalam fermentasi bahan makanan. BAL tergolong dalam bakteri gram positif. BAL merupakan mikroorganisme yang memiliki manfaat sebagai starter dalam pengolahan pangan fungsional (Aritonang, Roza, Rossi, Purwati, & Husmaini, 2017). Bakteri ini tidak bersifat toksik terhadap inang serta memiliki kemampuan membunuh bakteri patogen. Penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa BAL dapat digunakan untuk pembuatan makanan fermentasi, memiliki efek probiotik, dan digunakan sebagai pengawet makanan.

BAL mengandung antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas. Bakteri ini dapat diisolasi dari makanan fermentasi seperti yoghurt, inasua, dan cincalok. Manguntungi *et al.* (2020) menyatakan bahwa enzim antioksidan yang dihasilkan BAL, yaitu superoksida dismutase dan glutathione peroksidase yang diisolasi dari makanan fermentasi mempunyai peran penting dalam membasmi dan menangkal radikal bebas.

Uji antioksidan adalah uji yang dilakukan untuk mendeteksi senyawa antioksidan pada suatu sampel. Antioksidan adalah sifat dari suatu senyawa yang dapat melawan radikal bebas. Antioksidan dapat ditemukan pada buah, sayur, dan beberapa makanan olahan. Contoh senyawa yang mengandung antioksidan diantaranya adalah likopen, betakaroten, polifenol, dan katekin. Antioksidan merupakan molekul yang dapat memperlambat, menghambat, atau mencegah proses oksidasi, menghilangkan radikal bebas dan mengurangi stres oksidatif (Amaral *et al.*, 2020). Bisson (2001) menjelaskan bahwa BAL memproduksi asam organik dan senyawa fenol. Apabila kadar asam laktat yang dihasilkan dari proses fermentasi terus meningkat, maka aktivitas antioksidan juga akan meningkat. Bakteri juga menghasilkan metabolit sekunder saat terjadinya metabolisme, dimana hal tersebut dapat meningkatkan aktivitas antioksidan.

Isolat BAL CIN-2 merupakan isolat hasil isolasi dari cincalok (Pribadhi, Kusdiyantini, & Ferniah, 2021). Isolat ini belum diuji antioksidannya, untuk itu penelitian ini bertujuan untuk menguji antioksidan yang dihasilkan oleh isolat BAL CIN-2 dengan metode (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) dan fosfomolibdenum, melakukan identifikasi senyawa antioksidan yang dihasilkan isolat BAL CIN-2 menggunakan metode *Thin Layer Chromatography* (TLC) dan spektrofotometer UV-Vis, serta menganalisis gugus fungsional antioksidan isolat BAL CIN-2 menggunakan metode *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR)

METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika serta Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro Semarang selama bulan Januari sampai dengan bulan Juni 2021.

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian diantaranya media MRSB, bubuk agar, isolat hasil fermentasi cinalok CIN-2, alkohol 70%, metanol, vitamin C, vitamin E, n-butanol, asam asetat, asam sulfat, natrium fosfat, amonium molibdat, akuades, serbuk DPPH, spiritus, plat silika gel F₂₅₄, kalsium karbonat (CaCO₃) 0,75%.

Bakteri ditumbuhkan pada media MRSA yang telah ditambahkan CaCO₃ 0,75%. Kemudian bakteri diambil dari *culture stock* menggunakan ose bulat dan inokulasikan dengan metode streak, inokulasi dilakukan secara aseptis. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati secara mikroskopik maupun makroskopik.

Pertumbuhan isolat BAL CIN-2 dapat diamati dengan membuat kurva pertumbuhan. Langkah-langkah pembuatan kurva pertumbuhan diawali dengan memasukkan sebanyak 5% (2,5 mL) dari starter kemudian diinokulasikan pada 47,5 mL media MRSB dalam erlenmeyer, kemudian diinkubasi pada inkubator shaker. Langkah selanjutnya yaitu dengan melakukan perhitungan nilai OD dan jumlah koloni setiap 6 jam sekali selama 72 jam. Perhitungan nilai OD dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 660 nm.

Tahapan uji antioksidan dimulai dengan mencampurkan serbuk DPPH sebanyak 0,0197 g ke dalam 100 mL methanol (0,05 mM). Selanjutnya dilakukan pembuatan larutan uji dengan cara melarutkan sebanyak 0,2 mL sampel dengan konsentrasi 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 (% (v/v)) dengan 3,8 mL larutan DPPH. Larutan kontrol menggunakan 4 mL larutan DPPH tanpa sampel. Vitamin C dan vitamin E (2, 4, 6, dan 8 ppm) sebagai pembanding diberi perlakuan yang sama dengan sampel. Selanjutnya, diaduk dan disimpan dalam botol kaca gelap selama 1 jam dengan suhu ruang. Larutan uji, larutan kontrol, dan larutan pembanding masing-masing diukur absorbansinya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 515 nm. Hasil absorbansi kemudian diukur % hambatannya menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ hambatan} = \left\{ \frac{A \text{ blanko} - A \text{ sampel}}{A \text{ blanko}} \right\} \times 100\%$$

Langkah selanjutnya yaitu dari hasil % hambatan masing-masing larutan dibuat kurva persamaan linier sehingga akan didapat nilai IC₅₀ dari masing-masing larutan. Uji antioksidan menggunakan metode DPPH dilakukan dengan mencampurkan sampel dan larutan DPPH dalam botol kaca gelap dan dibiarkan selama 2 jam pada suhu kamar (Monowar *et al.*, 2020).

Metode fosfomolibdenum dilakukan dengan membuat reagen terlebih dahulu, yaitu dengan mencampurkan 3,0 mL asam sulfat ditambahkan 0,199 gram natrium fosfat dan 0,247 gram amonium molibdat. Ketiganya dilarutkan dalam *aquadest* hingga volume tepat 50,0 mL (Prieto, Pineda, & Aguilar, 1999). Sampel cair BAL CIN-2 diambil sebanyak 0,3 mL kemudian dimasukkan ke dalam 3 mL reagen dan diinkubasi pada suhu 95°C selama 90 menit. Kontrol yang digunakan yaitu reagen sebanyak 3 mL tanpa sampel. Vitamin C (2, 4, 6, dan 8 ppm) digunakan sebagai pembanding dengan perlakuan yang sama. Selanjutnya, diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer *visible* dengan panjang gelombang 695 nm. Vitamin C yang digunakan sebagai pembanding dibuat kurva persamaan liniernya, kemudian absorbansi sampel dimasukkan ke dalam persamaan tersebut. Total kandungan antioksidan dinyatakan sebagai jumlah ml setara asam askorbat.

Identifikasi TLC menggunakan fase diam dan fase gerak. Fase diam menggunakan plat silika gel, sedangkan fase gerak menggunakan eluen (n butanol : asam asetat : aquadest = 4 : 1 : 1). Kemudian eluen dituang ke dalam chamber. Plat silika gel disiapkan dan ditandai dengan garis; bagian bawah sekitar 1 cm dan bagian atas sekitar 0,5 cm. Plat silika gel dimasukkan ke dalam eluen dan ditunggu sampai basah (sampai mencapai batas). Setelah itu sampel yang telah

disiapkan ditotolkan ke plat dengan menggunakan pipa kapiler. Kemudian plat dimasukkan ke dalam *chamber* yang berisi eluen dalam keadaan miring sekitar 30°. Hasilnya ditunggu sampai terlihat elusi, kemudian diangkat dan diamati dengan sinar UV 254 dan 365 nm. Perlakuan yang sama juga dilakukan untuk vitamin C sebagai kontrol. Selanjutnya dihitung nilai Rf dengan rumus:

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh solute}}{\text{jarak yang ditempuh solvent}}$$

Kultur cair bakteri disentrifugasi dan diambil bagian supernatan, kemudian dimasukkan ke dalam cuvet spektrofotometer UV-Vis dan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 200-800 nm, kemudian ditunggu hasilnya.

Cairan sampel supernatan BAL CIN-2 yang diuji diteteskan pada satu bagian *window* KBr, kemudian satu bagian *window* KBr yang lain dipasangkan sehingga cairan merata pada permukaan *window*. *Window* KBr disiapkan pada *holder*, kemudian dilakukan proses pengujian.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi secara makroskopik isolat BAL CIN-2 dilakukan dengan mengamati koloni yang telah diremajakan. Culture stock bakteri CIN-2 diremajakan pada media MRSA dengan penambahan CaCO₃ 0,75% yang berfungsi untuk mengetahui adanya zona bening, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Zona bening yang terbentuk mengindikasikan bahwa bakteri tersebut merupakan BAL.

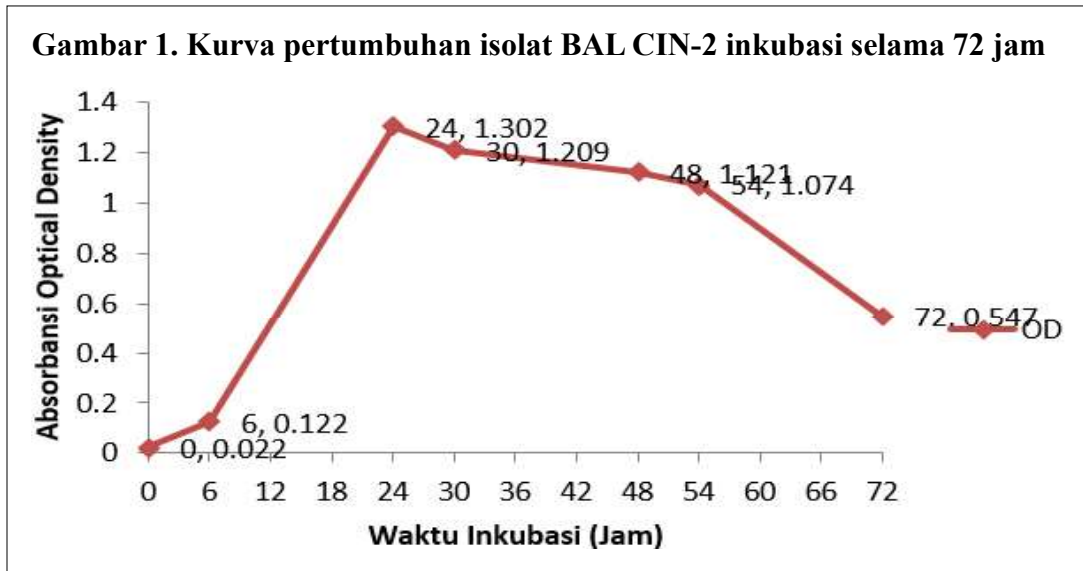
Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengamati bakteri secara mikroskopik. Pengamatan pada mikroskop dengan pewarnaan Gram akan menunjukkan morfologi sel bakteri serta bakteri tersebut termasuk bakteri Gram positif atau negatif. Wulandari dan Purwaningsih (2019) mengatakan karakterisasi mikroskopis bakteri dilakukan menggunakan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengidentifikasi morfologi bakteri dan sifat gramnya. Karakterisasi isolat BAL CIN-2 baik secara makroskopik maupun mikroskopik dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakterisasi isolat BAL CIN-2 (Pribadhi *et al.*, 2021)

| Bentuk Koloni | Warna Koloni | Elevasi | Tepian | Morfologi Sel | Gram |
|---------------|------------------|---------|--------|---------------|---------|
| Bulat | Putih kekuningan | Cembung | Rata | Batang | Positif |

Isolat BAL CIN-2 diamati pertumbuhannya setiap 6 jam sekali selama 72 jam dan diukur OD-nya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm, kemudian dibuat kurva pertumbuhannya (Gambar 1).

Gambar 1 menunjukkan bahwa bakteri mengalami fase pertumbuhan dimulai dari fase lag, eksponensial, stationer, dan fase kematian. Jam ke 0-6 bakteri mengalami fase lag, bakteri mengalami pertumbuhan yang lambat karena terjadi penyesuaian terhadap kondisi lingkungan. Jam ke 6-24 bakteri mengalami fase eksponensial, bakteri mengalami pertumbuhan yang sangat cepat. Jam ke 24-54 bakteri mengalami fase stationer, jumlah bakteri yang tumbuh dan yang mati hampir sama atau seimbang sehingga menghasilkan kurva yang cenderung konstan. Jam ke 54-72 bakteri mengalami fase kematian, bakteri perlahan mulai banyak yang mati karena nutrisi dalam media dan cadangan energi mulai menipis.



Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa pertumbuhan maksimum isolat BAL CIN-2 terjadi saat jam ke 24 pada awal fase stationer dengan OD 1,302. Pada fase tersebut dihasilkan produk metabolit sekunder sehingga untuk pengujian isolat BAL CIN-2 menggunakan sampel cair isolat BAL CIN-2 dengan fase pertumbuhan pada jam ke 24. Metabolit sekunder diproduksi selama fase pertumbuhan stationer (Thirumurugan, Cholarajan, Raja, & Vijayakumar, 2018).

Metode uji antioksidan yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode α , α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) pada sampel dengan konsentrasi 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 (% (v/v)). Vitamin C dan E dengan konsentrasi 2, 4, 6, dan 8 ppm digunakan sebagai pembanding atau kontrol positif. Senyawa DPPH merupakan radikal bebas yang stabil berwarna ungu, ketika direduksi oleh radikal akan berwarna kuning. Rahmayani, Pringgenies, dan Djunaedi (2013) menjelaskan bahwa reaksi antara senyawa antioksidan dengan radikal DPPH terjadi melalui mekanisme donasi atom hidrogen.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, sampel dari isolat BAL CIN-2 dengan konsentrasi 0,2% (v/v) mengalami perubahan warna dari ungu pekat menjadi ungu muda. Konsentrasi 0,4% (v/v) mengalami perubahan warna dari ungu pekat menjadi oranye. Konsentrasi 0,6% (v/v) dan 0,8% (v/v) mengalami perubahan warna dari ungu pekat menjadi kuning. Hal ini menandakan sampel bakteri CIN-2 mengandung senyawa antioksidan, dan semakin tinggi konsentrasi sampel maka warnanya akan menjadi semakin kuning, yang menunjukkan konsentrasi senyawa antioksidan yang terkandung juga semakin tinggi. Vitamin C dan E yang digunakan sebagai pembanding atau kontrol positif juga mengalami perubahan warna. Data absorbansi yang diperoleh kemudian dianalisis sehingga diperoleh nilai % hambatan dari sampel seperti yang terlihat pada Tabel 2.

Data pada Tabel 2 kemudian dibuat analisis regresi dengan nilai x berupa konsentrasi sampel dan nilai y berupa % hambatan sampel sehingga didapatkan persamaan linier yang dapat dilihat pada Tabel 3.

Hasil perhitungan % hambatan supernatan isolat BAL CIN-2 konsentrasi 0,2; 0,4; 0,6; 0,8(% v/v) yaitu 47; 64,1; 78,1; dan 85. Berdasarkan penelitian Sofiana *et al.* (2020)

Tabel 2. Nilai absorbansi dan % hambatan isolat BAL CIN-2, vitamin C dan E hasil Uji DPPH

| Sampel | Konsentrasi | Absorbansi (517 nm) | Hambatan (%) |
|-----------------------------|-------------|---------------------|--------------|
| Blanko | | 0,775 | |
| Supernatan Isolat BAL CIN-2 | 0,2% (v/v) | 0,411 | 47 |
| | 0,4% (v/v) | 0,278 | 64,1 |
| | 0,6% (v/v) | 0,17 | 78,1 |
| | 0,8% (v/v) | 0,117 | 85 |
| Vitamin C | 2 ppm | 0,754 | 2,7 |
| | 4 ppm | 0,632 | 18,5 |
| | 6 ppm | 0,527 | 32 |
| | 8 ppm | 0,507 | 34,6 |
| Vitamin E | 2 ppm | 0,615 | 20,6 |
| | 4 ppm | 0,548 | 29,3 |
| | 6 ppm | 0,530 | 31,6 |
| | 8 ppm | 0,527 | 32 |

Tabel 3. Nilai IC₅₀ supernatan isolat BAL CIN-2, vitamin C dan E

| Sampel | Persamaan Linier | Nilai IC ₅₀ |
|----------------------|----------------------|------------------------|
| Supernatan BAL CIN-2 | $y = 63,85x + 36,6$ | 0,209 % (v/v) |
| Vitamin C | $y = 5,46x - 5,35$ | 10,14 ppm |
| Vitamin E | $y = 1,825x + 19,25$ | 16,8 ppm |

perhitungan % hambatan BAL cincalok konsentrasi 50, 100, 200, 400, dan 800 (ppm) di antaranya yaitu 44,240; 36,646; 40,519; 45,463; 50,254 yang mempunyai nilai hampir sama dengan % hambatan supernatan isolat BAL CIN-2. BAL cincalok mempunyai nilai IC₅₀ 1782,08 ppm (Sofiana *et al.*, 2020). Berdasarkan Tabel 6 sampel dari isolate BAL CIN-2 termasuk dalam golongan antioksidan yang sangat lemah karena memiliki nilai IC₅₀ >200 ppm. Molyneux (2004) menyatakan bahwa sifat antioksidan vitamin C 10,14 ppm (sangat kuat) dan vitamin E 16,8 ppm (sangat kuat). Penelitian Aliyu, Abdullahi, dan Ugya (2017) menggunakan metode DPPH menyatakan bahwa nilai IC₅₀ vitamin C sebesar 13,89 µg/mL. Sedangkan Yassa, Masoomi, Rankouhi, & Hadjiakhoond. (2009) menyatakan bahwa nilai IC₅₀ vitamin E sebesar 22,72 µg/mL. Ini berarti aktivitas antioksidan dari vitamin C lebih kuat daripada vitamin E. Chalid dan Hartiningsih (2013) menjelaskan bahwa nilai IC₅₀ bakteri asam laktat hasil fermentasi dadih susu kerbau adalah 44,86 yang berarti memiliki kadar antioksidan yang sangat kuat.

Aktivitas antioksidan total supernatan isolat BAL CIN-2 diukur dengan metode fosfomolibdenum dengan standar asam askorbat (vitamin C). Asam askorbat digunakan karena mengandung senyawa antioksidan. Senyawa fosfomolibdenum akan terbentuk pada saat dilakukan pemanasan dengan suhu 95°C selama 90 menit. Aloanis dan Karundeng (2019) menjelaskan bahwa metode fosfomolibdenum adalah suatu pengukuran terhadap reduksi kompleks fosfat-Mo(VI) menjadi kompleks fosfat-Mo(V) pada keadaan pH asam. Kompleks fosfat-Mo(VI) yang

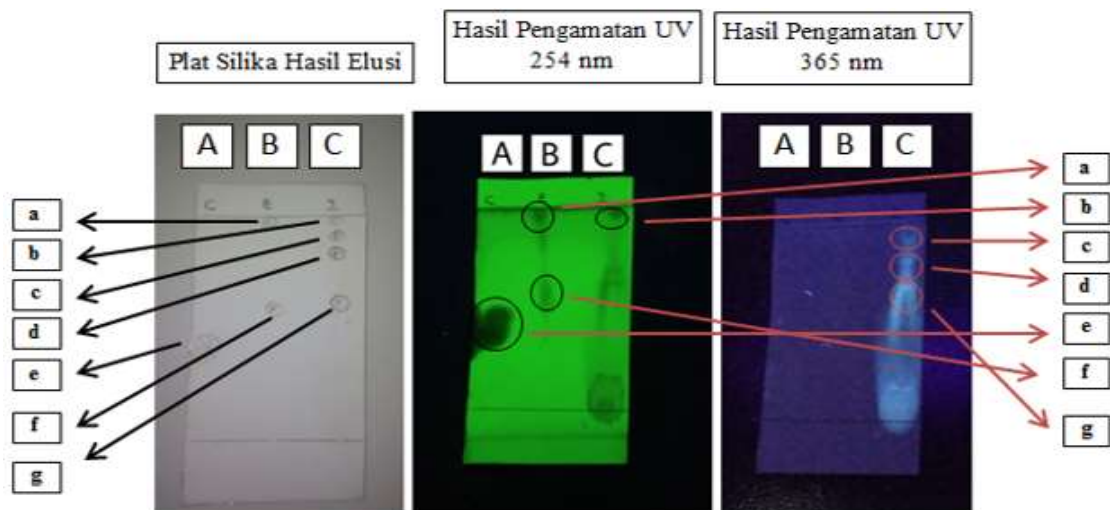
semula tidak berwarna akan berubah menjadi kompleks fosfat-Mo(V) berwarna biru, semakin pekat warna biru yang terbentuk menandakan semakin banyak kompleks fosfat-Mo(V) yang terbentuk sehingga semakin baik pula kemampuan antioksidan dari sampel tersebut.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, terjadi perubahan warna pada sampel vitamin C dari putih bening menjadi biru kehijauan dan supernatan isolat BAL CIN-2 dari putih keruh menjadi biru kehijauan, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 695 nm. Hasil absorbansi vitamin C dibuat kurva kalibrasi dan didapatkan persamaan regresi linier $y = 0,0745x + 0,255$ dengan $R^2 = 0,817$. Koefisien determinasi (R^2) dapat dikategorikan sebagai berkorelasi sangat kuat apabila mempunyai nilai $>0,75-0,99$ (Sarwono, 2006). Nilai aktivitas antioksidan total dihitung dengan mensubstitusi nilai y dengan absorbansi supernatan isolat BAL CIN-2 ke dalam persamaan. Nilai tersebut dinyatakan dalam mg equivalen asam askorbat/gram ekstrak (AAE). Kandungan vitamin C pada masing-masing konsentrasi dinyatakan equivalen asam askorbat atau *Ascorbic Acid Equivalent (AAE)*. AAE merupakan acuan yang umum digunakan untuk mengukur sejumlah vitamin C yang terkandung dalam suatu bahan. Hasil yang didapat yaitu 1,906 mgAAE/ml. Artinya, aktivitas antioksidan dari setiap 1 ml supernatan isolat BAL CIN-2 setara dengan 1,906 mg asam askorbat.

Pemisahan larutan atau senyawa secara kualitatif dapat dilakukan dengan metode *Thin Layer Chromatography (TLC)* atau kromatografi lapis tipis. Plat yang digunakan yaitu plat silika F₂₅₄. Pengujian Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan uji yang sederhana dan cepat sehingga digunakan untuk menganalisis senyawa yang terdapat dalam kultur bakteri (Lade, Patil, Paikrao, Kale, & Hire, 2014). TLC terdiri atas fase diam dan fase gerak.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, terdapat beberapa noda atau spot yang dihasilkan dari metode TLC ini dapat dilihat pada Gambar 2. Supernatan isolat BAL CIN-2

Gambar 2. Hasil TLC supernatan BAL CIN-2 (A = vitamin C, B = vitamin E, C = CIN-2)



Keterangan : a. Noda Vitamin E₁, b. Noda CIN-2₁, c. Noda CIN-2₂, d. Noda CIN-2₃, e. Noda Vitamin C, f. Noda Vitamin E₂, g. Noda CIN-2₄

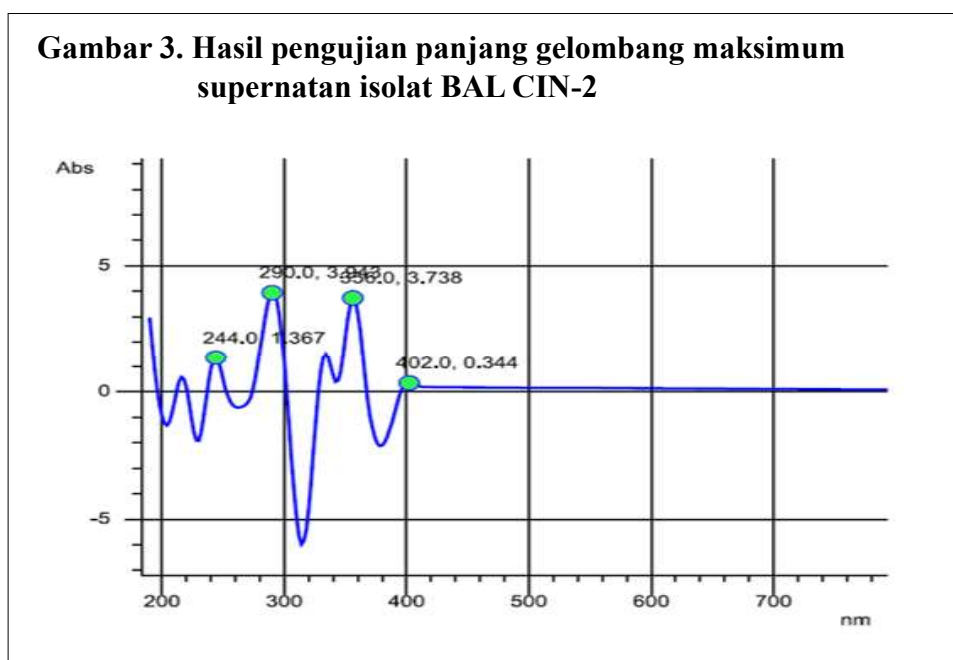
menghasilkan 4 noda yaitu CIN-2₁ dengan nilai Rf 0,98; CIN-2₂ dengan nilai Rf 0,91; CIN-2₃ dengan nilai Rf 0,73; dan CIN-2₄ dengan nilai Rf 0,6. Vitamin C menghasilkan 1 noda dengan nilai Rf 0,6. Vitamin E menghasilkan 2 noda yaitu E₁ dengan nilai Rf 0,98 dan E₂ 0,58. Faktor retardasi (*Retardation faktor=Rf*) merupakan parameter untuk menggambarkan migrasi senyawa pada metode KLT. Nilai Rf menyatakan posisi noda saat fase diam setelah dielusi (Wulandari, 2011). Noda yang terbentuk dari hasil TLC ini menandakan senyawa yang terkandung di dalamnya. Supernatan isolat BAL CIN-2 menghasilkan 4 noda, vitamin E 2 noda, sedangkan vitamin C menghasilkan 1 noda. Berdasarkan nilai Rf yang dihasilkan supernatan isolat CIN-2 kemungkinan senyawa yang terkandung adalah senyawa flavonoid. Pratiwi, Hasanah, dan Idramsya (2014) menyatakan bahwa isolat jamur endofit yang diisolasi dari tumbuhan raru (*Cotylelobium melanoxyton*) mengandung senyawa metabolit sekunder flavonoid yang memiliki nilai Rf sebesar 0,96 dan 0,62.

Nilai Rf dari supernatan isolat BAL CIN-2 dengan vitamin E memiliki nilai yang hampir sama (CIN-2₁ 0,98 dan vitamin E₁ 0,98 ; CIN-2₄ 0,6 dan vitamin E₂ 0,58) serta noda CIN-2₄ dengan vitamin C juga memiliki nilai Rf yang sama yaitu 0,6. Hal tersebut menandakan bahwa senyawa yang terkandung dalam supernatan isolat CIN-2 hampir sama dengan vitamin C dan E.

Vitamin E dan senyawa flavonoid termasuk ke dalam golongan antioksidan fenolik. Senyawa fenol terutama golongan flavonoid terbentuk karena adanya proses fermentasi yang sangat kompleks melibatkan beberapa macam mikroba yang dapat menghasilkan reaksi enzimatik dalam merangsang pembentukan senyawa flavonoid (Selly, 2008).

Pengukuran *lambda max* (panjang gelombang maksimum) menggunakan spektrofotometer UV-Vis dilakukan untuk mengetahui panjang gelombang dan absorbansi maksimum dari supernatan isolat BAL CIN-2, sehingga dapat diketahui senyawa apa yang terkandung di dalamnya. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 3.

Hasil pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis seperti yang terdapat pada Tabel 4 menunjukkan adanya empat serapan yaitu pada panjang gelombang 244, 290, 356, dan 402 nm.



Tabel 4. Hasil absorbansi dari kurva serapan maksimum

| Panjang Gelombang (nm) | Absorbansi |
|------------------------|--------------|
| 244 | 1,367 |
| 290 | 3,943 |
| 356 | 3,738 |
| 402 | 0,344 |

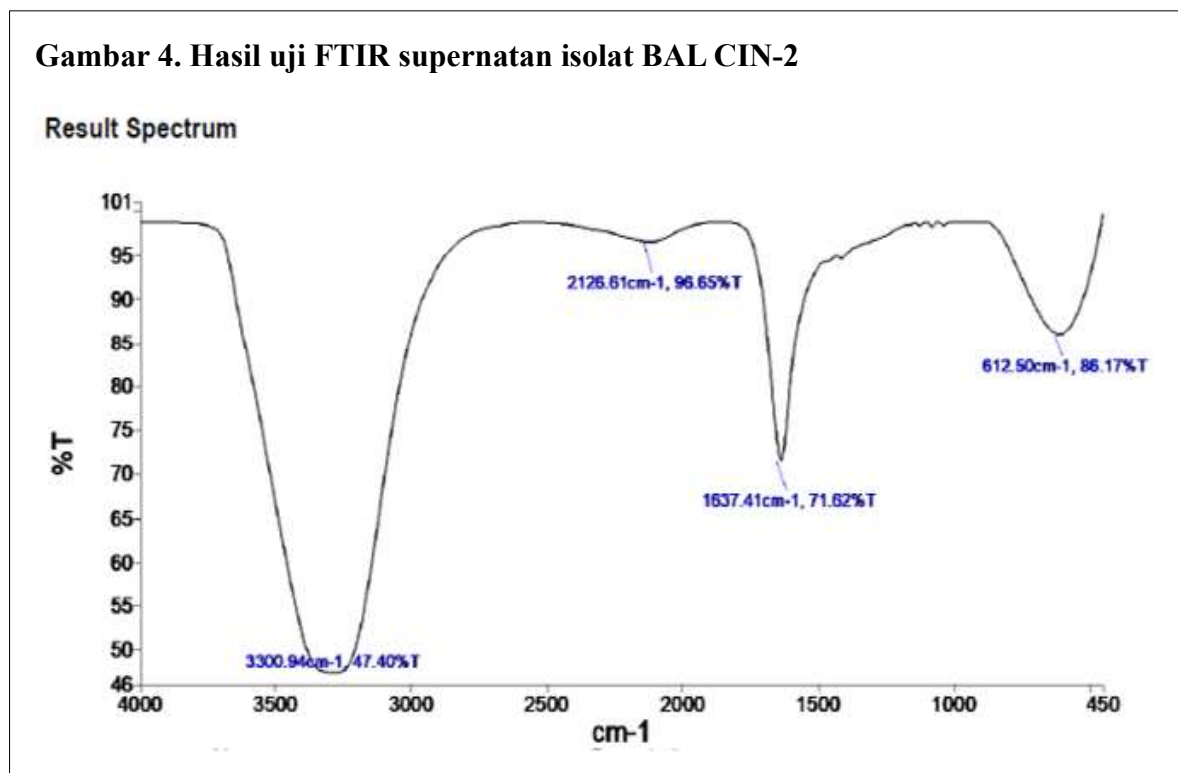
402 nm. Hasil analisis menunjukkan supernatan isolat BAL CIN-2 memiliki serapan panjang gelombang maksimum pada 290 nm dengan nilai absorbansi 3,943; diduga senyawa yang terkandung di dalamnya adalah senyawa flavonoid golongan flavanon atau dihidroflavonol. Fungi endofit yang diisolasi dari daun dan umbi bawang dayak (*Eleutherine palmifolia Merr*) menghasilkan senyawa flavonoid yang mempunyai potensi antioksidan dengan panjang gelombang maksimum antara 260-395 nm (Arfah, 2019). Panjang gelombang 244, 356, dan 402 nm juga diduga merupakan senyawa flavonoid. Markham (1998) menjelaskan bahwa spektrum khas senyawa flavonoid terdiri atas dua panjang gelombang maksimal pada rentang 230-295 nm dan 300-560 nm, masing-masing jenis senyawa flavonoid memiliki rentang panjang gelombang maksimal yang berbeda-beda.

Senyawa flavonoid adalah senyawa polifenol yang mempunyai 15 atom karbon yang tersusun dalam konfigurasi C6-C3-C6. Artinya, kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C6 (cincin benzena tersubstitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon. Flavonoid termasuk dalam famili polifenol yang larut dalam air. Mikroba dapat melakukan biotransformasi untuk menghasilkan flavonoid baru, yang tidak ada di alam (Arifin & Ibrahim, 2018).

Spektroskopi FTIR adalah salah satu teknik analitik yang sangat baik dalam proses identifikasi struktur molekul suatu senyawa. Komponen utama spektroskopi FTIR yaitu interferometer Michelson yang mempunyai fungsi menguraikan (mendispersi) radiasi inframerah menjadi komponen-komponen frekuensi (Sankari *et al.*, 2010). Metode FTIR dipilih karena mempunyai beberapa kelebihan, di antaranya merupakan teknik analisis yang cepat dan nondestruktif, sensitif dan memerlukan preparasi sampel yang sederhana, serta penggunaan reagen kimia dan pelarut dalam jumlah sedikit (Rahmawati, Kuswandi, & Retnaningtyas, 2015).

Uji spektroskopi FTIR bertujuan untuk melihat gugus fungsional dari suatu sampel. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan menggunakan *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR), didapatkan hasil seperti pada Gambar 4. Hasil tersebut menunjukkan terdapat empat *peak*, di antaranya dapat dilihat pada Tabel 5.

Hasil uji FTIR pada *peak* 1 menunjukkan terdapat gugus fungsi O-H dengan intensitas yang kuat pada serapan gelombang $3300,94\text{ cm}^{-1}$, senyawa dengan gugus fungsi O-H ini diantaranya adalah monomer alkohol, alkohol ikatan hidrogen, dan fenol. *Peak* 2 menunjukkan terdapat gugus fungsi $\text{C}\equiv\text{C}$ dengan intensitas lemah pada serapan gelombang $2126,61\text{ cm}^{-1}$. *Peak* 3 menunjukkan terdapat gugus fungsi $\text{C}=\text{C}$ aromatik dengan intensitas sedang pada serapan gelombang $1637,41\text{ cm}^{-1}$. *Peak* 4 menunjukkan terdapat gugus fungsi C-I dengan intensitas sedang pada serapan gelombang $612,5\text{ cm}^{-1}$. Berdasarkan analisis tersebut dapat disimpulkan bahwa supernatan isolat BAL CIN-2 diduga mengandung senyawa flavonoid dengan gugus fungsi O-H, $\text{C}\equiv\text{C}$, $\text{C}=\text{C}$ aromatik, dan C-I. Parwata (2016) mengungkapkan bahwa gugus aktif yang terdapat pada senyawa antioksidan yang berfungsi dalam menangkap dan menghambat



Tabel 5. Interpretasi hasil spektra FTIR (Dachriyanus, 2004)

| Bilangan Gelombang (cm ⁻¹) | Range Pustaka (cm ⁻¹) | Jenis Vibrasi atau Gugus Fungsi | Intensitas |
|--|-----------------------------------|---------------------------------|------------|
| 3300,94 | 3550-3200 | Rentang O-H | Kuat |
| 2126,61 | 2100-2140 | Rentang C≡C | Lemah |
| 1637,41 | 1626-1662 | Rentang C=C (aromatik) | Sedang |
| 612,50 | 690-515 | Rentang C-I | Sedang |

radikal bebas adalah gugus-gugus OH dan ikatan rangkap C=C. Pernyataan tersebut diperkuat oleh Akbar (2010) bahwa hasil spektrum infra merah terdapat gugus O-H, C=O, C-O, C=C aromatik, dan C-H alifatik yang mengindikasikan bahwa isolat tersebut positif mengandung antioksidan yaitu senyawa flavonoid.

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa supernatan Isolat BAL CIN-2 mempunyai aktivitas antioksidan yang tergolong sangat lemah dan mempunyai aktivitas antioksidan total sebesar 1,906 mg AAE/ml. Artinya, aktivitas antioksidan dari setiap 1 ml supernatan isolat BAL CIN-2 setara dengan 1,906 mg asam askorbat. Identifikasi antioksidan menggunakan TLC menghasilkan 4 spot dan panjang gelombang hasil spektrofotometer UV-Vis memiliki rentang untuk panjang gelombang maksimum yang diduga merupakan senyawa antioksidan golongan flavonoid. Analisis menggunakan FTIR supernatan isolat BAL CIN-2 diduga mengandung senyawa flavonoid dengan gugus fungsi antioksidan O-H, dan C=C aromatik.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, H. R. (2010). *Isolasi dan identifikasi golongan flavonoid daun dandang gendis (Clinacanthus nutans) berpotensi sebagai antioksidan* (Skripsi tidak diterbitkan). Departemen Kimia, Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Aliyu, M. A., Abdullahi, A. A., & Ugya, A. (2017). Antioxidant properties of selected poaceae species in Kano, Northern Nigeria. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 4(5), 577-585.
- Aloanis, A. A., & Karundeng, M. (2019). Total kandungan antioksidan ekstrak etanol buah beringin (*Ficus benjamina* Linn.). *Fullerene Journal of Chemistry*, 4(1), 1-4.
- Amaral, V. A., Alves, T. F. R., de Souza, J. F., Batain, F., deMoura Crescencio, K. M., Soeiro, V.S., de Barros, C. T., & Chaud, M. V. (2020). Phenolic compounds from *Psidium guajava* (Linn.) leaves: Effect of the extraction-assisted method upon total phenolics content and antioxidant activity. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(2), 9346-9357. <https://doi.org/10.33263/BRIAC112.93469357>.
- Arfah, A. (2019). Isolasi dan identifikasi fungi endofit daun dan umbi bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* Merr) sebagai penghasil senyawa antioksidan. *Journal of Pharmaceutical Science and Herbal Technology*, 4(1), 32-39.
- Arifin, B., & Ibrahim, S. (2018). Struktur, bioaktivitas dan antioksidan flavonoid. *Jurnal Zarah*, 6(1), 21-29.
- Aritonang, S. N., Roza, E., Rossi, E., Purwati, E., & Husmaini, H. (2017). Isolation and identification of lactic acid bacteria from okara and evaluation of their potential as candidate probiotics. *Pakistan J. Nutri*, 16(8), 618-628.
- Bisson, L. (2001). *The alcoholic fermentation section 3*. University of California.
- Chalid, S. Y., & Hartiningsih, F. (2013). Potensi dadih susu kerbau fermentasi sebagai antioksidan dan antibakteri. *Prosiding SEMIRATA 2013*, 1(1), 369-375.
- Dachriyanus. (2004). *Analisis struktur senyawa organik secara spektroskopi*. Lembaga Pengembangan Teknologi Informasi dan Komunikasi (LPTIK) Universitas Andalas, Padang.
- Lade, B. D., Patil, A. S., Paikrao, H. M., Kale, A. S., & Hire, K. K. (2014). A comprehensive working, principles and applications of thin layer chromatography. *Res. J. Pharm. Bio. Chem. Sci*, 5(4), 486-503.
- Manguntungi, B., Saputri, D. S., Mustopa, A. Z., Ekawati, N., Nurfatwa, M., Prastyowati, A., Irawan, S., Vanggy, L. R., & Fidien, K. A. (2020). Antidiabetic, antioxidants and antibacterial activities of Lactic Acid Bacteria (LAB) from masin (Fermented sauce from Sumbawa, West Nusa Tenggara, Indonesia). *Annales Bogorienses*, 24(1), 27-34.
- Markham, K. R. (1998). *Cara mengidentifikasi flavonoid*. (Terj.: Padmawinata). Penerbit ITB.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol*, 26(2), 211-219.
- Nofiani, Risa and Puji Ardiningsih. (2018). Physicochemical and Microbiological Profiles of Commercial Cincalok from West Kalimantan. *JPHPI*, 21(2), 244-250
- Parwata, I. M. O. A. (2016). *Antioksidan* (Bahan ajar). Program Pascasarjana Universitas Udayana, Bali.
- Pratiwi, E., Hasanah, U., & Idramsya. (2014). Identifikasi senyawa metabolit sekunder pada jamur endofit dari tumbuhan raru (*Cotylelobium melanoxydon*). *Prosiding Seminar Nasional Biologi dan Pembelajarannya* (pp. 267-277).

- Pribadhi, A. N., Kusdiyantini, E., & Ferniah, R. S. (2021). Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat dari pangan fermentasi cinalok sebagai penghasil gamma-aminobutyric acid. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBI)*, 8(1), 25-32.
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphormolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337-341.
- Rahmawati, A., Kuswandi, B., & Retnaningtyas, Y. (2015). Deteksi gelatin babi pada sampel permen lunak jelly menggunakan metode Fourier Transform Infra Red (FTIR) dan kemometrik. *Pustaka Kesehatan*, 3(2), 278-283.
- Rahmayani, U., Pringgenies, D., & Djunaedi, A. (2013). Uji aktivitas antioksidan ekstrak kasar keong bakau (*Telescopium telescopium*) dengan pelarut yang berbeda terhadap metode DPPH (diphenyl picril hidrazil). *Journal of Marine Research*, 2(4), 36-45.
- Sankari, G., Krishnamoorthy, E., Jayakumaran, S., Gunasekaran, S., Priya, V. V., Subramaniam, S., & Mohan, S. K. (2010). Analysis of serum immunoglobulins using Fourier transform infrared spectral measurements. *Biology and Medicine*, 2(3), 42-48.
- Sarwono, J. (2006). *Metode penelitian kuantitatif dan kualitatif*. Graha Ilmu.
- Selly, A. J. (2008). Karakteristik sifat fisika-kimia dan pengujian antiproliferasi ekstraksi buah merah (*Pandanus conoideus* Lam.) terhadap sel kanker HeLa dan K-562 secara in vitro. (Skripsi tidak diterbitkan). Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Sofiana, M. S. J., Warsidah, N. I., Nurdiansyah, S. I., Aritonang, A. B., Rahmawati, A., & Fadly, D. (2020). The activity of lactic acid bacteria from ale-ale (fermented clams) and cinalok (fermented shrimp) as antioxidant and antimicrobial. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(12), 1676-1679.
- Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Raja, S. S. S., & Vijayakumar, R. (2018). An introductory chapter: Secondary metabolites. Dalam R. Vijayakumar & S. S. S. Raja (Eds.), *Secondary metabolites - Sources and Applications*. Intech Open. DOI: 10.5772/intechopen.79766.
- Wulandari, D., & Purwaningsih, D. (2019). Identifikasi dan karakterisasi bakteri amilolitik pada umbi *Colocasia esculenta* L. secara morfologi, biokimia, dan molekuler. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*, 6(2), 247-258.
- Wulandari, L. (2011). *Kromatografi lapis tipis*. PT. Taman Kampus Presindo.
- Yassa, N., Masoomi, F., Rankouhi, S. R., & Hadjiakhoondi, A. (2015). Chemical composition and antioxidant activity of the extract and essential oil of *Rosa damascena* from Iran, population of Guilan. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(3), 175-180.