



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PENETAPAN KADAR FENOL TOTAL  
DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN  
EKSTRAK METANOL DEDAK  
BEBERAPA VARIETAS PADI (*Oryza sativa* L.)**

**SKRIPSI**

**DEDE SUGIAT  
0606070610**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI FARMASI  
DEPOK  
JULI 2010**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PENETAPAN KADAR FENOL TOTAL  
DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN  
EKSTRAK METANOL DEDAK  
BEBERAPA VARIETAS PADI (*Oryza sativa* L.)**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Farmasi**

**DEDE SUGIAT  
0606070610**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI FARMASI  
DEPOK  
JULI 2010**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Dede Sugiati

NPM : 0606070610

Tanda Tangan :

Tanggal : 14 Juli 2010

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Dede Sugiati  
NPM : 0606070610  
Program Studi : Farmasi  
Judul Skripsi : Penetapan Kadar Fenol Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Dedak Beberapa Varietas Padi (*Oryza sativa* L.)

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. Dr. Endang Hanani, MS. Apt. ( )  
Pembimbing II : Dr. Abdul Mun'im, MS. Apt. ( )  
Penguji I : Dr. Yahdiana Harahap, MS. Apt. ( )  
Penguji II : Dr. Harmita, Apt. ( )  
Penguji III : Dra. Rosmaladewi Aziz, Apt. ( )

Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : 14 Juli 2010

## KATA PENGANTAR

Hanya kepada Sang Triratna, Tiga Permata Termulia: Sang Buddha, Sang Dharma, dan Sang Sangha, penulis selalu berlingung dan memberikan penghormatan tertinggi.

Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi di Departemen Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Dr. Yahdiana Harahap, MS selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI;
- (2) Prof. Dr. Endang Hanani, MS. Apt. dan Dr. Abdul Mun'im, MS. Apt. sebagai pembimbing skripsi yang telah membimbing penulis dengan sabar mulai dari awal hingga skripsi ini dapat terselesaikan;
- (3) Dr. Katrin, MS selaku Pembimbing Akademik atas bimbingan selama perkuliahan;
- (4) Ir. Jumali dari Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Kementerian Pertanian, Subang, yang telah sangat membantu penulis dalam penyediaan sampel serta atas ilmu yang telah dibagikannya;
- (5) Prof. Phoency Lai dari Department of Food and Nutrition, Providence University, Republic of China (Taiwan), atas korespondensi dan kebaikan hati memberikan referensi yang sangat berguna untuk penulis dalam menyelesaikan skripsi ini;
- (6) Para dosen pengajar di Departemen Farmasi UI atas ilmu yang telah diberikan kepada penulis serta para laboran dan staf yang telah banyak memberikan bantuan kepada penulis;
- (7) Papa Giawan Ismaya, Mama Suryani, Koko Yan Agisthia, S.Tp., dan Adik

Geri Sugiati serta seluruh keluarga atas kasih sayang, perhatian, dukungan dan perhatian yang tak pernah henti kepada penulis;

- (8) Seluruh rekan-rekan Farmasi UI 2006 -Rainbow United- atas dukungan, semangat, dan kebersamaan dalam berbagi suka dan duka selama perkuliahan dan penelitian;
- (9) Semua pihak yang telah membantu dan mendukung penulis sehingga dapat menyelesaikan kuliah dan tugas akhir di Departemen Farmasi Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karenanya, penulis memohon maaf untuk kesalahan-kesalahan yang telah dilakukan.

Akhir kata, semoga skripsi ini dapat berguna bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan kepentingan serta kebaikan semua makhluk.

Semoga semua makhluk senantiasa berbahagia, terbebas dari penderitaan, serta selalu mendapatkan jalan kedamaian.

Penulis

2010

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dede Sugiat

NPM : 0606070610

Program Studi : Farmasi

Departemen : Farmasi

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Penetapan Kadar Fenol Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Dedak Beberapa varietas Padi (*Oryza sativa L.*)

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 14 Juli 2010

Yang menyatakan

( Dede Sugiat )

## ABSTRAK

Nama : Dede Sugiat  
Program Studi : Farmasi  
Judul : Penetapan Kadar Fenol Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Dedak Beberapa Varietas Padi (*Oryza sativa* L.)

Salah satu senyawa yang telah diketahui memiliki peran penting dalam pencegahan dan pengobatan penyakit adalah senyawa antioksidan. Salah satu sumber senyawa antioksidan adalah senyawa-senyawa fitonutrien, yaitu senyawa yang terkandung dalam tanaman. Saat ini, telah banyak tanaman dieksplorasi untuk mendapatkan kandungan metabolit sekundernya. Akan tetapi, perhatian terhadap hasil samping dan limbah dari industri pangan masih sangat sedikit. Salah satu hasil samping industri makanan yang memiliki potensi yang sangat besar adalah dedak padi (*Oryza sativa* L.). Oleh karenanya, perlu diketahui potensi dedak padi, terutama sebagai salah satu sumber senyawa antioksidan dan senyawa-senyawa fenol. Dalam menentukan aktivitas antioksidan, digunakan dua metode, yaitu metode peredaman radikal DPPH dan metode Penentuan Kekuatan Reduksi, sedangkan kadar fenol total ditetapkan dengan metode Folin-Ciocalteu. Dalam Penelitian ini, kadar fenol total yang terbanyak dikandung pada ekstrak metanol dedak padi varietas OM-4495 dengan kadar fenol total 71,85 mg setara asam galat / gram, sedangkan dari uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH memberikan hasil nilai  $IC_{50}$  terkecil diberikan oleh ekstrak metanol dedak padi varietas IR-64 yaitu sebesar 350,64 ppm dan dengan metode Penentuan Kekuatan Reduksi memberikan hasil terbaik pada ekstrak metanol dedak padi varietas IR-42 yaitu sebesar 39,23% dibandingkan dengan standar BHT.

Kata kunci : antioksidan, dedak padi, Folin-Ciocalteu, metode peredaman DPPH, penentuan kekuatan reduksi  
xiv+59 halaman: 12 gambar; 17 tabel; 2 lampiran  
Daftar acuan : 42 (1959-2010)



## ABSTRACT

Name : Dede Sugiat  
Program Study : Pharmacy  
Title : Total Phenolic Content and Antioxidant Activity Determination of Methanol Extract of Bran from Some Rice (*Oryza sativa* L.) Varieties

Compound that has been known to have an important role in the prevention and treatment of disease is antioxidant. One source of antioxidant compounds are phytonutrients, i.e. compounds contained in plants. In recent years, many plants have been explored to obtain the secondary metabolites. However, there are few attention to the co-products and wastes from food industries. One co-product of food industry that has been promising potential is the rice bran. As a source of phytonutrient, the potency of rice bran is in its antioxidant activity and phenolic compounds. Antioxidant activity of rice bran is determined by DPPH Scavenging Assay and Reducing Power Determination, while Total Phenolic Contents is determined by Folin-Ciocalteu Reagent. In Folin-Ciocalteu Method, the highest total phenolic content is methanolic extract of rice bran from OM-4495 variety, i.e. 71.85 mg Gallic Acid Equivalent / gram. DPPH Scavenging Assay give result as the lowest IC<sub>50</sub> given by methanolic extract of rice bran from IR-64 variety, i.e. 350.64 ppm and Reducing Power Determination Method give the highest result by methanolic extract of rice bran from IR-42 variety, i.e. 39.23% of BHT standard.

Keywords : Antioxidant, DPPH Scavenging Assay, Folin-Ciocalteu, Reducing Power Determination, Rice Bran, Total Phenolic Content  
xiv+59 pages : 12 figures; 17 tables; 2 appendices  
Bibliography : 42 (1959-2010)

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>v</b>
<b>LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	4
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
2.1 <i>Oryza sativa</i> L.....	5
2.1.1 Deskripsi Umum .....	5
2.1.2 Kegunaan Padi .....	6
2.2 Dedak dan Bekatul.....	6
2.2.1 Deskripsi.....	6
2.2.2 Kandungan Kimia dalam Dedak dan Bekatul .....	7
2.3 Reduktan dan Oksidan .....	8
2.4 Antioksidan dan Pro-Oksidan .....	8
2.4.1 Deskripsi .....	8
2.4.2 Kegunaan Antioksidan.....	10
2.4.3 Uji Aktivitas Antoksidan .....	10
2.4.4 Penetapan Kandungan Fenol Total dengan Pereaksi Folin-Ciocalteu .....	17
2.5 Ekstraksi.....	18
2.5.1 Cara Dingin .....	18
2.5.2. Cara Panas .....	19
<b>3. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>20</b>
3.1 Bahan .....	20
3.2 Alat .....	20
3.3 Cara Kerja .....	20
3.3.1 Stabilisasi Simplisia .....	20
3.3.2 Ekstraksi Simplisia.....	21
3.3.3 Pengukuran Kandungan Fenol Total .....	21
3.3.3.1 Pembuatan Larutan Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 7,5% b/v.....	21
3.3.3.2 Penetapan Waktu Optimum dan Panjang Gelombang Maksimum Asam Galat .....	21

3.3.3.3 Pembuatan Kurva Kalibrasi.....	22
3.3.3.4 Pengukuran Serapan Sampel .....	22
3.3.4 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode Peredaman Radikal DPPH.....	22
3.3.4.1 Pembuatan Larutan DPPH.....	22
3.3.4.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Pengukuran .....	23
3.3.4.3 Uji Penghambatan Radikal DPPH pada Sampel .....	23
3.3.4.4 Perhitungan Persentasi Inhibisi dan Nilai IC <sub>50</sub> .....	24
3.3.5 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode Penentuan Kekuatan Reduksi.....	24
3.3.5.1 Pembuatan Dapar Fosfat pH 6,6.....	24
3.3.5.2 Pembuatan Larutan Kalium Heksasianoferrat 1% <sup>b/v</sup> .....	24
3.3.5.3 Pembuatan Larutan Asam Trikloroasetat 1% <sup>b/v</sup> .....	24
3.3.5.4 Pembuatan Larutan FeCl <sub>3</sub> 10% <sup>b/v</sup> .....	25
3.3.5.5 Pengukuran Serapan Sampel .....	25
<b>4. HASIL PEMBAHASAN .....</b>	<b>26</b>
4.1 Stabilisasi Simplisia .....	26
4.2 Ekstraksi Simplisia.....	26
4.3 Pengukuran Kandungan Fenol Total .....	27
4.3.1 Penetapan Waktu Optimum dan Panjang Gelombang Maksimum Asam Galat.....	27
4.3.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi .....	27
4.3.3 Pengukuran Serapan Sampel .....	27
4.4 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode Peredaman Radikal DPPH.....	28
4.4.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Pengukuran .....	28
4.4.2 Uji Penghambatan Radikal DPPH pada Sampel .....	28
4.5 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode Penentuan Kekuatan Reduksi.....	29
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>31</b>
5.1 Kesimpulan .....	31
5.1 Saran .....	31
<b>DAFTAR ACUAN .....</b>	<b>32</b>

## DAFTAR GAMBAR

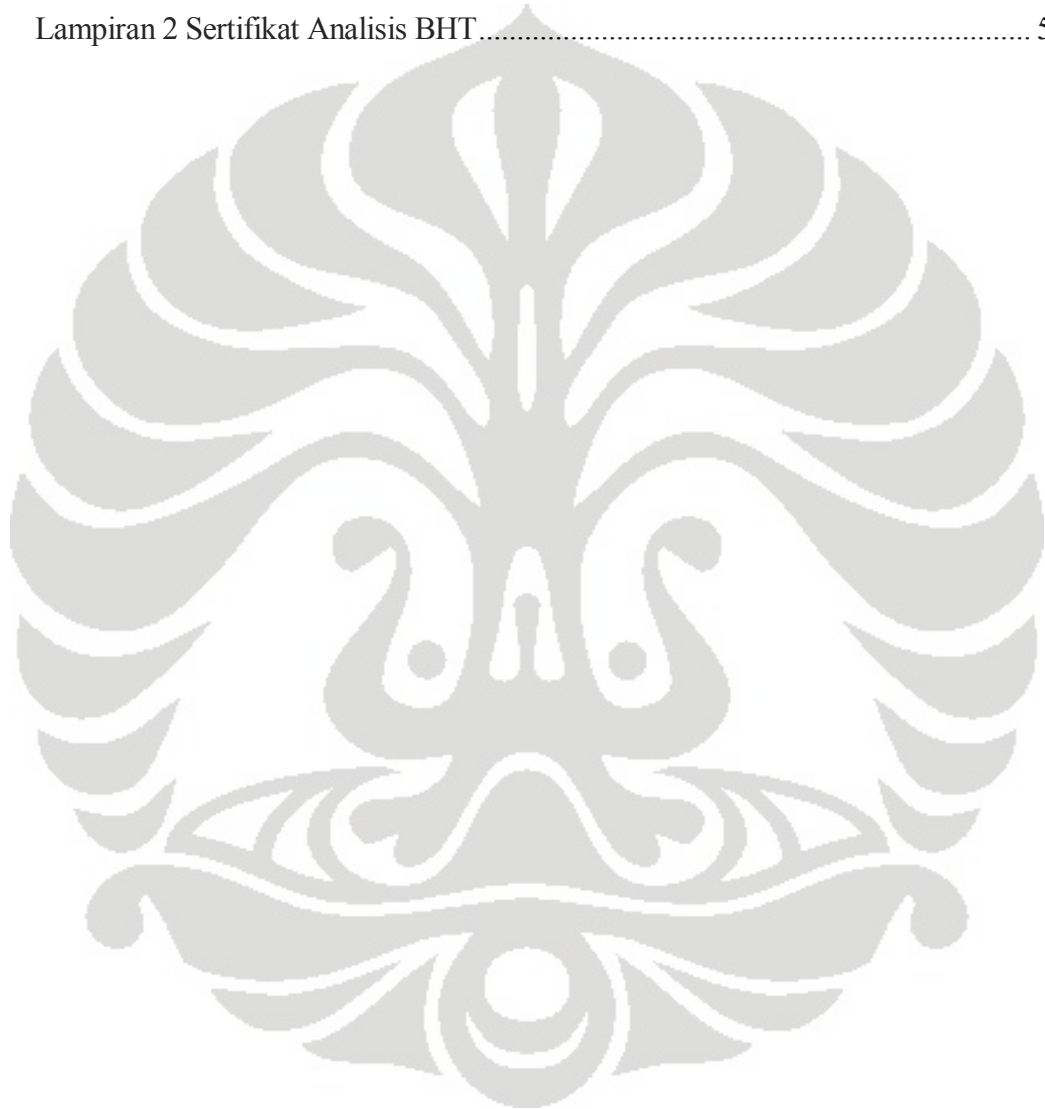
Gambar 2.1	Simplisia Dedak Padi.....	36
Gambar 2.2	Anatomi Buah Padi / Gabah .....	37
Gambar 2.3	Struktur Vitamin E .....	38
Gambar 2.4	Struktur Oryzanol .....	38
Gambar 2.5	Reaksi Peredaman Radikal DPPH oleh Senyawa Antioksidan ..	15
Gambar 3.3	Spektrofotometer UV-Vis Jasco V-530.....	39
Gambar 4.1	Spektrum Serapan Standar Asam Galat dengan Konsentrasi 10 ppm pada Menit ke-105 pada Penentuan Kadar Fenol dengan Menggunakan Pereaksi Folin-Ciocalteu .....	40
Gambar 4.2	Spektrum Serapan Larutan DPPH 100 ppm dengan Pelarut Metanol.....	41
Gambar 4.3	Penentuan Waktu Optimum Serapan Standar Asam Galat pada Penetapan Kadar Fenol Total dengan Menggunakan Metode Folin-Ciocalteu.....	42
Gambar 4.4	Kurva Kalibrasi Standar Asam Galat pada Penentuan Kadar Fenol Total dengan Metode Folin-Ciocalteu.....	42
Gambar 4.5	Grafik Perbandingan Kadar Fenol Total Ekstrak Sampel dengan Metode Folin-Ciocalteu.....	43
Gambar 4.6	Grafik Perbandingan Nilai $IC_{50}$ Ekstrak Sampel dengan Metode Peredaman Radikal DPPH.....	44
Gambar 4.7	Grafik Perbandingan Kekuatan Reduksi Ekstrak Sampel dengan Metode Penentuan Kekuatan Reduksi .....	45

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Bobot Ekstrak yang Diperoleh dari Ekstraksi .....	46
Tabel 4.2	Data Pengukuran Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan Waktu Optimum Standar Asam Galat 10 ppm pada Penentuan Kadar Fenol Total dengan Menggunakan Pereaksi Folin-Ciocalteu.....	47
Tabel 4.3	Data Kurva Kalibrasi Standar Asam Galat 10 ppm pada Penentuan Kadar Fenol Total dengan Menggunakan Pereaksi Folin-Ciocalteu .....	47
Tabel 4.4	Data Pengukuran Kadar Fenol Total Sampel dengan Menggunakan Pereaksi Folin-Ciocalteu .....	48
Tabel 4.5	Nilai $IC_{50}$ dari Ekstrak Metanol Dedak Padi Varietas Ciherang.....	49
Tabel 4.6	Nilai $IC_{50}$ dari Ekstrak Metanol Dedak Padi Varietas Cibogo .....	49
Tabel 4.7	Nilai $IC_{50}$ dari Ekstrak Metanol Dedak Padi Varietas Cigeulis.....	50
Tabel 4.8	Nilai $IC_{50}$ dari Ekstrak Metanol Dedak Padi Varietas IR-64.....	50
Tabel 4.9	Nilai $IC_{50}$ dari Ekstrak Metanol Dedak Padi Varietas IR42.....	51
Tabel 4.10	Nilai $IC_{50}$ dari Ekstrak Metanol Dedak Padi Varietas Sintanur.....	51
Tabel 4.11	Nilai $IC_{50}$ dari Ekstrak Metanol Dedak Padi Varietas INPARI-1 ....	52
Tabel 4.12	Nilai $IC_{50}$ dari Ekstrak Metanol Dedak Padi Varietas INPARI-5 ....	52
Tabel 4.13	Nilai $IC_{50}$ dari Ekstrak Metanol Dedak Padi Varietas INPARI-10..	53
Tabel 4.14	Nilai $IC_{50}$ dari Ekstrak Metanol Dedak Padi Varietas OM-4495.....	53
Tabel 4.15	Nilai $IC_{50}$ dari Larutan Standar BHT dengan Pelarut Metanol.....	54
Tabel 4.16	Nilai $IC_{50}$ dari Ekstrak Sampel Berbagai Varietas Dedak Padi pada Uji Peredaman Radikal DPPH .....	55
Tabel 4.17	Nilai Kekuatan Reduksi Ekstrak Sampel dibandingkan dengan Kekuatan Reduksi Standar BHT.....	56

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Surat Keterangan Sampel.....	57
Lampiran 2 Sertifikat Analisis BHT.....	58



# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Pada awal abad ini, obesitas (kegemukan) telah menjadi penyakit metabolik yang paling cepat berkembang dan paling umum di dunia. Lebih dari tiga ratus juta orang di seluruh dunia dapat digolongkan mengidap kegemukan. Obesitas telah menjadi sangat penting dan salah satu perhatian di dunia kesehatan bukan hanya karena obesitas tersebut sebagai sebuah penyakit, tetapi karena fakta membuktikan obesitas juga merupakan salah satu faktor risiko untuk berbagai macam penyakit, diantaranya merupakan penyakit yang memiliki tingkat mortalitas dan morbiditas yang tinggi (Chrysohoou, 2007). Diantara penyakit-penyakit tersebut adalah arterosklerosis, diabetes tipe 2, dislipidemia, *hiperuricemia*, hipertensi arterial, dan berbagai macam jenis penyakit (Formiguera & Canton, 2004; Amirkhizi, Siassi, Djalali, & Foroushani, 2010). Selain itu, beberapa gangguan pernafasan seperti sindrom hipoventilasi obesitas dan sindrom apnu obstruktif juga berkaitan erat dengan obesitas (Formiguera & Canton, 2004). Oleh karenanya, di dunia kesehatan, penanganan obesitas menjadi sangat penting.

Obesitas disebabkan utamanya oleh fungsi normal penyimpanan energi oleh jaringan adiposa (Formiguera & Canton, 2004). Untuk menjalankan fungsi normalnya tersebut, jaringan adiposa merupakan organ endokrin yang mensintesa berbagai jenis *cytokines* (*adipokines*) yang berperan penting dalam mengontrol keseimbangan energi dan asupan makanan. Lebih lanjut, kini telah diketahui bahwa beberapa *adipokines*, seperti *tumor necrosis factor- $\alpha$* , *interleukin-1 $\beta$* , *interleukin-6*, dan *interleukin-10*, berperan penting dalam inflamasi, stres oksidatif, dan disfungsi endothelial. Pada penderita obesitas, kadar *cytokines* tersebut diketahui meningkat jika dibandingkan dengan orang bukan pengidap obesitas (Puchau, 2010).

Stres oksidatif adalah keadaan dimana terjadi ketidakseimbangan antara produksi *reactive oxygen species* (ROS) dengan perlindungan antioksidan. ROS

merupakan penyebab dari oksidasi lipid, protein, dan DNA. Salah satu senyawa yang dapat melindungi dari kerusakan oksidatif dan komplikasi inflamasi tersebut adalah senyawa antioksidan. Senyawa antioksidan juga dapat melindungi dari radikal bebas (Beltowski, Jamroz-Wisniewska, Borkowska, & Wojcicka, 2005).

Kini telah banyak studi yang memperlihatkan adanya hubungan antara obesitas dengan senyawa antioksidan. Selain dapat mencegah inflamasi yang diperantarai oleh *adipokines* yang juga berperan dalam penyimpanan lemak, antioksidan juga diketahui dapat mencegah stres oksidatif yang diakibatkan oleh akumulasi lemak pada penderita obesitas (Furukawa, 2004; Beltowski, Wojcicka, Gorny, & Marciniak, 2000). Saat ini telah berkembang ketertarikan yang tinggi pada fitonutrien atau *nutraceutical*, senyawa bioaktif yang berasal dari tanaman yang muncul secara alami pada makanan dan memiliki sifat pencegahan dan pengobatan penyakit. Secara umum, buah dan sayuran telah terbukti mengandung senyawa yang memiliki kontribusi pada kesehatan manusia. Akan tetapi, hanya perhatian yang sangat sedikit yang diberikan pada tanaman serealia dan tanaman pangan sehubungan dengan kontribusi jenis tanaman ini pada kesehatan manusia dan pengurangan resiko penyakit, meskipun faktanya jenis tanaman ini merupakan makanan pokok bagi sebagian besar populasi dunia (Yu, 2008).

Meningkatnya kesadaran pada masalah-masalah lingkungan hidup menyebabkan perhatian terhadap hasil samping dan limbah semakin besar, tak terkecuali hasil samping dan limbah dari industri pangan. Salah satu caranya adalah dengan memanfaatkan kembali (*re-use*) hasil samping dan limbah tersebut. Secara spesifik, salah satu cara yang bisa dilakukan sebagai upaya *re-use* adalah dengan memanfaatkan senyawa-senyawa fitokimia atau fitonutrien yang terkandung di dalamnya, yang biasanya berupa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas biologis (Waldron, 2007). Diantara senyawa fitokimia tersebut adalah senyawa-senyawa yang memiliki khasiat antioksidan.

Sebagai salah satu tanaman pangan, padi (*Oryza sativa* L.) merupakan bahan makanan yang dikonsumsi oleh lebih dari setengah populasi manusia di dunia yang berjumlah lebih dari 6,8 milyar orang (IRRI, 2009). Badan Pangan Dunia, FAO, melaporkan bahwa produksi padi total di seluruh dunia pada tahun 2007 adalah 638 juta ton (FAO, 2008). Di Indonesia, berdasarkan data



Kementerian Pertanian Republik Indonesia, pada tahun 2009 telah diproduksi padi dengan jumlah total sekitar 64.329.329 ton dan pada tahun 2010 diperkirakan jumlah produksi akan meningkat menjadi 64.897.700 ton (Basisdata Statistik Pertanian, 2010).

Berdasarkan penelitian, penggilingan padi dengan kadar air 14% akan menghasilkan rendemen beras 57-60%, dan sisanya adalah hasil samping berupa sekam 18-20%, dan dedak 8-10% (Hadipernata, 2007). Dengan data produksi padi dari Kementerian Pertanian Republik Indonesia pada tahun 2009, maka hasil samping penggilingan beras yang diproduksi adalah sekitar 25 juta ton.

Beberapa diantara produk samping penggilingan beras tersebut telah dapat dimanfaatkan manusia menjadi lebih berguna. Misalnya adalah menir dan beras pecah dapat digiling menjadi tepung sebagai bahan kue dan makanan lainnya. Adapun sekam telah banyak dimanfaatkan sebagai bahan bakar alternatif serta sebagai kompos. Sementara itu, dedak hanya dimanfaatkan sebagai pakan ternak (Hadipernata, 2007).

Jumlah produksi dedak padi sebagai hasil samping produksi beras terbilang besar. Dengan data produksi padi dari Kementerian Pertanian Republik Indonesia pada tahun 2009, maka dedak yang dihasilkan di Indonesia adalah sekitar 6,4 juta ton. Oleh karenanya, perlu dilakukan usaha untuk menambah nilai tambah dari dedak yang jumlahnya sangat berlimpah tersebut.

Tanaman biji-bijian, termasuk padi, dikenal mengandung berbagai macam nutrisi penting yang bermanfaat untuk tubuh manusia. Diantaranya adalah karbohidrat, serat, mineral, asam amino, vitamin B, vitamin E,  $\gamma$ -oryzanol, dan zat-zat lainnya. Vitamin E dan  $\gamma$ -oryzanol dikenal memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi (Slavin, 2004).

Akan tetapi, masih sedikit penelitian yang dilakukan yang berhubungan dengan aktivitas antioksidan dari padi yang ditanam di Indonesia. Berdasarkan hal tersebut, akan dilakukan penelitian mengenai kandungan senyawa, khususnya senyawa fenol total dan aktivitas antioksidan pada dedak padi dari beberapa varietas padi yang ditanam di Indonesia.

## 1.2 Tujuan penelitian

1. Menentukan kadar fenol total pada ekstrak metanol dedak dari beberapa varietas padi (*Oryza sativa* L.) yang ditanam di Indonesia
2. Menentukan aktivitas antioksidan ekstrak metanol dedak dari beberapa varietas padi (*Oryza sativa* L.) yang ditanam di Indonesia



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Oryza sativa* L.

2.1.1 Deskripsi Umum (Backer & Van Den Brink Jr., 1968; Heyne, 1987; Vergara & De Datta, 1996)

Tanaman *Oryza sativa* L. dalam Bahasa Indonesia dikenal dengan sebutan padi. Padi merupakan tanaman terna semusim, berbatang banyak, bulat, berlubang, mempunyai daun bendera yang menempel pada pelepah daun dan berakar serabut. Klasifikasinya adalah sebagai berikut:

Dunia	: Plantae
Subdunia	: Traceobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida
Subkelas	: Commelinidae
Bangsa	: Cyperaceae
Suku	: Gramineae / Poaceae
Marga	: <i>Oryza</i>
Jenis	: <i>Oryza sativa</i> L.
Sinonim	: <i>Oryza glutinosa</i> Lour. (1790), <i>O. Montana</i> Lour (1790), <i>O. praecox</i> Lour (1790), <i>O. aristata</i> Blanco (1873)

Padi memiliki tinggi 50-130 cm dengan batang yang sangat pendek, struktur serupa batang terbentuk dari rangkaian pelepah daun yang saling menopang; daun sempurna dengan pelepah tegak, daun berbentuk lanset, warna hijau muda hingga hijau tua, berurat daun sejajar, tertutupi oleh rambut yang pendek dan jarang. Bunga tersusun majemuk, tipe malai bercabang, satuan bunga disebut floret, yang terletak pada satu spikelet yang duduk pada panikula; buah tipe bulir atau kariopsis yang tidak dapat dibedakan mana buah dan bijinya,

bentuk hampir bulat hingga lonjong, ukuran 3 mm hingga 15 mm, tertutup oleh palea dan lemma. Tinggi tanaman kurang lebih 85 cm

Padi menyebar dari kaki pegunungan Himalaya dan kemungkinan dibudidayakan pertama kali di India pada zaman dahulu. Di Indonesia, Malaysia, dan Filipina, budidaya padi dimulai pada sekitar tahun 1500 SM (Vergara & De Datta, 1996).

### 2.1.2 Kegunaan Padi

Padi merupakan makanan utama lebih dari 40% populasi dunia dan merupakan makanan pokok di Asia Tenggara. Beras yang telah digiling dikonsumsi dengan cara dimasak dengan air panas atau dikukus. Beras merupakan sumber utama energi. Tepung yang dibuat dari beras biasanya digunakan sebagai makanan untuk sarapan, bahan pada produk olahan daging, makanan bayi, campuran roti dan kue, dan kosmetika. Beras juga dapat diolah menjadi minuman fermentasi (Vergara & De Datta, 1996).

## 2.2 Dedak dan Bekatul

### 2.2.1 Deskripsi

Dedak padi (Gambar 2.1) didapat dari proses penyosohan beras pecah kulit menjadi beras dan merupakan produk yang sangat bernilai untuk peternakan. Dedak terdiri dari perikarp, lapisan aleuron, embrio, dan sedikit endosperma dari biji padi / gabah (Gambar 2.2) (Vergara & De Datta, 1996). Berdasarkan definisi dari Dewan Standardisasi Nasional pada Standar Nasional Indonesia (SNI) 01-3798-1996/Rev.92 tentang Dedak Padi / Bahan Baku Pakan, dedak padi adalah hasil ikutan pengolahan padi (*Oryza sativa* L.) menjadi beras terutama terdiri dari lapisan kulit ari (Badan Standardisasi Nasional, 1996). Pada SNI 6128:2008 tentang Beras, dedak didefinisikan sebagai hasil samping proses penggilingan beras yang berasal dari lapisan terluar beras pecah kulit yang terdiri dari perikarp, testa, dan aleuron (Badan Standardisasi Nasional, 2008).

Lebih lanjut, dijelaskan bahwa pada proses penyosohan bertingkat akan menghasilkan dedak kasar dan dedak halus yang biasa disebut bekatul. Adapun yang dimaksud dengan lapisan bekatul menurut SNI 6128:2008 adalah lapisan

terluar beras pecah kulit yang terdiri dari perikarp, testa, dan aleuron yang masih menempel pada endosperm (Badan Standardisasi Nasional, 2008).

### 2.2.2 Kandungan Kimia dalam Dedak dan Bekatul

Dedak dan bekatul mengandung sakarida, vitamin E (tokoferol dan tokotrienol),  $\gamma$ -oryzanol, dan protein. Selain itu, dedak juga memiliki kandungan senyawa vitamin B yang terdiri dari Thiamin (vitamin B<sub>1</sub>), Riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>), dan Sianokobalamin (vitamin B<sub>12</sub>), Niasin, Asam Pantotenat (vitamin B<sub>5</sub>), vitamin A, Asam Folat, Biotin, Inositol, dan Kholin. Dari berbagai kandungan kimia pada dedak dan bekatul, vitamin E (tokoferol dan tokotrienol), dan  $\gamma$ -oryzanol dikenal memiliki aktivitas antioksidan yang baik (Schramm, 2007).

Vitamin E (Gambar 2.3) merupakan suatu golongan senyawa yang terdiri dari tokoferol dan tokotrienol beserta keempat derivatnya (dikenal sebagai derivat  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, dan  $\delta$ -) (Sen, Khanna, & Roy, 2006). Vitamin E pertama kali diteliti oleh Herbert Evans dan Katherine Bishop dari University of California pada tahun 1924 sebagai nutrisi penting yang berperan dalam reproduksi pada tikus. Vitamin E tergolong sebagai vitamin esensial, yang berarti tubuh manusia tidak dapat mensintesis senyawa ini dan harus mendapat asupan dari luar tubuh (Zingg, 2006). Studi epidemiologi menunjukkan bahwa senyawa ini mengurangi kerusakan yang ditimbulkan karena oksidasi struktur biomolekuler yang berperan dalam pencegahan penyakit-penyakit kronis. Selain itu, senyawa-senyawa ini juga dapat memperlambat onset diabetes dan penyakit Alzheimer, serta berperan dalam mencegah penyakit jantung dan kanker (Schramm, 2007) dan juga memiliki aktivitas antiinflamasi (Lai, Li, Lu, & Chen, 2009). Selain itu, vitamin E dapat juga berguna untuk mencegah penyakit arteri koroner (Schramm, 2007). Vitamin E secara kimiawi berperan sebagai molekul pemutus rantai radikal bebas pada fase lipid (lipoprotein) dan membran, sehingga dapat melindungi mikroorganisme dari serangan radikal bebas. Secara umum, kekuatan reaktivitas peredaman radikal dapat dihitung berdasarkan urutan  $\alpha > \gamma > \beta > \delta$ . Selain itu, berdasarkan penelitian yang dilakukan 20 tahun terakhir, peran vitamin E selain sebagai penangkal radikal bebas telah banyak diteliti, diantaranya adalah dalam modulasi sinyal seluler, aktivitas enzimatik, dan ekspresi gen (Zingg, 2006).

$\gamma$ -Oryzanol (Gambar 2.4) merupakan senyawa ester ferulat dari triterpen alkohol dan fitosterol (Hadipernata, 2007). Senyawa ini merupakan campuran dari senyawa-senyawa steril ferulat yang biasanya terdapat pada padi, yaitu sikloartenil ferulat dan 24-metilensikloartanil ferulat (Nystrom, Achrenius, Lampi, Moreau, & Piironen, 2007)

$\gamma$ -Oryzanol telah dilaporkan dapat menurunkan kadar kolesterol dalam serum (Wilson, Nicolosi, Woolfrey, & Kritchevsky, 2007). Selain itu, senyawa ini memiliki efek proteksi terhadap peroksidasi lipid, sehingga dapat digunakan dalam pengobatan dermatitis atopik, xenoderma senile, dan mencegah kekeringan pada kulit (Xu & Godber, 2001). Senyawa ini juga tidak memiliki aktivitas genotoksik maupun aktivitas karsinogenik (Narayan, Barhale, & Raghavao, 2006). Dalam salah satu penelitian,  $\gamma$ -oryzanol juga berperan dalam pencegahan dan penyembuhan kerusakan hati yang diinduksi oleh etanol (Chotimarkorn & Ushio, 2008).

### 2.3 Reduktan dan Oksidan

Reduksi kimia didefinisikan sbagai penambahan elektron. Oksidasi kimia didefinisikan sebagai kehilangan elektron. Reduktan atau agen pereduksi merupakan zat yang berperan sebagai donor elektron, dan oleh karenanya, menyebabkan senyawa lain mengalami reduksi. Oksidan atau agen pengoksidasi merupakan senyawa yang dapat menerima elektron dan menyebabkan senyawa lain mengalami oksidasi. Dalam sebuah sistem, reaksi oksidasi tidak akan mungkin terjadi tanpa adanya reaksi reduksi dan sebaliknya. Ketika reaksi oksidasi dan reduksi terjadi pada sebuah reaksi kimia, maka reaksi tersebut disebut sebagai reaksi redoks. Reaksi redoks merupakan reaksi yang paling penting dalam oksidasi biologis, sebuah rantai reaksi kimia dimana manusia menggunakan oksigen dari udara untuk mengoksidasi senyawa kimia yang berasal dari pemecahan makanan untuk menyediakan energi untuk hidup (Halliwell & Gutteridge, 1985).

## 2.4 Antioksidan dan Pro-oksidan

### 2.4.1 Deskripsi

Reduktan dan oksidan merupakan istilah dalam sistem kimiawi, sedangkan antioksidan dan pro-oksidan merupakan istilah yang memiliki arti dalam konteks sistem biologis. Secara umum, antioksidan dapat didefinisikan sebagai zat yang ketika muncul dalam konsentrasi rendah jika dibandingkan dengan substrat yang dapat teroksidasi dapat secara signifikan mencegah atau menghambat pro-oksidan dalam memulai (menginisiasi) reaksi oksidasi pada substrat. Sedangkan pro-oksidan merupakan senyawa toksik yang dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada lipid, protein, dan asam nukleat, sehingga menyebabkan berbagai penyakit patologis. Sinonim dari pro-oksidan adalah spesies reaktif. Secara kimiawi, pro-oksidan adalah oksidan yang dapat menyebabkan kerusakan patologis. Antioksidan dapat secara efisien mereduksi pro-oksidan dengan hasil reaksi yang terbentuk tidak memiliki atau hanya memiliki toksisitas yang rendah (Halliwell & Gutteridge, 1985).

Senyawa pro-oksidan atau yang lebih dikenal sebagai senyawa radikal bebas merupakan kelompok senyawa yang memiliki sifat reaktivitas yang besar karena memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbit terluar. Senyawa radikal ini dapat digolongkan dalam dua kelompok, yaitu: (a) spesies oksigen reaktif, contohnya anion superoksida, radikal hidroksil, dan hidrogen peroksida, dan (b) spesies nitrogen reaktif, contohnya adalah nitrat oksida, dan peroksinitrat (Brambilla, 2008).

Senyawa radikal bebas yang terdapat di dalam tubuh dapat terbentuk dari metabolisme sel atas beberapa obat atau xenobiotik dan juga pemaparan tubuh atas sinar UV, asap rokok, dan polutan dari lingkungan. Meskipun memiliki perbedaan struktur, senyawa-senyawa radikal, terutama radikal hidroksil (Murray, 2003), memiliki mekanisme yang sama dalam kemampuannya untuk merusak sel dan jaringan tubuh melalui perusakan protein, DNA, dan lemak (Brambilla, 2008). Kerusakan oksidatif pada asam lemak tak jenuh pada membran sel dan lipoprotein plasma menyebabkan terbentuknya peroksida lipid, yang akan menjadi aldehid yang sangat reaktif yang dapat mengubah protein dan asam nukleat secara kimiawi. Selain itu, protein juga dapat menjadi target modifikasi kimia

langsung jika berinteraksi dengan radikal. Kerusakan oksidatif pada tirosin di protein dapat menyebabkan pembentukan dihidroksifenilalanin, yang dapat menyebabkan reaksi non-enzimatik membentuk radikal oksigen (Murray, 2003). Oleh sebab itu, tubuh memerlukan senyawa antioksidan agar radikal bebas tidak merusak sel dan jaringan tubuh.

Senyawa antioksidan dapat digolongkan ke dalam dua kelas, yaitu: (a) antioksidan preventif, yang mengurangi kecepatan inisiasi (permulaan) rantai reaksi, misalnya: enzim katalase, enzim peroksidase lainnya, serta zat-zat pembentuk kelat seperti etilendiamintetraasetat (EDTA); dan (b) antioksidan pemutus-rantai yang akan memotong perbanyakkan reaksi berantai, misalnya senyawa fenol atau amin aromatik (Murray, 2003).

#### 2.4.2 Kegunaan Antioksidan

Stres oksidatif, yang merupakan istilah bagi ketidakseimbangan kapasitas oksidatif dalam sistem tubuh, diketahui merupakan penyebab pada etiologi berbagai penyakit, seperti penyakit jantung, autisme, kanker, stroke, diabetes, demensia Alzheimer, penyakit Parkinson, arthritis, dan degenerasi muskuler. Telah diketahui bahwa kandungan antioksidan dalam makanan memiliki peranan penting dalam pencegahan penyakit metabolik tersebut. (Szydłowska-Czerniak, 2008).

Antioksidan juga dikenal dalam pencegahan inflamasi kronis dan penyakit autoimun. Selain itu, antioksidan juga berperan penting dalam pencegahan proses penuaan (*ageing*) (Halliwell & Gutteridge, 1985).

#### 2.4.3 Uji Aktivitas Antioksidan

Secara *in-vitro*, uji aktivitas antioksidan telah banyak dilakukan dengan berbagai metode. Beberapa metode uji aktivitas antioksidan secara *in-vitro* yang telah dilakukan adalah:

1. Uji diena terkonjugasi (Shivaprasad, 2005)

Metode uji diena terkonjugasi memberikan kuantifikasi yang dinamis dari diena terkonjugasi sebagai hasil dari oksidasi PUFA (*Poly unsaturated fatty acids*) dengan cara mengukur serapan UV pada 234 nm.



Prinsip dari *assay* ini adalah selama oksidasi asam linoleat, ikatan rangkap diubah menjadi ikatan rangkap terkonjugasi yang dapat dikarakterisasi oleh serapan UV kuat pada panjang gelombang 234 nm. Aktivitas tersebut dinyatakan dalam konsentrasi inhibisi ( $IC_{50}$ ).

2. Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) (Yu, 2008)

Uji peredaman radikal DPPH merupakan uji dekolorisasi untuk mengukur kemampuan antioksidan yang secara langsung bereaksi dengan (meredam) radikal DPPH dengan memantau absorbansinya pada 517 nm dengan spektrofotometer. Radikal DPPH merupakan radikal bebas dengan pusat nitrogen organik yang stabil berwarna ungu tua yang ketika tereduksi menjadi bentuk nonradikal oleh antioksidan menjadi tidak berwarna.

3. Aktivitas peredaman radikal superoksida (Yu, 2008)

Uji peredaman radikal superoksida dikembangkan untuk mengevaluasi kemampuan antioksidan hidrofilik untuk secara langsung bereaksi dengan radikal ini. Uji ini mengukur kemampuan antioksidan untuk berkompetisi dengan *nitroblue tetrazolium* (NBT) untuk meredam radikal superoksida. NBT yang berwarna kuning selama proses reduksi membentuk formazan yang berwarna biru yang diukur secara spektrofotometer pada panjang gelombang 560 nm.

4. Aktivitas penghambatan radikal hidroksil (Shivaprasad, 2005)

Kapasitas penghambatan radikal hidroksil suatu ekstrak berhubungan secara langsung dengan aktivitas antioksidannya. Metode ini melibatkan pembentukan radikal hidroksil secara *in vitro* menggunakan  $Fe^{3+}$  / askorbat / EDTA /  $H_2O_2$  dengan menggunakan reaksi Fenton. Penghambatan radikal hidroksil dengan adanya antioksidan diukur. Pada salah satu metode radikal hidroksil dibentuk secara oksidasi dibuat untuk bereaksi dengan DMSO (*dimethyl sulphoxide*), untuk menghasilkan formaldehida. Formaldehida yang dibentuk memberikan warna kuning intensif dengan pereaksi Nash (ammonium asetat 2 M dengan asam asetat 0,05 M dan asetil

aseton 0,02 M dalam aquadest). Intensitas warna kuning yang terbentuk diukur secara spektroskopi pada panjang gelombang 412 nm, dibandingkan dengan blanko negatif. Aktivitas ini dinyatakan sebagai persen penghambatan radikal hidroksil.

5. Aktivitas penghambatan radikal nitrat oksida (Shivaprasad, 2005)

Nitrogen monooksida, karena memiliki elektron tak berpasangan, diklasifikasikan sebagai radikal bebas dan memperlihatkan reaktivitas penting dengan jenis protein tertentu dan radikal bebas lainnya. Penghambatan *in vitro* dari radikal nitrogen monoksida juga diukur sebagai aktivitas antioksidan. Metode ini berdasarkan penghambatan radikal nitrogen monoksida yang dihasilkan dari Natrium Nitoprusida dalam dapar garam dan diukur dengan pereaksi Griess. Dengan adanya penghambatan, serapan dari kromofor diukur pada panjang gelombang 546 nm. Aktivitas ini menunjukkan persen reduksi nitrogen monoksida.

6. Metode kekuatan pereduksi (Shivaprasad, 2005)

Prinsip dari metode ini adalah peningkatan serapan dari reaksi pencampuran. Peningkatan serapan menunjukkan peningkatan aktivitas antioksidan. Pada metode ini senyawa antioksidan membentuk kompleks berwarna dengan kalium ferisianida, trikloroasetat dan besi (III) klorida, yang diukur pada panjang gelombang 700 nm. Peningkatan serapan dari reaksi menunjukkan penurunan kekuatan dari sampel.

7. Metode fosfomolibdenum (Shivaprasad, 2005)

Metode ini merupakan metode spektroskopi untuk penentuan kapasitas antioksidan secara kuantitatif, melalui pembentukan kompleks fosfomolibden. *Assay* berdasarkan reduksi dari Mo (VI) menjadi Mo (V) oleh sampel analit yang mengandung antioksidan pada pH asam.

8. Metode ABTS ( garam 2,2 – azinobis (3 – etilbenzotiazolin – 6 – sulfonikacid) diamonium) (Yu, 2008)

Metode peredaman radikal kation  $ABTS^{\bullet+}$  merupakan metode uji untuk mengukur kapasitas antioksidan yang secara langsung bereaksi atau meredam radikal kation ABTS yang dihasilkan dari reaksi kimia.  $ABTS^{\bullet+}$  merupakan radikal dengan pusat nitrogen dengan karakteristik warna biru kehijauan, yang ketika tereduksi oleh antioksidan menjadi bentuk nonradikal yang tidak berwarna. Metode ini mengkuantifikasi kapasitas peredaman dengan mengukur absorbansi campuran reaksi antioksidan dengan radikal pada panjang gelombang 734 nm pada waktu yang telah ditentukan dengan spektrofotometer.

9. Kapasitas serapan radikal oksigen (ORAC) (Shivaprasad, 2005)

ORAC merupakan metode analisis tes yang baru yang dapat digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan makanan dan senyawa kimia lainnya. Prosedur analisis ini mengukur kemampuan makanan, vitamin, suplemen nutrisi, atau bahan kimia lainnya untuk melindunginya terhadap radikal bebas, atau bertindak sebagai antioksidan. Uji ini dilakukan dengan menggunakan trolox (analog vitamin E) sebagai standar untuk menentukan trolox ekuivalen (TE). Nilai ORAC kemudian dihitung dari TE dan dinyatakan sebagai satuan atau nilai ORAC. Semakin tinggi nilai ORAC, semakin besar kekuatan antioksidannya. Assay ini berdasarkan pembentukan radikal bebas menggunakan AAPH (*2,2-azobis-2-amido propane dihydrochloride*) dan pengukuran dari penurunan fluoresensi dengan adanya penghambat radikal. Penelitian terbaru telah melaporkan *assay* ORAC dengan otomatisasi. Pada assay ini  $\beta$ -phycoerythrin ( $\beta$ -PE) digunakan sebagai target radikal bebas, AAPH sebagai penghasil radikal peroksil dan trolox sebagai kontrol standar. Setelah penambahan AAPH ke larutan uji, fluoresensi direkam dan aktivitas antioksidan dinyatakan sebagai trolox ekuivalen (TE).

10. Model linoleat  $\beta$ -karoten (Shivaprasad, 2005)

Metode ini adalah metode yang cepat untuk penapisan antioksidan, yang terutama berdasarkan prinsip bahwa asam linoleat yang merupakan asam lemak tak jenuh teroksidasi oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dihasilkan oleh air teroksigenasi. Produk yang dibentuk akan menginisiasi reaksi oksidasi  $\beta$ -karoten, yang akan memicu pemudaran warna. Antioksidan menurunkan perluasan pemudaran warna yang diukur pada 434 nm dan aktivitasnya diukur.

11. Metode FRAP (Shivaprasad, 2005)

FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*) merupakan salah satu uji tercepat dan sangat bermanfaat untuk analisis rutin. Aktivitas antioksidan diperkirakan dengan mengukur peningkatan serapan yang disebabkan oleh pembentukan ion  $\text{Fe}^{2+}$  dari pereaksi FRAP yang berisi TPTZ (*2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine*)  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Serapannya diukur pada 595 nm.

12. Lipid peroksidasi mikrosomal atau uji asam tiobarbiturat (Shivaprasad, 2005)

Uji TBA salah satu uji yang sering dilakukan untuk mengukur peroksidasi lipid. Metode ini melibatkan isolasi mikrosom dari hati tikus dan induksi lipid peroksida dengan ion  $\text{Fe}^{3+}$ , memicu produksi sejumlah kecil malonaldehida (MDA). TBA bereaksi dengan MDA untuk membentuk kromagen merah muda, yang dapat dideteksi secara spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm.

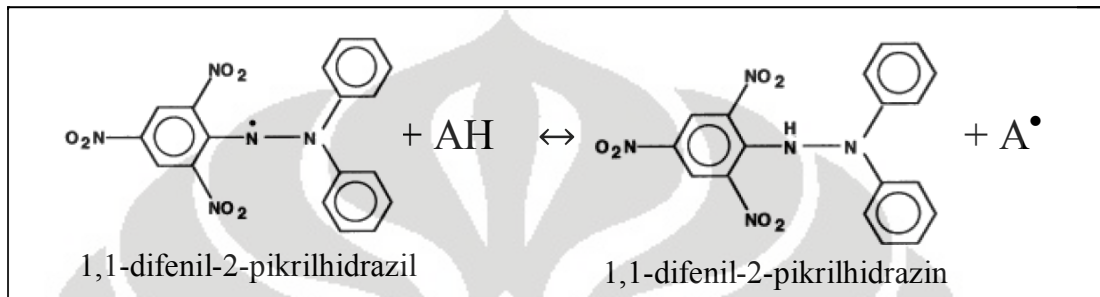
Sedangkan metode yang dipakai dalam penelitian ini, yaitu Uji Penghambatan Radikal Bebas DPPH dan Uji Kekuatan Reduksi, akan diuraikan lebih lanjut sebagai berikut:

1. Uji penghambatan radikal bebas DPPH

Senyawa DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) merupakan senyawa radikal bebas yang stabil karena sifat delokalisasi dari elektron bebas dari keseluruhan molekul sehingga molekul-molekul DPPH tidak mengalami

dimerisasi. Sifat delokalisasi elektron inilah yang memberikan warna ungu tua pada senyawa DPPH.

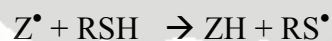
Ketika larutan DPPH dicampur dengan senyawa yang dapat memberikan atom hidrogen, maka senyawa DPPH akan tereduksi menjadi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin yang berwarna kuning akibat masih adanya gugus pikril.



[sumber: Molyneux, 2004. Telah diolah kembali]

Gambar 2.5 Reaksi Peredaman Radikal DPPH oleh Senyawa Antioksidan

Perubahan dari senyawa DPPH menjadi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin pertama kali dilakukan oleh Blois pada tahun 1958. Pada percobaannya tersebut, Blois melakukan reaksi DPPH (Z) dengan molekul sistein (RSH), seperti pada reaksi berikut:

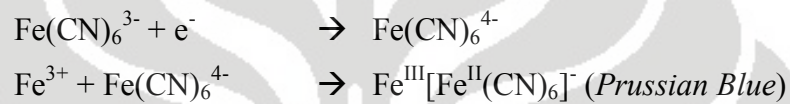


Reaksi menunjukkan terjadinya donor atom hidrogen dari sistein kepada DPPH. Kemudian molekul sistein tersebut menjadi senyawa radikal yang saling berinteraksi sesamanya membentuk senyawa yang nonradikal.

Metode uji antioksidan menggunakan DPPH ini cocok digunakan untuk melakukan skrining aktivitas antioksidan karena metode ini mudah, cepat dan sensitif. Hasil uji penghambatan radikal bebas DPPH ini dinyatakan dalam persentase inhibisi dan nilai *inhibition concentration* 50 (IC<sub>50</sub>). Nilai IC<sub>50</sub> menyatakan konsentrasi terkecil dari senyawa antioksidan yang mampu menghambat 50% senyawa radikal bebas (Molyneux, 2004 (26:2))

## 2. Metode Penentuan Kekuatan Reduksi

Metode penentuan kekuatan reduksi merupakan metode yang menunjukkan kapasitas senyawa bioaktif dalam memberikan elektron dan hal tersebut berhubungan dengan aktivitas antioksidan. Kapasitas mereduksi suatu senyawa dapat diukur dengan reduksi  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  menjadi  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ . Penambahan  $\text{Fe}^{3+}$  pada hasil reduksi menyebabkan terbentuknya kompleks *Prussian Blue* yang berwarna biru,  $\text{Fe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^-$ , yang memiliki absorbansi kuat pada panjang gelombang 700 nm (Izatt, Watt, Bartholomew, & Christensen, 1970). Reaksinya adalah sebagai berikut:



Peningkatan absorbansi dari larutan uji yang telah direaksikan mengindikasikan peningkatan kapasitas reduksi yang sejalan dengan peningkatan pembentukan kompleks (Gülçin, 2010).

### 2.4.4 Penetapan Kandungan Fenol Total dengan pereaksi Folin-Ciocalteu

Kandungan fenol total dari sampel yang mengandung antioksidan dapat diketahui dengan mengukur kapasitas reduksi dengan pereaksi Folin-Ciocalteu menggunakan spektrofotometer. Metode ini mengukur kemampuan sampel pada kondisi basa untuk mereduksi pereaksi Folin-Ciocalteu yang berwarna kuning sehingga menyebabkan perubahan warna menjadi biru gelap. Pereaksi Folin-Ciocalteu merupakan kompleks dari fosfomolybdat-fosfotungstat. Molybdenum pada kompleks ini, Mo (VI), yang memiliki warna kuning, akan tereduksi oleh anion fenolat menjadi berwarna biru (Yu, 2008).

## 2.5 Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak terlarut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstraksi mengandung berbagai senyawa aktif yang dapat larut dan dan

senyawa aktif yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat, protein, dan lain-lain.

Dalam mengekstraksi bahan alam, terdapat sejumlah metode menggunakan pelarut organik atau pelarut yang mengandung air yang dapat diterapkan. Pada ekstraksi cair-padat bahan tanaman mengalami kontak dengan pelarut. Proses keseluruhannya bersifat dinamis dan dapat disederhanakan kedalam beberapa tahap. Pada tahap pertama misalnya pelarut harus berdifusi ke dalam sel, pada tahap selanjutnya pelarut harus dapat melarutkan metabolit tanaman, dan akhirnya harus berdifusi keluar sel meningkatkan jumlah metabolit yang terekstraksi. Beberapa metode yang sering digunakan dalam ekstraksi bahan alam antara lain (*Parameter standar*, 2000):

### 2.5.1 Cara Dingin

#### 1. Maserasi

Metode ini sederhana, tetapi masih digunakan secara luas. Prosedurnya dilakukan dengan merendam bahan tanaman (*simplisia*) dalam pelarut yang sesuai dalam wadah tertutup pada suhu kamar. Metode ini sesuai baik untuk ekstraksi pendahuluan maupun untuk jumlah besar. Pengadukan sesekali ataupun secara konstan (dengan menggunakan alat pengocok mekanik untuk menjamin kehomogenan) dapat meningkatkan kecepatan ekstraksi. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai keseimbangan antara konsentrasi metabolit dalam ekstrak dan dalam bahan tanaman. Setelah ekstraksi, residu bahan tanaman (*maserat*) harus dipisahkan dari pelarut. Hal ini melibatkan proses pemisahan kasar dengan cara dekantasi, biasanya diikuti dengan tahap penyaringan. Sentrifugasi mungkin diperlukan jika serbuk terlalu halus untuk disaring. Untuk memastikan ekstraksi yang menyeluruh, umumnya dilakukan maserasi pendahuluan, yang diikuti pemisahan dan penambahan pelarut baru (*fresh solvent*) ke maserat. Hal ini bisa dilakukan secara periodik dengan semua filtrat dikumpulkan.

Kelemahan yang utama dari maserasi adalah prosesnya cukup memakan waktu yang lama, dapat berlangsung beberapa jam sampai

beberapa minggu. Ekstraksi secara menyeluruh juga dapat menghabiskan sejumlah besar volume pelarut dan dapat berpotensi hilangnya metabolit. Selain itu, beberapa senyawa tidak terekstraksi secara efisien jika kurang terlarut pada temperatur kamar. Di lain pihak, dikarenakan ekstraksi dilakukan pada temperatur kamar, maserasi tidak menyebabkan degradasi dari metabolit yang tidak tahan panas.

## 2. Perkolasi

Pada perkolasi, serbuk tanaman direndam dalam pelarut pada sebuah alat perkolator. Perkolasi cukup sesuai baik untuk ekstraksi pendahuluan maupun dalam jumlah besar. Seperti pada maserasi, untuk mengekstrak secara menyeluruh dilakukan dengan penambahan pelarut yang baru (*fresh solvent*) dan semua ekstrak dikumpulkan. Untuk meyakinkan perkolasi sudah sempurna, perkolat dapat diuji adanya metabolit dengan reagen spesifik.

### 2.5.2. Cara Panas

#### 1. Soxhlet

*Soxhlet* adalah ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

#### 2. Refluks

Ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Kekurangan yang utama dari metode ini adalah terdegradasinya komponen yang tidak tahan panas.



### 3. Digesti

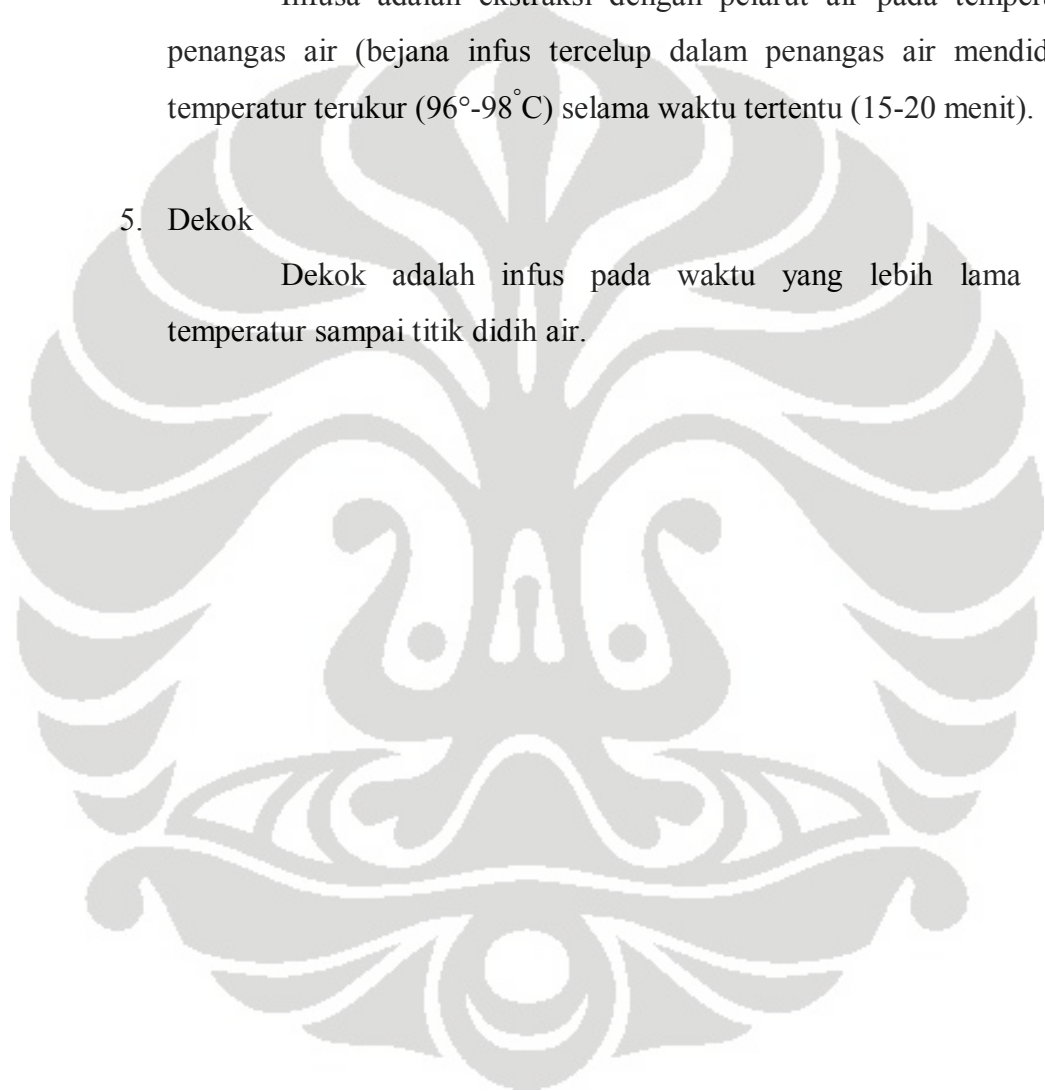
Adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40°-50°C.

### 4. Infusa

Infusa adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih), temperatur terukur (96°-98°C) selama waktu tertentu (15-20 menit).

### 5. Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama dan temperatur sampai titik didih air.



## BAB 3

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Bahan

Simplisia dedak padi dari 10 varietas, yaitu varietas IR-64, IR-42, Ciherang, Cibogo, Cigeulis, Sintanur, INPARI-1, INPARI-5, INPARI-10, dan OM-4495 (Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Subang), Reagen Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), DPPH (1,1-difenil-2-pikril hidrazil) (Wako), Butil Hidroksi Toluen (BHT) (Merck), Natrium Karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Merck), Kalium dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), asam trikloroasetat (TCA) (Merck), Besi (III) Klorida ( $\text{FeCl}_3$ ) (Merck), Kalium Heksasianoferat ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) (Merck), Natrium Hidroksida (NAOH) (Merck), aquades, dan metanol.

#### 3.2 Alat

Ayakan B40, spatel logam, timbangan analitik (Acculab), kertas perkamen, oven, labu Erlenmeyer 300 ml (Pyrex), gelas piala (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), kertas saring, termometer (Yenaco), batang pengaduk, labu ukur (Pyrex), lemari pendingin, pipet Ependorf (Socorex), tip pipet, balon pipet (Merriemfield), pipet volume (Pyrex), vorteks (Health H-VM-300 Touch), kuvet, spektrofotometer UV-Vis (Jasco V-530), dan tabung reaksi.

#### 3.3 Cara Kerja

##### 3.3.1 Stabilisasi Simplisia (Lai, Li, Lu, & Chen, 2009)

Sebelum dilakukan proses stabilisasi, mula-mula simplisia diayak terlebih dahulu dengan menggunakan ayakan B40. Stabilisasi dedak padi dilakukan dengan memanaskan sampel dedak sebanyak 100 gram pada oven dengan suhu  $120^\circ\text{C}$  selama tiga menit, kemudian sampel dibiarkan pada temperatur kamar selama 12 jam. Proses ini dilakukan tiga kali untuk memastikan bahwa enzim lipase endogen telah terinaktivasi.

### 3.3.2 Ekstraksi Simplisia (Lai, Li, Lu & Chen, 2009)

Seratus gram dedak yang telah distabilisasi diekstraksi secara maserasi dengan 100 ml metanol selama tiga jam sambil diaduk. Selanjutnya, filtrat disaring dengan menggunakan kertas saring. Residu yang didapat kemudian diekstraksi kembali sebanyak dua kali. Prosedur ekstraksi tersebut dilakukan tiga kali untuk masing-masing varietas dedak padi. Ekstrak yang didapat dari hasil ekstraksi pertama, kedua, dan ketiga kemudian dicampur dan ditimbang, hasilnya dinyatakan dalam persen berat simplisia. Ekstrak yang telah didapat kemudian disimpan pada wadah tertutup pada temperatur 4°C selama dua minggu.

### 3.3.3 Pengukuran Kandungan Fenol Total (BPOM, 2008)

Pengukuran kandungan fenol total pada ekstrak dilakukan dengan menggunakan pereaksi Folin-Ciocalteu. Standar yang digunakan adalah asam galat. Dalam penetapan kandungan fenol total ini, dilakukan tiga langkah, yaitu penetapan waktu optimum dan panjang gelombang maksimum asam galat; pembuatan kurva kalibrasi standar asam galat; dan pengukuran serapan sampel. Sebelum dilakukan penetapan kadar fenol total, dilakukan terlebih dahulu pembuatan larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5%  $\text{b/v}$  yang akan digunakan

#### 3.3.3.1 Pembuatan Larutan $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 7,5% $\text{b/v}$

Larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5%  $\text{b/v}$  dibuat dengan cara melarutkan 7,5 gram  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ke dalam 100 ml aquadest bebas  $\text{CO}_2$ .

#### 3.3.3.2 Penetapan Waktu Optimum dan Panjang Gelombang Maksimum Asam Galat

Terlebih dahulu dibuat larutan induk asam galat dengan konsentrasi 100 ppm. Larutan induk asam galat tersebut diambil 1,0 ml dengan menggunakan pipet volume dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml. Kedalam labu ukur 10,0 ml tersebut ditambahkan 500  $\mu\text{l}$  pereaksi Folin-Ciocalteu, lalu dikocok hingga homogen selama 1 menit. Sebelum menit ke-8, ditambahkan 4,0 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5%  $\text{b/v}$ , dikocok selama 1 menit dan ditambahkan aquadest dan dikocok hingga homogen. Selanjutnya dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer

sinar tampak pada panjang gelombang 800 hingga 400 nm untuk penentuan panjang gelombang maksimum dan dilakukan setiap 15 menit hingga menit ke-150 untuk penentuan waktu optimum.

#### 3.3.3.3 Pembuatan Kurva Kalibrasi

Dari larutan induk asam galat 100 ppm yang telah dibuat sebelumnya, diambil dengan pipet volume masing-masing 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml; 2,5 ml; 3,0 ml; 3,5 ml; 4,0 ml; dan 4,5 ml. Kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml. Kedalam labu ukur 10,0 ml tersebut masing-masing ditambahkan 500 µl pereaksi Folin-Ciocalteu, lalu dikocok hingga homogen selama 1 menit. Sebelum menit ke-8, masing-masing labu ukur ditambahkan 4,0 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5% <sup>b/v</sup>, dikocok selama 1 menit dan ditambahkan aquadest dan dikocok hingga homogen. Selanjutnya dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer sinar tampak pada panjang gelombang maksimum dan pada waktu optimum yang telah didapat dari langkah sebelumnya.

#### 3.3.3.4 Pengukuran Serapan Sampel

Dibuat 100 ppm larutan ekstrak. Larutan ekstrak tersebut diambil 1,0 ml dengan menggunakan pipet volume dan kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml. Kedalam labu ukur 10,0 ml tersebut ditambahkan 500 µl pereaksi Folin-Ciocalteu, lalu dikocok hingga homogen selama 1 menit. Sebelum menit kedelapan, ditambahkan 4,0 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5% <sup>b/v</sup>, dikocok selama 1 menit dan ditambahkan aquadest dan dikocok hingga homogen. Selanjutnya dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum dan waktu optimum untuk pengukuran asam galat. Hasil pengukuran ini dinyatakan sebagai berat setara dengan asam galat tiap berat ekstrak.

#### 3.3.4 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode Peredaman Radikal DPPH

##### 3.3.4.1 Pembuatan Larutan DPPH (1,1-difenil-2-pikril hidrazil)

Larutan baku DPPH dibuat dengan cara menimbang seksama lebih kurang 5,0 mg DPPH di atas kertas perkamen yang telah ditara. Kemudian DPPH yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 ml lalu DPPH tersebut

dilarutkan dengan metanol teknis yang telah didestilasi dan dicukupkan volumenya hingga batas labu ukur sehingga diperoleh larutan DPPH dengan konsentrasi 100 ppm. Labu ukur kemudian dilindungi dengan kertas alumunium dan disimpan pada suhu 4°C dalam lemari pendingin. Larutan baku ini harus selalu dibuat baru setiap hari ketika akan dilakukan pengujian.

#### 3.3.4.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Pengukuran

Panjang gelombang maksimum pengukuran ditentukan dengan cara mengukur serapan larutan DPPH dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 800 nm hingga 350 nm. Larutan DPPH 100 ppm yang telah dibuat dipipet sebanyak 1,0 ml, lalu ditambahkan metanol 4,0 ml. Campuran tersebut dihomogenkan dengan menggunakan vorteks, lalu diinkubasi selama 30 menit pada temperatur kamar. Setelah inkubasi, dilakukan pengukuran serapan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 800 nm hingga 350 nm. Panjang gelombang yang memberikan serapan maksimum merupakan panjang gelombang maksimum yang akan digunakan pada pengukuran sampel.

#### 3.3.4.3 Uji Penghambatan Radikal DPPH pada Sampel

Ekstrak ditimbang sebanyak 20 mg dan dimasukkan ke dalam labu takar 10,0 ml dan ditambahkan dengan metanol hingga garis batas labu takar sehingga didapat larutan induk ekstrak sampel dengan konsentrasi 2000 ppm. Dari larutan induk tersebut diambil sebanyak 1,0 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml; dan 5,0 ml dengan menggunakan pipet volume dan masing-masing dimasukkan ke dalam labu takar 10,0 ml. Selanjutnya ke dalam labu takar tersebut ditambahkan metanol hingga batas sehingga didapat larutan uji dengan konsentrasi 200 ppm; 400 ppm; 600 ppm; 800 ppm; dan 1000 ppm.

Dari masing-masing larutan dengan berbagai konsentrasi tersebut, diambil 1,0 ml larutan uji, lalu ditambahkan 1,0 ml larutan DPPH 100 ppm dan metanol 3,0 ml. Campuran tersebut dihomogenkan dengan menggunakan vorteks, lalu diinkubasi selama 30 menit pada temperatur kamar. Setelah inkubasi, kemudian dilakukan pengukuran serapan dengan menggunakan spektrofotometer

pada panjang gelombang maksimum yang telah ditetapkan sebelumnya. Pengukuran dilakukan tiga kali.

#### 3.3.4.4 Perhitungan Persentase Inhibisi dan Nilai IC<sub>50</sub>

Persentase inhibisi dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \left[ 1 - \left( \frac{A \text{ sampel}}{A \text{ kontrol}} \right) \right] \times 100\%$$

Sedangkan nilai IC<sub>50</sub> ditentukan dari persamaan garis kuadrat,  $y = a + bx$ , yang terbentuk dari data persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi. Dalam persamaan tersebut, nilai x adalah konsentrasi zat yang diukur, sedangkan nilai y merupakan serapan yang terukur dari sampel yang sedang diuji.

#### 3.3.5 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode Penentuan Kekuatan Reduksi

##### 3.3.5.1 Pembuatan Dapar Fosfat pH 6,6 (*Farmakope Indonesia*, 1995)

Sebanyak 50 ml kalium dihidrogenfosfat 0,2 M dimasukkan kedalam labu tentukur 200 ml, lalu ditambahkan 16,4 ml larutan natrium hidroksida 0,2 M, dan selanjutnya ditambahkan aquades hingga batas labu tentukur.

##### 3.3.5.2 Pembuatan larutan kalium heksasianoferrat 1% <sup>b/v</sup>

Larutan kalium heksasianoferrat 1% <sup>b/v</sup> dibuat dengan cara melarutkan 1 gram K<sub>3</sub>(Fe[CN]<sub>6</sub>) ke dalam 100 ml aquades.

##### 3.3.5.3 Pembuatan larutan asam trikloroasetat 1%

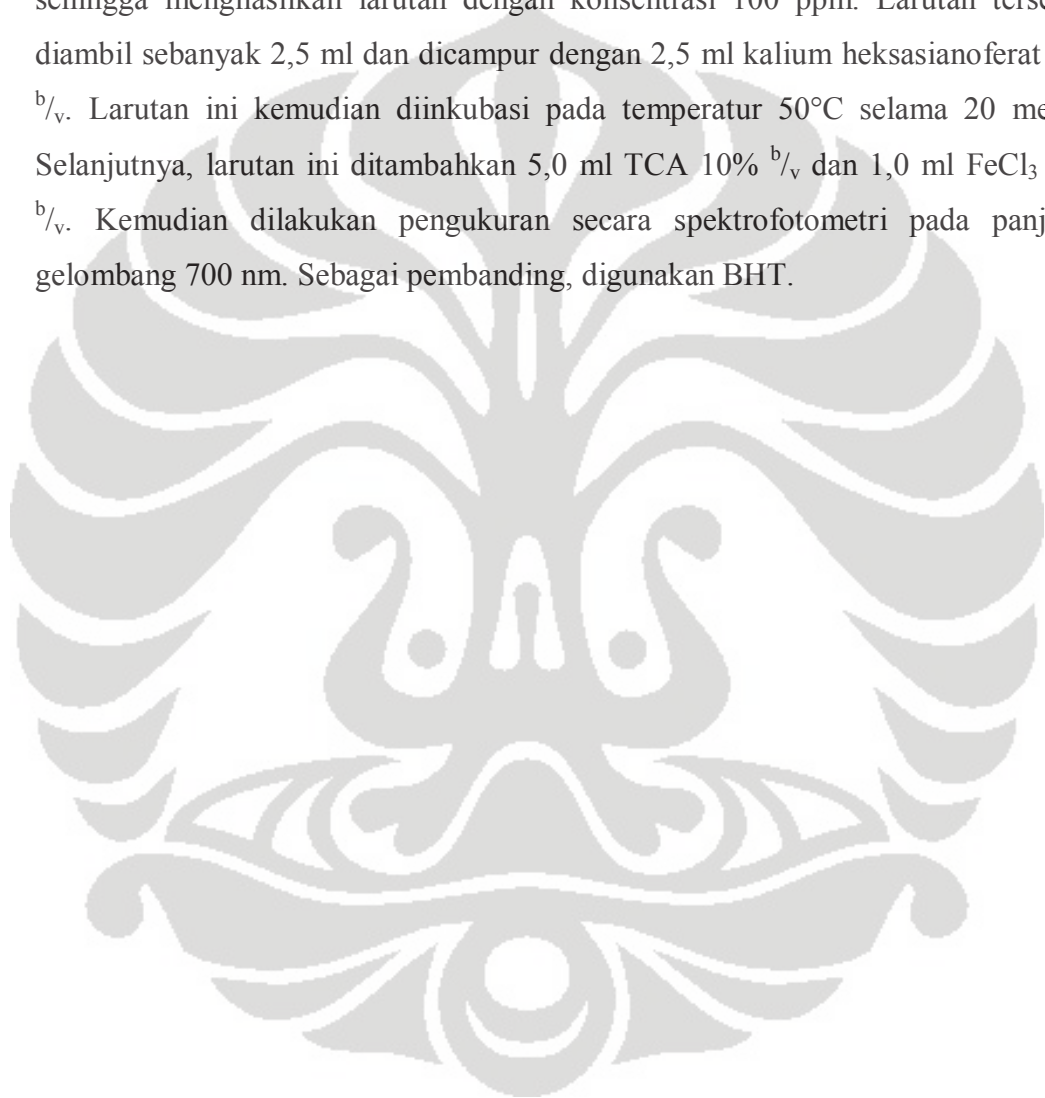
Larutan asam trikloroasetat 1% <sup>b/v</sup> dibuat dengan cara melarutkan 1 gram asam trikloroasetat ke dalam 100 ml aquades.

##### 3.3.5.4 Pembuatan larutan FeCl<sub>3</sub> 10% <sup>b/v</sup>

Larutan FeCl<sub>3</sub> 10% <sup>b/v</sup> dibuat dengan cara melarutkan 10 gram FeCl<sub>3</sub> ke dalam 100 ml aquades.

### 3.3.5.5 Pengukuran Serapan Sampel

Ekstrak mula-mula ditimbang sebanyak 20 mg, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10,0 ml. Setelah dicukupkan volumenya dengan dapar fosfat pH 6,6 sehingga menghasilkan larutan dengan konsentrasi 2000 ppm, larutan tersebut kemudian diambil 0,5 ml dengan menggunakan pipet volume, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan dicukupkan volumenya dengan dapar fosfat pH 6,6 sehingga menghasilkan larutan dengan konsentrasi 100 ppm. Larutan tersebut diambil sebanyak 2,5 ml dan dicampur dengan 2,5 ml kalium heksasianoferat 1% <sup>b</sup>/<sub>v</sub>. Larutan ini kemudian diinkubasi pada temperatur 50°C selama 20 menit. Selanjutnya, larutan ini ditambahkan 5,0 ml TCA 10% <sup>b</sup>/<sub>v</sub> dan 1,0 ml FeCl<sub>3</sub> 1% <sup>b</sup>/<sub>v</sub>. Kemudian dilakukan pengukuran secara spektrofotometri pada panjang gelombang 700 nm. Sebagai pembanding, digunakan BHT.



## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Stabilisasi Simplisia

Simplisia yang diperoleh terlebih dahulu diayak dengan pengayak, dengan tujuan agar simplisia terpisah dari sekam dan beras pecah yang masih terbawa bersama simplisia, karena memungkinkan untuk mengganggu pengukuran.

Selanjutnya, simplisia distabilisasi dengan cara dipanaskan dalam oven 120°C selama 3 menit, kemudian simplisia dibiarkan selama 12 jam dan proses stabilisasi diulangi hingga tiga kali. Tujuan dari stabilisasi ini adalah untuk menginaktivasi enzim lipase yang ada pada simplisia yang dapat mengubah lipid menjadi asam lemak bebas, sehingga akan menyebabkan ketengikan pada ekstrak dan dapat mengganggu pengukuran.

#### 4.2 Ekstraksi Simplisia

Ekstraksi simplisia dilakukan dengan cara dingin, yaitu secara maserasi dengan menggunakan metanol sebagai pelarut. Ekstrak yang telah didapat dikumpulkan dan disimpan pada temperatur 4°C. Bobot masing-masing ekstrak dapat dilihat pada Tabel 4.1. Ekstrak tersebut akan digunakan dalam pengujian selanjutnya.

Ekstraksi simplisia dilakukan dengan menggunakan cara dingin, yaitu secara maserasi, untuk mencegah kerusakan senyawa aktif pada ekstrak akibat temperatur yang terlalu tinggi yang digunakan selama penyarian. Pelarut yang digunakan adalah senyawa semipolar, yaitu metanol. Metanol dipilih sebagai pelarut karena kepolarannya yang mendekati kepolaran senyawa yang diekstrak, serta dari beberapa penelitian terdahulu disebutkan bahwa pelarut metanol merupakan pelarut yang terbaik dalam menyari senyawa kimia dalam dedak padi (Lai, Li, Lu, & Chen, 2009). Penyarian dilakukan selama tiga jam, kemudian ekstrak yang didapat dipisahkan dari ampas dengan cara penyaringan. Setelah



disaring, ampas ditambahkan lagi pelarut, kemudian proses ekstraksi diulangi kembali hingga tiga kali agar jumlah senyawa aktif yang tersari dapat lebih banyak.

#### 4.3 Pengukuran Kadar Fenol Total

Pengukuran kadar fenol total dengan menggunakan pereaksi Folin-Ciocalteu dilakukan dengan tiga langkah, yaitu penetapan waktu optimum dan serapan maksimum standar asam galat, pembuatan kurva kalibrasi standar asam galat, dan pengukuran pajang gelombang sampel. Meskipun mekanisme pasti tentang reaksi yang terjadi pada Pereaksi Folin-Ciocalteu belum diketahui, tetapi pada dasarnya adalah reduksi senyawa fosfomolybdotungstat menjadi heteropolimolybdenum yang berwarna biru (Walker, 2002).

##### 4.3.1 Penetapan Waktu Optimum dan Panjang Gelombang Maksimum Asam Galat

Dalam penetapan kadar fenol total, larutan standar asam galat dengan konsentrasi 10 ppm yang telah dipersiapkan direaksikan dengan pereaksi Folin-Ciocalteu dalam suasana basa dan diukur serapannya pada panjang gelombang 800-400 nm untuk menentukan panjang gelombang yang memberikan serapan maksimum dan dilakukan setiap 15 menit hingga menit ke-150 untuk menentukan waktu optimum pengukuran. Hasilnya diketahui bahwa panjang gelombang yang memberikan serapan maksimum adalah pada 731 nm (Gambar 4.1) dan waktu optimum pengukuran adalah pada menit ke-105. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.2.

##### 4.3.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi Standar Asam Galat

Pembuatan kurva kalibrasi standar asam galat dilakukan dengan mengukur serapan yang diberikan oleh larutan uji dengan konsentrasi 10 ppm; 15 ppm; 20 ppm; 25 ppm; 30 ppm; dan 45 ppm pada panjang gelombang maksimum, yaitu 731 nm, dan pada waktu optimum, yaitu menit ke-105 setelah reaksi. Hasilnya adalah didapat kurva kalibrasi dengan persamaan regresi linear  $y = 0,18549 + 0,00883x$ . Untuk data lengkap, dapat dilihat pada tabel 4.3.

Persamaan regresi linear yang didapat dari kurva kalibrasi tersebut selanjutnya akan digunakan untuk menghitung kadar fenol total dalam sampel.

#### 4.3.3 Pengukuran Serapan Sampel

Larutan sampel ekstrak dengan konsentrasi 100 ppm. Kemudian setelah dilakukan reaksi dengan pereaksi Folin-Ciocalteu, larutan uji tersebut diukur serapannya pada panjang gelombang 731 nm dan pada menit ke-105. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 4.4. Dari nilai serapan yang diperoleh, kadar fenol total masing-masing sampel dapat dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear standar asam galat yang didapat sebelumnya. Dari hasil pengujian, diketahui bahwa varietas dedak padi yang memiliki kandungan fenol terbanyak yang dinyatakan setara dengan asam galat adalah pada dedak dari padi varietas OM-4495 dengan kandungan fenol total sebanyak 71,85 mg setara asam galat tiap gram simplisia.

### 4.4 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode Penghambatan Radikal DPPH

#### 4.4.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Pengukuran

Hasil pengukuran serapan larutan DPPH dengan konsentrasi 100 ppm yang telah ditambahkan dengan metanol sebanyak 4 ml dan diinkubasi selama 30 menit menunjukkan bahwa serapan maksimum diberikan pada panjang gelombang 514,5 nm, seperti yang dapat dilihat pada Gambar 4.2. Dengan demikian, panjang gelombang yang akan digunakan dalam pengukuran sampel adalah panjang gelombang maksimum tersebut adalah 514,5 nm. Panjang gelombang tersebut tidak jauh berbeda dengan yang digunakan pada literatur, yaitu berkisar antara 514 nm hingga 520 nm. Perbedaan tersebut terjadi karena perbedaan deteksi alat pengukuran yang digunakan

#### 4.4.2 Uji Penghambatan Radikal DPPH pada Sampel

Setelah ditetapkan panjang gelombang maksimum pengukuran, maka dilakukanlah pengukuran serapan sampel Hasil uji penghambatan radikal DPPH pada ekstrak sampel dapat dilihat pada Tabel 4.5 sampai Tabel 4.15. Dari sampel yang diuji, dapat dilihat bahwa ekstrak sampel yang memberikan  $IC_{50}$  paling

rendah adalah ekstrak sampel dedak padi varietas IR-64, yaitu sebanyak 350,64 ppm.

Pada metode uji antioksidan dengan menggunakan radikal DPPH ini, serapan yang semakin menurun menandakan bahwa peredaman radikal DPPH semakin baik. Hal tersebut karena produk reaksi antar radikal DPPH dan antioksidan merupakan senyawa yang berwarna kuning, yang akan menurunkan nilai serapan dari larutan DPPH yang berwarna biru-ungu.

Dalam pengukuran  $IC_{50}$  yang baik, sebaiknya konsentrasi yang digunakan dalam pengukuran adalah konsentrasi di bawah dan di atas konsentrasi yang diperkirakan memberikan nilai  $IC_{50}$ , yang dapat diketahui dari uji pendahuluan. Akan tetapi, karena ekstrak yang akan diukur berbentuk cair sehingga sulit dalam penimbangan dan karena dikhawatirkan ekstrak yang digunakan akan terlalu banyak, maka digunakan metode ekstrapolasi berdasarkan kurva kalibrasi yang diperoleh.

#### 4.5 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode Penentuan Kekuatan Reduksi

Uji aktivitas antioksidan dengan metode kekuatan reduksi dilakukan dengan mengukur serapan larutan uji pada panjang gelombang 700 nm setelah sebelumnya larutan uji ditambahkan  $K_3[Fe(CN)_6]$  dan  $FeCl_3$ . Uji ini dilakukan dalam suasana pH 6,6 karena reaksi berjalan optimal pada kondisi tersebut. Adapun penambahan TCA setelah inkubasi dilakukan untuk mengakhiri proses reaksi dengan mengubah kondisi pH larutan (Lue, *et al.*, 2010). Hasil yang didapat kemudian dibandingkan dengan standar BHT dan dinyatakan dalam persentase kekuatan reduksi standar BHT. Dari hasil pengukuran (tabel 4.17), diketahui bahwa ekstrak sampel yang memiliki kekuatan reduksi paling besar adalah ekstrak sampel dedak padi varietas IR-42 yang memiliki kekuatan reduksi 39,23% dari kekuatan reduksi standar BHT.

Berkebalikan dengan Metode Peredaman DPPH, pada metode penentuan kekuatan reduksi, semakin besar nilai serapan yang dihasilkan menunjukkan semakin baik kekuatan reduksi sampel. Hal tersebut karena hasil reaksi antara  $Fe(CN)_6^{3-}$  yang tereduksi menjadi  $Fe(CN)_6^{4-}$  dengan  $Fe^{3+}$  adalah kompleks senyawa yang berwarna biru, yang lebih dikenal dengan nama kompleks *Prussian*

*Blue*, yang akan meningkatkan nilai serapan larutan uji yang semula berwarna kuning.

Pada pengujian dengan metode ini, terdapat beberapa cara perhitungan, diantaranya adalah dengan membandingkan serapan sampel dengan serapan standar, dengan menentukan konsentrasi yang memberikan nilai serapan 0,5 atau dengan menghitung nilai  $EC_{50}$ . Pada penelitian ini, yang digunakan dalam menghitung nilai kekuatan reduksi adalah dengan membandingkan serapan yang diberikan oleh standar.

Dalam uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode Penentuan Kekuatan Reduksi, hasil yang didapat sedikit berbeda dengan uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode Peredaman Radikal DPPH. Hal tersebut diduga disebabkan oleh beberapa faktor. Diantaranya adalah adanya perbedaan kandungan senyawa-senyawa pada masing-masing sampel. Salah satu senyawa yang diduga berperan penting adalah asam fitat. Asam fitat diketahui memiliki kemampuan untuk mengikat logam, terutama logam dalam bentuk kation polivalen, termasuk  $Fe^{3+}$ . Ikatan yang terbentuk adalah ikatan khelat (Graf, 1983). Dalam penentuan kekuatan reduksi,  $Fe^{3+}$ , yang seharusnya berikatan dengan  $Fe(CN)_6^{4-}$  yang merupakan hasil reduksi dari  $Fe(CN)_6^{3-}$ , akan terganggu oleh adanya asam fitat yang juga akan berikatan dengan  $Fe^{3+}$ . Hal tersebut yang menghasilkan perbedaan hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode peredaman DPPH dan metode kekuatan reduksi.

## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 1.1 Kesimpulan

1. Ekstrak metanol dedak dari beberapa varietas padi (*Oryza sativa* Linn.) yang ditanam di Indonesia mengandung senyawa fenol, yang kadarnya diukur melalui metode Folin-Ciocalteu berkisar antara 37 hingga 71 mg setara asam galat tiap gram simplisia, dengan kandungan terbesar adalah pada dedak padi varietas OM-4495 yaitu 71,84 mg setara asam galat tiap gram simplisia.
2. Ekstrak metanol dedak dari beberapa varietas padi (*Oryza sativa* Linn.) yang ditanam di Indonesia memberikan nilai  $IC_{50}$  pada uji peredaman radikal DPPH, dengan yang tertinggi yaitu pada dedak padi varietas IR-64 dengan metode peredaman radikal DPPH yang memberikan nilai  $IC_{50}$  sebesar 350,64 ppm. Sedangkan dengan uji kekuatan reduksi, dedak padi varietas IR-42 memberikan hasil terbaik dengan nilai kekuatan reduksi sebesar 39,33% dibandingkan dengan standar BHT.

#### 1.2 Saran

Mengingat bahwa antioksidan memiliki banyak kegunaan dalam pencegahan dan pengobatan penyakit, maka penelitian tentang manfaat dedak padi tidak hanya terhenti pada pengujian aktivitas antioksidan saja, akan tetapi juga dapat dikembangkan dalam hal pemurnian, pengawetan, hingga penelitian terhadap manfaat pencegahan dan pengobatan penyakit, diantaranya adalah obesitas, penyakit-penyakit kardiovaskuler, diabetes mellitus, penyakit-penyakit degeneratif, dan lain-lain.

## DAFTAR ACUAN

- Amirkhizi, F., *et al.* (2010). Evaluation of Oxidative Stress and Total Antioxidant Capacity in Women with General and Abdominal Adiposity. *Obes Res Clin Pract* , 8-16.
- Backer, C. A., & Van Den Brink Jr., R. C. (1968). *Flora of Java*. Groningen: Wolters-Noordhoff N.V.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (2008). *Monografi Ekstrak Tanaman Obat Indonesia*. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Badan Standardisasi Nasional (1996). *SNI 01-3798-1996/Rev.92*. Jakarta: Dewan Standardisasi Nasional.
- Badan Standardisasi Nasional (2008). *SNI 6128 : 2008*. Jakarta: Dewan Standardisasi Nasional.
- Balai Besar Penelitian Tanaman Padi (2009). *Deskripsi Varietas Padi*. Subang: Balai Besar Penelitian Tanaman Padi.
- Beltowski, J., *et al.* (2005). Differential Effect of Antioxidant Treatment on Plasma and Tissue Paraoxonase Activity in Hyperleptinemic Rats. *Pharmacol Res* , 51, 523-532.
- Beltowski, J., *et al.* (2000). The Effect of Dietary-Induced Obesity on Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzymes, and Total Plasma Antioxidant Capacity. *J Physiol Pharmacol* , 883-896.
- Brambilla, D. *et al.* (2008). The Role of Antioxidant Supplement in Immune System, Neoplastic, and Neurodegenerative Disorders: A Point of View for an Assesment of the Risk/Benefit Profile. *Nutr J* (7), 29-37.
- Chotimarkorn, C., & Ushio, H. (2008). The Effect of Trans-Ferulic Acid and Gamma-Oryzanol on Ethanol-Induced Liver Injury in C57BL Mouse. *Phytomed* 15 , 951–958.

- Chrysohoou, C. *et al.* (2007). The Implication of Obesity on Total Antioxidant Capacity Inapparently Healthy Men and Women: The ATTICA Study. *Nutr Metab Cardiovas Dis* , 17, 590-517.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). Farmakope Indonesia Indonesia edisi IV. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Food and Agriculture Organization of United Nation. (n.d.) 21 April 2010. [http://www.fao.org/es/esc/en/20953/21026/21631/highlight\\_23001en.html](http://www.fao.org/es/esc/en/20953/21026/21631/highlight_23001en.html)>.
- Formiguera, X., & Canton, A. (2004). Obesity: Epidemiology and Clinical Aspects. *Best Pract Res Clin Gastroent* , 18 (6), 1125-1146.
- Furukawa, S. *et al.* (2004). Increased Oxidative Stress in Obesity and Its Impact on Metabolic Syndrome. *J Clin Invest* , 1752-1761.
- Graf, E. (1983). Calcium Binding to Phytic Acid. *J Agric Food Chem* , 851-855.
- Grist, D.H. (1959). Rice, 3<sup>rd</sup> Edition. London: Longmans, Green and Co. Ltd.
- Gülçin, I. B. (2010). Polyphenol Contents and Antioxidant Activity of Lyophilized Aqueous Extract of Propolis from Erzurum, Turkey. *Food Chem Toxicol* .
- Hadipernata, M. (2007). Mengolah Dedak Menjadi Minyak (*Rice Bran Oil*). *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian* , 29 (7), 8-10.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1985). *Free Radical in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press.
- Heyne, K. (1987). *Tumbuhan Berguna Indonesia* (Vol. I). Jakarta: Departemen Kehutanan Republik Indonesia.
- International Rice Research Institute (2009). *Rice Science for better World*. Los Banos: International Rice Research Institute.
- Kementerian Pertanian Republik Indonesia (2010). *Basisdata Statistik Pertanian*.: 3 April 2010. [http://database.deptan.go.id/bdsp/hasil\\_kom.asp](http://database.deptan.go.id/bdsp/hasil_kom.asp)
- Lai, P., *et al.* (2009). Phytochemicals and Antioxidant Properties of Solvent Extracts from Japonica Rice Bran. *Food Chem*, 117 (3), 538-544.

- Lue, Bena-marie, *et al.* (2010). Antioxidant Properties of Modified Rutin Esters by DPPH, Reducing Power, Iron Chelation and Human Low Density Lipoprotein Assays. *Food Chem*, 123, 221-230.
- Molyneux, P. (2004). The Use of Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin J Sci Tech* , 211-219.
- Murray, R. K. (2003). *Biokimia Harper ed. 5.* (Hartono A., Penerjemah.). Jakarta: EGC.
- Narayan, A. V., Barhale, R. S., & Raghavao, K. S. (2006). Extraction and Purification of Oryzanol from Rice Bran Oil and Rice Bran Oil Soapstock. *JAOCS* 83(8) , 663-670.
- Nystrom, L., *et al.* (2007). A Comparison of the Antioxidant Properties of Steryl Ferulates with Tocopherol at High Temperature. *Food Chem* 101 , 947-954.
- Puchau, B. *et al.* (2010). Dietary Total Antioxidant Capacity is Negatively Associated with Some Metabolic Syndrome Features in Healthy Young Adults. *Nutr* , 26, 534-541.
- Schramm, R. *et al.* (2007). Fractionation of the Rice Bran Layer and Quantification of Vitamin E, Oryzanol, Protein, and Rice Bran Saccharide. *J Biol Eng* , 1-9.
- Sen, C. K., Khanna, S., & Roy, S. (2006). Tocotrienols: Vitamin E Beyond Tocopherols. *Life Sci.* 78 (18) , 2088-2098.
- Shivaprasad, H. N. (2005). *In-Vitro Models for Antioxidant Activity Evaluation: A Review.* 5 Januari 2010. Pharmainfo.net.  
<http://www.pharmainfo.net/reviews/vitro-models-antioxidant-activity-evaluation-review>
- Slavin, J. (2004). Beyond Fiber: Whole Grains and Health. Dalam M. S. Meskin, *et al.*, *Phytochemicals : Nutrient-Gene Interaction.* Boca Raton: CRC Press.
- Szydłowska-Czerniak, A. D. (2008). Determination of Antioxidant Capacities of Vegetable Oils by Ferric-Ion Spectrophotometric Methods. *Talanta* 78, 899-905.



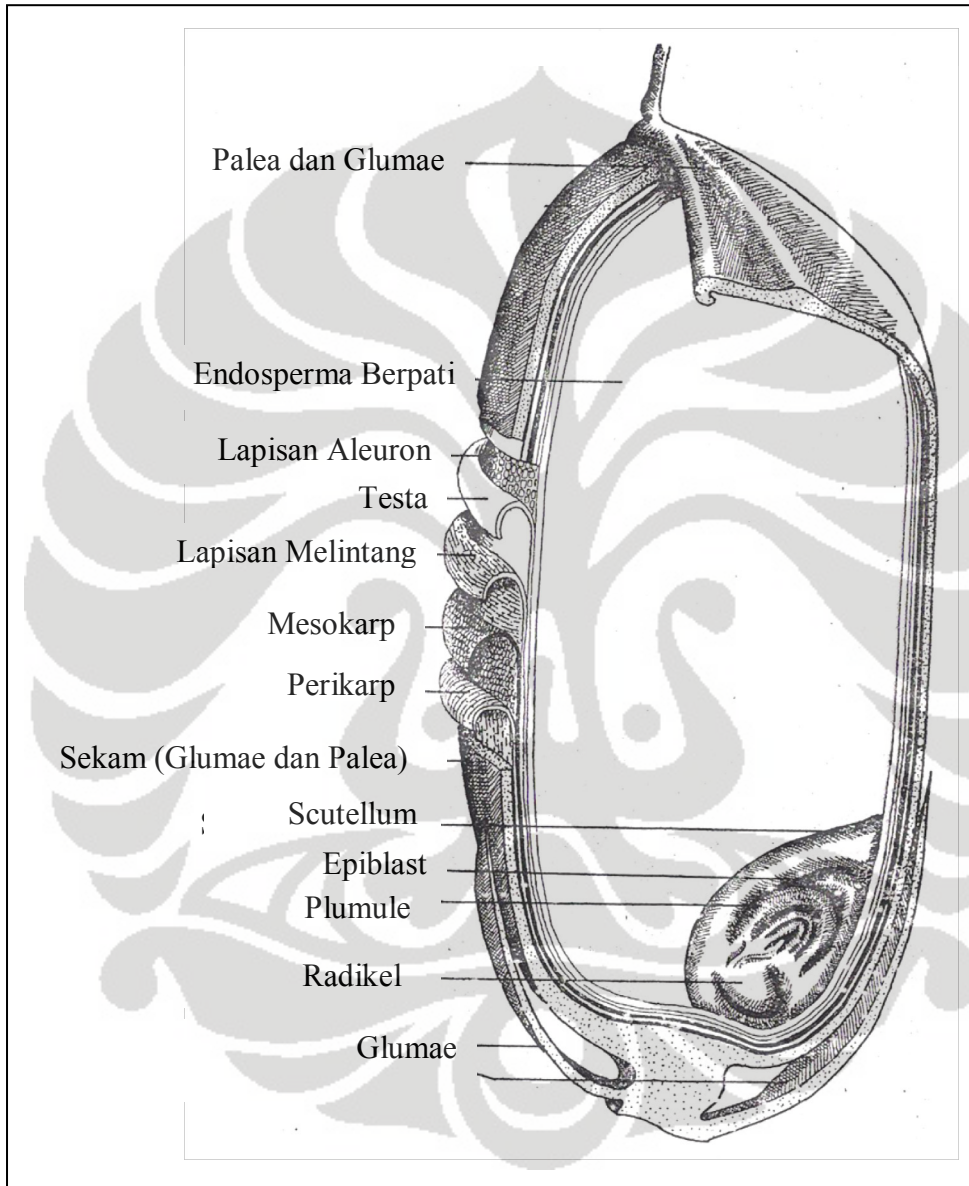
- Vergara, B. S., & De Datta, S. K. (1996). *Oryza sativa* L. Dalam G. J. Grubben, & S. Partoharjono. *Plant Resources of South-East Asia No 10. Cereals* (hal. 106-115). Leiden: Backhuys Publisher.
- Waldron, K. (2007). *Handbook of Waste Management and Co-product Recovery in Food Processing vol. 1*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.
- Walker, J. (2002). *The Protein Protocols Handbook*. Totowa: Humana Press Inc.
- Wilson, T. A., *et al.* (2007). Rice Bran Oil and Oryzanol Reduce Plasma Lipid and Lipoprotein Cholesterol Concentrations and Aortic Cholesterol Ester Accumulation to a Greater Extent than Ferulic Acid in Hypercholesterolemic Hamsters. *J Nutr Biochem* 18 , 105-112.
- Xu, Z., & Godber, S. (2001). Antioxidant Activities of Major Components of  $\gamma$ -Oryzanol from Rice Bran Using a Linoleic Acid Model. *JAOCS*, Vol. 78, no. 6 , 645-649.
- Yu, L. (. (2008). *Wheat Antioxidants*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Zingg, J. M. *et al.* (2006). Molecular Activities of Vitamin E. Dalam M. S. Meskin *et al.*, *Phytochemicals: Nutrient-Gene Interactions* (hal. 175-206). Boca Raton: CRC Press.



# GAMBAR



Gambar 2.1 Simplisia Dedak Padi



[Sumber: Grist, 1959. Telah diolah kembali]

Gambar 2.2 Anatomi Biji Padi / Gabah

Tokoferol

Tokotrienol

[Sumber: Schramm, 2007. Telah diolah kembali]

(A)  $R^1=R^2=R^3=Me$  :  $\alpha$ -tokoferol;  $R^1=R^2=Me, R^3=H$  :  $\beta$ -tokoferol;  $R^1=H, R^2=R^3=Me$  :  $\gamma$ -tokoferol;  $R^1=R^2=H, R^3=Me$  :  $\delta$ -tokoferol.

(B)  $R^1=R^2=R^3=Me$  :  $\alpha$ -tokotrienol;  $R^1=R^2=Me, R^3=H$  :  $\beta$ -tokotrienol;  $R^1=H, R^2=R^3=Me$  :  $\gamma$ -tokotrienol;  $R^1=R^2=H, R^3=Me$  :  $\delta$ -tokotrienol

Gambar 2.3 Struktur Vitamin E

Sikloartenil ferulat

24-metilensikloartanilferulat

[Sumber: Nystrom, Achrenius, Lampi, Moreau, & Piironen, 2007. Telah diolah kembali]

Gambar 2.4 Struktur sikloartenil ferulat dan 24-metilensikloartanil ferulat, yang lebih dikenal sebagai  $\gamma$ -oryzanol

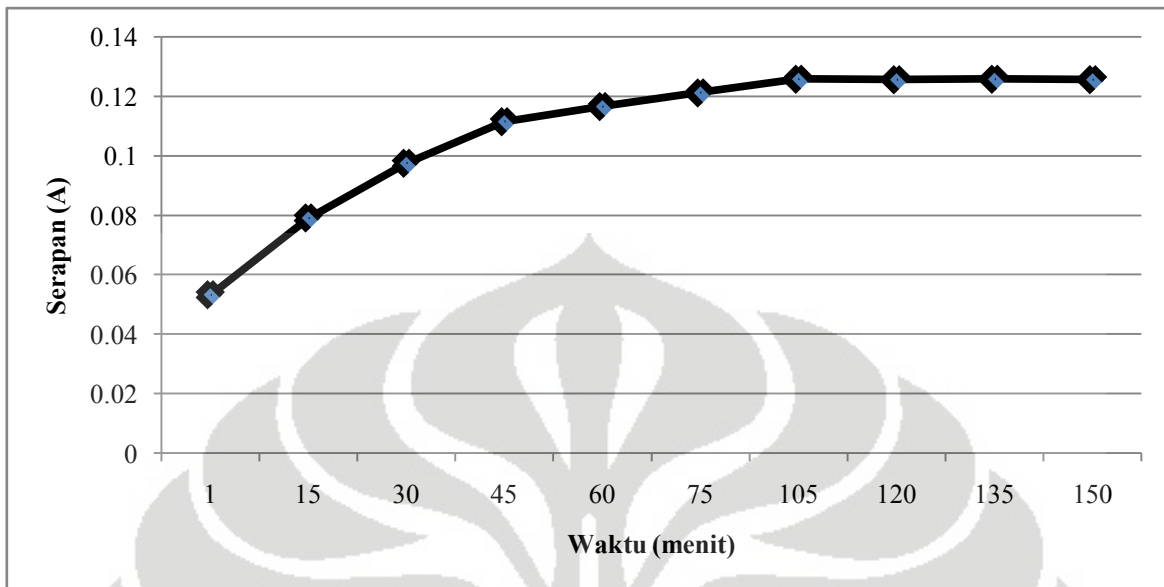


Gambar 3.3 Spektrofotometer UV-Vis Jasco V-530

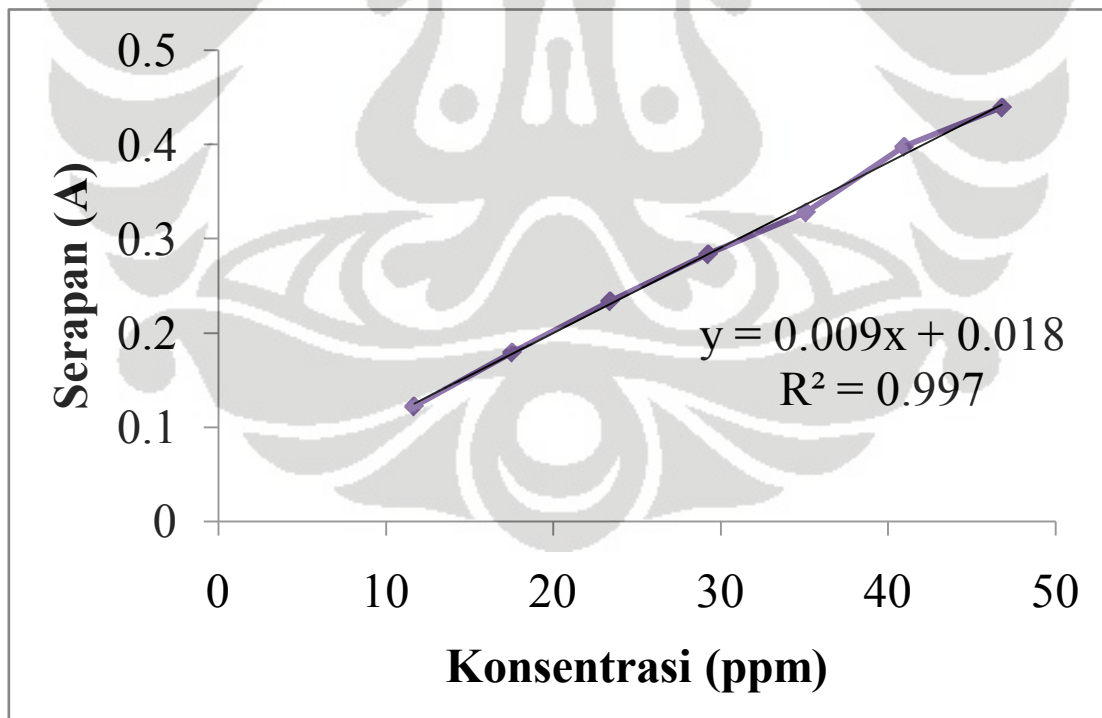








Gambar 4.3 Penentuan Waktu Optimum Serapan Standar Asam Galat pada Penetapan Kadar Fenol Total dengan Metode Folin-Ciocalteu



Gambar 4.4 Kurva Kalibrasi Standar Asam Galat pada Penentuan Kadar Fenol Total dengan Metode Folin-Ciocalteu



Gambar 4.5 Grafik Perbandingan Kadar Fenol Total Ekstrak Sampel dengan Metode Folin-Ciocalteu



Gambar 4.6 Grafik Perbandingan Nilai  $IC_{50}$  Ekstrak Sampel dengan Metode Peredaman Radikal DPPH



Gambar 4.7 Grafik Perbandingan Kekuatan Reduksi Ekstrak Sampel dengan Metode Penentuan Kekuatan Reduksi



Tabel 4.1 Bobot Ekstrak yang Diperoleh dari Ekstraksi

Varietas	Bobot Ekstrak (g)	Bobot Simplisia (g)	Bobot Ekstrak / Simplisia (%)
Ciherang	29,4364	100	29,4364
Cibogo	28,9097	100	28,9097
Cigeulis	40,8756	100	40,8756
Sintanur	33,8670	100	33,8670
IR-64	40,3457	100	40,3457
IR-42	58,9609	100	58,9609
INPARI-1	28,9551	100	28,9551
INPARI-5	25,388	100	25,388
INPARI-10	27,7551	100	27,7551
OM-4495	21,2093	100	21,2093

Tabel 4.2. Data Pengukuran Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan Waktu Optimum Standar Asam Galat 10 ppm pada Penentuan Kadar Fenol Total dengan Menggunakan Pereaksi Folin-Ciocalteu

Menit ke-	Panjang gelombang ( $\lambda$ ) maksimum (nm)	Serapan (A)
1	731	0,05324
15	731	0,07914
30	731	0,09756
45	731	0,11158
60	731	0,11668
75	731	0,12128
105	731	0,12590
120	731	0,12573
135	731	0,12589
150	731	0,12575

Tabel 4.3 Data Kurva Kalibrasi Standar Asam Galat 10 ppm pada Penentuan Kadar Fenol Total dengan Menggunakan Pereaksi Folin-Ciocalteu

Konsentrasi (ppm)	Serapan (A)
11,70	0,12209
17,55	0,17940
23,40	0,23385
29,25	0,28366
35,10	0,32816
40,95	0,39791
46,80	0,43960















Tabel 4.15 Nilai IC<sub>50</sub> dari Larutan Standar BHT dalam Metanol

Konsentrasi (ppm)	Serapan 1 (A)	Serapan 2 (A)	Serapan 3 (A)	Inhibisi 1 (%)	Inhibisi 2 (%)	Inhibisi 3 (%)
Kontrol DPPH 20 ppm	0,27716	0,2913	0,29492			
4,7	0,25634	0,25921	0,26287	7,511906	11,01613	10,86735
9,4	0,23319	0,23327	0,23136	15,86448	19,92104	21,55161
14,1	0,21407	0,21406	0,19542	22,76302	26,51562	33,73796
18,8	0,15613	0,20041	0,18795	43,66792	31,20151	36,27085
23,5	0,15386	0,18066	0,16673	44,48694	37,98146	43,46602
Peramaan Garis				$y = -3,6672 + 2,1650x$	$y = 5,7638 + 1,3875x$	$y = 5,2038 + 1,7003x$
IC <sub>50</sub> (ppm)				24,7881	31,88261	26,34525
<b>Rata-Rata IC<sub>50</sub> (ppm)</b>					<b>27,67225</b>	









# LAMPIRAN

Lampiran 1 Surat Keterangan Sampel



Lampiran 2 Sertifikat Analisis BHT



(lanjutan)

---

### Certificate of Analysis

---

8.17074.1000 Butylhydroxytoluene Ph Eur,NF,E 321  
Batch K36604374 ✓

---

Date of examination (DD.MM.YYYY): 28.09.2006 ✓  
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY): 30.09.2010 ✓

Corresponds to Ph. Eur., NF, E 321 Conforms to the purity criteria on food additives according to European Commission directive 96/77/EC.

Dr. Ulrich Reichert

responsible laboratory manager quality control

*This document has been produced electronically and is valid without a signature*