



UNIVERSITAS PANCASILA  
FAKULTAS FARMASI

**SKRIPSI**

**PENGARUH PENAMBAHAN GLUKOSA PADA  
SUBSTRAT TERHADAP AKTIVITAS  
ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA PRODUK  
FERMENTASI DAUN *Moringa oleifera* Lam. OLEH  
*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356**

OLEH:

NURUL ALMA FEBRIYANTI  
NPM 2016210178

Dibuat untuk memperoleh  
gelar Sarjana Farmasi pada  
Universitas Pancasila

JAKARTA

2022

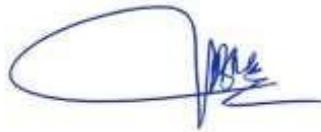
**UNIVERSITAS PANCASILA  
FAKULTAS FARMASI  
JAKARTA**

**PERSETUJUAN SKRIPSI**

**NAMA** : NURUL ALMA FEBRIYANTI  
**NPM** : 2016210178  
**PEMINATAN** : FARMASI KLINIK DAN KOMUNITAS  
**JUDUL** : PENGARUH PENAMBAHAN GLUKOSA PADA  
SUBSTRAT TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN  
ANTIMIKROBA PRODUK FERMENTASI DAUN *Moringa*  
*oleifera* Lam. OLEH *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

Disetujui oleh:

Pembimbing



(Dra. Umi Marwati, M.si)

Tanggal:

UNIVERSITAS PANCASILA  
FAKULTAS FARMASI  
JAKARTA

**PENGESAHAN SKRIPSI**

Judul

PENGARUH PENAMBAHAN GLUKOSA PADA SUBSTRAT TERHADAP  
AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA PRODUK FERMENTASI  
DAUN *Moringa oleifera* Lam. OLEH *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

OLEH

NURUL ALMA FEBRIYANTI  
NPM: 2016210178

Dipertahankan di Hadapan Panitia Penguji Skripsi  
Fakultas Farmasi Universitas Pancasila  
Pada tanggal 11 Januari 2022



Pembimbing:

1. Dra. Umi Marwati, M.si.

1.....

Penguji:

1. apt. Moordiani, S.F., M.Sc.

1.....

2. Prof. Dr. apt. Shirly Kumala, M.Biomed.

2.....

3. Dr. apt. Esti Mumpuni., M.si.

3.....

## KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Dengan mengucapkan Alhamdulillah segala puji dan syukur, penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT karena berkat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan dalam Menyusun skripsi dengan judul “PENGARUH PENAMBAHAN GLUKOSA PADA SUBSTRAT TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA PRODUK FERMENTASI DAUN *Moringa oleifera* Lam. OLEH *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356” dapat terselesaikan guna memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar sarjana farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Pancasila.

Perjalanan Panjang telah penulis lalui dalam menyusun skripsi ini, karena berkat kehendak-Nya, penulis dapat melewati hambatan dan menyelesaikan penyusunan skripsi dengan baik. Dengan penuh kerendahan hati, pada kesempatan ini, penulis mengucapkan banyak terimakasih kepada Ibu Dra. Umi Marwati, M.si. selaku dosen pembimbing skripsi yang telah bersedia meluangkan waktu dengan penuh kesabaran untuk membantu membimbing, mengarahkan, dan memotivasi penulis dengan baik. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Shirly Kumala, M.Biomed., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila.
2. Ibu Moordiani S.F.,M.Sc selaku Dosen Pembimbing Akademik penulis selama masa studi di Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila.
3. Kedua orang tua, ayahanda penulis Bapak Supriyanto Rohadi dan Ibunda penulis Ibu Pudji Setyani yang telah memberikan dukungan dan doa kepada Allah SWT. Dan terimakasih juga untuk adik-adik saya Nurul Hana Wulandari, Nurul Risa Danastri, dan Rahadi Afkar Zaidan.

4. Seluruh Dosen, Staff, dan Karyawan Fakultas Farmasi Universitas Pancasila atas ilmu dan bimbingan selama masa perkuliahan penulis.
5. Kerabat terdekat penulis Muhammad Fikri Aulia, Syifa Luthfiyah, Amiya Safitri, Kristi Pitaloka, Sandra Vista Putri, Noviani Ester, dan teman-teman lain yang tidak bisa saya sebutkan satu per satu.
6. Rekan skripsi penulis Naura Nazifah, Arinta Yudi Astuti, dan rekan-rekan skripsi saya yang lain.
7. Rekan yang membantu membimbing penulis dalam menyusun skripsi Osyana Candra M dan Rastiendi.
8. Semua teman-teman seperjuangan dan pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu atas semua bantuannya selama proses penyusunan skripsi hingga akhirnya dapat terselesaikan.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari kata sempurna, Oleh karena itu, kritik dan saran sangat diharapkan. Akhir kata semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan berkah dan hidayah-Nya kepada kita semua dan semoga skripsi ini dapat bermanfaat sebaik-baiknya bagi penelitian dan perkembangan ilmu pengetahuan.

Wassalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh.

Jakarta, 2022

Penuli

# DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b>	
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>iv</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>vi</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xi</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
A. Latar belakang .....	1
B. Perumusan masalah .....	4
C. Tujuan Penelitian .....	5
D. Manfaat penelitian .....	5
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
A. Klasifikasi tanaman <i>Moringa oleifera</i> L. ....	6
B. Kandungan senyawa kimia,metabolit sekunder dan manfaat daun <i>Moringa oleifera</i> L .....	8
C. Peran <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356.....	10
D. Peran glukosa pada proses fermentasi.....	11
E. Mekanisme antioksidan dan antimikroba .....	12

F. Prinsip pengukuran kadar glukosa, protein, dan fenol total .....	12
G. Landasan teori .....	13
H. Hipotesis.....	15

### **BAB III RANCANGAN PENELITIAN**

A. Prinsip penelitian .....	16
B. Tempat penelitian.....	16
C. Tahap penelitian .....	17

### **BAB IV BAHAN, ALAT DAN METODE PENELITIAN**

A. Alat dan bahan penelitian .....	21
B. Metode penelitian.....	22
1. Meremajakan bakteri <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 dan stok inokulum .....	22
2. Pembuatan infusa daun <i>Moringa oleifera</i> L .....	22
3. Karakteristik dan skrining fitokimia produk fermentasi <i>Moringa oleifera</i> L.....	23
4. Menghitung jumlah sel <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 dalam fermentasi <i>Moringa oleifera</i> L menggunakan optical densitometer .....	25
5. Pengukuran pH krud ekstrak daun <i>Moringa oleifera</i> L.....	26
6. Pengukuran kadar asam total krud ekstrak <i>Moringa oleifera</i> L.....	26
7. Pengukuran kadar glukosa krud ekstrak daun <i>Moringa oleifera</i> L.....	27
8. Pengukuran kadar fenol krud ekstrak <i>Moringa oleifera</i> L.....	29
9. Pengukuran kadar protein krud ekstrak <i>Moringa oleifera</i> L .....	31
10. Pengukuran Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) untuk antimikroba dan pengukuran potensi antioksidan menggunakan metode DPPH dan FRAP.....	31
11. Analisis data.....	35

## **BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

A. Karakteristik mutu sebagai media fermentasi .....	36
B. Organoleptik dan kandungan senyawa fitokimia hasil seduhan daun <i>Moringa oleifera</i> L.....	37
C. Laju pertumbuhan <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 pada seduhan daun <i>Moringa oleifera</i> L. ....	38
D. pH dan total asam seduhan daun <i>Moringa oleifera</i> L. ....	44
E. Kadar total glukosa seduhan daun <i>Moringa oleifera</i> L.....	48
F. Kadar total protein seduhan daun <i>Moringa oleifera</i> L. ....	51
G. Kadar fenol total seduhan daun <i>Moringa oleifera</i> L. ....	54
H. Aktivitas antimikroba seduhan daun <i>Moringa oleifera</i> L. oleh <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356.....	57
I. Aktivitas antioksidan seduhan daun <i>Moringa oleifera</i> L. oleh <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356.....	59

## **BAB VI SIMPULAN DAN SARAN**

A. Simpulan.....	64
B. Saran.....	64

<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>50</b>
-----------------------------	-----------

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan nutrisi daun segar dan kering <i>Moringa oleifera</i> L.....	9
Tabel 2.2 Kandungan vitamin dan mineral daun <i>Moringa oleifera</i> L.....	10
Tabel 2.3 Kandungan nilai gizi daun <i>Moringa oleifera</i> L segar dan kering .....	10
Tabel 5.1 Skrining fitokimia fermentasi seduhan daun <i>Moringa oleifera</i> L .....	36
Tabel 5.2 Organoleptik seduhan fermentasi seduhan daun <i>Moringa oleifera</i> L.....	37
Tabel 5.3 Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) produk fermentasi seduhan daun <i>Moringa oleifera</i> L .....	58

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Pohon <i>Moringa oleifera</i> L .....	6
Gambar 2.2 Daun <i>Moringa oleifera</i> L.....	9
Gambar 5.1 Grafik peningkatan jumlah sel <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014 .....	39
Gambar 5.5 Grafik penurunan pH .....	45
Gambar 5.6 Grafik peningkatan kadar asam total .....	46
Gambar 5.8 Grafik penurunan kadar glukosa.....	44
Gambar 5.10 Grafik peningkatan kadar total protein .....	49
Gambar 5.12 Grafik peningkatan kadar fenol total .....	52
Gambar 5.14 Grafik penurunan nilai IC <sub>50</sub> .....	6

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat determinasi LIPI Bogor.....	71
Lampiran 2. Foto Kebun <i>Moringa oleifera</i> L. ....	72
Lampiran 3. Sertifikat biakan murni <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356.....	73
Lampiran 6. Sertifikat analisis Bovine Serum Albumin .....	76
Lampiran 7. Sertifikat analisis Bovine Serum Albumin (lanjutan).....	77
Lampiran 8. Sertifikat analisis <i>Folin-Ciocalteu</i> .....	78
Lampiran 9. Sertifikat analisis Asam Galat .....	79
Lampiran 10. Sertifikat analisis DPPH.....	80
Lampiran 11. <i>Certificate of analysis</i> Vitamin C .....	81
Lampiran 12. Skema kerja secara umum .....	82
Lampiran 13. Pembuatan infusa daun <i>Moringa oleifera</i> L.....	83
Lampiran 14. Skema kerja pembuatan MRSA .....	84
Lampiran 15. Skema kerja pembuatan starter.....	85
Lampiran 16. Skema kerja proses fermentasi seduhan daun <i>Moringa oleifera</i> L.	85
Lampiran 17. Skema kerja pengukuran pertumbuhan jumlah sel .....	87

Lampiran 18. Skema kerja pengukuran pH seduhan .....	88
Lampiran 19. Skema kerja pengukuran kadar asam total seduhan.....	89
Lampiran 20. Skema kerja pengukuran kadar glukosa seduhan.....	90
Lampiran 20a. Skema kerja pembuatan larutan DNS (asam 3,5-dinitrosalisilat).....	90
Lampiran 20b. Skema kerja penetapan panjang gelombang maksimum dan kurva.....	91
Lampiran 20c. Skema kerja pengukuran kadar glukosa pada crude ekstrak hasil fermentasi .....	92
Lampiran 21. Skema kerja pengukuran kadar protein .....	93
Lampiran 22. Skema Kerja kadar fenol total .....	94
Lampiran 23. Skema kerja pengukuran aktivitas antimikroba .....	96
Lampiran 24. Skema kerja pengukuran aktivitas antioksidan .....	97
Lampiran 24a. Skema penetapan panjang gelombang maksimum dan waktu stabil.....	97
Lampiran 24b. Skema penetapan kontrol positif.....	98
Lampiran 24c. Skema penetapan antiosidan hasil fermentasi daun <i>Moringa oleifera</i> L .....	99
Lampiran 25. Perubahan warna hasil reaksi pengujian fitokimia.....	100
Lampiran 26. Deteksi perubahan warna hasil reaksi pengujian fitokimia (lanjutan).....	101
Lampiran 27. Deteksi perubahan warna hasil reaksi pengujian fitokimia (lanjutan).....	102
Lampiran 28. Bakteri <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	

pada mikroskop dengan menggunakan hemasitomer .....	103
Lampiran 29. Hasil uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).....	104
Lampiran 30. Foto alat Penelitian .....	106
Lampiran 31. Kurva baku pertumbuhan <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 pada seduhan daun <i>Moringa oleifera</i> L. setelah difermentasi.....	107
Lampiran 32. Panjang gelombang serapan maksimum spektrofotometer pada pengujian kadar Glukosa .....	107
Lampiran 33. Kurva Baku pada pengujian kadar glukosa .....	108
Lampiran 34. Panjang gelombang serapan maksimum dan waktu stabil pada pengujian kadar protein .....	108
Lampiran 35. Kurva Baku pada pengujian kadar protein .....	109
Lampiran 36. Panjang gelombang serapan maksimum dan waktu stabil pada pengujian kadar fenol total .....	110
Lampiran 37. Kurva Baku pada pengujian kadar fenol total .....	110
Lampiran 38. Panjang gelombang serapan maksimum dan waktu stabil pada pengujian aktivitas antioksidan .....	111

## ABSTRAK

- (A) NURUL ALMA FEBRIYANTI (2016210178)
- (B) PENGARUH PENAMBAHAN GLUKOSA PADA SUBSTRAT TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA PRODUK FERMENTASI DAUN *Moringa oleifera* Lam. OLEH *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356
- (C) xiv + 111 halaman; 6 tabel; 9 gambar; 38 lampiran
- (D) Kata kunci: *Moringa oleifera* L., *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, Fermentasi, Fermentasi seduhan daun *Moringa oleifera* L., antimikroba, antioksidan.
- (E) Daun *Moringa oleifera* L. diketahui mengandung senyawa-senyawa metabolit sekunder yang memiliki potensi sebagai antioksidan dan antimikroba. Penelitian ini untuk mengetahui pengaruh penambahan glukosa 10% pada tiap variasi konsentrasi substrat yang digunakan terhadap pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 serta pengaruhnya terhadap aktivitas antimikroba dan antioksidan. Penambahan glukosa digunakan sebagai sumber nutrisi *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 sehingga jumlah dan aktivitas *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 meningkat. Aktivitas antimikroba menggunakan metode dilusi cair dan uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH. Hasil uji setelah fermentasi diperoleh laju pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 4% ( $1,82 \times 10^5$  sel/menit), waktu generasi pada substrat 4% (3,91 jam/generasi), jumlah generasi pada substrat 4% (4,61 generasi), peningkatan jumlah sel pada substrat 4% (129,75%). Hasil pH setelah fermentasi pada substrat 4% (5,45), peningkatan asam total pada substrat 4% (47,58%), sisa kadar glukosa 4% (55,61%), peningkatan protein pada substrat 4% (3,95%), peningkatan fenol pada substrat 4% (61,19%). Hasil uji aktivitas penghambatan terbesar terhadap mikroba uji *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231. Hasil uji aktivitas antioksidan sesudah fermentasi diperoleh penurunan nilai  $IC_{50}$  tertinggi pada substrat 4% (49,56% mg/L). Uji statistik anova menunjukkan semakin besar konsentrasi substrat maka, jumlah pertumbuhan sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 meningkat, aktivitas antioksidan dan antimikroba semakin tinggi. Dengan demikian produk fermentasi seduhan daun *Moringa oleifera* L. oleh *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 terbaik terdapat pada substrat 4%.
- (F) Daftar Rujukan: 56 buah (1990-2021)
- (G) Dra. Umi Marwati, M.si.
- (H) 2022

## ABSTRACT

- (A) NURUL ALMA FEBRIYANTI (2016210178)
- (B) EFFECT OF ADDED GLUCOSE TO SUBSTRATE ON ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIC ACTIVITIES OF FERMENTED PRODUCTS LEAVES OF *Moringa oleifera* Lam. BY *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356
- (C) xiv + 111 pages; 6 tables; 9 pictures; 38 attachments
- (D) Keywords: *Moringa oleifera* L., *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, Fermentation, Fermentation of *Moringa oleifera* L. leaves, antimicrobial, antioxidant.
- (E) *Moringa oleifera* L. leaves are known to contain secondary metabolites that have potential as antioxidants and antimicrobials. The function of add glucose as a source of nutrition for *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. That can make the number and activity of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 increase. This study aims to determine the effect of 10% glucose addition on each variation of substrate concentration used on the growth of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 and its effect on antimicrobial and antioxidant activity. Antimicrobial activity by liquid dilution method and antioxidant activity test using DPPH method. The test results after fermentation showed that the growth rate of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 4% ( $1.82 \times 10^5$  cells/min), 4% generation time (3.91 hours/generation), 4% number of generations (4.61 generations), increased cell number 4 % (129.75%). The result of pH after fermentation was 4% (5.45), increased total acid 4% (47.58%), remaining glucose content 4% (55.61%), increased protein 4% (3.95%), increased phenol 4 % (61.19%). The results of the test of the greatest inhibitory activity against the test microbes *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231. The results of the antioxidant activity test after fermentation obtained the highest decrease in IC50 value on 4% substrate (49.56% mg/ L). ANOVA statistical test showed that the higher the substrate concentration, the higher the number of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 cells, the higher the antioxidant and antimicrobial activity. Thus, the best fermented product of *Moringa oleifera* L. leaves by *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 was found on 4% substrate.
- (F) References List: 56 pieces (1990-2021)
- (G) Dra. Umi Marwati, M.si.
- (H) 2022

# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. LATAR BELAKANG

Tanaman *Moringa oleifera* L. atau “Kelor” merupakan tanaman dari familia *Moringaceae* [1]. *Moringa oleifera* L. memiliki tinggi 7-11 m, batang berwarna putih kotor, kulit tipis, permukaan kasar, daun bulat telur, dan bunga berwarna putih kekuningan [2]. *Moringa oleifera* L. tumbuh dalam pH asam dengan tanah yang sedikit lembab sehingga tanaman ini dapat tumbuh pada daerah tropis maupun subtropis hingga ketinggian dataran  $\pm$  1000 m di atas permukaan laut [2]. *Moringa oleifera* L. merupakan tanaman asli dari barat laut Hindia, tepatnya wilayah pegunungan Himalaya bagian selatan [1]. Namun, tanaman ini sudah tersebar pada berbagai daerah di Indonesia seperti Sulawesi, Madura, Jawa Barat, Ternate, Sumbawa, dan Aceh. *Moringa oleifera* L. disebut sebagai “*Miracle Tree*” karena memiliki banyak manfaat [3].

*Moringa oleifera* L. mempunyai banyak manfaat karena memiliki kandungan nutrisi yang tinggi seperti *betakaroten*, vitamin C, kalsium, dan zat besi. Hal tersebut membuat *Moringa oleifera* L. memiliki sifat fungsional bagi kesehatan serta mengatasi kekurangan nutrisi. Kandungan nutrisi yang tinggi tersebut berada pada seluruh bagian *Moringa oleifera* L. yaitu pada bagian akar, batang, bunga, buah, dan daun. Daun merupakan bagian yang paling besar manfaatnya. Dalam bidang kesehatan, daun *Moringa oleifera* L. memiliki manfaat farmakologis antara lain antiinflamasi, antifibrotic atau antiulcer, antitumor, antikanker, antihiperlipidemik, antimikrobia, dan antioksidan [5]. Manfaat-manfaat tersebut berasal dari senyawa metabolit yang terdapat pada daun *Moringa oleifera* L.. Senyawa metabolit yang terdapat pada daun *Moringa oleifera* L. yaitu senyawa metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit primer yang terkandung pada

daun *Moringa oleifera* L. yaitu karbohidrat, lemak, protein, serat, mineral, dan vitamin serta metabolit sekunder yang terkandung pada daun *Moringa oleifera* L. yaitu sterol, saponin, terpenoid, fenolat, alkaloid, dan flavonoid yang merupakan senyawa dengan kemampuan untuk bertindak sebagai antimikroba dan antioksidan [6]. Flavonoid sebagai antioksidan bekerja dengan cara menangkap *reactive oxygen species* (ROS) secara langsung [7]. Sedangkan flavonoid sebagai antimikroba bekerja dengan cara menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel, dan menghambat metabolisme energi [8]. Senyawa-senyawa lain seperti saponin, tannin, dan triterpenoid memiliki aktivitas antimikroba dengan cara merusak membran sel bakteri [9].

Pada penelitian sebelumnya, fermentasi diketahui dapat meningkatkan potensi aktivitas antimikroba dan antioksidan dari senyawa metabolit sekunder. Fermentasi merupakan suatu proses perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme [10]. Fermentasi bertujuan untuk meningkatkan nilai gizi, memperpanjang umur simpan produk, dan memperoleh manfaat klinis bagi tubuh. Pada proses fermentasi, terdapat faktor-faktor yang mempengaruhi seperti pH, suhu, waktu fermentasi, substrat, dan inokulum [10]. Salah satu mikroba yang dapat digunakan pada proses fermentasi yaitu bakteri asam laktat (*Lactic Acid Bacteria*/BAL) [11]. *Lactobacillus* merupakan BAL yang paling berpotensi digunakan sebagai agen probiotik karena mampu bertahan pada pH rendah, tahan terhadap garam empedu, memproduksi antimikroba, dan tumbuh baik pada medium sederhana [13].

Salah satu bakteri dari genus *Lactobacillus* yang dapat digunakan pada proses fermentasi yaitu *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 merupakan bakteri homofermentatif yaitu bakteri yang memproduksi asam laktat sebagai satu-satunya produk akhir [18]. Karakteristik bakteri *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 yaitu bakteri gram positif yang tumbuh pada suhu 37°C - 42°C (Mampu hingga suhu 45°C), dan pH pertumbuhan 5,5 – 6,0 (Pertumbuhan berhenti apabila pH di bawah 4) [14]. *Lactobacillus*

*acidophilus* ATCC 4356 juga merupakan salah satu mikroorganisme yang paling sering disarankan dalam penggunaan makanan dan produk olahan fermentasi [15].

*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 memerlukan sumber karbon sebagai penunjang pertumbuhannya. Sumber karbon yang diperlukan oleh bakteri *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 antara lain glukosa [16]. Glukosa memiliki struktur yang paling sederhana dibandingkan dengan monosakarida lainnya serta waktu generasi yang diperlukan *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 lebih pendek dalam medium yang mengandung glukosa dibandingkan dalam medium dengan jenis monosakarida lainnya [16].

Penelitian ini merupakan penelitian payung dari penelitian sebelumnya. Pada penelitian sebelumnya, dilakukan variasi konsentrasi seduhan 1%, 2%, dan 4% dengan penambahan inokulum *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 10%. Untuk meningkatkan potensi aktivitas dari senyawa metabolit sekunder pada masing-masing konsentrasi, maka diperlukan penambahan glukosa 10%. Glukosa 10% merupakan sumber nutrisi dari *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 sehingga diharapkan dapat meningkatkan jumlah dan aktivitas bakteri. Pada penelitian sebelumnya, diperoleh hasil aktivitas antioksidan terbaik pada konsentrasi substrat 4% dengan nilai penurunan  $IC_{50}$  sebesar 41,34%. Untuk penghambatan aktivitas antimikroba terbesar diperoleh konsentrasi substrat 4%. Pada konsentrasi substrat 4%, antimikroba dapat menghambat *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, dan *Candida albican* ATCC 10231. Konsentrasi substrat 4% merupakan konsentrasi terbaik dari tiga konsentrasi yang diteliti. Pada konsentrasi substrat 4% memiliki kandungan sumber karbon paling tinggi sehingga berpengaruh pada jumlah bakteri yang semakin banyak dan menyebabkan aktivitas bakteri semakin baik [12].

Pada penelitian ini, masing-masing variasi substrat 1%, 2%, dan 4% ditambah karbon berupa glukosa 10% yang difermentasi selama 18 jam dengan konsentrasi

inokulum *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 20% untuk meningkatkan efisiensi produksi dan potensi senyawa metabolit sekunder.

## B. RUMUSAN MASALAH

Daun *Moringa oleifera* L. memiliki kandungan gizi dan nutrisi berupa kandungan metabolit primer dan sekunder. Kandungan dari senyawa metabolit ini memberi manfaat sebagai antioksidan dan antimikroba. Berdasarkan penelitian sebelumnya, diperoleh hasil potensi antimikroba dan antioksidan terbaik terdapat pada substrat 4%. Hal ini disebabkan karena pada substrat 4% memiliki kandungan sumber karbon paling tinggi sehingga berpengaruh pada jumlah dan aktivitas bakteri. Untuk meningkatkan efisiensi produksi dan potensi senyawa metabolit sekunder tersebut maka, pada penelitian ini dilakukan penambahan glukosa 10% pada masing-masing variasi konsentrasi substrat daun *Moringa oleifera* L. yang terdiri dari 4%, 2%, dan 1% oleh *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Berdasarkan hasil fermentasi daun *Moringa oleifera* L. penelitian ini diharapkan dapat menjawab beberapa masalah seperti berikut:

1. Bagaimana pengaruh penambahan glukosa terhadap potensi antioksidan produk fermentasi dari variasi konsentrasi substrat daun *Moringa oleifera* L. oleh *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 20%?
2. Bagaimana pengaruh penambahan glukosa terhadap kandungan produk fermentasi daun *Moringa oleifera* L. dengan variasi konsentrasi oleh *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 20% terhadap pH, kadar asam total, kadar glukosa, kadar protein, dan kadar fenol?
3. Bagaimana pengaruh penambahan glukosa pada masing-masing substrat dengan inokulum 20% terhadap Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) produk fermentasi daun *Moringa oleifera* L.?

### **C. TUJUAN PENELITIAN**

1. Mengetahui pengaruh penambahan glukosa pada substrat terhadap potensi antioksidan produk fermentasi daun *Moringa oleifera* L. dengan variasi konsentrasi oleh *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 20%.
2. Mengetahui pengaruh penambahan glukosa terhadap kandungan produk fermentasi daun *Moringa oleifera* L. dengan variasi konsentrasi oleh *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 20% terhadap pH, kadar asam total, kadar glukosa, dan kadar protein.
3. Mengetahui pengaruh penambahan glukosa pada masing-masing substrat dengan inokulum 20% terhadap Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) produk fermentasi daun *Moringa oleifera* L.

### **D. MANFAAT PENELITIAN**

Pemanfaatan teknologi fermentasi dari penelitian ini dapat digunakan untuk pembuatan minuman fungsional daun *Moringa oleifera* L. dengan penambahan glukosa dalam skala pilot plan.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. DESKRIPSI DAN KLASIFIKASI TANAMAN MORINGA

*Moringa oleifera* L. merupakan tanaman asli dari barat laut Hindia, tepatnya wilayah pegunungan Himalaya bagian selatan [1]. Namun, kelor hadir di semua negara-negara tropis. Saat ini kelor dibudidayakan di seluruh Timur Tengah dan hampir diseluruh daerah tropis [22].



**Gambar 1.** Daun *Moringa oleifera* L. [10]

*Moringa oleifera* L. dikenal sebagai salah satu tanaman multi guna karena hampir semua bagian dari pohonnya memiliki senyawa alami yang dapat dimanfaatkan menjadi sumber makanan dan bahan obat herbal [19]. Pohon ini telah digunakan sebagai antidiabetik, antibakterial, sakit kepala, antihipertensi, demam, dan antiinflamasi sebagai obat herbal. Adapun taksonomi dari daun kelor [21]:

Kingdom : *Plantae*  
Divisi : *Spermatophyta*  
Subdivisi : *Angeospermae*  
Kelas : *Dicotyledoneae*  
Ordo : *Brassicales*  
Familia : *Moringaceae*  
Genus : *Moringa*  
Spesies : *Moringa oleifera* Lam

Tanaman *Moringa oleifera* L. terdapat pada dataran rendah maupun dataran tinggi sampai ketinggian  $\pm 1000$  meter di atas permukaan laut. Selain itu, *Moringa oleifera* L. memiliki batang yang berkayu (*lignosus*) dengan ciri-ciri yaitu tegak, berwarna putih tidak bersih, kulit tipis, dan permukaannya kasar. *Moringa oleifera* L. memiliki cabang yaitu percabangan simpodial dimana arah cabangnya tegak atau miring dan cenderung tumbuh lurus memanjang. Perbanyak tanaman *Moringa oleifera* L. dapat dilakukan secara generatif (biji) maupun vegetatif (stek batang) [22].

Daun *Moringa oleifera* L. merupakan daun majemuk yang memiliki tangkai panjang, tersusun berseling (*alternate*), beranak daun gasal (*imparipinnatus*). Saat daun masih muda, daun memiliki warna hijau muda sedangkan setelah dewasa, daun berwarna hijau tua. Daun *Moringa oleifera* L. memiliki bentuk helai daun bulat telur, panjang 1-2cm, dan lebar 1-2cm serta daunnya tipis lemas, ujung dan pangkal tumpul (*obtusus*), tepi rata, susunan tulang menyirip (*pinnate*), dan permukaan atas maupun bawah halus [22].

Pada bagian bunga *Moringa oleifera* L. bunga muncul pada ketiak daun (*axillaris*), memiliki tangkai panjang, kelopak berwarna putih agak krem dan beraroma khas. Bunga *Moringa oleifera* L. memiliki warna putih kekuning-kuningan dan keluar sepanjang tahun dengan aroma bau semerbak.

Pada bagian akar *Moringa oleifera* L. merupakan akar tunggang dengan warna putih dan akan membesar seperti lobak. Kulit akarnya memiliki rasa pedas dan berbau tajam serta berwarna kuning pucat dengan garis halus terang melintang. Selain itu, bentuknya tidak beraturan dengan permukaan luar kulit yang sedikit licin dan permukaan dalamnya berserabut serta pada bagian kulit berwarna coklat muda yang sebagian besar terpisah.

Tanaman *Moringa oleifera* L. termasuk jenis tanaman perdu yang memiliki ketinggian batang 7-12m yang merupakan tanaman berbatang serta memiliki batang berkayu sehingga batangnya keras dan kuat. Bentuknya sendiri adalah bulat (*teres*) dan permukaannya kasar. Arah tumbuhnya lurus ke atas atau biasa yang

disebut dengan tegak lurus (*erectus*). *Moringa oleifera* L. berbuah setelah berumur 12-18 bulan dengan bentuk segitiga memanjang yang disebut klentang (Jawa) dengan panjang 20-60cm yang ketiga muda berwarna hijau tetapi setelah tua berubah menjadi coklat. Selain itu, terdapat biji buah yang memiliki bentuk bulat pada saat muda berwarna hijau terang dan berubah berwarna coklat kehitaman ketika polong matang dan kering. Saat kering polong terbuka menjadi 3 bagian yang dalam setiap polong rata-rata berisi 12 dan 35 biji [22].

#### **B. KANDUNGAN DAN MANFAAT DAUN *Moringa oleifera* L.**

Daun *Moringa oleifera* L. merupakan jenis daun bertangkai karena hanya terdiri atas helaian daun dan tangkai. Tangkai daun *Moringa oleifera* L berbentuk silinder dengan sisi atas sedikit pipih dan menebal pada pangkalnya serta permukaannya halus. Bangun daunnya berbentuk bulat atau bundar (*orbicularis*) dengan pangkal daun tidak bertoreh dan termasuk ke dalam bentuk bangun bulat telur. Ujung dan pangkal daunnya membulat (*rotundatus*) dimana ujungnya tumpul dan tidak membentuk sudut. Susunan tulang daunnya menyirip (*penninervis*) serta memiliki satu ibu tulang daun yang berjalan dari pangkal ke ujung yang merupakan terusan tangkai daun. Selain itu, pada ibu tulang daun tersebut kearah samping akan keluar tulang-tulang cabang sehingga susunannya seperti sirip-sirip pada ikan. *Moringa oleifera* L memiliki tepi daun yang rata (*integer*) dan helaian daunnya tipis dengan warna hijau tua atau hijau kecoklatan serta permukaannya licin (*laevis*) dan berselaput lilin (*pruinosis*) [22].



**Gambar 2** Daun *Moringa oleifera* L. [14]

Daun *Moringa oleifera* L. memiliki banyak kandungan nutrisi dan kegunaan antara lain karoten (vitamin A), vitamin B, vitamin C, kalsium dan kalium.

Tabel II.1 Kandungan nutrisi daun *Moringa oleifera* L. segar dan kering [20]

<b>Komponen Nutrisi</b>	<b>Daun Segar</b>	<b>Daun Kering</b>
Kadar air (%)	94.01	4.09
Protein (%)	22.7	28.44
Lemak (%)	4.65	2.74
Kadar abu	-	7.95
Karbohidrat (%)	51.66	57.01
Serat (%)	7.92	12.63
Kalsium (mg)	350-550	1600-2200
Energi (Kcal/100g)	-	307.30

Tabel II.2 Kandungan Vitamin & Mineral dari *Moringa oleifera* L. [20]

Komponen	Daun Segar	Daun Kering
Karoten (Vitamin A)	6,78	18,9
Thiamin (Vitamin B1)	0,06	2,64
Riboflavin (Vitamin B12)	0,05	20,5
Niasin (Vitamin B3)	0,8	8,2
Vitamin C	220	17,3
Kalsium	440	2003
Kalori	92	205
Karbohidrat	12,5	38,2
Tembaga	0,07	0,57
Lemak	1,70	2,3
Serat	0,90	19,2
Besi	0,85	28,2
Magnesium	42	368
Fosfor	70	204
Kalium	259	1324
Protein	6,70	27,1

Tabel II.3 Kandungan asam amino per 100 g daun *Moringa oleifera* L. [21]

Komponen Asam Amino	Daun Segar (mg)	Daun Kering (mg)
Argine	406,6	1325
Histidine	149,8	613
Isolisine	299,6	825
Leusine	492,2	1950
Lysine	342,4	1325
Methionine	117,7	350
Phenylalanine	310,3	1388
Threonine	117,7	1188
Tryptophan	107	425
Valine	374,5	1063

### C. PERAN *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 DALAM FERMENTASI

Fermentasi merupakan proses untuk mengubah substrat menjadi suatu produk. Dalam melakukan proses fermentasi diperlukan suatu mikroba seperti bakteri asam laktat (BAL) untuk menjalankan proses tersebut. Salah satu bakteri asam laktat (BAL) yang dapat digunakan dalam proses fermentasi berasal dari genus *Lactobacillus* seperti *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Bakteri *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 merupakan bakteri gram positif yang tumbuh pada suhu 37°C - 42°C (Mampu hingga suhu 45°C), dan pH pertumbuhan

5,5 – 6,0 (Pertumbuhan berhenti apabila pH di bawah 4) [14]. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 memiliki manfaat dalam meningkatkan konsentrasi dan bioavailabilitas senyawa polifenol yang berperan sebagai antioksidan [11]. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 juga menghasilkan senyawa antimikroba seperti asam-asam organik, hidrogen peroksida, dan senyawa protein atau kompleks protein spesifik yang disebut bakteriosin [12]. Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri tersebut mampu menghambat bakteri patogen seperti *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumonia*, dan *Bacillus subtilis* [12]. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 merupakan salah satu mikroorganisme yang paling sering disarankan dalam penggunaan makanan dan produk olahan fermentasi [15].

#### **D. PERAN GLUKOSA PADA PROSES FERMENTASI**

Dalam proses fermentasi, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 memerlukan nutrisi untuk memenuhi pertumbuhannya. Salah satu sumber nutrisi untuk membantu pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 adalah karbon. Salah satu karbon yang dapat digunakan oleh *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 adalah glukosa.

Glukosa digunakan sebagai sumber nutrisi bagi *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 karena glukosa memiliki struktur yang paling sederhana dibandingkan dengan sukrosa serta waktu generasi yang diperlukan *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 lebih pendek dalam medium yang mengandung glukosa dibandingkan dalam medium dengan sukrosa dan laktosa [16],[17]. Dengan memanfaatkan kecukupan nutrisi yang tersedia maka, aktivitas dan jumlah bakteri asam laktat akan meningkat sehingga jumlah asam hasil metabolisme meningkat. Peningkatan jumlah bakteri asam laktat yang terjadi dapat meningkatkan rombakan senyawa gula yang ada pada medium menjadi asam-asam organik [17].

## **E. MEKANISME ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA**

Senyawa radikal bebas merupakan salah satu faktor penyebab kerusakan DNA. Bila kerusakan sudah sampai menyebabkan rantai DNA terputus maka, kerusakan tidak akan dapat diperbaiki sehingga pembelahan sel akan terganggu. Agar radikal bebas tidak menyebar maka, tubuh akan memproduksi antioksidan.

Antioksidan merupakan inhibitor yang bekerja dengan cara menghambat oksidasi serta bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas tidak reaktif yang relatif stabil sehingga dapat melindungi sel dari bahaya radikal bebas oksigen reaktif [24]. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat antioksidan sehingga senyawa oksidan tersebut dapat terhambat. Maka, keefektifan antioksidan tergantung dari seberapa kuat daya oksidasinya dibanding dengan molekul lain [24].

Metabolit sekunder pada ekstrak daun *Moringa oleifera* L. teridentifikasi mengandung senyawa seperti steroid, flavonoid, tanin, fenol, dan saponin. Flavonoid dan fenol yang diketahui dapat berperan sebagai antimikroba dengan menghambat aktivitas bakteri. Flavonoid juga berfungsi sebagai antioksidan yang mampu menjaga terjadinya oksidasi sel tubuh. Saponin merupakan golongan glikosida yang berfungsi menyimpan karbohidrat dan sebagai pelindung serangan hama dengan mekanismenya yaitu menurunkan tegangan permukaan dinding sel bakteri sehingga menyebabkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel bakteri dan dapat mengakibatkan senyawa intraseluler keluar [25].

## **F. PRINSIP PENGUKURAN KADAR GLUKOSA, PROTEIN, DAN FENOL TOTAL**

Pengujian kadar glukosa dapat dilakukan dengan metode DNS (dinitrosalicylic). Metode ini dapat digunakan dalam penentuan gula pereduksi seperti glukosa, galaktosa, laktosa, dan maltose. Prinsip metode DNS adalah gula pereduksi akan bereaksi dengan reagen DNS membentuk senyawa asam 3-amino-5-nitrosalisilat

yang berwarna kuning kecoklatan. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 540 nm [26].

Pada pengujian kadar protein total dapat dilakukan dengan metode biuret. Metode ini digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya ikatan peptida dalam suatu senyawa sehingga uji biuret dapat digunakan untuk menunjukkan adanya senyawa protein. Prinsip dasar metode biuret adalah mengukur banyaknya ikatan peptida yang berikatan dengan Cu yang didasarkan pembentukan warna ungu [27].

Pengukuran kadar fenol total dilakukan menggunakan pereaksi *Folin Ciocalteu*. Prinsip dari pengukuran kadar fenol total adalah pembentukan senyawa kompleks biru dari fosfomolibdat-fosfotungstat yang direduksi oleh senyawa fenolik dalam suasana basa yang dapat diukur secara spektrofotometri dengan panjang gelombang maksimum 760 nm [28]. Pembentukan warna kompleks biru dapat terbentuk dengan cepat pada suhu yang hangat. Pada penelitian ini, larutan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C untuk mempercepat terbentuknya warna biru kompleks. Beberapa contoh baku pembanding yang dapat digunakan dalam pengukuran kadar fenol total antara lain yaitu asam tanat, asam galat, katekin dan tirosin. Namun, baku pembanding yang sering digunakan adalah asam galat karena asam galat memiliki 3 gugus hidroksi fenolik yang merupakan unit signifikan fenolik [29].

## **G. LANDASAN TEORI**

Daun *Moringa oleifera* L. memiliki senyawa fenolik golongan flavonoid dengan aktivitas antioksidan yang diidentifikasi berupa kaempferol dan kuersetin. Antioksidan bekerja sebagai inhibitor penghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif sehingga membentuk radikal bebas tak reaktif yang relatif stabil. Senyawa fenol yang terdapat pada daun *Moringa oleifera* L. juga dapat menghambat aktivitas bakteri dengan mekanismenya yaitu mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut.

Fermentasi akan mempengaruhi komposisi senyawa biokimia yang akan berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan dan antimikroba sehingga terjadi perubahan fisik. Faktor-faktor yang mempengaruhi fermentasi seperti pH, suhu, waktu fermentasi, substrat, dan inokulum [10]. Hasil fermentasi yang didapatkan akan dilakukan uji pH, kadar asam total, kadar glukosa, kadar protein, kadar fenol total, dan aktivitas antioksidan. Total gula menunjukkan pemanfaatan sumber karbon sebagai substrat yang dimanfaatkan oleh starter sebagai sumber energi. Pengukuran pH menunjukkan aktivitas metabolisme untuk menghasilkan senyawa seperti asam yang menyebabkan penurunan pH dan peningkatan biomassa protein menunjukkan peningkatan pH [30].

Pengukuran potensi antioksidan dilakukan dengan metode peredaman radikal bebas menggunakan DPPH [31]. Prinsip metode DPPH adalah mendonor electron atau hidrogen dari senyawa antioksidan seperti senyawa fenolik yang mengandung inti katekol ke senyawa radikal bebas sehingga diperoleh senyawa radikal yang lebih stabil (ditandai dengan menurunnya intensitas warna ungu kemudian diukur pada rentang panjang gelombang maksimum 515-517nm di daerah cahaya tampak).

*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 dalam proses fermentasi dapat meningkatkan konsentrasi bioavailabilitas senyawa polifenol dan menghasilkan senyawa antimikroba seperti asam-asam organik, hidrogen peroksida, dan bakteriosin [17]. Dalam meningkatkan potensi senyawa polifenol dan antimikroba, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 memerlukan glukosa sebagai sumber karbohidratnya. Glukosa dipilih karena memiliki memiliki tingkat produksi asam dan penggunaan jumlah gula yang paling tinggi serta waktu fermentasi paling cepat. Glukosa juga termasuk kedalam golongan monosakarida yang mudah ditemui sehari-hari [17]. Keuntungan penambahan glukosa adalah *Lactobacillus acidophilus* akan semakin cepat tumbuh, sehingga aktivitas *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 akan meningkat, mempercepat waktu produksi dan menekan biaya produksi.

## **H. HIPOTESIS**

Penambahan glukosa pada fermentasi infusa daun *Moringa oleifera* L. oleh *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 dapat mempengaruhi potensi antioksidan dan antimikroba.

## **BAB III**

### **RANCANGAN PENELITIAN**

#### **A. PRINSIP PENELITIAN**

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode fermentasi pada infusa daun *Moringa oleifera* L. dengan variasi konsentrasi 4%, 2%, dan 1% serta dilakukan penambahan glukosa 1% untuk mengetahui potensi aktivitas antioksidan dan antimikroba fermentasi daun *Moringa oleifera* L. Pembuatan infusa dilakukan dengan metode *Hard Infusion*. *Hard Infusion* dapat mengekstraksi metabolit sekunder seperti senyawa fenolik di dalam air pada suhu 85°C selama 30 menit serta dilakukan penambahan glukosa pada infusa. Proses fermentasi dilakukan dengan menggunakan *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 yang berjalan selama 18 jam dengan teknik penggoyangan sebesar 80 rpm sebagai pengatur agitasi pada orbital shaker. Analisis yang dilakukan pada produk fermentasi meliputi pengukuran jumlah sel, pH, kadar asam total, kadar glukosa, kadar protein, kadar fenol total, skrining fitokimia, dan uji aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal bebas menggunakan DPPH yang diukur dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 515.5 nm dan metode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), menghitung nilai *Inhibition Concentration* 50 (IC<sub>50</sub>).

#### **B. TEMPAT PENELITIAN**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Skripsi Fakultas Farmasi Universitas Pancasila Jakarta Selatan.

### C. TAHAP PENELITIAN

1. Meremajakan bakteri *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 dan stok inokulum
  - a. Peremajaan *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356
  - b. Pembuatan stok inokulum *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356
  - c. Pembuatan starter inokulum infusa dan MRS broth
  - d. Perhitungan jumlah stok dan starter inokulum sebelum diinokulasikan ke infusa
2. Pembuatan infusa fermentasi daun *Moringa oleifera* L. ditambah glukosa 1% dan media MRSB
  - a. Pembuatan infusa daun *Moringa oleifera* L. ditambah glukosa 1%
  - b. Inokulasi starter
  - c. Inkubasi fermentasi
  - d. Pengambilan sampel
3. Karakterisasi organoleptik dan skrining fitokimia

Diamati organoleptik dari hasil fermentasi daun *Moringa oleifera* L. seperti warna, bau, dan rasa. Selanjutnya hasil fermentasi dikarakterisasi senyawa metabolit sekundernya antara lain:

  - a. Identifikasi alkaloid
  - b. Identifikasi flavonoid
  - c. Identifikasi saponin
  - d. Identifikasi kuinon
  - e. Identifikasi steroid dan triterpenoid
  - f. Identifikasi minyak atsiri
  - g. Identifikasi kumarin
  - h. Identifikasi tanin galat dan katekuat
  - i. Identifikasi senyawa fenolik
4. Menghitung jumlah sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 dalam fermentasi *Moringa oleifera* L. menggunakan *Optical densitometer*

- a. Pengukuran kurva standar
- b. Pengukuran sampel
5. Pengukuran pH crude ekstrak daun *Moringa oleifera* L.
  - a. Standarisasi pH meter
  - b. Pengukuran sampel
6. Pengukuran kadar asam total crude ekstrak daun *Moringa oleifera* L.
  - a. Pembuatan standar NaOH menggunakan KHP
  - b. Pengukuran kadar asam total dalam sampel
7. Pengukuran kadar glukosa
  - a. Pembuatan larutan DNS
  - b. Penetapan panjang gelombang maksimum
  - c. Pengukuran serapan kurva standar
  - d. Pengukuran serapan dalam sampel
  - e. Penetapan kadar glukosa yang terdapat dalam sampel
8. Pengukuran kadar fenol total
  - a. Penyiapan larutan Natrium karbonat 7.5%
  - b. Penetapan panjang gelombang maksimum
  - c. Penetapan waktu stabil serapan (*operating time*)
  - d. Pengukuran serapan kurva standar
  - e. Pengukuran serapan dalam sampel
  - f. Penetapan kadar polifenol dalam sampel
9. Pengukuran kadar protein
  - a. Pembuatan pereaksi buret
  - b. Penetapan panjang gelombang maksimum
  - c. Penetapan waktu stabil serapan (*operating time*)
  - d. Pengukuran serapan kurva standar
  - e. Pengukuran serapan dalam sampel
  - f. Penetapan kadar protein dalam kurva standar dan sampel

10. Pengukuran Konsentrasi Hambat Minimum untuk antimikroba dan pengukuran potensi antioksidan dengan menggunakan metode DPPH dan FRAP (Ferric Reduction Antioksidan Powder)
  - a. Pengukuran Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)
  - b. Pengukuran aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH
    1. Penyiapan larutan DPPH 0.4 Mm
    2. Pembuatan larutan blanko
    3. Penentuan panjang gelombang maksimum
    4. Pengukuran waktu stabil
    5. Pengukuran control positif vitamin C
    6. Pengukuran sampel
    7. Perhitungan persen inhibisi dan menghitung nilai  $IC_{50}$
  - c. Pengukuran aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode FRAP
    1. Pembuatan larutan dapar fosfat 0.2 M pH 6.6
    2. Pembuatan larutan oksalat 1%
    3. Pembuatan larutan Kalium Ferrisianida 1%
    4. Pembuatan larutan  $FeCl_3$  0.1%
    5. Pembuatan larutan asam trikloroasetat (TCA) 10%
    6. Pengukuran kurva standar
    7. Pengukuran sampel dan perhitungan daya antioksidan
11. Analisa data
  - a. Data pengukuran nilai pH, kadar asam total, kadar total glukosa, kadar total protein, kadar fenol total dianalisis dengan menggunakan (ANOVA) *one-way* dan uji lanjutan yaitu uji BNt (beda nyata terkecil) dari masing-masing presentase substrat dan presentase inoculum. Asas keberartian yang digunakan (P) adalah 0.05.
  - b. Data pengukuran aktivitas antioksidan dianalisis dengan menggunakan (ANOVA) *one-way* dan uji lanjutan yaitu uji BNt (beda nyata terkecil) dari

masing-masing presentase substrat dan presentase inoculum. Asas keberartian yang digunakan (P) adalah 0.05.

## BAB IV

### ALAT, BAHAN, DAN METODE PENELITIAN

#### A. ALAT DAN BAHAN PENELITIAN

##### 1. ALAT

Tabung reaksi, beaker glass, corong glass, gelas ukur, labu tentukur, penangas air, cawan penguap, penjepit kayu, batang pengaduk, kertas saring, Erlenmeyer, ove, autoklaf, inkubator, spektrofotometer UV-Vis, waterbath, mikropipet, tip mikropipet, timbangan analitik, timbangan microbalance, vortex, *orbital shaker*, membrane saring Sartorius diameter 0.22 $\mu$ m, LAF (*Laminar Air Flow*), vial, tabung sentrifuge, mikroskop, *plate hemasitometer*, *Eppendorf*, pH meter, *Open disposable*.

##### 2. BAHAN

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun *Moringa oleifera* L., bakteri *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, MRS agar, aqua destillata (air suling), *buffer* pH 4 dan 7, reagen DNS, NaOH 2N, Na-K tatra, glukosa, reagen biuret, BSA (*Bovine Serum Albumin*), kalium biftalat, reagen Folin-Ciocalteu, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), Natrium karbonat jenuh, asam tanat, indikator fenoltalein, NaOH 0.1 N, asam klorida, asam sitrat jenuh, timbal asetat, eter, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, petroleum eter, kloroform, ammonia (NH<sub>4</sub>OH) 10%, besi(III)klorida 1%, gelatin 1%, pereaksi Stiansy (Formaldehid 30%:HCL pekat = 2:1), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, *buffer* fosfat pH 6.6, larutan kalium heksasianoferat 1%, larutan TCA 10%, FeCl<sub>3</sub> 0.1%, indikator ferroin, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.7 N, FeSO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4 N.

### 3. MIKROBA UJI

Mikroba yang digunakan sebagai mikroba uji adalah *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Klebsiella pneumonia* ATCC 10031, dan *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

## B. METODE PENELITIAN

1. Meremajakan bakteri *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 dan stok inoculum
  - a. Peremajaan bakteri *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356  
Diinokulasikan bakteri pada media MRS agar miring kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 35°-37°C.
  - b. Pembuatan stok inoculum *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356  
Diinokulasikan bakteri pada MRS broth cair kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 35°-37°C.
  - c. Pembuatan starter inoculum infusa  
Hasil peremajaan dari *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 diperkaya di dalam seduhan daun *Moringa oleifera* L., kemudian diinkubasi selama 24 jam.
  - d. Perhitungan jumlah stok dan starter inoculum sebelum diinokulasikan ke infusa  
Perhitungan stok inoculum yang akan digunakan sebagai starter menggunakan hemositometer dengan jumlah sel  $2 \times 10^8$  (CFU/mL).
2. Pembuatan infusa fermentasi daun *Moringa oleifera* L ditambah glukosa 1%  
Ditimbang  $\pm$  120gram daun *Moringa oleifera* L pada konsentrasi 4%, lalu dilakukan penyeduhan pada suhu 85°C selama 30 menit dengan volume aquadest  $\pm$  3000 mL. Hasil penyeduhan kemudian disaring sampai hasil saringan jernih dan bebas dari serbuk daun *Moringa oleifera* L. Diperoleh hasil penyaringan  $\pm$  1500 mL, kemudian dilakukan pengenceran untuk memperoleh

konsentrasi substrat 4% dan 2%, dari konsentrasi 1% dengan cara perhitungan menggunakan rumus  $V_1N_1 = V_2N_2$ . Seduhan hasil penyeduhan disaring menggunakan kertas saring kemudian ditambahkan glukosa 1% dan dilakukan proses sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit yang akan digunakan sebagai substrat.

a. Inokulasi Starter

Starter diinokulasikan sebanyak  $2 \times 10^8$  (CFU/mL) ke dalam media fermentasi seduhan daun *Moringa oleifera* L.

b. Inkubasi Fermentasi

Inkubasi proses fermentasi dilakukan pada suhu ruang selama 18 jam dengan penggoyangan *orbital shaker* pada 80 rpm.

c. Pengambilan Sampel

Dilakukan pengambilan sampel setelah 18 jam pada setiap konsentrasi substrat dan inokulum.

3. Karakteristik dan skrining fitokimia produk fermentasi *Moringa oleifera* L.

Diamati organoleptik dari hasil fermentasi daun *Moringa oleifera* L. seperti warna, bau, dan rasa. Selanjutnya hasil fermentasi dikarakterisasi senyawa metabolit sekundernya antara lain:

a. Identifikasi Alkaloid

Dipipet sejumlah 5 mL sampel dan ditetesi larutan asam klorida kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh kemudian ditetesi larutan asam sitrat jenuh. Endapan kuning yang terbentuk menandakan adanya kandungan alkaloid.

b. Identifikasi Flavonoid

Larutan timbal asetat ditetaskan ke dalam 5 mL sampel. Warna kuning yang terbentuk menandakan adanya kandungan flavonoid.

c. Identifikasi Saponin

Sebanyak 5 mL sampel dicampur dengan aquadest lalu dikocok kuat sehingga terbentuk busa. Bila terbentuk busa yang stabil, sampel mempunyai kandungan senyawa saponin.

d. Identifikasi Kuinon

Sebanyak 5 mL sampel ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 1 N. Pembentukan warna merah intensif menunjukkan adanya kandungan kuinon dalam sampel.

e. Identifikasi Golongan Steroid dan Triterpenoid

Sebanyak 5 mL sampel dicampur dengan 20 mL eter dalam Erlenmeyer tutup dan didiamkan selama 2 jam. Campuran kemudian disaring dan diuapkan di cawan penguap. Residu kemudian ditetesi 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Warna hijau dan merah yang terbentuk menunjukkan adanya steroid dan triterpenoid.

f. Identifikasi Minyak Atsiri

Sebanyak 10 mL sampel diuapkan dengan cawan penguap di atas waterbath kemudian ditambahkan 10 mL petroleum eter. Larutan campuran ditempatkan dalam Erlenmeyer. Bagian atas Erlenmeyer dipasang corong dan kapas yang sudah dibasahi. Larutan dipanaskan selama 10 menit dan dinginkan, saring dengan kertas saring. Filtrat diuapkan pada cawan penguap, residu dilarutkan dengan pelarut alkohol sebanyak 5 mL lalu, saring dengan kertas saring. Filtratnya diuapkan pada cawan penguap, residu berbau aromatik menunjukkan adanya golongan minyak atsiri.

g. Identifikasi Kumarin

Sebanyak 5 mL sampel dengan cawan penguap di atas waterbath. Residu kemudian ditambahkan 20 mL kloroform dan ditempatkan dalam erlenmeyer. Bagian atas Erlenmeyer dipasang corong dan kapas yang telah dibasahi air sebagai pendingin balik. Larutan dipanaskan di waterbath selama 20 menit. Setelah itu, disaring dengan kertas saring dan diuapkan kembali pada cawan uap. Residu ditambahkan 10 ml air panas dan 0.5 mL ammonia (NH<sub>4</sub>OH) 10%. Larutan campuran kemudian diamati di bawah sinar ultraviolet pada  $\lambda$  365 nm.

#### h. Identifikasi Tanin

##### 1). Tanin galat

5 ml sampel ditambahkan dengan 1 ml air kemudian ditambahkan 2 tetes besi(III)klorida. Warna biru menunjukkan adanya senyawa tanin galat.

##### 2). Tanin katekuat

5 ml sampel ditambahkan 1 ml air kemudian ditambahkan 2 tetes besi(III)klorida. Warna hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin katekuat.

#### i. Identifikasi senyawa fenol

Sebanyak 5 ml sampel ditetesi 3-4 tetes larutan besi(III)klorida. Warna biru kehitaman menandakan adanya kandungan senyawa fenol.

4. Menghitung jumlah sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 dalam fermentasi daun *Moringa oleifera* L. menggunakan optical densitometer. Diambil 12,5 ml suspensi bakteri daun *Moringa oleifera* L. kemudian diukur *optical density* (OD) pada panjang gelombang maksimum 454 nm. Pertumbuhan sel bakteri dihitung berdasarkan persamaan regresi dengan menggunakan persamaan kurva baku pertumbuhan sel yang telah didapatkan sebelumnya.

$$y = a + bx$$

Keterangan:

y= jumlah sel

a= nilai intercept (perpotongan garis terhadap koordinat)

b= nilai slope (kemiringan garis)

x= serapan

Pembuatan kurva standar *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 optical density:

Kultur bakteri *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 24 jam pada media fermentasi daun *Moringa oleifera* L. dibuat konsentrasi perbandingan 1:0, 1:1,

1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7 dengan larutan pengencernya. Dihomogenkan dan diukur *optical density* (OD) pada panjang gelombang maksimum 454 nm dan dihitung jumlah sel bakteri dengan spektrofotometer UV-Vis berdasarkan serapan.

5. Pengukuran pH crude ekstrak *Moringa oleifera* L.

a. Standarisasi pH

Alat pH meter dinyalakan dan dibiarkan stabil selama 15-30 menit. Pengatur suhu pH meter diset sesuai dengan suhu larutan buffer. Elektroda pH meter dibilas dengan larutan buffer atau aquades kemudian, dikeringkan dengan kertas tisu jika digunakan aquadest. Elektroda dicelupkan dalam larutan buffer, pH meter diset pada pengukuran pH. Dibiarkan beberapa saat sampai jarum pH meter stabil kemudian, tombol kalibrasi diputar sampai jarum pH meter menunjukkan angka yang sama dengan pH larutan buffer. Standarisasi dilakukan pada pH 4 da 7.

b. Pengukuran sampel

Suhu sampel diukur dan pengatur suhu pH meter diset pada suhu terukur. Elektroda dibilas dengan aquadest dan dikeringkan dengan tisu. Elektroda dicelupkan pada sampel dan pH meter diset pada pengukuran pH. Elektroda dibiarkan beberapa saat sampai jarum pH meter stabil. Jarum pH meter menunjukkan pH sampel. Hasil yang didapatkan dihitung presentasenya dengan rumus:

$$\text{Presentase (\%)} = \frac{\text{hasil awal} - \text{hasil akhir}}{\text{hasil awal}} \times 100$$

6. Pengukuran kadar asam total crude ekstrak *Moringa oleifera* L.

a. Pembuatan standar NaOH menggunakan KHP

Memanaskan kalium biftalat di dalam oven 150°C selama 2 jam lalu, timbang sejumlah 0.2 g kalium biftalat kemudian dilarutkan dalam 10 ml

air bebas CO<sub>2</sub> lalu, ditambahkan 2 tetes indikator fenolftalein. Kemudian, titrasi dengan NaOH 0.1 N hingga berwarna merah jambu.

$$\text{Normalitas NaOH} = \frac{\text{berat kalium biftalat (mg)}}{\text{volume NaOH (mL) x berat ekivalen kalium}}$$

b. Penetapan kadar asam total

Total asam diukur dengan cara 10 ml sampel ditambah indikator fenolftalein 2-3 tetes dan selanjutnya dititrasi menggunakan NaOH 0.1 N sampai didapatkan titik akhir titrasi berwarna merah muda.

c. Penetapan kadar asam dalam sampel

Total Asam (%) adalah:

$$\frac{\text{Volume NaOH x N NaOH x fp x 0.09}}{\text{volume bahan (mL)}} \times 100\%$$

Hasil yang didapatkan dihitung persentasenya dengan rumus:

$$\text{Presentase (\%)} = \frac{\text{hasil awal} - \text{hasil akhir}}{\text{hasil awal}} \times 100$$

7. Pengukuran glukosa crude ekstrak *Moringa oleifera* L.

a. Pembuatan larutan DNS (asam 3, 5-dinitrosalisilat)

Dibuat dengan cara menimbang 1 gr reagen DNS (asam 3, 5-dinitrosalisilat) dilarutkan dalam 20 mL aquadest. Diletakkan di dalam waterbath pada suhu 80°C selama 5 menit. Pada suhu ruang 25°C ditempatkan pada labu tentukur 100 mL ditambahkan 1 gram NaOH 2 N ditambah dengan 0.05 gr Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> dalam 1 mL Na-K tatarat 40% dan ditambah air sampai dengan 100 mL.

b. Penetapan panjang gelombang maksimum

Dibuat larutan glukosa dengan konsentrasi 200  $\mu\text{g/mL}$  dari larutan stok glukosa dengan konsentrasi 500  $\mu\text{g/mL}$  dengan cara memipet 1 ml dari larutan stok glukosa 500  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu tentukur 5.0 ml ditambahkan 2 mL larutan DNS dan aquadest hingga tanda batas lalu campuran dipanaskan selama 10 menit. Selanjutnya, dibuat spectrum serapannya pada rentang panjang gelombang 400-800 nm secara spektrofotometer visible.

c. Penetapan kurva standar glukosa

Sejumlah 25 mg glukosa dimasukkan ke dalam labu ukur 25.0 ml dan ditambahkan aquadest hingga tanda, sehingga diperoleh larutan stok glukosa dengan konsentrasi 500  $\mu\text{g/mL}$ . selanjutnya dipipet sejumlah 1 mL, 1.25 mL, 1.5 mL, 1.75 mL, 2 mL, dan 2.25 mL dari larutan stok glukosa 500  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu ukur 5.0 mL untuk mendapatkan konsentrasi 200  $\mu\text{g/mL}$ , 250  $\mu\text{g/mL}$ , 300  $\mu\text{g/mL}$ , 350  $\mu\text{g/mL}$ , 400  $\mu\text{g/mL}$  dan 450  $\mu\text{g/mL}$ . kemudian, ditambahkan 2 mL larutan DNS dan aquadest hingga tanda batas lalu, campuran dipanaskan selama 10 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 505.5 nm.

d. Pengukuran sampel

Sebanyak 1 mL sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 5.0 ml kemudian ditambahkan 2 mL larutan DNS dan aquadest hingga tanda batas lalu, ditutup tabung dengan aluminium *foil* dan dipanaskan selama 10 menit. Selanjutnya, diukur pada  $\lambda$  505.5 nm.

e. Perhitungan kadar glukosa

Kadar glukosa dihitung berdasarkan persamaan regresi dengan menggunakan persamaan kurva baku glukosa yang telah didapatkan sebelumnya.

$$y = a + bx$$

Keterangan:

y= jumlah sel

a= nilai intercept (perpotongan garis terhadap koordinat)

b= nilai slope (kemiringan garis)

x= konsentrasi gula (mg/L)

f. Hasil yang didapatkan dihitung persentasenya dengan rumus:

$$\text{Presentase (\%)} = \frac{\text{hasil awal} - \text{hasil akhir}}{\text{hasil awal}} \times 100$$

## 8. Pengukuran kadar fenol

a. Penetapan standarisasi asam galat

1). Penyiapan larutan Natrium karbonat 7.5 %

Larutan natrium karbonat 7.5% dibuat dengan melarutkan 7.5gram natrium karbonat dalam 100 mL air hangat. Larutan natrium karbonat yang diperoleh didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang. Setelah itu, larutan disaring terlebih dahulu bila akan digunakan.

2). Penetapan panjang gelombang maksimum

Dipipet sejumlah 400  $\mu\text{L}$  larutan baku asam galat 500  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu tentukur 10 mL. Ditambahkan sejumlah 80  $\mu\text{L}$  reagen *Follin Ciocaltheau* dan didiamkan selama 8 menit. Setelah itu, ditambahkan 600  $\mu\text{L}$  larutan natrium karbonat 7.5 % dan aquadest sampai tanda batas sehingga, diperoleh larutan uji dengan konsentrasi 2  $\mu\text{L/mL}$ . larutan uji kemudian dibuat spectrum panjang gelombang pada rentang 400-800 nm.

3). Penetapan waktu stabil (*Operating time*)

Larutan uji yang digunakan untuk penetapan panjang gelombang maksimum diukur serapan stabilnya pada panjang gelombang 760 nm yang diperoleh setiap 5 menit selama 120 menit.

4). Pembuatan kurva baku dan persamaan regresi

Sejumlah 5 mg asam galat dilarutkan dengan 2 mL etanol 70% dan aquadest dalam labu tentukur 250 mL, sehingga diperoleh larutan baku asam galat dengan konsentrasi 20 µg/mL. Selanjutnya, dipipet sejumlah dengan 500 µL, 750 µL, 1000 µL, 1250 µL, 1500 µL dan 1750 µL dari larutan stock asam galat 20 µg/mL ke dalam labu tentukur 5 mL untuk mendapatkan konsentrasi 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5 µg/mL, 6 µg/mL, dan 7 µg/mL. kemudian, ditambahkan 80 µL reagen *Folin-Ciocalteu* dan didiamkan selama 8 menit di tempat yang gelap untuk bereaksi. Setelah itu, ditambahkan sejumlah 600 µL natrium karbonat 7.5% dan aquadest sampai tanda batas. Masing-masing larutan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 1 jam dan diukur serapannya pada panjang gelombang 760 nm. Setelah itu, dibuat kurva hubungan antara konsentrasi asam galat dengan serapan.

5). Pengukuran kadar fenol total

Larutan sampel diambil sebanyak 250 µL dan dimasukkan ke labu tentukur 5,0 mL kemudian, ditambahkan 80 µL reagen *Folin ciocalteu* dan didiamkan selama 8 meniit pada tempat gelap agar bereaksi. Ditambah sejumlah 600 µL natrium karbonat 7,5% dan aquadest sampai tanda batas. Masing-masing larutan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 1 jam dan diukur serapannya pada Panjang gelombang 760 nm.

b. Penetapan kadar fenol

Serapan yang diperoleh dihitung dengan persamaan regresi yang diperoleh dari baku pembanding dan dimasukkan dalam rumus

$$C = \frac{C_u \times V_a \times F_p}{B_u} \times 100 \%$$

Keterangan :

C = kadar fenolik total ( $\mu\text{g/mL}$ )

Cu = konsentrasi uji dari persamaan kurva baku asam galat ( $\text{mg/mL}$ )

Va = volume akhir ( $\text{mL}$ )

Fp = faktor pengenceran

Bu = bobot uji ( $\text{g}$ )

Hasil yang didapatkan dihitung persentasenya dengan rumus :

$$\text{Presentase (\%)} = \frac{\text{hasil awal} - \text{hasil akhir}}{\text{hasil awal}} \times 100$$

#### 9. Pengukuran kadar protein

##### a. Pembuatan reaksi Biuret

Sejumlah 1.5 gr tembaga sulfat dan 6.0gram potassium sodium tetratrat dicampur dengan 500 mL natrium hidroksida 10 %. Dipindahkan ke labu tentukur 1 L dan ditambahkan dengan aquadest hingga tanda.

##### b. Penetapan panjang gelombang maksimum

Dibuat larutan *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan konsentrasi 0.2%, 0.4 %, dan 0.6% dari larutan stok BSA 1% ke dalam labu tentukur 5.0 ml kemudian, ditambahkan 4 mL pereaksi biuret. Selanjutnya, dibuat spectrum serapannya pada panjang gelombang 400-800 nm secara spektrofotometer visible.

##### c. Penetapan waktu stabil serapan

Dibuat larutan *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan konsentrasi 0.2% dari larutan stok BSA 1% kemudian, ditambahkan 4 mL pereaksi biuret lalu, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 545.2 nm setiap 5 menit selama 60 menit.

#### 10. Pengukuran Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) untuk antimikroba dan pengukuran potensi antioksidan dengan menggunakan metode DPPH

##### Pengukuran Konsentrasi Hambat Minimum

##### a. Pembuatan Suspensi Mikroba Uji

Bakteri *Eschericia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Klebsiella pneumonia* ATCC 10031, dan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 yang telah diremajakan (umur 24 jam) diinokulasikan ke dalam erlenmeyer berisi 50 mL TSB. Setelah itu, diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 35°-37°C. Jamur *Candida albicans* ATCC 10231 yang telah diremajakan (umur 24jam) diinokulasikan ke dalam erlenmeyer berisi 50 mL PDB. Setelah itu, diinkubasikan selama 3-5 hari pada 30°-35°C untuk jamur dan digunakan sebagai inoculum.

b. Pengukuran Konsentrasi Hambat Minimum

Penipisan seri TSB untuk bakteri dan PDB untuk khamir dengan cara disiapkan tabung dan masing-masing tabung ditambahkan 1 mL TSB dan PDB. Pada tabung pertama dimasukkan hasil fermentasi daun *Moringa oleifera* L. dan dibuat seri pengenceran 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.13%, 1.56%, 0.78%, dan 0.39%. seri pengenceran dibuat dengan cara dipindahkan 1 mL ke tabung kedua dan seterusnya. Lalu, ditambahkan 0.5 mikroba 25%T (menunjukkan jumlah koloni sebanyak  $10^8$  CFU/ml. Dihomogenkan. Diinkubasi suhu 35°-37°C selama 18-24 jam untuk bakteri dan suhu 20°-25°C selama 3-5 hari untuk khamir. Ditentukan KHM masing-masing sampel dengan cara mengamati yang paling minimal pengencerannya tetapi, masih memiliki hasil yang + (positif).

Pengukuran aktivitas antioksidan:

1. Metode DPPH

Pengukuran aktivitas antioksidan pada hasil fermentasi seduhan daun *Moringa oleifera* L. dilakukan dengan menggunakan metode DPPH. Pelaksanaan langkah-langkah pengukuran aktivitas antioksidan harus di tempat yang terhindar dari cahaya dan setiap alat gelas yang digunakan harus dilapisi kertas alumunium foil.

a. Penyiapan larutan DPPH 0.4 mM

Larutan DPPH 0.4 mM dibuat dengan cara menimbang 4 mg (BM: 394.32) serbuk DPPH dan dilarutkan dengan methanol pro analisis hingga 25.0 mL. Dihomogenkan, dan ditempatkan dalam botol gelap.

b. Pembuatan larutan blanko

Dipipet 1 mL larutan DPPH (0.4 mM) dan ditambahkan methanol pro analisis sampai 5.0 mL kemudian, dihomogenkan dan dilapisi alumunium foil.

c. Penentuan panjang gelombang maksimum

Dipipet 1 mL larutan DPPH (0.4 mM), dimasukkan ke dalam labu tentukur 5.0 mL. ditambahkan methanol pro analisis hingga tanda kemudian, dihomogenkan dengan vortex dan dilapisi alumunium foil lalu, dibuat spectrum serapannya pada rentang panjang gelombang 400-600 nm.

d. Pengukuran waktu stabil (*Operating time*)

Dipipet larutan vitamin C sebanyak 10  $\mu$ L, ditambahkan 1 mL larutan DPPH dengan konsentrasi 0.4 mM. Dimasukkan ke dalam labu tentukur 5.0 ml dan ditambahkan methanol pro analisis hingga tanda kemudian, dihomogenkan dengan vortex dan dilapisi alumunium foil. Larutan campuran diukur pada panjang gelombang 515.5 nm setiap 5 menit dengan durasi waktu selama 60 menit. Diamati waktu stabilnya.

e. Pengukuran kontrol positif vitamin C

Ditimbang sejumlah 10 mg vitamin C kemudian dilarutkan dengan methanol pro analisis ke dalam labu tentukur 10 mL yang telah dilapisi alumunium foil sehingga diperoleh larutan induk vitamin C dengan konsentrasi 1000  $\mu$ g/mL. Kemudian, dipipet 1 ml dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 ml. Ditambahkan methanol

pro analisis sehingga diperoleh konsentrasi 100 bpj. Kemudian dibuat konsentrasi 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , 1  $\mu\text{g/mL}$ , 1.5  $\mu\text{g/mL}$ , 2  $\mu\text{g/mL}$ , 2.5  $\mu\text{g/mL}$ , dan 3  $\mu\text{g/mL}$ . Dipipet 25  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$ , 75  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 125  $\mu\text{L}$ , dan 150  $\mu\text{L}$  ke dalam labu tentukur 5.0 mL. ke dalam masing-masing tabung ditambahkan 1.0 mL.

Larutan DPPH (0.4 mM) dan ditambahkan methanol pro analisis sampai tanda 5.0 mL. Dihomogenkan dan dilapisi dengan alumunium foil. Seluruh larutan sampel diinkubasi dalam incubator pada suhu 37°C selama 30 menit dan segera diukur serapannya pada panjang gelombang 515.5 nm.

f. Pengukuran sampel

Hasil fermentasi daun *Moringa oleifera* L. dipipet sebanyak 1.25 ml untuk konsentrasi substrat 0.5 %, dipipet sebanyak 0.625 ml untuk konsentrasi substrat 1 % dan dipipet sebanyak 0.417 ml untuk konsentrasi substrat 0.5 % lalu, dimasukkan ke dalam labu tentukur 25.0 ml kemudian, ditambahkan methanol pro analisis sampai tanda sehingga diperoleh konsentrasi 250  $\mu\text{g/mL}$ . Dibuat konsentrasi 25  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 75  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , dan 125  $\mu\text{g/mL}$ . Dipipet 500  $\mu\text{L}$ , 1000  $\mu\text{L}$ , 1500  $\mu\text{L}$ , 2000  $\mu\text{L}$ , 2500  $\mu\text{L}$  dari larutan induk 250  $\mu\text{g/mL}$  dimasukkan ke dalam labu tentukur 5.0 mL. ditambahkan 1.0 mL larutan DPPH (0.4 mM) dan ditambahkan dengan methanol pro analisis sampai tanda. Dihomogenkan dan dilapisi dengan alumunium foil. Seluruh larutan sampel diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 30 menit dan segera diukur serapannya pada panjang gelombang 515.5 nm.

g. Perhitungan persen inhibisi dan menghitung nilai  $\text{IC}_{50}$  melalui analisis probit atau regresi linear. Serapan DPPH yang diperoleh

dari hasil pengukuran dihitung persen penghambatannya dengan menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi}_{\text{blanko}} - \text{Absorbansi}_{\text{sampel}}}{\text{Absorbansi}_{\text{blanko}}} \times 100\%$$

Data persen penghambatan yang diperoleh selanjutnya dihitung dengan menggunakan persamaan garis regresi yang diperoleh dari kurva hubungan antara konsentrasi sebagai sumbu x dan nilai peredaman radikal bebas sebagai sumbu y. Kemudian, didapatkan persamaan  $y = a + bx$  yang digunakan untuk memperoleh nilai  $IC_{50}$  (*Inhibition Concentration 50*) yaitu konsentrasi antioksidan yang mampu menghambat 50 % radikal bebas.

Hasil yang didapatkan dihitung persentasenya dengan rumus:

$$\text{Presentase (\%)} = \frac{\text{hasil awal} - \text{hasil akhir}}{\text{hasil awal}} \times 100$$

## 11. Analisa Data

- a. Data pengukuran nilai pH, kadar asam total, kadar total glukosa, kadar total protein, kadar fenol total dianalisis dengan menggunakan (ANOVA) *one-way* dan uji lanjutan yaitu uji BNt (beda nyata terkecil) dari masing-masing presentase substrat dan presentase inokulum. Asas keberartian yang digunakan (P) adalah 0.05.
- b. Data pengukuran aktivitas antioksidan dianalisis dengan menggunakan (ANOVA) *one-way* dan uji lanjutan yaitu uji BNt (beda nyata terkecil) dari masing-masing presentase substrat dan presentase inokulum. Asas keberartian yang digunakan (P) adalah 0.05.

## BAB V

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### A. SKRINING FITOKIMIA DAN ORGANOLEPTIK PRODUK FERMENTASI *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 PADA SEDUHAN DAUN *Moringa oleifera* L.

Skrining fitokimia dan organoleptik daun *Moringa oleifera* L. sebelum dan sesudah dilakukannya fermentasi tercantum pada tabel 5.1. Skrining fitokimia bertujuan untuk mengetahui jenis senyawa fitokimia di dalam daun *Moringa oleifera* L. seperti alkaloid, flavonoid, tannin katekuat, tannin galat, triterpenoid, steroid, kuinon, minyak atsiri, saponin, kumarin, dan fenolik. Uji organoleptik bertujuan untuk mengetahui perbedaan warna, bau, dan rasa daun *Moringa oleifera* L. sebelum dan sesudah fermentasi. Hal tersebut dapat dilihat berdasarkan tabel dibawah ini:

Tabel 5.1 Skrining fitokimia seduhan daun *Moringa oleifera* L.

	Sebelum Fermentasi (Dengan penambahan glukosa)	Sesudah Fermentasi (Dengan penambahan glukosa)	Kontrol – (Seduhan yang tidak difermentasi)
Fitokimia			
Alkaloid	-	-	-
Flavonoid	+	+	+
Tanin katekuat	+	+	+
Tanin galat	-	-	-
Triterpenoid	+	+	+
Steroid	-	-	-
Kuinon	-	-	-
Minyak atsiri	+	+	+
Saponin	+	+	+
Kumarin	-	-	-
Fenolik	+	+	+

Tabel 5.2 Organoleptik seduhan daun *Moringa oleifera* L.

Organoleptik				
		Warna	Rasa	Bau
1%	Sebelum fermentasi	Coklat Kuning	Kelat, Manis	Khas Moringa
	Sesudah fermentasi	Coklat Kuning	Asam, Manis, Segar	Khas Moringa Agak Asam
2%	Sebelum fermentasi	Coklat Muda	Kelat, Manis	Khas Moringa
	Sesudah fermentasi	Coklat	Asam, Manis, Segar	Khas Moringa Agak Asam
4%	Sebelum fermentasi	Coklat Kehitaman	Kelat, Manis	Khas Moringa
	Sesudah fermentasi	Coklat Kehitaman	Asam, Manis, Segar	Khas Moringa Agak Asam
Kontrol (-)	Sebelum fermentasi	Coklat Kehitaman	Kelat, Manis	Khas Moringa

Keterangan: (+) terdapat senyawa fitokimia uji, (-) tidak terdapat senyawa fitokimia uji.

Berdasarkan data di atas, seduhan daun *Moringa oleifera* L. sebelum dan sesudah fermentasi memiliki kandungan senyawa fitokimia yang sama yaitu flavonoid, tannin katekuat, triterpenoid, minyak atsiri, saponin, dan fenolik. Pada tabel menunjukkan hasil metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yang digunakan saat fermentasi. Tidak adanya perbedaan hasil antara sebelum dan sesudah fermentasi maka, dilanjutkan dengan uji identifikasi spesifik terhadap kelompok senyawa flavonoid dan fenolik.

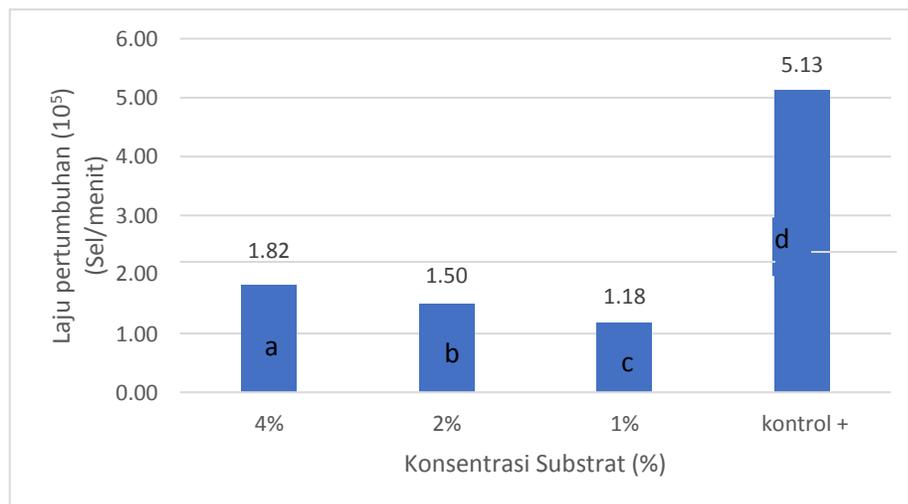
Senyawa-senyawa metabolit yang ada pada daun *Moringa oleifera* L. pada tabel 5.1 merupakan metabolit sekunder yang berfungsi sebagai antioksidan dan antimikroba. Senyawa flavonoid yang terdapat pada seduhan daun *Moringa oleifera* L. merupakan salah satu senyawa polifenol yang memiliki sifat sebagai antimikroba dan antioksidan. Uji fitokimia flavonoid pada ekstrak daun *Moringa oleifera* L. menunjukkan hasil positif. Flavonoid berfungsi pada proses fotosintesis, antivirus, antimikroba, dan antioksidan [6]. Tanin pada uji fitokimia ekstrak daun *Moringa oleifera* L. menunjukkan hasil positif. Senyawa tanin merupakan senyawa yang berfungsi sebagai antioksidan dan penghambat pertumbuhan tumor [35]. Triterpenoid pada uji fitokimia ekstrak daun *Moringa oleifera*

L. menunjukkan hasil positif. Senyawa triterpenoid berfungsi sebagai antioksidan [36]. Kandungan minyak atsiri pada daun *Moringa oleifera* L. bersifat sebagai antimikroba, anti jamur, dan antioksidan [8].

Uji organoleptik merupakan uji terhadap warna, rasa, dan bau. Pada uji organoleptik menunjukkan hasil yang berbeda antara sebelum dan sesudah fermentasi. Adanya perbedaan ini disebabkan karena sifat *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 yaitu homofermentatif. Pada proses fermentasi, bakteri asam laktat merombak glukosa menggunakan enzim dan menghasilkan produk akhir berupa asam laktat sehingga mempengaruhi bau dan rasa yang lebih asam pada hasil akhir fermentasi [48].

#### **B. LAJU PERTUMBUHAN *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 PADA SEDUHAN DAUN *Moringa oleifera* L.**

*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 merupakan bakteri asam laktat yang dapat meningkatkan bioavailabilitas senyawa polifenol dan menghasilkan senyawa antimikroba seperti asam organik, hidrogen peroksida, senyawa protein, atau protein spesifik yang disebut bakteriosin [16]. Pertumbuhan mikroba *Lactobacillus* merupakan proses penambahan jumlah atau volume sel mikroba. Pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 melewati fase kurva pertumbuhan meliputi fase adaptasi, log (pertumbuhan eksponensial), stationer, kematian [38]. Pola pertumbuhan sel bakteri *Lactobacillus acidophilus* pada produk fermentasi daun *Moringa oleifera* L. dan MRS Broth memiliki fase lag pada jam ke-0 sampai 4, fase eksponensial jam ke-8 sampai 14 yang menandakan bahwa sel membelah diri dengan laju konstan, fase stasioner jam ke-16 sampai 18 yang menandakan bahwa sel berada pada fase pertumbuhan tetap dan fase kematian pada jam ke-0 sampai 26 [40]. Fase-fase tersebut dapat memberikan hasil yang optimal dalam proses fermentasi karena berhubungan dengan lama waktu fermentasi untuk bakteri asam laktat tersebut tumbuh.



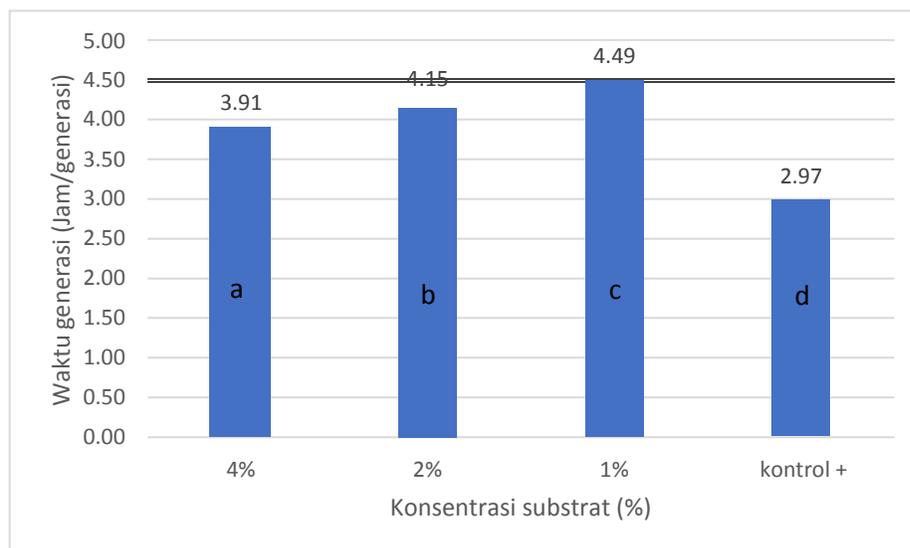
Keterangan: a;b;c;d= huruf yang sama menunjukkan tidak signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$  sedangkan huruf yang tidak sama menunjukkan signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$ .

Gambar 5.1 Laju pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 pada variasi konsentrasi daun *Moringa oleifera* L.

Gambar 5.1 menunjukkan laju pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 pada seduhan daun *Moringa oleifera* L. dengan penambahan glukosa 10% setelah fermentasi. Laju pertumbuhan sel dihitung setiap  $10^5$  sel per menit. Kecepatan pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 dipengaruhi oleh jumlah nutrisi yang tersedia dan kondisi fisik seperti suhu, oksigen, dan pH (40). Kontrol positif yang digunakan adalah MRSB (*deMan Rogosa Sharpe Broth*). Laju pertumbuhan yang diperoleh pada kontrol positif yaitu 5,13. Laju pertumbuhan yang diperoleh pada konsentrasi substrat 4% yaitu 1,82, pada konsentrasi substrat 2% yaitu 1,50, dan pada konsentrasi substrat 1% yaitu 1,18. Dilihat dari hasil pertumbuhan koloni pada seluruh seduhan daun *Moringa oleifera* L., pertumbuhan yang paling tinggi terdapat pada konsentrasi seduhan daun *Moringa oleifera* L. yaitu 4%.

Data hasil penelitian diolah secara statistik dengan menggunakan analisis sidik ragam (anova) satu arah yang dilanjutkan dengan uji Beda Nyata terkecil (BNt) pada taraf signifikansi 5%. Berdasarkan hasil anova, variasi substrat memiliki perbedaan nyata terhadap laju pertumbuhan dalam  $10^5$  sel bakteri dengan nilai  $F 89653,46 > F_{crit} 5,14$ .

Berdasarkan hasil anova peningkatan signifikan dengan taraf nyata 5%. Hasil peningkatan pertumbuhan sel bakteri didapatkan jumlah substrat yang berbeda memiliki perbedaan signifikan terhadap jumlah sel bakteri yang tumbuh pada media fermentasi. Dikarenakan jumlah substrat mempengaruhi proses pertumbuhan, metabolisme dan biokimia bakteri [37].



Keterangan: a;b;c;d= huruf yang sama menunjukkan tidak signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$  sedangkan huruf yang tidak sama menunjukkan signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$ .

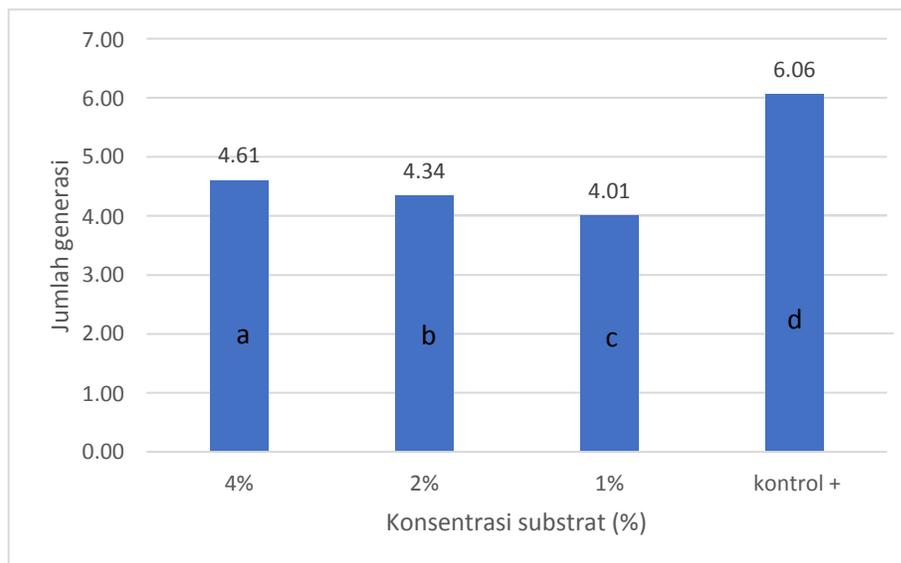
Gambar 5.2 Waktu generasi *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 pada variasi konsentrasi daun *Moringa oleifera* L.

Gambar 5.2 menunjukkan waktu generasi *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 pada variasi konsentrasi seduhan daun *Moringa oleifera* L. Waktu generasi merupakan prediksi populasi setiap mikroorganisme dalam jangka waktu yang sama dengan eaktifannya dalam proses metabolisme [38]. Kontrol positif yang digunakan adalah MRSB (*deMan Rogosa Sharpe Broth*). Waktu generasi yang diperoleh *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 pada kontrol positif yaitu 2,97 jam per generasi. Pada konsentrasi substrat 4% tanpa glukosa diperoleh waktu generasi 4,04 jam per generasi dan pada konsentrasi substrat 4% dengan penambahan glukosa 10% diperoleh waktu generasi yaitu 3,91 jam per generasi. Pada konsentrasi substrat 2% tanpa penambahan glukosa diperoleh waktu generasi 4,36

jam per generasi dan pada konsentrasi 4% dengan penambahan glukosa 10% diperoleh waktu generasi yaitu 4,15 jam per generasi. Pada konsentrasi substrat 1% tanpa penambahan glukosa diperoleh waktu generasi yaitu 4,72 jam per generasi dan pada konsentrasi substrat 1% dengan penambahan glukosa 10% diperoleh waktu generasi yaitu 4,49 jam per generasi. Pada penelitian ini, masing-masing variasi substrat dengan penambahan glukosa 10% memiliki waktu generasi lebih cepat dibandingkan tanpa penambahan glukosa.

Waktu generasi tiap konsentrasi substrat dipengaruhi oleh jumlah nutrisi dan kondisi lingkungan yang ada pada media dan proses fermentasi [41]. Pada gambar 5.2 menunjukkan bahwa waktu generasi konsentrasi substrat 4% memiliki waktu generasi paling cepat dibandingkan konsentrasi substrat 2% dan 1% karena banyaknya nutrisi yang terkandung pada konsentrasi substrat 4% sehingga, bakteri dapat membelah sel dalam waktu lebih cepat.

Data hasil penelitian diolah secara statistik dengan menggunakan analisis sidik ragam (anova) satu arah yang dilanjutkan dengan uji Beda Nyata terkecil (BNt) pada taraf signifikansi 5%. Berdasarkan hasil anova, waktu generasi dari jumlah substrat yang bervariasi memiliki perbedaan nyata dengan nilai F hitung  $121,29 >$  dari nilai Fcrit yaitu 5,14. Pada uji BNt diperoleh nilai BNt 1,0069 menunjukkan bahwa penambahan glukosa 10% pada masing-masing konsentrasi substrat berpengaruh signifikan terhadap waktu generasi *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 pada seduhan daun *Moringa oleifera* L. setelah difermentasi.



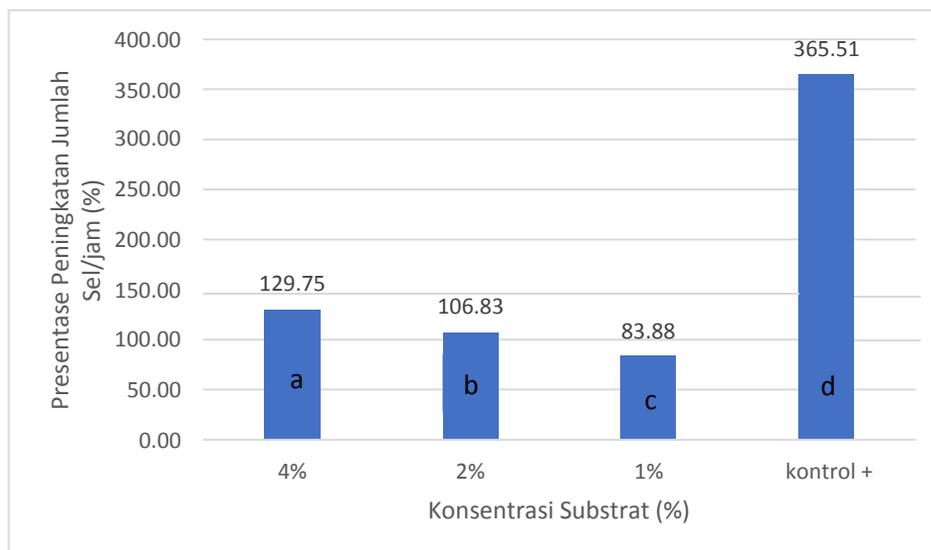
Keterangan: a;b;c;d= huruf yang sama menunjukkan tidak signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$  sedangkan huruf yang tidak sama menunjukkan signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$ .

Gambar 5.3 Jumlah generasi *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 pada variasi konsentrasi daun *Moringa oleifera* L.

Gambar 5.3 menunjukkan jumlah generasi *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 pada variasi konsentrasi substrat daun *Moringa oleifera* L. Jumlah generasi dalam suatu sampel dapat dihitung dengan menggunakan ruang hitung pada hemositometer. Kontrol positif yang digunakan adalah MRSB (*deMan Rogosa Sharpe Broth*). Pada kontrol positif, diperoleh jumlah generasi *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 yaitu 6,06. Pada konsentrasi substrat 4% yaitu 4,61, pada konsentrasi substrat 2% yaitu 4,34, dan pada konsentrasi substrat 1% yaitu 4.01. Pertambahan jumlah generasi berhubungan dengan laju pertumbuhan dan waktu generasi sel [38].

Data hasil penelitian diolah secara statistik dengan menggunakan analisis sidik ragam (anova) satu arah yang dilanjutkan dengan uji Beda Nyata terkecil (BNt) pada taraf signifikansi 5%. Berdasarkan hasil anova, jumlah generasi dari jumlah substrat yang bervariasi memiliki perbedaan nyata dengan nilai  $F_{139,01} >$  dari nilai  $F_{crit} 5,14$ . Pada uji BNt diperoleh nilai BNt 0,0877 menunjukkan bahwa substrat 4%, 2%, dan 1% berbeda signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan glukosa 10% pada masing-masing konsentrasi substrat berpengaruh signifikan terhadap jumlah generasi *Lactobacillus*

*acidophilus* ATCC 4356 yang terdapat pada seduhan daun *Moringa oleifera* L. setelah difermentasi.



Keterangan: a;b;c;d= huruf yang sama menunjukkan tidak signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$  sedangkan huruf yang tidak sama menunjukkan signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$ .

Gambar 5.4 Persentase peningkatan jumlah sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 pada variasi konsentrasi daun *Moringa oleifera* L.

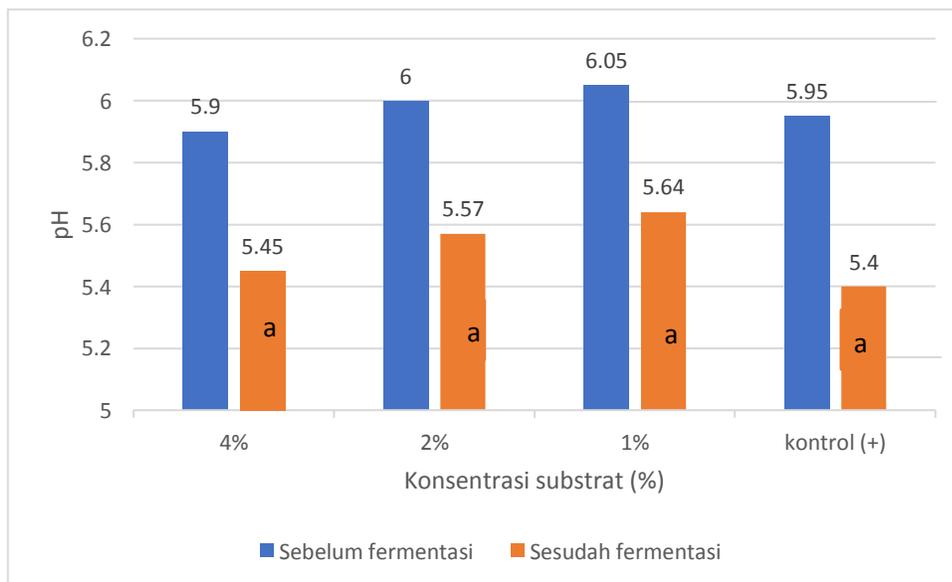
Gambar 5.4 menunjukkan persentase peningkatan jumlah sel per jam pada masing-masing konsentrasi substrat daun *Moringa oleifera* L. Kontrol positif yang digunakan adalah MRSB (*deMan Rogosa Sharpe Broth*). Persentase peningkatan jumlah sel pada kontrol positif yaitu 365,51 sel per jam. Persentase peningkatan jumlah sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 pada masing-masing konsentrasi substrat memiliki hasil yang berbeda. Pada konsentrasi substrat 4% dengan penambahan glukosa 10% diperoleh hasil persentase peningkatan jumlah sel yaitu 129,75 sel per jam, pada konsentrasi substrat 2% dengan penambahan glukosa 10% diperoleh hasil presentase peningkatan jumlah sel yaitu 106,83 sel per jam, dan pada konsentrasi substrat 1% dengan penambahan glukosa 10% diperoleh hasil persentase peningkatan jumlah sel yaitu 83,88 sel per jam. Hal ini

menunjukkan bahwa penambahan glukosa pada masing-masing konsentrasi substrat mempengaruhi presentase peningkatan jumlah sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

Data hasil penelitian diolah secara statistik dengan menggunakan analisis sidik ragam (anova) satu arah yang dilanjutkan dengan uji Beda Nyata terkecil (BNt) pada taraf signifikansi 5%. Berdasarkan hasil anova, persentase perbedaan nyata diperoleh nilai F 89653,46 > dari Fcrit 5,14. Pada uji BNt diperoleh nilai BNt 0,2651 menunjukkan bahwa substrat 4%, 2%, dan 1% memiliki beda signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan glukosa 10% pada masing-masing konsentrasi substrat berpengaruh signifikan terhadap persentase peningkatan jumlah sel per jam *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 yang terdapat pada seduhan daun *Moringa oleifera* L. setelah difermentasi.

### **C. PH DAN TOTAL ASAM SEDUHAN DAUN *Moringa oleifera* L.**

*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 merupakan bakteri asam laktat homofermentatif dengan asam laktat sebagai hasil akhir metabolisme [14]. Asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri akan mempengaruhi peningkatan total asam sehingga memberikan efek pada penurunan pH seduhan daun *Moringa oleifera* L.



Keterangan: a;b;c;d= huruf yang sama menunjukkan tidak signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$  sedangkan huruf yang tidak sama menunjukkan signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$ .

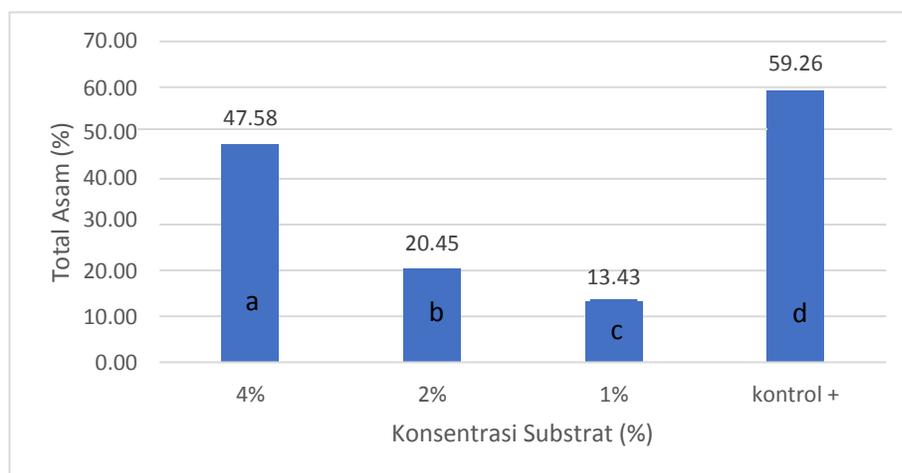
Gambar 5.5 pH produk fermentasi daun *Moringa oleifera* L. oleh *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

Berdasarkan gambar 5.5 menunjukkan penurunan nilai pH pada masing-masing konsentrasi substrat sebelum dan setelah fermentasi. Penurunan pH terjadi karena pada proses fermentasi terjadi akumulasi asam laktat dan asam organik. Asam laktat yang terdapat pada seduhan merupakan hasil rombakan glukosa pada substrat oleh bakteri asam laktat. Pengukuran nilai pH menggunakan alat yang disebut pH meter. Kontrol positif yang digunakan adalah MRSB (*deMan Rogosa Sharpe Broth*). MRSB adalah media selektif untuk bakteri asam laktat sehingga, dapat digunakan untuk *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 agar tumbuh lebih baik. Nilai pH pada kontrol positif setelah fermentasi yaitu 5,4. Pada konsentrasi substrat 4% diperoleh nilai pH 5,45, pada konsentrasi substrat 2% diperoleh nilai pH 5,57, dan pada konsentrasi substrat 1% diperoleh nilai pH 5,64.

pH suatu produk fermentasi berkaitan dengan kadar asam total yang dihasilkan dari suatu proses fermentasi Konsentrasi substrat yang meningkat karena adanya penambahan glukosa membuat glukosa atau karbohidrat yang dirombak oleh bakteri

semakin banyak sehingga asam laktat yang dihasilkan semakin meningkat dan pH yang dihasilkan lebih rendah [42].

Data hasil penelitian diolah secara statistik dengan menggunakan analisis sidik ragam (anova) satu arah yang dilanjutkan dengan uji Beda Nyata terkecil (BNt) pada taraf signifikansi 5%. Berdasarkan hasil anova, penurunan nilai pH dari masing-masing konsentrasi substrat memiliki perbedaan nyata dengan nilai  $F$  486,6 > dari  $F_{crit}$  5,14. Pada uji BNt diperoleh nilai BNt 0,01 menunjukkan perlakuan substrat antara substrat 4%, 2%, dan 1% berbeda tidak signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan glukosa 10% pada masing-masing konsentrasi substrat tidak berpengaruh signifikan terhadap penurunan nilai pH *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 pada seduhan daun *Moringa oleifera* L. setelah difermentasi.



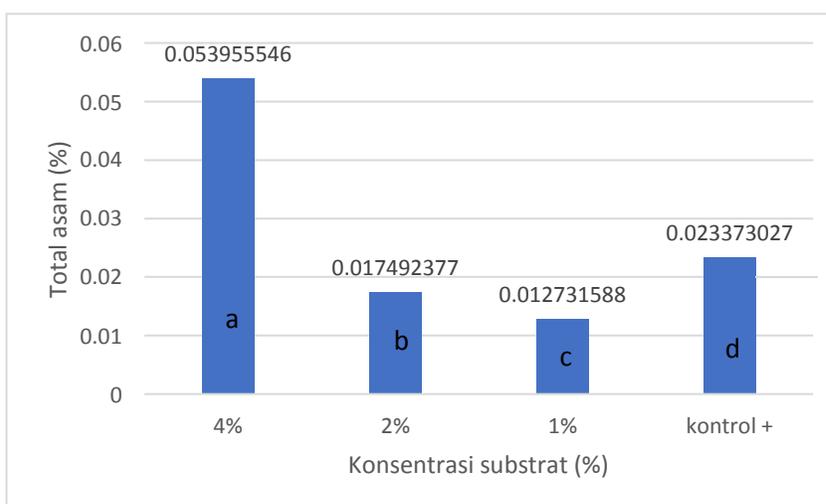
Keterangan: a;b;c;d= huruf yang sama menunjukkan tidak signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$  sedangkan huruf yang tidak sama menunjukkan signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$ .

Gambar 5.6 Presentase peningkatan total asam produk fermentasi daun *Moringa oleifera* L. oleh *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

Gambar 5.6 menunjukkan nilai peningkatan total asam *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 pada masing-masing konsentrasi substrat daun *Moringa oleifera* L. setelah difermentasi. Kontrol positif yang digunakan adalah MRSB (*deMan Rogosa Sharpe Broth*). MRSB adalah media selektif untuk bakteri asam laktat sehingga, dapat digunakan

untuk *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 agar tumbuh lebih baik. Peningkatan total asam pada kontrol positif yaitu 59,26%. Pada konsentrasi substrat 4% diperoleh total asam sebesar 47,58%, pada konsentrasi substrat 2% diperoleh total asam sebesar 20,45%, dan pada konsentrasi substrat 1% diperoleh total asam sebesar 13,43%. Semakin rendah nilai pH maka, nilai total asam semakin tinggi (42). Semakin tinggi total asam dikarenakan semakin tingginya konsentrasi substrat. Asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat terekresikan keluar sel dan terakumulasi di dalam substrat sehingga meningkatkan keasaman [43].

Data hasil penelitian diolah secara statistik dengan menggunakan analisis sidik ragam (anova) satu arah yang dilanjutkan dengan uji Beda Nyata terkecil (BNt) pada taraf signifikansi 5%. Berdasarkan hasil anova, peningkatan total asam dari masing-masing konsentrasi substrat memiliki perbedaan nyata dengan nilai  $F_{308,77} >$  dari  $F_{crit} 5,14$ . Pada uji BNT menunjukkan bahwa penambahan glukosa 10% pada substrat 4%, 2%, dan 1% berbeda signifikan terhadap peningkatan total asam *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 pada seduhan daun *Moringa oleifera* L. setelah difermentasi.



Keterangan: a;b;c;d= huruf yang sama menunjukkan tidak signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$  sedangkan huruf yang tidak sama menunjukkan signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$ .

Gambar 5.7 Kontribusi *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 terhadap peningkatan total asam pada variasi konsentrasi daun *Moringa oleifera* L.

Gambar 5.7 menunjukkan kontribusi sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 terhadap peningkatan total asam seduhan daun *Moringa oleifera* L. setelah difermentasi. Kontribusi sel merupakan peran sel bakteri terhadap suatu proses. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 memiliki kontribusi atas kandungan total asam di dalam seduhan daun *Moringa oleifera* L. Kontrol positif yang digunakan adalah MRSB (*deMan Rogosa Sharpe Broth*). Pada gambar 5.7 menunjukkan bahwa setiap  $10^8$  sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 pada kontrol positif, berkontribusi sebanyak 0,02 %. Pada konsentrasi substrat 4%, sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 berkontribusi sebanyak 0,05%, pada konsentrasi substrat 2%, sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 berkontribusi sebanyak 0,02 %, dan pada konsentrasi substrat 1%, sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 berkontribusi sebanyak 0,01%.

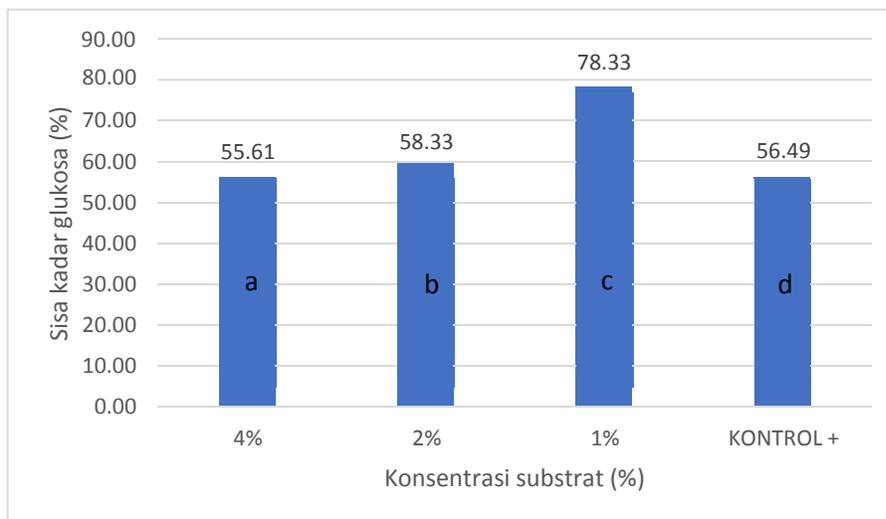
Kontribusi *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 terhadap peningkatan total asam yang dihasilkan semakin meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi substrat. Menurut tetapan *Michaelis-Menten*, kecepatan reaksi yang dikatalis enzim meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat, hingga dicapai keadaan dimana penambahan konsentrasi substrat tidak lagi meningkatkan laju awal reaksi [44].

Data hasil penelitian diolah secara statistik dengan menggunakan analisis sidik ragam (anova) satu arah. Kemudian, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata terkecil (BNt) pada taraf signifikansi 5%. Berdasarkan hasil anova, kontribusi  $10^8$  sel terhadap penurunan kadar glukosa dari masing-masing variasi konsentrasi substrat memiliki perbedaan nyata dengan nilai  $F_{308,77} >$  dari  $F_{crit} 5,14$ . Pada uji BNt menunjukkan bahwa penambahan glukosa 10% pada substrat 4%, 2%, dan 1% berbeda signifikan terhadap peningkatan total asam *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 pada seduhan daun *Moringa oleifera* L. setelah difermentasi.

#### **D. KADAR TOTAL GLUKOSA SEDUHAN DAUN *Moringa oleifera* L.**

Pengukuran kadar glukosa bertujuan untuk mengetahui seberapa besar glukosa yang digunakan dan glukosa sisa yang digunakan oleh *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

sebagai sumber energi. Seiring berjalannya fermentasi, bakteri asam laktat menggunakan sumber energinya berupa glukosa untuk digunakan sebagai pertumbuhan sampai dirombak menjadi asam laktat dan asam organik. Hal ini menyebabkan, glukosa pada media akan berkurang.



Keterangan: a;b;c;d= huruf yang sama menunjukkan tidak signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$  sedangkan huruf yang tidak sama menunjukkan signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$ .

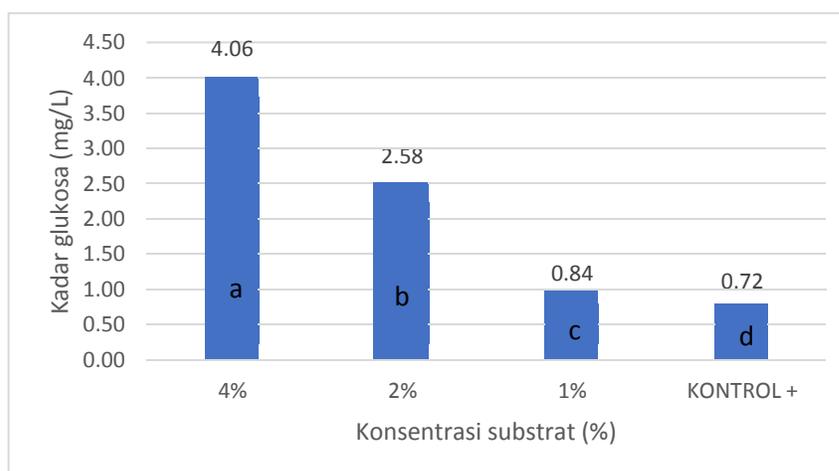
Gambar 5.8 Persentase penurunan kadar glukosa produk fermentasi daun *Moringa oleifera* L. oleh *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

Berdasarkan gambar 5.8 menunjukkan sisa kadar glukosa setelah dilakukan fermentasi pada daun *Moringa oleifera* L. Kontrol positif yang digunakan adalah MRSB (*deMan Rogosa Sharpe Broth*). MRSB adalah media selektif untuk bakteri asam laktat sehingga, dapat digunakan untuk *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 agar tumbuh lebih baik. Sisa kadar glukosa pada kontrol positif yaitu 56,49%. Sisa kadar glukosa pada konsentrasi substrat 4% yaitu 55,61%, sisa kadar glukosa pada konsentrasi substrat 2% yaitu 58,33%, dan sisa kadar glukosa pada konsentrasi substrat 1% yaitu 78,33%.

Pada proses fermentasi, penggunaan glukosa oleh bakteri asam laktat akan meningkat karena digunakan sebagai sumber nutrisi untuk penunjang pertumbuhannya. Sehingga, kadar glukosa yang terdapat pada media akan berkurang karena digunakan oleh bakteri

asam laktat. Kontrol positif yang digunakan adalah MRSB (*deMan Rogosa Sharpe Broth*). Pada kontrol positif diperoleh sisa kadar glukosa sebesar 56,49%. Pada konsentrasi substrat 4% diperoleh sisa kadar glukosa sebesar 55,61%, pada konsentrasi substrat 2% diperoleh sisa kadar glukosa sebesar 58,33%, dan pada konsentrasi substrat 1% diperoleh sisa kadar glukosa sebesar 78,33%. Hal ini menunjukkan bahwa substrat konsentrasi 4% merupakan substrat yang glukosanya digunakan paling banyak oleh *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 sehingga sisa kadar glukosa paling sedikit dibandingkan dengan variasi konsentrasi lain.

Data hasil penelitian diolah secara statistik dengan menggunakan analisis sidik ragam (anova) satu arah. Kemudian, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata terkecil (BNt) pada taraf signifikansi 5%. Berdasarkan hasil anova, penurunan total glukosa dengan penambahan glukosa 10% dari variasi konsentrasi substrat memiliki perbedaan nyata dengan nilai  $F$  10583,38 > dari  $F_{crit}$  5,14. Pada uji BNt diperoleh nilai BNt 0,4174 menunjukkan bahwa substrat 4%, 2%, dan 1% berbeda signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan glukosa 10% pada masing-masing variasi substrat berpengaruh signifikan terhadap penurunan total glukosa pada seduhan daun *Moringa oleifera* L. setelah difermentasi.



Keterangan: a;b;c;d= huruf yang sama menunjukkan tidak signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$  sedangkan huruf yang tidak sama menunjukkan signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$ .

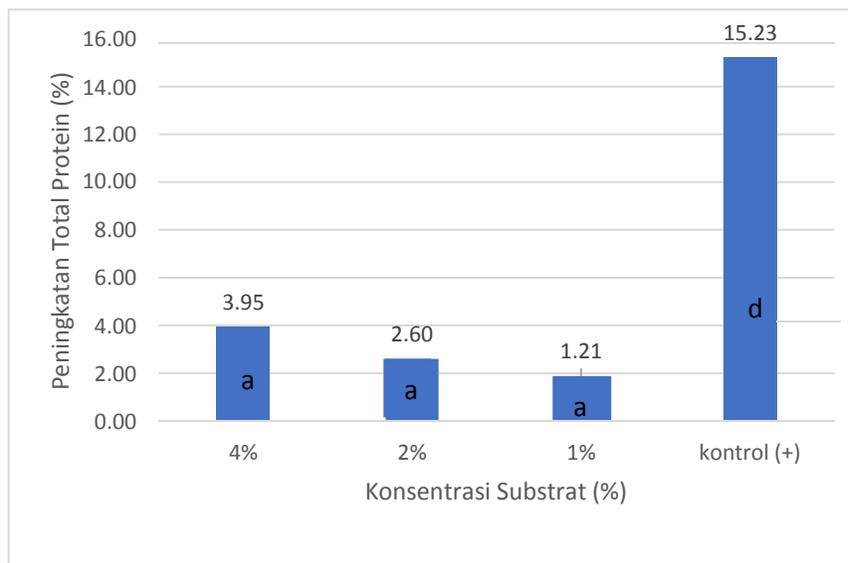
Gambar 5.9 Kontribusi *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 terhadap penurunan kadar glukosa pada variasi konsentrasi daun *Moringa oleifera* L.

Gambar 5.9 menunjukkan kontribusi sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 terhadap penurunan kadar glukosa pada seduhan daun *Moringa oleifera* L. setelah difermentasi. Kontribusi merupakan peran sel bakteri terhadap suatu proses fermentasi. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 memiliki kontribusi terhadap kadar glukosa di dalam seduhan daun *Moringa oleifera* L. Kontrol positif yang digunakan adalah MRSB (*deMan Rogosa Sharpe Broth*). Pada gambar 5.9 menunjukkan bahwa setiap  $10^6$  sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 dapat berkontribusi pada kontrol positif sebanyak 0,72 mg/L. Pada konsentrasi substrat 4% sebanyak 4,06 mg/L, pada konsentrasi substrat 2% sebanyak 2,58 mg/L, dan pada konsentrasi substrat 1% sebanyak 0,84 mg/L.

Data hasil penelitian diolah secara statistik dengan menggunakan analisis sidik ragam (anova) satu arah. Kemudian, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata terkecil (BNt) pada taraf signifikansi 5%. Berdasarkan hasil anova, kontribusi  $10^6$  sel terhadap penurunan kadar glukosa dari masing-masing konsentrasi substrat memiliki perbedaan nyata dengan nilai F hitung  $10583,38 >$  dari  $F_{crit} 5,14$ . Pada uji BNt diperoleh nilai BNt 4173,97 menunjukkan bahwa substrat 4%, 2%, dan 1% berbeda signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan glukosa 10% pada masing-masing variasi substrat berpengaruh signifikan terhadap kontribusi  $10^6$  sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 pada penurunan total glukosa pada seduhan daun *Moringa oleifera* L. setelah difermentasi.

#### **E. KADAR TOTAL PROTEIN SEDUHAN DAUN *Moringa oleifera* L.**

Analisis kadar protein dilakukan untuk mengetahui kandungan protein yang ada pada seduhan daun *Moringa oleifera* L. setelah difermentasi. Banyaknya asam laktat yang dihasilkan saat proses fermentasi membuat protein yang dihasilkan juga meningkat. Presentase penambahan ekstrak daun kelor diketahui mempengaruhi kadar protein. Hal ini disebabkan karena daun kelor memiliki kandungan protein yang tinggi [45]. Analisis protein dilakukan dengan menggunakan metode biuret yang didasarkan pada pembentukan warna ungu.



Keterangan: a;b;c;d= huruf yang sama menunjukkan tidak signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$  sedangkan huruf yang tidak sama menunjukkan signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$ .

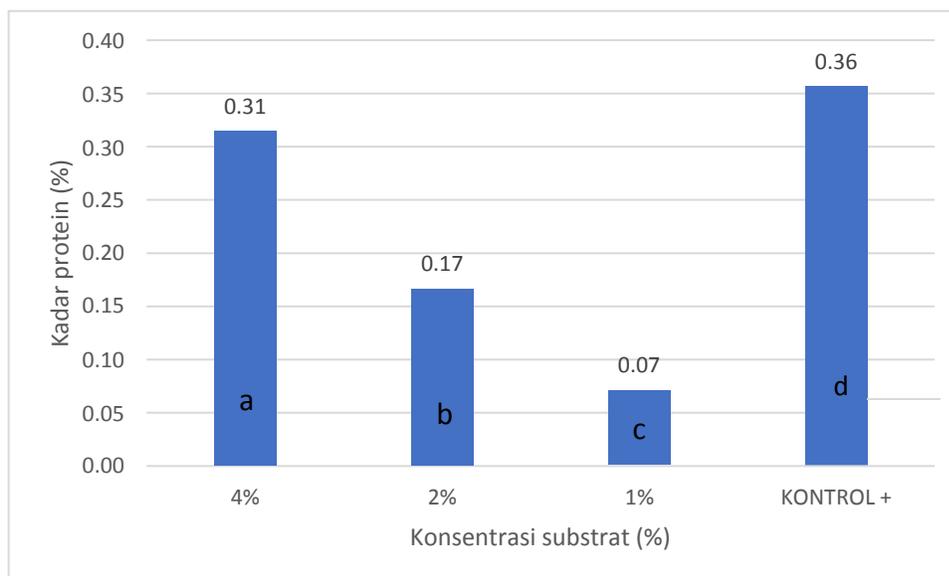
Gambar 5.10 Presentase peningkatan kadar protein produk fermentasi daun *Moringa oleifera* L. oleh *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

Gambar 5.10 menunjukkan hasil peningkatan kadar protein seduhan daun *Moringa oleifera* L. setelah difermentasi dengan adanya variasi konsentrasi substrat dan penambahan glukosa 10%. Kontrol positif yang digunakan adalah MRSB (*deMan Rogosa Sharpe Broth*). Peningkatan kadar protein pada kontrol positif yaitu 15,23%. Peningkatan kadar protein pada konsentrasi substrat 4% sebesar 3,95%, peningkatan kadar protein pada konsentrasi substrat 2% sebesar 2,60%, dan peningkatan kadar protein pada 1% sebesar 1,21%. Peningkatan kadar protein dapat terjadi selama proses fermentasi, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 menghidrolisis protein kompleks menjadi asam amino bebas yang lebih sederhana dengan adanya aktivitas enzim proteolitik [46].

Hal lain yang dapat menyebabkan peningkatan kadar protein oleh bakteri *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 yaitu senyawa bakteriosin. Bakteriosin yang terdapat pada *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 merupakan senyawa protein yang bersifat bakteriosidal. Bakteriosin berasal dari metabolit bakteri asam laktat selama proses

fermentasi berlangsung. Bakteriosin merupakan protein atau peptida yang disintesa melalui ribosom yang dapat menghambat atau membunuh bakteri lain [47].

Data hasil penelitian diolah secara statistik dengan menggunakan analisis sidik ragam (anova) satu arah. Kemudian, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata terkecil (BNt) pada taraf signifikansi 5%. Berdasarkan hasil anova, peningkatan kadar protein dari masing-masing variasi konsentrasi substrat memiliki perbedaan nyata dengan nilai F hitung 313064,9 > dari Fcrit 5,14. Pada uji BNt menunjukkan variasi konsentrasi substrat dengan penambahan glukosa 10% berpengaruh signifikan terhadap peningkatan kadar protein *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 pada seduhan daun *Moringa oleifera* L. setelah difermentasi.



Keterangan: a;b;c;d= huruf yang sama menunjukkan tidak signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$  sedangkan huruf yang tidak sama menunjukkan signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$ .

Gambar 5.11 Kontribusi *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 terhadap peningkatan kadar protein pada variasi konsentrasi daun *Moringa oleifera* L.

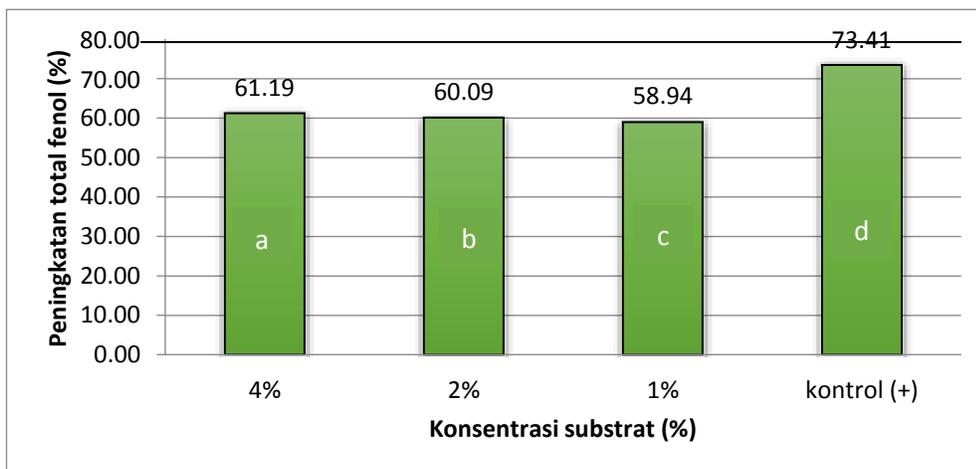
Gambar 5.11 menunjukkan kontribusi sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 terhadap peningkatan kadar protein pada seduhan daun *Moringa oleifera* L. setelah difermentasi. Kontribusi merupakan peran sel bakteri terhadap suatu proses. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 memiliki kontribusi terhadap kadar protein di dalam seduhan daun *Moringa oleifera* L. kontribusi *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 terhadap peningkatan kadar

protein dibandingkan dengan kontrol positif yang digunakan yaitu MRSB (*deMan Rogosa Sharpe Broth*). pada gambar 5.11 menunjukkan bahwa  $10^8$  sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 berkontribusi terhadap peningkatan kadar protein pada kontrol positif sebesar 0,36%. Pada konsentrasi substrat 4%, peningkatan kadar protein sebesar 0,31%, pada konsentrasi substrat 2%, peningkatan kadar protein sebesar 0,17%, dan pada konsentrasi substrat 1%, peningkatan kadar protein sebesar 0,07%. Berdasarkan gambar 5.11, kontribusi *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 terhadap peningkatan kadar protein yang dihasilkan semakin meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi substrat

Data hasil penelitian diolah secara statistik dengan menggunakan analisis sidik ragam (anova) satu arah. Kemudian, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata terkecil (BNt) pada taraf signifikansi 5%. Berdasarkan hasil anova, kontribusi  $10^8$  sel terhadap peningkatan kadar protein dari masing-masing variasi konsentrasi dengan penambahan glukosa 10% memiliki perbedaan nyata dengan nilai F hitung 313064,9 > dari Fcrit 5,14. Pada uji BNt menunjukkan bahwa variasi konsentrasi substrat dengan penambahan glukosa 10% berpengaruh signifikan terhadap peningkatan kadar protein seduhan daun *Moringa oleifera* L. setelah difermentasi.

#### **F. KADAR TOTAL FENOL SEDUHAN DAUN *Moringa oleifera* L.**

Fenol merupakan senyawa yang banyak terdapat di dalam tanaman khususnya bagian daun *Moringa oleifera* L. Pengukuran kadar fenol dilakukan untuk mengetahui pemanfaatan senyawa fenol oleh *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Pada penelitian ini, total fenol diukur dengan kurva standar asam galat.



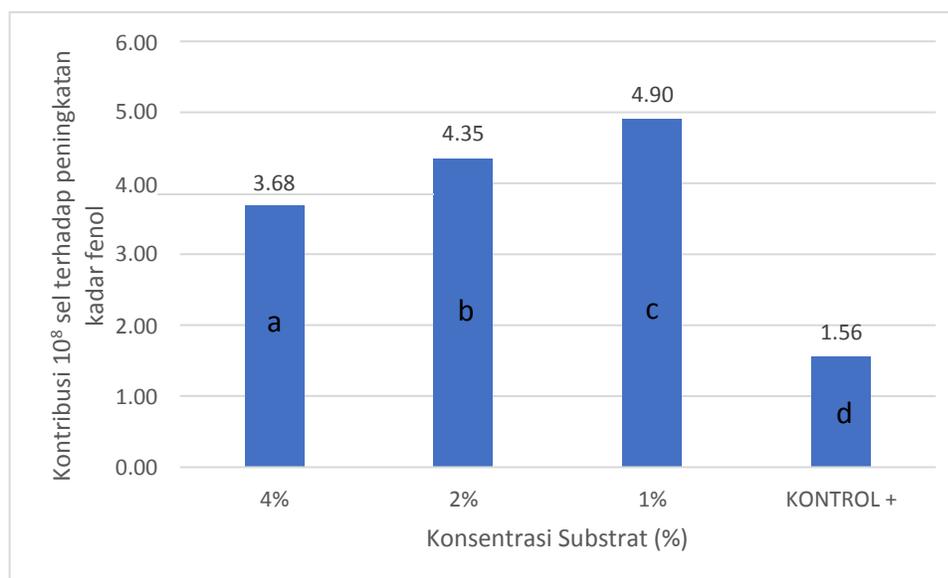
Keterangan: a;b;c;d= huruf yang sama menunjukkan tidak signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$  sedangkan huruf yang tidak sama menunjukkan signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$ .

Gambar 5.12 Peningkatan kadar fenol produk fermentasi daun *Moringa oleifera* L. oleh *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

Berdasarkan gambar 5.12 diperoleh data peningkatan kadar total fenol pada seduhan daun *Moringa oleifera* L. setelah difermentasi. Kontrol positif yang digunakan adalah MRSB (*deMan Rogosa Sharpe Broth*). Peningkatan kadar fenol pada kontrol positif yaitu 73,41%, peningkatan kadar fenol pada konsentrasi substrat 4% yaitu 61,19, peningkatan kadar fenol pada konsentrasi substrat 2% yaitu 60,09%, dan peningkatan kadar fenol pada konsentrasi substrat 1% yaitu 58,94%. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan kadar fenol total tertinggi berada pada konsentrasi substrat 4%. Senyawa fenol dihasilkan oleh bakteri asam laktat melalui metabolit sekunder dengan cara mendegradasi asam ferulat dan asam sinamat menjadi 4-vinyl phenol dan 4-guaiacol [33].

Data hasil penelitian diolah secara statistik dengan menggunakan analisis sidik ragam (anova) satu arah. Kemudian, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata terkecil (BNt) pada taraf signifikansi 5%. Berdasarkan hasil anova, peningkatan kadar fenol dari jumlah substrat yang bervariasi memiliki perbedaan nyata dengan nilai F hitung 52335,5 > dari Fcrit 5,14. Pada uji BNt menunjukkan bahwa substrat 4%, 2%, dan 1% berbeda signifikan. Sehingga, variasi konsentrasi substrat dengan penambahan glukosa 10% berpengaruh signifikan

terhadap peningkatan kadar fenol pada seduhan daun *Moringa oleifera* L. setelah difermentasi.



Keterangan: a;b;c;d= huruf yang sama menunjukkan tidak signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$  sedangkan huruf yang tidak sama menunjukkan signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$ .

Gambar 5.13 Kontribusi *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 terhadap peningkatan kadar fenol pada variasi konsentrasi daun *Moringa oleifera* L.

Gambar 5.13 menunjukkan kontribusi sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 terhadap peningkatan kadar fenol pada seduhan daun *Moringa oleifera* L. setelah difermentasi. Kontribusi merupakan peran sel bakteri terhadap suatu proses seperti kegiatan fermentasi. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 memiliki kontribusi terhadap kadar fenol di dalam seduhan daun *Moringa oleifera* L. kontrol positif yang digunakan yaitu MRSB (*deMan Rogosa Sharpe Broth*). Pada gambar 5.13 menunjukkan bahwa setiap  $10^8$  sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 dapat berkontribusi peningkatan kadar fenol pada kontrol positif sebesar 1,56%. Pada konsentrasi substrat 4%,  $10^8$  sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 dapat berkontribusi sebesar 3,68%, pada konsentrasi substrat 2%,  $10^8$  sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 dapat berkontribusi sebesar 4,35%, dan pada

konsentrasi substrat 1%,  $10^8$  sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 dapat berkontribusi sebesar 4,90%.

Pada gambar 5.13 menunjukkan bahwa pada konsentrasi substrat 1% dengan penambahan glukosa 10% sudah dapat meningkatkan kadar fenol. Pada persamaan *Michaelis-Menten* menyatakan bahwa apabila penambahan konsentrasi substrat tidak lagi meningkatkan laju awal reaksi [44]. Bila semua enzim dalam keadaan jenuh oleh substrat maka, laju reaksi akan mencapai keadaan maksimum [9].

Data hasil penelitian diolah secara statistik dengan menggunakan analisis sidik ragam (anova) satu arah. Kemudian, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata terkecil (BNt) pada taraf signifikansi 5%. Berdasarkan hasil anova, peningkatan kadar fenol dari jumlah substrat yang bervariasi memiliki perbedaan nyata dengan nilai  $F_{52335,5} > F_{crit} 5,14$ . Pada uji BNt menunjukkan bahwa substrat 4%, 2%, dan 1% berbeda signifikan. Sehingga, kontribusi  $10^8$  sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 dari masing-masing variasi konsentrasi dengan penambahan glukosa 10% berpengaruh signifikan terhadap peningkatan kadar fenol pada seduhan daun *Moringa oleifera* L. setelah difermentasi.

#### **G. AKTIVITAS ANTIMIKROBA SEDUHAN DAUN *Moringa oleifera* L. OLEH *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356**

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antimikroba seduhan daun *Moringa oleifera* L. yang telah difermentasi terhadap beberapa mikroba uji. Mikroba uji yang digunakan bersifat patogen dan paling sering menyebabkan terhadap manusia [49]. Mikroba uji yang digunakan yaitu *Eschericia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Klebsiella pneumonia* ATCC 10031, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, dan *Candida albicans* ATCC 10231. Pada uji antimikroba, metode yang digunakan adalah dilusi cair [50]. Prinsip dilusi cair yaitu menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah tertentu sel mikroba yang diuji [51].

Pengamatan KHM seduhan daun *Moringa oleifera* L. yang difermentasi diinokulasi dengan bakteri uji dan dilihat berdasarkan kekeruhan. Pengujian Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) metode dilusi cair pada konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.13%, 1.56%, 0.78%, dan 0.39%. Hasil nilai KHM metode dilusi cair dapat dilihat pada tabel berikut ini:

Tabel 5.3 Konsentrasi Hambatan Minimum (KHM) krud ekstrak seduhan daun *Moringa oleifera* L.

WAKTU (JAM)	Konsentrasi Substrat	KHM (%)						
		E.c	P.a	B.s	S.a	S.t	K.p	C.a
0	4%	100	-	-	100	-	-	100
	2%	-	-	-	-	-	-	-
	1%	-	-	-	-	-	-	-
	Kontrol (+)	-	-	-	-	-	-	-
18	4%	50	50	-	1.56	-	-	0.78
	2%	100	100	-	3.13	-	-	1.56
	1%	-	-	-	6.25	-	-	3.13
	Kontrol (+)	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan: C.a= *Candida albicans* ATCC 10231; E.c= *Escherichia coli* ATCC 25922;  
P.a= *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; S.a= *Staphylococcus aureus* ATCC 6538;  
S.t= *Salmonella typhimurium* ATCC 14028; K.p= *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031;  
B.s= *Bacillus subtilis* ATCC 6633; tanda (-)= menunjukkan tidak ada nilai KHM

Berdasarkan tabel 5.2, nilai KHM krud ekstrak 4% terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 sebesar 50% dan pada krud ekstrak 2% sebesar 100%. Nilai KHM substrat 4% terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 sebesar 50% dan pada substrat 2% sebesar 100%. Nilai KHM substrat 4% terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 sebesar 1,56%, pada substrat 2% sebesar 3,13%, dan pada substrat 1% sebesar 6,25%. Nilai KHM substrat 4% terhadap *Candida albicans* ATCC 10231 sebesar 0,78%, pada substrat 2% sebesar 1,56%, dan pada substrat 1% sebesar 3,13%.

Pada *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, dan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 tidak adanya nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum). Tidak adanya nilai KHM pada bakteri uji tersebut, ditandai dengan adanya kekeruhan pada krud ekstrak dari konsentrasi uji 100% hingga 0,78%. Hasil tersebut dapat disebabkan karena adanya perbedaan komponen penyusun dinding sel pada bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Dinding sel pada gram positif memiliki struktur lebih sederhana dibandingkan struktur dinding sel bakteri gram negatif yang cenderung memiliki susunan yang kompleks sehingga menimbulkan rintangan yang besar untuk ditembus oleh suatu antimikroba [52]. Pada tabel 5.2 juga menunjukkan bahwa *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 mampu menghambat pertumbuhan *Candida albicans* ATCC 10231.

*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 merupakan BAL dari kelompok homofermentatif yang menghasilkan jenis asam laktat dari metabolisme gula. Proses dari metabolisme ini dimulai dari perombakan glukosa dengan dibantu enzim aldolase untuk menjadi gliseraldehid-3-P dan dihidroksiaton-P. Kemudian, gliseraldehid 3-P dirombak menjadi asam piruvat dan sedikit asam lain [11]. Selama proses fermentasi berlangsung, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 menghasilkan metabolit seperti asam laktat, hidrogen peroksida, dan bakteriosin yang berfungsi sebagai senyawa antimikroba [61]. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 memiliki bakteriosin berupa acidocin, lactacin B, lactacin D, dan bahan lain seperti asam laktat dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [48]. Bakteriosin memiliki mekanisme kerja dengan cara merusak permeabilitas membran dan menghambat produksi energi, biosintesis protein, dan asam nukleat [53]. Sehingga memberikan efek pertumbuhan sel yang terhambat atau mati.

Asam laktat pada hasil fermentasi seduhan daun *Moringa oleifera* L. oleh *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 mempengaruhi nilai pH sehingga pH fermentasi seduhan daun *Moringa oleifera* L. akan turun dan asam. Asam yang dihasilkan oleh bakteri akan berinteraksi dengan membran sel bakteri patogen sehingga menyebabkan denaturasi protein. Denaturasi protein dapat menyebabkan kandungan sitoplasma bakteri mengalami kebocoran [54]. Berdasarkan hasil skrining fitokimia, terdapat senyawa fenol, saponin, dan flavonoid pada seduhan daun *Moringa oleifera* L.. Senyawa fenol memiliki aktivitas

antimikroba yaitu berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses absorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen [58]. Senyawa saponin memiliki aktivitas antimikroba dengan cara menurunkan tegangan permukaan dinding sel bakteri dan merusak permeabilitas membran [59]. Senyawa flavonoid memiliki aktivitas sebagai antimikroba dengan cara menghambat sintesis asam nukleat [60].

Berdasarkan tabel 5.1, seduhan daun *Moringa oleifera* L. memiliki senyawa flavonoid yang memiliki fungsi sebagai antimikroba. Senyawa flavonoid memiliki mekanisme sebagai antimikroba dengan cara berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses absorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen.

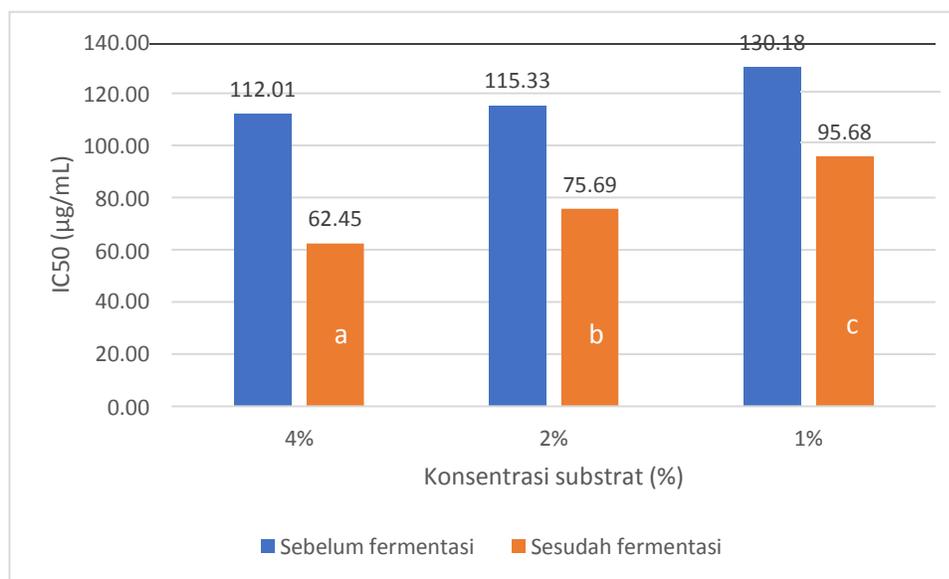
#### **H. AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SEDUHAN DAUN *Moringa oleifera* L. OLEH *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356**

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan fermentasi seduhan daun *Moringa oleifera* L. Uji antioksidan fermentasi seduhan daun *Moringa oleifera* L. dilakukan dengan menggunakan metode DPPH. Metode ini memiliki cara yaitu perubahan warna radikal DPPH yang disebabkan oleh reaksi antara radikal bebas DPPH dengan satu elektron yang dilepaskan senyawa yang terkandung dalam sampel sehingga membentuk senyawa 1,1-difenil-2-pikrihidrazil berwarna kuning [55]. Metode DPPH memiliki kelebihan yaitu sederhana, cepat, mudah, akurat, dan sampel yang digunakan sedikit dengan waktu yang singkat [23]. DPPH juga merupakan radikal bebas yang stabil dan biasa digunakan untuk mengevaluasi peredaman radikal bebas pada bahan alam [63]. Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *Inhibition Concentration 50%* ( $IC_{50}$ ).  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi suatu sampel yang dapat menghambat 50% proses oksidasi radikal bebas. Tabel 5.3 merupakan klasifikasi kekuatan antioksidan berdasarkan nilai  $IC_{50}$ .

Tabel 5.3 Klasifikasi Antioksidan Berdasarkan Nilai IC<sub>50</sub> [56]

Nilai IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Antioksidan
< 50	Sangat kuat
50-100	Kuat
101-250	Sedang
250-500	Lemah
>500	Tidak aktif

Hasil pengukuran aktivitas antioksidan dan kontribusi sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 pada setiap konsentrasi substrat dengan metode DPPH dapat dilihat pada gambar berikut ini:



Keterangan: a;b;c= huruf yang sama menunjukkan tidak signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$  sedangkan huruf yang tidak sama menunjukkan signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$ .

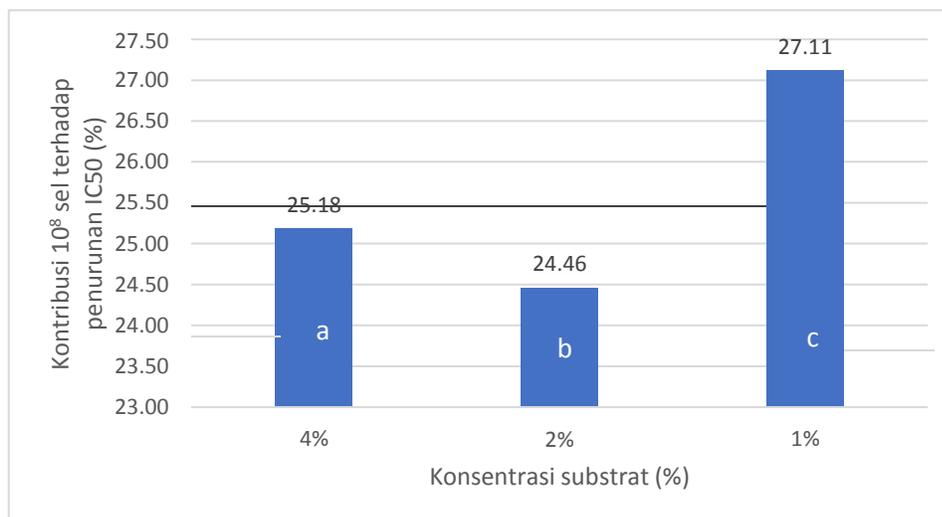
Gambar 5.14 Nilai IC<sub>50</sub> produk fermentasi daun *Moringa oleifera* L. terhadap *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

Gambar 5.14 menunjukkan hasil penurunan nilai  $IC_{50}$  seduhan daun *Moringa oleifera* L. sebelum dan sesudah fermentasi. Pada substrat 4%, sebelum fermentasi didapatkan nilai  $IC_{50}$  sebesar 112,01  $\mu\text{g/mL}$  dan setelah fermentasi didapatkan nilai  $IC_{50}$  sebesar 62,45  $\mu\text{g/mL}$ . Pada substrat 2%, sebelum fermentasi didapatkan nilai  $IC_{50}$  sebesar 115,33  $\mu\text{g/mL}$  dan setelah fermentasi nilai  $IC_{50}$  sebesar 75,69  $\mu\text{g/mL}$ . Pada substrat 1%, sebelum fermentasi didapatkan nilai  $IC_{50}$  sebesar 130,18  $\mu\text{g/mL}$  dan setelah fermentasi nilai  $IC_{50}$  sebesar 95,68  $\mu\text{g/mL}$ . Hal ini menandakan bahwa semakin besar konsentrasi substrat maka, semakin besar aktivitas antioksidan sehingga, semakin banyak partikel-partikel zat aktif dari seduhan tersebut bekerja untuk mengoksidasi partikel DPPH [56].

Adanya peningkatan aktivitas antioksidan oleh proses fermentasi ini dapat disebabkan adanya enzim  $\beta$ -glukosidase yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat. Keberadaan enzim  $\beta$ -glukosidase menyebabkan senyawa-senyawa bioaktif seperti flavonoid, fenol, dan antosianin (glikosida) terhidrolisis menjadi bentuk aglikonnya. Bentuk aglikon ini lebih mudah dicerna dan lebih berpotensi sebagai antioksidan dibandingkan dengan bentuk glikosidanya [56]. Seduhan daun *Moringa oleifera* L. teridentifikasi mengandung senyawa seperti steroid, flavonoid, tanin, fenol, dan saponin. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antioksidan yaitu dengan cara menangkap *Reactive Oxygen Species* secara langsung dan mencegah regenerasi *Reactive Oxygen Species* [7]. Minyak atsiri pada seduhan daun *Moringa oleifera* L. memiliki fungsi antioksidan dengan mekanismenya yaitu mencegah adanya peroksidasi lemak yang akan membuat kerusakan sel [62].

Berdasarkan nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh dapat dijelaskan bahwa Vitamin C sebagai pembanding atau kontrol positif antioksidan yang lebih kuat jika dibandingkan dengan produk fermentasi daun *Moringa oleifera* L., nilai  $IC_{50}$  untuk vitamin C yang diperoleh yaitu 3,45  $\mu\text{g/mL}$ . Data hasil penelitian diolah secara statistik dengan menggunakan analisis sidik ragam (anova) satu arah. Kemudian, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata terkecil (BNT) pada taraf signifikansi 5%. Berdasarkan hasil anova, nilai  $IC_{50}$  dari variasi substrat dengan penambahan glukosa 10% memiliki perbedaan nyata dengan nilai  $F_{14390,79} > F_{crit} 5,14$ . Pada uji BNT menunjukkan bahwa substrat 4%, 2%, dan 1% berbeda signifikan. Sehingga, konsentrasi substrat berpengaruh signifikan terhadap nilai  $IC_{50}$

*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 pada seduhan daun *Moringa oleifera* L. setelah difermentasi.



Keterangan: a;b;c= huruf yang sama menunjukkan tidak signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$  sedangkan huruf yang tidak sama menunjukkan signifikansi dengan  $\alpha= 5\%$ .

Gambar 5.15 Kontribusi *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 terhadap nilai  $IC_{50}$  pada variasi konsentrasi daun *Moringa oleifera* L.

Gambar 5.15 menunjukkan kontribusi sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 terhadap nilai  $IC_{50}$  pada seduhan daun *Moringa oleifera* L. setelah difermentasi. Kontribusi merupakan peran terhadap suatu kegiatan tertentu. Bakteri *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 memiliki kontribusi terhadap  $IC_{50}$  di dalam seduhan daun *Moringa oleifera* L. Pada gambar 5.15 menunjukkan bahwa setiap  $10^8$  sel *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, pada substrat 4% dapat berkontribusi nilai  $IC_{50}$  sebanyak 25,18  $\mu\text{g/mL}$ . Pada substrat 2% dapat berkontribusi nilai  $IC_{50}$  sebanyak 24,46  $\mu\text{g/mL}$ , dan pada substrat 1% dapat berkontribusi nilai  $IC_{50}$  sebanyak 27,11  $\mu\text{g/mL}$ .

Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa pada konsentrasi substrat 1% sudah dapat memberikan kontribusi terhadap peningkatan nilai  $IC_{50}$  dengan *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Sehingga dengan peningkatan konsentrasi substrat, tidak akan meningkatkan

nilai  $IC_{50}$ . Menurut persamaan *Michaelis-Menten*, apabila penambahan konsentrasi substrat tidak lagi meningkatkan laju awal [45].

## **BAB VI**

### **SIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. SIMPULAN**

1. Laju pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 pada seduhan daun *Moringa oleifera* L. dengan penambahan glukosa 10% tertinggi terdapat pada substrat 4% ( $1,82 \times 10^5$  sel/menit), jumlah generasi substrat 4% (4,61 generasi), peningkatan jumlah sel substrat 4% (129,75%), waktu generasi tercepat 4% (3,91 jam/generasi).
2. Penurunan pH tertinggi terdapat pada substrat 4% (5,45), peningkatan asam total tertinggi terdapat pada substrat 4% (47,58%), sisa kadar glukosa tertinggi terdapat pada substrat 4% (55,61%), peningkatan protein tertinggi terdapat pada substrat 4% (3,95%), peningkatan fenol tertinggi terdapat pada substrat 4% (61,19%).
3. Presentase penurunan nilai  $IC_{50}$  tertinggi terdapat pada konsentrasi substrat 4%. Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) pada produk fermentasi seduhan daun *Moringa oleifera* L. dengan nilai pengenceran terkecil berada pada substrat 4% dan memberikan aktivitas penghambatan terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 sebesar 50%, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 sebesar 50%, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 sebesar 1,56%, dan *Candida albicans* ATCC 10231 sebesar 0,78%.

#### **B. SARAN**

Untuk penelitian selanjutnya, diperlukan adanya penelitian lanjut mengenai kandungan senyawa metabolit sekunder yang diukur secara kuantitatif seperti flavonoid total. Sehingga diharapkan dapat diketahui secara spesifik seberapa pengaruh penambahan glukosa terhadap potensi antioksidan dan antimikroba serta, penelitian lanjut mengenai keamanan produk dan uji toksisitas.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Leone A, Spada A, *Et al.* Cultivation, Genetic, Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Pharmacology of *Moringa oleifera* Leaves: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*; 2015. Vol 16(6). 12791-12835.
2. Rianto WR, Sumarjan, Santoso BB. Karakter Tanaman Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) Aksesori Kabupaten Lombok Utara: *Jurnal Sains Teknologi & Lingkungan*; 2020. Vol. 6(1) pp. 116-131.
3. Daba M. Miracle Tree: A review on Multi-purposes of *Moringa oleifera* and Its Implication for Climate Change Mitigation. *Journal of Earth Science & Climatic Change*; 2016. 7:8.
4. Kumar P S, Mishra D, Ghosh G, et al. "Medicinal Uses and Pharmacological Properties of *Moringa oleifera*" *International Journal of Phytomedicine*; 2010. 210-216. ISSN: 0975-0185.
5. Abdul R, A.F Ibrahim, M.D., Kntayya S B. "Health Benefits of *Moringa oleifera*," *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*; 2014. vol. 15, no. 20, pp.8571-8576, Nov. 2014.
6. Dwika I W, Anak A G, Luh M. Identifikasi Senyawa Ekstrak Daun Kelor *Moringa oleifera* L. di Bali. *Indonesia Medicus Veterinus*; 2015. vol 5 no. 5. pp. 464-473.
7. Pratiwi A, Salimah I. Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Minyak Atsiri Kembang Leson; *Jurnal Biologi*; 2020. 13(2), 139-146.
8. Gede Gunawan I W., Karda I M. Identifikasi Senyawa MInyak Atsiri dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Batang Kepuh (*Stercula foetida* L.), Universitas Udayana; 2015. p-6-1.
9. Shuler M L, Kargi F. *Bioprocess Engineering Basic Concepts 2<sup>nd</sup> Edition*. United States: Prentice-Hall, Inc; 2022.
10. Krisnadi, A D. *Kelor Super Nutrisi*. Blora: Pusat Informasi dan Pengembangan Tanaman Kelor Indonesia; 2015.

11. Suprihatin. Teknologi Fermentasi. UNESA Press. Surabaya; 2010.
12. Huang Y, Wang H, Zhu C. Effect of Lactic Acid Bacteria Fermentation on Antioxidant and Bioactivity of Hawthorn Pulp. *Journal of Food and Nutrition Research*; 2016. Vol. 4, No. 8, 508-514.
13. Osyana. Potensi Antioksidan dan Antimikroba Produk Fermentasi Dari Variasi Seduhan Daun *Moringa oleifera* L. Oleh *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Skripsi. Jakarta: Universitas Pancasila; 2021.
14. Sunaryanto R. Uji Kemampuan *Lactobacillus casei* Sebagai Agensia Probiotik. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*; 2014. Vol 1. No 1
15. Altermann E, Russell W M, Azcarate-Peril M A, *et al.* Complete Genome Sequence of The Probiotic Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *P Natl Acad Sci USA*; 2005. 102.
16. Sanders M E, Klaenhammer T R. Invited Review: The Scientific Basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM Functionality as a Probiotic. *J Dairy Sci*; 2001. 84: 319-331.
17. D. Srinivas B L, Mital S.K. Garg. Utilization of Sugars by *Lactobacillus acidophilus* Strains. *International Journal of Food Microbiology*; 1990. 51-58.
18. Indriani N. The Effect of Various Type of Sugar Addition on The Quality of Cheese Analog from a Mixture of Cow's Milk and Soy Milk. Subang: LIPI; 2012.
19. Sandine W E. Roles of *Lactobacillus* in the Intestinal Tract. *J Food Protection*; 1979. 42(3):259-62
20. S. Khatun "Effect of *Moringa oleifera* Leaf Extract on Histopathology of Heart Tissues on Silk Dye Waste Effluent Induced Swiss Albino Male Mice *Mus musculus*," *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*; 2018. vol. 7, no. 2, pp. 2094-2100.
21. Aminah S, Ramdhan T, Yanis M, "Kandungan Nutrisi dan Sifat Fungsional Tanaman Kelor (*Moringa oleifera*)," *Bul. Pertan. Perkota*; 2015. vol. 5, no. 30, pp. 35-44.
22. Hermanto P, "Inventaris Tanaman Obat Indonesia Jilid I" KUPDF; 2017.

23. Rahmawati A, Muflihunna, LaOde M S, “Analisis Aktivitas Antioksidan dan Produk Sirup Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) Dengan Metode DPPH” *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, Vol. 2 No. 2.
24. Misra S, Misra M K, “Nutritional Evaluation of Some Leafy Vegetable Used by The Tribal and Rural People of South Odisha, India,” *J. Nat. Prod. Plant Resour*; 2014. vol. 4, no. 1, pp. 23-28.
25. Khaira K, “Menangkal Radikal Bebas Dengan Antioksidan,” *Jurnal Sainstek IAIN Batusangkar*, vol. 2, no. 2. pp. 183-187, 2010.
26. Pandey A, Pandey R D, Tripathi P, *Et al* “Medicinal & Aromatic Plants Moringa Oleifera Lam. (Sahijan) – A plant with a Plethora of Diverse Therapeutic Benefits: An Updated Retrospection,” vol. 1, no. 1, pp. 1-8, 2012
27. A. Pengujian, L.- Arabinofuranosidase, and E. Abfa, “p-ISSN 1907-9850,” pp. 134-139, 2004.
28. Legowo A M, Nurwantoro, Sutaryo, “Buku Ajar Analisis Pangan,”; 2007. p.30.
29. Jimenez-Diaz R, Rios-Sanchez R M, Desmazeaud M, et al. “Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation,” *Appl. Environ. Microbiol*; 1993. vol. 59, no. 5, pp. 1416-1424.
30. Sambada D L E “Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Radikal 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Penetapan Kandungan Fenolik Total Fraksi Air Ekstrak Etanolik Daun Selasih (*Ocimum sanctum* L.),” *Skripsi*; 2011. vol. 10, no. 1, p. 129,
31. Ray B, Bhunia A K. *Fundamental Food Microbiology*, 4<sup>th</sup> ed. Boca raton, Florida: CRC; 2008.
32. Abdulaziz R A, Dhiya D Z, Md. Sarwar Jahan. “DPPH antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid content of different part of Drumstic tree (*Moringa oleifera* Lam),” *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*; 2015. 7(4):1423-1428.

33. Edwinanto, Septiadi E, Latifah R, et al. Phytochemical Features of *Moringa oleifera* Leaves as Anticancer a Review Article. *Journal of Medicine and Health Phytochemical*; 2018. Vol. 2 No. 1.
34. Celep G S, Rastmanesh R, Marotta F. Chapter 43. Microbial Metabolism of Polyphenols and Health. In: Watson R.R., Preedy V.R., Zibadi S., editors. *Polyphenols in Human Health and Disease*. Academic Press; San Diego, CA, USA; 2014. pp. 577-589.
35. Toripah S S, Abidjulu J, Wehantouw F. aktivitas antioksidan dan kandungan total fenolik ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam). *Pharmacon*; 2014. 3(4): 37-43.
36. Lenny S. Senyawa Flavonoida, Fenilpropanoid, dan Alkaloida. Karya Ilmiah. Department Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sumatera Utara, Medan; 2006.
37. Wahyu D S, Slamet A, Hermana J. Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Laju Pertumbuhan Alga dan Bakteri Heterotropik pada Sistem HRAR. *Jurnal Teknik POMITS*; 2014. Vol 3, No. 2.
38. Kilinc B, Cakli S, Tolasa S, et al. Chemical, microbiological and sensory changes associated with fish sauce processing. *European Food Research and Technology* 222; 2006. 604–613.
39. Sharah A, Karnila R, Desmelati. Pembuatan Kurva Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Ikan Peda Kembang (*Rastrelliger sp.*). *Media Neliti*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Riau; 2015.
40. Nuraini U. Aktivitas Antioksidan Produk Fermentasi Hard Infusion Daun Kelor (*Moringa oleifera* L.) Oleh *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314. Skripsi. Farmasi: Universitas Pancasila; 2019.
41. Ślizewska, K, Chlebicz-Wójcik A. Growth Kinetics of Probiotic *Lactobacillus* Strains in the Alternative, Cost-Efficient Semi-Solid Fermentation Medium. *Biology*; 2020. 9(12), 423.

42. Joko P. Pola Pertumbuhan dan Pemanenan Biomassa dalam Fotobioreaktor Mikroalga untuk Penangkapan Karbon. Pusat Teknologi Lingkungan – BPPT; 2015.
43. Yosephina D. Pengaruh Lama Fermentasi Total Asam Tertitiasi (TAT) & Karakteristik Fisik (Uji Organoleptik) Pada Teh Kombucha Serai (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). Skripsi. Universitas Sanatha Dharma. Yogyakarta; 2018.
44. Sutedjo, Nisa. Konsentrasi Sari Belimbing (*Averrhoa carambolam*L) dan Lama Fermentasi terhadap Karakteristik Fisiko-Kimia dan Mikrobiologi Yoghurt. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*; 2015. Vol. 3 No. 2 p.582-593. FTP Universitas Brawijaya, Malang.
45. Mardawati. Karakterisasi Produk dan Pemodelan Kinetika Enzimatis Alfa-amilase Pada Produksi Sirup Glukosa dari Pati Jagung (*Zea mays*). *Jurnal Industri Pertanian*; 2019. Vol. 1, No. 1, Hal. 11-20.
46. Wardhani D H, Maharani D C, Prasetyo E A. Kajian Pengaruh cara Pembuatan Susu Fermentasi terhadap Karakteristik Yoghurt Jagung Manis. *Jurnal Momentum*; 2015. 11 (1), 7-12.
47. Amodou, Kamara M T, Amza T, et al. Physicochemical and Nutritional Analysis of Fermented Soybean Protein Meal by *Lactobacillus plantarum* Lp6. *World Journal Dairy and Food Science*; 2010. 5:14-18.
48. Fatih O, Imen H. *Lactic Acid Bacteria: Lactobacillus acidophilus*. *Encyclopedia of Dairy Science*; 2016 Pages 91-95.
49. Ramadhan, Prasetya. Mikroorganisme Patogen Penyebab Penyakit Pada Manusia Jenis-Jenis Mikroba dan Penyakit Ditimbulkan Serta Tindakan Pencegahan dan Pengobatannya. *Mikrobiologi Industri*. Universitas Brawijaya; 2001.
50. Poelongan M, Pratiwi P. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* Linn). *Media Litbang Kesehatan*; 2012. 20(2). Hal.9-65.
51. Christine R. Efektivitas Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Sebagai Antimikroba Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans*. *Fakultas Kedokteran Gigi*. Universitas Sumatera Utara; 2020.

52. Sari Y D, Djannah S N, Hayu L. Uji Aktivitas Antibakteri Infusa Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) secara in Vitro terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Eschericia coli* ATCC 35218 Serta Profil Kromatografi Lapis Tipisnya. Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan; 2010.
53. Parada JL et al. Bacteriosins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties, and Use as Biopreservatives. *Braz Arch Biol Tech*; 2007. 50:521-42.
54. Puspitojati E, Santoso H. Pengaruh Penggunaan Bakteri Asam Laktat Selama Fermentasi Pada Kualitas Modified Cassava Flour (Mocaf). Magelang; 2014.
55. Irnawati, Purba M, Mujadila R, et al. Penetapan Kadar Vitamin C dan Uji Aktivitas Antioksidan Sari Buah Songi (*Dillenia serrate* Thunb.) Terhadap Radikal DPPH (Diphenylpicrylhydrazyl). *Jurnal Ilmiah Farmasi-UNSRAT*; 2017. Vol.6 No. ISSN 2302-2493.
56. Jun MHY et al. Comparison of Antioxidant Activities of Isoflavones from Kudzu Root (*Pueraria labata Ohwl*); 2003. *J. Food Sci.* 68: 2117-2122.
57. Edwinanto L. et al. Phytochemical Features of Moringa Oleifera Leaves as Anticancer a Review Article. *Journal of Medicine and Health Phytochemical*; 2018. Vol. 2 No. 1.
58. Dwi D, Dwi E, Agung. Kandungan Total Fenol dan Aktivitas Antibakteri Kelopak Buah Rosela Merah dan Ungu sebagai Kandidat *Feed Additive* Alami Pada Broiler. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*; 2007. Vol. 14 (3): 174-180. ISSN 1410-5020.
59. Poelongan M, Pratiwi P. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana* Linn). *Media Litbang Kesehatan*; 2012. Hal. 9-65.
60. Rijayanti R K. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mangga Bacang (*Mangifera foetida* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. Naskah Publikasi, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura. 2014.

61. Delfahedah Y, Syukur S, Jamsari. Isolasi, karakterisasi dan identifikasi DNA bakteri asam laktat (BAL) yang berpotensi sebagai antimikroba dari fermentasi kakao varietas hibrid (Trinitario). *J Kim Unand*; 2013. 2(2): 92-102.
62. Filiz A, Funda, et al. a Review on Traditional Turkish Fermented Non-Alcoholic Beverages: Microbiota, Fermentation Process and Quality Characteristics. *International Journal of Food Microbiology* 167; 2013. P. 44-56.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Surat determinasi LIPI Bogor

	<b>LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA</b> <b>(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)</b> <b>PUSAT PENELITIAN BIOLOGI</b> <b>(RESEARCH CENTER FOR BIOLOGY)</b>										
	Cibinong Science Center, Jl. Raya Jakarta - Bogor KM. 46 Cibinong 16911 Telp. (+62 21) 87907636 - 87907604, Fax. 87907612 Website: www.biologi.lipi.go.id										
Nomor : <b>465 /IPH.1.01/II.07/III/2017</b> Lampiran : - Perihal : <b>Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan</b>		Cibinong, 6 Maret 2017									
Kepada Yth. Bpk./Ibu/Sdr(i), <b>Annisa Fira Yulianti</b> NPM : 2013210023 Mhs. Univ. Pancasila Fak. Farmasi Srengseng Sawah, Jagakarsa Jakarta - 12640											
Dengan hormat, Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :											
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 5%;">No.</th> <th style="width: 20%;">No. Kol.</th> <th style="width: 50%;">Jenis</th> <th style="width: 25%;">Suku</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td>Pohon Kelor</td> <td><i>Moringa oleifera</i> Lam.</td> <td>Moringaceae</td> </tr> </tbody> </table>				No.	No. Kol.	Jenis	Suku	1	Pohon Kelor	<i>Moringa oleifera</i> Lam.	Moringaceae
No.	No. Kol.	Jenis	Suku								
1	Pohon Kelor	<i>Moringa oleifera</i> Lam.	Moringaceae								
Demikian, semoga berguna bagi Saudara.											
Kepala Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI,  <b>Dr. Joeni Setiyo Rahajoe</b> NIP. 196706241993032004											
C:\Users\windows 7\Desktop\dokumen lia\Ident 2017\Annisa Fira Yulianti.doc\Amir-Dg Page 1 of 1											

Lampiran 2. Foto Kebun *Moringa oleifera* L.



Lampiran 3. Sertifikat Biakan Murni *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

	<p>PT. EmbrioBiotekindo  <b>MBRIO Food Laboratory</b>          Jl. Villa Indah Pajajaran Blok B-17 Pulo Armin Bogor 16143          Tel. 62 251 – 8346 986 ; Fax. 62 251 – 8346 986  <a href="http://www.mbrrio-food.com">http://www.mbrrio-food.com</a> ; email: <a href="mailto:laboratory@mbrrio-food.com">laboratory@mbrrio-food.com</a></p>
<b>SERTIFIKAT BIAKAN MURNI</b>	
No : 0100/SK/MFL/V/21	
A. Strain Bakteri	: <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356
B. Bentuk	: Ampul (Biakan Kering Turunan Ke-5)
C. Media Inokulasi	: - CNA/MRSA - Larutan fisiologis MRSB, dll.
D. Cara Inokulasi	: Secara aseptis, ampul dibuka dengan pemotong ampul kemudian kedalamnya diberi 0.1 ml MRSB, garam fisiologis steril atau pengencer lainnya. Homogenkan dengan <i>cotton swab</i> steril kemudian goreskan ke dalam cawan berisi media CNA/MRSA. Inkubasi pada suhu 35°C - 37°C selama 24 jam. Kemudian gores kultur ke media agar miring CNA/MRSA sebagai stok kultur. Untuk meyakinkan bakteri tersebut murni selain digores pada agar miring CNA/MRSA, goreskan juga pada cawan berisi media selektif yang sesuai dengan bakteri kultur tersebut.

Lampiran 4. Sertifikat Biakan Murni *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (Lanjutan)

Uji	Acuan	Hasil	Standar Acuan
CNA/MRSA	√	√	Certificate of Analysis
Macroscopic Features : Two colony types are present . The predominant colonies are medium to large , circular to slightly irregular, low convex, erose edge and rough, the other type is small , circulr, convex, entire edge and smooth.Colonies are translucent and weakly alpha hemolytic, Microscopic Features : Gram positive rods wih rounded ends, occurring singly, in pairs, and in short chains.	√	√	
Gram Strain	+	+	
Catalase	-	-	
<b>Conclusion (Pass/Fail)</b>	<b>Pass</b>	<b>Pass</b>	

E. Hasil Uji Kemurnian Kultur  
 Nama : *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356  
 Tanggal Uji : 21 Mei 2021  
 Hasil :

F. Expire Date : 25 Februari 2022

**PT. Embriolotekindo**  
**MBRIO Food Laboratory**  
 Jl. Villa Indah Pajajaran Blok B-17 Pulo Armin Bogor 16143  
 Tel.62 251 – 8346 986 ; Fax. 62 251 – 8346 986  
 http://www.mbrio-food.com ; email: laboratory@mbrio-food.com

Lampiran 5. Sertifikat Biakan Murni *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (Lanjutan)

 **PT. EmbrioBiotekindo**  
**MBRIO Food Laboratory**  
Jl. Villa Indah Pajajaran Blok B-17 Pulo Armin Bogor 16143  
Tel. 62 251 – 8346 986 ; Fax. 62 251 – 8346 986  
<http://www.mbrio-food.com> ; email: [laboratory@mbrio-food.com](mailto:laboratory@mbrio-food.com)

G. Pengamatan Mikroskopik



Bogor, 24 Mei 2021



Azaria Sabrina  
( Manager Teknik Mikrobiologi)

# Certificate of Analysis



1.12018.0025 Albumin fraction V (from bovine serum) for  
biochemistry  
Batch K41706518

	Spec Values	Batch Values
Appearance		
colour	slightly yellow	slightly yellow
description	leafs	leafs
Assay of protein (spectrophotometric, calc. on anhydrous substance)	≥ 97.0 %	97.9 %
Assay of Albumin (Agarose gel electrophoresis)	≥ 95.0 %	≥ 95.0 %
pH-value (1 %; sodium chloride solution c = 0.5 mol/l)	6.9 - 7.2	6.9
K (Potassium)	≤ 0.02 %	≤ 0.02 %
Na (Sodium)	≤ 0.5 %	≤ 0.5 %
Mg (Magnesium)	≤ 0.01 %	≤ 0.01 %
Ca (Calcium)	≤ 0.05 %	≤ 0.05 %
Heavy metals (as lead)	≤ 0.001 %	≤ 0.001 %
Fats	≤ 0.2 %	≤ 0.2 %
Decomposition products	not detectable	passed test
Water (according to Karl Fischer)	≤ 2.00 %	0.31 %
Ash (600 °C)	≤ 1 %	1.0 %
HAEN (oxide) (HAEN, pH 7.5, 25 °C)	not detectable	passed test
LDH (pyruvate, pH 7.5, 25 °C)	not detectable	passed test

**Certificate of Analysis**

---

1.12018.0025 Albumin fraction V (from bovine serum) for  
biochemistry

Batch K41706518

---

Minimum shelf life (DD-MM-YYYY) 30.11.2018

Dr. Karl-August Reiffen  
responsible laboratory manager quality control

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

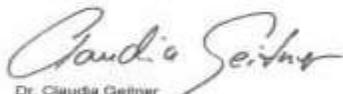
Merck KGaA, Frankfurter Straße 260, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0  
SA.121200551201800000000 V.001 Date: 25.12.2018

Page 2 of 2

Lampiran 8. Sertifikat analisis *Folin-Ciocalteu*

**SIGMA-ALDRICH**3000 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA  
Email USA: techserv@sigma.com Outside USA: auctechserv@sigma.com**Certificate of Analysis**

<b>Product Name:</b>	FOLIN & CIOCALTEU'S PHENOL REAGENT total protein determination by the method of Lowry suitable, 2N	
<b>Product Number:</b>	F9252	
<b>Batch Number:</b>	BCBR9547V	
<b>Brand:</b>	Sigma-Aldrich	
<b>CAS Number:</b>		
<b>Formula:</b>		
<b>Formula Weight:</b>		
<b>Quality Release Date:</b>	12 APR 2016	
<b>Recommended Retest Date:</b>	MAR 2020	
<b>TEST</b>	<b>SPECIFICATION</b>	<b>RESULT</b>
<b>APPEARANCE (COLOR)</b>	FAINT YELLOW TO VERY DARK YELLOW AND FAINT GREEN-YELLOW TO VERY DARK GREEN-YELLOW	YELLOW
<b>APPEARANCE (FORM)</b>	LIQUID	LIQUID
<b>TITRATION (MOLARITY)</b>	1.9 - 2.1 N	2.0 N
<b>BIO-TESTS</b>	SUITABLE FOR USE IN LOWRY PROTEIN DETERMINATION	SUITABLE FOR USE IN LOWRY PROTEIN DETERMINATION



Dr. Claudia Geitner  
Manager Quality Control  
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

## Lampiran 9. Sertifikat analisis Asam Galat

**SIGMA-ALDRICH**

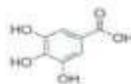
sigmaaldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA  
 Website: www.sigmaaldrich.com  
 Email USA: techserv@sigma.com  
 Outside USA: eurtechserv@sigma.com

**Certificate of Analysis**

Product Name:  
Gallic acid - 97.5-102.5% (titration)

Product Number: 07354  
 Batch Number: SL286746V  
 Brand: SIGMA  
 CAS Number: 148-91-7  
 MDL Number: MFCD0002510  
 Formula: C7H6O5  
 Formula Weight: 170.12 g/mol  
 Quality Release Date: 20 MAR 2015



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Beige	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Faint Yellow to Dark Yellow	Faint Yellow
Solubility (Turbidity)	Clear to Very Slightly Hazy	Clear
50 mg/mL, EtOH		
% Loss on Drying	≤ 10	4
Purity (GC)	≥ 98.5 %	100.0 %
Titration by NaOH (dry basis)	97.5 - 102.5 %	100.5 %

Rodney Bursbach, Manager  
 Analytical Services  
 St. Louis, Missouri, US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

## Lampiran 10. Sertifikat analisis DPPH

**SIGMA-ALDRICH**

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA  
Email USA: techserv@sigma.com Outside USA: watechserv@sigma.com

### Certificate of Analysis

**Product Name:** 3,5-DINITROSALICYLIC ACID  
98 %

**Product Number:** 128848

**Batch Number:** STBH5937

**Brand:** Aldrich

**CAS Number:** 609-99-4

**Formula:**  $(\text{O}_2\text{N})_2\text{C}_7\text{H}_5\text{-2-(OH)CO}_2\text{H}$

**Formula Weight:** 228.12

**Quality Release Date:** 25 APR 2018

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO YELLOW	FAINT YELLOW
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
TITRATION (T) NaOH 0.1M	97.5 - 102.5 %	98.9 %
PURITY (HPLC AREA %)	≥ 97.5 %	> 99.9 %
SOLUBILITY (COLOR)	YELLOW TO VERY DARK YELLOW	YELLOW
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR TO HAZY	CLEAR
SOLUBILITY (METHOD)	50MG/ML H <sub>2</sub> O	50MG/ML H <sub>2</sub> O
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS

*Claudia Mayer*

Claudia Mayer  
Manager Quality Control  
Steinheim, Germany

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Sigma-Aldrich      Certificate of Analysis - Product 128848 Lot STBH5937      Page 1 of 1

Lampiran 11. *Certificate of analysis* Vitamin C

*ASEAN TECHNICAL COOPERATION IN PHARMACEUTICALS*

**Programme on ASEAN Reference Substances**

**Certificate of Analysis**

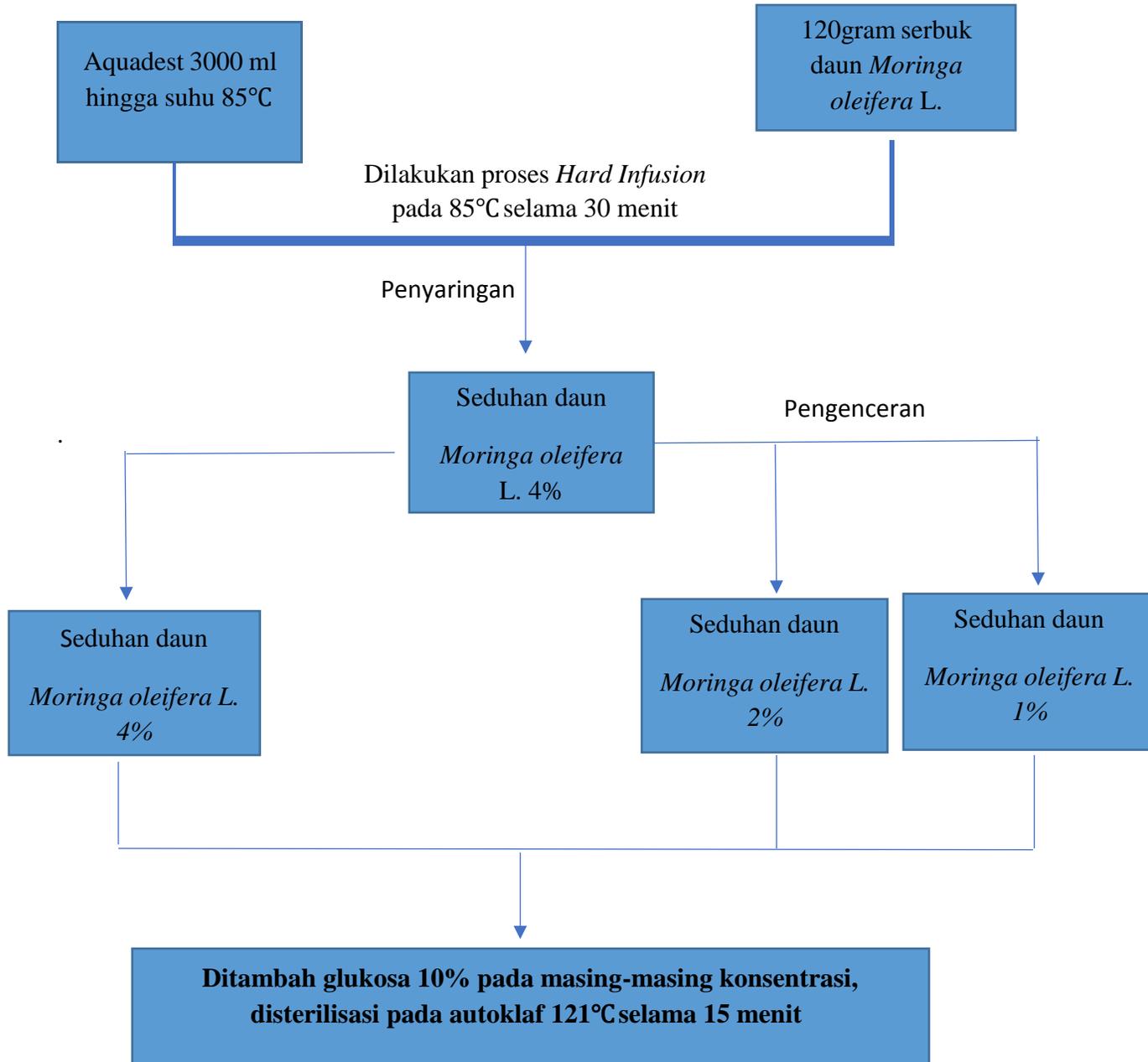
**ASCORBIC ACID**

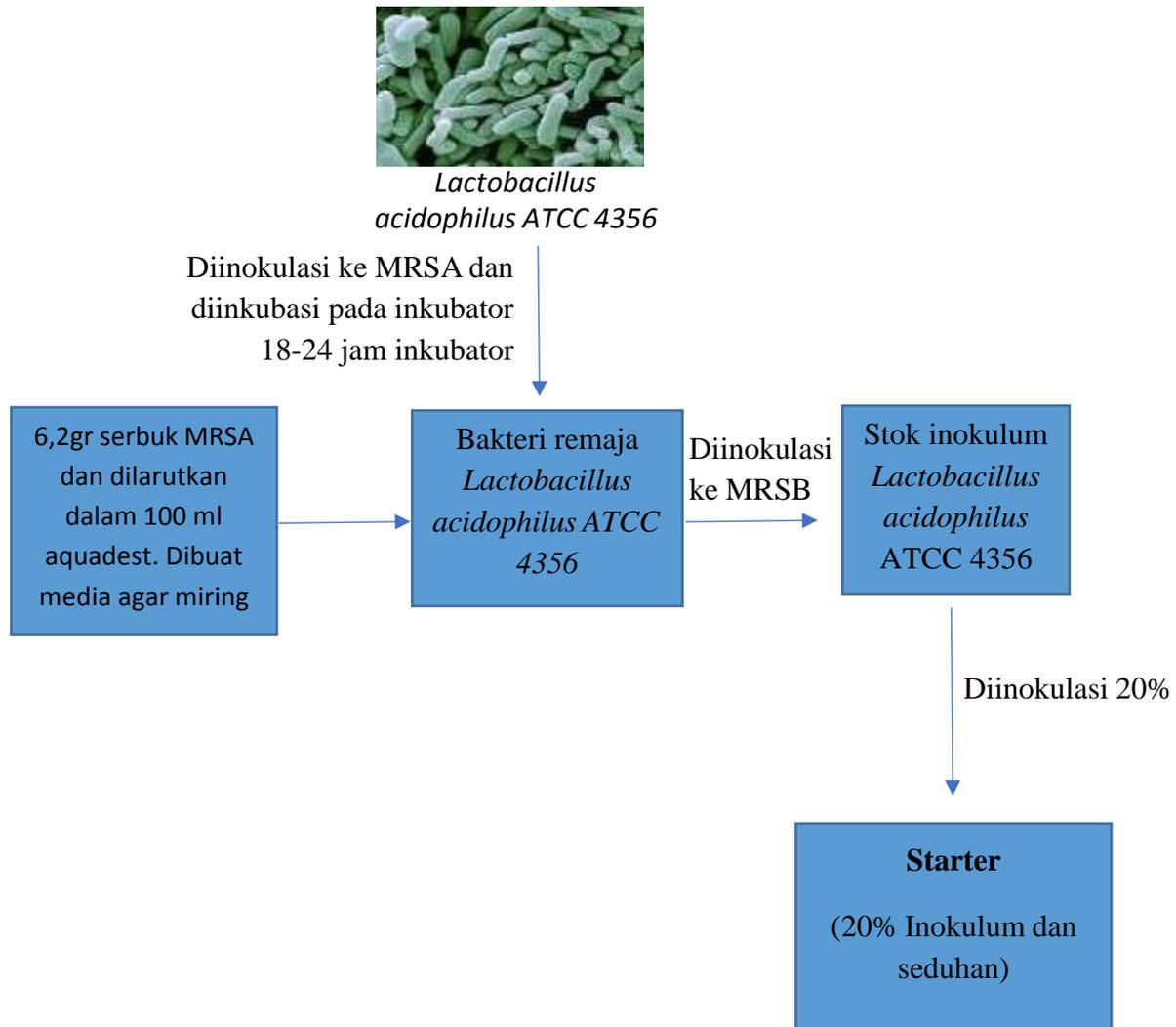
**ASEAN Reference Standard**

**Control No. I 103122**

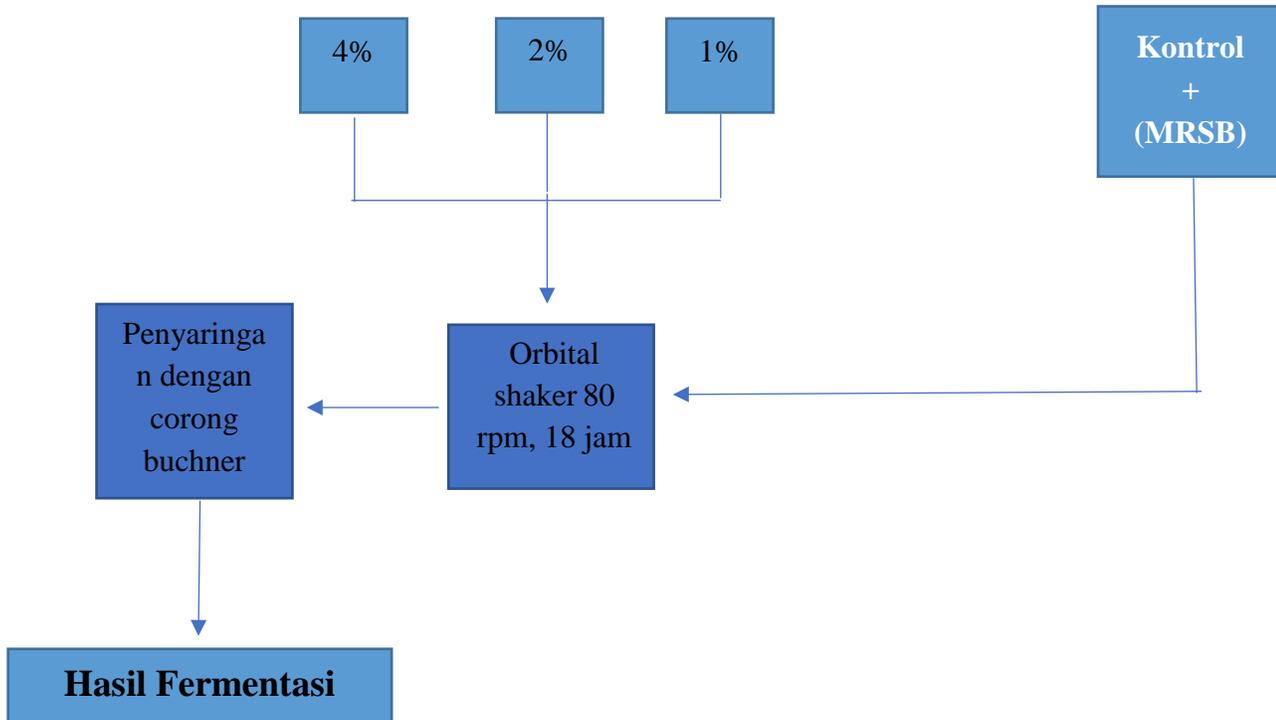
Description	: A white, crystalline powder.
Infrared absorption	: Concordant with the reference spectrum of Ascorbic acid BPCRS.
Light absorption	: A 0.001% solution in 0.01 M hydrochloric acid exhibits a maximum at 243 nm with A (1%, 1cm) about 561 to 573.
Specific optical rotation	: + 20.8 ° to + 20.9 ° (10% solution)
Acidity or alkalinity	: pH 2.1 to 2.3 (5% solution)
Assay	: 99.81% of $C_6H_8O_6$ , calculated on as is basis, determined by iodometric titration method.
Purity by DSC	: 98.09% of $C_6H_8O_6$
Intended use	: For chemical assay and identification.
Direction for use	: Do not dry before use.
Storage	: Keep container tightly closed and protected from light, preferably at the temperature about 5 ° C.

BTX

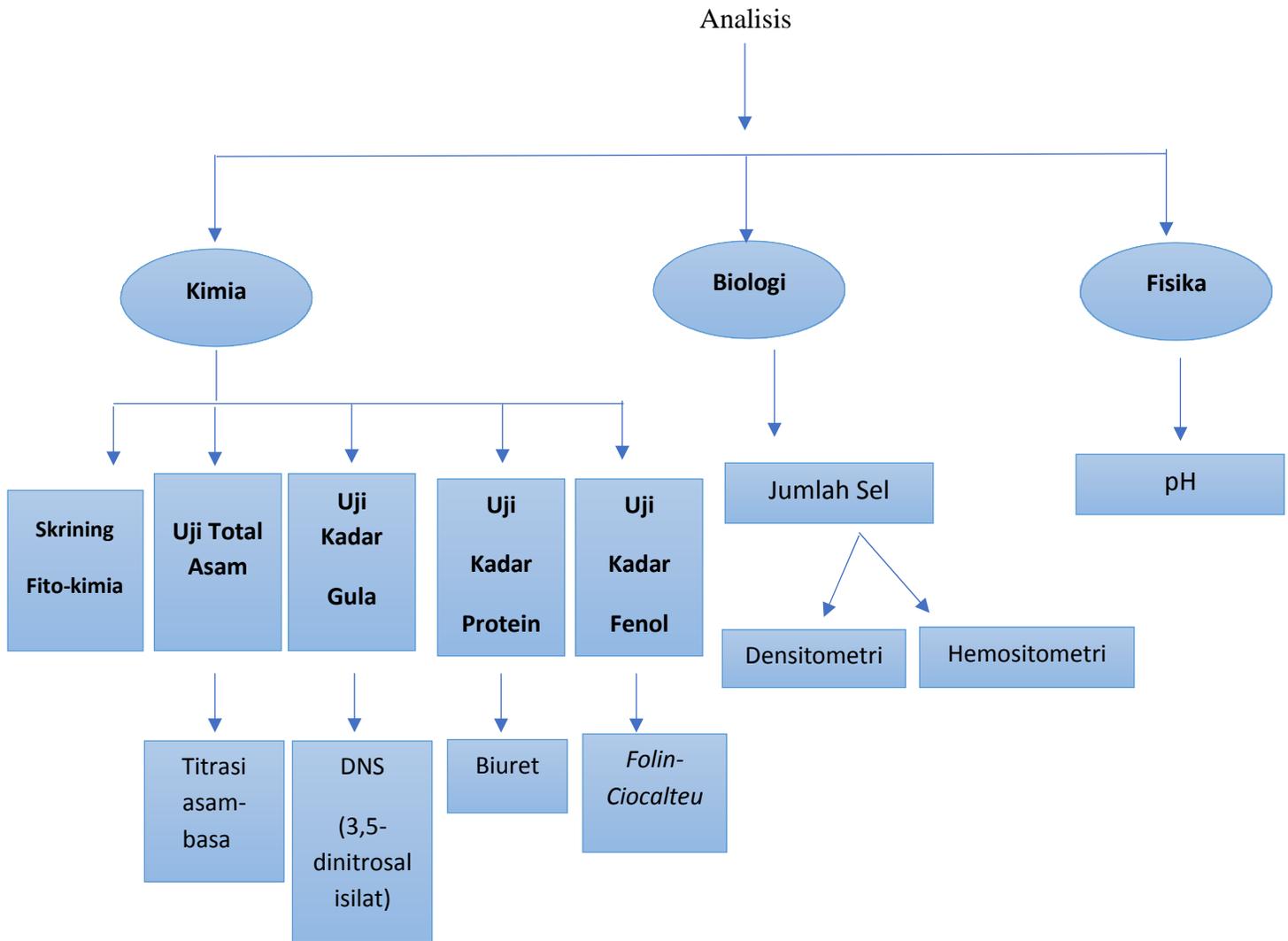
Lampiran 12. Pembuatan Seduhan Daun *Moringa oleifera* L.

Lampiran 13. Pembuatan Stok *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

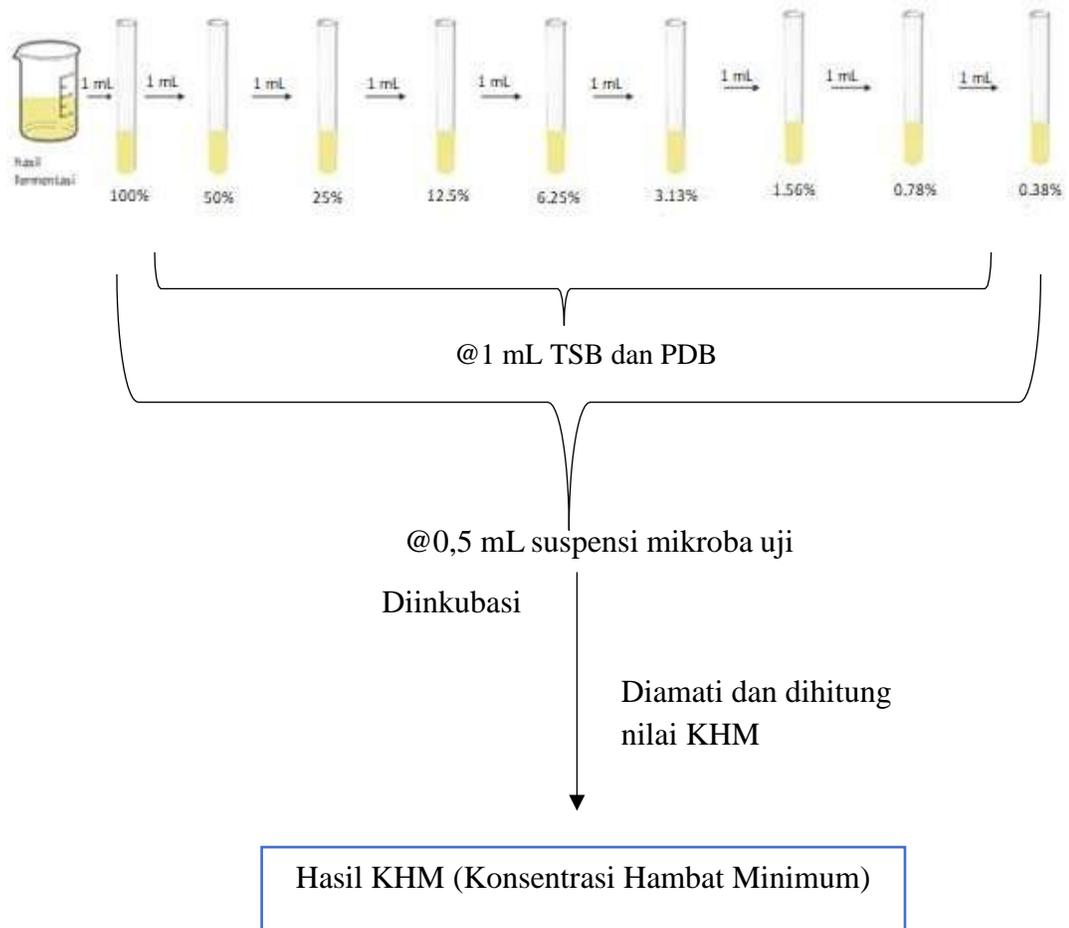
Lampiran 14. Skema Proses Fermentasi.



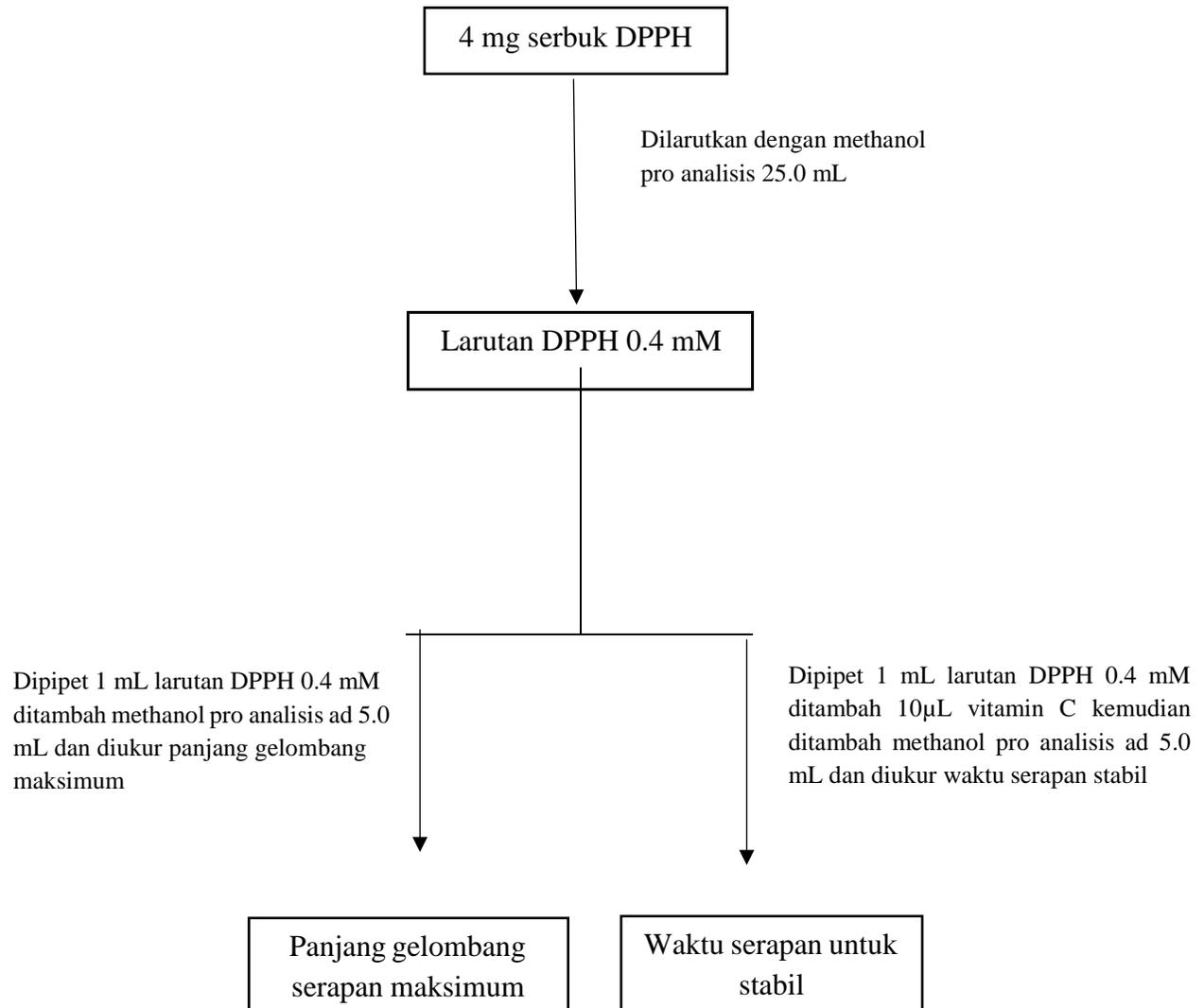
## Lampiran 15. Skema Analisis



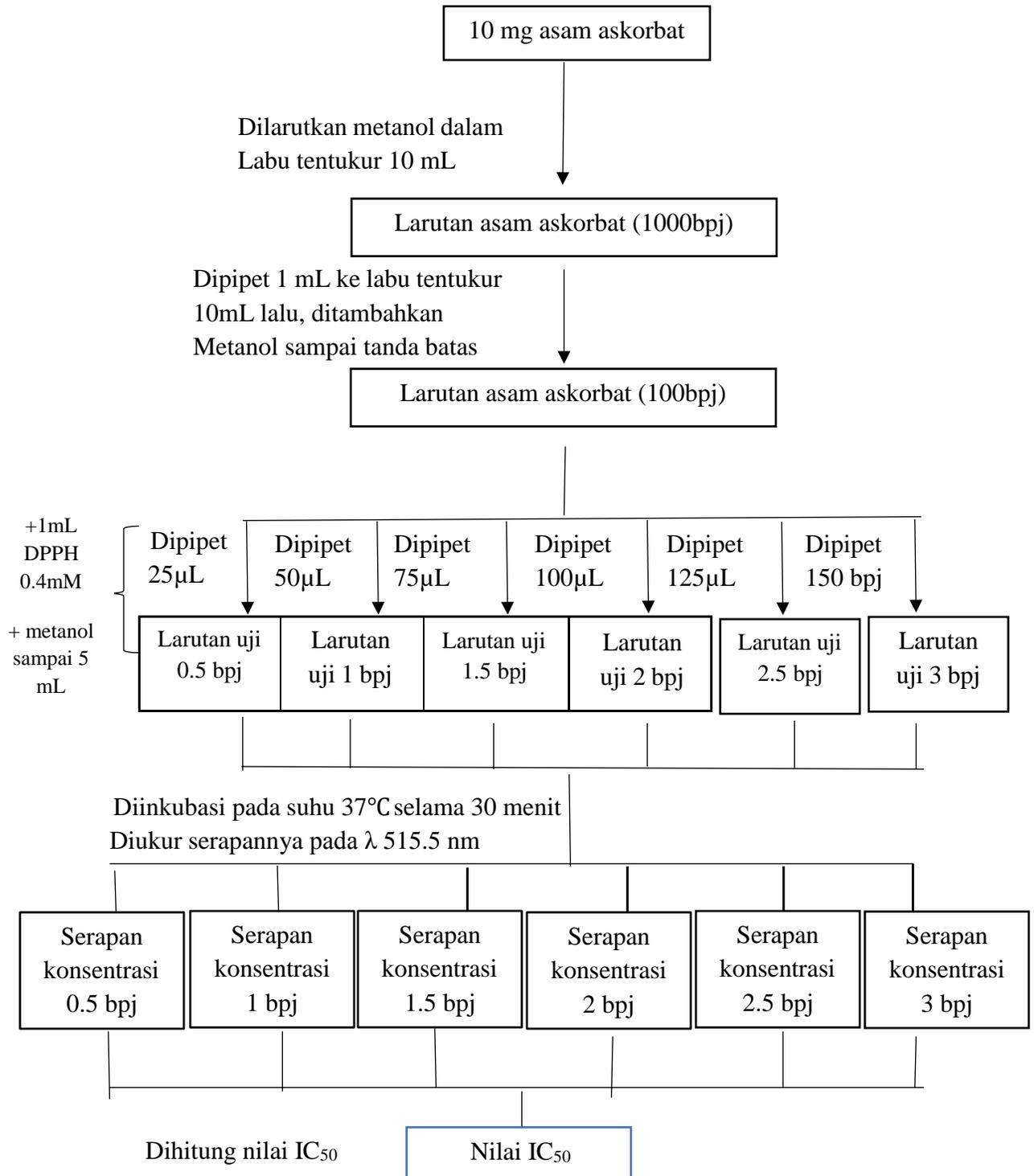
## Lampiran 16. Skema kerja pengukuran aktivitas antibakteri



## Lampiran 17. Skema kerja pengukuran aktivitas antioksidan

Lampiran 17a. Skema penetapan panjang gelombang ( $\lambda$ ) maksimum dan waktu stabil

Lampiran 17b. Skema penetapan kontrol positif



Lampiran 17c. Skema penetapan antioksidan hasil fermentasi daun *Moringa oleifera* L.