

### 3. PENGARUH FAKTOR PENGOLAHAN TERHADAP KADAR ANTIOKSIDAN

#### 3.1. Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa alami maupun sintetik guna mencegah oksidasi pada senyawa organik dengan cara melindungi dari efek merusak dari *reactive oxygen species* (ROS). Tingkat efisiensi dari antioksidan tergantung dari kemampuan *free radical scavengers* (FRS) untuk mendonasikan hidrogen pada radikal bebas (Karadag *et al.*, 2009). Antioksidan yang ada secara alami di dalam individu baik manusia, hewan, dan tumbuhan disebut antioksidan endogen. Sedangkan antioksidan yang didapat dari asupan dari luar disebut antioksidan eksogen. Tingginya kadar antioksidan secara umum dapat diketahui dengan melihat warna dari produk pangan. Jika warna alami dari produk tersebut pekat, maka kadar antioksidan relatif tinggi (Pradedova *et al.*, 2011). Antioksidan alami dari buah dan sayuran umumnya berupa vitamin C, vitamin E,  $\beta$ -karoten, dan flavonoid seperti pigmen antosianin, flavon, isoflavon, flavonons, katekin, dan isokatekin (Wang *et al.*, 1996).

Antioksidan memiliki sifat antimikroba, mencegah perubahan rasa, aroma, dan *flavor* dari produk akibat oksidasi lemak, serta mencegah hilangnya warna pigmen yang tidak stabil seperti antosianin, karotenoid, myoglobin, klorofil, maupun reaksi *browning* pada produk *bakery*. Hal ini yang menjadi dasar penambahan kadar antioksidan ke dalam produk *bakery* (Nanditha & Prabhasankar, 2009). Antioksidan memiliki sifat yang tidak stabil terutama terhadap panas dan pH dimana semakin tinggi panas maupun pH maka kadar antioksidan menurun (Mahmudatuss'adah *et al.*, 2014). Pengolahan produk *bakery* menggunakan proses pemanasan dengan suhu yang relatif tinggi sehingga berpengaruh pada kestabilan antioksidan. Proses pemanasan dapat dilakukan dengan beberapa metode seperti pemanggangan dan pengukusan. Perlu diketahui proses pengolahan yang baik guna mempertahankan kandungan antioksidan produk *bakery* (Baik *et al.*, 2001).

Antioksidan terbagi menjadi berbagai klasifikasi yang berbeda. Klasifikasi paling umum dilakukan berdasarkan aktivitas katalis, mekanisme kerja, dan sistem pertahanannya. Berdasarkan aktivitas katalisnya, antioksidan terbagi menjadi 2 jenis yaitu:

a. Antioksidan enzimatik

Antioksidan enzimatik bekerja secara spesifik terhadap bentuk ROS tertentu dengan menggunakan katalis berupa metal seperti Cu, Zn, Mn, Fe, dan Se. Antioksidan ini akan

membatasi konsentrasi dari sel radikal bebas dan mencegah kerusakan oksidatif yang terlalu besar (Apak *et al.*, 2016). Tipe antioksidan ini yaitu superoksida dismutase (SOD), glutathione peroksidase (GPO), glutathione reduktase, katalase, transferase, dan seluruh enzim dari siklus *ascorbate-glutathione*.

b. Antioksidan non enzimatik

Pertahanan antioksidan non enzimatik dilakukan oleh antioksidan seperti karotenoid, asam askorbat, flavonoid,  $\alpha$ -tokoferol, dan lain sebagainya yang bekerja dengan menetralisasi ROS baik secara non enzimatik maupun enzimatik (Pradedova *et al.*, 2011). Salah satu contoh cara kerja antioksidan non enzimatik yaitu plasma dari antioksidan non enzimatik melingkupi albumin dan protein terkait lainnya yang mengandung thiol dan residu asam amino antioksidatif lainnya serta molekul-molekul kecil seperti  $\alpha$ -tokoferol, bilirubin, asam askorbat, asam urat, dan glutathione tereduksi (Apak *et al.*, 2016).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan dibagi menjadi:

a. *Scavengers*

Antioksidan ini bekerja dengan memurnikan organisme dari radikal bebas. Pemurnian kebanyakan dilakukan dengan mereduksi radikal bebas tersebut menjadi produk yang stabil dan inaktif.

b. *Traps*

Cara kerja antioksidan *traps* yaitu menunjukkan afinitas pada radikal bebas tertentu seperti *singlet oxygen* dan *hydroxyl radical*.

c. *Breaking the chains*

Molekul dari antioksidan ini, yaitu fenol, lebih aktif dibanding radikal bebas dimana elektron dari fenol dengan mudah berikatan dengan radikal bebas kemudian mengkonversinya menjadi produk molekuler dan mengkonversi dirinya sendiri menjadi radikal fenol yang lemah sehingga dia tidak mampu bereaksi dengan rantai reaksi yang ada. Dengan mekanisme ini maka rantai reaksi radikal bebas dapat terhenti.

(Pradedova *et al.*, 2011)

Berdasarkan sistem pertahanannya, antioksidan digolongkan menjadi:

a. Primer

Antioksidan primer langsung berikatan dengan ROS dan mengeliminasinya. Antioksidan primer antara lain vitamin A, C, E, glutathione tereduksi, asam urat, dan enzim seperti superoksida dismutase dan peroksidase.

b. Sekunder

Antioksidan sekunder merupakan garis pertahanan kedua ketika antioksidan primer tidak mampu mengatasi ROS. Antioksidan ini akan memperbaiki kerusakan fisiologis yang ditimbulkan oleh ROS pada molekul-molekul penting. Antioksidan yang termasuk dalam jenis ini yaitu enzim katabolisme seperti lipase, protease, peptidase, dan lain sebagainya serta enzim reparasi DNA. Antioksidan sekunder akan aktif ketika terjadi stress oksidatif ekstrem atau ketika sistem detoksifikasi ROS mengalami tekanan atau bahkan rusak.

(Pradedova *et al.*, 2011)

### 3.1.1. Uji Antioksidan

Uji antioksidan yang dapat dilakukan tidak hanya satu tetapi terdapat banyak jenis uji dengan dasar yang berbeda-beda. Pada umumnya, uji aktivitas antioksidan diklasifikasikan berdasarkan transfer atom hidrogennya atau disebut *hydrogen atom transfer* (HAT) dan transfer elektron atau disebut *single electron transfer* (SET) (Apak *et al.*, 2016).

a. Uji berbasis HAT

Uji berbasis HAT digunakan untuk mengukur kemampuan antioksidan dalam melumpuhkan radikal bebas (umumnya radikal peroksil) dengan mendonasikan atom hidrogennya sehingga membentuk struktur yang stabil (Apak *et al.*, 2016). Reaksi dari HAT bergantung pada solven dan pH dimana reaksi tersebut terjadi cukup cepat yaitu dalam hitungan detik hingga menit (Karadag *et al.*, 2009). Adanya agen pereduksi seperti logam selama uji berlangsung dapat menyebabkan kesalahan dalam penghitungan aktivitas antioksidan dimana logam akan terhitung sebagai antioksidan sehingga kadarnya tampak lebih tinggi (Prior *et al.*, 2005). Contoh dari uji berbasis HAT yaitu *Hydroxyl Radical Activities* (ORAC) (Skrajda-Brdak *et al.*, 2019), TRAP, ABTS dan *Total Oxidant Scavenging Capacity* (TOSC) (Prior *et al.*, 2005).

b. Uji berbasis SET

Uji berbasis SET mendeteksi potensial antioksidan dengan melihat reduksi pada senyawa-senyawa seperti metal, karbonil, dan radikal setelah mentransferkan satu elektronnya. Reaksi SET bergantung pada pH dan sangat bergantung pada solven. Nilai pH berperan penting pada kapasitas reduksi dimana kapasitas donor elektron meningkat seiring dengan deprotonasi (Apak *et al.*, 2016). Selain itu, mekanisme SET sangat bergantung pada solven karena mempengaruhi stabilitas pelarut dari spesies bermuatan (Karadag *et al.*, 2009).

Metode dasar SET melibatkan dua komponen yaitu antioksidan dan oksidan (*probe*). *Probe* yang merupakan oksidan akan mengabstraksi elektron dari antioksidan sehingga terjadi perubahan warna pada *probe*. Akhir reaksi ditentukan dari berhentinya laju perubahan warna. Perubahan warna tersebut akan diukur absorbansinya dimana absorbansi menunjukkan kapasitas reduksi antioksidan. Semakin tinggi perubahan warna maka semakin tinggi kadar antioksidan (Karadag *et al.*, 2009). Uji berbasis SET ini biasanya berjalan lambat dan memakan waktu yang lama. Pengukuran antioksidan dilakukan berdasarkan penurunan kadar pada produk. Metode ini sangat sensitif terhadap asam askorbat dan asam urat (Prior *et al.*, 2005). Contoh metode berbasis SET yaitu *Ferric Reducing Ability of Plasma* (FRAP) dan uji DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl) *radical scavenging capacity* (Karadag *et al.*, 2009).

Pengujian antioksidan pada produk pangan biasa menggunakan uji FRAP dan DPPH walau tidak menutup kemungkinan uji berbasis HAT seperti uji ABTS dilakukan pada produk pangan. Uji FRAP biasa digunakan untuk mengukur kadar antioksidan pada sel dan jaringan tumbuhan. Uji ini tidak dapat digunakan untuk mengukur senyawa antioksidan yang bekerja dengan melakukan transfer H, selain itu juga tidak mengukur antioksidan berbasis thiol seperti glutathione dan protein (Prior *et al.*, 2005). Walaupun termasuk dalam uji SET yang memakan waktu yang cukup panjang, uji DPPH sebenarnya dapat berlangsung dengan cepat ketika bereaksi dengan asam askorbat yang memakan waktu 5 hingga 60 menit, namun ketika bereaksi dengan *butylated hydroxytoluene* (BHT), proses pengujian akan memakan waktu yang lama, yaitu 90 menit. Pengujian pada produk yang berbeda menggunakan konsentrasi DPPH yang berbeda. Konsentrasi DPPH yang digunakan pada umumnya berkisar pada 22,5 – 250  $\mu\text{M}$ . Konsentrasi yang digunakan sebaiknya sesuai dengan produk uji karena konsentrasi yang terlalu tinggi menyebabkan rendahnya tingkat akurasi pada saat pengukuran dengan spektrofotometer (O. P. Sharma & Bhat, 2009).

### 3.2. Faktor Pengolahan terhadap Kadar Antioksidan Produk *Bakery*

Pada dasarnya, produk *bakery* mengandung kadar antioksidan alami dari bahan yang digunakan dan kadarnya dapat meningkat ketika menggunakan bahan lain yang mengandung antioksidan dengan jumlah yang tinggi. Antioksidan dapat digunakan untuk meningkatkan

kualitas produk maupun untuk membantu meningkatkan kadar antioksidan dalam tubuh konsumen. Contoh kandungan antioksidan alami pada produk *bakery* yaitu pada tepung terigu. Gandum memiliki kadar antioksidan dari kandungan vitamin E yang tinggi, namun kadarnya menurun sebesar 50% akibat dari proses pengupasan *bran* dan *germ*. Kadar antioksidan juga menurun akibat kerentanan vitamin E terhadap oksidasi, pemrosesan, dan penyimpanan tepung terigu itu sendiri (Nanditha & Prabhasankar, 2009).

### 3.2.1. Fermentasi

Fermentasi merupakan proses metabolisme dari mikroba yang menghasilkan produk tertentu yang diinginkan dalam suatu produk. Fermentasi biasa dilakukan pada produk *bakery* yaitu roti dengan menggunakan mikroba *Saccharomyces cerevisiae* atau *baker's yeast*. Mikroba tersebut membutuhkan substrat yang mengandung nutrisi, terutama karbohidrat sebagai sumber energi bagi mikroba dan protein (Azizah *et al.*, 2012). *Yeast* mampu memanfaatkan segala jenis gula yang ada di dalam tepung seperti glukosa, fruktosa, manosa, maltosa, dan sukrosa tetapi hanya glukosa dan fruktosa yang dapat digunakan secara langsung oleh *yeast* karena berbentuk tunggal. Sedangkan gula dalam bentuk lain seperti sukrosa dan maltosa harus melalui proses pemecahan terlebih dahulu (Kulp & Lorenz, 2003).

Proses fermentasi memecah karbohidrat berupa polisakarida menjadi monosakarida yaitu glukosa kemudian dari glukosa tersebut akan diubah menjadi etanol dan CO<sub>2</sub>. Lebih detailnya, glukosa atau fruktosa yang memiliki ikatan 6(enam)-karbon akan dipecah menjadi dua ikatan 3(tiga)-karbon atau dapat disebut sebagai triosa yang nantinya akan dioksidasi dan dipecah kembali menjadi alkohol 2(dua)-karbon yaitu etanol dan molekul karbon dioksida 1(satu)-karbon (Kulp & Lorenz, 2003).

Etanol yang teroksidasi akan membentuk asam organik sehingga menimbulkan aroma dan rasa khas pada roti (Saragih *et al.*, 2017). Asam organik bersifat asam sehingga memberi kontribusi dalam penurunan pH walaupun mungkin tidak terlalu signifikan. Nilai pH produk roti yang mengalami proses fermentasi berada pada kisaran 5 (Kulp *et al.*, 1985) sedangkan pada produk yang tidak melalui proses fermentasi seperti *cake* dan *cookies*, nilai pH berada pada kisaran 7 atau netral (Mau *et al.*, 2014). Semakin rendah pH maka kadar antioksidan akan semakin stabil karena pH yang rendah meningkatkan densitas ion hidrogen sehingga menekan pelepasan ion hidrogen untuk meredam radikal bebas (Rifkowitz & Wardanu, 2016).

### 3.2.2. Pemanggangan

Proses pemanggangan menggunakan suhu yang tinggi. Selama pemanasan, suhu pada permukaan adonan akan meningkat terlebih dahulu kemudian diikuti dengan peningkatan suhu pada bagian dalam adonan. Pada saat suhu mencapai lebih dari 100°C, air akan menguap. Bagian permukaan atau dapat disebut sebagai *crust* akan terpapar dengan suhu tinggi terlebih dahulu menyebabkan penguapan air yang besar. Hal ini yang menyebabkan *crust* dari produk *bakery* mengandung lebih sedikit air dan memiliki warna yang lebih gelap daripada bagian dalamnya atau disebut sebagai *crumb*. Contohnya ketika melakukan pemanggangan pada suhu 200°C, yang akan mencapai suhu mendekati 200°C pada produk tersebut adalah bagian *crust*, sedangkan suhu pada bagian *crumb* tidak lebih dari 100°C (Rask, 1989).

Produk *bakery* yang melalui proses pemanggangan akan mengalami proses pencoklatan yang dikenal dengan sebutan *browning*. *Browning* adalah hasil dari reaksi kimia non-enzimatik yang menghasilkan senyawa yang berwarna. Bahan utama dalam pencoklatan ini yaitu gula. Contoh dari reaksi *browning* yaitu reaksi *Maillard* dan karamelisasi. Kedua reaksi ini berperan penting pada aspek sensori dan nutrisi (Purlis, 2010). Reaksi *Maillard* melibatkan gula dan asam amino, sedangkan karamelisasi menggunakan gula dan asam askorbat sebagai prekursor (Nanditha & Prabhasankar, 2009). Semakin tinggi suhu yang digunakan dan semakin lama waktu pemanggangan maka reaksi *Maillard* dan karamelisasi yang terjadi akan semakin besar (Shi *et al.*, 2019).

Reaksi *Maillard* adalah reaksi pencoklatan non-enzimatik dimana dalam prosesnya melibatkan gula pereduksi, asam amino, protein, dan atau senyawa yang mengandung nitrogen yang dipanaskan bersamaan (Purlis, 2010). Reaksi ini menghasilkan produk berwarna maupun tidak berwarna tergantung dari tingkatan reaksi yang dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pH, temperatur, aktivitas air, dan lain sebagainya (Yilmaz & Toledo, 2005). Terjadinya reaksi *browning* ini diinginkan karena memiliki peran penting dalam meningkatkan penampakan, tekstur, dan rasa dari produk (Charissou *et al.*, 2007).

Proses *browning* diawali dengan terjadinya reaksi kondensasi antara gula pereduksi dengan asam amino pada lisin atau protein yang menghasilkan amadori (1-amino-1-deoxy-2-ketose).

Amadori ini akan terdegradasi menjadi senyawa yang berbeda tergantung dari nilai pH. Senyawa hidroksi metal furfural (HMF) akan terbentuk pada pH 4 hingga 7 (pH produk *bakery*). HMF yang bereaksi dengan senyawa amino akan mengarah pada pembentukan melanoidin yang merupakan polimer berwarna coklat, dan substansi aromatik (Purlis, 2010).

Melanoidin sebagai produk reaksi *Maillard* yang utama memiliki berat molekul yang tinggi dimana cincin furan dan nitrogen mengandung senyawa berwarna coklat. Kompleksitas dalam struktur ini membatasi penentuan aktivitas antioksidan pada setiap senyawa dalam seluruh produk hasil reaksi *Maillard* atau MRP. Aktivitas antioksidan di dalam MRP yang terbentuk selama pengolahan produk pangan biasanya diukur dengan uji ORAC (Yilmaz & Toledo, 2005). MRP, khususnya melanoidin, dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan (Bhat *et al.*, 2020) setelah dilakukan pengujian melalui pembersihan radikal oksigen atau logam pengkelat (Yilmaz & Toledo, 2005). Produk dari reaksi *Maillard* memang memiliki aktivitas antioksidan, namun antioksidan yang terbentuk dari reaksi *Maillard* ini tidak stabil terutama ketika terpapar udara (P. Sharma & Gujral, 2014).

Karamelisasi merupakan reaksi kompleks yang terjadi akibat pemanasan secara langsung dengan suhu tinggi, yaitu lebih dari 120°C, terhadap karbohidrat khususnya sukrosa dan gula pereduksi. Panas ini akan mereduksi gula menjadi osuloses (senyawa  $\alpha$ -dikarbonil) setelah melewati reaksi enolisasi dan dehidrasi. Osuloses ini yang akan membawa pada pembentukan produk dengan ikatan ganda atau cincin tak jenuh seperti furan, HMF, dan polimer (Purlis, 2010).

### 3.2.3. Pengukusan

Pengukusan merupakan jenis pemanasan yang dilakukan pada tahap pembuatan produk *bakery*. Prinsip dasar pemanasannya menggunakan uap air yang dihasilkan dari pemanasan air hingga mencapai titik didihnya. Suhu yang dihasilkan yaitu sekitar 100°C. Pengukusan ini mempengaruhi kadar antioksidan dalam produk yang disubstitusi sehingga kadar antioksidan produk meningkat, namun tidak mempengaruhi kadar antioksidan alami dari bahan dasar produk tersebut (Fu *et al.*, 2015). Perbandingan kadar antioksidan dilakukan dengan membandingkan kadar antioksidan pada bahan substitusi atau pada adonan produk sebelum dilakukan pemanasan dan pada produk jadi setelah dilakukan pemanasan. Dalam pengukusan,

penurunan kadar antioksidan produk bila dibandingkan dengan kadar antioksidan bahan substitusi alami umumnya sekitar 30-40% akibat dari degradasi termal (Fu *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2016).

### 3.2.3. Kadar Antioksidan Produk *Bakery*

Proses pengukusan dinilai lebih baik untuk menjaga aktivitas antioksidan dibandingkan proses pemanggangan karena suhu yang digunakan dalam proses pengukusan lebih rendah yaitu sekitar 100°C (Fu *et al.*, 2015). Selain itu, pada jenis produk *bakery* tertentu melalui satu proses pengolahan tambahan yaitu fermentasi. Fermentasi dapat meningkatkan stabilitas antioksidan di dalam produk *bakery* karena menurunkan pH produk (Rifkowaty & Wardanu, 2016).

Produk *bakery* yang dianalisa yaitu roti, *cake*, *cookies*, mantau, dan *cake* kukus. Roti melalui proses pemanggangan suhu tinggi dan fermentasi, *cake* melalui proses pemanggangan suhu sedang, *cookies* melalui proses pemanggangan suhu rendah, mantau melalui proses pengukusan dan fermentasi, dan *cake* kukus melalui proses pengukusan. Dilihat dari proses pengolahannya, dapat diketahui secara teoritis bahwa mantau akan memiliki kemampuan yang paling baik dalam mempertahankan kadar antioksidan pada produk akhir. Kadar antioksidan pada berbagai jenis produk *bakery* yang telah disubstitusi bahan alami dengan kadar antioksidan tinggi dapat dilihat pada Tabel 2.



Tabel 2. Kadar dan Aktivitas Antioksidan Produk *Bakery* yang Mengalami Substitusi atau Penambahan Bahan

Bahan Substitusi	Proses Pengolahan	Produk <i>Bakery</i>	Persen Substitusi / Penambahan Bahan	Kadar dan Aktivitas Antioksidan Bahan Alami	Kadar dan Aktivitas Antioksidan Adonan Substitusi	Kadar dan Aktivitas Antioksidan Produk	Referensi
Kunyit ( <i>Curcuma longa L.</i> )	Suhu tinggi + fermentasi	Roti tawar	4%	DPPH: 79,80±0,6%	DPPH: 0,87%	DPPH: 33,7%	(Lim <i>et al.</i> , 2011)
<i>Barley</i>	Suhu tinggi + fermentasi	Roti tawar	60%	DPPH <i>scavenging</i> : 1,109 mg TE/g DPPH: 77,42%	DPPH <i>scavenging</i> : 0,195 mg TE/g DPPH: 13,60%	DPPH <i>scavenging</i> : 0,171±0,03 mg TE/g DPPH: 11,94%	(Omwamba & Hu, 2009) (Robles-Ramírez <i>et al.</i> , 2020)
<i>Buckwheat</i>	Suhu tinggi + fermentasi	Roti tawar	50%	DPPH <i>scavenging</i> : 6,2±28,1 mg TE/g DPPH: 67,45%	DPPH <i>scavenging</i> : 1,62 mg TE/g DPPH: 17,62%	DPPH <i>scavenging</i> : 0,588±3,9 mg TE/g DPPH: 6,40%	(Inglett <i>et al.</i> , 2011) (Alvarez-Jubete <i>et al.</i> , 2010)
<i>Buckwheat sprouts</i>	Suhu tinggi + fermentasi	Roti tawar	50%	DPPH <i>scavenging</i> : 6,66±62,5 mg TE/g DPPH: 71%	DPPH <i>scavenging</i> : 1,741 mg TE/g DPPH: 18,56%	DPPH <i>scavenging</i> : 0,768±2,5 mg TE/g DPPH: 8,19%	(Lim <i>et al.</i> , 2012) (Alvarez-Jubete <i>et al.</i> , 2010)
<i>Rice bran</i>	Suhu tinggi + fermentasi	Roti tawar	20%	DPPH <i>scavenging</i> : 6,25 mg TE/g DPPH: 89%	DPPH <i>scavenging</i> : 0,42 mg TE/g DPPH: 5,98%	DPPH <i>scavenging</i> : 2,95 mg TE/g DPPH: 42%	(Arab <i>et al.</i> , 2011) (Irakli <i>et al.</i> , 2015)

Bahan Substitusi	Proses Pengolahan	Produk Bakery	Persen Substitusi / Penambahan Bahan	Kadar dan Aktivitas Antioksidan Bahan Alami	Kadar dan Aktivitas Antioksidan Adonan Substitusi	Kadar dan Aktivitas Antioksidan Produk	Referensi
Kunyit	Suhu sedang	Cake	4%	DPPH: 88,4%	DPPH: 26%	DPPH: 28,5%	(Park <i>et al.</i> , 2012)
Jujube ( <i>Zizyphus lotus</i> L.)	Suhu sedang	Cake	5%	DPPH: 79,27±0,73%	DPPH: 1,17%	DPPH: 31,01±0,04%	(Masmoudi <i>et al.</i> , 2020) (Najjaa <i>et al.</i> , 2020)
Cocoa hull	Suhu sedang	Cake	40%	DPPH scavenging: 5,01±0,46 mg TE/g DPPH: 74,1±2,5%	DPPH scavenging: 0,524 mg TE/g DPPH: 7,75%	DPPH scavenging: 1,38±0,71 mg TE/g DPPH: 20,41%	(Othman <i>et al.</i> , 2007) (Öztürk & Ova, 2020)
Coffee silverskin	Suhu sedang	Cake	30%	DPPH scavenging: 3,763 mg TE/g DPPH: 40,6±1,5%	DPPH scavenging: 0,322 mg TE/g DPPH: 3,47%	DPPH scavenging: 0,578 mg TE/g DPPH: 6,24%	(Bessada <i>et al.</i> , 2018) (Ateş & Elmacı, 2019)
Wortel	Suhu sedang	Cake	10%	DPPH: 76,34±1,32%	DPPH: 1,10%	DPPH: 33%	(Olawuyi & Lee, 2019)
Jamur ( <i>Agaricus bisporus</i> )	Suhu sedang	Cake	10%	DPPH: 77,5%	DPPH: 2,58%	DPPH: 41,18±2,14%	(Elmastas <i>et al.</i> , 2007) (Arora <i>et al.</i> , 2017)

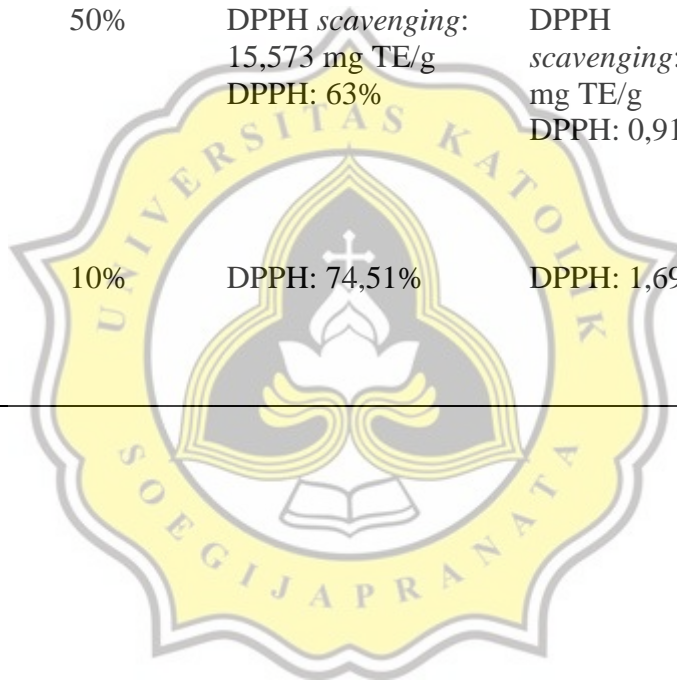
Bahan Substitusi	Proses Pengolahan	Produk Bakery	Persen Substitusi / Penambahan Bahan	Kadar dan Aktivitas Antioksidan Bahan Alami	Kadar dan Aktivitas Antioksidan Adonan Substitusi	Kadar dan Aktivitas Antioksidan Produk	Referensi
<i>Barley</i>	Suhu rendah	<i>Cookies</i>	75%	DPPH <i>scavenging</i> : 1,026 mg TE/g DPPH: 64%	DPPH <i>scavenging</i> : 0,25 mg TE/g DPPH: 15,7%	DPPH <i>scavenging</i> : 0,271 mg TE/g DPPH: 16,9%	(Moghadam, 2016) (Liu & Yao, 2007) (P. Sharma & Gujral, 2014)
Jahe	Suhu rendah	<i>Cookies</i>	4%	DPPH <i>scavenging</i> : 19,75 mg TE/g DPPH: 84,11±0,1%	DPPH <i>scavenging</i> : 0,373 mg TE/g DPPH: 1,59%	DPPH <i>scavenging</i> : 14,965 mg TE/g DPPH: 59,9±0,4%	(Ramírez-Godínez <i>et al.</i> , 2017) (El-Ghorab <i>et al.</i> , 2010) (Abdel-Samie <i>et al.</i> , 2010)
Jagung ( <i>blue popping corn</i> )	Suhu rendah	<i>Cookies</i>	40%	DPPH <i>scavenging</i> : 12,773 mg TE/g DPPH: 70%	DPPH <i>scavenging</i> : 6,185 mg TE/g DPPH: 33,89%	DPPH <i>scavenging</i> : 4,928 mg TE/g DPPH: 27,01%	(Aguayo-Rojas <i>et al.</i> , 2012) (Žilić <i>et al.</i> , 2016)
Jagung ( <i>blue-standard corn</i> )	Suhu rendah	<i>Cookies</i>	40%	DPPH <i>scavenging</i> : 11,705 mg TE/g DPPH: 60%	DPPH <i>scavenging</i> : 5,655 mg TE/g DPPH: 28,99%	DPPH <i>scavenging</i> : 5,484 mg TE/g DPPH: 28,11%	(Lopez-Martinez <i>et al.</i> , 2011) (Žilić <i>et al.</i> , 2016)
<i>Flaxseed</i>	Suhu rendah	<i>Cookies</i>	15%	DPPH: 48,24%	DPPH: 9,36%	DPPH: 9,05%	(Kaur <i>et al.</i> , 2017)

Bahan Substitusi	Proses Pengolahan	Produk Bakery	Persen Substitusi / Penambahan Bahan	Kadar dan Aktivitas Antioksidan Bahan Alami	Kadar dan Aktivitas Antioksidan Adonan Substitusi	Kadar dan Aktivitas Antioksidan Produk	Referensi
Ubi jalar ungu	Pengukusan + fermentasi	Mantau	10%	DPPH scavenging: 15,573 mg TE/g DPPH: 65%	DPPH scavenging: 0,915 mg TE/g DPPH: 3,82%	DPPH scavenging: 3,905 mg TE/g DPPH: 16,30%	(Jiao <i>et al.</i> , 2012) (Zhu & Sun, 2019)
<i>Tartary buckwheat</i>	Pengukusan + fermentasi	Mantau	4%	DPPH scavenging: 30,935 mg TE/g DPPH: 79%	DPPH scavenging: 3,725 mg TE/g DPPH: 9,51%	DPPH scavenging: 11,23 mg TE/g DPPH: 31,84±1,61%	(Li <i>et al.</i> , 2010) (Zielińska <i>et al.</i> , 2012) (Xu <i>et al.</i> , 2014)
<i>Tartary buckwheat sprouts</i>	Pengukusan + fermentasi	Mantau	4%	DPPH scavenging: 51,902 mg TE/g DPPH: 88%	DPPH scavenging: 1,463 mg TE/g DPPH: 2,43%	DPPH scavenging: 28,328 mg TE/g DPPH: 48,03±0,86%	(Liu <i>et al.</i> , 2008) (Xu <i>et al.</i> , 2014)
<i>Calamondin fiber</i>	Pengukusan + fermentasi	Mantau	6%	DPPH scavenging: 0,531 mg TE/g DPPH: 63,25%	DPPH scavenging: 0,125 mg TE/g DPPH: 14,89%	DPPH scavenging: 0,12 mg TE/g DPPH: 14,29%	(Singh <i>et al.</i> , 2020) (Fu <i>et al.</i> , 2014)
<i>Lemon fiber</i>	Pengukusan + fermentasi	Mantau	3%	DPPH scavenging: 0,809 mg TE/g DPPH: 53,2%	DPPH scavenging: 0,18 mg TE/g DPPH: 11,84%	DPPH scavenging: 0,16 mg TE/g DPPH: 10,52%	(Singh <i>et al.</i> , 2020) (Leong & Shui, 2002)

Bahan Substitusi	Proses Pengolahan	Produk Bakery	Persen Substitusi / Penambahan Bahan	Kadar dan Aktivitas Antioksidan Bahan Alami	Kadar dan Aktivitas Antioksidan Adonan Substitusi	Kadar dan Aktivitas Antioksidan Produk	Referensi
							(Fu <i>et al.</i> , 2015)
Ubi jalar ungu	Pengukusan	Cake kukus	50%	DPPH scavenging: 15,573 mg TE/g DPPH: 63%	DPPH scavenging: 0,225 mg TE/g DPPH: 0,91%	DPPH scavenging: 12,137 mg TE/g DPPH: 49,10%	(Jiao <i>et al.</i> , 2012) (Handayani <i>et al.</i> , 2017) (Shaliha <i>et al.</i> , 2017)
Kulit manggis	Pengukusan	Cake kukus	10%	DPPH: 74,51%	DPPH: 1,69%	DPPH: 65%	(Wathoni <i>et al.</i> , 2019) (Salin <i>et al.</i> , 2019)

Keterangan:

TE : Trolox equivalent



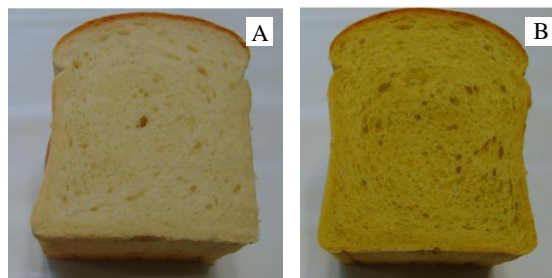
Pada Tabel 2. dapat diketahui berbagai jenis produk *bakery* yang telah disubstitusi atau mengalami penambahan bahan yang mengandung antioksidan. Substitusi umumnya dilakukan pada tepung terigu. Proses pengolahan memberikan dampak pada kualitas produk termasuk kadar antioksidan yang umumnya akan mengalami penurunan. Tinggi atau rendahnya tingkat penurunan antioksidan pada produk tergantung dari pengolahan yang dilalui. Setiap produk mengalami substitusi dengan bahan dan jumlah yang berbeda mengingat adanya perbedaan karakteristik pada setiap jenis produk *bakery*. Contohnya pada produk yang melalui proses fermentasi seperti roti. Roti tidak dapat terlalu banyak mengalami substitusi mengingat kebutuhannya terhadap gluten. Bahan substitusi yang digunakan sebagian besar berkadar gluten rendah bila dibandingkan dengan tepung terigu sehingga ketika substitusi yang dilakukan terlalu banyak maka produk tidak dapat mengembang seperti yang diinginkan (Darmawansyah & Ninsix, 2016).

Kestabilan antioksidan pada setiap produk dilihat dari besar penurunan kadar antioksidan ekstrak bahan substitusi serta kadar antioksidan adonan terhadap kadar antioksidan produk. Seperti yang tertera pada Tabel 2., kadar antioksidan dengan penurunan paling rendah yaitu pada produk *bakery* dengan proses pengolahan pengukusan, diikuti dengan suhu rendah, pengukusan dan fermentasi, suhu sedang, serta suhu tinggi dan fermentasi. Faktor utama yang mempengaruhi penurunan kadar antioksidan yaitu suhu dan waktu pemanasan selama proses pengolahan. Selain itu, faktor lain seperti kadar substitusi bahan kaya antioksidan juga mempengaruhi aktivitas antioksidan pada produk akhir.

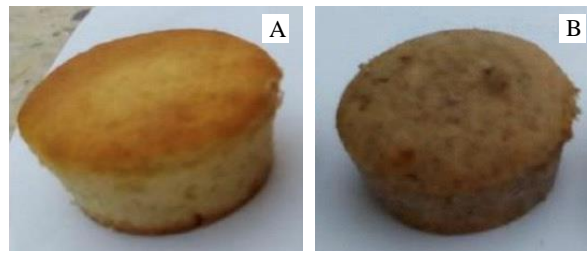
Pengukusan pada *cake* mengalami penurunan kadar antioksidan paling rendah yaitu rata-rata sebesar 11,705% karena proses pengolahan yang menggunakan suhu relatif rendah bila dibandingkan dengan pemanggangan dengan waktu yang singkat yaitu 10 hingga 30 menit (Salin *et al.*, 2019). *Cake* tidak memerlukan kadar gluten yang tinggi sehingga substitusi dapat dilakukan dengan jumlah yang lebih tinggi dari produk roti. Pemanggangan suhu rendah mengalami penurunan rata-rata sebesar 37,076%. Hal ini disebabkan karena suhu yang digunakan rendah yaitu 150 hingga 160°C dengan waktu yang singkat yaitu 12 menit sehingga *cookies* tidak terlalu lama terpapar oleh panas (Kaur *et al.*, 2017). Pengukusan dan fermentasi mengalami penurunan kadar antioksidan rata-rata sebesar 45,494% yang tidak jauh berbeda dengan penurunan pada proses pengolahan suhu sedang yaitu rata-rata sebesar 46,028%.

Produk yang mengalami fermentasi memerlukan kadar gluten tinggi sehingga substitusi tidak dapat dilakukan dengan jumlah besar (Darmawansyah & Ninsix, 2016). Hal ini mempengaruhi kadar antioksidan pada produk akhir secara signifikan. Mantau mengalami proses fermentasi yang dapat menurunkan pH pada adonan sehingga antioksidan lebih stabil. Selain itu, proses pemanasan yang dilalui yaitu pengukusan. Secara teori, kedua proses ini sangat mendukung kestabilan antioksidan produk, namun substitusi yang rendah menyebabkan antioksidan pada produk akhir setara dengan antioksidan pada *cake* yang mengalami pemanggangan dengan suhu sedang yaitu 150 hingga 180°C (Dwi *et al.*, 2014). Penurunan kadar antioksidan terbesar yaitu pada proses pengolahan suhu tinggi dan fermentasi dengan penurunan rata-rata sebesar 56,496%. Proses pemanggangan menggunakan suhu sebesar 200 hingga 225°C selama 20-30 menit (Lim *et al.*, 2011). Suhu yang sangat tinggi dan waktu pemanggangan yang panjang menyebabkan antioksidan di dalam produk menurun secara signifikan. Selain proses pemanggangan, penurunan kadar antioksidan yang signifikan dari bahan substitusi juga terjadi karena pencampuran bahan substitusi dengan bahan lain yang tidak mengandung antioksidan (Yu & Beta, 2015).

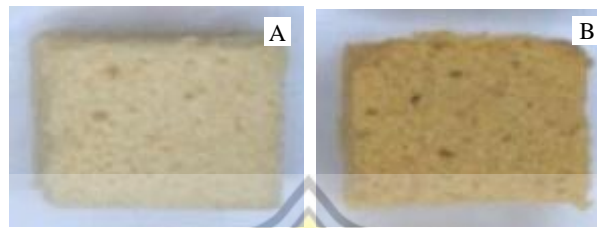
Selain dari pengujian kadar antioksidan, keberadaan antioksidan pada produk pangan dapat diketahui dengan melakukan pengamatan pada warna. Buah maupun sayur yang memiliki warna cerah dan pekat memiliki pigmen yang tinggi dimana pigmen tersebut mengandung aktivitas antioksidan sehingga dapat dikatakan bahwa warna menjadi indikator tinggi rendahnya kapasitas antioksidan (Li *et al.*, 2012). Pigmen alami yang terkandung dalam buah dan sayur antara lain pigmen larut lemak seperti klorofil (hijau) dan karotenoid (kuning, oranye, dan merah), serta pigmen larut air yaitu antosianin (merah, biru), flavonoid (kuning), dan betalain (merah). Penambahan buah maupun sayur dalam jumlah kecil sekalipun mampu mempengaruhi produk terutama pada warna seperti yang terlihat pada Gambar 3 sampai dengan 5.



Gambar 3. A. Roti Tawar Kontrol; B. Roti Tawar Kunyit (sumber: Lim *et al.*, 2011)



Gambar 4. A. *Cake* Kontrol; B. *Cake* Jujube (sumber: Najjaa *et al.*, 2020)



Gambar 5. A. *Cake* Kontrol; B. *Cake* Wortel (sumber: Najjaa *et al.*, 2020)



Gambar 6. A. *Cookies* Kontrol; B. *Cookies* Flaxseed (sumber: Kaur *et al.*, 2017)



Gambar 7. A. Mantau Kontrol-Substitusi *Tartary Buckwheat Flour*; B. Mantau Kontrol-Substitusi *Tartary Buckwheat Sprouts* (sumber: F. Y. Xu *et al.*, 2014)

Produk-produk yang telah mengalami substitusi atau penambahan bahan cenderung mengikuti warna bahan substitusi ketika antioksidan pada bahan substitusi berasal dari pigmen. Hal ini



dibuktikan dari Gambar 3 sampai dengan 6. dimana substitusi kunyit pada roti tawar menghasilkan warna produk menjadi kuning pekat. Substitusi jujube pada *cake* menghasilkan warna kecoklatan. Substitusi wortel pada *cake* menghasilkan warna produk yang kekuningan. Substitusi *flaxseed* pada *cookies* menghasilkan warna yang lebih kecoklatan. Sedangkan substitusi *tartary buckwheat* yang terlihat pada Gambar 7. pada mantau mengalami perubahan warna yang kurang signifikan karena pada dasarnya antioksidan pada *tartary buckwheat* tidak didominasi oleh pigmen tetapi oleh senyawa flavonoid yang disebut rutin (Chua, 2013). Perubahan warna produk akhir disebabkan oleh pigmen pada bahan substitusi yang secara alami mengandung antioksidan sehingga perubahan warna yang terjadi disertai peningkatan antioksidan (Li *et al.*, 2012). Warna dapat berfungsi sebagai indikator dari tinggi rendahnya proses pemanasan dan memprediksi penurunan kualitas produk karena panas. Paparan panas dengan temperatur yang relatif tinggi menyebabkan pigmen yang berperan sebagai penghasil warna mengalami degradasi. Tingkat degradasi pigmen meningkat ketika pigmen yang terkandung adalah pigmen larut air seperti antosianin, flavonoid, dan betalain karena dapat menguap bersama air dalam proses pemanasan (Pathare *et al.*, 2013). Degradasi pigmen yang terjadi pada *cookies* terlihat pada Gambar 8.



Gambar 8. A. Adonan-Produk *Cookies Blue Popping Corn*; B. Adonan-Produk *Cookies Blue-Standard Corn* (sumber: Žilić *et al.*, 2016)

Gambar 8. menunjukkan *cookies* sebelum dan sesudah mengalami pemanasan. Pigmen yang terkandung yaitu pigmen antosianin yang larut air. Warna pada adonan terlihat lebih pekat dengan tingkat kecerahan lebih rendah. Sedangkan pada produk, warna menjadi lebih cerah. Hal ini disebabkan karena pigmen antosianin pada produk mengalami degradasi. Walaupun

pigmen hilang akibat paparan suhu tinggi, sebagian pigmen akan tetap tertahan dalam jumlah kecil (Wojdyło *et al.*, 2009).

Pengukuran warna yang lebih akurat dapat dilakukan menggunakan pengukuran CIE  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ .  $L^*$  menandakan tingkat kecerahan,  $a^*(+)$  menunjukkan warna merah,  $a^*(-)$  menunjukkan warna hijau,  $b^*(+)$  menunjukkan warna kuning, dan  $b^*(-)$  menunjukkan warna biru. Hasil pengukuran warna produk sebelum dan setelah pemanasan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Perubahan Warna Produk Sebelum dan Setelah Pemanasan

Bahan Substitusi	Produk Bakery	Warna		Referensi
		Adonan	Produk	
Barley	Cookies	$L^* : 80,0 \pm 0,3$ $a^* : 0,39 \pm 0,01$ $b^* : 15,5 \pm 0,2$	$L^* : 64,9 \pm 0,1$ $a^* : 6,6 \pm 0,2$ $b^* : 19,3 \pm 0,3$	(Sharma & Gujral, 2014)
Jinten	Cookies	$L^* : 94,1 \pm 0,3$ $a^* : -0,5 \pm 0,1$ $b^* : 7,3 \pm 0,1$	$L^* : 62,2 \pm 0,7$ $a^* : 7,6 \pm 0,5$ $b^* : 36,8 \pm 0,5$	(Samie <i>et al.</i> , 2010)
Jahe	Cookies	$L^* : 94,0 \pm 0,3$ $a^* : 0,04 \pm 0,0$ $b^* : 9,1 \pm 0,2$	$L^* : 59,8 \pm 1,0$ $a^* : 10,6 \pm 0,05$ $b^* : 36,9 \pm 0,2$	(Samie <i>et al.</i> , 2010)
Jagung ( <i>blue popping corn</i> )	Cookies	$L^* : 40,73 \pm 0,99$ $a^* : 7,89 \pm 0,37$ $b^* : 5,52 \pm 0,16$	$L^* : 42,03 \pm 1,25$ $a^* : 18,75 \pm 0,32$ $b^* : 3,49 \pm 0,16$	(Žilić <i>et al.</i> , 2016)
Jagung ( <i>blue-standard corn</i> )	Cookies	$L^* : 48,28 \pm 2,81$ $a^* : 5,30 \pm 0,42$ $b^* : 16,88 \pm 0,30$	$L^* : 58,85 \pm 1,56$ $a^* : 10,44 \pm 0,31$ $b^* : 15,13 \pm 0,32$	(Žilić <i>et al.</i> , 2016)

Pada Tabel 3., diketahui bahwa terjadi perbedaan warna pada adonan dan produk setelah mengalami proses pemanasan. Perubahan warna tampak jelas pada perubahan nilai  $L^*$ . Hal ini terjadi karena produk mengalami reaksi *Maillard* maupun degradasi pigmen (Wojdyło *et al.*, 2009). Reaksi *Maillard* menghasilkan melanoidin yang berwarna coklat. Warna coklat tersebut yang secara signifikan mempengaruhi tingkat kecerahan produk (Žilić *et al.*, 2016).

Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi stabilitas pigmen yaitu proses pemanasan, paparan oksigen, pH, cahaya, ion logam, enzim, gula dan  $A_w$  (Herbach *et al.*, 2006). Faktor

utama yang paling berpengaruh pada degradasi pigmen yaitu pemanasan, oksigen, dan pH (Patras *et al.*, 2010). Suhu yang baik untuk mempertahankan kestabilan sehingga tidak terjadi degradasi pigmen yaitu pada kisaran suhu 70 hingga 90°C (Patras *et al.*, 2010). Sedangkan nilai pH pada kisaran 3 hingga 7 merupakan nilai optimum untuk mempertahankan stabilitas pigmen (Herbach *et al.*, 2006).

