

**ISOLASI SENYAWA FENOLIK DAN UJI AKTIVITAS
ANTIOKSIDANNYA DALAM BEKATUL TERFERMENTASI
*Rhizopus oryzae***

SKRIPSI

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar sarjana (S.Si.)
Program Studi Kimia pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia Yogyakarta**



Disusun oleh :

IKA RIA INDRIANI

No. Mahasiswa : 16612079

PROGRAM STUDI KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA

YOGYAKARTA

2021

**ISOLASI SENYAWA FENOLIK DAN UJI AKTIVITAS
ANTIOKSIDANNYA DALAM BEKATUL TERFERMENTASI**

Rhizopus oryzae

SKRIPSI

Yang diajukan oleh :

IKA RIA INDRIANI

No. Mahasiswa : 16612079

Telah dipertahankan di hadapan panitia Ujian Skripsi Program Studi Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Tanggal : 20 Januari 2021

Dewan Penguji

Tanda Tangan

1. Dr. Tatang Shabur Julianto, S.Si. M.Si.

2. Dr. Habibi Hidayat, S.Pd., M.Si.

3. Amri Setyawati, S.Si., M.Si.

Mengetahui,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia



Prof. Riyanto, S.Pd., M.Si., Ph.D.

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Wr. Wb

Alhamdulillah hirobbil' alamin, penulis hanturkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan berkah dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul “Isolasi Senyawa Fenolik dan Uji Aktivitas Antioksidannya dalam Bekatul Terfermentasi *Rhizopus oryzae*”. Shalawat dan salam senantiasa tercurahkan kepada *Akhiirul anbiyaa' Nabiyallah* Muhammad SAW beserta keluarga, sahabat dan seluruh pengikutnya hingga akhir zaman.

Skripsi dapat terselesaikan hingga tersusunnya laporan ini, tidak lepas dari bimbingan dan pengarahan berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati, pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Allah SWT dan Rasulullah SAW beserta para pengikutnya
2. Prof. Riyanto S.Pd., M.Si., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia
3. Dr. Dwiarso Rubiyanto, S.Si., M.Si. selaku Ketua Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia
4. Dr. Tatang Shabur Julianto, S.Si., M.Si. selaku Dosen Pembimbing Skripsi yang telah banyak meluangkan waktu untuk membimbing dan mengarahkan penulis selama melakukan perencanaan, penelitian hingga penulisan skripsi ini
5. Bapak, Ibu dan seluruh keluarga besar yang sangat berjasa selama ini mendampingi serta senantiasa memberi dukungan serta tiada hentinya mendoakan
6. Semua teman–teman Ilmu Kimia 2016 dan khususnya Kimia B 2016 yang telah menjadi bagian dari kehidupan perkuliahan dan selalu memberikan semangat dan motivasi
7. Bia, Suci, Sukma, Dhea, Bunda yang telah memberikan memori yang indah selama perkuliahan

8. Wiwik, Laras, Indah, Linda, Indah, Dewi, Opi, Fitria, Cica, Cici dan Roma yang telah membantu mengenai penelitian yang telah dilakukan
9. Segenap civitas laboratorium dan FMIPA UII yang telah banyak membantu dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan dukungan dan motivasinya.

Penulis menyadari bahwa Skripsi ini masih harus disempurnakan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran dari semua pihak guna penyempurnaan di masa mendatang. Akhir kata dengan segala harapan dan doa semoga laporan ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya maupun pembaca pada umumnya.

Aamiin Ya Rabbal'alamiin

Wassalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh.

Yogyakarta, Januari 2021

Ika Ria Indriani

DAFTAR ISI

Halaman Sampul	i
Halaman Pengesahan	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
INTISARI	Error! Bookmark not defined.
ABSTRACT	Error! Bookmark not defined.
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TUNJAUAN PUSTAKA	4
BAB III DASAR TEORI	11
3.1 Bekatul.....	11
3.2 Antioksidan.....	12
3.1 Senyawa Fenolik.....	18
3.4 Fermentasi.....	20
3.5 Jamur <i>Rhizopus Oryzae</i>	22
3.6 <i>Gas Chromatography-Mass Spectroscopy</i> (GC-MS).....	23
3.7 Spektrofotometer UV-Vis.....	24
3.8 Metode DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazil).....	25
BAB IV METODE PENELITIAN	27
4.1 Alat dan Bahan.....	27
4.1.1 Alat.....	27
4.1.2 Bahan.....	27
4.2 Prosedur Kerja.....	27
4.2.1 Sterilisasi Alat.....	27

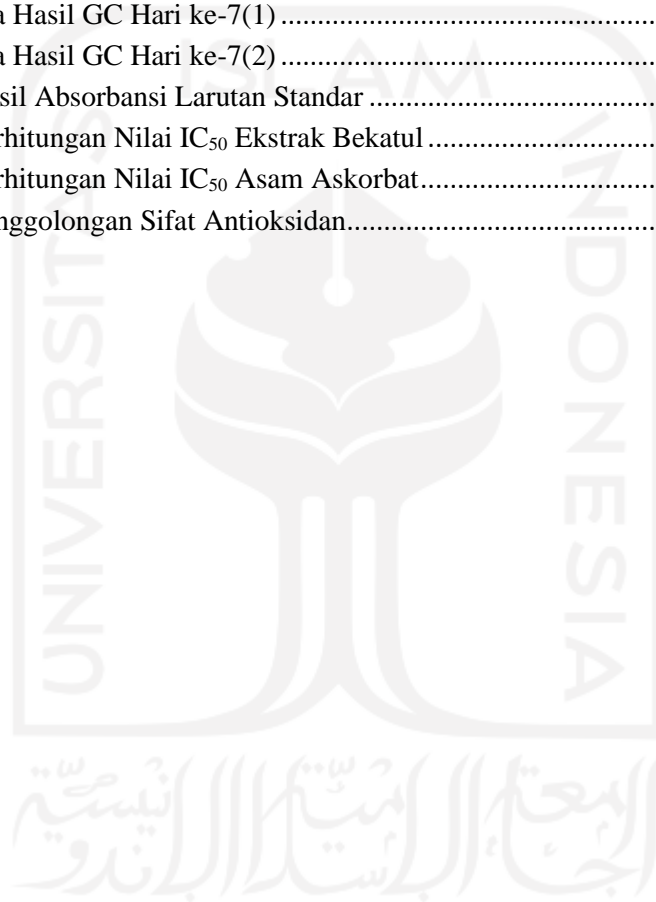
4.2.2	Pertumbuhan Jamur dalam Media PDA.....	27
4.2.3	Pembuatan pH Buffer <i>Rhizopus oryzae</i>	28
4.2.4	Pembuatan PDB (<i>Potato Dextrose Broth</i>).....	28
4.2.5	Pertumbuhan <i>Rhizopus oryzae</i>	29
4.2.6	Pembuatan Standar McFarland 0,5.....	29
4.2.7	Pengenceran Jamur.....	29
4.2.8	Fermentasi Bekatul.....	30
4.2.9	Ekstraksi Cair-cair.....	30
4.2.10	Analisis hasil ekstraksi dengan GC-MS	30
4.2.11	Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH.....	31
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....		34
5.1	Sterilisasi Alat	34
5.2	Pertumbuhan Jamur <i>Rhizopus oryzae</i> dalam media PDA dan PDB	35
5.3	Fermentasi Bekatul dengan Varasi Waktu	39
5.4	Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Fenolik	47
5.4.1	Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	48
5.4.2	Pengukuran Kurva Standar DPPH	49
5.4.3	Pengukuran Aktivitas Antioksidan Sampel Bekatul	50
5.4.4	Mekanisme Reaksi Senyawa Fenolik dengan DPPH.....	54
PENUTUP.....		59
6.1	Kesimpulan.....	59
6.2	Saran.....	59
DAFTAR PUSTAKA.....		60
LAMPIRAN.....		66
	Lampiran 1. Prosedur Kerja	67
	Lampiran 2. Perhitungan	76
	Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian	82

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur Senyawa Fenolik dalam Bekatul (Zhuang et al., 2019)	1
Gambar 2. Representasi Struktur Senyawa Fenolik dalam Tumbuhan.....	2
Gambar 3. Struktur Senyawa Fenolik (Ozcan & Delikanli, 2014)	8
Gambar 4. Jalur Pembentukan Senyawa Fenolik (Taiz & Zeiger, 2015)	8
Gambar 5. Struktur beras	11
Gambar 6. Sporangium dan sporangiofor <i>Rhizopus oryzae</i>	23
Gambar 7. Struktur DPPH	26
Gambar 8. Hasil Fermentasi 2,5 dan 7 hari (dari kiri ke kanan).....	40
Gambar 9. Hasil GC pada hari ke-2(1)	41
Gambar 10. Hasil GC hari ke-2(2).....	42
Gambar 11. Hasil GC Hari ke-5(1).....	43
Gambar 12. Hasil GC Hari ke-5(2).....	43
Gambar 13. Hasil GC Hari ke-7(1).....	44
Gambar 14. Hasil GC Hari ke-7(2).....	44
Gambar 15. Base Peak Line 2.....	45
Gambar 16. Struktur <i>2-Tert-Butyl-4,6-Bis(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxybenzyl) Phenol</i> (Senyawa A).....	46
Gambar 17. Struktur <i>4-Bromo-2,6-Bis(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxybenzyl) Phenol</i> (Senyawa B)	46
Gambar 18. Panjang Gelombang Maksimum DPPH.....	49
Gambar 19. Kurva Standar DPPH	50
Gambar 20. Grafik Hubungan Konsentrasi dan % Inhibisi Ekstrak Bekatul.....	51
Gambar 21. Grafik Hubungan Konsentrasi dan % Inhibisi Asam Askorbat	53
Gambar 22. Reaksi Umum DPPH dan Antioksidan	54
Gambar 23. Reaksi Fenolik Terhadap DPPH	55
Gambar 24. Mekanisme Reaksi Senyawa A dengan DPPH	57

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Kandungan Zat Gizi Bekatul	12
Tabel 2. Absorbansi Pengenceran Jamur	38
Tabel 3. Konsentrasi Standar McFarland.....	39
Tabel 4. Data GC Hari ke-2(1).....	42
Tabel 5. Data GC Hari ke-2(2).....	42
Tabel 6. Data Hasil GC Hari ke-5(1)	43
Tabel 7. Data Hasil GC Hari ke-5(2)	43
Tabel 8. Data Hasil GC Hari ke-7(1)	44
Tabel 9. Data Hasil GC Hari ke-7(2)	44
Tabel 11. Hasil Absorbansi Larutan Standar	49
Tabel 12. Perhitungan Nilai IC_{50} Ekstrak Bekatul	50
Tabel 13. Perhitungan Nilai IC_{50} Asam Askorbat.....	52
Tabel 14. Penggolongan Sifat Antioksidan.....	54



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Prosedur Kerja.....	67
Lampiran 2. Perhitungan.....	76
Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian.....	82



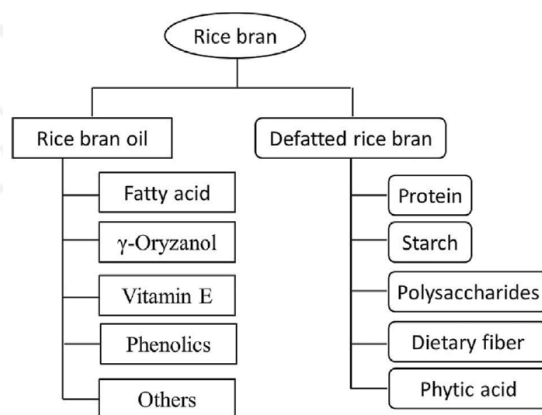
BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

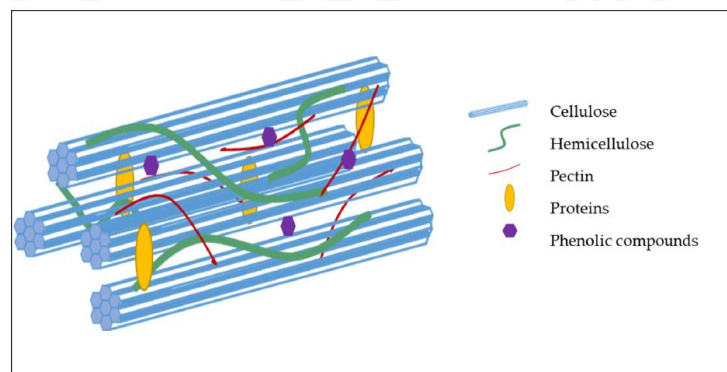
Padi merupakan komoditas tanaman pangan utama di Indonesia, karena sebagian besar penduduk Indonesia mengkonsumsi beras sebagai bahan makanan pokok. Dalam beras terdapat kandungan karbohidrat dan gizi lainnya. Dalam proses penggilingan beras terdapat produk samping yang dapat menjadi sumber makanan yang sehat kaya serat, disebut dedak halus yang sering disebut juga dengan bekatul. Menurut *Food and Agriculture Organization* (FAO), bekatul merupakan hasil samping proses penggilingan padi yang sebenarnya merupakan selaput inti biji padi. Perbedaan antara dedak padi dengan bekatul adalah dedak padi lebih dikenal masyarakat sebagai dedak kasar yang dihasilkan pada proses penyosohan pertama, sedangkan untuk proses penyosohan kedua disebut dengan dedak halus, yakni bekatul tersebut.

Menurut Badan Pusat Statistik (2015) di Indonesia produksi gabah keringnya sebanyak 70,83 juta ton sedangkan produksi bekatul pada tahun 2014 berkisar 6,2-7,4 juta ton per tahun. Berikut struktur bekatul yang terdapat di dalam beras dapat dilihat pada Gambar 1:



Gambar 1. Struktur Senyawa Fenolik dalam Bekatul (Zhuang *et al.*, 2019)

Selain karbohidrat, bekatul juga memiliki kandungan senyawa bioaktif yang dapat digunakan sebagai pencegah penyakit degeneratif. Salah satunya adalah senyawa antioksidan fenolik yang merupakan senyawa bioaktif yang banyak ditemukan di dalam bekatul. Dalam Hanin & Pratiwi (2017) disebutkan bahwa senyawa fenolik merupakan senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan sebagai respons terhadap stres lingkungan. Senyawa fenolik berfungsi sebagai pelindung terhadap sinar UV-B dan kematian sel untuk melindungi DNA dari dimerisasi dan kerusakan. Komponen pada senyawa ini diketahui memiliki peranan penting sebagai agen pencegah dan pengobatan beberapa gangguan penyakit seperti arteriosklerosis, disfungsi otak, diabetes dan kanker. Menurut Bhat *et al.* (2020) senyawa fenolik telah ditemukan terdiri dari antosianidin, asam ferulat dan diferulat, antosianin dan polimerik. Senyawa Fenolik bertindak sebagai antioksidan karena menjadi agen pereduksi yang kemampuannya digunakan untuk menyumbangkan atom hydrogen, selain itu juga bertindak sebagai pemadam oksigen tunggal dan donor hidrogen radikal bebas. Keberadaan senyawa fenolik dapat digambarkan dalam representasi struktur berikut (Holland *et al.*, 2020):



Gambar 2. Representasi Struktur Senyawa Fenolik dalam Tumbuhan

Penelitian yang dilakukan oleh Fikriyah (2018) dilakukan fermentasi menggunakan *Rhizopus oryzae* dalam bekatul dengan variasi konsentrasi (1:1, 1:2 dan 1:3) dan waktu fermentasi 72 hingga 120 jam. Variasi waktu fermentasi yang digunakan berpengaruh terhadap nilai aktivitas antioksidan bekatul yang difermentasi oleh *Rhizopus oryzae*. Pada penelitian tersebut didapatkan nilai aktivitas antioksidan tertinggi diperoleh pada perlakuan lama fermentasi 5 hari

dengan konsentrasi substrat 1;1 sebesar 13,37%, sedangkan nilai aktivitas antioksidan terendah diperoleh pada perlakuan lama fermentasi 3 hari dengan konsentrasi substrat (1:3) sebesar 0,08%. Hal ini menunjukkan adanya pengaruh penggunaan jamur dan variasi waktu dalam proses fermentasi.

Penggunaan jamur dengan genus *Rhizopus* merupakan suatu hal yang menjanjikan dalam proses fermentasi. Jamur dari genus ini diindikasikan untuk tidak memproduksi zat beracun (Oliveira *et al.*, 2012). Selain itu *Rhizopus oryzae* mampu meningkatkan kadar total senyawa fenolik yang terikat dalam serat bekatul. Hal ini dikarenakan *Rhizopus oryzae* mengandung enzim selulase yang dapat membuka dan menghidrolisis serat selulosa menjadi rantai oligosakarida yang lebih sederhana, sehingga ikatan bioaktif senyawa fenolik yang terikat diantara selulosa akan melemah dan terlepas. Potensi tersebutlah yang menjadikan *Rhizopus oryzae* digunakan dalam penelitian ini.

Berdasarkan latar belakang di atas, maka penelitian ini perlu dilakukan untuk mengetahui kondisi optimum jamur *Rhizopus oryzae* dalam menghidrolisis serat bekatul pada proses fermentasi. Kondisi optimum tersebut dapat dilihat pada waktu divariasikan. Oleh sebab itu dilakukannya penelitian ini untuk melihat tingkat aktivitas antioksidan dalam ekstrak bekatul yang diduga sebagai senyawa fenolik melalui fermentasi dengan metode DPPH sebagai radikal bebas yang stabil.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana aktivitas antioksidan senyawa fenolik yang terkandung dalam bekatul secara fermentasi menggunakan jamur *Rhizopus oryzae*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian yaitu untuk mengetahui senyawa fenolik yang terkandung di dalam sampel bekatul beserta aktivitas antioksidannya.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat tentang senyawa fenolik yang terkandung di dalam bekatul yang ternyata mempunyai aktivitas antioksidan. Sehingga masyarakat juga lebih bijak dalam memanfaatkan bekatul selain dari pakan ternak.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Yosmar *et al.*, (2018) menyatakan bahwa jamur *Rhizopus oryzae* mampu menghasilkan enzim selulase. Hal tersebut ditunjukkan oleh hasil penelitiannya yaitu dengan mengamati terbentuknya zona bening pada media CMCA (*Carboxy Methyl Cellulosa Agar*). Zona bening yang telah terbentuk pada isolat *Rhizopus oryzae* tersebut sebesar 2,4 cm, sehingga dapat disimpulkan bahwa dapat dihasilkan enzim selulase dari isolat *Rhizopus oryzae* ditandai dengan terbentuknya zona bening yang merupakan gula sederhana hasil hidrolisis dari enzim selulase terhadap rantai panjang selulosa pada media CMCA.

Schmidt *et al.*, (2014) telah melakukan penelitian tentang peningkatan kandungan senyawa fenolik pada bekatul dengan metode fermentasi oleh mikroorganisme berupa jamur *Rhizopus oryzae*. Konsentrasi senyawa fenolik setelah dilakukan fermentasi meningkat hingga 2 kali lipat dengan nilai 765 mg/g. Oleh sebab itu, fermentasi sering digunakan untuk meningkatkan kandungan senyawa fenolik pada suatu bahan alam dalam peningkatan aktivitas antioksidan. Menurut Razak, *et al.*, (2014) kandungan fenolik dalam bekatul tersebut akan memberikan korelasi terhadap aktivitas antioksidan yang dihasilkan.

Penelitian lain juga dilakukan oleh Oliveira, *et al.*, (2012) yang menyelidiki kandungan total senyawa fenolik dan aktivitas antioksidan dalam dedak padi yang difermentasi untuk mengetahui efek fermentasi keadaan padat terhadap sifat-sifat ini. Proses dilakukan menggunakan Jamur *Rhizopus oryzae* CTT 1217 dalam reaktor baki pada 30°C selama 120 jam. Sampel dedak beras fermentasi dikumpulkan setiap 24 jam. Sifat antioksidan dianalisis dengan metode *scavenging radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* dan melalui penghambatan oksidasi enzimatis dan peroksidasi lipid dari minyak zaitun. Ekstrak metanol dari biomassa yang diperoleh pada 96 jam fermentasi mengaktifkan 50% radikal bebas dalam waktu 15 menit. Ekstrak yang sama mengurangi nilai peroksida dalam minyak zaitun sebesar 57% setelah 30 hari penyimpanan. Ekstrak air dari biomassa yang

diperoleh pada 120 jam adalah penghambat paling efisien dari reaksi penggelapan yang dikatalisis oleh peroksidase.

Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Ardiansyah *et al.*, (2018) Penentuan Aktivitas Antioksidan dalam Bekatul Indonesia yang Terfermentasi oleh *Rhizopus oligosporus* dengan varietas jenis jamur dan variasi waktu fermentasi. Varietas jamur yang digunakan adalah Sintanur dan Inpari 24 dan untuk waktu fermentasi yang digunakan adalah 0, 48, 72 dan 96 jam dalam penentuan TPC dan aktivitas antioksidan. TPC yang terfermentasi oleh bekatul dianalisis menggunakan Metode Follin-Ciocalteu dan aktivitas antioksidannya digunakan metode DPPH untuk penangkapan radikal bebas. Dari hasil penelitian tersebut didapatkan hasil optimum dari proses fermentasi untuk penentuan TPC dan aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH pada varietas Inpari 24 dengan waktu fermentasi 24 jam. Dari penelitian tersebut ditarik kesimpulan terdapat juga pengaruh waktu fermentasi dan jenis jamur yang digunakan. Penelitian tersebut menggunakan jenis jamur *Rhizopus oligosporus*, dan ada kemungkinan jamur *Rhizopus oryzae* juga memiliki pengaruh pada aktivitas antioksidan dalam proses fermentasi yang akan dilakukan, mengingat keduanya termasuk dalam genus yang sama.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Razak *et al.*, (2015) tentang pengaruh fermentasi solid-state menggunakan beberapa jenis jamur pada kadar asam fenoladan aktivitas antioksidan dedak padi yang ditentukan dan dibandingkan dengan metode non-fermentasi. Substrat difermentasi dengan tunggal dan kultur campuran dari dua jenis jamur: *Rhizopus oligosporus* dan *Monascus purpureus*. *Total Phenolic Compound* (TPC), ditentukan dengan menggunakan metode Folin-Ciocalteu, meningkat setelah fermentasi. Analisis aktivitas antioksidan menggunakan metode *Ferric Reduction Ability Of Plasma* (FRAP) yang menunjukkan kecenderungan yang sama dengan TPC, artinya, aktivitas antioksidan meningkat pada semua sampel yang difermentasi. Berbeda dengan Tes TPC dan FRAP, penangkapan radikal DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) pada aktivitas sampel yang difermentasi menunjukkan peningkatan yang tidak signifikan atau aktivitas berkurang. Kandungan senyawa fenolik dalam ekstrak metanol bekatul hasil fermentasi, ditentukan dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja

Tinggi (KCKT/HPLC), umumnya menunjukkan peningkatan signifikan pada *ferulic acid, sinapic, vanillic, caffeic, syringic, dan 4-hydroxybenzoic*. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa aktivitas antioksidan dan fenolik secara keseluruhan kandungan bekatul dapat ditingkatkan dengan fermentasi keadaan padat menggunakan jamur. Dalam penelitian ini penggunaan metode DPPH menghasilkan aktivitas antioksidan yang kurang baik.

Kemudian Razak *et al.*, (2021) melakukan penelitian kembali yang berjudul “Aktivitas antioksidan, aktivitas penghambatan tirosinase dan senyawa bioaktif kandungan *broken rice* yang difermentasi dengan *Amylomyces rouxii*”. Penelitian tersebut dilakukan *Solid State Fermentation* (SSF) dengan memanfaatkan jamur berserabut *Amylomyces rouxii* yang diselidiki sebagai strategi bio-processing untuk meningkatkan sifat bioaktif yang terdapat dalam *broken rice*. Fermentasi dilakukan selama 18 hari dan sampel ditarik pada 2 hari selang fermentasi berlangsung. Metode yang digunakan untuk menilai perubahan dalam sifat bioaktif dan kandungan senyawa dalam *broken rice* yang difermentasi. Sifat bioaktif yang dipelajari adalah *Total Phenolic Compound* (TPC), *Total Flavonoid Compound* (TFC), aktivitas penangkapan radikal DPPH dan *Ferric Reduction Antioxidant Power* (FRAP). Selain itu, penghambatan aktivitas tirosinase, yang mewakili sifat anti-pigmentasi/pencoklatan, dievaluasi. Kadar senyawa fenolik dan asam organik ditentukan melalui Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Hasil penelitian menunjukkan bahwa fermentasi sangat nyata meningkatkan kadar fenolik total beras pecah dari 0,03 mg *Gallic Acid Equivalent* (GAE)/g sampel menjadi 3,94 mg GAE/g sampel dan total kandungan flavonoid dari 0,04 hingga 1,71 mg Quercetin Equivalent (QE)/g sampel. Pada akhir fermentasi, peningkatan DPPH-radikal pemulungan beras pecah fermentasi meningkat menjadi 94,22%, dibandingkan dengan 9,03% pada sampel yang tidak difermentasi. Diamati juga FRAP dan aktivitas penghambatan tirosinase *broken rice* yang difermentasi meningkat menjadi 39 kali lipat dan 50 kali lipat, masing-masing. Asam kojic, antioksidan kuat dan penghambat tirosinase, terdeteksi pada *broken rice* yang difermentasi, bersama dengan asam oksalat dan asam askorbat. *Gallic, protocatechuic acid dan 4-hydroxybenzoic* ditingkatkan setelah fermentasi. Penelitian ini memantapkan

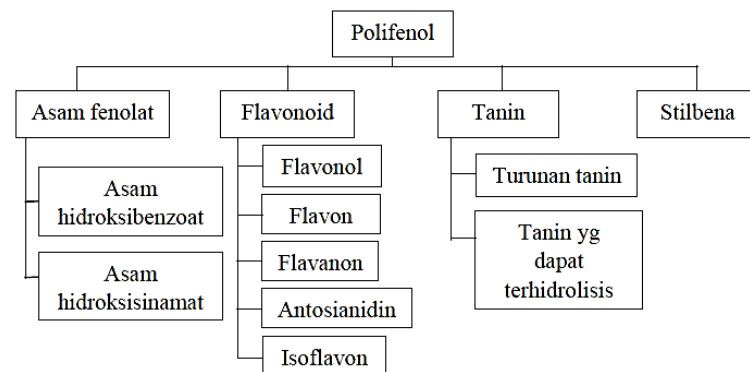
efek positif dari *broken rice* setelah fermentasi dengan *A. rouxii* dan dengan demikian mengungkap potensi beras pecah yang difermentasi sebagai bahan nabati alami yang menjanjikan produk makanan, kosmetik dan obat-obatan. Dapat ditarik kesimpulan bahwa metode DPPH yang sebelumnya (2015) kurang efektif untuk penentuan aktivitas antioksidan dalam fermentasi, Razak pada 2021 telah membuktikan bahwa metode DPPH efektif digunakan untuk penentuan aktivitas antioksidan.

Senyawa fenolik yang terdapat di dalam bekatul terdiri dari antosianidin, asam ferulat, diferulat, antosianin dan *polimeric proanthocyanidins*. Antosianin terletak di lapisan dedak inti padi, sedangkan asam fenolat terutama terdapat di lapisan dedak padi, yang ada sebagai bentuk bebas, terkonjugasi, dan terikat. Terus masuk melihat beberapa manfaat kesehatan yang terkait dengan bahan fungsional, seperti anti-inflamasi, efek antioksidan dan antikanker, beras berpigmen dianggap sebagai pangan fungsional dan pangan bahan di banyak negara Asia (Bhat *et al.*, 2020). Dedak padi juga memiliki kandungan fenolik yang lebih tinggi daripada dedak gandum (Lai *et al.*, 2009). Senyawa fenolik yang terdapat di dalam tumbuhan termasuk ke dalam kelompok yang secara kimiawi heterogen, hamper 10.000 berupa senyawa tunggal:

1. Senyawa fenolik yang larut dalam pelarut organik
2. Senyawa fenolik yang berupa asam-asam karboksilat dan glikosida yang larut dalam air
3. Senyawa fenolik yang merupakan polimer tidak larut berukuran besar

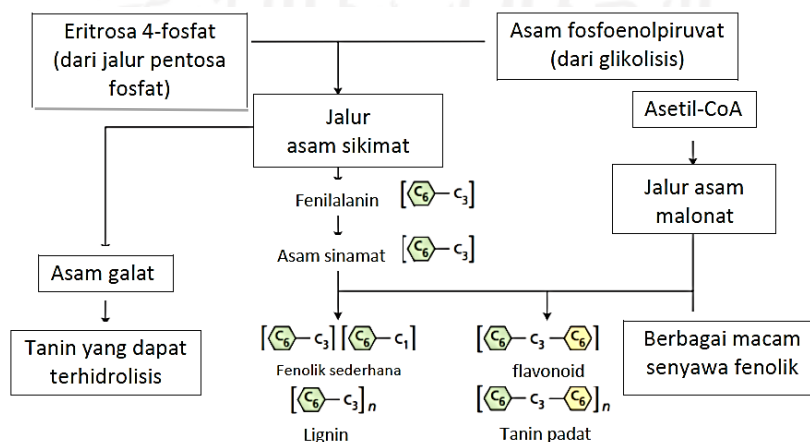
Senyawa fenolik terdiri dari beberapa kelompok, yaitu: flavonoid sederhana, asam-asam fenolat, flavonoid kompleks, dan antosianin. Senyawa fenolik yang terdapat di dalam tumbuhan biasanya dikaitkan dengan respon pertahanan tumbuhan. Selain itu, senyawa fenolik juga berperan penting dalam mekanisme lain: aktran zat untuk mempercepat polinasi, warna untuk kamuflase dan pertahanan hidup tumbuhan dari herbivor, serta aktivitas antifungi dan antibakteri (Alasalvar *et al.*, 2001).

Senyawa fenolik memiliki ciri terdapat cincin aromatik dan penggantian satu atau lebih gugus hidroksil, dimulai dari molekul sederhana hingga sangat kompleks (Lin *et al.*, 2016). Senyawa fenolik secara sederhana dapat dikelompokkan menjadi beberapa kelas seperti pada gambar 3 berikut:



Gambar 3. Struktur Senyawa Fenolik (Ozcan & Delikanli, 2014)

Biosintesis pada senyawa fenolik dapat melalui dua jalur, yaitu jalur asam sikimat dan jalur asam malonat. Pada jalur asam sikimat digunakan dalam sintesis kelompok tannin yang dapat terhidrolisis dan senyawa-senyawa berbasis asam amino fenilalanin, misalnya lignin. Jalur asam malonat memanfaatkan asetil-koA sebagai bahan utamanya. Meskipun bukan merupakan jalur utama, namun senyawa intermediet dibutuhkan dalam proses sintesis berbagai metabolisme sekunder dengan penggabungan produk senyawa intermediet dari jalur asam sikimat, misalnya dalam pembentuk kelompok flavonoid atau tannin yang tidak mudah terhidrolisis.



Gambar 4. Jalur Pembentukan Senyawa Fenolik (Taiz & Zeiger, 2015)

Senyawa fenolik pada tumbuhan disintesis melalui beberapa jalur (lihat Gambar 4). Pada tumbuhan tingkat tinggi, mayoritas senyawa fenolik merupakan turunan dari senyawa besar fenilalanin, suatu produk yang dihasilkan dari jalur asam sikimat. Formula dalam kurung mengindikasikan susunan dasar kerangka dari karbon: C_6 menunjukkan cincin benzena, sedangkan C_3 merupakan rantai tiga karbon.

Kategori kedua dari senyawa fenolik pada tumbuhan yang memiliki sifat seperti pertahanan selain lignin adalah tannin. Senyawa ini merupakan senyawa yang memiliki potensi toksik umumnya bersifat dapat mereduksi pertumbuhan dan kehidupan herbivor ketika dimakan. Selain itu tannin juga berperan sebagai penolak berbagai jenis hewan. Seperti hewan mamalia, contohnya sapi, rusa dan kera secara khusus menghindari tumbuhan yang memiliki kandungan tannin yang tinggi. Contoh lain adalah buah yang belum matang misalnya, seringkali mengandung kadar tannin yang cukup tinggi, yang fungsinya adalah mencegah hewan untuk memakan buah tersebut sampai biji buah cukup matang untuk disebarkan. Jenis herbivor yang biasanya memakan tumbuhan yang mengandung tannin cukup tinggi telah mampu beradaptasi untuk menghilangkan kadar tannin tersebut dari dalam pencernaannya. Tannin pada tumbuhan juga berfungsi sebagai pertahanan tumbuhan terhadap mikroorganisme (Anggraito *et al.*, 2018).

Seiring dengan berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi, senyawa metabolit sekunder diproduksi untuk kebutuhan manusia misal di bidang kesehatan seperti antioksidan, antikanker dan antimalarial. Senyawa fenolik yang dimanfaatkan sebagai antioksidan biasanya menggunakan metode DPPH. Metode DPPH merupakan metode yang didasarkan pada kemampuan senyawa antioksidan mendonorkan atom hidrogen dalam menghambat radikal bebas. Metode ini digunakan dalam penelitian ini karena sesuai dengan mekanisme reaksi yang terjadi pada kemampuan senyawa fenolik sebagai aktivitas antioksidan. Senyawa fenolik mampu mendonorkan atom hidrogen pada mekanisme *radical scavenging*-nya.

Reaktivitas pada radikal bebas berkaitan dengan kemampuan mencari pasangan elektron. Sebagai efek dari radikal bebas tersebut, terbentuk radikal bebas

baru yang berasal dari atom dalam molekul yang elektronnya diambil untuk berpasangan dengan radikal bebas sebelumnya. Tetapi, apabila dua senyawa radikal bebas bertemu, electron-elektron tidak berpasangan yang berasal dari kedua senyawa tersebut akan bergabung sehingga membentuk ikatan kovalen yang kuat. Kemudian sebaliknya, jika senyawa radikal bebas dan senyawa bukan radikal bebas saling bertemu, akan terjadi 3 kemungkinan:

1. Radikal bebas memberikan electron yang tidak berpasangan dan berperan sebagai reduktor terhadap senyawa bukan radikal bebas
2. Radikal bebas menerima electron dan berperan sebagai oksidator dari senyawa yang bukan radikal bebas.
3. Radikal bebas bergabung dengan senyawa bukan radikal bebas dan membentuk kompleks senyawa baru (Halliwell, et al., 1992) dalam (Winarsi, 2007).

Mekanisme reaksi yang ke-2 merupakan mekanisme reaksi ini yang terjadi pada senyawa fenolik dan senyawa radikal bebasnya. Dan mekanisme reaksi tersebut cocok dengan prinsip utama metode DPPH, yaitu pendonoran electron hidrogen untuk senyawa radikal bebas.

Dalam penelitian ini digunakan senyawa pembanding sebagai indikator keberhasilan yang mengacu pada kontrol positif aktivitas antioksidan senyawa fenolik. Senyawa pembanding yang digunakan adalah asam askorbat. Dipilihnya metode ini karena mempunyai mekanisme reaksi yang sama dengan mekanisme antioksidan pada senyawa fenolik. Sehingga untuk pengukuran data absorbansi sampai pada perhitungan IC_{50} dapat dibandingkan.

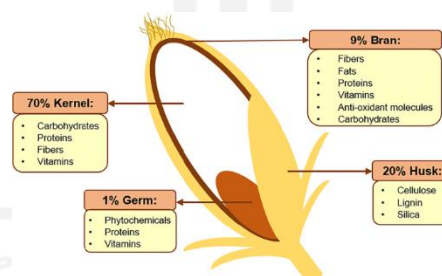
Nilai IC_{50} merupakan nilai konsentrasi yang dapat menyebabkan hilangnya 50% aktivitas DPPH (Molyneux, 2004). Efisiensi aktivitas dari senyawa-senyawa murni ataupun ekstrak dapat diukur berdasarkan nilai IC_{50} . Semakin kecil nilai IC_{50} , menunjukkan aktivitas antioksidan yang semakin kecil. Kriteria dari suatu senyawa dapat dikatakan sebagai antioksidan yang sangat kuat apabila nilai $IC_{50} < 50$ ppm, dikatakan sangat kuat apabila IC_{50} 50-100 ppm, dikatakan lemah apabila IC_{50} 100-150 dan dikatakan sangat lemah apabila 150-200 ppm (Molyneux, 2004).

Nilai IC_{50} dari senyawa fenolik dibandingkan dengan asam askorbat sebagai kontrol positif yang secara umum telah digunakan lebih luas sebagai senyawa antioksidan dalam bidang kesehatan. Perbandingan tersebut untuk melihat seberapa bagus senyawa fenolik dapat digunakan sebagai antioksidan.

BAB III DASAR TEORI

3.1 Bekatul

Bekatul atau *rice bran* merupakan hasil samping proses penggilingan padi berasal dari lapisan kulit paling luar dari beras yaitu bagian antara butir beras dan kulit padi. Warna bekatul padi bervariasi dari coklat muda hingga coklat tua. Bekatul yang dihasilkan dari penggilingan padi dapat mencapai 8-12% dari jumlah total padi. Hasil samping lainnya adalah 15-20% sekam yang merupakan kulit luar dan 3% menir (Pascapanen Litbang Pertanian, 2020), yaitu bagian yang hancur. Struktur dari beras dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Struktur beras

Sumber : <https://link.springer.com/article/10.1007/s13399-020-00846-3>

Dalam jurnal Issara & Rawdkuen (2016) disebutkan bahwa bekatul (*Rice Bran*) diidentifikasi sebagai produk sampingan dari limbah pertanian. Saat ini, sudah banyak dipelajari dan diterapkan dalam industri makanan karena mempromosikan nutrisi tinggi (terutama, protein, lipid, vitamin dan mineral) dan kaya akan sumber utama senyawa fitokimia. Selanjutnya bekatul mempersembahkan beberapa hal menarik yang berkhasiat untuk kesehatan manusia seperti antioksidan, antibiotik sekaligus anti kolesterol. Saat ini, bekatul telah digunakan untuk pakan ternak, ekstraksi minyak dedak padi, produksi lilin, dan

digunakan sebagai bahan makanan. Produk ini adalah dihasilkan dari ekstraksi dedak padi yang stabil dapat digunakan untuk makanan manusia; saat ini, sudah pasti digunakan untuk produk yang dipanggang, sumber energi, dan protein fortifikasi formulasi minuman bubuk. Ada beberapa negara yang lebih mempertimbangkan untuk meningkatkan nilai BPR (*Business Process Reengineering*) sebesar mengembangkan bekatul secara utuh untuk berbagai produk makanan. Satu produk terbuat dari BPR utuh agar sehat minuman yang menarik karena bisa menjadi alternatif pasar minuman untuk kesehatan konsumen. Bekatul mengandung berbagai zat gizi, seperti yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan Zat Gizi Bekatul (Mazza, 1998)

No	Zat gizi	Kadar
1	Protein	11,5-17,2 %
2	Lipid	10-23 %
3	Karbohidrat	51,1-55 %
4	Serat	6,2-31,5 %
5	Abu	8-17,1 %
6	Mineral dan vitamin	Sisa

3.2 Antioksidan

Antioksidan adalah zat yang dapat melawan pengaruh bahaya dari radikal bebas atau *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang terbentuk sebagai hasil dari metabolisme oksidatif yaitu hasil dari reaksi-reaksi kimia dan proses metabolik yang terjadi dalam tubuh. Senyawa antioksidan dapat berfungsi sebagai penangkap radikal bebas, pembentuk kompleks dengan logam-logam prooksidan dan berfungsi sebagai senyawa pereduksi (Rajeshwar *et al.*, 2005). Menurut (Miller *et al.*, 2000), antioksidan dapat menangkap radikal bebas sehingga menghambat mekanisme oksidatif yang merupakan penyebab penyakit- penyakit degeneratif seperti penyakit jantung, kanker, katarak, disfungsi otak dan artritis. Radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih atom yang tidak berpasangan. Meskipun suatu radikal tidak bermuatan positif atau negatif, spesi semacam ini sangat reaktif karena adanya elektron yang tidak berpasangan dalam mencapai kestabilan atom-atom molekul, radikal bebas akan bereaksi dengan molekul di sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron. Reaksi ini akan terus-menerus

berlangsung dalam tubuh, dan apabila tidak segera dihentikan akan menyebabkan timbulnya berbagai penyakit, seperti kanker, katarak, dan berbagai penyakit degeneratif lainnya.

Berdasarkan sumbernya antioksidan dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetis. Antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami) secara toksikologi lebih aman untuk dikonsumsi dan lebih mudah diserap oleh tubuh daripada antioksidan sintetis. Salah satu antioksidan alami adalah vitamin C (L-asam askorbat). Vitamin C secara efektif menangkap radikal-radikal dan juga berperan dalam regenerasi vitamin E. Vitamin C dapat melindungi membrane biologis dan LD dari kerusakan prooksidatif dengan cara mengikat radikal peroksil dalam fase berair dari plasma atau sitosol. Antioksidan sintetis (antioksidan yang diperoleh hasil sintesis). Beberapa contoh antioksidan sintetis yang diizinkan penggunaannya untuk makanan dan penggunaannya telah sering digunakan, yaitu BHT, TBHQ dan tokoferol (Kesuma, 2015).

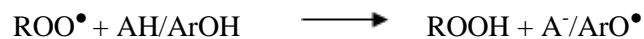
Menurut Hudson (1990) Antioksidan dapat juga digolongkan menjadi antioksidan primer (*Chainbreaking antioxidant*) dan antioksidan sekunder (*preventive antioxidant*). Antioksidan primer dapat bereaksi dengan radikal lipid dan mengubahnya menjadi bentuk yang lebih stabil. Sebuah senyawa dapat disebut sebagai antioksidan primer apabila senyawa tersebut dapat mendonorkan atom hidrogennya dengan cepat ke radikal lipid dan radikal antioksidan yang dihasilkan lebih stabil dari radikal lipid atau dapat diubah menjadi produk lain yang lebih stabil. Senyawa yang termasuk dalam kelompok antioksidan primer (*Chain-breaking antioxidant*) adalah vitamin E (tokoferol), vitamin C (asam askorbat), β -karoten, glutathione dan sistein.

Antioksidan sekunder berfungsi sebagai antioksidan pencegah yaitu menurunkan kecepatan inisiasi dengan berbagai mekanisme, seperti melalui pengikatan ion-ion logam, penangkapan oksigen dan penguraian hidroperoksida menjadi produk-produk nonradikal. Pada dasarnya tujuan antioksidan sekunder (*preventive antioxidant*) adalah mencegah terjadinya radikal yang paling berbahaya yaitu radikal hidroksil. Contoh antioksidan sekunder antara lain turunan-

turunan asam fosfat, asam askorbat, senyawa karoten, sterol, fosfolipid dan produk-produk reaksi maillard (Hudson, 1990).

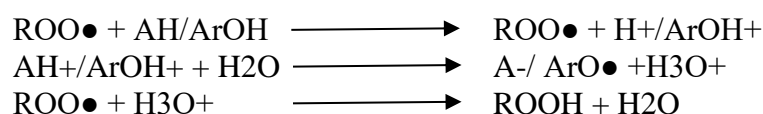
Bekatul mengandung antioksidan dalam jumlah besar dari golongan senyawa fenolik seperti asam galat, *protocatechuic*, *chlorogenic*, *p-hydroxybenzoic*, *caffeic*, *syringic*, vanilin, *p-coumaric* dan asam ferulat (Schmidt *et al.*, 2014). Senyawa fenolik pada sereal sebagian besar dalam bentuk terikat melalui ikatan ester dengan rantai arabinosylyan atau melalui obligasi eter untuk lignin (Hole *et al.*, 2012).

Secara umum, mekanisme antioksidan dapat digolongkan kepada dua macam, yaitu Hidrogen Elektron Transfer (HAT) dan Elektron Transfer (ET). Reaksi HAT ini didasarkan pada reaksi kinetik yang menyebabkan reaksi kompetitif antara antioksidan dan substrat yang saling bersaing untuk membentuk radikal peroksil melalui proses dekomposisi senyawa azo (Huang, 2005). Seperti yang diungkapkan oleh (Apak, *et al.*, 2013) HAT dapat digunakan untuk mengukur seberapa besar kemampuan senyawa antioksidan dalam menghambat radikal bebas (radikal peroksil) menggunakan donor atom hidrogen. Misalnya, atom hidrogen yang berasal dari fenol (Ar-OH) ditransfer pada radikal ROO, reaksi yang terjadi sebagai berikut:



Reaksi ariloksi (ArO[•]) dibentuk dari reaksi yang terjadi antara antioksidan fenol dengan peroksil radikal. Oksidan dan antioksidan bereaksi dengan ROO[•], kemudian aktivitas antioksidan dapat diukur dari hasil kompetisi kinetik dengan cara mengukur penghilangan warna oksidan yang digantikan dengan kehadiran antioksidan (Huang, 2005).

Mekanisme ET didasarkan pada reaksi redoks. Metode ini biasanya digunakan untuk mengukur kapasitas antioksidan yang bisa ditandai dengan adanya perubahan warna karena terjadinya reaksi reduksi. Mekanisme reaksi ET biasanya berjalan lebih lambat dibandingkan dengan reaksi HAT dan juga dipengaruhi oleh jenis



pelarut dan kondisi pH (Arifin *et al.*, 2019). Menurut Ou (2002), mekanisme reaksi ET dapat dilihat sebagai berikut:

Berdasarkan hal tersebut mekanisme reaksi pada HAT dan ET dikembangkan dalam beberapa metode penentuan aktivitas antioksidan. Metode analisis yang didasarkan dari reaksi HAT adalah sebagai berikut (Huang, 2005); (Arifin *et al.*, 2019); (Hidayah, 2015):

1. *ORAC method (Oxygen Radical Absorbance Capacity method)*

Ketika generator radikal bebas seperti vs waktu yang direkam dan area di bawah kurva dengan dan tanpa tambahan antioksidan yang dihitung dan dibandingkan dengan kurva standar yang dihasilkan menggunakan antioksidan (\pm)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid, yaitu analog vitamin E yang larut dalam air dengan merek dagang Hoffman-LaRoche sebagai TroloxTM (Neil, 2011).

2. *TRAP method (total Radical-Trapping Antioxidant Parameter method)*

Metode ini menggunakan luminescence spektrometer untuk mengukur fluoresensi peluruhan R-phycoerythrin selama peroksidasi terkontrol reaksi. Nilai TRAP dihitung dari panjang fase lag yang disebabkan oleh antioksidan dibandingkan dengan Trolox (Neil, 2011)

Sedangkan untuk metode ET dapat dikembangkan menjadi lebih bervariasi, diantaranya adalah:

1. *TAC method (Total Antioxidant Capacity)*

TAC adalah ukuran jumlah radikal bebas yang terbawa oleh larutan uji (Hiselli *et al.*, 2000), digunakan untuk mengevaluasi kapasitas antioksidan dari sampel biologis.

2. *TEAC method (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity method)*

Metode ini pada prinsipnya mirip dengan ORAC, menggunakan spektrofotometer larik diode untuk mengukur hilangnya warna saat antioksidan ditambahkan ke kromofor biru-hijau ABTS \bullet^+ , 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-asam sulfonat). Antioksidan mengurangi ABTS \bullet^+ menjadi ABTS, menghilangkan warnanya. ABTS \bullet^+ adalah radikal stabil yang tidak ditemukan di tubuh manusia (Mermelstein, 2011).



3. PRSC method (*Peroxyl Radical Scavenging Capacity method*)

Metode ini sebenarnya juga mirip dengan ORAC. Pada metode ini senyawa azo-inisiator ditambahkan ke molekul fluorezen seperti *beta-phicoerythrin* atau *fluorescein* dan dipanaskan, azo-inisiator menghasilkan radikal bebas peroksil, yang merusak molekul fluorezen, mengakibatkan hilangnya fluoresensi. Dibuat kurva intensitas fluoresensinya (Mermelstein, 2011).

4. DPPH (*2,2-diphenylpicrylhydrazyl*)

Uji ini mengukur kemampuan antioksidan dengan spektrofotometer untuk mereduksi 2,2-difenil pikrilhidrazil (DPPH), radikal yang tidak umum ditemukan dalam sistem biologis (Mermelstein, 2011).

Pada pengujiannya didasarkan pada pengukuran *radical scavenging* antioksidan. Elektron bebas dari atom nitrogen dalam DPPH direduksi dengan menerima hidrogen atom dari antioksidan hingga terjadi pembentukan hidrazin (Kedare & Singh, 2011).

5. TOSC method (*Total Oxyradical Scavenging Capacity method*)

Ini juga mirip dengan ORAC, didasarkan pada tingkat penghambatan dichlorofluorescein oksidasi oleh antioksidan yang mengais radikal peroksil dihasilkan dari degradasi termal dari *2,2'-azobis(middleinopropane)* (Mermelstein, 2011).

Metode ini adalah metode in vitro yang agak baru dan berbeda dengan kebanyakan pengujian lainnya, seperti: tes dapat diterapkan pada larutan antioksidan murni sebagai serta sampel biologis yang kompleks seperti cairan dan jaringan. Ini dijelaskan dalam literatur yang cocok untuk mendeteksi antioksidan yang larut dalam air, lemak dan senyawa yang dapat diperiksa hingga skala μM yang kisaran lebih rendah. Tiga *Reaction Oxygen Species* (ROS) berbeda dengan yang berpotensi untuk merusak jaringan biologis digunakan di dalamnya pengujian ini: radikal peroksil, radikal hidroksil dan peroksinitrit. Radikal peroksil dihasilkan oleh panas homolisis *2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) diclorida* (ABAP); radikal hidroksil terbentuk selama besi ditambah reaksi Fenton yang diimobilisasi oleh

askorbat; dan peroksinitrit diproduksi oleh dekomposisi 3-*morpholinol-sydnonimine-N-ethylcarbamide* (SIN-1). Uji TOSC didasarkan pada reaksi yang menghasilkan etilen senyawa ini dengan asam α -*keto- γ -methiolbutyric* (KMBA). Waktu pembentukan etilen dipantau dengan analisis kromatografi gas pengulangan alikuot dari *headspace of the reaction vessels*. Sebuah antioksidan dicirikan oleh kemampuannya untuk menghambat produksi etilen dengan ROS masing-masing dibandingkan dengan reaksi kontrol tanpa hambatan. Substrat yang dapat teroksidasi KMBA disimpan pada konsentrasi dan pengujian yang kondisi konstan yang diterapkan mengarah ke etilen yang setara hasil dari semua ROS yang diterapkan. Demikian efektifitasnya antioksidan terhadap tiga oksidan yang berbeda dapat dibandingkan dalam kondisi serupa. Jika diinginkan, bahkan ROS lain dapat diterapkan dalam kombinasi dengan KMBA karena sifatnya yang unik bereaksi dengan berbeda oksidan, misalnya asam hipoklorit (HOCl) (Lichtenthaler *et al.*, 2003).

6. FRAP method (*Ferric Reducing / Antioxidant Power method*)

Pada metode ini dikurangi oleh antioksidan polifenol seperti asam galat dan katekin, menghasilkan larutan biru dengan penyerapan maksimal pada 765 nm. Kurva standar disiapkan menggunakan asam galat, dan hasilnya dilaporkan sebagai kesetaraan asam galat (Mermelstein, 2011).

Pada penelitian ini digunakan metode ET yang lebih spesifiknya adalah metode DPPH.

3.1 Senyawa Fenolik

Senyawa fenolik alami adalah jenis biomolekul yang setidaknya mempunyai satu cincin aromatik yang mengandung satu gugus hidroksil (fenol) atau lebih (polifenol) (Hättenschwiler & Vitousek, 2000). Berdasarkan struktur molekul cincin aromatiknya, mereka diklasifikasikan menjadi fenol dan benzoquinon sederhana (C₆), asam fenolik (C₆-C₁), asetofenon dan asam fenilasetat (C₆-C₂), asam hidroksinamatika, fenilpropen, kumarin-isocoumarin dan kromon (C₆-C₃), *naphthoquinones* (C₆-C₄), *xanthones* (C₆-C₁-C₆), stilbenes dan antrakuinon (C₆-C₂-C₆), flavonoid (C₆-C₃-C₆), lignan dan neolignan (C₆-C₃)₂, dan lignin (C₆-C₃)_n.

Senyawa fenolik alami berlimpah pada tumbuhan dan dapat ditemukan pada tumbuhan, rempah-rempah, sayuran, buah-buahan, anggur, minyak esensial, minyak zaitun, dan biji minyak (salah satu dari beberapa benih dari tanaman budidaya yang menghasilkan minyak, misalnya, lobak, kacang tanah, kedelai, atau kapas). Meskipun mereka adalah komponen non-gizi, mereka dimanfaatkan oleh makanan industri untuk fungsi antioksidan, antimikroba, antijamur, antivirus (Kalogianni *et al.*, 2020), antitumorial (antimutagenik), antiinflamasi dan antikarsinogenik (Guiche *et al.*, 2015).

Senyawa fenolik tersebar luas di tumbuhan jaringan, terutama yang memberikan warna, rasa, dan astringency untuk buah-buahan. Konsentrasi fenolik senyawa dapat bervariasi dari 0,5 hingga 5,0 g per 100 g kering berat jaringan tanaman. Senyawa fenolik sering kali dianggap metabolit sekunder dari metabolisme tanaman yang berkontribusi sedikit pada fisiologis atau fungsi ekologi tumbuhan. (Lihat Pewarna (Pewarna): Sifat dan Penentuan Alam Pigmen; *Flavour*; Senyawa: Struktur dan Karakteristik (Swanson, 2003).

Banyaknya variasi gugus yang mungkin tersubstitusi pada kerangka utama fenol menyebabkan kelompok fenolik memiliki banyak sekali anggota. Terdapat lebih dari 8.000 jenis senyawa yang termasuk dalam golongan senyawa fenolik. Oleh karena senyawa kimia yang tergolong sebagai senyawa fenolik sangat banyak macamnya, berbagai cara klasifikasi dilakukan oleh banyak ilmuwan (Nunung, 2016):

a. Senyawa Fenolik Sederhana

Secara umum senyawa fenolik sederhana memiliki sifat bakterisidal, antiseptic, dan antihelmintik. Senyawa dari kelompok ini merupakan hasil substitusi gugus fenol. Substitusi tersebut bisa berupa dua gugus atau satu gugus dalam posisi orto, meta, para. Contoh senyawa fenolik sederhana yang tersubstitusi oleh dua dan satu gugus hidroksil berturut-turut adalah floroglukinol dan resorcinol, contoh senyawa fenol sederhana lainnya adalah p-kresol, 3-etilfenol, 3,4-dimetilfenol, dan hidrokarbon.

b. Asam fenolat dan senyawa yang berhubungan lainnya (aldehid)

Senyawa fenolik dari golongan asam fenolat adalah fenol yang tersubstitusi oleh gugus karboksil. Contoh asam fenolat adalah asam galat. Asam galat merupakan trifenol yang biasa terdapat di daun teh dalam bentuk teresterifikasi bersama dengan katekin. Selain gugus karboksil, gugus lainnya seperti aldehid juga dapat tersubstitusi di gugus fenol, contoh senyawa dari jenis ini adalah vanillin.

c. Asetofenon dan asam fenilasetat

Asetofenon dan asam fenilasetat adalah golongan senyawa fenolik yang jarang ditemukan di alam. Asetofenon dikenal dengan adanya gugus aseton yang tersubstitusi di fenol. Asam fenilasetat juga memiliki gugus karboksil, namun berbeda dengan asam fenolat, gugus karboksil pada asam fenilasetat tidak berikatan langsung dengan cincin benzen.

Senyawa golongan fenol diketahui sangat berperan terhadap aktivitas antioksidan, semakin besar kandungan senyawa golongan fenolnya maka semakin besar aktivitas antioksidannya.

3.4 Fermentasi

Fermentasi mempunyai pengertian suatu proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Mikroorganisme membutuhkan sumber energi untuk tumbuh yang diperoleh dari metabolisme bahan pangan di mana mikroorganisme berada di dalamnya. Bahan baku pangan yang paling banyak digunakan oleh mikroorganisme adalah glukosa. Pertumbuhan mikroorganisme yang terjadi tanpa adanya oksigen sering dikenal sebagai fermentasi (Hidayanto, 2017).

Fermentasi dengan menggunakan jamur dapat meningkatkan nilai nutrisi dari suatu bahan. Sesuai dengan penelitian (Razak *et al.*, 2015) yang melakukan fermentasi terhadap bekatul dengan menggunakan 2 jenis jamur, salah satunya *Rhizopus oryzae* yang merupakan salah satu jenis jamur selulolitik. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa bekatul yang telah difermentasikan dengan menggunakan Jamur *Rhizopus oryzae* akan mengalami peningkatan kandungan senyawa fenolik. Selain itu masih berdasarkan penelitian yang sama, nilai aktivitas

antioksidan dari bekatul yang difermentasi dengan jamur yang dicampur antara *Rhizopus oryzae* dan *Aspergillus oryzae* mendapatkan hasil yang lebih besar dibandingkan dengan bekatul yang difermentasi dengan jamur tunggal. Sehingga dapat diketahui bahwa fermentasi dengan menggunakan jamur *Rhizopus oryzae* dapat meningkatkan kadar total fenolik dan aktivitas antioksidan. Keberhasilan fermentasi ditentukan oleh beberapa faktor yaitu:

1. Lama fermentasi

Waktu yang dibutuhkan dalam proses fermentasi biasanya adalah 2-3 hari

2. Konsentrasi Inokulum

Konsentrasi inokulum yang terlibat dalam fermentasi sangat mempengaruhi efektifitas penghasil produk. Jika konsentrasi inokulum yang digunakan terlalu sedikit maka proses fermentasi berjalan dengan lambat, sedangkan konsentrasi inokulum yang terlalu banyak akan mempengaruhi persaingan pengambilan nutrisi, sehingga sangat berpengaruh pada pertumbuhan mikroorganisme.

3. Substrat

Substrat sebagai sumber energi yang diperlukan oleh mikroba untuk proses fermentasi. Energi yang dibutuhkan berasal dari karbohidrat, protein, lemak, mineral dan zat gizi lainnya yang terdapat dalam substrat. Bahan energi yang banyak digunakan oleh mikroorganisme adalah glukosa. Mikroba fermentasi harus mampu tumbuh pada substrat dan mudah beradaptasi dengan lingkungannya.

4. Suhu

Suhu selama proses fermentasi sangat menentukan jenis mikroorganisme dominan yang akan tumbuh. Umumnya diperlukan suhu 30 °C untuk pertumbuhan mikroorganisme.

5. Oksigen

Ketersediaan oksigen harus diatur selama proses fermentasi. Hal ini berhubungan dengan sifat mikroorganisme yang digunakan

6. pH Substrat

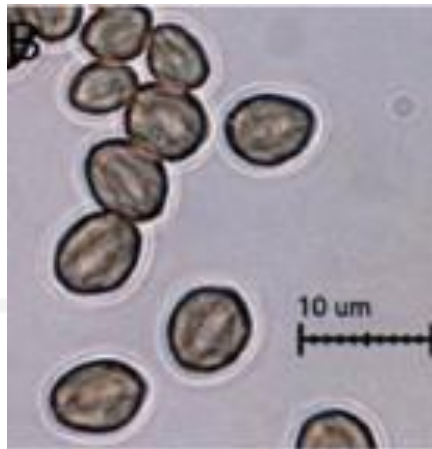
Kebanyakan mikroba dapat tumbuh pada kisaran pH 3,0 – 4,0. Kebanyakan bakteri mempunyai pH optimum berkisar 6,5 – 7,5. Di bawah 5,0 dan di atas 8,5 bakteri tidak dapat tumbuh dengan baik. Khamir menyukai pH 4,0 – 5,0 dan tumbuh pada kisaran pH 2,5 – 8,5. Oleh karena itu untuk menumbuhkan khamir dilakukan pada pH rendah untuk mencegah kontaminasi bakteri. Dalam fermentasi, kontrol pH penting sekali dilakukan karena pH yang optimum harus dipertahankan selama fermentasi. Fermentasi menggunakan bakteri selulolitik, didapatkan bahwa nilai pH optimumnya yakni pada tingkatan pH 5-6. Sedangkan jika menggunakan bakteri *A. terreus* menyatakan bahwa pH optimum untuk fermentasinya yakni pada pH 6 (Kapupara *et al.*, 2011).

3.5 Jamur *Rhizopus Oryzae*

Jamur adalah salah satu mikroorganisme yang dapat digunakan dalam proses fermentasi. Beberapa macam jenis jamur digunakan dalam proses fermentasi salah satunya adalah jamur *Rhizopus oryzae* yang merupakan anggota *Zygomycetes*. Jamur ini juga banyak digunakan dalam proses fermentasi beberapa jenis makanan. *Rhizopus oryzae* memiliki karakteristi, yaitu miselia berwarna putih, ketika dewasa maka miselia putih akan tertutup oleh sporangium yang berwarna abu-abu kecoklatan.

Menurut Germain and Summerbell (2006), klasifikasi *Rhizopus oryzae* sebagai berikut :

Kingdom	: Fungi
Divisio	: Zygomycota
Class	: Zygomycotes
Ordo	: Mucorales
Familia	: Mucoraceae
Genus	: <i>Rhizopus</i>
Spesies	: <i>R. Oryzae</i>



Gambar 6. Sporangium dan sporangiofor *Rhizopus oryzae*

Sumber : https://www.researchgate.net/figure/Morphological-characteristics-of-Rhizopus-oryzae-isolated-from-soft-rot-lesions-on-apple_fig3_229065673

Jamur *Rhizopus oryzae* merupakan jamur yang biasa digunakan dalam pembuatan tempe. Jamur dengan genus ini merupakan jamur yang aman untuk dikonsumsi karena tidak menghasilkan toksin. Selain itu jamur dari genus *Rhizopus* mampu meningkatkan kadar total fenolik yang terikat dalam serat. Hal tersebut terjadi karena jamur ini mengandung enzim selulase yang mampu membuka atau menghidrolisis serat selulosa menjadi rantai oligosakarida yang lebih sederhana, sehingga ikatan senyawa bioaktif yang terikat diantara selulosa akan lemah dan mudah terlepas.

3.6 Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC-MS)

GC-MS merupakan gabungan dua buah alat yaitu kromatografi gas dan spektrometri massa. GC-MS digunakan untuk mendeteksi massa antara 10 m/z hingga 700 m/z (Fessenden and Fessenden, 1982).

GC atau kromatografi gas merupakan metode yang dinamis untuk pemisahan dan deteksi senyawa-senyawa yang mudah menguap dalam suatu campuran. Prinsip kerja dari kromatografi gas terkait dengan titik didih senyawa yang dianalisis serta perbedaan interaksi analit dengan fase diam dan fase gerak. Senyawa dengan titik didih yang tinggi memiliki waktu retensi yang lama. Senyawa yang lebih terikat dalam fase cair pada permukaan fase diam juga memiliki waktu retensi yang lebih lama (Clark, 2007).

MS atau spektrometer massa merupakan suatu instrument yang dapat menyeleksi molekul-molekul gas bermuatan berdasarkan massa atau beratnya (Khopkar, 1990). Prinsip kerja spektrometri massa adalah menembak bahan yang sedang dianalisis dengan berkas elektron dan secara kuantitatif mencatat hasilnya sebagai suatu spektrum fragmen ion positif. Fragmen-fragmen tersebut berkelompok sesuai dengan massanya (Fessenden and Fessenden, 1982).

Kegunaan umum kromatografi gas adalah untuk melakukan pemisahan dinamis dan identifikasi semua jenis senyawa organik yang mudah menguap dan juga untuk melakukan analisis kualitatif dan kuantitatif senyawa dalam suatu campuran (Gandjar dan Rohman, 2007). Sedangkan spektrometer massa selain untuk penentuan struktur molekul, spektrum massa dipakai untuk penentuan analisis kuantitatif.

3.7 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-VIS adalah salah satu metode instrumen yang paling sering diterapkan dalam analisis kimia untuk mendeteksi senyawa (padat/cair) berdasarkan absorbansi foton. Agar sampel dapat menyerap foton pada daerah UV-VIS (panjang gelombang foton 200 nm – 700 nm), biasanya sampel harus diperlakukan atau derivatisasi, misalnya penambahan reagen dalam pembentukan garam kompleks dan lain sebagainya. Unsur diidentifikasi melalui senyawa kompleksnya (Irawan, 2019).

Prinsip kerja Spektrofotometer UV-Vis yaitu apabila cahaya monokromatik melalui suatu media (larutan), maka sebagian cahaya tersebut diserap (I), sebagian dipantulkan (I_r), dan sebagian lagi dipancarkan (I_t). Aplikasi rumus tersebut dalam pengukuran kuantitatif dilaksanakan dengan cara komparatif menggunakan kurva kalibrasi dari hubungan konsentrasi deret larutan alat untuk analisa suatu unsur yang berkadar rendah baik secara kuantitatif maupun secara kualitatif, pada penentuan secara kualitatif berdasarkan puncak-puncak yang dihasilkan spektrum dari suatu unsur tertentu pada panjang gelombang tertentu, sedangkan penentuan secara kuantitatif berdasarkan nilai absorbansi yang dihasilkan dari spektrum dengan adanya senyawa pengompleks sesuai unsur yang dianalisisnya. Adapun yang melandasi pengukuran spektrofotometer ini dalam penggunaannya adalah

hukum Lambert-Beer yaitu bila suatu cahaya monokromatis dilewatkan melalui suatu media yang transparan, maka intensitas cahaya yang ditransmisikan sebanding dengan tebal dan kepekaan media larutan yang digunakan berdasarkan persamaan berikut (Yanlinastuti & Fatimah, 2016) :

$$A = \log I/I_0 \text{ atau } A = a \cdot b \cdot c \quad (1)$$

Dimana :

A = absorbansi

a = koefisien serapan molar

b = tebal media cuplikan yang dilewati sinar

c = konsentrasi unsur dalam larutan cuplikan

I_0 = intensitas sinar mula-mula

I = intensitas sinar yang diteruskan.

$$Y = ax - b \quad (2)$$

Dimana:

Y = absorbansi

a = konstanta

x = konsentrasi

b = kemiringan/slope

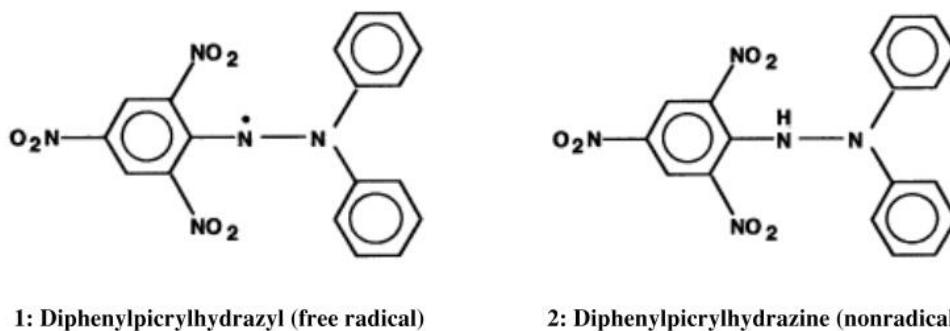
3.8 Metode DPPH (*2,2-diphenyl-2-picrylhydrazil*)

DPPH adalah singkatan umum untuk senyawa kimia organik *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*. Ini adalah bubuk kristal berwarna gelap yang terdiri dari molekul radikal bebas yang stabil. DPPH memiliki dua aplikasi utama, keduanya dalam penelitian laboratorium: satu adalah monitor reaksi kimia yang melibatkan radikal, terutama untuk pengujian antioksidan yang umum (Sharma & Bhat, 2009).

Beberapa metode pengukuran aktivitas antioksidan yang dapat digunakan antara lain metode DPPH dan metode uji aktivitas kemampuan mereduksi. Metode DPPH merupakan salah satu metode aktivitas antioksidan yang sederhana dengan menggunakan DPPH sebagai senyawa pendeteksi. Metode DPPH digunakan secara luas untuk menguji kemampuan senyawa yang berperan sebagai pendonor elektron atau hydrogen. Metode ini merupakan metode yang dapat mengukur aktivitas total antioksidan baik dalam pelarut polar maupun nonpolar. Beberapa

metode lain terbatas mengukur komponen yang larut dalam pelarut yang digunakan dalam analisis (Prakash, 2001).

Metode DPPH dipilih karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel. Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donasi atom hydrogen dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning. Biasanya, absorbansi DPPH diukur pada panjang gelombang 515 - 520 nm (Bandoniene et al. 2002, Pavlov et al. 2002, Gazi et al. 2004) dalam (Marxen *et al.*, 2007). Pengurangan intensitas warna yang terjadi berhubungan dengan jumlah elektron DPPH yang menangkap atom hidrogen yang mengindikasikan peningkatan kemampuan antioksidan untuk menangkap radikal bebas. Aktivitas antioksidan diperoleh dengan menghitung jumlah pengurangan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan pengurangan konversi larutan DPPH melalui pengukuran absorbansi larutan uji (Prakash, 2001). Berikut adalah struktur DPPH (Molyneux, 2004) :



Gambar 7. Struktur DPPH

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Alat dan Bahan

4.1.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah ayakan 60 mesh, gelas beker 50 mL; 100 mL; 250 mL, spatula, neraca analitik, gelas arloji, pengaduk gelas, Erlenmeyer 250 mL, labu ukur 100 mL, autoklaf, *hot plate*, jarum ose, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *shaker*, pipet ukur 10 mL, pipet ukur 1 mL, pipet ukur 5 mL, pipet mikro, *blue tipe*, vortex, penangas air, bola hisap, gelas ukur 100 mL, labu ukur 5 mL, labu uku 10 mL, labu ukur 50 mL, botol kecil, vortex, *laminar air flow*, Spektrootometer UV-Vis, kuvet, *plastic wrap*, corong Buchner, Erlenmeyer vakum, *rotary evaporator vacuum* dan *freezdrying*.

4.1.2 Bahan

Bekatul, Jamur *Rhizopus oryzae*, PDA (*Potato Dextrose Agar*), etanol, methanol teknis, eter teknis, BaCl₂, NaCl, H₂SO₄, NaH₂PO₄, Asam Sitrat, Buffer pH 4, 7 dan 10, Aquades, DPPH, Asam Askorbat (vitamin C), alkohol, kertas saring, kapas, bunsen, korek api, isolasi, aluminium foil, plastic wrap dan tisu.

4.2 Prosedur Kerja

4.2.1 Sterilisasi Alat

Alat yang digunakan untuk menginokulasi jamur *Rhizopus oryzae* seluruhnya dicuci bersih. Kemudian, Erlenmeyer dan tabung reaksi dibungkus menggunakan plastik tahan panas. Selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C.

4.2.2 Pertumbuhan Jamur dalam Media PDA

4.2.2.1 Pembuatan Media Potato Dextrose Agar (PDA)

Diambil sebanyak 3,9 gram serbuk PDA dan kemudian dilarutkan dalam aquades pada erlemeyer 100 mL. Dilakukan pengadukan dengan pengaduk kaca. Selanjutnya ditutup dengan kapas dan aluminium foil bagian mulut Erlenmeyer. Erlenmeyer diletakkan diatas *hot plate* pada suhu 25-40 °C, dimasukkan *magnetic stirrer* dan dilakukan homogenasi sampai larutan berwarna kuning keruh.

Selanjutnya dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 2 jam. Setelah 2 jam, larutan dituangkan ke dalam cawan petri dan ditunggu sampai menjadi padat dan dingin.

4.2.2.2 Pembuatan Larutan Fisiologis Steril (0,9%)

Sebanyak 2,25 gram NaCl dilarutkan dengan aquades dalam labu ukur 250 mL. Lalu dihomogenkan dan dilakukan sterilisasi dengan autoklaf selama 2 jam.

4.2.2.3. Pembuatan Inokulum *Rhizopus oryzae*

Jamur yang akan digunakan harus diregenerasi terlebih dahulu. Disiapkan media miring *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan disiapkan larutan fisiologis yang telah dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Dilakukan pembakaran ose diatas bunsen terlebih dahulu sampai pijar, kemudian ose dimasukkan ke dalam larutan fisiologis dan dimasukkan ke dalam jamur *Rhizopus oryzae* dan diambil jamur yang berwarna putih keabuan di dalam agar miring tabung reaksi. Satu kali ambil langsung digoreskan ke dalam media PDA (beberapa kali goresan). Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 29-30 °C selama 72 jam.

4.2.3 Pembuatan pH Buffer *Rhizopus oryzae*

Dalam tahap ini pH yang akan dibuat adalah 5 (sesuai pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae*). Ditimbang $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 6,89 gram dilarutkan dalam 200 mL aquades dan dihomogenkan, larutan ini disebut Na_2HPO_4 0,25 M. Selanjutnya ditimbang asam sitrat sebanyak 4,8031 gram dilarutkan dengan aquades dalam labu ukur 200 mL dan dihomogenkan, larutan ini disebut asam sitrat 0,25 M.

Kemudian masing-masing larutan diukur pHnya menggunakan pH meter (setelah dilakukan kalibrasi pH buffer 4, 7 dan 10). Lalu dipipet larutan Na_2HPO_4 0,25 M sebanyak 19,3 mL ditambahkan larutan asam sitrat 0,25 M sebanyak 30,7 mL. Lalu diukur campuran kedua larutan tersebut, apabila belum mencapai pH 4, maka ditambahkan sesuai dengan larutan asam atau basa yang digunakan. Penambahan asam atau basa dilakukan di atas *hot plate* dengan meneteskan larutan tersebut secara perlahan.

4.2.4 Pembuatan PDB (*Potato Dextrose Broth*)

Sebanyak 6 gram PDB dilarutkan dengan aquades dalam labu ukur 250 mL. Diletakkan diatas hot plate dan dimasukkan *magnetic stirrer*. Setelah homogen

dimasukkan ke dalam autoklaf selama 2 jam pada suhu 121 °C. Setelah itu dimasukkan dalam kulkas media steril.

4.2.5 Pertumbuhan *Rhizopus oryzae*

Ose dibakar dengan Bunsen sampai pijar dan dimasukkan ke dalam larutan fisiologis, kemudian dimasukkan ke dalam jamur yang telah di inokulasi dalam PDA. Lalu jamur yang telah diambil dimasukkan dalam PDB. PDB tersebut terdiri dari 80 mL dan Buffer 20 mL. Lalu Erlenmeyer tersebut ditutup dengan kapas dan ditutup dengan aluminium foil kemudian dilakban. Selanjutnya dishaker (*shaker incubator*) selama 48-72 jam dengan kecepatan 130 rpm pada suhu 30 °C.

4.2.6 Pembuatan Standar McFarland 0,5

Dilakukan pembuatan BaCl₂ 1% sebanyak 10 mL. Ditimbang BaCl₂ sebanyak 0,1 gram dilarutkan dengan aquades dalam labu ukur 10 mL. Selanjutnya dilakukan pembuatan H₂SO₄ 1% sebanyak 10 mL dengan cara diambil H₂SO₄ pekat 95-97% sebanyak 0,05 mL dan dilarutkan dengan aquades dalam labu ukur 10 mL. Standar McFarland dibuat dengan cara mencampurkan 9,95 mL H₂SO₄ dengan 0,05 mL BaCl₂. Lalu diukur absorbansinya menggunakan Uv-vis *Double Beam* pada panjang gelombang maksimal yaitu 600 nm dengan blanko adalah aquades (Fatisa, 2013).

4.2.7 Pengenceran Jamur

Pengenceran jamur dilakukan di dalam LAF (*Laminar Air Flow*). Disiapkan tabung reaksi sebanyak 6 buah, diberi label 10⁻¹;10⁻²;10⁻³;10⁻⁴;10⁻⁵;10⁻⁶ untuk masing-masing tabung reaksi. Dimasukkan 9 mL NaCl 0,9% pada masing-masing tabung reaksi. Diambil 1 mL inoculum jamur dari PDB dengan menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi 10⁻¹ dan divortex beberapa saat untuk menghomogenkan pengenceran tersebut. Kemudian dari tabung reaksi 10⁻¹ diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi 10⁻² dan juga divortex, begitu seterusnya sampai pada labu ukur 10⁻⁶. Lalu dihomogenkan dengan cara divortex beberapa detik sampai kira-kira sudah homogen. Lalu diukur absorbansi tiap tabung reaksi dengan menggunakan UV-Vis *Double Beam* pada panjang gelombang 600 nm dengan blanko adalah aquades sebagai mediumnya.

Setelah didapatkan absorbansi masing-masing pengenceran, dibandingkan hasil absorbansi McFarland dengan hasil pengenceran, diambil pengenceran jamur yang absorbansinya paling mendekati absorbansi McFarland.

4.2.8 Fermentasi Bekatul

Disiapkan erlenmeyer sebanyak 6 buah dan diberi label sesuai dengan variasi waktu fermentasi 2, 5 dan 7 hari dengan masing-masing dua pengulangan (H2-1; H2-2; H5-1; H5-2; H7-1 dan H7-2). Bekatul sebanyak 18 gram ditimbang dan dilarutkan dengan aquades 54 mL (perbandingan 1:3) dalam erlenmeyer 100 mL dan diaduk dengan pengaduk kaca. Diambil 1 mL dengan mikropipet isolate jamur yang telah diencerkan (10^{-2}) dimasukkan ke dalam masing-masing erlenmeyer. Lalu ditutup kapas dan lakban, dimasukkan ke dalam *inkubasi shaker* (fermentasi goyang) dengan kecepatan 130 rpm dan suhu 30 °C. Setelah fermentasi selesai, Erlenmeyer dikeluarkan dan ditambahkan eter teknis (Razak *et al.*, 2015).

4.2.9 Ekstraksi Cair-cair

Sampel bekatul hasil fermentasi ditambahkan dengan eter 30 mL dan dilakukan penggojokan. Dilakukan penyaringan penyaring vakum. Dimasukkan ke dalam corong pisah dan dilakukan ekstraksi cair-cair sampai terbentuk dua lapisan, lapisan bawah disimpan dalam Erlenmeyer lalu ditutup aluminium foil sedangkan lapisan atas berupa minyak disimpan dalam vial yang merupakan ekstrak senyawa fenolik.

4.2.10 Analisis hasil ekstraksi dengan GC-MS

Hasil ekstrak dilakukan analisis dengan *Gas Chromatography – Mass Spectroscopy* (GC-MS) untuk melihat jenis senyawa fenolik apa saja yang terdapat di dalam bekatul tersebut, serta mengetahui seberapa besar kandungan fenolik dalam hasil ekstraksinya. Diatur alat dalam kondisi sebagai berikut : Ekstrak yang dianalisis adalah senyawa fenolik, kolom yang digunakan adalah AT-5MS (5% fenilmetilpolisilokan), dengan dimensi 30 × 0,25 mm I.D, dan layar tipis dengan ukuran 0,25 µm. Temperatur injector diatur pada 230 °C dengan gas pembawa helium 1,0 mL/min. Temperatur oven diatur mulai dari 60 °C dengan kenaikan suhu 3 °C/min sampai 280 °C. Temperatur sumber ion diatur pada 280 °C dengan range scan MS 29-600 m/z dan arus detektornya 1150.

4.2.11 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

4.2.11.1 Pembuatan larutan DPPH 0,4 mM

Ditimbang DPPH serbuk sebanyak 0,01577 gram dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 100 mL (Sami & Rahimah, 2016).

4.2.11.2 Pembuatan kurva standar DPPH

Diawali dengan pembuatan larutan stok 100 ppm, yaitu diambil 5 mg serbuk DPPH kemudian dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 50 mL. Dari larutan stok tersebut dilakukan variasi konsentrasi, yaitu 5; 10; 15; 20 dan 25 ppm. Untuk konsentrasi 5 ppm dibuat dengan cara dipipet larutan stok 0,5 mL dan kemudian diencerkan dengan metanol dalam labu ukur 10 mL. Untuk konsentrasi 10 ppm dibuat dengan cara dipipet larutan stok 1 mL dan kemudian diencerkan dengan metanol dalam labu ukur 10 mL. Untuk konsentrasi 15 ppm dibuat dengan cara dipipet larutan stok 1,5 mL dan kemudian diencerkan dengan metanol dalam labu ukur 10 mL. Untuk konsentrasi 20 ppm dibuat dengan cara dipipet larutan stok 2 mL dan kemudian diencerkan dengan metanol dalam labu ukur 10 mL. Untuk konsentrasi 25 ppm dibuat dengan cara dipipet larutan stok 2,5 mL dan kemudian diencerkan dengan metanol dalam labu ukur 10 mL. Lalu pengukuran panjang gelombang maksimum. Kemudian dilakukan pengukuran absorbansi blanko. Blanko dibuat dengan cara diambil 1 mL DPPH 0,4 mM dan dilarutkan dalam metanol dalam labu ukur 5 mL. Kemudian blanko diukur pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan (Yoga, 2015).

4.2.11.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat

Dibuat terlebih dahulu larutan induk asam askorbat 100 ppm dengan cara ditimbang 5 mg serbuk asam askorbat dan dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 50 mL dan dihomogenkan. Dari larutan induk tersebut dibuat variasi konsentrasi 6; 8; 10 dan 12 ppm. Untuk membuat konsentrasi 6 ppm dibuat dengan cara dipipet 0,3 mL larutan induk dan kemudian diencerkan dengan metanol dalam labu ukur 5 mL. Untuk membuat konsentrasi 8 ppm dibuat dengan cara dipipet 0,4 mL larutan induk dan kemudian diencerkan dengan metanol dalam labu ukur 5 mL. Untuk membuat konsentrasi 8 ppm dibuat dengan cara dipipet 0,5 mL larutan induk dan kemudian diencerkan dengan metanol dalam labu ukur 5 mL. Untuk membuat

konsentrasi 12 ppm dibuat dengan cara dipipet 0,6 mL larutan induk dan kemudian diencerkan dengan metanol dalam labu ukur 5 mL.

Kemudian dilakukan pengukuran absorbansi asam askorbat pada panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan. Absorbansi yang telah didapat kemudian digunakan untuk mencari nilai % Inhibisi dan IC₅₀.

Rumus % Inhibisi :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi Asam Askorbat})}{(\text{Absorbansi Kontrol})} \times 100\%$$

Rumus IC₅₀:

$$y = bx + a$$

$$50 = bx + a$$

Dengan x adalah nilai dari IC₅₀.

4.2.11.3 Pengukuran Aktivitas Antioksidan Senyawa Fenolik dalam Sampel Bekatul

Dibuat terlebih dahulu larutan induk asam askorbat 100 ppm dengan cara ditimbang 5 mg ekstrak senyawa fenolik dan dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 50 mL dan dihomogenkan. Dari larutan induk tersebut dibuat variasi konsentrasi 5; 10; 15 dan 20 ppm. Untuk membuat konsentrasi 5 ppm dibuat dengan cara dipipet 0,25 mL larutan induk dan kemudian diencerkan dengan metanol dalam labu ukur 5 mL. Untuk membuat konsentrasi 10 ppm dibuat dengan cara dipipet 0,5 mL larutan induk dan kemudian diencerkan dengan metanol dalam labu ukur 5 mL. Untuk membuat konsentrasi 15 ppm dibuat dengan cara dipipet 0,75 mL larutan induk dan kemudian diencerkan dengan metanol dalam labu ukur 5 mL. Untuk membuat konsentrasi 20 ppm dibuat dengan cara dipipet 1 mL larutan induk dan kemudian diencerkan dengan metanol dalam labu ukur 5 mL.

Kemudian dilakukan pengukuran absorbansi asam askorbat pada panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan. Absorbansi yang telah didapat kemudian digunakan untuk mencari nilai % Inhibisi dan IC₅₀.

Rumus % Inhibisi :

$$\% \text{ Penghambat DPPH} = \frac{(\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi Asam Askorbat})}{(\text{Absorbansi Kontrol})} \times 100\%$$

Rumus IC₅₀ :

$$y = bx + a$$

$$50 = bx + a$$

Dengan x adalah nilai dari IC₅₀.



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini berisi tentang isolasi senyawa fenolik yang terkandung di dalam bekatul yang diduga memiliki aktivitas antioksidan. Proses fermentasi yang dilakukan menggunakan bantuan jamur *Rhizopus oryzae* dengan menggunakan media pertumbuhan *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan *Potato Dextrose Broth* (PDB). Dilakukan variasi waktu fermentasi yakni 2, 5 dan 7 hari yakni untuk mengetahui perbandingan hasil senyawa fenolik dari fermentasi. Karakterisasi dilakukan dengan metode *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy* (GC-MS). Metode yang digunakan untuk penentuan aktivitas antioksidannya metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) dan instrument yang digunakan adalah *Spectrophotometer UV-Vis*.

5.1 Sterilisasi Alat

Pada proses sterilisasi digunakan autoklaf sebagai pensteril. Proses sterilisasi dilakukan pada tahap awal karena bertujuan selain untuk menghindari kontaminasi bahan maupun alat yang akan digunakan, juga untuk mencegah adanya mikroorganisme lain yang tidak diinginkan dan dikhawatirkan akan mengganggu tahap selanjutnya.

Sesuai dengan prinsip dari autoklaf yaitu sterilisasi menggunakan pensteril uap air yang bertekanan. Jika suhu yang digunakan 121 °C, maka tekanannya yaitu sebesar 15-17,5 psi (2 atm). Agar penggunaan sterilisasi dalam autoklaf tersebut maksimal dan efektif, maka uap air harus menembus setiap bagian alat yang disetirlikan. Maka dari itu air yang dituangkan ke dalam autoklaf tidak boleh terlalu penuh, supaya uap dapat menembus keseluruhan bagian dari alat yang disterilkan (Dhirgo dan Zuliyanti, 2007).

Pada saat api autoklaf dinyalakan, air di dalam autoklaf lama kelamaan akan mendidih dan uap yang terbentuk akan mendesak udara yang sebelumnya mengisi autoklaf. Setelah uap air memenuhi autoklaf maka katup uap ditutup sehingga tekanan dalam autoklaf naik, setelah tekanan dan suhu tercapai yaitu pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm maka proses seterilisasi dimulai dengan menghidupkan timer

hitungan mundur. Setelah proses sterilisasi selesai, matikan autoklaf dan didamkan hingga tekanan turun perlahan mencapai 0 Psi, tidak dianjurkan membuka autoklaf sebelum tekanan mencapai 0 Psi (Syah, 2013).

Suhu dan tekanan yang besar diberikan pada saat sterilisasi karena memiliki kemampuan yang lebih besar untuk membunuh sel dibanding dengan udara panas. Pada tekanan 15 psi, air akan mendidih tepat pada suhu 121 °C, jadi semua jenis kehidupan akan mati saat air mendidih di dalam autoklaf yaitu pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 psi. Lama sterilisasi tergantung pada sifat bahan yang disterilkan, tipe wadah dan volume bahan, sedangkan kondisi yang baik digunakan untuk sterilisasi adalah pada 15 psi (2 atm) dan temperatur 121 °C selama 15 menit (Adji dan Zuliyanti, 2007).

5.2 Pertumbuhan Jamur *Rhizopus oryzae* dalam media PDA dan PDB

Pemilihan media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan *Potato Dextrose Broth* (PDB) sebagai media pertumbuhan bagi jamur *Rhizopus oryzae* merupakan hal yang tepat. Metode pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae* dengan media PDA berfungsi sebagai asupan nutrisi bagi jamur yang akan ditumbuhkan karena media PDA mengandung dextrose, sari kentang dan agar. Dalam PDA juga mengandung karbohidrat yang cukup banyak untuk perkembangan jamur sesuai nutrisi dan faktor pertumbuhan yang dibutuhkan oleh jamur. Selain itu media PDA sangat mendukung pertumbuhan jamur karena media ini dapat membuat kondisi jamur terhindar dari berbagai kontaminasi bakteri dengan keasaman pada media yang rendah, yakni pada pH 4,5 sampai 5,6 sehingga kondisi ini dapat menghambat kontaminasi bakteri karena pH pertumbuhan bakteri adalah 7 (lingkungan yang netral) dan pada suhu 25-30 °C (Cappuccino, 2002). Jamur *Rhizopus oryzae* akan tumbuh pada media PDA dalam cawan petri yang diperoleh dari proses pelarutan media PDA serbuk 3,9 gram dalam 100 mL akuades dengan menggunakan pemanasan (Hikmah, 2018). Pemanasan pada suhu 25-40 °C bertujuan untuk menghindari pertumbuhan bakteri yang tidak diinginkan. Selain itu juga untuk mempercepat proses homogenasi antara serbuk PDA dan aquades sebagai pelarutnya.

Dibuat larutan fisiologis sebagai larutan yang berfungsi untuk menjaga ketahanan hidup isolat dari jamur *Rhizopus oryzae*, hal ini dikarenakan larutan garam NaCl fisiologis dengan konsentrasi 0,9% berfungsi juga untuk menjaga keseimbangan ion dari sel jamur (Lestari, 2014).

Setelah media PDA dan larutan fisiologis 0,9% disiapkan, dilakukan pemindahan jamur ke dalam media PDA. Digunakan jamur inokulum atau jarum ose sebagai mediator pemindahan jamur. Jarum ose ini digunakan untuk melakukan coretan atau garis pada permukaan media agar. Jarum ose ini berfungsi sebagai pemindah biakan jamur untuk ditanam dan ditumbuhkan dalam media PDA (Yunilas & Yusni, 2017).

Pemindahan jamur ke dalam media PDA yang bertujuan untuk inkubasi (proses pertumbuhan jamur dalam media) diambil pada bagian yang berwarna putih keabuan seperti bentuk kapas tipis pada permukaan media miring tabung reaksi yang menunjukkan adanya isolat jamur dalam permukaan tersebut.

Isolat diambil dengan jarum ose yang sebelumnya telah dipanaskan dengan menggunakan bunsen. Pemanasan ini bertujuan untuk mematikan mikroorganisme lain sebelum dilakukan pengambilan isolate jamur. Jarum ose digoreskan pada media PDA cawan petri dengan metode gores. Tujuan dari metode ini adalah untuk menghasilkan jenis koloni jamur yang terpisah dengan baik dari suspensi yang masih pekat dalam tabung reaksi. Setelah dilakukan penggoresan, cawan ditutup kembali dan diposisikan dalam keadaan terbalik. Tujuan dari pembalikan ini adalah untuk menghindari terjadinya penguapan air yang terkandung dalam media PDA sehingga tidak menghasilkan embun pada tutup cawan petri. Jika terdapat embun, maka akan berakibat fatal jika embun tersebut jatuh mengenai media PDA dan membuat media PDA tersebut tidak memadat. Selain itu, tujuan pembalikan cawan petri juga memiliki tujuan lain, di antaranya untuk membantu pertumbuhan jamur dalam media PDA, meratakan panas media secara merata serta mempermudah dalam melihat dan mengidentifikasi jamur yang sudah tumbuh dalam media PDA. Kemudian dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 29-30°C selama 5 hari. Hal ini dikarenakan pada hari sebelumnya jamur belum tumbuh optimal.

Kemudian dilanjutkan dengan tahap pembuatan media PDB yang diawali dengan pembuatan larutan buffer untuk pertumbuhan jamur dalam media PDB. Larutan buffer dibuat dari Na_2HPO_4 0,25M dan Asam sitrat 0,25M (McIlvaine, 1921). Larutan buffer yang digunakan dalam pertumbuhan ini adalah pH 5. Sesuai dengan literatur yang diungkapkan oleh Pagarra (2009) *Rhizopus oryzae* tumbuh baik pada kisaran pH 3,4-6. Larutan buffer ini dibuat dengan tujuan untuk mengoptimalkan pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae* dalam media PDB, yang mana pada pH tersebut diharapkan untuk tidak tumbuh mikroorganisme selain jamur *Rhizopus oryzae*.

Dilanjutkan dengan pembuatan media PDB dari 6 gram serbuk PDB dilarutkan dengan 250 mL aquades. Setelah itu dilakukan pertumbuhan jamur dalam media PDB. Diambil hasil pertumbuhan jamur dari media PDA menggunakan jarum ose. Pada media PDA jamur yang tumbuh terdapat spot berwarna abu kehitaman yang biasanya dilapisi seperti kapas, spot bagian tersebut diambil menggunakan jarum ose dan dimasukkan ke dalam media PDB dan dipastikan jamur masuk ke dalam media PDB atau tidak tertinggal di dalam jarum ose. Di dalam media tersebut mengandung PDB 80 mL dan larutan buffer 20 mL. Setelah jamur dimasukkan ke dalam media PDB, dilakukan inkubasi shaker (*shaker incubator*) selama 48-72 jam dengan kecepatan 130 rpm pada suhu 30 °C.

Shaker incubator ini berfungsi untuk menghomogenkan media PDB agar jamur yang disebarkan di media tersebut bisa merata di dalam inkubator tertutup. Caranya dengan menerapkan *shaking* atau getaran yang memiliki getaran satu arah saja, yaitu dengan gerakan maju mundur sesuai dengan kecepatan yang ditentukan. Selain itu juga media PDB bisa terlindungi dari sesuatu yang berpotensi mengkontaminasi. Perlindungan ini menciptakan kondisi suhu agar sesuai dengan pertumbuhan mikroorganisme, yaitu 30 °C.

Kemudian dilakukan perbandingan standar McFarland terhadap pengenceran bakteri hasil pertumbuhan dari media PDB. Dilakukan pembuatan standar McFarland terlebih dahulu. Standar McFarland ini digunakan untuk menyetarakan konsentrasi jamur dengan menggunakan larutan BaCl_2 1% dan H_2SO_4 1%. Standar kekeruhan dari McFarland ini digunakan untuk menggantikan

perhitungan jamur satu persatu serta untuk memperkirakan kepadatan sel jamur yang akan digunakan dalam proses fermentasi.

Dalam penelitian ini dilakukan pengenceran jamur sebanyak 6 variasi pengenceran, yaitu 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} dan 10^{-6} . Tujuan pengenceran jamur secara bertingkat selain untuk memisahkan koloni, tujuan lainnya adalah untuk mengurangi atau memperkecil jumlah jamur yang tersuspensi dalam cairan tabung reaksi, sehingga semakin banyak dilakukan pengenceran, maka semakin tunggal pula koloni yang didapatkan. Variasi pengenceran jamur dan Standar McFarland 0,5 dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm, yaitu panjang gelombang maksimum yang didapatkan dari Standar McFarland (Fernanda *et al.*, 2018). Didapatkan data absorbansi hasil pengenceran jamur yang disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Absorbansi Pengenceran Jamur

Pengenceran Jamur	Absorbansi
10^{-1}	0,314
10^{-2}	0,033
10^{-3}	0,001
10^{-4}	0,007
10^{-5}	-0,002
10^{-6}	-0,001

Sedangkan untuk Standar McFarland 0,5 memiliki absorbansi 0,008. Maka diambil pengenceran jamur 10^{-4} yang mendekati absorbansi dari Standar McFarland 0,5, yaitu 0,007. Kemudian hasil pengenceran jamur 10^{-4} tersebut dicocokkan dengan tabel konsentrasi Standar McFarland berikut (Sutton, 2011) dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Konsentrasi Standar McFarland

Standar McFarland	CFU (x 10 ⁶ /mL)
0,5	<300
1	300
2	600
3	900
4	1200
5	1500
6	1800
7	2100

Satuan CFU (*Colony Forming Units*) yang merupakan satuan untuk mengetahui seberapa banyak koloni jamur dalam suatu tabung reaksi yang digunakan. Maka dapat disimpulkan bahwa konsentrasi jamur *Rhizopus oryzae* pada hasil pengenceran 10⁻⁴ mempunyai konsentrasi <300 × 10⁶ CFU/mL. Konsentrasi ini yang digunakan dalam proses fermentasi bekatul dengan varian waktu.

5.3 Fermentasi Bekatul dengan Varasi Waktu

Fermentasi dalam penelitian ini merupakan proses pemecahan molekul organik dalam skala besar yang terdapat di dalam sampel bekatul menggunakan mikroorganismenya dalam penelitian ini adalah *Rhizopus oryzae* menjadi yang lebih sederhana (Sharma *et al.*, 2020). Jamur *Rhizopus oryzae* digunakan dalam penelitian ini dikarenakan jamur tersebut mampu membantu meningkatkan kadar senyawa fenolik yang terikat dalam serat bekatul. Hal tersebut karena jamur *Rhizopus oryzae* mengandung enzim selulase yang mampu membuka serat selulosa, sehingga akan membuat senyawa fenolik dan senyawa antioksidan lain yang terdapat dalam bekatul tersebut menjadi terlepas dan larut dalam pelarut.

Pada proses fermentasi bekatul digunakan perbandingan bekatul:aquades adalah 1:3 (18 mL aquades : 54 mL aquades). Digunakan perbandingan tersebut karena yang paling maksimal jika dibandingkan dengan perbandingan 1:1 maupun 1:2 dalam pelarutan aquades terhadap bekatul.

Bekatul yang telah disterilisasi kemudian dilarutkan dengan aquades dalam erlenmeyer dan dihomogenkan. Kemudian ditambahkan 1 mL isolat jamur pada pengenceran 10^{-4} dan kembali dihomogenkan. Fermentasi bekatul dalam penelitian ini digunakan variasi waktu fermentasi. Variasi fermentasi yang dilakukan adalah 2, 5 dan 7 hari dengan pengulangan sebanyak dua kali (duplo), yang merupakan langkah yang bertujuan untuk mengetahui tingkat pemecahan senyawa antioksidan dalam bekatul dengan hitungan hari. Sehingga bisa dilihat kadar maksimum senyawa antioksidan yang dihasilkan dalam hari yang divariasikan.

Setelah selesai fermentasi pada hari yang ditentukan, masing-masing variasi sampel ditambahkan dengan eter untuk menghentikan proses fermentasi pada bekatul. Hasil yang didapatkan dapat dilihat pada Gambar 8.



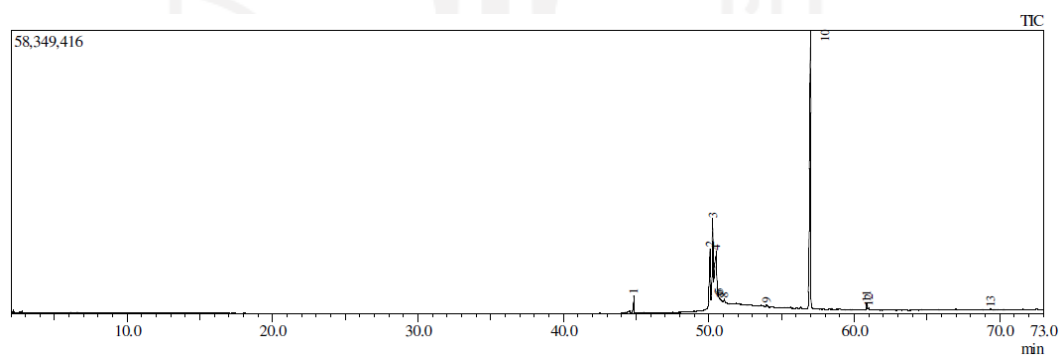
Gambar 8. Hasil Fermentasi 2,5 dan 7 hari (dari kiri ke kanan)

Dalam bekatul, senyawa bioaktif seperti senyawa fenolik memiliki bentuk yang terikat dengan senyawa lain, seperti lignin (Zhang *et al.*, 2010). Selain itu, senyawa bioaktif tersebut juga memiliki palatabilitas yang kurang disukai. Sehingga salah satu metode yang digunakan untuk meningkatkan senyawa fenolik sebagai antioksidan dalam penelitian ini adalah metode fermentasi (Faizah *et al.*, 2020). Menurut (Rashid *et al.*, 2015) metode fermentasi tersebut dapat digunakan untuk melepaskan ikatan fitokimia sehingga dapat meningkatkan bentuk bebas senyawa fenolik tersebut serta ketersediaannya yang disebabkan oleh kemampuan jamur *Rhizopus oryzae* untuk mendegradasi matriks polisakarida dan lignoselulosa secara enzimatis. Sehingga hal ini secara langsung juga disebabkan oleh variasi waktu fermentasi yang dilakukan.

Variasi waktu fermentasi berbanding lurus dengan jumlah enzim yang dihasilkan untuk mendegradasi senyawa fenolik dalam bekatul. Semakin lama waktu fermentasi, maka semakin banyak enzim yang dihasilkan oleh jamur sehingga semakin banyak pula senyawa fenolik yang terdegradasi di dalam bekatul.

Kemudian ketiga hasil fermentasi tersebut dilakukan analisis menggunakan instrument GC-MS, yang mana tujuannya adalah untuk memisahkan dan mengidentifikasi komponen-komponen campuran yang mudah menguap terdapat di dalam sampel bekatul hasil fermentasi. Selain itu fungsi instrument GC-MS juga untuk menentukan berat molekul suatu senyawa, MS yang digunakan dapat mengetahui rumus suatu molekul tanpa melalui analisis unsur terlebih dahulu dan juga dapat mengenali senyawa berdasarkan reaksi fragmentasinya, sehingga didapatkan cara tambahan untuk mengetahui apakah senyawa yang dianalisis tersebut termasuk senyawa golongan alkohol, asam karboksilat, aldehid dan lain sebagainya (LPPT-UGM, 2018).

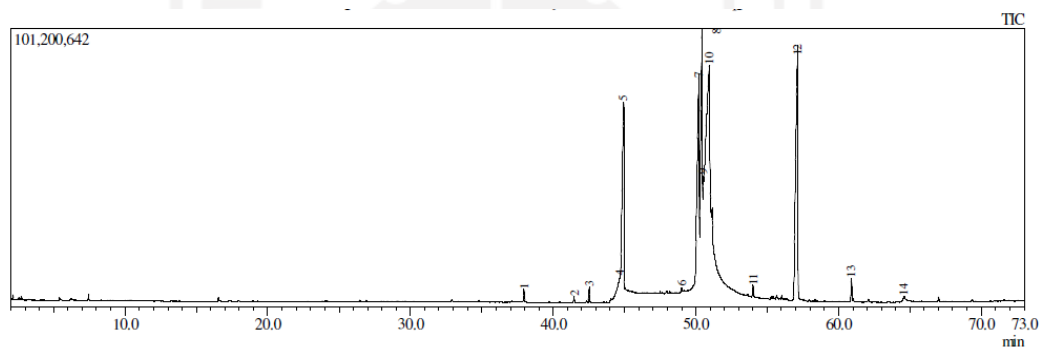
Data hasil GC-MS hari ke 2, 5 dan 7 disajikan dalam gambar dan tabel di bawah ini.



Gambar 9. Hasil GC pada hari ke-2(1)

Puncak	Waktu Retensi	% Area	Nama Senyawa
1	44.824	1,94	Hexadecanoic Acid
2	50.054	8,42	Octadecadienoic Acid
3	50.252	14,65	9-Octadecadienoic Acid
4	50.494	19,3	9,12-Octadecadienoic Acid
5	50.667	0,37	Oxyrane
6	50.708	0,16	Hexadecadien-7,11 ol
7	50.767	0,22	2-Decyne
8	51.050	0,24	Octadecanoic Acid
9	53.947	0,22	9-Octadecanoic Acid
10	56.974	52,82	Hexanedioic Acid
11	60.853	1,13	1,2-Benzenedicarboxylic Acid
12	60.990	0,32	9-Octadecanoic Acid
13	69.341	0,2	Nonacosane

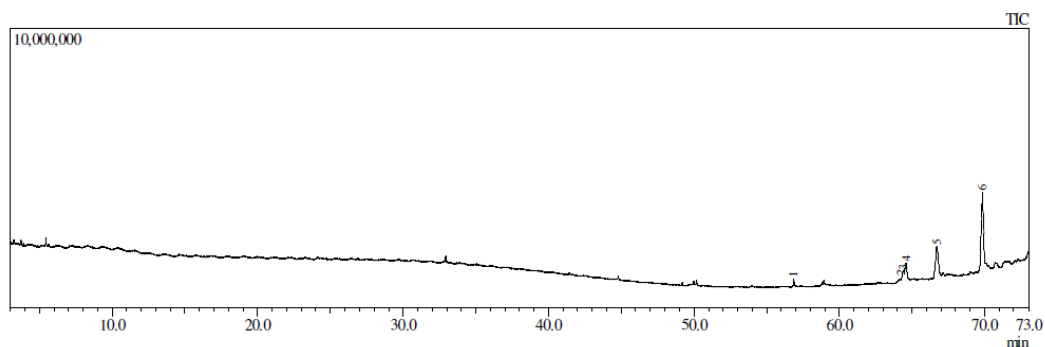
Tabel 4. Data GC Hari ke-2(1)



Gambar 10. Hasil GC hari ke-2(2)

Puncak	Waktu Retensi	% Area	Nama Senyawa
1	37.958	0,29	Tetradecanoic Acid
2	41.463	0,13	Hexanedioic Acid
3	42.518	0,37	Hexadecanoic Acid
4	44.667	0,53	Hexadecanoic Acid
5	44.940	10,17	Hexadecanoic Acid
6	48.997	0,11	Octadecanoic Acid
7	50.195	12,72	Ethyl Linoleat
8	50.432	13,88	9-Octadecanoic Acid
9	50.525	2,6	9-Octadecanoic Acid
10	50.946	40,33	9-Octadecenal
11	54.013	0,35	Oxiraneoctanoic Acid
12	57.126	17,39	Hexadionic Acid
13	60.907	0,74	1,2-Benzenedicarboxylic Acid
14	64.588	0,39	9-Octadecenal

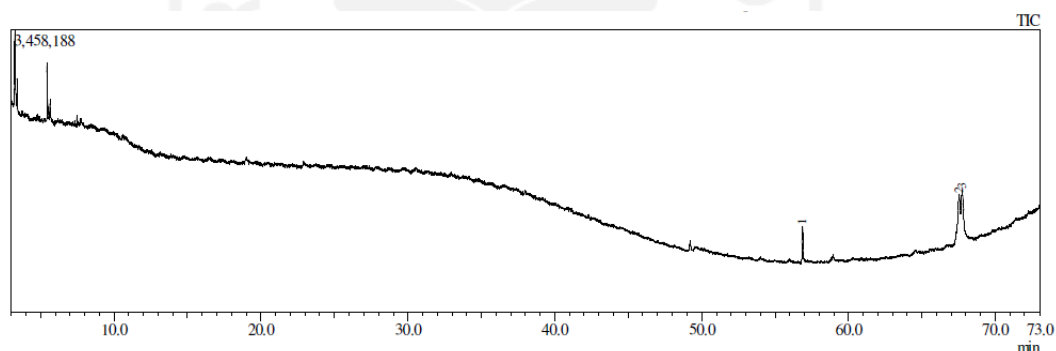
Tabel 5. Data GC Hari ke-2(2)



Gambar 11. Hasil GC Hari ke-5(1)

Puncak	Waktu Retensi	% Area	Nama Senyawa
1	56.858	2,13	Hexanedioic Acid
2	64.267	1	Octanedioic Acid
3	64.236	7,5	Ergost-5-en-3-ol
4	64.573	7,98	Stigmast-5-en-3-ol
5	66.693	25,47	Stigmasta-5,22-dien-3-ol
6	69.854	55,91	Stigmast-5-en-3-ol

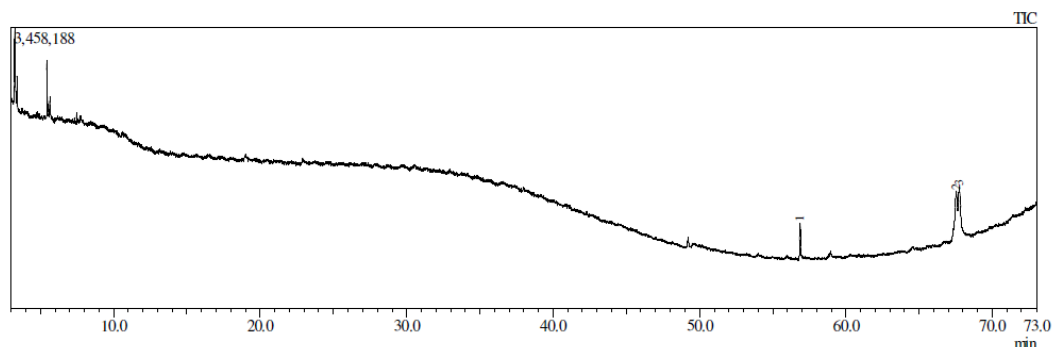
Tabel 6. Data Hasil GC Hari ke-5(1)



Gambar 12. Hasil GC Hari ke-5(2)

Puncak	Waktu retensi	% Area	Nama Senyawa
1	56.860	12,22	Hexanedioic Acid
2	60.125	46,88	9,19-Cyclolanost-23-ene-3,2-diol
3	60.442	15,72	8'-Apo.beta-Caroten-8'-al
4	60.542	25,64	9,19-Cyclolanost-3-ol

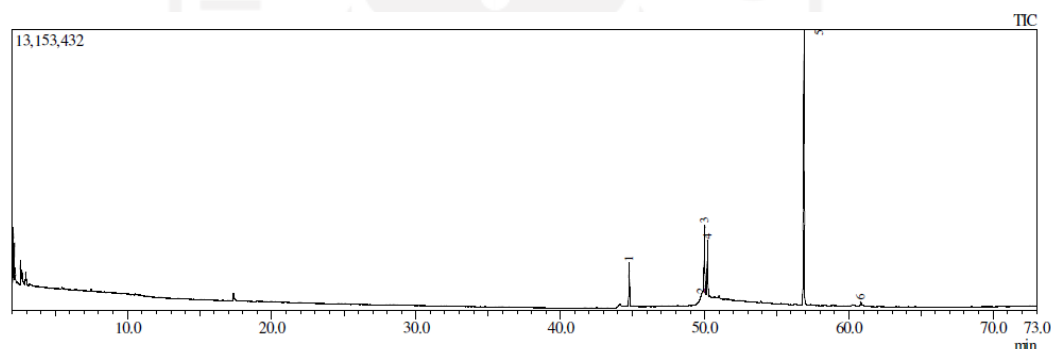
Tabel 7. Data Hasil GC Hari ke-5(2)



Gambar 13. Hasil GC Hari ke-7(1)

Puncak	Waktu retensi	% Area	Nama Senyawa
1	56.886	15,72	Hexanedioic Acid
2	67.521	38,49	2-Tert-Butyl-4,6-Bis(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxybenzyl) Phenol
3	67.739	45,79	4-Bromo-2,6-Bis(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxybenzyl) Phenol

Tabel 8. Data Hasil GC Hari ke-7(1)

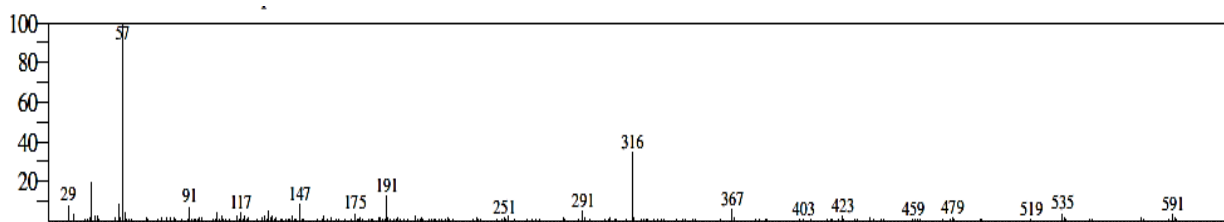


Gambar 14. Hasil GC Hari ke-7(2)

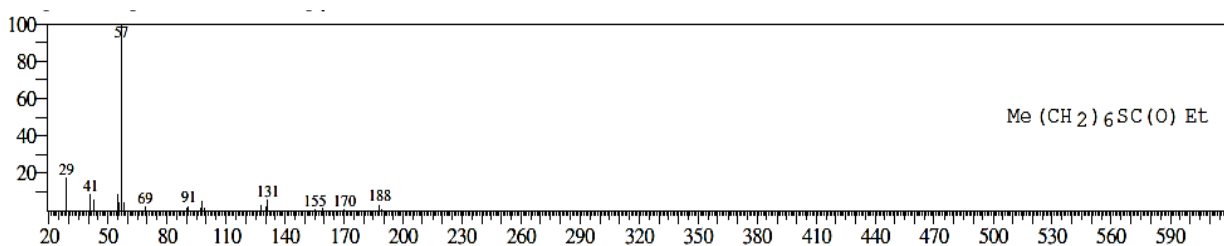
Peak	Waktu Retensi	% Area	Comp Name
1	44.773	8,41	Hexanedioic Acid
2	49.758	0,45	9,12-Octanedioic Acid
3	50.004	18,9	9,12-Octanedioic Acid
4	50.197	12,66	9-Hexadecanoic Acid
5	56.889	58,76	Hexanedioic Acid
6	60.882	0,82	1,2-Benzenedicarboxylic Acid

Tabel 9. Data Hasil GC Hari ke-7(2)

Dari keseluruhan hasil GC dilakukan analisis MS yang didapatkan senyawa fenolik muncul pada variasi waktu fermentasi hari ke-7(1) dengan analisis MS yang didapatkan adalah sebagai berikut:

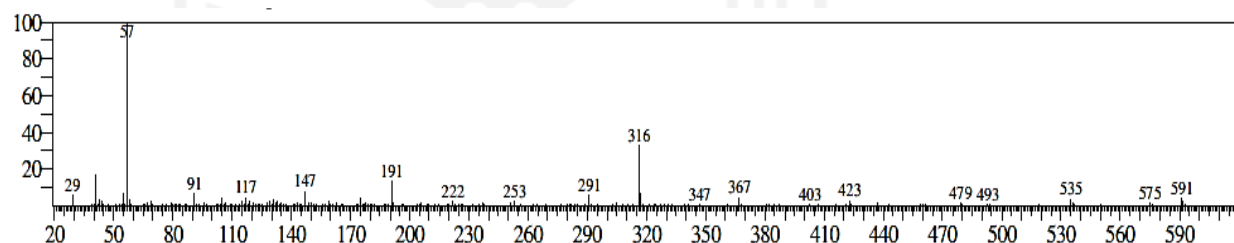


Gambar 15. Base Peak Line 2

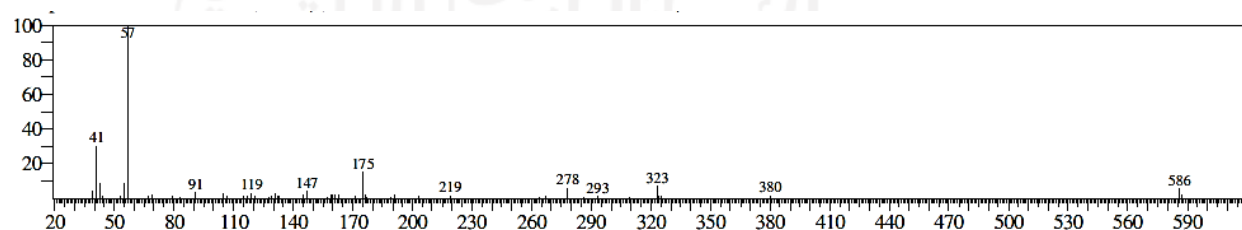


Gambar 12. Hit Line 2

Pada puncak 2 didapatkan senyawa dengan kemiripan 67% dari *base peak* (Gambar 16) sebagai referensi dengan intensitas 100%. Senyawa pada puncak 2 dinamakan *2-Tert-Butyl-4,6-Bis(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxybenzyl) Phenol*.



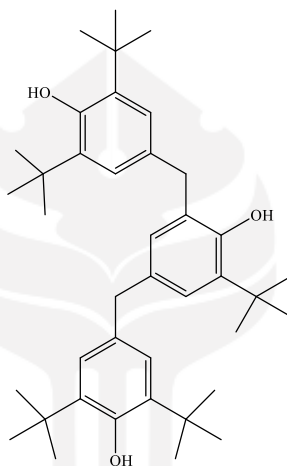
Gambar 13. Base Peak Line 3



Gambar 14. Hit 1 Line 3

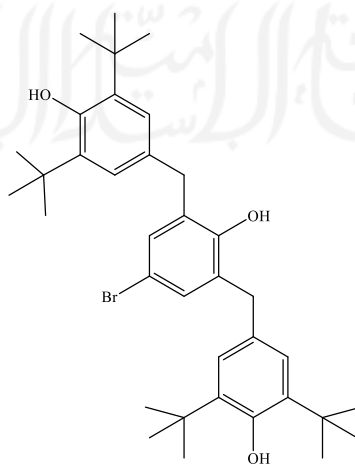
Pada line 3 didapatkan senyawa dengan kemiripan 67% dari *base peak* sebagai referensi dengan intensitas sebesar 100%. Senyawa pada puncak 3 dinamakan *4-Bromo-2,6-Bis(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxybenzyl) Phenol*.

Dari variasi waktu fermentasi yang dilakukan, dapat ditarik kesimpulan bahwa dibutuhkan minimal 7 hari untuk mengekstrak senyawa fenolik dalam bekatul dengan bantuan *Rhizopus oryzae*. Total senyawa fenolik yang dihasilkan adalah mencapai 84,28 % (2 puncak) dari total substrat bekatul 18 gram dan aquades 54 mL. Sumbu X menyatakan berat molekul yang terfragmentasi dan sumbu Y menyatakan kelimpahan relatif (*Relative Abundance*). Dalam hasil analisis GC-MS tersebut senyawa antioksidan fenolik yang didapatkan melebihi 50% dari total substrat dalam satu variasi konsentrasi. Untuk struktur masing-masing senyawa dapat dilihat pada Gambar 16 dan 17.



Gambar 16. Struktur 2-Tert-Butyl-4,6-Bis(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxybenzyl) Phenol (Senyawa A)

Sumber : <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.474770.html>



Gambar 17. Struktur 4-Bromo-2,6-Bis(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxybenzyl) Phenol (Senyawa B)

Sumber : <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.474584.html>

5.4 Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Fenolik

Antioksidan merupakan molekul yang dapat berinteraksi dan menghambat proses inisiasi maupun propagasi reaksi oksidasi yang dihasilkan oleh radikal bebas. Senyawa antioksidan tersebut mampu menghambat reaktivitas radikal bebas melalui beberapa mekanisme termasuk donasi hidrogen, *radical scavenging* dan *quenching* oksigen tunggal (Antolovich *et al.*, 2002).

Penentuan aktivitas antioksidan senyawa fenolik dalam sampel bekatul menggunakan metode DPPH, yaitu *2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl* dianggap sebagai metode yang cepat, sederhana dan akurat untuk mengukur kemampuan senyawa yang berbeda dan bertindak *free radical scavengers* atau donor hidrogen dan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan (Prakash, 2001).

Prinsip pengukuran aktivitas antioksidan secara kuantitatif menggunakan metode DPPH adalah adanya perubahan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan konsentrasi larutan DPPH tersebut. Radikal bebas DPPH yang memiliki elektron yang tidak berpasangan akan memberikan warna ungu. Warna akan berubah menjadi kuning saat elektronnya berpasangan. Perubahan intensitas warna ungu ini terjadi karena adanya peredaman radikal bebas yang dihasilkan oleh bereaksinya molekul DPPH dengan atom hidrogen yang dilepaskan oleh molekul senyawa sampel sehingga terbentuk senyawa *diphenyl-picryl-hydrazine* dan menyebabkan terjadinya perubahan warna DPPH dari ungu menjadi kuning. Perubahan warna ini mengakibatkan perubahan absorbansi pada panjang gelombang maksimum DPPH menggunakan spektrofotometri UV-Vis sehingga akan diketahui nilai aktivitas peredaman radikal bebas yang dinyatakan dengan nilai *inhibitory concentration* (IC₅₀) (Molyneux, 2004).

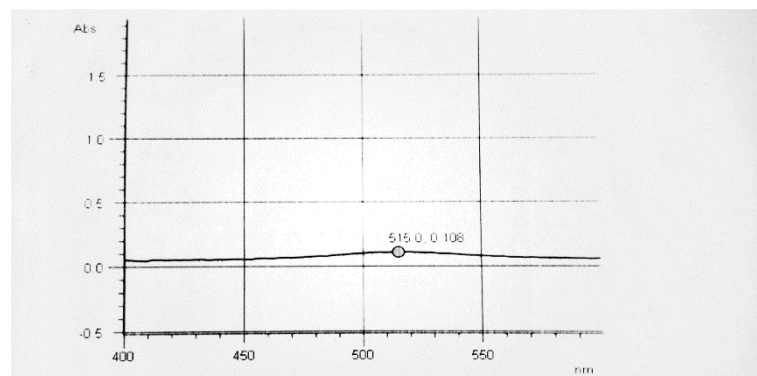
Menurut Molyneux (2004) antioksidan bereaksi dengan *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil* (DPPH) yang menstabilkan radikal bebas dan mereduksi DPPH. Kemudian DPPH akan bereaksi dengan atom hidrogen dari senyawa peredam radikal bebas membentuk *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazin* (DPPH-H) yang lebih stabil. Reagen DPPH yang bereaksi dengan antioksidan akan mengalami perubahan warna dari ungu ke kuning, intensitas warna tergantung kemampuan dari antioksidan.

Aktivitas antioksidan dari suatu senyawa dapat digolongkan berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh. Jika nilai IC_{50} suatu ekstrak berada dibawah 50 ppm maka aktivitas antioksidannya kategori sangat kuat, nilai IC_{50} berada diantara 50-100 ppm berarti aktivitas antioksidannya kategori kuat, nilai IC_{50} berada di antara 100-150 ppm berarti aktivitas antioksidannya kategori sedang, nilai IC_{50} berada di antara 150-200 ppm berarti aktivitas antioksidannya kategori lemah, sedangkan apabila nilai IC_{50} berada diatas 200 ppm maka aktivitas antioksidannya dikategorikan sangat lemah ((Molyneux, 2004).

5.4.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum bertujuan untuk mengetahui nilai panjang gelombang dimana komponen menyerap maksimum terhadap sinar monokromatis pada alat yang digunakan. Bila cahaya mengenai senyawa pada sampel, maka ada sebagian cahaya yang diserap oleh molekul lain yang sesuai dengan struktur dari molekul senyawa tersebut. Karena terdapat perbedaan energi antara tingkat dasar dan tereksitasi spesifik untuk tiap-tiap senyawa, maka frekuensi yang diserap juga spesifik (panjang gelombang tertentu).

Sebelum dilakukan analisis terhadap sampel, dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum terlebih dahulu dengan tujuan agar dapat memberikan kepekaan sampel yang mengandung senyawa senyawa fenolik dengan maksimal. Hasil kurva absorbansi diharapkan linear dan mendapatkan hasil yang cukup konstan. Pelarut yang digunakan adalah pelarut metanol. Selain sebagai pelarut, metanol juga berfungsi sebagai blanko dengan tujuan untuk mengkalibrasi instrument Spektrofotometer UV-Vis agar dapat meminimalisir kesalahan pada pemakaian alat sehingga diperoleh besar absorbansi dan panjang gelombang maksimum sampel dengan tingkat ketelitian yang tinggi. Berikut hasil gambar penentuan panjang gelombang maksimum disajikan pada Gambar 18.



Gambar 18. Panjang Gelombang Maksimum DPPH

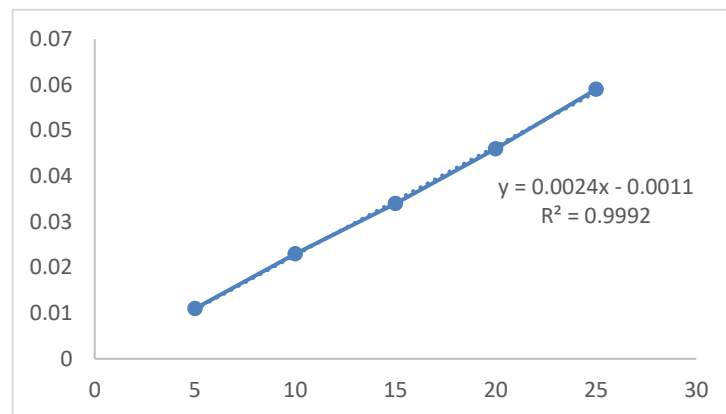
Nilai panjang gelombang maksimum yang didapatkan telah sesuai dengan referensi yang ada yaitu berkisar 515 nm sampai 520 nm (Tristantini *et al.*, 2016). Sehingga panjang gelombang 515 nm tersebut digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH.

5.4.2 Pengukuran Kurva Standar DPPH

Pengukuran kurva standar DPPH dibuat dari larutan standar DPPH. Larutan standar DPPH tidak mengandung analit, artinya hanya terdapat serbuk DPPH yang dilarutkan dengan pelarut metanol. Tujuan pembuatan larutan ini adalah untuk digunakan sebagai kontrol atau acuan oleh larutan yang akan ditambahkan dengan analit. Dalam penelitian ini digunakan larutan standar dengan konsentrasi 5; 10; 15; 20 dan 25 ppm. Setelah diukur dengan instrumen Spektrofotometer UV-Vis, hasil absorbansi yang didapatkan disajikan dalam Tabel 11 dan Gambar 19.

Tabel 10. Hasil Absorbansi Larutan Standar

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Persamaan Regresi Linear
5	0,011	$y=0,0024x-0,0011$ $R^2=0,9992$
10	0,023	
15	0,034	
20	0,046	
25	0,059	



Gambar 19. Kurva Standar DPPH

Persamaan regresi linear ini merupakan hubungan antara seri konsentrasi atau kadar senyawa fenolik yang terkandung dalam sampel dengan absorbansi senyawa fenolik. Grafik kurva standar senyawa fenolik dapat dilihat pada Gambar 7 dengan nilai intersep (a)=-0,0011 dan nilai slop (b)=0,0024 dengan nilai korelasi (R^2)=0,9992. Data absorbansi yang didapatkan sudah tergolong baik, karena korelasi yang didapatkan mendekati 1.

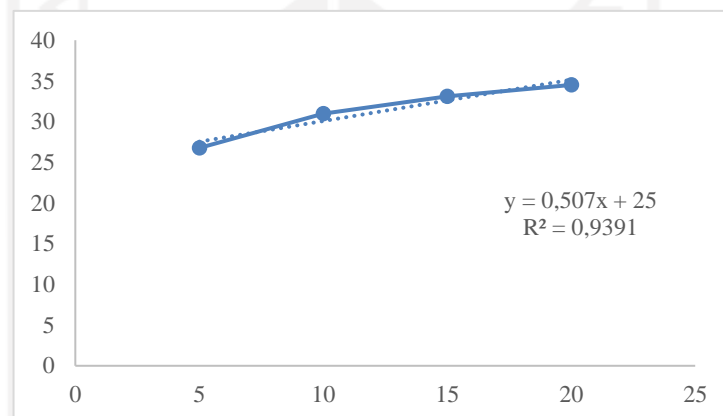
5.4.3 Pengukuran Aktivitas Antioksidan Sampel Bekatul

Pengukuran aktivitas antioksidan sampel bekatul digunakan variasi konsentrasi 5; 10; 15 dan 20 ppm yang diukur absorbansinya dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm. Hasil pengukuran absorbansi dan perhitungan aktivitas antioksidannya disajikan dalam Tabel 12.

Kons (ppm)	Abs Sampel	% Inhibisi	Abs Kontrol	Pers. Regresi Linear	IC ₅₀ (ppm)	Keterangan
5	0,104	26,76056338				
10	0,098	30,98591549				
15	0,095	33,09859155	0,142	y=0,2817x+25	49,31	Sangat Kuat
20	0,093	34,50704225				

Tabel 11. Perhitungan Nilai IC₅₀ Ekstrak Bekatul

Nilai IC_{50} ekstrak bekatul didapat dari hasil perhitungan persamaan regresi linier pada tabel 3 di atas, dimana persamaan regresi dari ekstrak metanol yang didapat pada tabel 3 di atas adalah $y = 2,3592x + 11,338$ dan $R^2 = 0,9391$. Koefisien y pada persamaan ini adalah sebagai IC_{50} , sedangkan koefisien x pada persamaan ini adalah konsentrasi dari ekstrak yang akan dicari nilainya, dimana nilai dari x yang didapat merupakan besarnya konsentrasi yang diperlukan untuk dapat meredam 50% aktivitas radikal DPPH. Nilai $R^2 = 0,9391$ yang mendekati 1 (bernilai positif) menggambarkan bahwa dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak maka semakin besar aktivitas antioksidannya hal ini dapat dilihat dari kurva hubungan konsentrasi ekstrak bekatul terhadap % Inhibisi pada Gambar 20 berikut.



Gambar 20. Grafik Hubungan Konsentrasi dan % Inhibisi Ekstrak Bekatul

Pengukuran ini dilakukan untuk mengetahui absorbansi DPPH yang tersisa setelah ditambahkan ekstrak senyawa fenolik yang terkandung dalam sampel. Penurunan nilai absorbansi DPPH pada panjang gelombang 515 nm menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki aktivitas antioksidan. Penurunan absorbansi DPPH diukur terhadap kontrol yaitu absorbansi DPPH dalam metanol ditambah DPPH tanpa penambahan sampel. Hubungan antara konsentrasi dengan nilai absorbansi adalah semakin konsentrasi maka semakin kecil nilai absorbansinya, hal ini dikarenakan semakin besar konsentrasi ekstrak dalam sampel akan semakin banyak mereduksi radikal DPPH sehingga nilai serapan absorbansinya semakin kecil. Perubahan warna dari ungu menjadi kuning menandakan terjadinya penurunan absorbansi DPPH. Ketika larutan DPPH yang berwarna ungu bertemu dengan bahan pendonor elektron maka DPPH akan tereduksi, menyebabkan warna

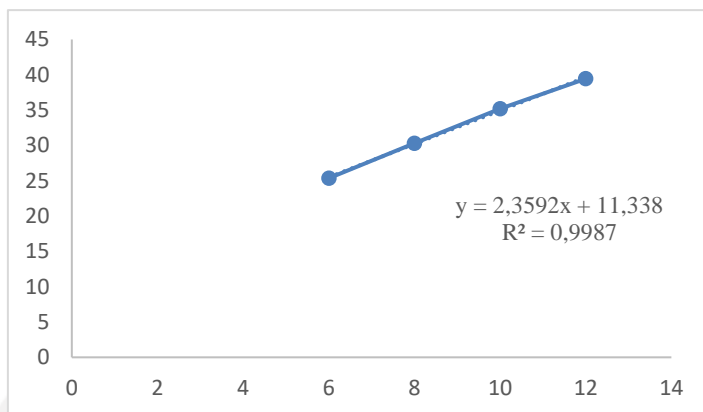
ungu akan memudar dan digantikan warna kuning yang berasal dari gugus pikril (Prayoga, 2013). Sehingga besarnya absorbansi DPPH berbanding terbalik dengan konsentrasi ekstrak senyawa fenolik yang ditambahkan.

Pengujian aktivitas antioksidan senyawa fenolik dibandingkan dengan Asam Askorbat. Asam askorbat digunakan sebagai kontrol positif dalam pengukuran aktivitas antioksidan karena asam askorbat mempunyai potensi sebagai pendonor elektron, dengan cara memindahkan suatu elektron ke senyawa yang direaksikannya, dalam penelitian ini adalah DPPH. Asam askorbat mampu bereaksi dengan radikal bebas, kemudian mengubahnya menjadi radikal askorbil. Senyawa radikal terakhir ini akan segera berubah menjadi askorbat dan dehidroaskorbat (Winarsi, 2007).

Larutan induk asam askorbat 100 ppm dibuat dengan hati-hati dan tidak dilakukan pembuatan di tempat yang banyak terdapat sinar matahari, hal ini dikarenakan asam askorbat sangat mudah teroksidasi secara reversibel menjadi asam L-dehidroaskorbat yang secara kimia sangat labil dan dapat mengalami perubahan lebih lanjut menjadi asam L-diketogulonat yang tidak memiliki keaktifan sebagai Vitamin C lagi (Buckle, 1987). Asam askorbat yang digunakan dalam penelitian ini divariasikan konsentrasinya yaitu 6; 8; 10 dan 12 ppm. Kemudian diukur dengan instrumen Spektrofotometer UV-Vis Double Beam dengan panjang gelombang 515 nm. Hasil yang didapatkan disajikan dalam Tabel 13 dan Gambar 21 berikut ini.

Tabel 12. Perhitungan Nilai IC₅₀ Asam Askorbat

Kons (ppm)	Abs	Abs Kontrol	% Inhibisi	Pers. Regresi Linear	IC₅₀ (ppm)	Ket
6	0,106		25,35211268			
8	0,099	0,142	30,28169014	y=2,3592x+11,338 R ² =0,9391	16,39	Sangat Kuat
10	0,092		35,21126761			
12	0,086		39,43661972			



Gambar 21. Grafik Hubungan Konsentrasi dan % Inhibisi Asam Askorbat

Nilai absorbansi yang didapat maka dapat dihitung nilai persentase penghambatan radikal DPPH (% inhibisi). Selanjutnya diperoleh kurva regresi linier dan persamaannya dengan konsentrasi sebagai sumbu x dan absorbansi % Inhibisi sebagai sumbu y. Kurva regresi linear dapat dilihat pada gambar 8 dan 9. Pada asam askorbat didapatkan kurva regresi linear dengan nilai $y = 2,3592x + 11,338$ dan $R^2 = 0,9987$. Sedangkan untuk sampel senyawa fenolik didapatkan nilai regresi linearnya adalah $y = 0,507x + 25$ dan $R^2 = 0,9391$.

Sedangkan untuk nilai IC_{50} dapat dihitung dari persamaan regresi linier yang sebelumnya telah diperoleh dengan mengganti y dengan 50 pada persamaan tersebut. Nilai IC_{50} merupakan suatu bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel dalam satuan ppm yang mampu menghambat proses oksidasi DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} menunjukkan semakin tinggi aktivitas antioksidan yang ditunjukkan Zuhra *et al.*, (2008). Hal ini dikarenakan konsentrasi IC_{50} yang digunakan untuk meredam aktivitas radikal bebas, apabila semakin sedikit konsentrasinya, maka keefektifan senyawa tersebut semakin bagus. Sehingga tidak membutuhkan banyak konsentrasi sampel untuk meredam aktivitas radikal bebas, maka semakin sedikit konsentrasi yang dibutuhkan, semakin bagus nilai IC_{50} -nya. Nilai IC_{50} yang didapatkan dalam asam askorbat adalah 16,39 ppm yang termasuk kategori sangat kuat sedangkan untuk IC_{50} yang didapatkan dalam sampel adalah sebesar 49,31 ppm yang termasuk kategori kuat. Yang berarti pada senyawa fenolik dapat disimpulkan dengan konsentrasi bekatul : aquades (1:3) dibutuhkan konsentrasi penghambatan sebesar 49,31 ppm untuk meredam 50%

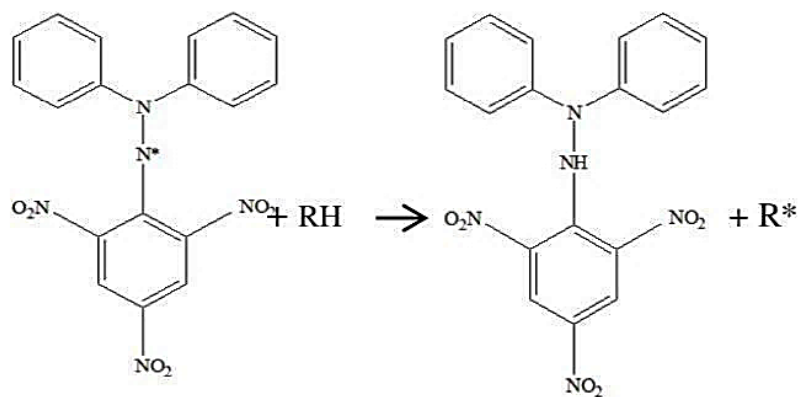
aktivitas radikal bebas pada DPPH. Konsentrasi ini menunjukkan kereaktifan senyawa fenolik pada sampel bekatul. Hal ini disesuaikan dengan parameter IC_{50} yang diungkapkan oleh Molyneux (2004) mengenai data penggolongan sifat antioksidan berdasarkan nilai IC_{50} dapat dilihat pada Tabel 14.

Tabel 13. Penggolongan Sifat Antioksidan

Nilai IC_{50}	Sifat Antioksidan
< 50 ppm	Sangat Kuat
50 ppm – 100 ppm	Kuat
100 ppm – 150 ppm	Sedang
150 ppm – 200 ppm	Lemah

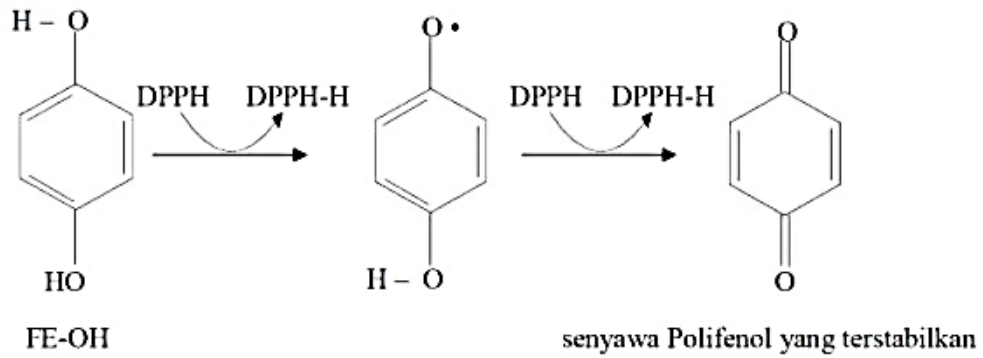
5.4.4 Mekanisme Reaksi Senyawa Fenolik dengan DPPH

Secara umum reaksi yang terjadi pada senyawa antioksidan dan DPPH dapat dilihat pada Gambar 22 (Prakash, 2001):



Gambar 22. Reaksi Umum DPPH dan Antioksidan

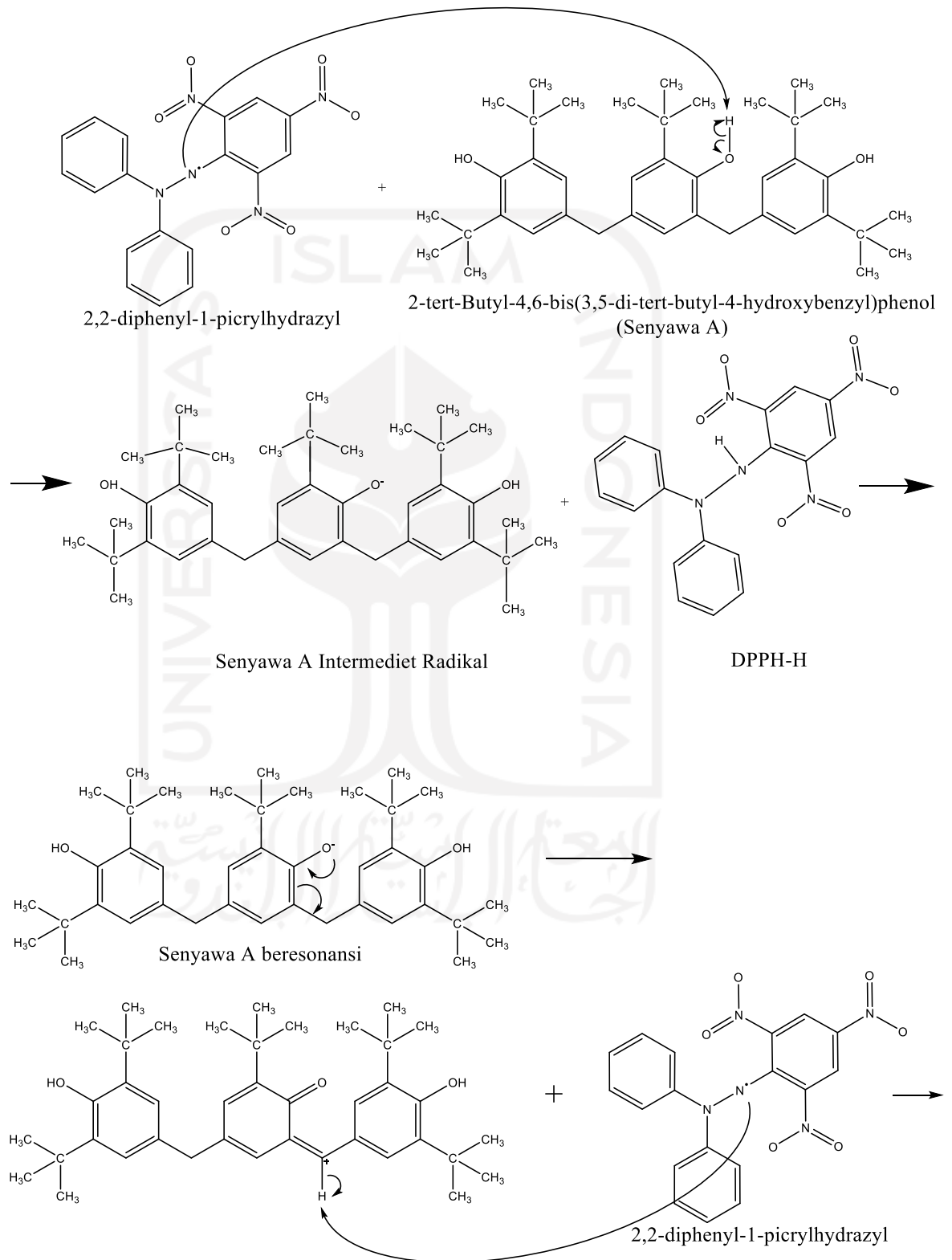
Sedangkan untuk reaksi senyawa golongan fenolik dengan DPPH adalah seperti Gambar 23 (Choliso, 2008):

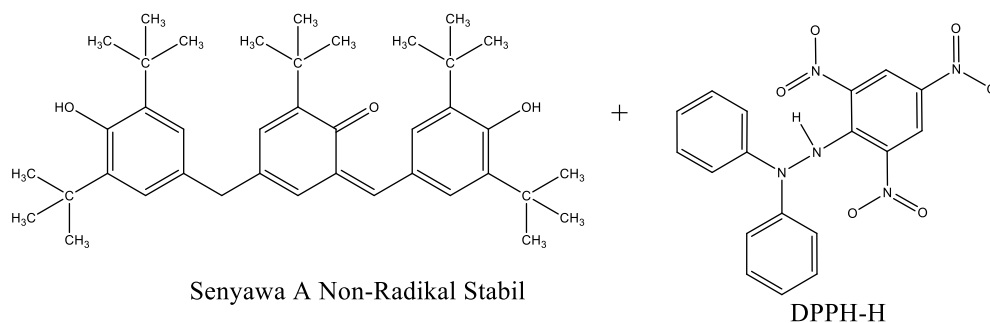


Gambar 23. Reaksi Fenolik Terhadap DPPH



Contoh perkiraan mekanisme reaksi yang terjadi pada senyawa fenolik dalam sampel bekatul dengan DPPH dapat dilihat pada Gambar 24.





Gambar 24. Mekanisme Reaksi Senyawa A dengan DPPH

DPPH sebagai penyedia radikal bebas yaitu electron bebas pada atom N, kemudian menyerang Senyawa A pada atom H yang terikat pada gugus hidroksil. Selanjutnya terbentuk Senyawa A intermediet radikal pada posisi O kelebihan elektron (radikal bebas) dan DPPH yang sudah stabil tidak radikal.

Kemudian Senyawa A beresonansi dan membentuk gugus karbonil dan terjadi penyerangan ulang dari DPPH radikal bebas yang termasuk ke dalam reaksi kedua. DPPH radikal menyerang Hidrogen dari Senyawa A radikal yang kemudian pada tahap terakhir membentuk Senyawa A Non-Radikal Stabil. Reaksi dalam mekanisme tersebut terjadi pengulangan (duplo) untuk menghasilkan senyawa yang tidak radikal, sehingga tidak menimbulkan reaksi radikal bebas berantai.

Sebuah penelitian yang dilakukan oleh (Rai & Arnata, 2014) yang berjudul Stabilitas Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bekatul Beras Merah Terhadap Oksidator dan Pemanasan Pada Berbagai pH. Dilakukan penelitian pada bekatul beras merah yang mengandung komponen bioaktif dalam jumlah yang tinggi termasuk didalamnya senyawa fenolik. Tujuan dari penelitian tersebut adalah mengekstrak komponen bioaktif bekatul beras merah dan menguji stabilitas aktivitas antioksidannya. Penelitian tersebut dirancang menggunakan rancangan acak lengkap faktorial dengan 2 faktor. Faktor pertama adalah pH maserasi yang terdiri dari 3 taraf yaitu: 1, 2.5, dan 4. Faktor kedua adalah rasio bekatul dengan pelarut etanol yang terdiri dari 4 taraf yaitu: 1:4, 1:6, 1:8, dan 1:10. Parameter ekstraksi yang diamati meliputi total fenolik, total antosianin, aktivitas antioksidan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstraksi pada pH 1 dan rasio bekatul dengan pelarut 1:10 memberikan hasil terbaik dengan nilai total antosianin, total fenolik,

dan aktivitas antioksidan masing-masing adalah 5.45 mg/100 g bekatul, 743.51 mg/100 g bekatul, dan 92.19% dengan nilai IC_{50} sebesar 441.74 mg/L. Reduksi aktivitas antioksidan ekstrak bekatul beras merah oleh pemanasan lebih besar dibandingkan oleh oksidator. Nilai IC_{50} yang didapatkan termasuk ke dalam kategori sangat lemah. Nilai IC_{50} yang rendah bisa disebabkan oleh jenis varietas bekatul yang digunakan. Jenis bekatul yang digunakan mempengaruhi hasil IC_{50} karena kandungan senyawa bioaktif dalam tiap-tiap bekatul tidak sama, sehingga aktivitas antioksidan yang dihasilkan juga tidak sama.



BAB VI

PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Senyawa fenolik yang dihasilkan dalam fermentasi bekatul oleh *Rhizopus oryzae* adalah senyawa *2-Tert-Butyl-4,6-Bis(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxybenzyl) Phenol* dan *4-Bromo-2,6-Bis(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxybenzyl) Phenol* dan didapatkan Persamaan Regresi Linear $y=0,2817x+25$ dan IC_{50} 49,31 ppm (kuat).

6.2 Saran

Perlu dilakukan karakterisasi FTIR dan NMR untuk memastikan lebih lanjut terkait senyawa yang dihasilkan pada proses isolasi ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abd. Razak, D.L., Abd. Rashid, N. Y., Jamaluddin, A., Abd Ghani, A., & Abdul Manan, M. (2021). Antioxidant Activities, Tyrosinase Inhibition Activity And Bioactive Compounds Content Of Broken Rice Fermented With *Amylomyces Rouxii*. *Food Research*, 5(S1), 65–72.
- Abd Razak, Dang Lelamurni, Abd Rashid, N. Y., Jamaluddin, A., Sharifudin, S. A., & Long, K. (2015). Enhancement Of Phenolic Acid Content And Antioxidant Activity Of Rice Bran Fermented With *Rhizopus Oligosporus* And *Monascus Purpureus*. *Biocatalysis And Agricultural Biotechnology*, 4(1), 33–38.
- Alasalvar, C., Grigor, J. M., Zhang, D., & Quantick, P. C. (2001). *Comparison Of Volatiles , Phenolics , Sugars , Antioxidant Vitamins , And Sensory Quality Of Different Colored Carrot Varieties*. 1410–1416.
- Anggraito, Y. U., Susanti, R., Iswari, R. S., Yuniastuti, A., Lisdiana, WH, N., Habibah, N. A., & Bintari, S. H. (2018). Metabolit Sekunder Dari Tanaman : Aplikasi Dan Produksi. In *Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang*. Universitas Negeri Semarang.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., Mcdonald, S., & Robards, K. (2002). Methods For Testing Antioxidant Activity. *Analyst*, 127(1), 183–198.
- Apak, Resat, Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., & Güçlü, K. (2013). Methods Of Measurement And Evaluation Of Natural Antioxidant Capacity / Activity (IUPAC Technical Report)*. *Pure Application Of Chemistry*, 85(5), 957–998.
- Ardiansyah, A., Gustriani, D., Handoko, D., Kusbiantoro, B., & Budijanto, S. (2018). The Antioxidant Activity Of Indonesian Fermented Rice Bran With *Rhizopus Oligosporus*. *Food Science And Technology: Integration For ASEAN Economic Community Sustainable Development, November 2017*.
- Arifin, A. S., Yuliana, N. D., Rafi, M., Pangan, T., Pertanian, F. T., Bogor, P., Bogor, D., Kimia, D., Ilmu, F., Alam, P., Bogor, P., & Bogor, D. (2019). *Aktivitas Antioksidan Beras Aktivitas Antioksidan Pada Beras Berpigmen Dan Dampaknya Terhadap Kesehatan Antioxidant Activity Of Pigmented Rice And Impact On Health*.
- Badan Pusat Statistik. (2015). *No Title*.
<https://www.bps.go.id/pressrelease/2015/03/02/1122/Produksi-Padi-Tahun-2014--Angka-Sementara--Diperkirakan-Turun-0-63-Persen.html>
- Bhat, F. M., Sommano, S. R., Riar, C. S., Seesuriyachan, P., Chaiyaso, T., & Prom-U-Thai, C. (2020). Status Of Bioactive Compounds From Bran Of Pigmented Traditional Rice Varieties And Their Scope In Production Of Medicinal Food With Nutraceutical Importance. *Agronomy*, 10(11), 1817.

- Cappuccino; James G. (N.D.). *Daftar Isi Manual Laboratorium Mikrobiologi Ed.Pdf*.
- Cholisoh, Z. (2008). Aktivitas Penangkap Radikal Ekstrak Etanol 70% Biji Jengkol (Archidendron Jiringa). In *Jurnal Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta*.
- Clark, J. (2007). *Kromatografi Gas-Cair*. Www.Chem-Is-Try.Org
- Dhirgo Adji, Zuliyanti, H. L. (2007). Perbandingan Efektivitas Sterilisasi Alkohol 70%, Inframerah, Otoklaf Dan Ozon Terhadap Pertumbuhan Bakteri Bacillus Subtilis. *Jurnal Sain Veteriner*, 25(1).
- El Guiche, R., Tahrouch, S., Amri, O., El Mehrach, K., & Hatimie, A. (2015). Antioxidant Activity And Total Phenolic And Flavonoid Contents Of 30 Medicinal And Aromatic Plants Located In The South Of Morocco. *International Journal Of New Technology And Research (IJNTR)*, 1(3), 7–11.
- Faizah, F., Kusnandar, F., & Nurjanah, S. (2020). Senyawa Fenolik, Oryzanol, Dan Aktivitas Antioksidan Bekatul Yang Difermentasi Dengan Rhizopus Oryzae. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan*, 31(1), 86–94
- Fatisa, Y. (2013). Daya Antibakteri Ekstrak Kulit Dan Biji Buah Pulasan (Nephelium Mutabile) Terhadap *staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Secara In Vitro. *Jurnal Peternakan*, 10(1), 31–38.
- Fernanda, M., Carrillo-Sosa, M., Rodríguez-Delgado, I., Flores-Treviño, J. J., De, M. A., Garza-Ramos, L., Madla-Cruz, E., Escamilla-García, E., & Cardenas-Estrada, E. (2018). Journal Of Dentistry And Oral Hygiene In Vitro Antimicrobial Activity Of Catdex Against Porphyromonas Endodontalis. *Journal Of Density And Oral Hygiene*, 10(2), 13–17.
- Fessenden, R.J. And Fessenden, J. S. (1982). *Kimia Organik, Diterjemahkan Oleh Pudjaatmakan, A. H.* (3rd Ed.). Penerbit Erlangga.
- Fikriyah, Z. (2018). Pengaruh Lama Fermentasi dan Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Antioksidan Bekatul Terfermentasi Oleh *Rhizopus oryzae*. In *Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim* (Vol. 2). Universitas Maulana Malik Ibrahim.
- G. S. Germain, And R., S. (2006). *Identifying Filamentous Fungi*. Microbiological Science.
- Gandjar, I.G., Rohman. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar.
- Hanin, N. N. F., & Pratiwi, R. (2017). Kandungan Fenolik, Flavonoid Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Paku Laut (Acrostichum Aureum L.) Fertil Dan Steril Di Kawasan Mangrove Kulon Progo, Yogyakarta. *Journal Of Tropical Biodiversity And Biotechnology*, 2(2), 51.

- Hättenschwiler, S., & Vitousek, P. M. (2000). Hattenschwiller & Vitousek 2000 Polyphenols And Nutrient Cycling. *Tree*, 15(6), 238–243.
- Hidayah, N. (2015). Berkala Ilmiah Kimia Farmasi. In *Departemen Kimia Farmasi* (Vol. 4, Issue 1). Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. <https://Eur-Lex.Europa.Eu/LegalContent/PT/TXT/PDF/?Uri=CELEX:32016R0679&From=PT%0Ahttp://EurLex.Europa.Eu/Lexuriserv/Lexuriserv.Do?Uri=CELEX:52012PC0011:Pt:NOT>
- Hidayanto, A. P. (2017). *Modul Teknologi Fermentasi. Ibp 611*.
- Hikmah, J. (2018). Pengaruh Ph Dan Suhu Terhadap Aktivitas Antibakteri Bekatul Terfermentasi Rhizopus Oryzae. In *Skripsi* (Vol. 2).
- Hiselli, A. N. G., Erafini, M. A. S., & Atella, F. A. N. (2000). Forum : Oxidative Stress Status Total Antioxidant Capacity As A Tool To Assess Redox Status : Critical View And Experimental Data. *Free Radical Biology & Medicine*, 29(11), 1106–1114.
- Hole, A. S., Rud, I., Grimmer, S., Sigl, S., Narvhus, J., & Sahlstrøm, S. (2012). Improved Bioavailability Of Dietary Phenolic Acids In Whole Grain. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 60, 6369–6375.
- Holland, C., Ryden, P., Edwards, C. H., & Grundy, M. M. L. (2020). Plant Cell Walls: Impact On Nutrient Bioaccessibility And Digestibility. *Foods*, 9(2), 1–16.
- Huang. (2005). The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal Of Agricultur And Food Chemistry*, 53, 1841.
- Hudson, B. J. . (1990). Herz-Kreislaufferkrankungen So. *Food Antioxidant*, 56.
- Irawan, A. (2019). Kalibrasi Spektrofotometer Sebagai Penjaminan Mutu Hasil Pengukuran Dalam Kegiatan Penelitian Dan Pengujian. *Indonesian Journal Of Laboratory*, 1(2), 1–9.
- Issara, U., & Rawdkuen, S. (2016). Rice Bran: A Potential Of Main Ingredient In Healthy Beverage. *International Food Research Journal*, 23(6), 2306–2318.
- Kalogianni, A. I., Lazou, T., Bossis, I., & Gelasakis, A. I. (2020). Natural Phenolic Compounds For The Control Of Oxidation, Bacterial Spoilage, And Foodborne Pathogens In Meat. *Foods*, 9(6), 1–28.
- Kapupara, P. P., Dholakia, S. P., Patel, V. P., & Suhagia, B. N. (2011). Journal Of Chemical And Pharmaceutical Research Preparations. *Journal Of Chemical And Pharmaceutical Research*, 3(4), 287–294.
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis And Development Of DPPH Method Of Antioxidant Assay. 48(August), 412–422.

- Kesuma, Y. (2015). *Antioksidan Alami Dan Sintetik*.
- Lai, P., Li, K. Y., Lu, S., & Chen, H. H. (2009). Phytochemicals And Antioxidant Properties Of Solvent Extracts From Japonica Rice Bran. *Food Chemistry*, 117(3), 538–544.
- Lestari. (2014). *Uji Daya Hidup Bakteri Asam Laktat Sebagai Kandidat Probiotik Pada Beberapa Media Preparasi Air Minum Unggas*.
- Lichtenthäler, R., Marx, F., & Kind, O., M. (2003). Determination Of Antioxidative Capacities Using An Enhanced Total Oxidant Scavenging Capacity (TOSC) Assay. *Europe Food Result Of Technology*, 216, 166–173.
- Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., & Xing, B. (N.D.). *An Overview Of Plant Phenolic Compounds And Their Importance In Human Nutrition And Management Of Type 2 Diabetes. Figure 2*.
- LPPT-UGM. (2018). *Booklet-Alat-LPPT-2017-Rev.Pdf* (P. 4).
- Marxen, K., Vanselow, K. H., Lippemeier, S., Hintze, R., Ruser, A., & Hansen, U. (2007). *S7102080.Pdf*. 2080–2095.
- Miller, H. E., Rigelhof, F., Marquart, L., Prakash, A., & Kanter, M. (2000). Antioxidant Content Of Whole Grain Breakfast Cereals, Fruits And Vegetables. *Journal Of The American College Of Nutrition*, 19(August), 312S-319S. <https://doi.org/10.1080/07315724.2000.10718966>
- Molyneux, P. (2004). The Use Of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-Hydrazyl (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarinn Journal Of Science And Technology*, 26(December 2003), 211–219.
- Neil H. Mermelstein. (2011). Determining Antioxidant Activity. In *Food Technology*.
- Nunung, S. H. H. (2016). Penentuan Kadar Total Fenolik, Flavonoid, Dan Karotenoid Ekstrak Etanol Kecambah Kacang Hijau (*Vigna radiata L.*) Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. *UIN Alauddin Makassar*, 80.
- Oliveira, M. Dos S., Cipolatti, E. P., Furlong, E. B., & Soares, L. De S. (2012). Phenolic Compounds And Antioxidant Activity In Fermented Rice (*Oryza sativa*) Bran. *Food Science And Technology (Campinas)*, 32(3), 531–537.
- Ou, Boxin, Dejian, Huang, Maureen, H.-W. (2002). Analysis Of Antioxidant Activities Of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) And Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays : *Journal Of Agricultur And Food Chemistry*, 50(1), 3122–3128.
- Ozcan, T., & Delikanli, B. (2014). *Phenolics In Human Health*. 5(5), 393–396.
- Pagarra, H. (2009). Laju Pertumbuhan Jamur *Rhizopus Sp.* Pada Tempe Kacang

- Hijau (*Phaseolus Radiatus L.*). *Bionature*, 10(2), 69–74.
- Pascapenen Litbang Pertanian. (2020). *Produk Gluten Free Untuk Percepatan Pengembangan Diversifikasi Pangan Lokal*. [Http://Pascapenen.Litbang.Pertanian.Go.Id/Pencarian/](http://Pascapenen.Litbang.Pertanian.Go.Id/Pencarian/)
- Prakash, A. (2001). Antioxidant Activity. *Medallion Laboratories Analytical Progress*, 12(1).
- Prayoga, G. (2013). Fraksinasi, Uji Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH Dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Dari Ekstrak Teraktif Daun Sambang Darah (*Excoecaria Cochinchinensis Lour.*). In *Fakultas Farmasi Program Studi Sarjana Ekstensi Universitas Indonesia*.
- Rai, I. W., & Arnata, I. W. (2014). Stabilitas Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bekatul Beras Merah Terhadap Oksidator Dan Pemanasan Pada Berbagai pH [*Stability Of Antioxidant Activity Of Red Rice Bran Extract Subjected To Oxidator And Heating In Various Ph J.* 25(2).
- Rajeshwar, Y., Gupta, M., & Kanti Mazumder, U. (2005). Antitumor Activity And In Vivo Antioxidant Status Of *Mucuna Pruriens* (Fabaceae) Seeds Against Ehrlich Ascites Carcinoma In Swiss Albino Mice. *Iranian Journal Of Pharmacology & Therapeutics*, 4(1), 46–53.
- Rashid, N. Y. A., Razak, D. L. A., Jamaluddin, A., Sharifuddin, S. A., & Long, K. (2015). Bioactive Compounds And Antioxidant Activity Of Rice Bran Fermented With Lactic Acid Bacteria. *Malaysian Journal Of Microbiology*, 11(Specialissue2), 156–162.
- Razak, Dang L. A, Nur Yuhasliza A. R., Anisah J., Shaiful A. S., Dan K. L. (2014). Enhancement Of Phenolic Acid Content And Antioxidant Activity Of Rice Bran Fermented With *Rhizopus Oligosporus* And *Monascus Purpureus*. *Malaysia Agricultural Research And Development, Biotechnology Research Center*, 14(2), 26–32.
- Sami, F. J., & Rahimah, S. (2016). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Bunga Brokoli (*Brassica Oleracea L. Var. Italica*) Dengan Metode Dpph (2,2 *Diphenyl-1-Picrylhydrazyl*) Dan METODE ABTS (2,2 Azinobis (3-Etilbenzotiazolin)-6-Asam Sulfonat). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 2(2), 107–110.
- Schmidt, C. G., Gonçalves, L. M., Prietto, L., Hackbart, H. S., & Furlong, E. B. (2014). Antioxidant Activity And Enzyme Inhibition Of Phenolic Acids From Fermented Rice Bran With Fungus *Rizhopus Oryzae*. *Food Chemistry*, 146, 371–377
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH Antioxidant Assay Revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202–1205.

- Sharma, R., Garg, P., Kumar, P., Bhatia, S. K., & Kulshrestha, S. (2020). Microbial Fermentation And Its Role In Quality Improvement Of Fermented Foods. *Fermentation*, 6(4), 106.
- Sutton, S. (2011). Measurement Of Microbial Cells By Optical Density. *J. Validation Techn*, 17(1), 46–49. [Http://Www.Microbiologynetwork.Com/Content/JVT_2011_V17n1_Measurement-Of-Microbial-Cells-By-Optical-Density.Pdf](http://www.microbiologynetwork.com/content/JVT_2011_V17n1_Measurement-Of-Microbial-Cells-By-Optical-Density.pdf)
- Swanson, B. G. (2003). Tannins And Polyphenols. *Encyclopedia Of Food Sciences And Nutrition*, 5729–5733.
- Syah, I. (2013). Penentuan Tingkatan Jaminan Sterilitas Pada Autoklaf Dengan Indikator Biologi Spore Strip. *Farmaka*, 4(1), 1–15.
- T. C. Mcilvaine. (1921). A Buffer Solution For Colorimetric Comparison. *Journal Of Chemical Information And Modeling*, 53(9), 1689–1699.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (N.D.). *Lincoln Taiz*.
- Tristantini, D., Ismawati, A., Pradana, B. T., & Gabriel, J. (2016). Pengujian Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH Pada Daun Tanjung (*Mimusops Elengi L*). *Universitas Indonesia*, 2.
- Winarsi, H. (2007). *Antioksidan Alami & Radikal Bebas* (4th Ed.). Kanisius.
- Winasi, H. (2011). *Antioksidan Alami & Radika Bebas. Potensi Dan Aplikasinya Dalam Kesehatan*. Cetakan Ke-5. In *Yogyakarta: Kanisius* (8th Ed.). Kanisius.
- Yanlinastuti, & Fatimah, S. (2016). Pengaruh Konsentrasi Pelarut Untuk Menentukan Kadar Zirkonium Dalam Paduan U-Zr Dengan Mengguakan Metode Spektrofotometri UV-VIS. *PIN Pengelolaan Instalasi Nuklir*, 1(17), 22–33.
- Yoga, I. K. W. (2015). Penentuan Konsentrasi Optimum Kurva Standar Antioksidan ; Asam Galat , Asam Askorbat Dan Trolox ® Terhadap Radikal Bebas DPPH (2 , 2-Diphenyl-1- Picrylhydrazyl) 0 , 1 Mm. *Proceedings Seminar Nasional FMIPA UNDIKSHA V Tahun 2015*, 316–321.
- Yosmar, R., Almasdy, D., & Rahma, F. (2018). Jurnal Sains Farmasi Dan Klinis. *Survei Risiko Penyakit Diabetes Melitus Terhadap Kesehatan Masyarakat Kota Padang*, 5(Agustus 2018), 134–141.
- Yunilas, & Yusni, E. (2017). Mikrobiologi Akuatik. In *Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara*.
- Zhang, M. W., Zhang, R. F., Zhang, F. X., & Liu, R. H. (2010). Phenolic Profiles And Antioxidant Activity Of Black Rice Bran Of Different Commercially Available Varieties. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 58(13), 7580–7587.

Zhuang, X., Yin, T., Han, W., & Zhang, X. (2019). Nutritional Ingredients And Active Compositions Of Defatted Rice Bran. In *Rice Bran And Rice Bran Oil: Chemistry, Processing And Utilization*. Elsevier Inc.

Zuhra, C. F., Tarigan, J. B., & Sihotang, H. (2008). Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid Dari Daun Katuk (*Sauropus Androgunus* (L) Merr.). *Jurnal Biologi Sumatra*, 3(1), 10–13.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Prosedur Kerja

1.1 Pembuatan PDA

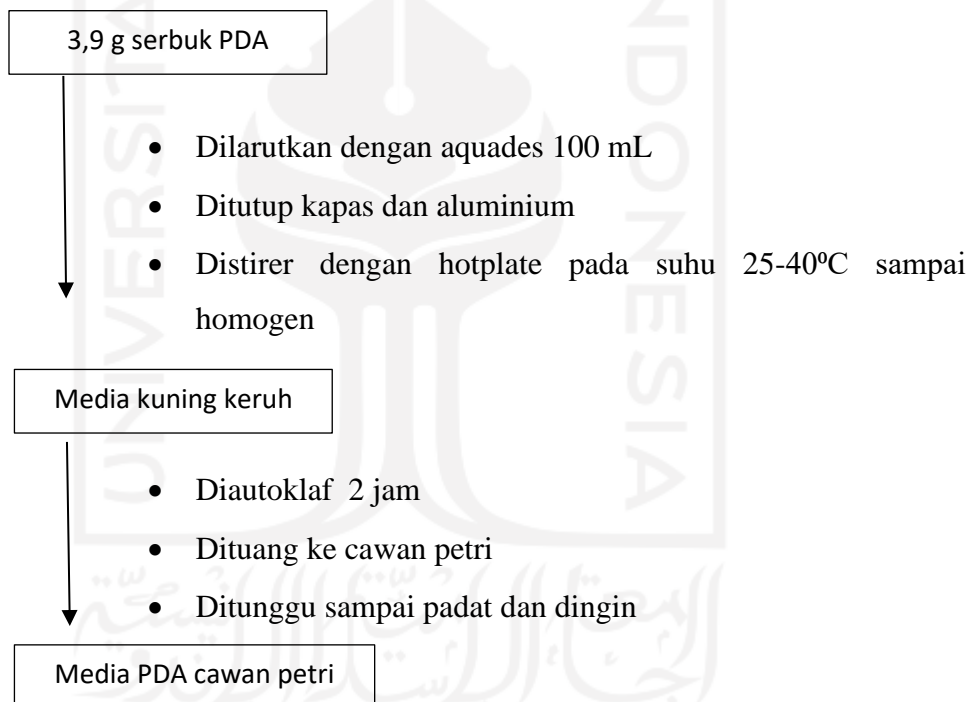
Perhitungan:

$$\frac{W1}{V1} = \frac{W2}{V2}$$

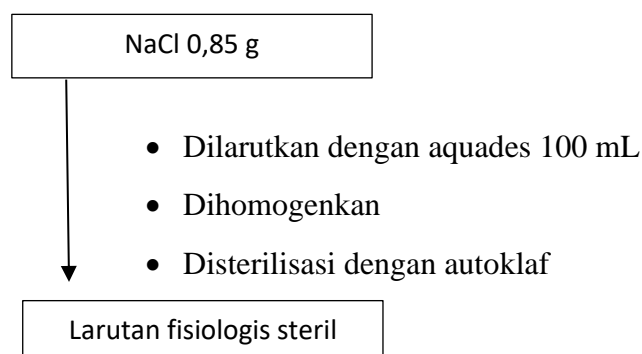
$$W2 = \frac{W1}{V1} \times V2$$

$$W2 = \frac{39 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml}$$

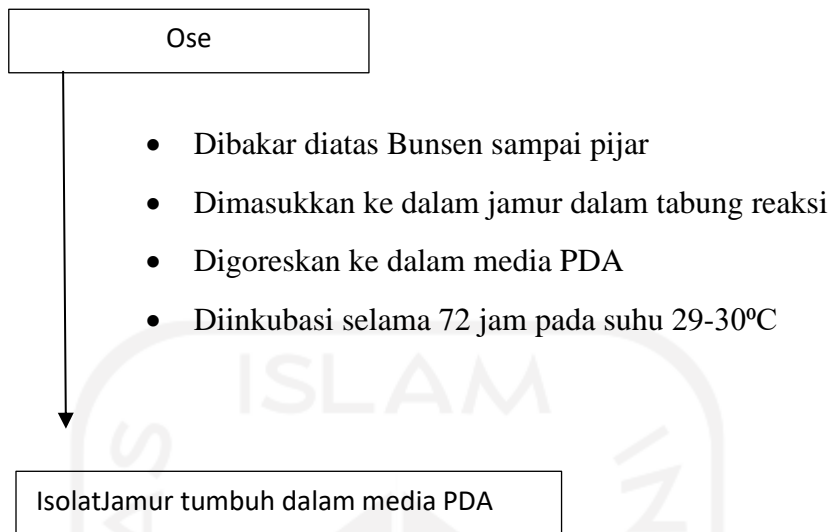
$$W2 = 3,9 \text{ g}$$



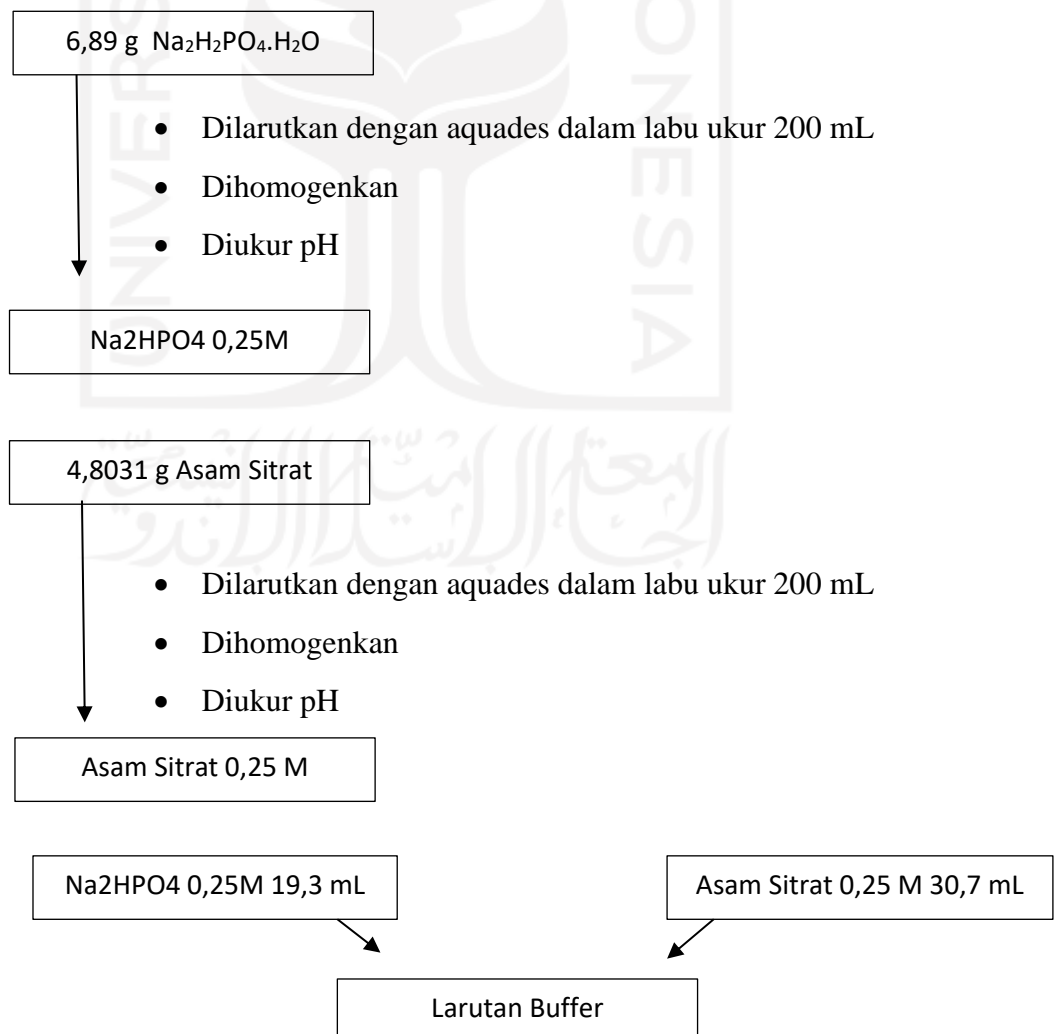
1.2 Pembuatan larutan fisiologis steril



1.3 Pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae*



1.4. Pembuatan Buffer Fosfat



1.5 Pembuatan PDB

Perhitungan:

$$\frac{W1}{V1} = \frac{W2}{V2}$$

$$W2 = \frac{W1}{V1} \times V2$$

$$W2 = \frac{24 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} \times 250 \text{ ml}$$

$$W2 = 6 \text{ g}$$

6 g serbuk PDB

- Dilarutkan dengan aquades 250 mL
- Distirer dan dipanaskan dengan hotplate pada suhu 25-40°C sampai homogen
- Disterilkan dengan autoklaf
- Disimpan di dalam kulkas media steril

Media PDB

1.6 Pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae*

Ose

- Dibakar dengan Bunsen sampai pijar
- Dimasukkan dalam larutan fisiologis
- Diambil jamur media PDA
- Dimasukkan dalam media PDB

Media PDB
(PDB 80 mL dan Buffer 20 mL)

- Ditutup dengan kapas, aluminium foil dan lakban
- Dishaker incubator selama 48-72 jam, kecepatan 130 rpm
- Diatur pada suhu 30°C

Jamur dalam media PDB

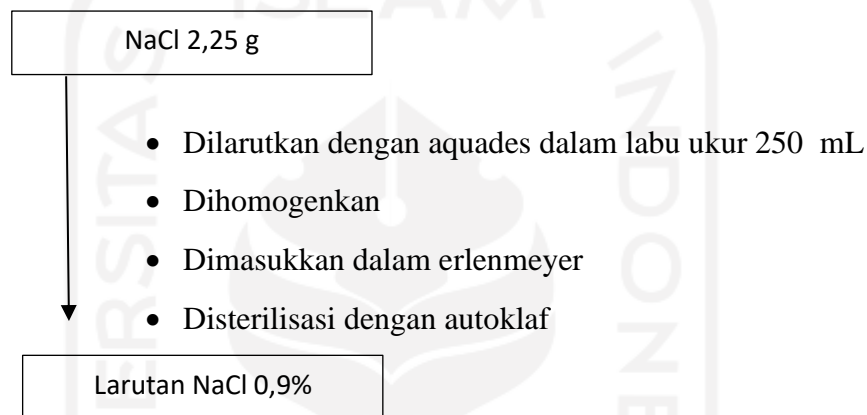
1.7 Pembuatan NaCl 0,9% 250 mL

$$\% \left(\frac{b}{v} \right) NaCl = \frac{Massa NaCl}{Volume} \times 100\%$$

$$NaCl 0,9\% = \frac{Massa NaCl}{250 mL} \times 100\%$$

$$Massa NaCl = \frac{0,9\% \times 250 mL}{100\%}$$

$$Massa NaCl = 2,25 g$$



1.8 Pembuatan McFarland

Pembuatan BaCl₂ 1% 10 mL

$$\% \left(\frac{b}{v} \right) BaCl = \frac{Massa BaCl}{Volume} \times 100\%$$

$$BaCl 1\% = \frac{Massa NaCl}{10 mL} \times 100\%$$

$$Massa BaCl = \frac{1\% \times 10 mL}{100\%}$$

$$Massa NaCl = 0,1 g$$

Pembuatan H₂SO₄ 1% 10 mLMencari molaritas H₂SO₄ pekat 97-95%

$$M = \frac{10 mL \times \% \times Berat jenis}{BM}$$

$$M = \frac{10 mL \times 97\% \times 1,84 g/mol}{98,08 g/mol}$$

$$M = 18,19 \approx 18 \text{ sebagai } M1$$

Mencari molaritas H_2SO_4

$$M = \frac{10 \text{ mL} \times 1\% \times 1,84 \text{ g/mol}}{98,08 \text{ g/mol}}$$

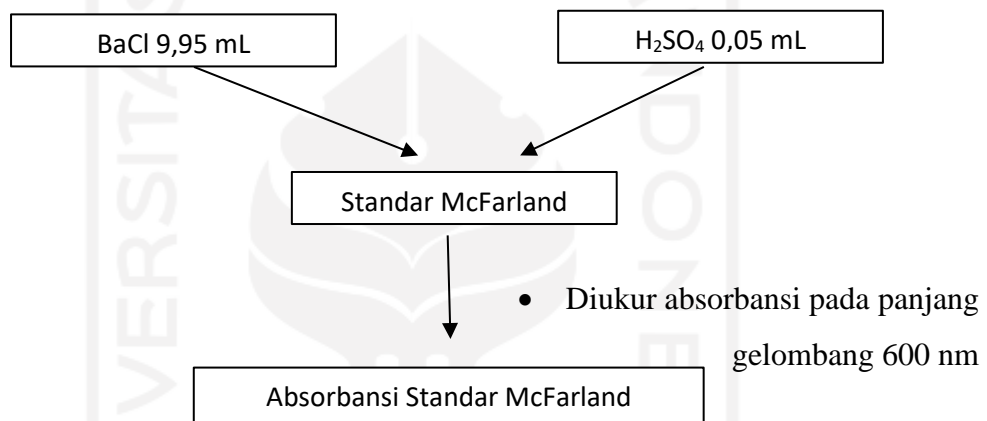
$$M = 0,18 \approx 0,1 \text{ sebagai } M2$$

Pengenceran H_2SO_4 dari 97% menjadi 1%

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$18 \text{ M} \times V1 = 0,1 \text{ M} \times 10 \text{ mL}$$

$$V1 = 0,05 \text{ mL}$$



1.9 Pengenceran jamur

9 mL NaCl 0.9%

- Dimasukkan dalam 6 tabung reaksi
- Diberi label 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6} pada tabung reaksi
- Dimasukkan isolate jamur sebanyak 1 mL pada tabung reaksi pengenceran 10^{-1} lalu difortex
- Diambil isolate jamur pada tabung reaksi pengenceran 10^{-1} dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi pengenceran 10^{-2} lalu difortex
- Diambil isolate jamur pada tabung reaksi pengenceran 10^{-2} dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi pengenceran 10^{-3}

lalu difortex

- Diambil isolate jamur pada tabung reaksi pengenceran 10^{-3} dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi pengenceran 10^{-4} lalu difortex
- Diambil isolate jamur pada tabung reaksi pengenceran 10^{-4} dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi pengenceran 10^{-5} lalu difortex
- Diambil isolate jamur pada tabung reaksi pengenceran 10^{-5} dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi pengenceran 10^{-6} lalu difortex
- Difortex keseluruhan pengenceran dalam tabung reaksi
- Diukur absorbansi dengan Spektrofotometer UV-Vis Double beam pada panjang gelombang 600 nm

Absorbansi

1.10 Fermentasi variasi waktu

18 g bekatul

- Ditambahkan 54 mL aquades
- Diaduk dengan pengaduk kaca
- Ditambahkan isolate jamur pengenceran 10⁻⁴
- Dimasukkan ke dalam 6 tabung reaksi dengan label H2(1); H2(2); H5(1); H5(2); H7(1); H7(2)
- Dihomogenkan
- Dimasukkan ke dalam inkubasi shaker dengan kecepatan 130 rpm dan suhu 30°C
- Difermentasi selama 2,5 dan 7 hari
- Ditambahkan eter teknis apabila fermentasi telah selesai

Bekatul terfermentasi

1.11 Ekstraksi cair-cair

Bekatul terfermentasi

- Ditambahkan eter teknis sebanyak 30 mL dan diaduk
- Disaring dengan penyaring vakum
- Dimasukkan ke dalam corong pisah
- Ditunggu sampai terbentuk dua lapisan
- Lapisan bawah diambil dan dimasukkan Erlenmeyer lalu ditutup menggunakan aluminium foil
- Lapisan atas dimasukkan vial

Ekstrak Senyawa

1.12 Analisis menggunakan GC-MS

Ekstrak senyawa fenolik

- Dianalisis menggunakan GC-MS dengan spesifikasi kondisi alat sebagai berikut : Ekstrak yang dianalisis adalah senyawa fenolik, kolom yang digunakan adalah AT-5MS (5% fenilmetilpolisilokan), dengan dimensi $30 \times 0,25$ mm I.D, dan layar tipis dengan ukuran $0,25 \mu\text{m}$. Temperatur injektor diatur pada 230°C dengan gas pembawa helium $1,0$ mL/min. Temperatur oven diatur mulai dari 60°C dengan kenaikan suhu $3^\circ\text{C}/\text{min}$ sampai 280°C . Temperature sumber ion diatur pada 280°C dengan range scan MS $29-600$ m/z dan arus detektornya 1150 .

Kromatogram dan fragmen GC-MS

1.12 Pembuatan larutan DPPH 0,4 mM

0,01577 g DPPH

- Dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 100 mL

DPPH 0,4 mM

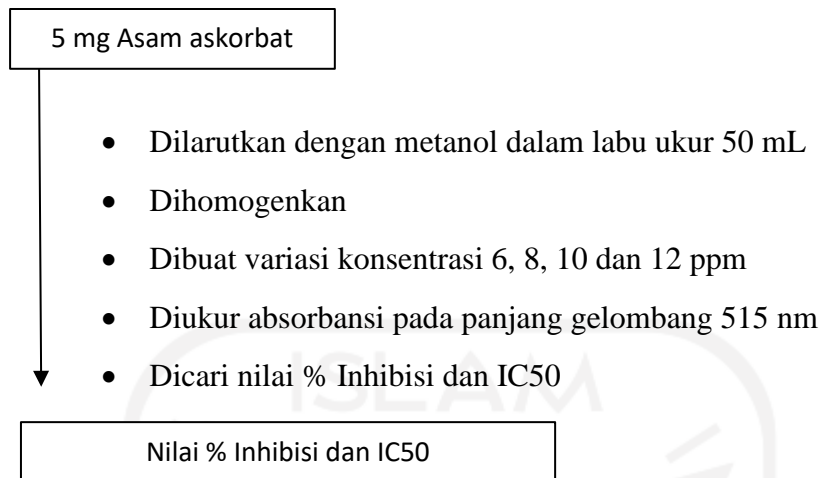
1.13 Pembuatan Kurva Standar DPPH

5 mg DPPH

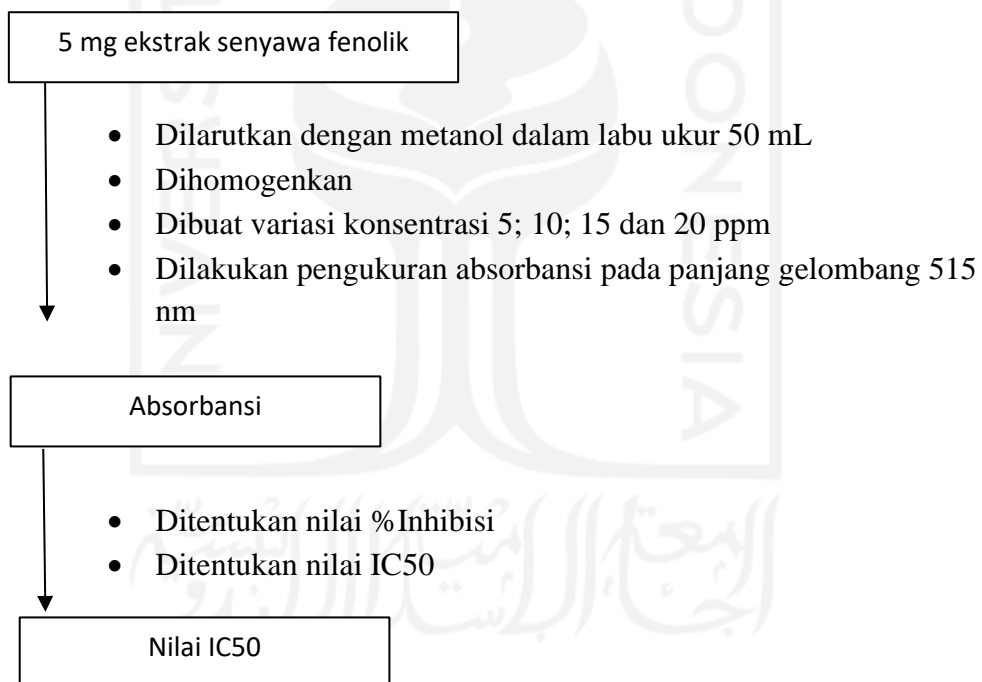
- Dilarutkan dalam metanol dalam labu ukur 50 mL
- Dibuat varian konsentrasi 5, 10, 15, 20 dan 25 ppm dalam labu ukur 10 mL
- Diukur panjang gelombang maksimum
- Dilakukan pengukuran absorbansi blanko

Panjang gelombang maksimum

1.14 Pengukuran Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat



1.15 Pengukuran Aktivitas Antioksidan dalam Sampel bekatul



Lampiran 2. Perhitungan

2.1 Pembuatan PDA

Perhitungan:

$$\frac{W1}{V1} = \frac{W2}{V2}$$

$$W2 = \frac{W1}{V1} \times V2$$

$$W2 = \frac{39 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml}$$

$$W2 = 3,9 \text{ g}$$

2.2 Pembuatan PDB

Perhitungan:

$$\frac{W1}{V1} = \frac{W2}{V2}$$

$$W2 = \frac{W1}{V1} \times V2$$

$$W2 = \frac{24 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} \times 250 \text{ ml}$$

$$W2 = 6 \text{ g}$$

2.3 Pembuatan NaCl 0,9% 250 mL

$$\% \left(\frac{b}{v} \right) NaCl = \frac{Massa NaCl}{Volume} \times 100\%$$

$$NaCl \text{ 0,9\%} = \frac{Massa NaCl}{250 \text{ mL}} \times 100\%$$

$$Massa NaCl = \frac{0,9\% \times 250 \text{ mL}}{100\%}$$

$$Massa NaCl = 2,25 \text{ g}$$

2.4 Pembuatan McFarland

Pembuatan BaCl₂ 1% 10 mL

$$\% \left(\frac{b}{v} \right) BaCl = \frac{Massa BaCl}{Volume} \times 100\%$$

$$BaCl\ 1\% = \frac{Massa\ NaCl}{10\ mL} \times 100\%$$

$$Massa\ BaCl = \frac{1\% \times 10\ mL}{100\%}$$

$$Massa\ NaCl = 0,1\ g$$

Pembuatan H₂SO₄ 1% 10 mL

Mencari molaritas H₂SO₄ pekat 97-95%

$$M = \frac{10\ mL \times \% \times Berat\ jenis}{BM}$$

$$M = \frac{10\ mL \times 97\% \times 1,84\ g/mol}{98,08\ g/mol}$$

$$M = 18,19 \approx 18\ sebagai\ M1$$

Mencari molaritas H₂SO₄

$$M = \frac{10\ mL \times 1\% \times 1,84\ g/mol}{98,08\ g/mol}$$

$$M = 0,18 \approx 0,1\ sebagai\ M2$$

Pengenceran H₂SO₄ dari 97% menjadi 1%

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$18\ M \times V1 = 0,1\ M \times 10\ mL$$

$$V1 = 0,05\ mL$$

2.5 Pengenceran larutan standar DPPH 100 ppm

- Konsentrasi 5 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100\ ppm \times V1 = 5\ ppm \times 10\ mL$$

$$V1 = 0,5\ mL$$

- Konsentrasi 10 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100\ ppm \times V1 = 10\ ppm \times 10\ mL$$

$$V1 = 1\ mL$$

- Konsentrasi 15 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 15 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V1 = 1,5 \text{ mL}$$

- Konsentrasi 20 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 20 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V1 = 2 \text{ mL}$$

- Konsentrasi 25 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 25 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V1 = 2,5 \text{ mL}$$

2.6 Perhitungan Pengenceran Larutan Asam Askorbat 100 ppm

- Konsentrasi 6 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 6 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V1 = 0,3 \text{ mL}$$

- Konsentrasi 8 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 8 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V1 = 0,4 \text{ mL}$$

- Konsentrasi 10 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 10 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V1 = 0,5 \text{ mL}$$

- Konsentrasi 12 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 12 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V1 = 0,6 \text{ mL}$$

Perhitungan Pengenceran Sampel Ekstrak Senyawa Fenolik 100 ppm

- Konsentrasi 5 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 5 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V1 = 0,25 \text{ mL}$$

- Konsentrasi 10 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 10 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V1 = 0,5 \text{ mL}$$

- Konsentrasi 15 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 15 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V1 = 0,75 \text{ mL}$$

- Konsentrasi 20 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 20 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V1 = 1 \text{ mL}$$

2.6 Perhitungan Nilai % Inhibisi dan IC₅₀

- Asam Askorbat

Kons (ppm)	Abs	Abs Kontrol	% Inhibisi	Pers. Regresi Linear	IC ₅₀ (ppm)	Ket
6	0,106	0,142	25,35211268	y=2,3592x+11,338	16,39	Kuat
8	0,099		30,28169014			
10	0,092		35,21126761			
12	0,086		39,43661972			

$$\text{Rumus Inhibisi} = \frac{\text{Abs Kontrol} - \text{Abs Asam Askorbat}}{\text{Abs Kontrol}} \times 100\%$$

$$1. \text{ \% Inhibisi DPPH 6 ppm} = \frac{0,142 - 0,106}{0,142} \times 100\% = 25,35\%$$

$$2. \% \text{ Inhibisi DPPH } 8 \text{ ppm} = \frac{0,142-0,099}{0,142} \times 100\% = 30,28\%$$

$$3. \% \text{ Inhibisi DPPH } 10 \text{ ppm} = \frac{0,142-0,092}{0,142} \times 100\% = 35,21\%$$

$$4. \% \text{ Inhibisi DPPH } 12 \text{ ppm} = \frac{0,142-0,086}{0,142} \times 100\% = 39,44\%$$

Nilai IC50 dihitung melalui persamaan garis linear yang dibuat dengan memplotkan antara konsentrasi dan % Inhibisi. Persamaan yang didapatkan adalah

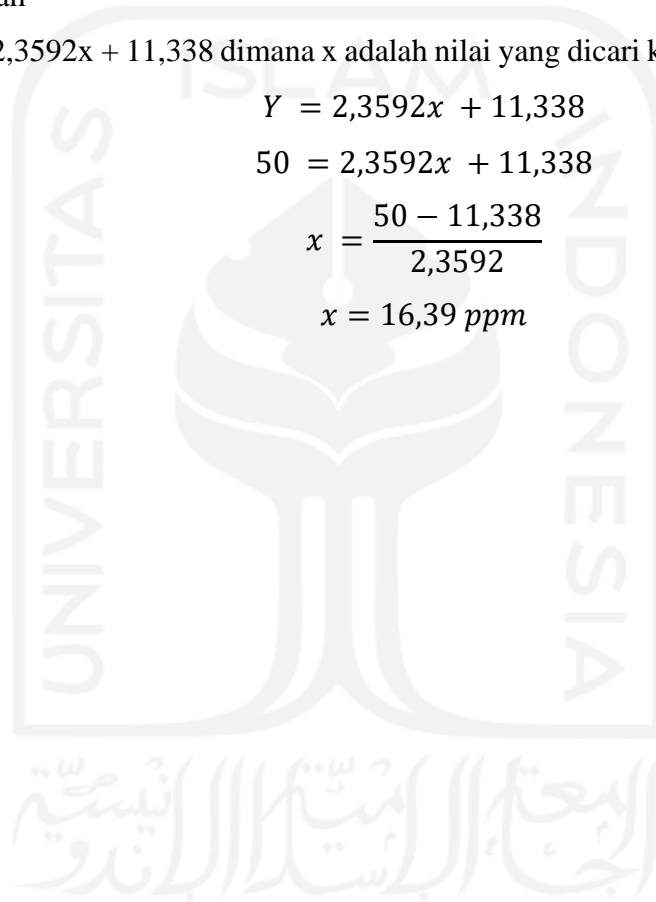
$y = 2,3592x + 11,338$ dimana x adalah nilai yang dicari ketika $y = 50$, maka:

$$Y = 2,3592x + 11,338$$

$$50 = 2,3592x + 11,338$$

$$x = \frac{50 - 11,338}{2,3592}$$

$$x = 16,39 \text{ ppm}$$



- Senyawa Fenolik Sampel Bekatul

Kons (mg/L)	Abs Sampel	% Inhibisi	Abs Kontrol	Pers. Regresi Linear	IC50 (ppm)	Ket
5	0,104	26,76056338	0,142	$y=0,2817x+25$	49,31	Sangat Kuat
10	0,098	30,98591549				
15	0,095	33,09859155				
20	0,093	34,50704225				

$$\text{Rumus Inhibisi} = \frac{\text{Abs Kontrol} - \text{Abs Asam Askorbat}}{\text{Abs Kontrol}} \times 100\%$$

1. % Inhibisi DPPH 5 ppm = $\frac{0,142-0,104}{0,142} \times 100\% = 26,76\%$
2. % Inhibisi DPPH 6 ppm = $\frac{0,142-0,098}{0,142} \times 100\% = 30,99\%$
3. % Inhibisi DPPH 6 ppm = $\frac{0,142-0,095}{0,142} \times 100\% = 33,1\%$
4. % Inhibisi DPPH 6 ppm = $\frac{0,142-0,093}{0,142} \times 100\% = 34,51\%$

Nilai IC50 dihitung melalui persamaan garis linear yang dibuat dengan memplotkan antara konsentrasi dan % Inhibisi. Persamaan yang didapatkan adalah

$y=0,2817x + 25$ dimana x adalah nilai yang dicari ketika $y = 50$, maka:

$$Y = 0,2817x + 25$$

$$50 = 0,2817x + 25$$

$$x = \frac{50 - 25}{0,2817}$$

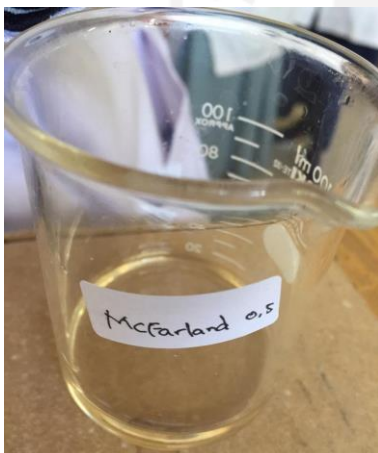
$$x = 49,31 \text{ ppm}$$

Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian

3.1 Hasil Pertumbuhan Jamur *Rhizopus oryzae* dalam Media PDB



3.2 Standar McFarland 0,5



3.3 Pengenceran Bertingkat Jamur *Rhizopus oryzae*



3.9 Penyaringan menggunakan vakum



3.10 Larutan DPPH 0,4 mM



3.11 Larutan Standar DPPH



3.12 Larutan Asam Askorbat

