

**PENGARUH pH dan SUHU TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI
BEKATUL TERFERMENTASI Oleh *Rhizopus oryzae***

SKRIPSI

Oleh:
JAZILATUL HIKMAH
NIM 13630045



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2018**

**PENGARUH pH DAN SUHU TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI
BEKATUL TERFERMENTASI Oleh *Rizhopus oryzae***

SKRIPSI

Oleh:
JAZILATUL HIKMAH
NIM. 13630045

Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2018


**PENGARUH pH DAN SUHU TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI
BEKATUL TERFERMENTASI Oleh *Rizhopus oryzae***

SKRIPSI

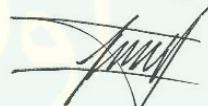
Oleh:
JAZILATUL HIKMAH
NIM. 13630045

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 30 JUNI 2018

Pembimbing I


Akyunul Jannah, S.Si, M.P
NIP. 19750410 200501 2 009

Pembimbing II


Mujahidin Ahmad, M.Sc
NIPT. 19860512 20160801 1 060

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia




Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 09790620 200604 2 002

**PENGARUH pH DAN SUHU TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI
BEKATUL TERFERMENTASI Oleh *Rizhopus oryzae***

SKRIPSI

Oleh:
JAZILATUL HIKMAH
NIM. 13630045

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 5 JUNI 2018

Penguji Utama	: A. Ghanaim Fasya, M.Si NIP. 19820616 200604 1 002	()
Ketua Penguji	: Anik Maunatin, S.T, M.P NIDT. 19760105 20180201 2 248	()
Sekretaris Penguji	: Akyunul Jannah, S.Si, M. NIP. 19750410 200501 2 009	()
Anggota Penguji	: Mujahidin Ahmad, M.Sc NIPT. 19860512 20160801 1 060	()



Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia


Elok Kamillah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Jazilatul Hikmah
NIM : 13630045
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Pengaruh pH dan Suhu terhadap Aktivitas Antibakteri
Bekatul Terfermentasi oleh *Rhizopus oryzae*

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 05 Juli 2018



membuat pernyataan,

Jazilatul Hikmah

NIM. 13630045

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis haturkan kepada Allah SWT. atas segala rahmat, taufiq dan hidayahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal penelitian yang berjudul **“PENGARUH pH DAN SUHU TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI BEKATUL TERFERMENTASI Oleh *Rhizopus oryzae*”**. Sholawat serta salam, senantiasa terucapkan kepada Nabi besar Muhammad SAW. Yang telah menunjukkan jalan kebenaran melalui ajaran agama Islam. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan Pendidikan strata satu (S1) Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bimbingan dan motivasi dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Bapak dan Ibu tercinta sebagai orang tua yang selalu mendo'akan dan memberi motivasi kepada saya.
2. Bapak Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Akyunul Jannah, S.Si, M.P selaku dosen pembimbing Fakultas, yang telah meluangkan waktu untuk membimbing, memotivasi, mengarahkan dan memberikan masukan dalam penyusunan skripsi ini.
5. Ibu Anik Maunatin S.T, M.P selaku dosen konsultan, yang telah meluangkan waktu untuk membimbing, memotivasi, mengarahkan dan memberikan masukan dalam penyusunan skripsi ini.
6. Bapak Mujahidin Ahmad, M. Sc selaku dosen pembimbing agama yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing dan memberikan masukan dalam penyusunan skripsi ini.
7. Seluruh Dosen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmu, pengetahuan, pengalaman, wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
8. Semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah ikut memberikan bantuan dan motivasi selama penyusunan skripsi ini.

Semoga semua bantuan yang telah diberikan mendapat balasan dari Allah SWT. Penulis juga menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Dan semoga skripsi ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Malang, 6 Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
ABSTRAK	xi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Hipotesis	7
1.5 Batasan Masalah	7
1.6 Manfaat Penelitian	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Pemanfaatan Tanaman dalam Perspektif Islam	8
2.2 Bekatul	9
2.3 Selulosa	11
2.4 Enzim Selulase	13
2.5 Ekstraksi Maserasi	16
2.6 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan Bakteri	17
2.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.6.2 <i>Escherihia coli</i>	19
2.6.3 Media Pertumbuhan Bakteri	20
2.7 Antibakteri	21
2.7.1 Mekanisme Kerja Zat Antibakteri	23
2.7.2 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Aktifitas Antibakteri	25
2.8 <i>Rhizopus oryzae</i>	26
2.9 Fermentasi	29
2.10 Uji Aktivitas Antibakteri	31
BAB III METODE PENELITIAN	35
3.1 Waktu dan Tempat	35
3.2 Alat dan Bahan	35
3.2.1 Alat	35
3.2.2 Bahan	35
3.3 Rancangan Penelitian	36
3.4 Tahapan Penelitian	37
3.5 Prosedur Penelitian	38
3.5.1 Preparasi Sampel	38
3.5.2 Pembuatan Media	38
3.5.2.1 <i>Potato Dextrose Agar (PDA)</i>	38
3.5.2.2 <i>Potato Dextrose Broth (PDB)</i>	39

3.5.2.3 Nutrient Agar (NA)	39
3.5.2.4 Nutrient Broth (NB)	39
3.5.3 Regenerasi Mikroorganisme	39
3.5.3.1 Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	39
3.5.3.2 Bakteri <i>Escherichia coli</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i>	40
3.5.4 Pembuatan Inokulum	40
3.5.4.1 Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	40
3.5.4.2 Bakteri <i>Escherichia coli</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i>	40
3.5.5 Perhitungan Jumlah Sel Bakteri	41
3.5.6 Fermentasi Bekatul dengan Variasi pH dan Suhu	42
3.5.7 Ekstraksi Senyawa Antibakteri Bekatul Terfermentasi	42
3.5.8 Uji Aktivitas Antibakteri Bekatul Terfermentasi	43
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	44
4.1 Preparasi Sampel	44
4.2 Pembuatan Media	45
4.3 Regenerasi Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	46
4.4 Kurva Pertumbuhan Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	47
4.5 Pembuatan Inokulum Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	48
4.6 Fermentasi Bekatul dengan Variasi pH dan Suhu	49
4.6.1 Hasil Rendemen Ekstrak Bekatul Terfermentasi	52
4.6.2 Aktivitas Antibakteri Bekatul Terfermentasi	55
BAB V PENUTUP	66
5.1 Kesimpulan	66
5.2 Saran	66
DAFTAR PUSTAKA	67
LAMPIRAN	72

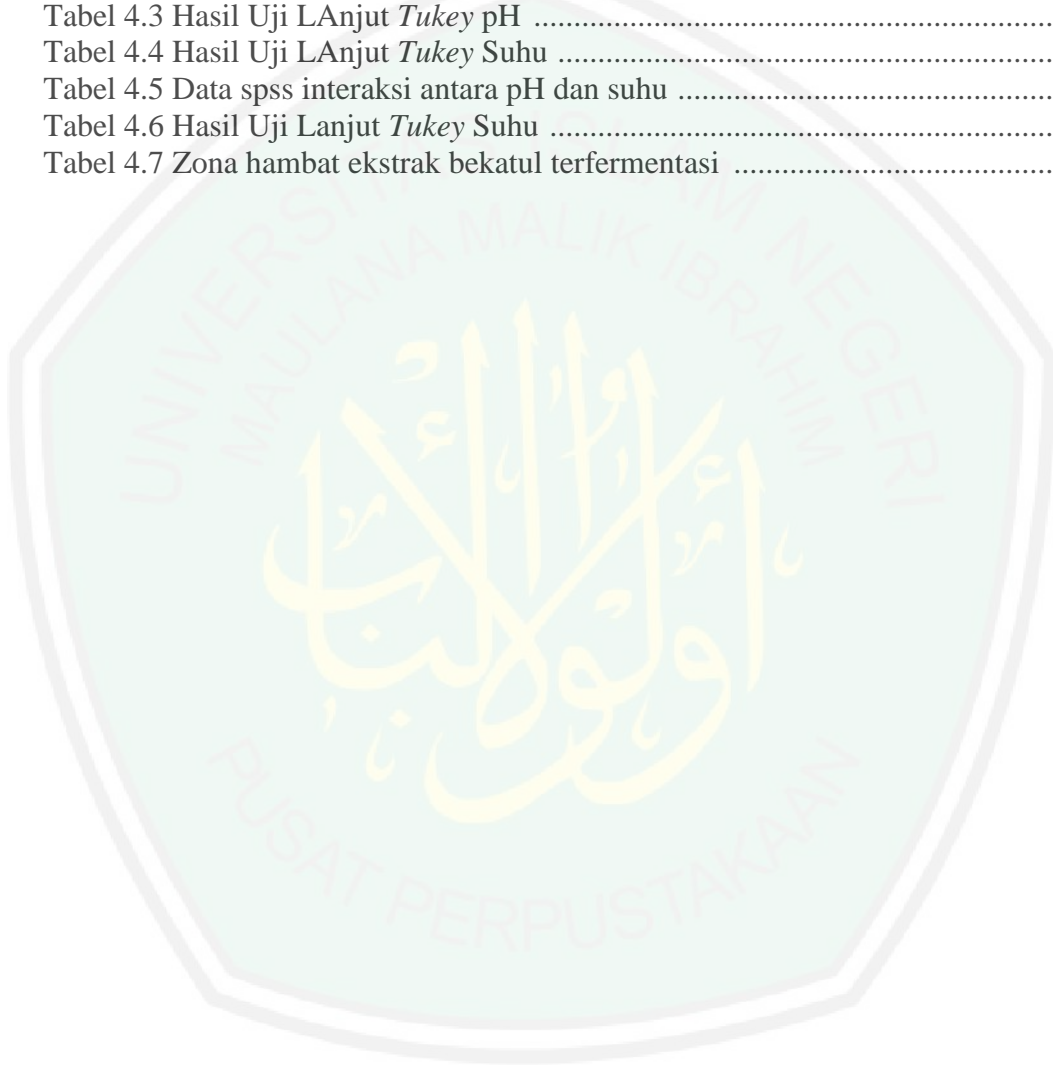
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur gabah	10
Gambar 2.2 Struktur selulosa	12
Gambar 2.3 Kurva pertumbuhan bakteri	18
Gambar 2.4 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	19
Gambar 2.5 Bakteri <i>Escherichia coli</i>	20
Gambar 2.6 <i>Rhizopus oryzae</i>	27
Gambar 2.7 Kurva pertumbuhan jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	28
Gambar 2.8 Dugaan reaksi pembukaan matriks serat pada fermentasi	29
Gambar 4.1 Kurva pertumbuhan Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	48
Gambar 4.2 Zona hambat ekstrak bekatul terfermentasi	63



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan zat gizi bekatul	11
Tabel 2.2 Perbedaan bakteri gram positif dan gram negatif	17
Tabel 2.3 Kategori diameter zona hambat	33
Tabel 3.1 Kombinasi perlakuan antara pengaruh pH dan suhu	36
Tabel 4.1 Rata-rata rendemen ekstrak bekatul	54
Tabel 4.2 Data spss interaksi antara pH dan suhu	57
Tabel 4.3 Hasil Uji LANjut <i>Tukey</i> pH	58
Tabel 4.4 Hasil Uji LANjut <i>Tukey</i> Suhu	59
Tabel 4.5 Data spss interaksi antara pH dan suhu	60
Tabel 4.6 Hasil Uji Lanjut <i>Tukey</i> Suhu	61
Tabel 4.7 Zona hambat ekstrak bekatul terfermentasi	62



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian	71
Lampiran 2 Diagram Alir	72
Lampiran 3 Perhitungan dan Pembuatan Larutan	78
Lampiran 4 Perhitungan Rendemen	79
Lampiran 5 Nilai Standart Deviasi Aktivitas Antibakteri	85
Lampiran 6 Data spss	86
Lampiran 7 Dokumentasi Penelitian	98
Lampiran 8 Gambar Zona Hambat	100



ABSTRAK

Hikmah, Jazilatul. 2018. **Pengaruh pH dan Suhu terhadap Aktivitas Antibakteri Bekatul Terfermentasi oleh *Rhizopus oryzae***. Skripsi. Jurusan Kimia. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
Pembimbing I: Akyunul Jannah, S. Si, M.P; Pembimbing II: Mujahidin Ahmad, M. Sc; Konsultan: Anik Maunatin, S.T., M.P.

Kata kunci: Bekatul, Fermentasi, *Rhizopus oryzae*, antibakteri.

Bekatul merupakan hasil samping dari penggilingan padi yang mempunyai senyawa aktif. Salah satunya senyawa fenolik yang dapat digunakan sebagai zat antibakteri. Dalam al qur'an surat al An'am ayat 95 menjelaskan bahwa Allah SWT menumbuhkan butir seperti padi yang dapat digunakan sebagai obat herbal. Seperti bekatul yang mempunyai senyawa aktif yang dapat digunakan sebagai senyawa antibakteri. Tujuan penelitian ini adalah meningkatkan senyawa aktif dalam ekstrak bekatul dengan proses fermentasi oleh *Rhizopus oryzae*. Variasi yang digunakan adalah kombinasi pH 4, 5 dan 6 serta suhu 30, 37, dan 44 °C. Ekstrak bekatul diperoleh dengan metode maserasi menggunakan etanol p.a, sedangkan pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar. Bakteri uji yang digunakan adalah *Escherichia coli* sebagai bakteri gram positif dan *Staphylococcus aureus* sebagai bakteri gram negatif. Hasil aktivitas antibakteri terbaik diperoleh pada pH 5 dan suhu 37 °C, yang ditunjukkan dengan zona hambat 13,9 mm terhadap bakteri *Escherichia coli* dan 11,6 mm terhadap *Staphylococcus aureus*. Berdasarkan uji statistik *Two way* (ANOVA) diketahui bahwa pada uji bakteri *Escherichia coli* berpengaruh nyata terhadap interaksi antara kedua variasi yang digunakan yaitu pH dan suhu. Namun, berdasarkan uji bakteri *Staphylococcus aureus*, hanya variasi suhu yang memberikan pengaruh nyata terhadap peningkatan aktivitas antibakteri bekatul terfermentasi.

ABSTRACT

Hikmah, Jazilatul. 2018. **Effect pH and Temperature on Antibacterial Activity of Rice Bran Fermented by *Rhizopus oryzae***. Thesis. Chemistry Department. Science and Technology Faculty, State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang..

Supervisor I: Akyunul Jannah, S. Si, M.P; Supervisor II: Mujahidin Ahmad, M. Sc; Consultant: Anik Maunatin, S.T., M.P.

Keyword: Rice Bran, Fermentation, *Rhizopus oryzae*, Antibactery.

Rice bran is a product of rice milling has active compounds. One of these phenolic compounds that can be used as antibacterial. In the Qur'an, surat al-An'am ayat 95 explains that Allah SWT to grow grain as rice can be used as herbal medicine. As rice bran that has active compounds that can be used as antibacterial compounds. This research purpose to increase bioactive compound from rice bran extract using fermentation by *Rhizopus oryzae* with combination of pH variation are 4, 5, and 6 and temperature variation are 30, 37, and 44 °C. Rice Bran Extract obtained from maceration using ethanol p.a, then antibacterial activity tested by agar diffusion method. There two different bacteria test, are *Escherichia coli* as positive gram bacteria and *Staphylococcus aureus* as negative gram bacteria. The optimal antibacterial activity showed at pH 5 and 37 °C with inhibition zone 13.9 mm on *Escherichia coli* and 11.6 mm on *Staphylococcus aureus*. After analysis use statistic *Two way* (ANOVA) test is known *Escherichia coli* bacteria test of these results significantly affect the interaction between the two variations. But, based on *Staphylococcus aureus* bacteria test, only temperature variation that gives effect to antibacterial increase of rice bran fermented.

ملخص البحث

الحكمة ، جزيلة. ٢٠١٨. تأثير إمكانات الهيدروجين (pH) ودرجة الحرارة (SUHU) على النشاط المضاد للبكتيريا النخالة المخمرة بالفطر الرزية (*Rhizopus oryzae*). البحث الجامعي. قسم الكيمياء. كلية العلوم والتكنولوجيا ، جامعة الاسلامية الحكومية مولانا مالك إبراهيم مالانج.

المشرفة الاولى: أعين الجنة، الماجستير، المشرفة الثانية: مجهد احمد ، الماجستير، المستشار: أنيك مونة، الماجستير

الكلمات الرئيسية: نخالة ، التخمر ، بالفطر الرزية ، مضاد للبكتيريا
النخالة تحتوي على مركب نشط الذي يمكن أن يستخدمه كعامل مضاد للبكتيريا، واحد منه هو مركب فينولي. الاهداف من هذا البحث هي زيادة المركب الفعال في الاستخراج النخالة بواسطة عملية التخمر بواسطة بالفطر الرزية (*Rhizopus oryzae*). الاختلاف المستخدم هو مزيج من درجة الحموضة (٤,٥,٦) ودرجة الحرارة ٣٠, ٣٧, ٤٤ °C. الاستخراج النخالة يحصل عليه باستخدام طريقة التذرية باستخدام الإيثانول p.a ، واختبار النشاط المضاد للبكتيريا مع طريقة الانشار الأجار. البكتيريا التجريبية المستخدمة هي الإشريكية القولونية (*Escherichia coli*) مثل البكتيريا الغرام الإيجابي والمكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*) كبكتيريا الغرام السلبي. حصلت نتائج أفضل نشاط مضاد للبكتيريا في درجة الحموضة عند إمكانات الهيدروجين ٥ و ٣٧ درجة مئوية ، الذي تظهر بواسطة منطقة تثبيط ١٣,٩ ميل متر على الإشريكية القولونية (*Escherichia coli*) و ١١,٦ ميل متر ضد بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*)

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bekatul merupakan salah satu hasil samping dari penggilingan padi. Menurut data Solo (2010) perkiraan produksi gabah kering di Indonesia pada tahun 2010 sebanyak 66,7 juta ton. Dengan 10% dari produksi dapat menghasilkan bekatul, maka dapat diperkirakan akan menghasilkan 6,67 juta ton bekatul. Namun, sangat disayangkan, sampai sekarang pemanfaatan bekatul masih terbatas, yaitu digunakan sebagai pakan ternak. Padahal laporan penelitian menyebutkan bahwa bekatul mengandung senyawa bioaktif yang bermanfaat seperti halnya dapat digunakan sebagai senyawa antibakteri. Allah SWT memberikan berbagai macam nikmat kepada manusia. Salah satunya yaitu tumbuh-tumbuhan yang bermanfaat. Seperti yang tertulis di dalam firman Allah Q. S. Asy-Syuara: 7,

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَيْفَ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam **tumbuh-tumbuhan yang baik** ?”

Menurut Tafsir Al-Mishbah (Shihab, 2002) ayat ini mengundang manusia untuk mempelajari, memikirkan dan mengkaji tumbuhan yang telah diciptakan oleh Allah SWT. Ada beberapa kajian tumbuhan yang menjelaskan tentang berbagai macam obat dari bahan alam (Zuhud, 2004). Seperti bekatul mengandung

komponen bioaktif yang dapat digunakan sebagai senyawa antibakteri (Amalia, 2016).

Surat Asy-syuara ayat 7 diatas digunakan sebagai landasan untuk penelitian ini. Dimana bekatul tidak hanya digunakan sebagai pakan ternak saja, namun dapat dimanfaatkan sebagai bahan yang lebih bermanfaat dan memiliki nilai ekonomi yang lebih tinggi. Menurut Zhang, dkk., (2010) bekatul merupakan salah satu sumber yang kaya akan senyawa bioaktif termasuk fenolik. Dimana senyawa fenolik dapat digunakan sebagai antibakteri.

Nilai kandungan gizi dalam bekatul sangat banyak yaitu kaya akan vitamin B, vitamin E, asam lemak assensial, protein, mineral, dan serat pangan (dietary fiber). Dalam 100 gram bekatul mengandung air 2,49%, protein 8,77%, lemak 1,09%, abu 1,60%, serat 1,69%, karbohidrat 84,30%, kalori 382,32 kal (Nursalim, 2005) serta komponen bioaktif (Devi, 2007). Komponen bioaktif pada bekatul bagus untuk kesehatan, misalnya dapat menurunkan kandungan kolesterol dan sebagai sumber antibakteri. Senyawa antibakteri alami biasanya merupakan senyawa turunan fenolik atau polifenolik seperti golongan flavonoid (Ambujakshi dkk, 2009) alkaloid, saponin, steroid, dan tanin (Ningsih, dkk. 2016).

Antibakteri adalah zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau bahkan mematikan bakteri. Zat antibakteri ini ada yang dihasilkan oleh mikroorganisme seperti jamur. Mekanisme kerja dari senyawa antibakteri diantaranya yaitu menghambat sintesis dinding sel, menghambat keutuhan permeabilitas dinding sel bakteri, menghambat kerja enzim, dan menghambat sintesis asam nukleat dan protein (Dwidjoseputro, 1980). Senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri pada bekatul yaitu senyawa fenolik seperti alkaloid, saponin, steroid, dan tanin. Aisy

(2016) menyatakan bahwa senyawa tanin, triterpenoid dan saponin mempunyai daya antibakteri terbaik terhadap bakteri *E. coli* sebesar 10,3 mm dan 12 mm terhadap bakteri *S. aureus*. Oleh sebab itu, fermentasi sering kali digunakan untuk meningkatkan kandungan senyawa fenolik pada suatu bahan alam sehingga dapat meningkatkan aktivitas antibakteri.

Proses yang digunakan dalam memaksimalkan pemanfaatan bekatul kini adalah metode fermentasi. Fermentasi merupakan metode yang memanfaatkan proses pemecahan senyawa organik menjadi senyawa sederhana yang melibatkan mikroorganisme (Pujaningsih, 2005) sehingga dapat meningkatkan aktivitas antibakteri di dalam bekatul. Proses fermentasi ini akan menurunkan kadar serat kasar pada bekatul. Karena selama proses fermentasi, senyawa fenolik yang terikat pada serat-serat kasar ekstrak bekatul akan terlepas. Semakin banyak senyawa fenolik yang terbebas, maka aktivitas antibakterinya akan semakin meningkat. Hal ini dikarenakan selama proses fermentasi akan menghasilkan enzim yang dapat melepaskan senyawa fenolik yang terikat pada serat tidak larut. Terlepasnya senyawa fenolik akan meningkatkan aktivitas antioksidan (Zubaidah, dkk., 2012). Hasil penelitian Rashid, dkk., (2015) melaporkan bahwa fermentasi dengan bakteri dapat meningkatkan senyawa aktif berupa fenolik dari bekatul yang digunakan sebagai antioksidan, di mana aktivitas antioksidan sebelum fermentasi sebesar 66,2%, namun setelah dilakukan fermentasi menggunakan bakteri *Pediococcus acidilactici* didapatkan aktivitas antioksidan sebesar 82,6%. Selain itu, Aruben (2016) menjelaskan bahwa fermentasi menggunakan jamur *R. oligosporus* juga dapat meningkatkan senyawa fenolik pada bekatul, yang mana konsentrasi senyawa fenolik sebelum fermentasi sebesar 73,31% menjadi 91,29%.

Jadi, dapat diketahui bahwa fermentasi menggunakan jamur lebih efisien dibandingkan dengan bakteri dalam meningkatkan kandungan senyawa fenolik pada bekatul.

Mikroorganisme yang digunakan pada proses fermentasi adalah jamur, karena jamur terlibat dalam penguraian selulosa (Indrawati, 2005) dan memiliki aktivitas selulolitik yang tinggi. Dari penelitian yang berkesinambungan ada beberapa jamur yang menghasilkan enzim selulase. Salah satunya adalah *Rhizopus oryzae* (Dwijoseputro, 1994). *Rhizopus oryzae* merupakan salah satu jenis yang sering dimanfaatkan dalam bidang farmasi sebagai antibiotik. Namun, penggunaan *R. oryzae* dalam proses fermentasi masih jarang ditemukan karena pemanfaatannya hanya sekedar dalam pembuatan antibiotik. Pemilihan jamur *R. oryzae* sebagai penghasil enzim selulase memiliki keuntungan yaitu, kebutuhan air jamur ini lebih sedikit dibandingkan dengan bakteri (Krishna, 2005) sehingga randemen yang dihasilkan tidak terlalu banyak yang ikut terbuang dengan air. Selain itu, jamur mempunyai kemampuan hidup yang lebih baik dibandingkan dengan bakteri. Karena jamur mempunyai 3 turunan enzim selulase yaitu β -glukosidase exo-1,4- β -D-glucanase, dan endo-1,4- β -D-glucanase (ikram, *et. al.*, 2005). Enzim tersebut dapat menghidrolisis selulosa dengan memecah ikatan β -1,4-D-glikosida untuk menghasilkan glukosa atau oligosakarida tertentu pada bekatul dan dapat membebaskan senyawa fenolik (Hsich, 2001). Sehingga dapat menurunkan kadar serat bekatul pada proses fermentasi semakin maksimal.

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi proses fermentasi diantaranya lama fermentasi, substrat, pH (keasaman), suhu, oksigen dan air. Pada penelitian ini, fermentasi akan dilakukan dengan interaksi variasi pH dan suhu. Menurut

Rizk, dkk., (2007) menjelaskan bahwa level pH dari suatu media pertumbuhan memiliki efek yang mencolok pada produksi metabolit sekunder dalam mencapai titik optimumnya. Selain itu, suhu yang digunakan pada saat inkubasi juga dapat memberi efek yang berbeda pada tumbuhan.

Menurut Kuswanto dan Slamet (1989), suhu optimal untuk pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae* adalah pada suhu 35 °C dan maksimal pertumbuhan pada suhu 44 °C. Begitu juga dengan kondisi pH yang tidak sesuai dengan jamur, akan menyebabkan jamur tersebut mati dan menghambat proses fermentasi. Dengan mengatur pH pada saat proses fermentasi, maka kerja dari jamur *Rhizopus oryzae* akan semakin maksimal dalam memutus serat-serat yang terkandung di dalam bekatul sehingga akan didapatkan nilai dari peningkatan aktivitas antibakteri yang lebih maksimal. Menurut Sorenson dan Hesseltine (1986), *Rhizopus sp.* tumbuh baik pada kisaran pH 4, 5, dan 6. Karena pada pH tinggi pertumbuhan jamur kurang sesuai sehingga kualitas jamur semakin menurun. Amalia (2016) telah melakukan fermentasi bekatul menggunakan bakteri *Bacillus subtilis* pada suhu 30 °C dan pH 5 didapatkan bahwa aktivitas antioksidan dengan kenaikan sebesar 7,08%.

Penelitian yang dilakukan oleh Paul (2014) yang menguji aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol dedak terhadap *S. aureus* dan *E. coli* dengan menggunakan konsentrasi 1 gm/mL menunjukkan bahwa ekstrak etanol dedak memberikan aktivitas antibakteri terbesar terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* yaitu sebesar 7 mm, namun dengan zona hambat tersebut masih dikategorikan senyawa yang sedang dalam menghambat bakteri. Sedangkan menurut Zubaidah (2014) yang menguji aktivitas antibakteri dari bekatul terfermentasi menggunakan

isolat J2B menunjukkan aktivitas antibakteri kuat terhadap pertumbuhan bakteri *E.coli* dan *S. aureus* yaitu sebesar 12,83 mm dan 13,04 mm. Mengacu pada penelitian tersebut, sehingga penelitian ini akan dilakukan uji zona hambat bakteri pada pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan bakteri *E.coli*.

Berdasarkan latar belakang di atas, maka perlu dilakukan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak bekatul yang dipengaruhi oleh dua faktor yaitu pH dan suhu pada saat fermentasi menggunakan jamur *Rhizopus oryzae*. Penggunaan jamur *Rhizopus oryzae* sebagai antibakteri masih sangat jarang ditemukan. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan, untuk mengetahui berapa pH dan suhu optimum pada proses fermentasi ekstrak bekatul oleh *Rhizopus oryzae* sebagai aktivitas antibakteri.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh kombinasi pH dan suhu terhadap peningkatan aktivitas antibakteri bekatul terfermentasi menggunakan *Rhizopus oryzae*?

1.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui pengaruh kombinasi pH dan suhu terhadap peningkatan aktivitas antibakteri bekatul terfermentasi menggunakan *Rhizopus oryzae*.

1.4 Hipotesis

H_0 = Interaksi suhu dan pH tidak berpengaruh nyata terhadap peningkatan aktivitas antibakteri bekatul terfermentasi oleh *Rhizopus oryzae*

H_1 = Interaksi suhu dan pH tidak berpengaruh nyata terhadap peningkatan aktivitas antibakteri bekatul terfermentasi oleh *Rhizopus oryzae*

1.5 Batasan Masalah

1. Bekatul yang diperoleh dari tempat penggilingan padi di Singosari.
2. Sumber jamur *Rhizopus oryzae* yang digunakan adalah jamur isolat indigenus yang diisolasi di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya Malang.
3. Variasi pH yang digunakan adalah 4, 5 dan 6, sedangkan variasi suhu yang digunakan yaitu 30 °C, 37 °C, 44 °C.
4. Analisis aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode difusi agar.

1.6 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada semua masyarakat tentang pengaruh pH dan suhu fermentasi pada peningkatan aktivitas antibakteri dalam ekstrak bekatul.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pemanfaatan Tanaman dalam Perspektif Islam

Allah SWT berfirman dalam Q.S Al-An'am ayat 95:

إِنَّ اللَّهَ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَى يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَمُخْرِجُ الْمَيِّتِ مِنَ الْحَيِّ ذَلِكُمْ اللَّهُ فَأَنَّى تُؤْفَكُونَ

Artinya: "Sesungguhnya Allah yang menumbuhkan butir (padi-padian) dan biji (kurma). Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup. Itulah (kekuasaan) Allah, maka mengapa kamu masih berpaling".

Menurut Shihab (2002), kata *Hubbi* dalam surat Al-An'am ayat 95 memiliki makna tumbuhan yang berbutir seperti padi-padian. Demikian juga tafsir Ibnu Katsir (2001), Allah SWT telah menumbuhkan berbagai macam pohon dari biji-bijian yang menghasilkan buah-buahan yang berbeda dari segi warna, bentuk, dan kegunaannya. Salah satu hasil yang diharapkan dari tumbuhan adalah dapat digunakan sebagai obat herbal. Seperti halnya padi yang memiliki hasil samping berupa bekatul. Bekatul ini mempunyai senyawa aktif yang dapat digunakan sebagai senyawa antibakteri (Amalia, 2016).

Salah satu manfaat tumbuhan dapat digunakan sebagai obat, merupakan anugerah dari Allah SWT yang harus dipelajari dan dikaji, tidak terkecuali bekatul yang selama ini dianggap hanya dapat digunakan sebagai pakan ternak. Disisi lain ternyata bekatul dapat diambil senyawa aktifnya dan dapat digunakan sebagai senyawa antibakteri. Allah SWT memerintahkan kita untuk berbuat baik kepada semuanya. Sebagaimana firman Allah SWT dalam Q.S Yunus ayat 26:

لِّلَّذِينَ أَحْسَنُوا الْحُسْنَىٰ وَزِيَادَةٌ وَلَا يَرْهَقُ وُجُوهَهُمْ قَتَرٌ وَلَا ذِلَّةٌ ؕ أُولَٰئِكَ أَصْحَابُ الْجَنَّةِ هُمْ فِيهَا خَالِدُونَ

Artinya: “Bagi orang-orang yang baik, ada pahala yang terbaik (surga) dan tambahannya. Dan muka mereka tidak ditutupi debu hitam dan tidak (pula) kehinaan. Mereka itulah penghuni surga, mereka kekal didalamnya”.

Salah satu contoh perbuatan baik yaitu dengan mengeksplor manfaat bekatul dan menyampaikan informasi yang bermanfaat tentangnya kepada masyarakat agar digunakan dengan maksimal.

Pemanfaatan bahan alam yang digunakan sebagai obat-obatan di Indonesia akhir-akhir ini meningkat. Bahkan beberapa bahan alami telah diproduksi dalam skala besar. Hal ini dikarenakan, obat tradisional lebih efektif dan memiliki efek samping lebih kecil dibandingkan dengan obat-obatan dari bahan kimia. Selain itu, obat tradisional harganya lebih terjangkau dan bahan bakunya juga mudah diperoleh (Putri, 2010). Hasil penelitian Zhang, dkk., (2010) membuktikan bahwa bekatul merupakan senyawa yang kaya akan senyawa aktif seperti fenolik. Dimana senyawa fenolik dapat digunakan sebagai senyawa antibakteri.

2.2 Bekatul

Bekatul merupakan kulit paling luar dari beras dan kulit paling dalam dari sekam yang terkelupas melalui proses penggilingan dan penyosohan. Di daerah Jawa Barat, bekatul dan dedak menjadi pengertian yang sama, sedangkan daerah Jawa Tengah dan Jawa Timur mengasumsikan dedak sebagai hasil penyosohan padi pertama dan bekatul sebagai hasil penyosohan kedua (ukuran lebih halus) dari beras yang digunakan sebagai pakan ternak (Widowati, 2001). Warna bekatul bervariasi dari coklat muda hingga coklat tua. Bekatul yang dihasilkan dari

penggilingan padi dapat mencapai 8-12% dari jumlah total padi (BB Pasca panen, 2007). Struktur dari gabah ditampilkan pada Gambar 2.1



Gambar 2.1 Struktur gabah (Liem, 2013)

Departemen Pertanian (2015) menginfokan bahwa konsumsi beras masyarakat Indonesia masih tergolong tinggi mencapai 114 kg per kapita per tahun atau 312 gram per hari. Peningkatan produksi dan konsumsi padi ini juga akan mengakibatkan peningkatan pada produk samping dari penggilingan padi seperti bekatul. Tahun 2015 produksi gabah di Indonesia mencapai 62,5 ton GK (Gabah Kering Giling). Jumlah ini merupakan jumlah yang cukup besar jika hanya dijadikan ampas yang tidak dimanfaatkan. Karena bekatul memiliki kandungan nutrisi yang banyak dan bermanfaat bagi tubuh. Bekatul mengandung berbagai zat gizi, antara lain :

Tabel 2.1 Kandungan zat gizi bekatul

Zat gizi	Kadar
Protein	12,32%
Lipid	20%
Karbohidrat	55%
Serat	31,5%
Abu	11,93%

Sumber: Chen, 2005

Menurut Astawan (2009), bekatul merupakan sumber serat pangan yang sangat baik dalam mengosogknkan perut dari sisa makanan yang tidak tercerna. Serat makanan merupakan polisakarida yang tidak dapat dicerna oleh enzim yang ada pada usus, selain itu juga tidak menghasilkan energi (Tirtawinata, 2006). Braig, dkk., (2007) , menyatakan bahwa serat bekatul mengandung 27% selulosa, 37% hemiselulosa, dan 5% lignin. Berbagai hasil menyatakan bahwa bekatul memiliki nilai gizi tinggi, mengandung senyawa bioaktif yang berfungsi sebagai antibakteri. Komponen bioaktif yang berperan sebagai antibakteri diantaranya adalah senyawa fenolik seperti golongan flavonoid, alkaloid, saponin, steroid, dan tanin (Ningsih, dkk., 2016).

2.3 Selulosa

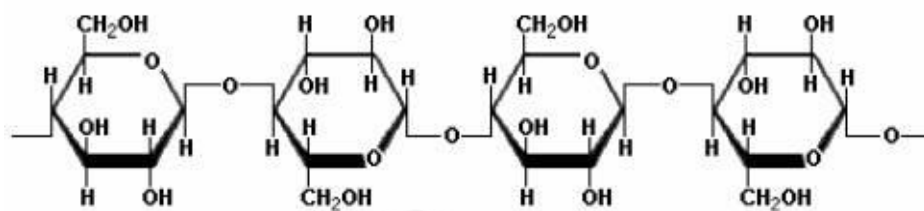
Selulosa adalah unsur pokok pada tanaman dan merupakan biopolymer linier dari molekul anhidroglukopiranososa pada ikatan β -1,4 glukosidik yang berlimpah dialam (Dashtban, dkk., 2009). Struktur linier ini menyebabkan selulosa bersifat kristalin dan tidak mudah larut. Selulosa tidak mudah didegradasi secara kimia maupun mekanis. Dialam, biasanya selulosa berasosiasi dengan polisakarida lain seperti hemiselulosa atau lignin membentuk kerangka utama dinding sel tumbuhan (Holtzapple, 1993). Menurut Goksyor dan eriksen (1980).

Selulosa tidak pernah ditemukan dalam keadaan murni di alam, tetapi selalu berasosiasi dengan polisakarida lain seperti lignin, pectin, hemiselulosa dan xilan.

Selulosa ditemukan sebagai dinding sel tumbuhan, tidak larut dalam air, ditemukan banyak pada batang, dahan, tangkai, daun, dan hampir semua jaringan tumbuhan. Kayu, katun, bamboo dan serat tumbuhan mengandung selulosa sebesar (98-99%) (Hawab, 2004). Sedangkan menurut Tjokrokoesoemo (1986) selulosa adalah bahan penyusun utama dari serat dan dinding sel tanaman. Bahan ini terdiri dari sejumlah besar molekul yang saling berikatan melalui gugus β -glukosida dari molekul yang satu dengan gugus hidroksil C-4 dari molekul glukosa yang lain.

Pada tanaman, selulosa dilapisi oleh polimer yang sebagian besar terdiri dari xilan dan lignin. Xilan dapat didegradasi oleh xilanase, akan tetapi lignin sangat sulit terdegradasi. Jika xilan dan lignin dihilangkan, maka selulosa dapat didegradasi oleh selulase dari bakteri atau kapang selulolitik untuk menghasilkan selobiosa dan glukosa (Bayer, dkk., 1994).

Rantai molekul selulosa tersusun sejajar dan dipengaruhi oleh ikatan hydrogen antara gugus-gugus OH yang bersebelahan. Dengan adanya ikatan hydrogen dari gugus-gugus hidroksil antar rantai akan terjadi orientasi paralel yang memanjang. Apabila susunannya teratur maka, akan terjadi daerah yang disebut daerah kristalin, disamping susunan yang teratur ini terdapat pula bagian yang kurang teratur, yang disebut amor. Selulosa mempunyai kemampuan untuk mengikat air yang terabsorpsi pada gugus hidroksil oleh karena terbentuknya ikatan hydrogen (Wirahadikusuma, 1990). Struktur selulosa dapat dilihat pada Gambar 2.2:



Gambar 2.2 Rantai selulosa (Wirahadikusuma, 1990)

2.4 Enzim Selulase

Enzim merupakan protein khusus yang bergabung dengan suatu substrat spesifik untuk mengkatalisis reaksi biokimia dari substrat tersebut (Maier, dkk., 2000). Menurut Lehninger (1997), enzim adalah biokatalisator yang mampu meningkatkan kecepatan reaksi spesifik tanpa ikut bereaksi dan tidak menghasilkan produk samping, bersifat jauh lebih efisien dibandingkan dengan katalis lain, disebabkan molekul enzim memiliki spesifitas yang tinggi terhadap substratnya.

Aktivitas enzim dipengaruhi banyak faktor. Faktor-faktor tersebut menentukan efektivitas kerja enzim. Apabila faktor tersebut berada pada kondisi yang optimum, maka kerja enzim juga akan maksimal. Beberapa faktor yang mempengaruhi kerja enzim yaitu konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, pH (keasaman), suhu, waktu kontak dan produk akhir (Poedjiadi, 2012).

1. Konsentrasi enzim

Seperti pada katalis lain, kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim tergantung pada konsentrasi enzim tersebut. Pada suatu konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim.

2. Konsentrasi substrat

Hasil eksperimen menunjukkan bahwa dengan konsentrasi enzim yang tetap, maka penambahan konsentrasi substrat akan menaikkan kecepatan reaksi. Akan tetapi pada batas konsentrasi tertentu, tidak terjadi kenaikan kecepatan reaksi walaupun konsentrasi substrat diperbesar. Keadaan ini telah diterangkan oleh Michaelis-Menten dengan hipotesis mereka tentang terjadinya kompleks enzim-substrat.

3. pH (Keasaman)

Seperti protein pada umumnya, struktur ion enzim tergantung pada pH lingkungannya. Enzim dapat membentuk ion positif, ion negatif atau ion bermuatan ganda (*zwitter ion*). Dengan demikian perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektifitas sisi aktif enzim dalam membentuk enzim-substrat. pH rendah atau pH tinggi juga dapat mengakibatkan terjadinya denaturasi yang mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim. Oleh karena itu, enzim memiliki pH optimum yang berbeda-beda.

4. Suhu

Reaksi enzimatik juga dipengaruhi oleh suhu. Suhu optimum merupakan suhu yang paling tepat bagi suatu reaksi yang menggunakan enzim. Karena enzim merupakan suatu protein, maka kenaikan suhu juga dapat menyebabkan proses denaturasi yang menyebabkan sisi aktif enzim terganggu dan mengurangi kecepatan dari reaksi.

Menurut Palmer (1985), reaksi antara enzim dengan substrat dapat terjadi menurut dua hipotesis berikut:

a. Hipotesis *Lock and Key*

Spesifitas enzim termasuk adanya struktur komplementer antara enzim dengan substrat terjadi karena substrat mempunyai kesesuaian bentuk ruang dengan enzim pada struktur sisi aktif enzim.

b. Hipotesis *Induce-Fit*

Substrat mempunyai kesesuaian ruang dengan sisi aktif pada kompleks enzim-substrat, tetapi dalam proses pengikatan substrat enzim mengalami perubahan konformasi sehingga strukturnya sesuai dengan substrat. Proses ini disebut sebagai proses induksi.

Enzim selulase merupakan enzim yang memegang peranan penting dalam proses biokenversi limbah-limbah organik berselulosa menjadi glukosa (Chalal, 1983). Pembentukan glukosa secara enzimatik sesuai dengan reaksi katalitik berikut:



Keterangan:

E : enzim
 S : substrat
 ES : enzim-substrat
 P : produk

Reaksi diatas menunjukkan bahwa terjadi reaksi sementara antara enzim dengan substrat. Ikatan ini sifatnya labil dan hanya terjadi dalam waktu yang singkat. Kemudian ikatan ini putus kembali menjadi enzim dan produk, dalam hal ini berupa glukosa. Pembentukan glukosa ini terjadi karena adanya degradasi selulosa dalam substrat *CMC* oleh enzim selulase.

2.5 Ekstraksi Maserasi

Ekstraksi adalah metode pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan kelarutannya terhadap dua cairan yang tidak saling larut. Prinsip ekstraksi adalah melarutkan senyawa polar pada pelarut polar dan senyawa nonpolar pada pelarut nonpolar. Salah satu metode ekstraksi adalah maserasi. Maserasi dilakukan dengan cara perendaman sampel dan akan terjadi pemecahan dinding dan membrane sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada di dalam sitoplasma akan larut dalam pelarut organik. Larutan yang konsentrasinya tinggi akan terdesak keluar dan diganti oleh cairan penyari dengan konsentrasi rendah, peristiwa tersebut dilakukan secara berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di dalam dan di luar sel (Voight, 1995).

Kelebihan dari metode maserasi adalah sederhana, relatif murah, tidak memerlukan peralatan yang rumit, terjadi kontak antara sampel dan pelarut yang cukup lama dan dapat menghindari kerusakan komponen senyawa yang tidak tahan panas. Pada umumnya, ekstraksi akan bertambah baik bila permukaan serbuk yang bersentuhan dengan pelarut makin luas. Pada dasarnya semakin halus serbuk bekatul, maka semakin baik pula hasil ekstraknya, akan tetapi dalam perlakuannya tidak selalu demikian karena ekstraksi masih tergantung pada sifat fisik dan kimia dengan yang bersangkutan (Ahmad, 2006)

Pemilihan pelarut organik yang akan digunakan dalam ekstraksi komponen aktif merupakan faktor penting dan menentukan untuk mencapai tujuan dan sasaran ekstraksi komponen. Semakin tinggi nilai konstanta dielektrik,

titik didih dan kelarutan dalam air, maka pelarut akan bersifat makin polar (Sudarmadji dkk., 2003).

2.6 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan Bakteri

Bakteri hidup tersebar di alam, antara lain di tanah, air, udara dan makanan. Secara garis besar, bakteri dapat dibedakan atas bakteri Gram positif dan Gram negatif. Bakteri berkembang biak dengan jalan membelah diri. Interval waktu yang dibutuhkan bakteri untuk membelah diri berbeda antara yang satu dengan yang lainnya (Pelczar, 1986). Perbedaan bakteri Gram positif dengan Gram negatif ditunjukkan pada Tabel 2.2:

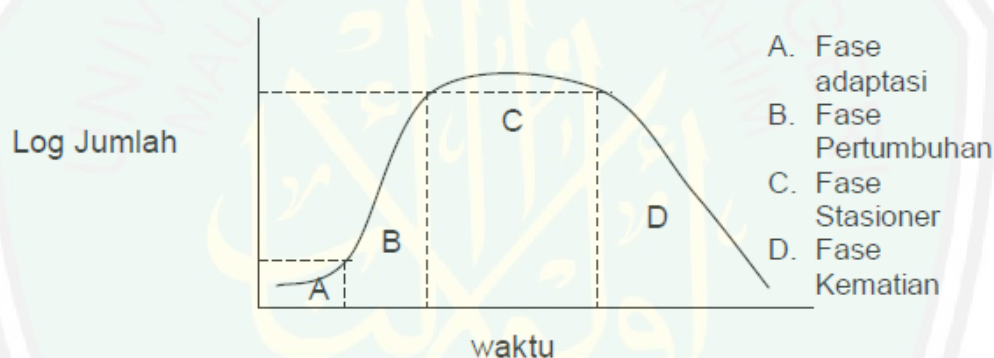
Tabel 2.2 Perbedaan bakteri gram positif dan gram negatif

No	Sifat	Perbedaan Relatif	
		Bakteri gram positif	Bakteri gram negatif
1)	Komposisi dinding sel	Kandungan lipid rendah (1-4%)	Kandungan lipid tinggi (11-22%)
2)	Peptidoglikan	Lapisan tebal (20-80 mm)	Lapisan tipis
3)	Asam teikoat	Ada	Tidak ada
4)	Ketahanan terhadap penisilin	Lebih sensitif	Lebih tahan
5)	Penghambatan oleh pewarnaan basa. Contoh siolet, kristal	Lebih dihambat	Kurang dihambat
6)	Kebutuhan nutrient	Kompleks spesies relatif kompleks	Kebanyakan spesies relatif sederhana

Sumber: Pelczar, 1986

Ketika sejumlah bakteri diinokulasikan pada media pertumbuhan cair dan populasi dihitung pada interval-interval suatu plot disebut kurva pertumbuhan bakteri. Ada 4 fasa dalam kurva tersebut, yaitu: Fasa lag, terjadi ketika jumlah perubahan sel sangat sedikit karena sel tidak segera mereproduksi diri dalam

media baru. Sel tidak aktif pada tahap ini, karena populasi mikroba sedang mengalami aktivitas metabolisme tertentu yang meliputi DNA dan sintesis enzim. Fasa log (eksponensial), terjadi ketika sel mulai membelah dan masuk ke dalam periode pertumbuhan. Reproduksi sel paling aktif selama periode ini dan waktu generasinya konstan. Fase stasioner, terjadi ketika laju pertumbuhan lambat sehingga jumlah bakteri yang hidup dan mati seimbang. Fase kematian, terjadi ketika jumlah kematian akhirnya melebihi jumlah sel-sel baru terbentuk dan memasuki fase kematian atau penurunan (Tortora, 2001).



Gambar 2.3 Kurva pertumbuhan bakteri (Prakoso, 2014)

2.6.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri Gram positif, selnya berbentuk bola dengan garis tengah 0,5-1,5 μm tersusun dalam kelompok-kelompok tidak teratur. *S. aureus* tidak memiliki kapsul dan spora. Membran selnya mengandung dua komponen utama, yaitu peptidoglikan serta asam tekoat. *S. aureus* bersifat anaerob fakultatif, tumbuh lebih cepat dan lebih banyak dalam keadaan aerobik. Suhu optimumnya mencapai 35-40 $^{\circ}\text{C}$ (Pelczar dan Chan, 1986). *S. aureus* mudah tumbuh pada kebanyakan pembenihan bakteri dalam keadaan aerobik atau mikroaerofilik. Bakteri ini tumbuh paling cepat pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$, tetapi

membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25 °C) (Supardi dan Sukanto, 1999). Pada umumnya, bakteri Gram positif mudah dibunuh oleh ampisilin. Sistem klasifikasinya sebagai berikut (Salle, 1961) :

Domain	: Bacteria
Kerajaan	: Eubacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Familia	: Staphylococcaceae
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>



Gambar 2.4 Bakteri *Staphylococcus aureus* (Yudhie, 2009)

2.6.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah bakteri Gram negatif yang berbentuk batang pendek lurus (kokobasil), dengan ukuran 1,1-1,5 μm x 2,0-6,0 μm . *E. Coli* tidak memiliki kapsul dan spora. Bersifat anaerob fakultatif, tumbuh dengan mudah pada medium nutrisi sederhana (Pelczar dan Chan, 1986). Bakteri Gram negatif cukup peka terhadap streptomisin (Volk dan Wheeler, 1993). Sistem klasifikasi sebagai berikut (Salle, 1961) :

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>



Gambar 2.5 Bakteri *Escherichia coli* (Robert, 2009)

E. coli tumbuh pada suhu antara 10-40 °C dengan suhu optimum 37 °C. pH optimum untuk pertumbuhannya adalah pada 7,0-7,5, pH minimum pada 4,0 dan maksimum pada 9,0. Bakteri ini sangat sensitif terhadap panas (Supardi dan Sukamto, 1999). Kontrol positif untuk bakteri Gram negatif menggunakan streptomisin 6,25 mg/mL (Soetan, dkk., 2006).

2.6.3 Media Pertumbuhan Bakteri

Media pertumbuhan mikroorganisme adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran zat-zat makanan (nutrisi) yang diperlukan mikroorganisme untuk pertumbuhannya. Bahan nutrisi yang tersedia dapat berupa bahan alami dan dapat pula berupa bahan sintetis. Komposisi dari *nutrient agar* antara lain ekstrak *beef*, pepton dan agar (Pelczar dan Chan, 1986). Berdasarkan bentuknya, media dibagi menjadi 3, yaitu (Mukhlis, 2008) :

1. Media cair

Komposisi dapat sintetis dapat pula alami. Keadaan cair karena tidak ditambahkan bahan pematat. Contohnya: *Nutrient Broth* (NB).

2. Media padat

Sama halnya dengan media cair, hanya bedanya disini ditambahkan bahan pematat (agar-agar, amilum atau gelatin). Contohnya *Nutrient Agar* (NA).

3. Media semi padat (semi solid)

Media ini termasuk media padat, tetapi karena keadaannya lembek maka disebut semi solid. Bahan pematat yang ditambahkan kurang dari setengah medium padat, sedangkan komposisinya sama dengan yang lainnya.

2.7 Antibakteri

Antibakteri adalah zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau bahkan mematikan bakteri dengan cara mengganggu metabolisme mikroba yang merugikan (Madigan, 2005). Antibakteri termasuk kedalam antimikroba yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Di alam semesta ini Allah SWT telah menciptakan segala sesuatu berpasangan. Sebagaimana firman Allah SWT dalam Q.S Yasin ayat 36:

سُبْحَانَ الَّذِي خَلَقَ الْأَزْوَاجَ كُلَّهَا مِمَّا تُنْبِتُ الْأَرْضُ وَمِنْ أَنْفُسِهِمْ وَمِمَّا لَا يَعْلَمُونَ

Artinya: “Maha Suci Tuhan yang telah **menciptakan pasangan-pasangan semuanya**, baik dari apa yang ditumbuhkan oleh bumi dan dari diri mereka maupun dari apa yang tidak mereka ketahui.”

Menurut Shihab (2002) dalam tafsir Al-Mishbah menjelaskan bahwa arti “pasangan” digunakan untuk dua hal yang berdampingan (bersamaan), bisa akibat

kesamaan dan bisa juga karena bertolak belakang seperti halnya bakteri dan antibakteri. Dimana bakteri merupakan suatu penyakit dan antibakteri sebagai penawarnya (obatnya). Dari sahabat Abu Hurairah bahwasannya Rasulullah SAW bersabda:

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

“Tidaklah Allah turunkan penyakit kecuali Allah turunkan pula obatnya”

Dari riwayat Imam Muslim dari Jabir bin Abdillah dia berkata bahwa Rasulullah SAW bersabda:

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ، فَإِذَا أَصَابَ الدَّوَاءُ الدَّاءَ، بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ

“Setiap penyakit pasti memiliki obat. Bila sebuah obat sesuai dengan penyakitnya maka dia akan sembuh dengan seizin Allah Subhanahu wa Ta'ala.” (HR. Muslim)

Hadis di atas menjelaskan bahwa setiap penyakit pasti ada obatnya. Ada berbagai macam obat herbal, salah satunya dari tumbuhan. Banyak senyawa aktif yang terkandung dalam tumbuhan, seperti halnya bekatul. Didalam bekatul terdapat senyawa aktif yang dapat digunakan sebagai antibakteri. Menurut Zhang, dkk., (2010) bekatul merupakan salah satu sumber yang kaya akan senyawa bioaktif termasuk fenolik yang dapat digunakan sebagai antibakteri.

Senyawa antibakteri secara umum adalah suatu komponen yang bersifat dapat menghambat pertumbuhan (bakteriostatik) atau membunuh (bakterisidal). Senyawa antibakteri digunakan untuk kepentingan pengobatan infeksi pada manusia dan hewan (Ganiswara, dkk., 1995). Aktivitas bakteriostatik merupakan antibakteri yang berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan jika bahan antibakteri dihilangkan, maka perkembangbiakan bakteri berjalan seperti semula.

Sedangkan aktivitas bakterisidal yakni antibakteri digunakan untuk membunuh bakteri serta jumlah total organisme yang dapat hidup. Daya bakterisidal berbeda dengan bakteriostatik karena prosesnya berjalan searah, yaitu bakteri yang telah mati tidak dapat dibiakkan kembali meskipun bahan bakterisidal dihilangkan (Lay, 1992).

2.7.1 Mekanisme Kerja Zat Antibakteri

Zat antibakteri dalam melakukan efeknya, harus dapat mempengaruhi bagian-bagian vital sel seperti membran sel, enzim-enzim dan protein struktural. Pelczar (1986), menyatakan bahwa mekanisme kerja zat antibakteri dalam melakukan efeknya terhadap mikroorganisme adalah sebagai berikut:

1. Merusak Dinding Sel

Pada umumnya bakteri memiliki suatu lapisan luar yang kaku disebut dinding sel (peptidoglikan). Sintesis dinding sel ini melibatkan sejumlah langkah enzimatik yang banyak diantaranya dihalangi oleh antimikroba. Rusaknya dinding sel bakteri misalnya karena pemberian enzim lisozim atau hambatan pembentuknya oleh karena obat antimikroba, dapat menyebabkan sel bakteri lisis. Kerusakan dinding sel akan berakibat terjadinya perubahan-perubahan yang mengarah pada kematian sel karena dinding sel berfungsi sebagai pengatur pertukaran zat-zat dari luar dan ke dalam sel, serta memberi bentuk sel.

2. Mengubah Permeabilitas Membran Sel

Sitoplasma semua sel hidup dibatasi oleh selaput yang disebut membran sel yang mempunyai permeabilitas selektif, membran ini tersusun atas fosfolipid dan

protein. Membran sel berfungsi untuk mengatur keluar masuknya zat antar sel dengan lingkungan luar, melakukan pengangkutan zat-zat yang diperlukan aktif dan mengendalikan susunan dalam diri sel. Proses pengangkutan zat-zat yang diperlukan baik ke dalam maupun keluar sel dimungkinkan karena di dalam membran sel terdapat enzim protein untuk mensintesis peptidoglikan komponen membran luar. Rusaknya dinding sel, mengakibatkan bakteri secara otomatis akan berpengaruh pada membran sitoplasma. Beberapa bahan antimikroba seperti fenol, kresol, detergen dan beberapa antibiotik dapat menyebabkan kerusakan pada membran sel, bahan-bahan ini akan menyerang dan merusak membran sel sehingga fungsi semi permeabilitas membran mengalami kerusakan yang akan mengakibatkan terhambatnya sel atau matinya sel.

3. Kerusakan Sitoplasma

Sitoplasma atau cairan sel terdiri atas 80% air, asam nukleat, protein, karbohidrat, lipid, ion anorganik dan berbagai senyawa dengan bobot molekul rendah. Kehidupan suatu sel tergantung pada terpeliharanya molekul-molekul protein dan asam nukleat dalam keadaan alamiahnya. Konsentrasi tinggi beberapa zat kimia dapat mengakibatkan koagulasi dan denaturasi komponen-komponen seluler yang vital.

4. Menghambat Kerja Enzim

Enzim dan protein yang terdapat di dalam sel membantu kelangsungan proses-proses metabolisme. Banyak zat kimia telah diketahui dapat mengganggu reaksi biokimia misalnya logam-logam berat, golongan tembaga, perak, air raksa dan senyawa logam berat lainnya yang umumnya efektif sebagai bahan antimikroba pada konsentrasi relatif rendah. Logam-logam ini akan mengikat

gugus enzim sulfhidril yang berakibat terhadap perubahan protein yang terbentuk. Penghambatan ini dapat mengakibatkan terganggunya metabolisme atau matinya sel.

5. Menghambat Sintesis Asam Nukleat dan Protein

DNA, RNA dan protein memegang peranan penting dalam sel. Beberapa bahan antimikroba dalam bentuk antibiotik misalnya kloramfenikol, tetrasilin, prumysin menghambat sintesis protein. Sedangkan sintesis asam nukleat dapat dihambat oleh senyawa antibiotik misalnya mitosimin. Bila terjadi gangguan pada pembentukan atau pada fungsi zat-zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel.

2.7.2 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Antibakteri

Banyak faktor dan keadaan yang mempengaruhi kerja zat antibakteri dalam menghambat atau membasmi organisme patogen. Semuanya harus dipertimbangkan agar zat antibakteri tersebut dapat bekerja secara efektif. Beberapa hal yang dapat mempengaruhi kerja zat antibakteri adalah sebagai berikut (Pelczar, 1986):

1. Konsentrasi atau Intensitas Zat Antimikroba

Semakin tinggi konsentrasi suatu zat antimikroba, maka semakin tinggi daya antimikrobanya. Artinya, banyak bakteri akan terbunuh lebih cepat bila konsentrasi zat tersebut lebih tinggi.

2. Jumlah Mikroorganisme

Semakin banyak jumlah organisme yang ada, maka semakin banyak pula waktu yang diperlukan untuk membunuhnya.

3. Suhu

Kenaikan suhu dapat meningkatkan keefektifan bahan mikrobial. Hal ini disebabkan zat kimia merusak mikroorganisme melalui reaksi kimia.

4. Spesies Mikroorganisme

Spesies mikroorganisme menunjukkan ketahanan yang berbeda-beda terhadap suatu bahan kimia tertentu.

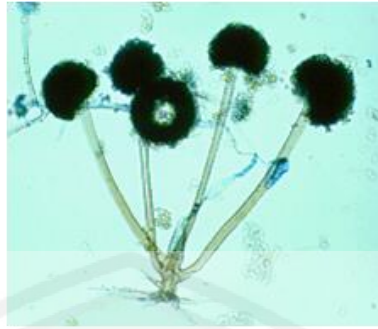
5. Keasaman atau Kebasaan (pH)

Mikroorganisme yang hidup pada pH asam akan lebih mudah dibasmi pada suhu rendah dan dalam waktu yang singkat bila dibandingkan dengan mikroorganisme yang hidup pada pH basa.

2.8 *Rhizopus oryzae*

Jamur merupakan salah satu mikroorganisme yang dapat digunakan dalam proses fermentasi karena tidak toksin. Jamur juga berperan sebagai pengurai atau dekomposer bahan organik. Salah satu jenis jamur pengurai yaitu *Rhizopus oryzae* adalah kapang yang sering digunakan untuk tempe atau oncom (Gambar 2.6). *Rhizopus oryzae* memiliki karakteristik, diantaranya miselia berwarna putih, akan tetapi ketika dewasa tertutup oleh sporangium yang berwarna abu-abu kecoklatan (Rahma, 2000). Menurut Germain (2006) klasifikasi *Rhizopus oryzae* adalah:

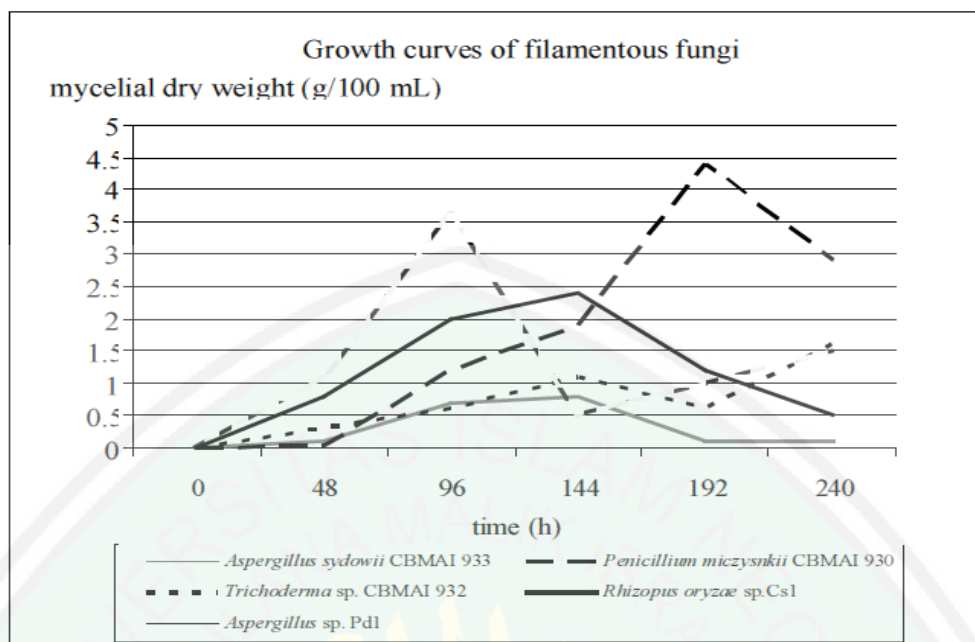
Kingdom	: fungi
Divisi	: Zygomycota
Class	: Zygomycetes
Ordo	: Mucorales
Famili	: Mucoraceae
Genus	: <i>Rhizopus</i>
Spesies	: <i>Rhizopus oryzae</i>



Gambar 2.6 *Rhizopus oryzae* (Nuryono, dkk., 2006)

Kapang ini bersifat heterolitik, yaitu reproduksinya dapat berupa seksual dengan membentuk zigospora, oospora atau aseksual dengan membentuk sporangiospor dan terkadang dengan kondisi konidia, habitat alamiahnya di air, tanah dan hewan. Nuryono, dkk., (2006) menyatakan bahwa *Rhizopus oryzae* biasa digunakan dalam fermentasi berbagai macam tempe dan oncom hitam. Pertumbuhannya cepat membentuk miselium seperti kapas. *Rhizopus oryzae* mempunyai stolon dan rhizoid yang warnanya gelap jika sudah tua, dan hidupnya bersifat sporofit.

Setiap mikroorganisme mempunyai kurva pertumbuhan, begitu pula dengan jamur. kurva tersebut diperoleh dari menghitung massa sel pada kapang atau kekeruhan media pada jamur dalam waktu tertentu. Kurva pertumbuhan mempunyai beberapa fase, diantaranya :

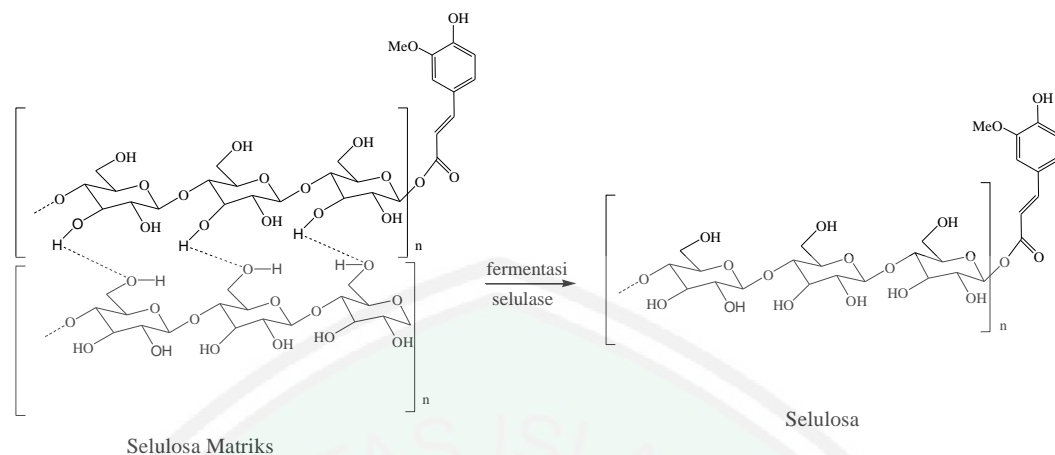


Gambar 2.7 Kurva pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae* (Melgar, dkk., 2013)

Keterangan:

1. fase lag : 0-48 jam
2. fase log (esensial) : 48-96 jam
3. fase deselerasi : 96-144 jam
4. fase stasioner : 144- 192 jam
5. fase kematian dipercepat : 192-240 jam

Rhizopus oryzae ini mampu meningkatkan kadar fenolik yang terikat pada serat bekatul pada saat fermentasi. Hal ini terjadi karena jamur mengandung enzim selulase yang mampu membuka serat selulase, sehingga senyawa fenolik yang terikat diantara selulosa akan terlepas. Dugaan reaksi yang terjadi pada saat pemutusan ikatan antara serat dan senyawa fenol ditampilkan pada gambar 2.8:



Gambar 2.8 Dugaan reaksi pembukaan matriks serat pada proses fermentasi (Amalia, 2016)

Enzim selulase berperan dalam hidrolisis selulosa dengan memecah ikatan β -1,4-D-glikosida untuk menghasilkan oligosakarida maupun glukosa. Enzim selulase diklasifikasikan menjadi tiga tipe, yaitu endoglukanase yang berperan memecah struktur selulosa kristal, eksoglukanase yang berperan memecah selulosa menjadi disakarida selubiosa dan selobiase (β -glukosidae) yang berperan untuk memecah selubiosa menjadi glukosa (Doi, dkk., 2003). Serat tersusun atas gabungan mikrofibril-mikrofibril yang terbentuk dari gabungan rantai-rantai selulosa yang bagian kristalannya akan bergabung dengan bagian nonkristalin. Degradasi serat oleh bakteri tersebut menjadi senyawa yang lebih sederhana menyebabkan terlepasnya ikatan kovalen antara senyawa fenolik dengan serat tidak larut (Zubaidah, 2012).

2.9 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 dimana 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 (Suprihatin, 2010).

Fermentasi dapat meningkatkan nilai gizi bahan yang berkualitas rendah serta berfungsi dalam pengawetan bahan dan merupakan suatu cara untuk menghilangkan zat antinutrisi atau racun yang terkandung dalam suatu bahan makanan (Wasito, 2005). Keberhasilan fermentasi ditentukan oleh beberapa faktor yaitu:

1. Lama fermentasi

Waktu yang dibutuhkan dalam proses fermentasi biasanya adalah 4-5 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. *S. cerevisiae* dapat melakukan aktivitasnya pada suhu 4–32 °C. *S. Cerevisiae* dapat tumbuh optimum pada suhu 28–30 °C.

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.

2.10 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji senyawa antibakteri adalah untuk mengetahui apakah suatu senyawa uji dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan mengukur respon pertumbuhan populasi mikroorganisme terhadap agen antibakteri. Obat yang digunakan untuk membasmi bakteri penyebab infeksi pada manusia harus

memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin, bersifat sangat toksik untuk bakteri, tetapi relatif tidak toksik untuk hospes (Pratiwi, 2008). Penentuan kepekaan bakteri patogen terhadap antibakteri pada dasarnya dapat dilakukan melalui dua cara, yaitu:

1. Metode Difusi

Prinsip metode difusi adalah pengukuran potensi antibakteri berdasarkan pengamatan diameter daerah hambatan bakteri karena berdifusinya obat dari titik awal pemberian ke daerah difusi. Metode yang paling sering digunakan adalah metode difusi agar, menggunakan cakram kertas saring yang berisi sejumlah tertentu obat yang ditempatkan pada permukaan medianya. Setelah diinkubasi, diameter zona hambatan sekitar cakram dipergunakan mengukur kekuatan hambatan obat terhadap organisme uji (Jawetz, 1996).

Penuangan media metode difusi ke dalam cawan petri ada dua cara, yaitu metode *pour plate* dan *spread plate*. Pada metode *pour plate*, sebanyak 1 mL atau 0,1 mL larutan biakan aktif dimasukkan ke dalam cawan petri kosong kemudian ditambahkan media agar dalam keadaan hangat dan dihomogenkan. Dibiarkan memadat dan koloni bakteri akan berada di atas maupun di bawah media padat. Pada metode *spread plate*, sebanyak 1 mL atau 0,1 mL larutan biakan aktif dimasukkan dalam cawan petri berisi media padat kemudian diratakan dengan L glass, sehingga koloni bakteri akan berada di atas permukaan media padat saja (Tortora, 2001). Zona bening diukur menggunakan penggaris dengan cara mengurangi diameter keseluruhan (cakram + zona hambat) dengan diameter cakram (Volk dan Wheeler, 1993). Klasifikasi respon hambatan pertumbuhan dapat dilihat pada Tabel 2.3

Tabel 2.3 Kategori diameter zona hambat (Susanto, 2012)

Diameter zona hambat	Respon hambatan
≤ 5 mm	Lemah
6-10 mm	Sedang
11-20 mm	Kuat
≥ 21 mm	Sangat kuat

Sumber: Susanto, 2012

2. Metode Dilusi

Prinsip metode dilusi adalah larutan uji diencerkan hingga diperoleh beberapa konsentrasi, kemudian masing-masing konsentrasi larutan uji ditambahkan suspensi bakteri dalam media. Pada dilusi padat, tiap konsentrasi larutan uji dicampurkan ke dalam media agar. Setelah padat kemudian ditanami bakteri (Hugo & Russel, 1987). Prosedur uji dilusi digunakan untuk mencari Konsentrasi Hambat Minimum (KHM), yaitu konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM), yaitu konsentrasi terendah yang dapat membunuh bakteri.

Masing-masing konsentrasi larutan uji pada metode dilusi ditambahkan dengan suspensi bakteri dalam media cair kemudian diinkubasi dan diamati pertumbuhan bakteri uji yang tampak berdasarkan kekeruhan media. Media yang berisi konsentrasi senyawa antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri terlihat memiliki kekeruhan paling tipis dibandingkan dengan konsentrasi senyawa antibakteri yang tidak menghambat pertumbuhan. Konsentrasi senyawa antibakteri yang dapat membunuh bakteri akan memberikan hasil berupa media yang tidak tampak adanya pertumbuhan bakteri pada saat di *streak* ke media lain. Potensi antibakteri dapat ditentukan dengan melihat konsentrasi terendah yang dapat menghambat atau membunuh bakteri (Mc Kane dan Kandel, 1996).

Beberapa penelitian mengenai senyawa yang diduga memiliki aktivitas antibakteri telah dilakukan, terutama terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Menurut Kader, dkk., (2012) yang menguji ekstrak metanol akar plethekan dengan konsentrasi 25 mg/ml dapat menghambat bakteri *S. aureus* dengan diameter daya hambat sebesar 13 mm dan bakteri *E. coli* sebesar 18 mm. Sedangkan Senthilkumar, dkk., (2013) yang menguji ekstrak metanol daun plethekan dengan konsentrasi 100 mg/ml hanya dapat menghambat bakteri *E. coli* dengan diameter daya hambat sebesar 6 mm.



BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Juni 2017 hingga februari 2018 di Laboratorium Riset Biokimia dan Bioteknologi Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat untuk ekstraksi maserasi : ayakan 60 mesh, spatula, neraca analitik, pengaduk gelas, Erlenmeyer 250 mL, gelas ukur 100 mL, *shaker*, Erlenmeyer vakum, corong Buchner, pompa vakum, *rotary evaporator vacuum*.

Alat-alat untuk uji aktivitas antibakteri: cawan petri, *autoclave*, *shaker*, LAF (*Laminar Air Flow*), lampu Bunsen, jarum ose, *hotplate*, stirrer, gelas ukur 100 mL, Erlenmeyer 250 mL, mikropipet, *blue tip*, pinset, jangka sorong, *wrap plastic*, *aluminium foil*, tabung reaksi, dan korek api.

3.2.2 Bahan

Bekatul (diperoleh dari penggilingan padi di daerah Kec. Singosari Kab. Malang), *Rhizopus oryzae* (diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya Malang), *S. aureus*, *E. coli* (diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang), media *Potato*

Dextrose Agar (Merck), *Potato Dextrose Broth* (Merck), media *Nutrient Broth* (Himedia), media *Nutrient Agar* (Merck), etanol (Merck), DMSO (Merck), antibiotic kloramfenikol, aquades, alkohol, kertas saring, kapas, kertas label, dan tisu.

3.3 Rancangan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui suhu dan pH optimum dari ekstrak bekatul terfermentasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji. Penelitian ini menggunakan metode maserasi untuk ekstraksi senyawa aktif, hasil ekstraksi diuji antibakteri dengan metode difusi. Faktor pH (P) dilakukan dengan tiga variasi yakni 4, 5, dan 6. Sedangkan faktor suhu (T) dilakukan dengan tiga variasi yakni 30 °C, 37 °C, 44 °C. Berikut kombinasi perlakuan pH dan suhu pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Kombinasi perlakuan antara pengaruh pH dan suhu

pH / Suhu	T ₁ (30 °C)	T ₂ (37 °C)	T ₃ (44 °C)
P ₁ (4)	P ₁ T ₁	P ₁ T ₂	P ₁ T ₃
P ₂ (5)	P ₂ T ₁	P ₂ T ₂	P ₂ T ₃
P ₃ (6)	P ₃ T ₁	P ₃ T ₂	P ₃ T ₃

Adapun proses penelitian yang dilakukan adalah bekatul yang telah dipreparasi dicampurkan dengan isolat jamur *Rhizopus oryzae* dengan variasi pH yakni 4, 5 dan 6, dimana nantinya akan di inkubasi selama 24 jam. Selanjutnya, dilakukan proses fermentasi dengan menggunakan variasi suhu 30, 37, dan 44 °C selama 120 jam. Jadi, akan dilakukan perlakuan dengan mengkombinasikan variasi pH serta suhu (seperti yang digambarkan pada Tabel 3.1) sehingga akan

didapatkan total 9 perlakuan. Hasil fermentasi selanjutnya akan dianalisis aktivitas antibakterinya. Masing-masing percobaan ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 (tiga) kali. Kontrol yang digunakan pada percobaan ini sebanyak 9 sesuai dengan masing-masing perlakuan tanpa dilakukan penambahan inokulum atau proses fermentasi.

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Preparasi sampel.
2. Pembuatan media *Potato Dextrose Agar* (PDA), media *Potato Dextrose Broth* (PDB), media *Nutrient Agar* (NA) dan media *Nutrient Broth* (NB).
3. Regenerasi jamur *Rhizopus oryzae*, bakteri *E. coli* dan bakteri *S. aureus*.
4. Pembuatan inokulum jamur *Rhizopus oryzae*, bakteri *E. coli* dan bakteri *S. aureus*.
5. Perhitungan jumlah sel bakteri.
6. Fermentasi bekatul dengan variasi pH dan suhu terhadap peningkatan aktivitas antibakteri menggunakan *Rhizopus oryzae*
7. Ekstraksi senyawa antibakteri bekatul terfermentasi menggunakan pelarut etanol.
8. Uji aktivitas antibakteri bekatul terfermentasi dengan metode difusi agar.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Preparasi Sampel (Lathifah, 2008)

Alat yang digunakan seluruhnya dicuci bersih. Cawan petri dibungkus kertas dan plastik. Media *Potato Dextrose Agar* (PDA), media *Potato Dextrose Broth* (PDB), media *Nutrient Agar* (NA) dan media *Nutrient Broth* (NB) pada Erlenmeyer di bungkus menggunakan plastik. Selanjutnya disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C.

Bekatul diayak menggunakan ayakan 60 mesh. Bekatul ditimbang sebanyak 30 gram dan masing-masing dimasukkan ke dalam 9 erlenmeyer 250 ml. Kemudian dicampurkan dengan *buffer* pH 4, 5 dan 6 sebanyak 30 mL dan ditutup dengan kapas dan dibungkus plastik. Disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C.

3.5.2 Pembuatan Media

3.5.2.1 *Potato Dextrose Agar*

Pembuatan media PDA ini dilakukan dengan cara melarutkan 4 gram media PDA bubuk dalam 100 mL akuades dalam beaker glass 250 mL dan dipanaskan hingga mendidih sambil distirer. Larutan tersebut dituang kedalam 16 buah tabung reaksi masing-masing sebanyak 4 mL dan ditutup mulut tabung reaksi dengan kapas dan *plastic wrap*. Selanjutnya, media PDA disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C. Kemudian, didinginkan dalam keadaan miring hingga memadat.

3.5.2.2 *Potato Dextrose Broth*

Pembuatan media PDB ini dilakukan dengan cara melarutkan 4 gram media PDB bubuk dalam 100 mL akuades dalam beaker glass 250 mL dan dipanaskan hingga mendidih sambil distirer. Larutan tersebut dituang kedalam 4 buah erlenmeyer masing-masing sebanyak 25 mL dan ditutup dengan kapas dan *plastic wrap*. Selanjutnya, media PDB disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C.

3.5.2.3 *Nutrient Agar (NA)*

Pembuatan media NA ini dilakukan dengan cara melarutkan 2 gram media NA bubuk dalam 100 mL akuades dan dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk. Larutan tersebut dituang ke dalam 16 buah tabung reaksi masing-masing sebanyak 4 mL dan ditutup mulut tabung reaksi dengan kapas dan *plastic wrap*. Selanjutnya, disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C. Didinginkan dalam keadaan miring hingga memadat

3.5.2.4 *Nutrient Broth (NB)*

Pembuatan media NB ini dilakukan dengan cara melarutkan 1,8 gram media NB bubuk dalam 100 mL akuades dan dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk. Larutan tersebut dituang ke dalam 2 buah Erlenmeyer 100 mL masing-masing sebanyak 50 mL dan mulut Erlenmeyer ditutup dengan alumunium foil. Selanjutnya, disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C. Kemudian didinginkan dan disimpan di dalam lemari es.

3.5.3 Regenerasi Mikroorganisme

3.5.3.1 Jamur *Rhizopus oryzae* (Dewi, dkk., 2004)

Jamur yang akan digunakan harus diregenerasi terlebih dahulu. Disiapkan media miring *Potato Dextrose Agar* (PDA) dalam tabung reaksi yang sudah disterilisasi. Diambil satu ose dari jamur induk dan digoreskan pada media miring yang baru. Jamur yang sudah ditanam dalam media didiamkan hingga bersporulasi penuh, kurang lebih 5 hari pada suhu kamar.

3.5.3.2 Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Bakteri yang akan digunakan harus diregenerasi terlebih dahulu. Disiapkan media *Nutrient Agar* (NA) dalam tabung reaksi yang sudah disterilisasi. Regenerasi ini dilakukan dengan cara mengambil 1 ose isolat bakteri kemudian digoreskan ke media *nutrient agar* yang masih baru dalam tabung reaksi secara aseptis. Setelah itu diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam (Iskandar, 2003).

3.5.4 Pembuatan inokulum

3.5.4.1 Jamur *Rhizopus oryzae* (Aruben, 2016)

Jamur yang sudah diregenerasi dalam media PDA kemudian diinokulasikan 5 ose ke dalam aquades 10 mL secara aseptik. Divortex hingga larutan keruh.

3.5.4.2 Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Disiapkan media cair *Nutrient Broth* (NB) sebanyak 25 mL dalam botol UC yang sudah sterilisasi. Selanjutnya, diambil 1 ose isolat bakteri yang telah

diregenerasi untuk dimasukkan pada media cair NB. Selanjutnya, dilakukan pengocokan di *shaker incubator* pada suhu ruang dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam.

3.5.5 Penghitungan Jumlah Sel Bakteri

Tabung reaksi sebanyak 10 buah diisi dengan NaCl 0,9% steril sebanyak 9 mL. Inokulum bakteri *Bacillus brevis* dalam media *Nutrient Broth* diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan kedalam tabung pertama lalu dihomogenisasi dengan vortex dan dihitung sebagai pengenceran pertama (10^{-1}). Larutan dari tabung pertama dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung kedua sehingga diperoleh pengenceran tingkat kedua (10^{-2}). Demikian seterusnya hingga didapatkan pengenceran 10^{-7} . Penghitungan jumlah sel bakteri dilakukan dengan metode *total plate count* (TPC). Masing-masing pengenceran diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan dalam cawan petri yang berisi media *Nutrient Agar*. Cawan petri digoyang-goyang hingga merata dan didiamkan hingga membeku kemudian diinkubasi dengan posisi terbalik selama 24 jam pada suhu 37°C . Cara menghitung, dipilih cawan petri yang mempunyai koloni antara 30-300. Jika perbandingan antara kedua pengenceran < 2 , maka nilai yang diambil adalah rata-rata dari kedua nilai tersebut dengan memperhatikan nilai pengencerannya. Jika perbandingannya > 2 , maka diambil yang terbesar atau yang terkecil (Harmita, dkk., 2008).

$$\text{Perhitungan jumlah bakteri} = \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{fp} \text{ cfu} \dots\dots\dots (1)$$

3.5.6 Fermentasi Bekatul dengan variasi pH dan Suhu Terhadap Peningkatan Aktivitas Antibakteri menggunakan *Rhizopus oryzae* (Razak, dkk., 2015)

Bekatul yang telah dicampur dengan *buffer* (4, 5, dan 6) selanjutnya ditambah dengan inokulum jamur 10% secara aseptis. Di aduk dengan spatula. Kemudian setiap campuran bekatul dan *buffer* (4, 5, dan 6) diinkubasi pada suhu 30 °C, 37 °C, dan 44 °C selama 120 jam. Sehingga akan dilakukan 9 perlakuan. Hasil fermentasi dikeringkan pada oven dengan suhu 50 °C selama 24 jam. Setelah itu, dilakukan ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol.

3.5.7 Ekstraksi Senyawa Antibakteri Bekatul Terfermentasi menggunakan etanol p.a (Olivera, dkk., 2012)

Bekatul hasil fermentasi diambil sebanyak 15 gram dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL. Selanjutnya dilakukan ekstraksi maserasi menggunakan etanol p.a (1:3 b/v) dan mulut erlenmeyer ditutup menggunakan aluminium foil. Ekstraksi maserasi dilakukan selama 1 jam menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu ruang. Setelah itu, disaring dengan pompa vakum. Filtrat hasil ekstraksi dipekatkan dengan dengan *rotary evaporator*.

3.5.8 Uji Aktivitas Antibakteri Bekatul Terfermentasi dengan Metode Difusi Agar (Mulyadi, dkk., 2013)

Media NA dipanaskan hingga mencair, kemudian didinginkan sampai suhu 40 °C. Selanjutnya dituangkan dalam cawan petri dan dicampurkan masing-masing dengan 0,1 mL larutan bakteri *S. aureus* dan *E. coli* kemudian dihomogenkan dan dibiarkan hingga memadat. Kertas cakram direndam pada hasil ekstrak bekatul yang telah dilarutkan menggunakan DMSO dengan perbandingan 1:1 dalam kontrol. Kontrol positif digunakan antibiotik kloramfenikol 500 mg yang telah dilarutkan dengan DMSO, sedangkan kontrol negatif digunakan DMSO saja. Kertas cakram diletakkan pada permukaan media menggunakan pinset steril dan sedikit ditekan. Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam sampai muncul daerah hambatan. Diukur zona hambatan dengan menggunakan jangka sorong untuk menentukan aktivitas bakteri. Luas zona hambat ditentukan dengan rumus :

$$\text{Zona hambat} = \text{diameter zona bening} - \text{diameter cakram}$$

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bekatul dari padi beras putih yang berasal dari Singosari, Malang. Bekatul ini telah dilakukan pengayakan serta beberapa proses preparasi sebelum digunakan dalam fermentasi. Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan, diantaranya adalah preparasi sampel, pembuatan media *Potato Nutrient Agar*, *Potato Nutrient Broth*, regenerasi jamur *Rhizopus oryzae*, pembuatan media *Nutrient Agar* dan *Nutrient Broth*, regenerasi bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, produksi inokulum, dan yang terakhir fermentasi bekatul dengan variasi pH dan suhu terhadap peningkatan aktivitas antibakteri oleh *Rhizopus oryzae*.

4.1 Preparasi Sampel

Sampel bekatul diayak menggunakan ayakan 60 mesh. Hal ini bertujuan untuk mendapatkan partikel bekatul yang lebih kecil. Semakin besar permukaan sampel, maka dapat mempermudah kelarutan komponen bioaktifnya. Setelah itu sampel ditambahkan *buffer* pH 4, 5 dan 6. Kemudian disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C beserta seluruh peralatan yang akan digunakan dalam proses fermentasi selanjutnya.

Sterilisasi bertujuan untuk mematikan dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain dalam sampel yang dapat mempengaruhi hasil akhir dari penelitian ini. Prinsip utama dari sterilisasi menggunakan autoklaf ini adalah menguapkan air yang bertekanan sebagai pensterilnya. Jika suhu yang digunakan

121°C, maka tekanannya 15-17,5 psi (2 atm). Suhu dan tekanan yang besar memiliki kemampuan yang besar pula untuk membunuh sel. Dan pada tekanan 15 psi, air akan mendidih pada suhu 121°C, sehingga semua jenis kehidupan akan mati saat air mendidih. Kondisi yang baik untuk sterilisasi adalah pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi (2 atm) selama 15 menit (Nester, dkk., dalam Adji, dkk., 2007). Hasil dari preparasi sampel ini adalah bekatul steril berwarna kecoklatan dan peralatan yang telah steril.

4.2 Pembuatan media *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Nutrient Agar* (NA) dan *Nutrient Broth* (NB)

Teknik penumbuhan jamur dengan media *Potato Dextrose Agar* yang berfungsi sebagai asupan nutrisi jamur yang akan dikembangbiakkan. Jamur *Rhizopus oryzae* akan tumbuh pada media PDA miring yang diperoleh dari proses melarutkan media 4 gram PDA serbuk dalam 100 mL akuades dengan menggunakan pemanasan. Setelah itu, media disterilkan dalam autoklaf.

Teknik penumbuhan bakteri dengan menggunakan media *Nutrient Agar* dan *Nutrient Broth* yang berfungsi sebagai asupan nutrisi bagi bakteri yang akan dikembangbiakkan. Media yang dipilih harus mengandung semua unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan dari bakteri. Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* ditumbuhkan pada media NA miring yang diperoleh dari proses melarutkan media NA bubuk sebanyak 2 gram dengan 100 mL akuades dengan menggunakan pemanasan. Sementara itu, media NB yang merupakan media cair selanjutnya akan digunakan sebagai media dalam perkembangbiakan bakteri sebagai inokulum. Media NB diperoleh dengan

melarutkan sebanyak 1,8 gram media NB bubuk ke dalam 100 mL akuades dengan menggunakan pemanasan. Media-media yang telah selesai disiapkan selanjutnya disterilisasi didalam autoklaf.

Media NA merupakan media yang sederhana dan biasa digunakan untuk pertumbuhan mayoritas dari mikroorganisme yang tidak selektif, dalam artian mikroorganisme yang heterotrof. Berdasarkan Fathir (2009) media NA merupakan salah satu media yang umum digunakan pada prosedur bakteriologi seperti untuk mengisolasi organisme kultur murni. Sementara itu, media NB memiliki komposisi sama dengan NA. Media NB akan digunakan pada saat pembuatan inokulum, karena dengan menggunakan media cair maka pertumbuhan dari bakteri akan berjalan lebih cepat dibandingkan dengan media padat. Bakteri dapat tumbuh secara cepat pada media yang homogen, pertumbuhan sel terjadi lebih cepat pada media cair karena bakteri dapat menyerap nutrisi dari media dengan sangat baik dan lebih baik berkontak dengan nutrisi dibanding pada media padat. Hasil dari proses pembuatan media ini yaitu berupa beberapa tabung media NA miring berbentuk padatan berwarna kuning bening yang akan digunakan untuk regenerasi bakteri, serta beberapa Erlenmeyer media cair NB berwarna kuning yang siap digunakan untuk pembuatan inokulum bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

4.3 Regenerasi Jamur *Rhizopus oryzae*

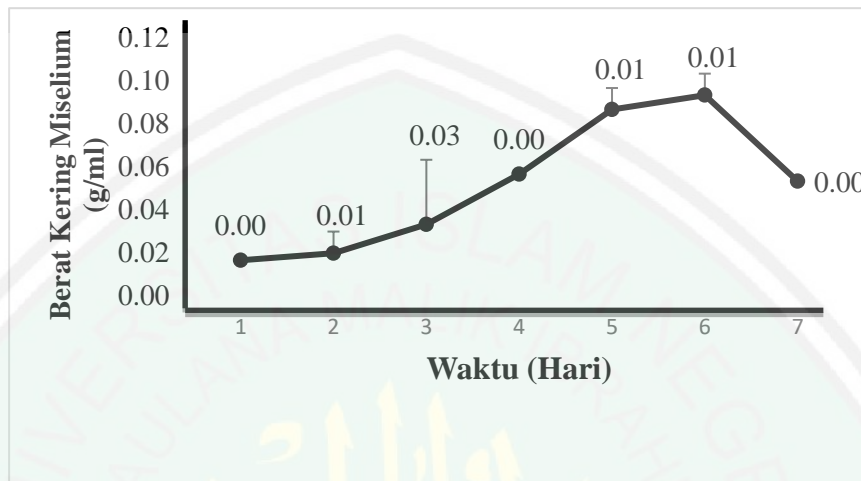
Jamur yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Rhizopus oryzae* yang merupakan salah satu mikroorganisme yang adapat digunakan dalam proses fermentasi karena tidak toksin. *Rhizopus oryzae* pertumbuhannya cepat

membentuk miselium seperti kapas. Jamur ini juga mempunyai rhizoid yang berwarna gelap jika sudah tua dan hidupnya bersifat sporofit (Nuryono, dkk., 2006). Regenerasi *Rhizopus oryzae* dilakukan untuk mendapatkan biakan jamur yang sedang berada pada fase log, sehingga jamur masih berada pada fase produktif. Hal pertama yang dilakukan adalah menyiapkan media PDA miring yang telah disterilisasi. Kemudian sebanyak 1 ose *Rhizopus oryzae* dan digoreskan biakan tersebut ke media PDA yang baru. Biakan yang telah dipindahkan selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 120 jam. Inkubasi bertujuan untuk melihat pertumbuhan jamur tersebut. Hasil dari regenerasi ini adalah berupa biakan jamur yang telah tumbuh pada media PDA miring yang baru.

4.4 Kurva Pertumbuhan Jamur *Rhizopus oryzae*

Hasil regenerasi yang sudah diinkubasi selama 120 jam selanjutnya diambil 1 ose untuk dimasukkan kedalam media cair PDB. Hal ini dilakukan untuk mengetahui kurva pertumbuhan jamur dengan menggunakan metode berat kering. Cara pertama yang dilakukan adalah disiapkan 21 media cair PDB yang steril dan disetiap media diisi 1 ose jamur yang sudah diinkubasi selama 5 hari. Jamur yang diinkubasi dalam 1 hari sebanyak 3 media cair. Hal ini dilakukan selama 7 hari (Melgar, dkk., 2013). Waktu inkubasi yang digunakan selama 7 hari ini bertujuan untuk mengamati fase pertumbuhan jamur. Kurva pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae* selanjutnya diuji standart deviasi. Uji standart deviasi ini dilakukan untuk mengetahui nilai perbedaan antar ulangan. Semakin besar nilai standart deviasi maka semakin besar pula perbedaan antar ulangan, dan

sebaliknya. Berikut standart deviasi zona hambat yang dihasilkan oleh bekatul terfermentasi berada pada Gambar 4.1



Gambar 4.1 Kurva pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae*
(Data label menunjukkan nilai standart deviasi)

Setelah 7 hari dilakukan pengamatan, maka diperoleh hasil bahwa hari ke 1-2, jamur dalam fase adaptasi (fase lag), hari ke 2-4 jamur dalam fase logaritmik, hari ke 4-6 jamur berada pada fase stasioner dan yang terakhir pada hari ke 6-7 jamur mengalami penurunan berat misellium. Hal ini menandakan bahwa jamur dalam fase kematian dipercepat. Salah satu tanda jamur dalam fase stasioner yaitu ketika jamur mengalami peningkatan berat misellium (jumlah sel) sehingga pada fase ini jamur siap dipanen untuk digunakan dalam proses fermentasi (Melgar, dkk., 2013).

4.5 Pembuatan Inokulum Jamur *Rhizopus oryzae*

Produksi inokulum jamur *Rhizopus oryzae* dilakukan untuk mempermudah proses fermentasi karena media yang digunakan adalah media cair. Media cair

yang digunakan dalam memproduksi inokulum jamur *Rhizopus oryzae* ini adalah akuades sehingga dapat lebih mudah bercampur dengan sampel yang akan difermentasi. Produksi inokulum dilakukan dengan cara diambil 5 ose isolate jamur yang telah diregenerasi dan dimasukkan pada media cair akuades steril. Setelah itu dilakukan pengocokan dengan vortex, hingga homogen. Hasil dari produksi inokulum ini berwarna putih keruh. Kemudian inokulum tersebut digunakan dalam proses fermentasi.

4.6 Fermentasi Bekatul dengan Variasi pH dan Suhu terhadap Peningkatan

Aktivitas Antibakteri menggunakan *Rhizopus oryzae*.

Bekatul merupakan bahan alam yang dapat digunakan sebagai obat karena kandungan senyawa aktifnya. Pada zaman sekarang banyak sekali cara baru yang dapat digunakan oleh manusia untuk meningkatkan nilai ekonomi seperti proses fermentasi. Hal ini merupakan bentuk rahmat dan karunia Allah SWT bagi manusia yang berakal. Sebagaimana firman Allah SWT dalam Q.S Az-zumar ayat 21:

أَلَمْ تَرَ أَنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَسَلَكَهُ يَنَابِيعَ فِي الْأَرْضِ ثُمَّ يُخْرِجُ بِهِ زَرْعًا مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ ثُمَّ يَهِيجُ فَتَرَاهُ مُصْفَرًّا ثُمَّ يَجْعَلُهُ حُطَامًا إِنَّ فِي ذَلِكَ لَذِكْرًا لِأُولِي الْأَبْصَارِ

Artinya: *“Apakah kamu tidak memperhatikan, bahwa sesungguhnya Allah menurunkan air dari langit, maka diaturnya menjadi sumber-sumber air di bumi kemudian ditumbuhkan-Nya dengan air itu tanam-tanaman yang bermacam-macam warnanya, lalu menjadi kering lalu kamu melihatnya kekuning-kuningan, kemudian dijadikan-Nya hancur berderai-derai. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat pelajaran bagi orang-orang yang mempunyai akal.”*

Menurut tafsir Al-Maraghi (1993), Dari surat Az-Zumar ayat 21 menjelaskan bahwa Allah SWT telah menciptakan tumbuhan yang bermacam-macam

warnanya, kemudian menjadi kering dan hancur atau berderai-derai. Hal tersebut merupakan dalam proses fermentasi. Fermentasi sendiri merupakan suatu proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Dimana Proses fermentasi mampu meningkatkan nilai gizi bahan yang berkualitas rendah serta berfungsi untuk pengawetan bahan makanan (Wasito, 2005).

Salah satu mikroorganisme pengurai adalah jamur, yang mana jamur tersebut juga akan memberi manfaat bagi orang yang mengetahuinya. Secara implisit Allah SWT berfirman dalam Q.S Al-baqarah ayat 26 tentang mikroorganisme:

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا فَأَمَّا الَّذِينَ آمَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ وَأَمَّا الَّذِينَ كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا أَرَادَ اللَّهُ بِهَذَا مَثَلًا يُضِلُّ بِهِ كَثِيرًا وَيَهْدِي بِهِ كَثِيرًا وَمَا يُضِلُّ بِهِ إِلَّا الْفَاسِقِينَ

Atinya: *"Sesungguhnya Allah tiada segan membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih kecil dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, maka mereka yakin bahwa perumpamaan itu benar dari Tuhan mereka. Dan adapun mereka yang kafir mengatakan: "Apakah maksud Allah menjadikan ini untuk perumpamaan? " dengan perumpamaan itu banyak orang yang disesatkan Allah, dan dengan perumpamaan itu (pula) banyak orang yang diberi-Nya petunjuk. Dan tidak ada yang disesatkan Allah kecuali orang-orang yang fasik."*

Menurut tafsir Al-Maraghi (1986), makna "Allah SWT membuat perumpamaan berupa nyamuk atau hal yang lebih kecil dari pada itu". Contohnya adalah kuman. Kuman tidak dapat dilihat dengan kasat mata melainkan bisa dilihat dengan bantuan mikroskop. Begitu pula dengan jamur yang pertumbuhannya tidak dapat dilihat secara langsung.

Teori sains menyatakan hancurnya tumbuhan atau bahan organik yang mati atau tubuh hewan yang mati disebabkan oleh aktivitas mikroorganisme, terutama oleh bakteri penghancur dan jamur yang mendekomposisi. Keberadaan jamur tidak asing lagi bagi kita meskipun proses pertumbuhannya tidak kasat mata. Jamur berwarna mulai dari warna yang kontras merah-kuning, warna cerah putih kekuningan sampai warna gelap kehitaman. Semua itu merupakan tubuh buah berbagai jamur yang berbeda-beda, tergantung spesiesnya. Dalam penelitian ini jamur yang digunakan adalah *Rhizopus oryzae* di mana jamur ini mengandung enzim selulase yang mampu membuka serat selulase, sehingga senyawa fenolik yang terkandung dalam bekatul serta senyawa antibakteri lainnya akan terlepas. Hal ini dapat meningkatkan nilai ekonomi dan lebih bermanfaat (Hafizah, 2012).

Tujuan proses fermentasi untuk memperoleh peningkatan senyawa aktif dalam ekstrak bekatul. Pada proses fermentasi juga terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi didalamnya. Termasuk pH dan suhu yang juga dapat mempengaruhi proses fermentasi. pH yang tidak sesuai dengan jamur, akan menyebabkan jamur tersebut mati dan menghambat proses fermentasi. Dengan mengatur pH saat proses fermentasi, maka kerja jamur *Rhizopus oryzae* akan semakin maksimal dalam memutus serat-serat yang terkandung dalam bekatul. Sehingga akan didapatkan nilai dari peningkatan aktivitas antibakteri yang lebih maksimal. Menurut Sorenson dan Hesseltine (1986), *Rhizopus sp* tumbuh baik pada kisaran pH 3 hingga pH 6. Secara umum jamur juga membutuhkan air untuk pertumbuhannya, tetapi kebutuhan air jamur lebih sedikit dibandingkan dengan bakteri. Begitu juga dengan suhu yang juga mempengaruhi proses fermentasi. Selayaknya mikroorganisme lain juga memiliki suhu optimum untuk

memaksimalkan pertumbuhannya. Apabila suhu yang diberikan berada diatas suhu optimum, maka pertumbuhan sel akan terhambat (Abdullah, 1995). Menurut Kuswanto dan Slamet (1989) suhu optimal untuk pertumbuhan *Rhizopus sp* adalah 35 °C dan suhu maksimal *Rhizopus sp* adalah 44 °C.

Proses fermentasi dilakukan dengan menggabungkan variasi pH dan suhu. Total ada 9 perlakuan (dengan penambahan 6 perlakuan sebagai blanko, yakni perlakuan yang tidak ditambahkan inokulum dari jamur). Semuanya dilakukan tiga kali pengulangan. Proses fermentasi dilakukan untuk memutuskan ikatan antara serat bekatul dan senyawa fenolik dengan menggunakan jamur *Rhizopus oryzae*. Jamur ini akan memproduksi enzim yang berperan dalam proses degradasi material sel tumbuhan yaitu enzim selulase.

Proses fermentasi dilakukan selama 5 hari karena selama kurun waktu tersebut jamur *Rhizopus oryzae* dapat bekerja memutus serat-serat yang terdapat dalam bekatul secara maksimal. Selama kurang lebih 120 jam, pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae* berada fase yang cukup stabil. Selanjutnya bekatul terfermentasi dikeringkan didalam oven menggunakan suhu 50 °C selama 24 jam untuk menghilangkan kadar air yang terdapat pada bekatul terfermentasi.

4.6.1 Hasil Rendemen Ekstrak Bekatul Terfermentasi

Metode yang digunakan dalam ekstraksi senyawa antibakteri pada penelitian ini adalah maserasi. Ekstraksi maserasi berfungsi untuk memisahkan senyawa-senyawa aktif yang terdapat didalam bekatul terfermentasi dengan cara perendaman menggunakan pelarut etanol p.a. Metode ekstraksi dipilih karena prosesnya dapat mencegah kerusakan senyawa yang terekstrak, dimana metode ini

tidak memakai pemanasan serta kerjanya lebih mudah. Pemilihan pelarut etanol yang merupakan pelarut polar, dikarenakan kebanyakan senyawa yang berada di alam masih terikat dalam senyawa glikosida. Oleh karena itu, ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut etanol yang bersifat polar. Dimana senyawa polar akan larut dengan pelarut polar juga, yang biasa disebut dengan “*like dissolved like*” (Rohman dan Gandjar, 2007).

Proses maserasi dilakukan 1 jam pada suhu ruang dengan menggunakan *shaker*. Perendaman ini mengakibatkan pemecahan dinding dan membrane sel sehingga senyawa aktif metabolit sekunder yang berada di sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik. Proses maserasi ini dilakukan untuk mengekstrak senyawa antibakteri khususnya senyawa fenolik yang telah terpisah dari ikatannya dengan serat setelah dilakukan proses fermentasi. Ekstrak senyawa fenolik dapat meningkatkan aktivitas antibakteri. Setelah maserasi, selanjutnya disaring untuk diambil filtratnya. Filtrat yang diperoleh berwarna kehijauan. Filtrat tersebut dipekatkan menggunakan *rotary evaporator vacuum*. Hasil, pemekatan, kemudian di *freezdrying* untuk menghilangkan sisa air yang diasumsikan masih berada didalamnya. Selanjutnya ekstrak yang diperoleh ditimbang untuk mengetahui hasil rendemennya. Adapun rendemen hasil ekstrak etanol bekatul terfermentasi dapat dilihat pada Tabel 4.1

Tabel 4.1 Rata-rata rendemen ekstrak bekatul tanpa penambahan kultur *Rhizopus oryzae* dan dengan penambahan kultur *Rhizopus oryzae*

Suhu	pH	Rata-rata rendemen ekstrak bekatul	
		Tanpa kultur (%)	Penambahan kultur (%)
30 °C	4	7,26	8,86
	5	7,36	8,78
	6	7,2	8,11
37 °C	4	8,22	9,54
	5	9,09	12,91
	6	7,67	9,11
44 °C	4	7,27	8,14
	5	7,20	8,09
	6	7,46	8,61

Berdasarkan Tabel 4.1 didapatkan bahwa hasil nilai rendemen dari sampel terfermentasi lebih besar dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Rendemen terbesar terdapat pada variasi pH 5 suhu 37 °C yaitu meningkat dari 9,09% menjadi 12,91%. Hal ini dikarenakan pada proses fermentasi banyak serat-serat yang terputus pada bekatul sehingga senyawa fenolik yang terikat di dalam bekatul banyak yang terekstrak. Hasil tersebut juga menunjukkan bahwa dengan adanya proses fermentasi dengan jamur *Rhizopus oryzae*, akan meningkatkan hasil ekstraksi yang diduga senyawa fenolik. Senyawa tersebut termasuk senyawa antibakteri yang banyak terdapat pada tumbuhan seperti bekatul. Pada penelitian Aruben (2016), juga menjelaskan bahwa konsentrasi senyawa fenolik dedak terfermentasi meningkat dari 73,31% menjadi 91,29% menggunakan jamur *Rhizopus oligosporus*.

Ada dua macam perlakuan kontrol yaitu dilakukan tanpa penambahan inokulum ke dalam bekatul dan dilakukan dengan hanya penambahan etanol saja. Kontrol digunakan untuk pembandingan antara bekatul tanpa fermentasi dengan

bekatul terfermentasi. Sehingga dapat diketahui adanya pengaruh dimana fermentasi menggunakan jamur *Rhizopus oryzae* dapat meningkatkan aktivitas antibakteri. Kedua kontrol memberikan peningkatan terhadap ekstrak bekatul terfermentasi. Data rata-rata peningkatan yang menggunakan kontrol tanpa penambahan inokulum dapat dilihat pada Tabel 4.1 sedangkan yang menggunakan kontrol dengan penambahan etanol saja randemen meningkat dari 7,21% menjadi 8,75%.

4.6.2 Aktivitas Antibakteri Bekatul Terfermentasi dengan Metode Difusi

Agar

Allah SWT menganjurkan manusia yang telah diberi kelebihan akal untuk mengkaji segala sesuatu yang berada di langit maupun di bumi. Sebagaimana firman Allah SWT dalam Q.S Al-imran ayat 190-191:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمُوتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

Artinya: “*Sesungguhnya, dalam penciptaan langit dan bumi, dan pergantian malam dan siang, terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berakal. (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka."* (QS. Al-Imran: 190-191).

Menurut tafsir Al-Maraghi (1986), Pada ayat 191 mendefinisikan orang-orang yang berakal (Ulul Albab), yaitu orang-orang yang mau menggunakan pikirannya, mengambil faedah, hidayah, dan menggambarkan keagungan Allah SWT. Ia

selalu mengingat Allah (berdzikir) di setiap waktu dan keadaan, baik di waktu ia berdiri, duduk atau berbaring. Jadi dijelaskan dalam ayat ini bahwa ulul albab yaitu orang-orang yang terus menerus mengingat Allah dengan ucapan atau hati dalam situasi dan kondisi apapun. Sebagai manusia yang berakal, merupakan bentuk petunjuk bagi manusia untuk lebih mengkaji dan meneliti segala ciptaan-Nya. Salah satunya dengan melakukan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antibakteri yang terbaik.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar, yaitu dengan menempelkan kertas cakram pada media agar yang telah ditumbuhi bakteri uji. Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona hambat disekitar kertas cakram. Ekstrak yang digunakan pada pengujian aktivitas antibakteri dilarutkan menggunakan DMSO 100%. DMSO berfungsi sebagai pelarut ekstrak sekaligus sebagai kontrol negatif. Selain itu, DMSO juga bersifat emulsifier, sehingga mampu melarutkan ekstrak yang bersifat polar maupun nonpolar. Penggunaan kontrol negatif bertujuan untuk memastikan bahwa diameter zona hambat ekstrak bekatul terfermentasi yang dihasilkan bukan pengaruh dari pelarut, tetapi murni dari senyawa aktif dalam ekstrak tersebut. Kontrol positif yang digunakan adalah kloramfenikol. Pemilihan kloramfenikol karena kloramfenikol merupakan antibakteri pertama yang berspektrum luas, dengan mekanisme kerja menghambat sintesis protein dan bersifat bakteriostatik. Inokulum bakteri yang digunakan pada pengujian aktivitas antibakteri ini memiliki kepadatan jumlah sel setara dengan 10^8 cfu/mL.

Nilai aktivitas antibakteri ekstrak bekatul yang telah didapatkan diuji statistik dengan analisis varians (Anova) *Two way* menggunakan SPSS 16. Uji

statistik ini dilakukan untuk mengetahui signifikansi pengaruh variasi pH dan suhu serta pengaruh dari interaksi kedua variasi yang digunakan terhadap aktivitas antibakteri bekatul terfermentasi. Uji statistik ini menggunakan tingkat kepercayaan hasil uji 95%. Berdasarkan hasil analisis statistik yang telah dilakukan pada bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yaitu:

a. Data SPSS pada bakteri *Escherichia coli*

Diperoleh nilai signifikansi dari kedua variasi yang digunakan yaitu pH dan suhu yang dapat dilihat pada Tabel 4.2

Tabel 4.2 Data SPSS interaksi antara pH dan suhu

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	173.776 ^a	8	21.722	6.010	.001
Intercept	1828.624	1	1828.624	505.921	.000
pH	56.836	2	28.418	7.862	.004
Suhu	72.516	2	36.258	10.031	.001
pH * suhu	44.424	4	11.106	3.073	.043
Error	65.060	18	3.614		
Total	2067.460	27			
Corrected Total	238.836	26			

a. R Squared = .728 (Adjusted R Squared = .607)

Berdasarkan uji statistik hasil fermentasi dengan perlakuan pH dan suhu menunjukkan bahwa terdapat pengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap aktivitas antibakteri bekatul terfermentasi pada variasi pH, suhu dan interaksi antara kedua variasi tersebut. Spesifikasi variasi pH yang berpengaruh nyata terhadap aktivitas antibakteri bekatul terfermentasi disajikan dalam tabel lampiran 6 hal 90.

Pada bakteri *Escherichia coli* variasi pH dan suhu memberikan perbedaan yang signifikan maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan *Tukey* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antara individu perlakuan yang satu dengan individu perlakuan lainnya. Hasil analisis uji lanjut disajikan pada Tabel 4.3

Tabel 4.3 Hasil Uji Lanjut *Tukey* Ph

Ph	Subset 1	Subset 2	Notasi
4	7.7778		a
5		10.1889	b
6	6.7222		a

Keterangan: Angka-angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata.

Tabel 4.3 menunjukkan bahwa pada perlakuan pH 4 dan 6 berbeda nyata dengan pH 5. Hal ini dikarenakan pada pH 5 kerja dari jamur dalam membuka ikatan antara serat dengan senyawa fenolik berjalan dengan baik. Peristiwa ini menyebabkan senyawa fenolik banyak terdapat di bekatul dan sedikit yang larut dalam filtrat, semakin banyak kadar fenolik yang terdapat pada bekatul maka semakin tinggi pula aktivitas antibakterinya. Sementara pada pH 4 dan 6 menunjukkan adanya efek yang berbeda terhadap peningkatan aktivitas antibakteri bekatul terfermentasi, hal ini dikarenakan pada pH 4 dan 6 kemampuan jamur dalam mendegradasi serat sudah berkurang dan pembukaan serat berjalan tidak maksimal sehingga sedikit senyawa fenolik yang terlepas dan terekstrak. Selain itu, variasi suhu juga menunjukkan nilai signifikansi dalam aktivitas antibakteri. Spesifikasi variasi suhu yang berpengaruh nyata terhadap aktivitas antibakteri bekatul terfermentasi disajikan dalam tabel lampiran 6 hal 91.

Tabel 4.4 Hasil Uji Lanjut *Tukey* Suhu

Suhu	Subset 1	Subset 2	Notasi
30 °C	8.3222	8.3222	ab
37 °C		10.1889	b
44 °C	6.1778		a

Keterangan: Angka-angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata.

Tabel 4.4 menunjukkan bahwa pada perlakuan suhu 30 °C tidak berbeda nyata dengan suhu 37 dan 44 °C. Namun perlakuan pada suhu 37 °C berbeda nyata dengan perlakuan pada suhu 44 °C terhadap peningkatan aktivitas antibakteri bekatul terfermentasi. Hal ini dikarenakan suhu yang digunakan tinggi yaitu 44 °C sehingga kemampuan jamur dalam mendegradasi serat sudah berkurang dan pembukaan serat berjalan tidak maksimal sehingga sedikit senyawa fenolik yang terlepas dan terekstrak. Sementara itu, pada suhu 37 °C hasilnya menunjukkan efek yang berbeda, hal ini dikarenakan pada suhu tersebut kerja dari jamur dalam membuka ikatan antara serat dengan senyawa fenolik berjalan dengan baik. Hal ini menyebabkan senyawa fenolik banyak terdapat di bekatul dan sedikit yang larut dalam filtrat, semakin banyak kadar fenolik yang terdapat pada bekatul maka semakin tinggi pula aktivitas antibakterinya.

b. Data spss pada bakteri *Staphylococcus aureus*

Hasil uji statistik bakteri *Staphylococcus aureus* pada interaksi antara pH dan suhu tidak menunjukkan pengaruh nyata terhadap aktivitas antibakteri bekatul terfermentasi. Variasi suhu memberikan perbedaan signifikan, namun variasi pH tidak memberikan perbedaan yang signifikan. Hasil signifikansi dapat dilihat pada tabel 4.5

Tabel 4.5 Data spss interaksi antara pH dan suhu

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	82.187 ^a	8	10.273	2.168	.082
Intercept	1594.676	1	1594.676	336.482	.000
pH	17.401	2	8.700	1.836	.188
Suhu	34.465	2	17.233	3.636	.047
pH * suhu	30.321	4	7.580	1.599	.218
Error	85.307	18	4.739		
Total	1762.170	27			
Corrected Total	167.494	26			

a. R Squared = .491 (Adjusted R Squared = .264)

Berdasarkan Tabel 4.5 hanya suhu yang menunjukkan pengaruh nyata yaitu dengan nilai signifikan 0,047 ($P < 0,05$). Hal ini mungkin dikarenakan rentang dari pH yang digunakan terlalu pendek sehingga aktivitas yang diberikan oleh jamur *Rhizopus oryzae* antar perlakuan tidak memberikan perbedaan yang signifikan. Spesifikasi variasi suhu yang berpengaruh nyata terhadap aktivitas antibakteri bekatul terfermentasi disajikan dalam tabel lampiran 6 hal 97. Ketika nilai menunjukkan pengaruh nyata maka dilakukan uji lanjut *Tukey* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antara individu perlakuan yang satu dengan individu perlakuan lainnya. Hasil analisis uji lanjut disajikan pada Tabel 4.6

Tabel 4.6 Hasil Uji Lanjut *Tukey* Suhu

Suhu	Subset 1	Subset 2	Notasi
30 °C	7.8333	7.8333	ab
37 °C		8.9889	b
44 °C	6.2333		a

Keterangan: Angka-angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata.

Tabel 4.6 menunjukkan bahwa pada perlakuan suhu 30 °C tidak berbeda nyata dengan suhu 37 dan 44 °C. Namun perlakuan pada suhu 37 °C berbeda nyata dengan perlakuan pada suhu 44 °C terhadap peningkatan aktivitas antibakteri bekatul terfermentasi, hal ini dikarenakan suhu yang digunakan tinggi yaitu 44 °C sehingga kemampuan jamur dalam mendegradasi serat sudah berkurang dan pembukaan serat berjalan tidak maksimal sehingga sedikit senyawa fenolik yang terlepas dan terekstrak. Sementara itu, pada penggunaan suhu 37 °C hasilnya menunjukkan efek yang berbeda, hal ini dikarenakan pada suhu tersebut kerja dari jamur dalam membuka ikatan antara serat dengan senyawa fenolik berjalan dengan baik. Hal ini menyebabkan senyawa fenolik banyak terdapat di bekatul dan sedikit yang larut dalam filtrat, semakin banyak kadar fenolik yang terdapat pada bekatul maka semakin tinggi pula aktivitas antibakterinya.

Selain uji statistik (Anova) *Two way*, juga dilakukan uji standart deviasi. Uji statistik ini dilakukan untuk mengetahui nilai perbedaan antar ulangan. Semakin besar nilai standart deviasi maka semakin besar pula perbedaan antar ulangan, dan sebaliknya. Berikut standart deviasi zona hambat yang dihasilkan oleh bekatul terfermentasi berada pada Tabel 4.7

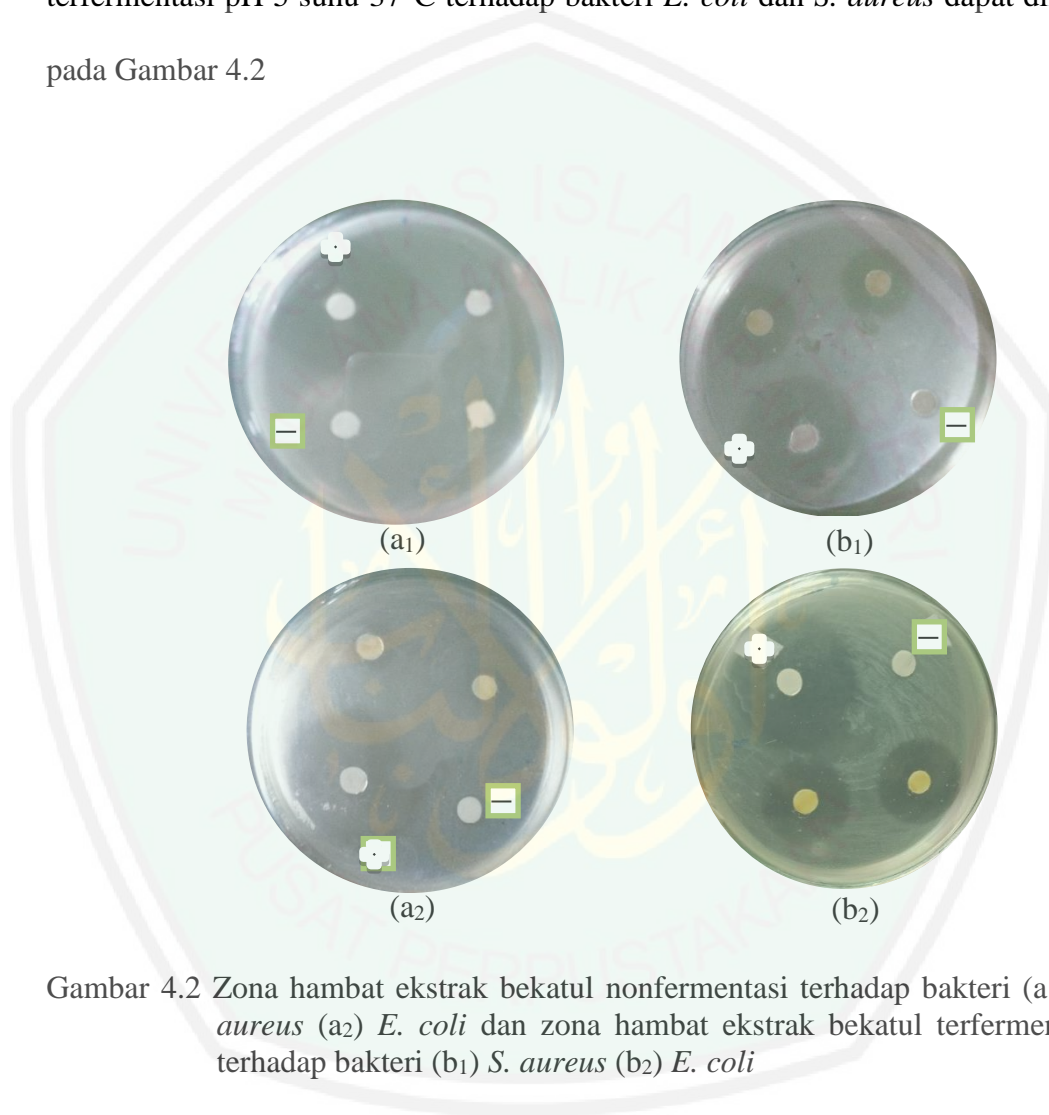
Tabel 4.7 Zona hambat ekstrak bekatul terfermentasi dengan variasi pH dan suhu terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Variasi sampel	Diameter zona hambat (mm)				Peningkatan ekstraksi bekatul terfermentasi (mm)		
	Tanpa kultur	Penambahan kultur					
Suhu	pH	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
30°C	4	4,3	3,1	8,5±2,48	8,3±3,37	4,0	5,2
	5	4,6	3,7	9,2±1,46	7,6±1,82	4,6	2,9
	6	4,1	2,6	7,3±1,25	7,6±1,56	3,2	5,0
37°C	4	4,5	3,9	9,0±3,76	9,4±4,53	4,5	5,5
	5	5,4	4,1	13,9±2,57	11,6±1,90	8,5	7,5
	6	3,1	3,8	6,9±1,23	6,0±0,31	3,8	2,2
44°C	4	3,7	4,1	5,8±0,35	6,2±0,42	2,1	2,1
	5	4,5	3,9	6,8±0,31	6,3±0,56	2,3	2,4
	6	4,1	3,6	5,9±0,32	6,2±0,90	1,8	2,6
Kontrol positif (Kloramfenikol)		32,1	30,5	32,1	30,5	-	-
Kontrol negatif (DMSO)		-	-	-	-	-	-

Berdasarkan Tabel 4.7 peningkatan aktivitas antibakteri tertinggi berada pada perlakuan pH 5 dan suhu 37 °C. Dimana aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* meningkat sebesar 8,5 mm dan terhadap *Staphylococcus aureus* meningkat sebesar 7,5 mm. Menurut Kuswanto dan Slamet (1989) suhu optimal jamur *Rhizopus oryzae* yaitu 35 °C dan jamur ini dapat tumbuh baik pada pH 4, 5, dan 6 (Sorenson, 1986). Nilai aktivitas antibakteri pada penelitian ini terendah berada pada perlakuan pH 6 dan suhu 44 °C yaitu terhadap *Escherichia coli* hanya meningkat 1,8 mm dan terhadap *Staphylococcus aureus* 2.1 pada pH 4 suhu 44 °C.

Menurut Susanto, dkk., (2012) jika diameter zona hambat kurang dari 5 mm, maka aktivitas antibakteri dikategorikan lemah. Diameter zona hambat

sebesar 6-10 mm dikategorikan sedang, zona hambat sebesar 11-20 mm dikategorikan kuat dan jika zona hambat bakteri lebih dari 21 mm, maka aktivitas antibakteri dikategorikan lebih kuat. Zona hambat yang dihasilkan ekstrak bekatul terfermentasi pH 5 suhu 37°C terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dapat dilihat pada Gambar 4.2



Gambar 4.2 Zona hambat ekstrak bekatul nonfermentasi terhadap bakteri (a₁) *S. aureus* (a₂) *E. coli* dan zona hambat ekstrak bekatul terfermentasi terhadap bakteri (b₁) *S. aureus* (b₂) *E. coli*

Gambar 4.2 menunjukkan bahwa aktivitas zona hambat terbaik berada pada pH 5 suhu 37 °C terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Masing-masing zona hambatnya sebesar 18,5 mm terhadap *E. coli* dan 16,7 mm terhadap *S. aureus*. Dimana zona hambat tersebut dikategorikan kuat. Bekatul dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji karena bekatul mempunyai daya antibakteri yang berasal

dari senyawa flavonoid dan fenol (Amalia, 2017). Besarnya zona hambat yang dihasilkan oleh ekstrak etanol pada kertas cakram, menunjukkan bahwa senyawa aktif antibakteri yang terkandung dalam bekatul terfermentasi bersifat polar.

Menurut Kuswanto dan Slamet (1989), jamur *Rhizopus oryzae* mempunyai suhu optimal 35°C dan tumbuh baik pada kisaran pH 4, 5, dan 6 (Sorenson, 1986). Setelah dilakukan fermentasi terjadi peningkatan aktivitas antibakteri, yaitu pada perlakuan P₂T₂ (suhu 37 °C dan pH 5). Hal ini menunjukkan bahwa proses fermentasi dapat membantu terbukanya ikatan serat-serat yang terkandung di dalam bekatul dengan senyawa fenolik. Sehingga, nilai dari persentase aktivitas antibakterinya dapat meningkat. Fermentasi yang melibatkan bantuan dari jamur *Rhizopus oryzae* ini dapat melepas serat-serat yang lebih banyak pada bekatul karena jamur ditambahkan sebagai pendegradasi serat-serat kasar pada bekatul yang dapat menyebabkan peningkatan pada aktivitas antibakteri (Al-Arif dan Mirni, 2013). Sedangkan aktivitas antibakteri yang paling rendah yakni pada perlakuan P₃T₃ (pH 6 dan suhu 44 °C) yang mengalami peningkatan namun aktivitas antibakterinya rendah sebesar 5,8 mm terhadap *E. coli* dan 5,3 mm terhadap *S. aureus*. Hal ini dikarenakan pada suhu 44 °C, dimungkinkan bahwa jamur *Rhizopus oryzae* sudah tidak bekerja lagi karena suhunya yang terlalu tinggi, sehingga tidak dapat mempengaruhi proses fermentasi. Dapat dimungkinkan jika jamur *Rhizopus oryzae* yang digunakan pada proses fermentasi berada di batas optimumnya, sehingga menyebabkan pembukaan serat tidak berjalan maksimal, sehingga tidak banyak senyawa fenolik yang terlepas dan terekstrak.

Penelitian yang dilakukan Pendit, dkk., (2016) menguji aktivitas antibakteri ekstrak etanol blimbing wuluh dengan menggunakan perbandingan 1:5 (b/v) menunjukkan bahwa ekstrak etanol blimbing wuluh memberikan aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* sebesar 8.63 mm yang dikategorikan sedang dan *S. aureus* sebesar 13.13 mm yang dikategorikan kuat dalam menghambat bakteri. Sedangkan menurut Febriani (2014) yang menguji aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun kelapa, menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kelapa memberikan aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* sebesar 6.8 mm yang dikategorikan sedang.



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang nyata terhadap aktifitas antibakteri dari kombinasi variasi pH dan suhu. Interaksi variasi pH dan suhu meningkat pada pH 5 suhu 37 °C yaitu sebesar 13,9 mm terhadap bakteri *Escherichia coli* dan 11,6 mm terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Dimana aktivitas antibakteri tersebut dikategorikan sebagai zona hambat yang kuat. Setelah dianalisis menggunakan uji statistik *Two way* (ANOVA) diketahui bahwa pada uji bakteri *Escherichia coli* hasil tersebut berpengaruh nyata terhadap interaksi antara kedua variasi yang digunakan. Namun, berdasarkan uji bakteri *Staphylococcus aureus*, hanya variasi suhu yang memberikan pengaruh terhadap peningkatan aktivitas antibakteri bekatul terfermentasi.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian sejenis dengan menggunakan bakteri patogen yang lain, sehingga dapat mempertegas bahwa bekatul mempunyai kemampuan aktivitas antibakteri.
2. Untuk mengetahui spesifik senyawa aktif yang ada pada bekatul terfermentasi dilakukan uji dengan metode KLT.

DAFTAR PUSTAKA

- Adji, D., Zuliyanti, dan Henry, L. 2007. Perbandingan efektivitas sterilisasi alkohol 70%, inframerah, otoklaf, dan ozon terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis*. *Journal Sains Veterinary*, 25(1): 123–127.
- Al-Arif, M. A., dan Mirni, L. 2014. Kualitas pakan ruminansia yang difermentasi bakteri selulolitik *Actinobacillus sp.* *Journal Acta Veterinaria Indonesiana*, 2(1): 12–16.
- Al-Maraghi, Ahmad Musthafa. 1986. Terjemah Tafsir Al-Maraghi 4. Semarang: Cv Toha Putra.
- Al-Maraghi, Ahmad Musthafa. 1992. Terjemah Tafsir Al-Maraghi 7. Semarang: Cv Toha Putra.
- Aruben. 2016. Peningkatan Konsentrasi Senyawa Fenolik Antioksidan dari Dedak dengan Cara Fermentasi. *Jurnal Teknik Kimia Fakultas Teknik: Universitas Diponegoro*
- Bayer, E. A., E. Morag, R. Lamed. 1994. The Cellulosome-A treasure-Trove for Biotechnology. *TIBTECH* 12, 379-386.
- Chahal, D.S. 1985. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulose production. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 205–210.
- Dashtban, M., Scharft, H., dan Qin, W. 2009. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residue: Opportunities and Perspectives. *Int J BiolSci*, 17:578595.
- Dewi, Chandra, T. Purwoko, A. Pangastuti. 2005. Production of reducing sugar from rice brans substrate by using *Rhizopus oryzae*. *Jurnal bioteknologi*, 2 (1): 21-26.
- Dwidjoseputro, S. 1994. Mikrobiologi Pangan. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Ganiswara. 1995. *Farmakologi dan Terapi* Edisi IV. Jakarta : UI.
- Harbone, J. B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: ITB Press.
- Harbone, J. B. 2004. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: ITB Press.
- Harmita, Radji, S. 2008. *Buku Ajar Analisis Hayati*. Jakarta: EGC.
- Hawab. 2004. *Pengantar Biokimia*. Malang: Bayumedia.

- Holtzaple, M.T. 1993. Cellulose in: Encyclopedia of Food Science. *Food Technology and Nutrition*, 2:2731-2738. London: Academic Press.
- Hugo, W. B., dan Rusel, A. D. 1987. *Pharmaceutical Microbiology 4th Ed.* London: BSP.
- Iskandar, Y. 2003. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Rumpun Laut (*Eucheuma cottoni*) terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus cereus*. *Skripsi*. Sumedang: Jurusan Farmasi Fakultas MIPA Universitas Padjajaran.
- Jawetz, E., Melnick, J. L, Adelberg, E. A.1996. *Microbiologi kedokteran* Edisi 1. Jakarta: Kedokteran EGC.
- Kader, A., Parvin, S., Chowduri, A., Haque, E. 2012. *Antibacterial, Antifungal and Insecticidal Activities of Reullia tuberosa (L.) Root Extract*, (Coolin 1998), 91-97. ISSN: 1023-8654.
- Komara, D. S., Rachman, S. D., Gaffar, S. 2007. Degradasi Enzimatis Selulosa dari Batang Pohon Pisang untuk Produksi Glukosa dengan Bantuan Aktivitas Selulolitik *Trichoderma viride*. *Litsar University of Padjajaran*, 16(2): 198-203.
- Komari. 1999. Proses Fermentasi Biji Lamtoro-Gung dengan *Rhizopus oryzae*. *Jurnal Mikrobiologi indonesia*, hlm. 19-21.
- Kulp, K. 1975. *Carbohydrases*, dalam *Enzyme in Food Processing*, G. Reed (ed). New York: Academic Press.
- Lathifah, Q. A. 2008. Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Senyawa Antibakteri pada Buah Blimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi L.*) dengan Variasi Pelarut. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Lay, Bibiana W. Hastowo, Sugyo. 1992 *Mikrobiologi*. Jakarta: Rajawali Press.
- Lehninger, A.L. 1997. *Biochemistry*. New York: Work Publisher Inc.
- Mc Kane, L., J. Kandel. 1996. *Microbiology: Essentials and Applications*. New York: Mc Graw-Hill.
- Melgar, G. Z., Assis, F. V. Souza de., Rocha, L. C da., Fanti, S. C., Sette, L. D., dan Porto, A. L. M. 2013. Growth Curves of Filamentous Fungi for Utilization in Biocatalytic Reduction of Cyclohexanones. *Global Journal of Science Frontier Research Chemistry*, 13(5):2249-4626.
- Mukhlis. 2008. *Mikrobiologi Dasar*. Retrieved May, 2017 from <http://www.Media.Pertumbuhan.html>.

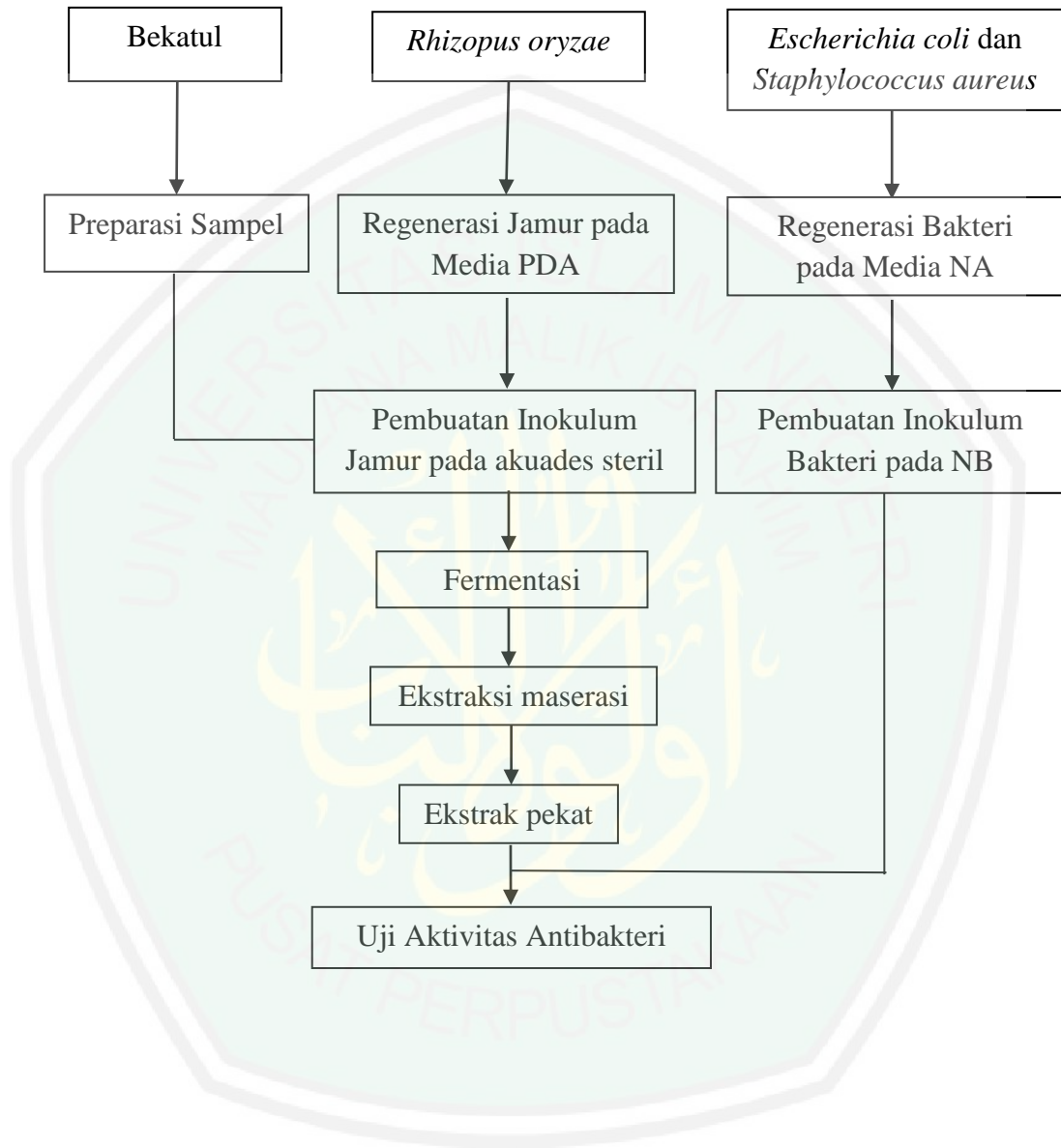
- Mulyadi, M., Wuryanti, Purbowatiningrum, R. S. (2013). Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Kadar Sampel Alang-Alang (*Imperata cylindrical*) dalam Etanol Melalui Metode Difusi Cakram. *Chem Info*, 1(1): hal. 35-42.
- Ningsih, Diian Riana, Zufahair, D. Kartika. 2016. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Serta Uji Aktivitas Ekstrak Sirsak Sebagai Antibakteri. *Molekul*, 11(1), 101-111.
- Nursalim dan Zalni, 2005. *Bekatul Makanan yang Menyehatkan*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Oleszek, W. A. 2002. Chromatographic Determination of Plant Saponins. *Journal of Chromatography*, 1(967), 147-162.
- Oliveira, M. S., Eliane, P. C., Eliana, B. F., Leonor, S. S. 2012. Phenolic Compound and Antioxidant Activity in Fermented Rice (*oryza sativa*) bran. *Cience Tecnol Aliment*, 32(3): 531-537.
- Palmer, T. 1985. *Understanding Enzyme* 3rd. New York: Ellishorwood Publisher.
- Paul, Nivya Mariam, R. J. Moolan. 2014. Evaluation of Antibacterial, Antioxidant, Anti inflammatory Activity and Trace Element Analysis of Njavara (*Oryza sativa* Linn). *Word journal of pharmacy and pharmaceutical science*, 3 (4), 1092-1104.
- Pelczar, M.J., dan Chan, E.C.S. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi Jilid 1*. Diterjemahkan oleh Hadioetomo, R. S. dan Tjitrosomo, S. L. Jakarta: UI Press.
- Pendit., Zubaidah., Shriherfyan. 2016. Karakteristik Fisika Kimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Blimbing Wuluh. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, Vol. 4 No. 1.
- Poedjiadi, Anna. 2012. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Prakoso, Adi. 2014. Pertumbuhan Mikroorganisme. Retrieved May 25, 2017 from <http://prakoso93.wordpress.com/2014/02/11/pertumbuhan-mikroorganisme-bagaimana-fase-faseny/>.
- Pratiwi, S. T. 2008. *Bertanam Jagung Unggul*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Rahayu, P., Winiati. 2000. Aktivitas Antimikroba Bumbu Masakan Tradisional Hasil Olahan Industri Terhadap Bakteri Patogen dan Perusak. *Buletin Teknologi dan Industri Pangan*. Vol. 11(2).
- Rahmawati, A. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirsak Naga (*Drymoglossum piloselloid* L.) dan Binahong (*Anredera cordifolia*)

- terhadap Bakteri *Staphylococcus mutans*. *Skripsi*. Malang: Jurusan Biologi UIN Malang.
- Razak, D. L. Abd., Jamaludin, A., Yuhasliza, N., Rashid, Abd., Sharifudin, A. A., dan Long, K. 2015. Comparative Study of Antioxidant Activities, Cosmeceutical Properties and Phenolic Acid Composition of Fermented Rice Bran and Coconut Taste. *Jurnal Teknologi*, 78: 11-12, 29-34.
- Robert, W. B. 2009. *Microbiology with Disease by Body System Second Edition*. San Fransisco: person Benjamin Cummings.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: ITB Press.
- Rohman, A., dan Gandjar, I.G. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Salle, A. J. 1961. *Fundamental Principles of Bacteriology*. 5th Edition. New York: Mc. Graw Hill Company Inc.
- Senthilkumar, P., Sambath, R., S. Vasantharaj. 2013. Antimicrobial Potential and Screening of Antimicrobial Compounds of *Ruellia tuberosa* L. Using GC-MS. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. ISSN 0976-044.
- Shihab, M. Quraish. 2001. *Tafsir Al-Mishbah: Edisi 4*. Jakarta: Lentera Hati.
- Shihab, M. Quraish. 2002. *Tafsir Al-Mishbah: Edisi 10*. Jakarta: Lentera Hati.
- Soetan, K. O. 2006. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Saponins Extract of *Sorghum Bicolor* L. Moench. *African Journal of Biotechnology*: 1684-5315.
- Supardi, I. dan Sukamto. 1999. *Mikrobiologi dalam Pengolahan dan Keamanan Pangan*. Bandung: Alumni.
- Suprihatin. 2010. *Teknim Fermentasi*. Surabaya: UNESA Press.
- Susanto, D. Sudrajat dan R. Ruga. 2012. Studi Kandungan Bahan Aktif Tumbuhan Meranti Merah (*Shorea leprosula* Miq) sebagai Sumber Senyawa Antibakteri. *Mulawarman Scientifie*. 11(2): 181-190.
- Tjokrokoesoemo, P.S. 1986. *HFS dan Industri Ubi Kayu Lainnya*. Jakarta: PT. Gramedia.
- Tortora, G. J. Funke, K. Case. 2001. *Microbiology An Introduction, 5th edition*. The Benjamin Cummings Publish Company, Inc.
- Voight, R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Diterjemahkan oleh Soedani Noerono Soewandi. Yogyakarta: UGM Press.

- Volk, W. A. dan Wheeler, M. F. 1993. *Mikrobiologi Dasar Jilid 1*. Alih Bahasa Markam. Jakarta: Erlangga.
- Wasito, H. R. 2005. *Peternakan Harus Menjadi Unggulan*. Jakarta : PT. Permata Wacana Lestari.
- Widowati, S. 2001. Pemanfaatan Hasil Samping Penggilingan Padi dalam Menunjang Sistem Agroindustri di Pedesaan. *Jurnal Sains*, 12(1): 128-134.
- Wirahadikusumah dan Rahwono. 1990. *Biokimia Metabolisme Energi, Karbohidrat dan Lipid*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Yudhie. 2009. *Staphylococcus aureus*. Retrieved May 27, 2017 from <http://yudhiestar.blogspot.co.id/2009/09/staphylococcus-aureus.html>.
- Zubaidah, E., Ella, S., dan Josep, H. 2012. Studi Aktivitas Antioksidan pada Bekatul dan Susu Skim Terfermentasi Probiotik (*Lactobacillus plantarum B2* dan *Lactobacillus acidophilus*). *Jurnal Teknologi Pertanian*, 113(2):111-118.

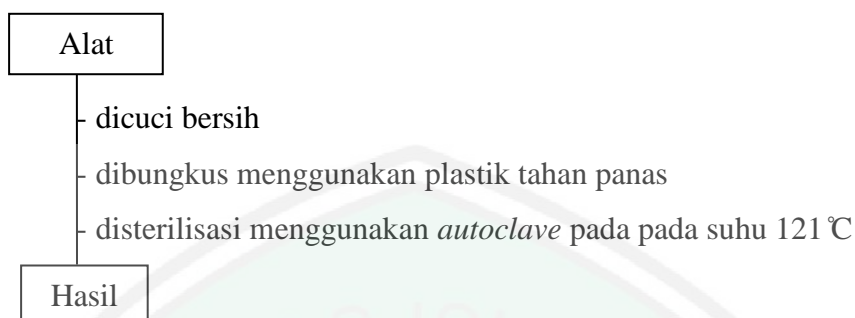
LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian

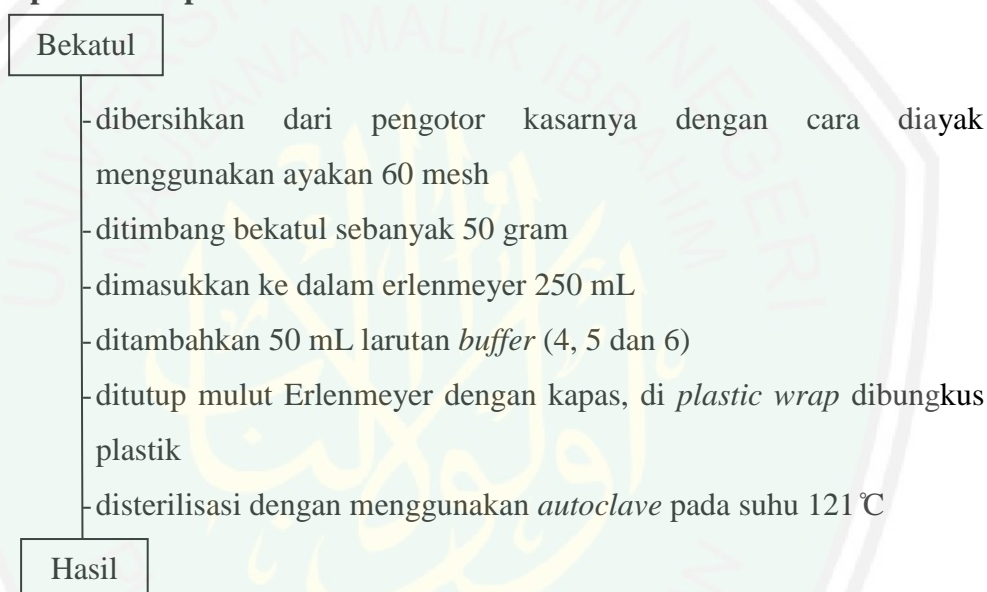


Lampiran 2. Diagram Alir

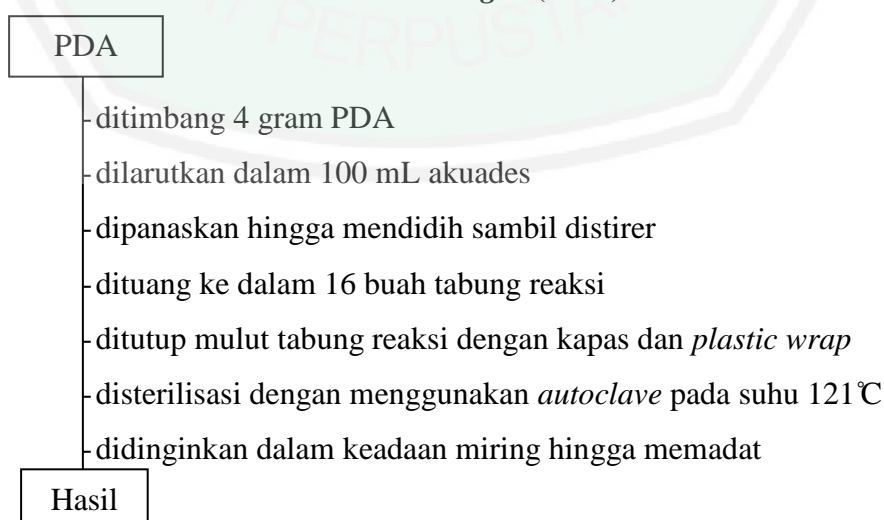
1. Sterilisasi Alat



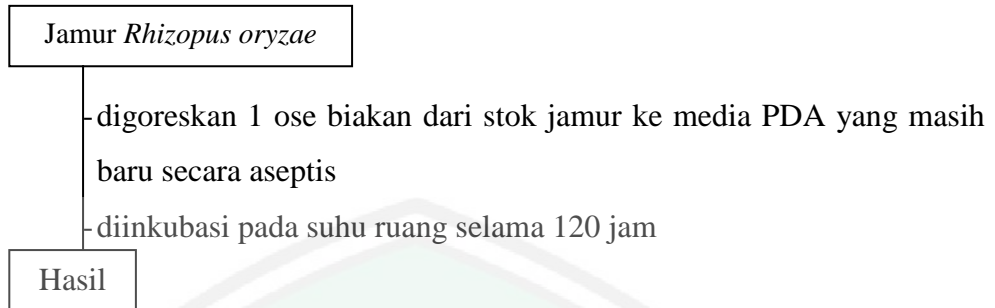
2. Preparasi Sampel



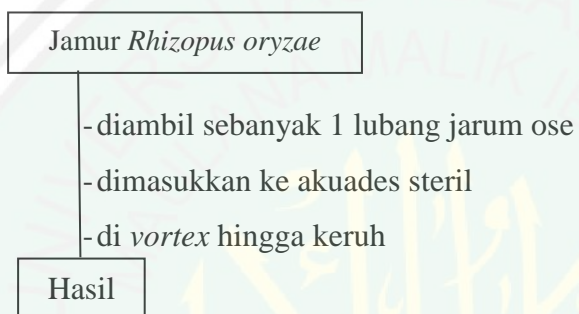
3. Pembuatan Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)



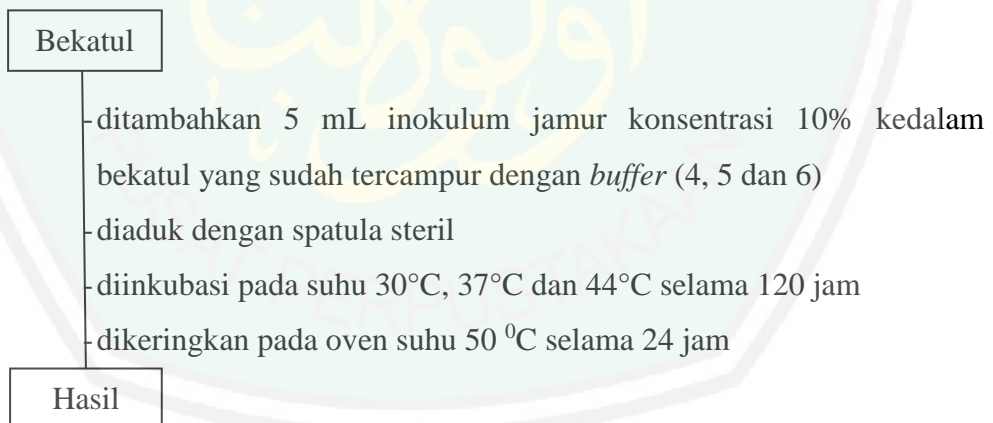
4. Regenerasi Jamur *Rhizopus oryzae*



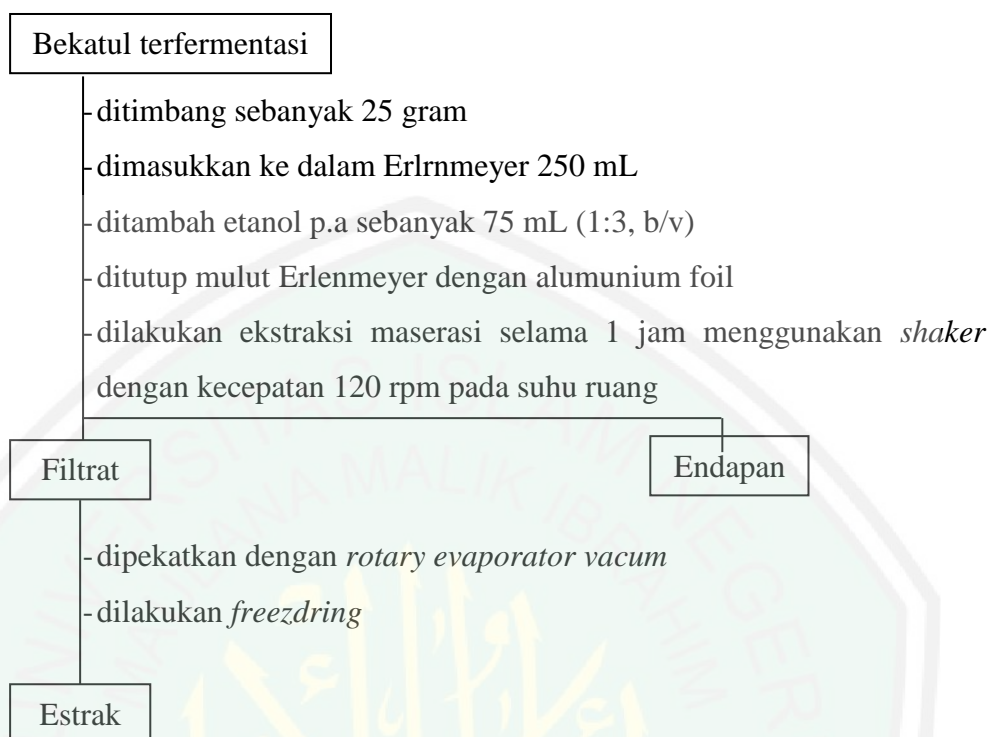
5. Pembuatan Inokulum Jamur *Rhizopus oryzae*



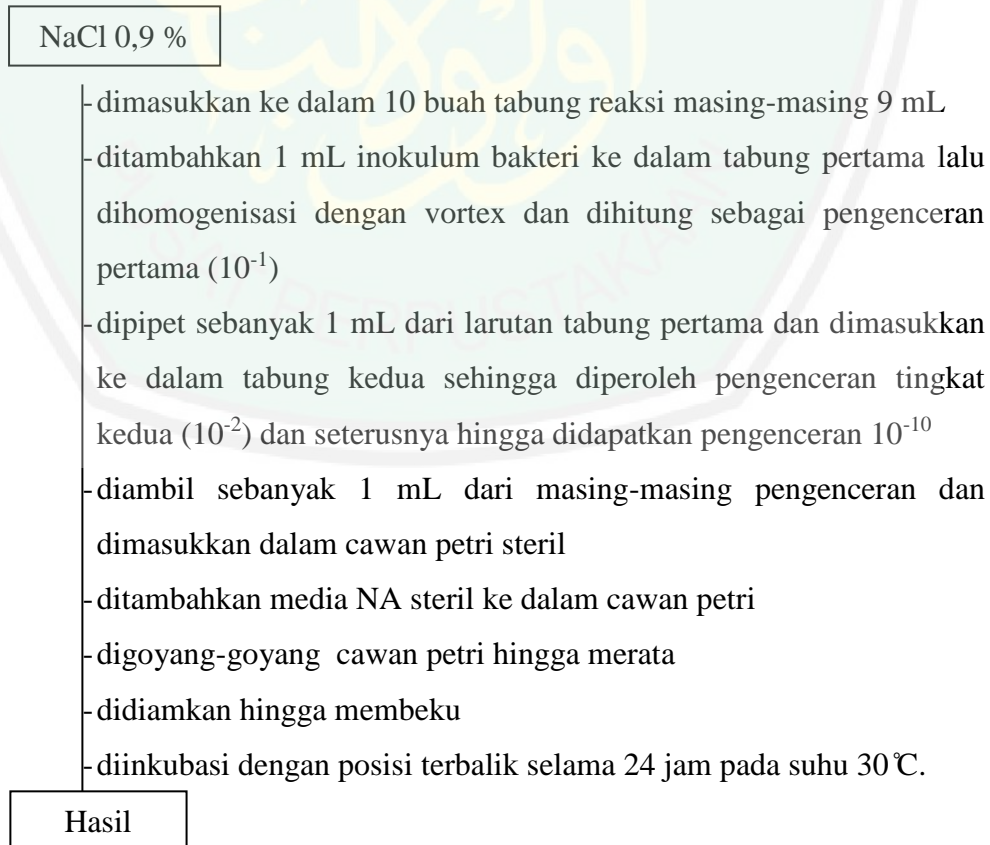
6. Fermentasi Bekatul dengan Variasi pH dan Suhu



7. Ekstraksi Bekatul Terfermentasi Menggunakan Pelarut Etanol

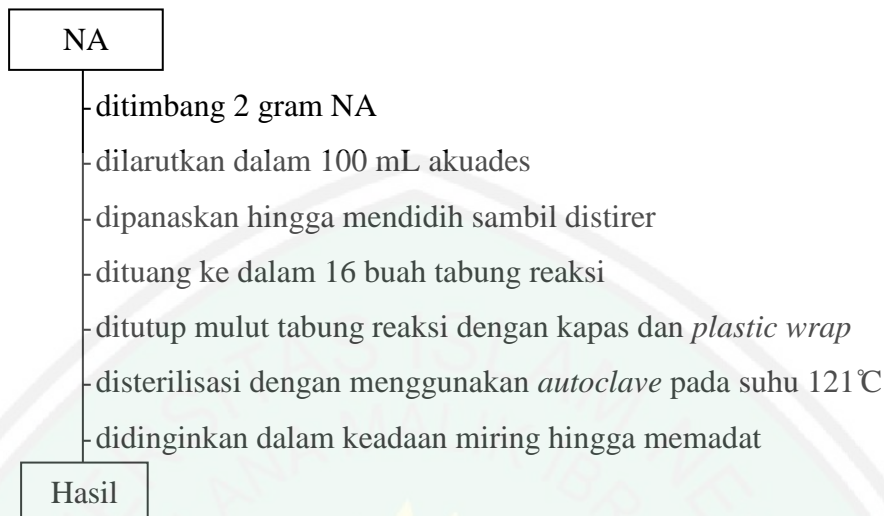


8. Penghitungan Jumlah Bakteri

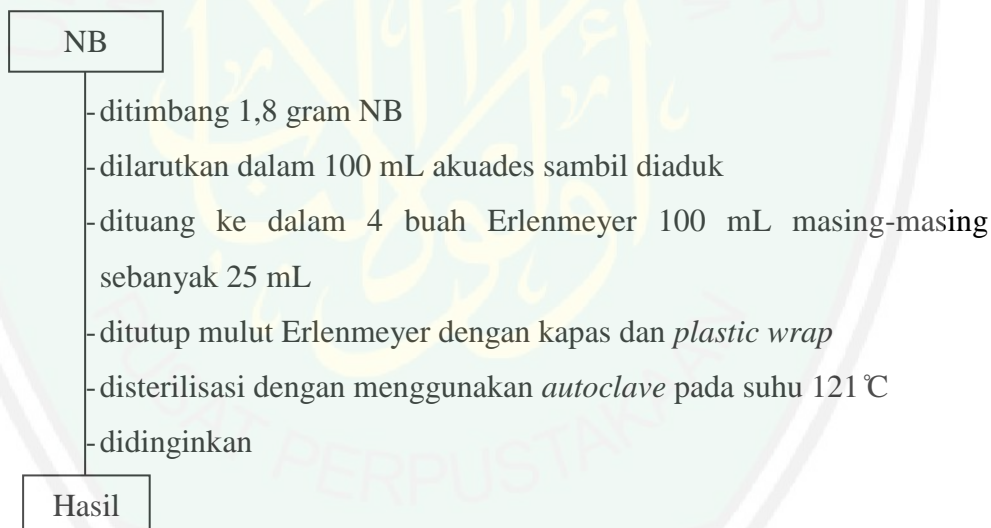


9. Uji Aktivitas Antibakteri dengan cara difusi agar

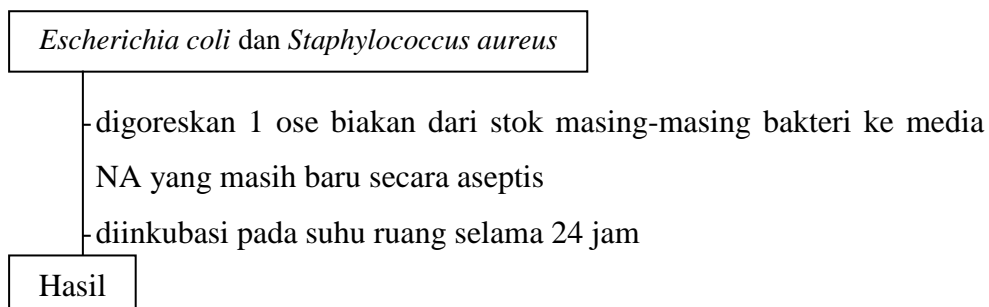
9.1 Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)



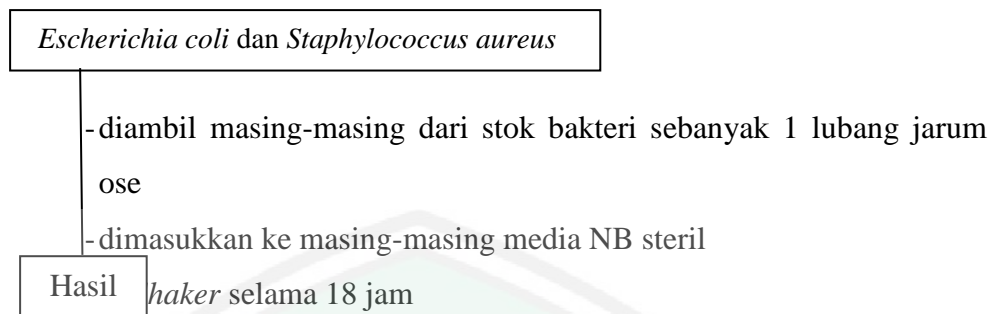
9.2 Pembuatan Media *Nutrient Broth* (NB)



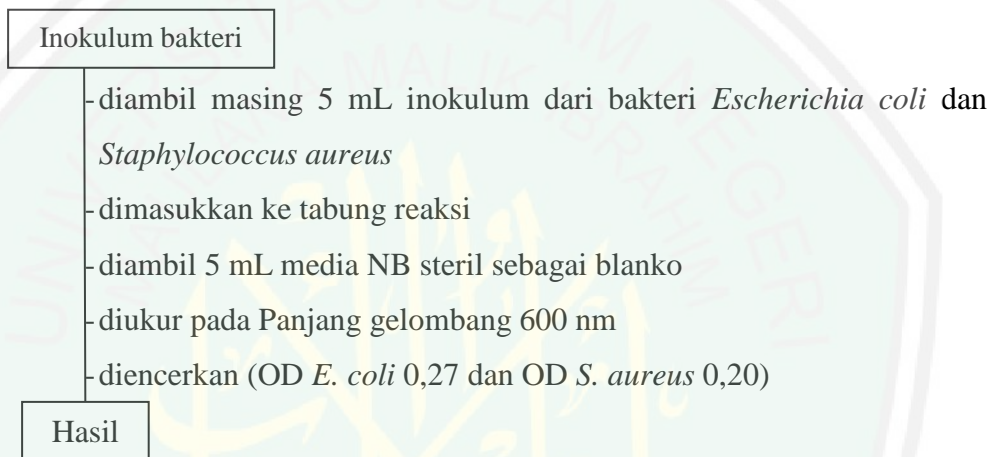
9.3 Regenerasi Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*



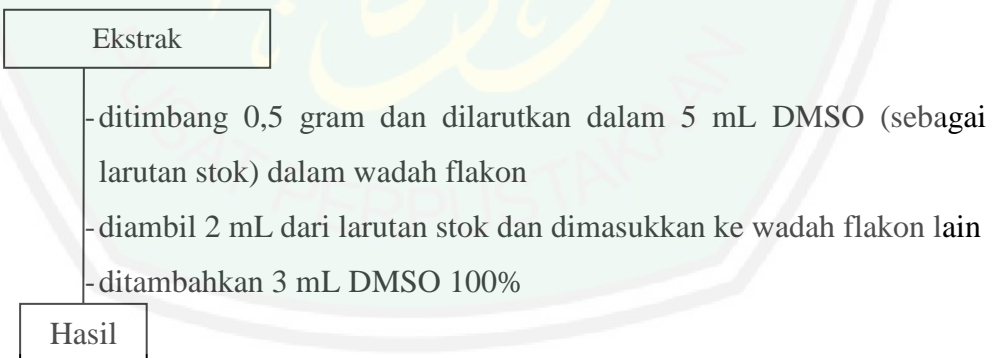
9.4 Pembuatan Inokulum Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*



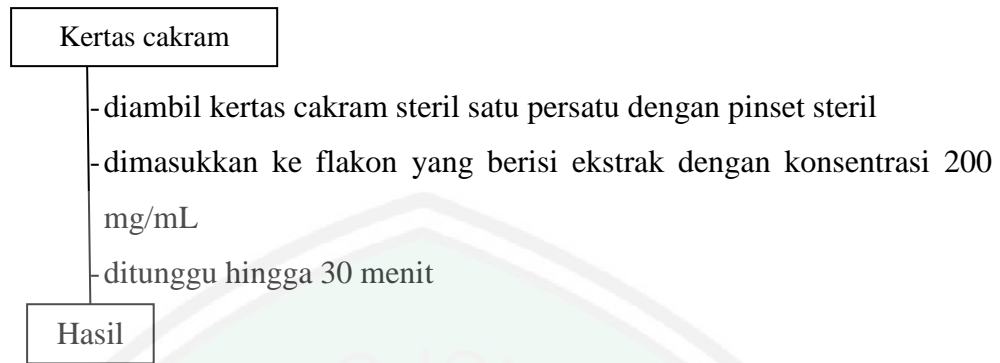
9.10 Penentuan OD



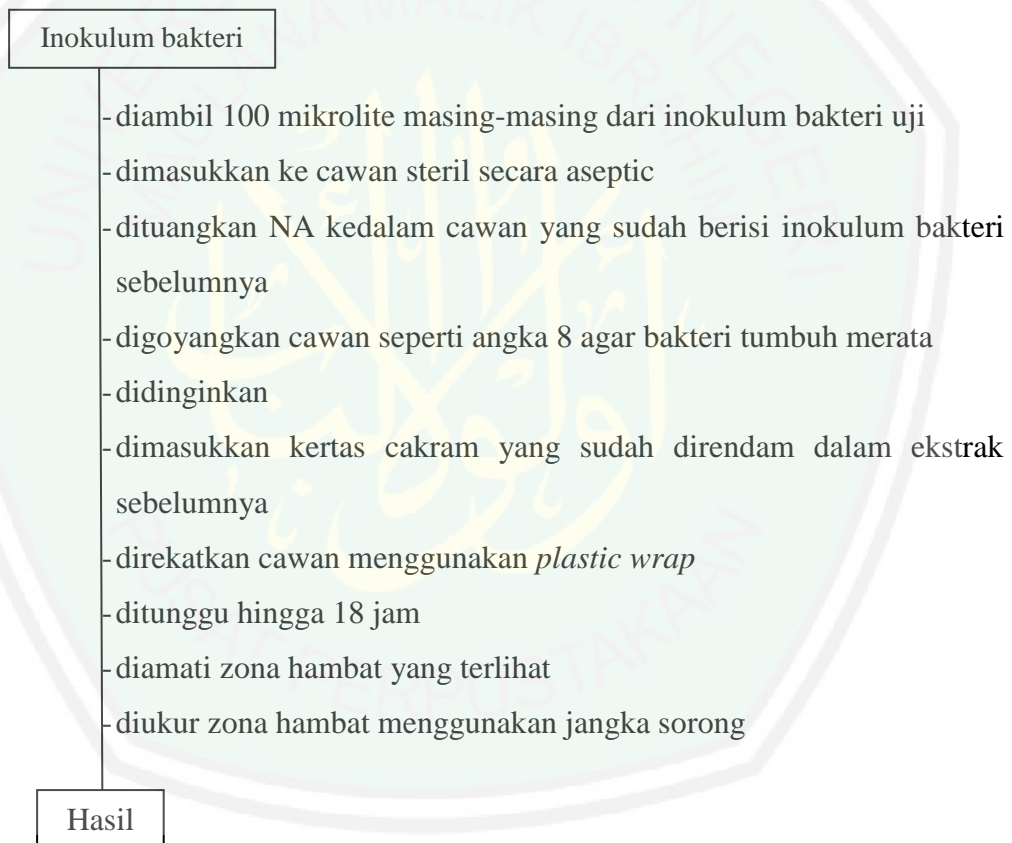
9.11 Pengenceran ekstrak dengan konsentrasi 200mg/mL



9.12 Perendaman kertas cakram



9.13 Uji Antibakteri



Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan

L.3.1 Pembuatan Buffer pH 4, 5 dan 6

- Larutan Asam Sitrat 0,1 M

Ditimbang dengan teliti 21,01 gr asam sitrat dan dilarutkan dengan akuades di dalam labu ukur 1000 mL sampai tanda batas.

- Larutan Natrium Sitrat 0,1 M

Ditimbang dengan teliti 21,41 gr natrium sitrat dan dilarutkan dengan akuades di dalam labu ukur 1000 mL sampai tanda batas.

pH	x mL 0,1 M asam sitrat	y mL 0,1 M natrium sitrat
4	33	17
5	20,5	29,5
6	9,5	41,5

Jadi untuk membuat 100 mL larutan buffer pH 4, 5, 6 diperlukan larutan stok x + y mL dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL dan ditambahkan dengan akuades hingga tanda batas.

L.3.2 Pembuatan Larutan NaCl 0,9%

Pembuatan larutan NaCl 0,9% dilakukan dengan cara sebanyak 0,9 gram NaCl dimasukkan ke dalam *beaker glass* 100 ml untuk dilarutkan dengan 50 ml akuades terlebih dahulu dan diaduk hingga larut. Setelah larut, larutan dipindahkan ke labu ukur 100 ml dan ditandabatkan dengan akuades lalu dihomogenkan.

Lampiran 4. Perhitungan Rendemen, Perhitungan Total Bakteri, Aktivitas Antibakteri

L.4.1 Perhitungan Rendemen Hasil Maserasi

Perlakuan	Berat sampel (gr)	Berat wadah (gr)	Berat wadah + ekstrak pekat (gr)	Berat ekstrak pekat (gr)	Rata-rata berat ekstrak (gr)
P ₁ T ₁ (K)	15,0021	20,6987	21,7883	1,0896	1,09
	(1) 15,0040	17,3755	18,5680	1,1925	
P ₁ T ₁	(2) 15,0044	17,4003	18,8690	1,1468	1,22
	(3) 15,0031	17,6574	18,9855	1,3281	
P ₁ T ₂ (K)	15,0035	9,7292	10,9620	1,2328	1,23
	(1) 15,0045	8,7023	10,9113	2,2090	
P ₁ T ₂	(2) 15,0043	10,1762	11,2051	1,0289	1,43
	(3) 15,0037	9,5728	10,6296	1,0568	
P ₁ T ₃ (K)	15,0023	24,4264	25,5172	1,0908	1,09
	(1) 15,0054	13,7258	14,7909	1,0651	
P ₁ T ₃	(2) 15,0033	25,1109	26,6844	1,5735	1,22
	(3) 15,0019	17,6260	18,6522	1,0262	
P ₂ T ₁ (K)	15,0023	44,9185	46,0221	1,1036	1,10
	(1) 15,0029	17,3878	18,8576	1,4698	
P ₂ T ₁	(2) 15,0025	17,7934	19,1313	1,3379	1,32
	(3) 15,0067	17,5901	18,7341	1,1440	
P ₂ T ₂ (K)	15,0021	8,9861	10,3501	1,3640	1,36
	(1) 15,0053	8,0151	10,3562	2,3411	
P ₂ T ₂	(2) 15,0061	9,0465	10,9310	1,8845	1,94
	(3) 15,0032	8,3716	9,9566	1,5850	
P ₂ T ₃ (K)	15,0041	17,2863	18,3659	1,0796	1,08
	(1) 15,0022	26,5052	27,8499	1,3447	
P ₂ T ₃	(2) 15,0037	17,8851	18,9349	1,0498	1,21
	(3) 15,0055	25,4556	26,7010	1,2454	
P ₃ T ₁ (K)	15,0031	44,2522	45,3309	1,0787	1,08
	(1) 15,0051	16,1448	17,4253	1,2805	
P ₃ T ₁	(2) 15,0042	17,1338	18,2376	1,1038	1,22
	(3) 15,0027	17,0681	18,3326	1,2645	
P ₃ T ₂ (K)	15,0033	8,5923	9,6436	1,0513	1,05
	(1) 15,0021	11,8961	13,5438	1,6477	
P ₃ T ₂	(2) 15,0035	9,9000	11,0232	1,1232	1,36
	(3) 15,0011	8,6002	9,9274	1,3272	
P ₃ T ₃ (K)	15,0035	17,4708	18,5908	1,1200	1,12
	(1) 15,0027	44,3138	46,0544	1,7406	
P ₃ T ₃	(2) 15,0039	26,1650	27,2753	1,1103	1,29
	(3) 15,0031	21,6586	22,6827	1,0241	

Hasil rendemen antara bekatul nonfermentasi dan bekatul terfermentasi

Suhu (T)	pH (P)	Rendemen ekstrak bekatul nonfermentasi (%)	Rata-rata rendemen ekstrak bekatul terfermentasi (%)
30°C	4	7,26	8,86
	5	7,36	8,78
	6	7,2	8,11
37°C	4	8,22	9,54
	5	9,09	12,91
	6	7,67	9,11
44°C	4	7,27	8,14
	5	7,20	8,09
	6	7,46	8,61

Keterangan :

$$\text{Rendemen (\%)} = \left[\frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Sampel}} \right] \times 100\%$$

L.4.2 Perhitungan Jumlah Total Bakteri

1. Bakteri *Eschericia coli*

No	Komposisi (Media NB : Inokulum) ml	Absorbansi
1	5,75 : 0,25	0,2697
2	5,5 : 0,5	0,4501
3	5,25 : 0,75	0,6536
4	5 : 1	0,8009

1.1 Hasil TPC

Faktor Pengenceran	Jumlah Bakteri Hitung			
	1	2	3	4
10 ⁻⁵	TBUD	TBUD	SP	SP
10 ⁻⁶	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD
10 ⁻⁷	78	85	22	269
10 ⁻⁸	5	9	25	61
10 ⁻⁹	1	2	21	8
10 ⁻¹⁰	0	0	8	2

1.2 Perhitungan jumlah bakteri

Ø Komposisi yang dipilih = komposisi 1

$$\text{Jumlah bakteri} = \text{Bakteri hitung} \times \frac{1}{Fp}$$

$$\text{Jumlah bakteri} = 78 \times \frac{1}{10^{-7}}$$

$$\text{Jumlah bakteri} = 7,8 \times 10^8 \text{ cfu}$$

2. Bakteri *Staphylococcus aureus*

No	Komposisi (Media NB : Inokulum) ml	Absorbansi
1	5,75 : 0,25	0,1991
2	5,5 : 0,5	0,3731
3	5,25 : 0,75	0,5752
4	5 : 1	0,7658

2.1 Hasil TPC

Pengenceran	Jumlah Bakteri Hitung			
	1	2	3	4
10 ⁻³	SP	SP	SP	SP
10 ⁻⁴	TBUD	SP	SP	TBUD
10 ⁻⁵	347	TBUD	TBUD	TBUD
10 ⁻⁶	279	116	157	225
10 ⁻⁷	125	26	355	51
10 ⁻⁸	60	2	60	5
10 ⁻⁹	74	0	15	1
10 ⁻¹⁰	12	0	9	0

2.2 Perhitungan jumlah koloni

Ø Komposisi yang dipilih = komposisi 1

$$\text{Jumlah bakteri} = \text{Bakteri hitung} \times \frac{1}{F_p}$$

$$\text{Jumlah bakteri} = 279 \times \frac{1}{10^{-6}}$$

$$\text{Jumlah bakteri} = 2,79 \times 10^8 \text{ cfu}$$

L.4.3 Zona Hambat Aktivitas Antibakteri

Perlakuan	Ulangan	Bakteri <i>E. coli</i> (mm)	Bakteri <i>S. aureus</i> (mm)
P ₁ T ₁ (K)	-	4,3	3,1
	1	6,7	4,8
P ₁ T ₁	2	7,4	8,7
	3	11,3	11,5
P ₁ T ₂ (K)	-	4,5	3,9
	1	13,3	14,6
P ₁ T ₂	2	7,6	6,9
	3	6,2	6,6
P ₁ T ₃ (K)	-	3,7	3,5
	1	5,8	6,1
P ₁ T ₃	2	5,5	5,9
	3	6,2	6,7
P ₂ T ₁ (K)	-	4,6	4,1
	1	10,3	9,7
P ₂ T ₁	2	9,8	6,7
	3	7,5	6,4
P ₂ T ₂ (K)	-	5,4	4,6
	1	16,6	13,4
P ₂ T ₂	2	13,5	11,7
	3	11,7	9,6
P ₂ T ₃ (K)	-	4,1	3,5
	1	7,1	6,2
P ₂ T ₃	2	6,5	6,9
	3	6,7	5,8
P ₃ T ₁ (K)	-	4,1	2,6
	1	8,7	9,2
P ₃ T ₁	2	6,9	7,4
	3	6,3	6,1
P ₃ T ₂ (K)	-	4,2	3,5
	1	8,3	5,7
P ₃ T ₂	2	6,6	6,3
	3	5,9	6,1
P ₃ T ₃ (K)	-	3,9	3,6
	1	6,3	7,1
P ₃ T ₃	2	5,7	6,1
	3	5,8	5,3

Keterangan:

P₁T₁ = pH 4, suhu 30 °C

P₃T₁ = pH 6, suhu 30 °C

P₁T₂ = pH 4, suhu 37 °C

P₃T₂ = pH 6, suhu 37 °C

P₁T₃ = pH 4, suhu 44 °C

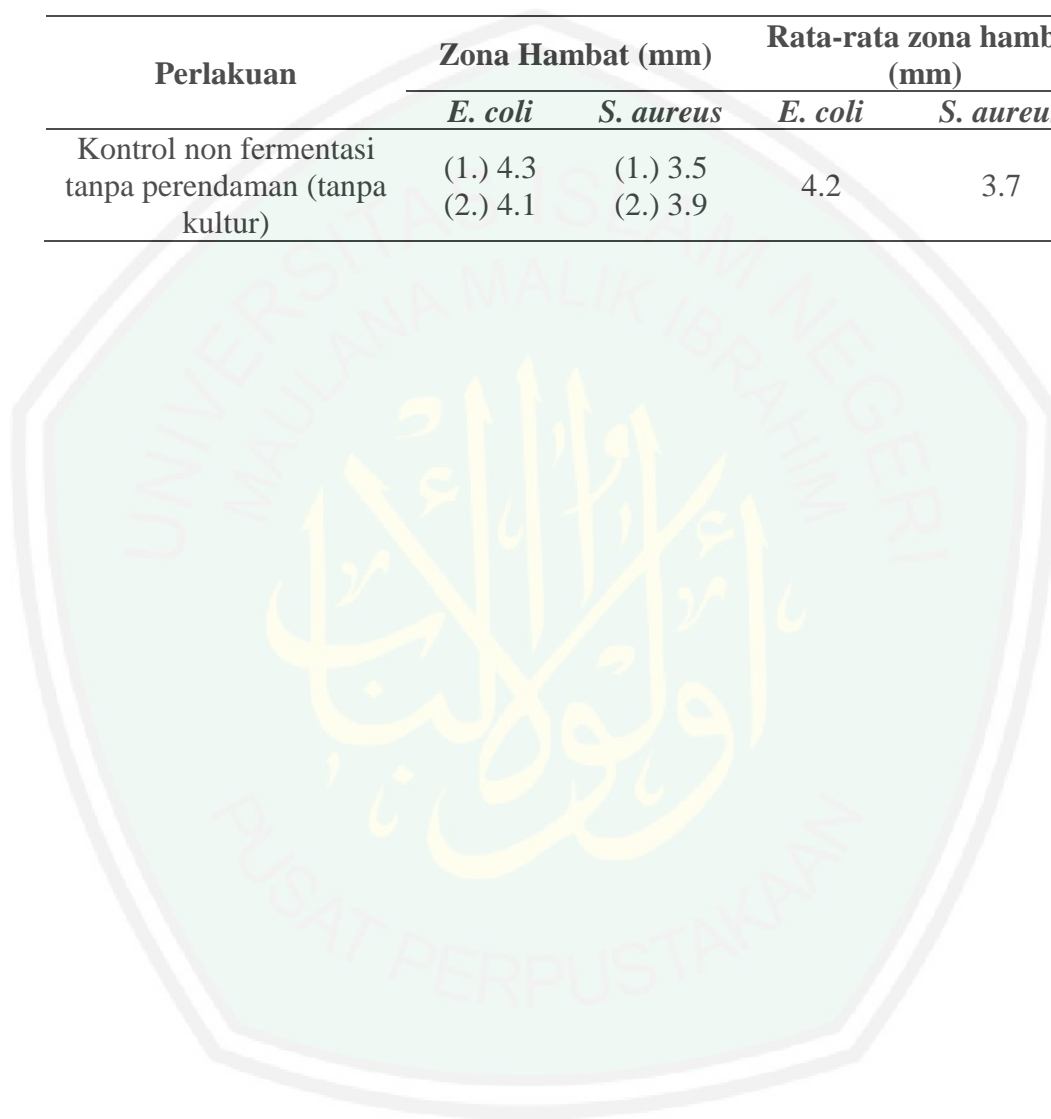
P₃T₃ = pH 6, suhu 44 °C

P₂T₁ = pH 5, suhu 30 °C

P₂T₂ = pH 5, suhu 37 °C

P₂T₃ = pH 5, suhu 44 °C

Perlakuan	Zona Hambat (mm)		Rata-rata zona hambat (mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Kontrol non fermentasi tanpa perendaman (tanpa kultur)	(1.) 4.3	(1.) 3.5	4.2	3.7
	(2.) 4.1	(2.) 3.9		



Lampiran 5. Nilai Standart Deviasi Aktivitas Antibakteri

a. Bakteri *Escherichia coli*

Sampel	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata-rata	Standar Deviasi
P ₁ T ₁	6.7	7.4	11.3	8.47	2.48
P ₁ T ₂	13.3	7.6	6.2	9.03	3.76
P ₁ T ₃	5.8	5.5	6.2	5.83	0.35
P ₂ T ₁	10.2	9.8	7.5	9.17	1.46
P ₂ T ₂	16.6	15.5	11.7	14.60	2.57
P ₂ T ₃	7.1	6.5	6.7	6.77	0.31
P ₃ T ₁	8.7	6.9	6.3	7.30	1.25
P ₃ T ₂	8.3	6.6	5.9	6.93	1.23
P ₃ T ₃	6.3	5.7	5.8	5.93	0.32

b. Bakteri *Staphylococcus aureus*

Sampel	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata-rata	Standar Deviasi
P ₁ T ₁	4.8	8.7	11.5	8.33	3.37
P ₁ T ₂	14.6	6.9	6.6	9.37	4.53
P ₁ T ₃	6.1	5.9	6.7	6.23	0.42
P ₂ T ₁	9.7	6.7	6.4	7.60	1.82
P ₂ T ₂	13.4	11.7	9.6	11.57	1.90
P ₂ T ₃	6.2	6.9	5.8	6.30	0.56
P ₃ T ₁	9.2	7.4	6.1	7.57	1.56
P ₃ T ₂	5.7	6.3	6.1	6.03	0.31
P ₃ T ₃	7.1	6.1	5.3	6.17	0.90

Lampiran 6. Data SPSS

L.6.1 *Escherichia coli*

```
UNIANOVA antibakteri BY pH suhu
  /METHOD=SSTYPE(3)
  /INTERCEPT=INCLUDE
  /POSTHOC=pH suhu(TUKEY)
  /PLOT=PROFILE(pH*suhu)
  /EMMEANS=TABLES(pH)
  /EMMEANS=TABLES(suhu)
  /EMMEANS=TABLES(pH*suhu)
  /PRINT=HOMOGENEITY DESCRIPTIVE
  /CRITERIA=ALPHA(.05)

  /DESIGN=pH suhu pH*suhu.
```

Univariate Analysis of Variance

[DataSet0]

Between-Subjects Factors

		N
pH	4	9
	5	9
	6	9
Suhu	30	9
	37	9
	44	9

Descriptive Statistics

Dependent Variable: antibakteri

pH	suhu	Mean	Std. Deviation	N
4	30	8.4667	2.47857	3
	37	9.0333	3.76076	3
	44	5.8333	.35119	3
	Total	7.7778	2.69990	9
5	30	9.2000	1.49332	3
	37	14.6000	2.57099	3
	44	6.7667	.30551	3

	Total	10.1889	3.78003	9
6	30	7.3000	1.24900	3
	37	6.9333	1.23423	3
	44	5.9333	.32146	3
	Total	6.7222	1.08256	9
Total	30	8.3222	1.78100	9
	37	10.1889	4.16427	9
	44	6.1778	.52626	9
	Total	8.2296	3.03084	27

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable:antibakteri

F	df1	df2	Sig.
4.762	8	18	.003

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + pH + suhu + pH * suhu

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:antibakteri

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	173.776 ^a	8	21.722	6.010	.001
Intercept	1828.624	1	1828.624	505.921	.000
pH	56.836	2	28.418	7.862	.004
Suhu	72.516	2	36.258	10.031	.001
pH * suhu	44.424	4	11.106	3.073	.043
Error	65.060	18	3.614		
Total	2067.460	27			
Corrected Total	238.836	26			

a. R Squared = .728 (Adjusted R Squared = .607)

Estimated Marginal Means

1. pH

Dependent Variable:antibakteri

pH	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
4	7.778	.634	6.446	9.109
5	10.189	.634	8.857	11.520
6	6.722	.634	5.391	8.054

2. suhu

Dependent Variable:antibakteri

Suhu	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
30	8.322	.634	6.991	9.654
37	10.189	.634	8.857	11.520
44	6.178	.634	4.846	7.509

3. pH * suhu

Dependent Variable:antibakteri

pH	suhu	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
4	30	8.467	1.098	6.161	10.773
	37	9.033	1.098	6.727	11.339
	44	5.833	1.098	3.527	8.139
5	30	9.200	1.098	6.894	11.506
	37	14.600	1.098	12.294	16.906
	44	6.767	1.098	4.461	9.073
6	30	7.300	1.098	4.994	9.606
	37	6.933	1.098	4.627	9.239
	44	5.933	1.098	3.627	8.239

Post Hoc Tests

pH

Multiple Comparisons

antibakteri

Tukey HSD

(I) pH	(J) pH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
4	5	-2.4111*	.89622	.038	-4.6984	-.1238
	6	1.0556	.89622	.481	-1.2317	3.3429
5	4	2.4111*	.89622	.038	.1238	4.6984
	6	3.4667*	.89622	.003	1.1794	5.7540
6	4	-1.0556	.89622	.481	-3.3429	1.2317
	5	-3.4667*	.89622	.003	-5.7540	-1.1794

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 3.614.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Antibakteri

Tukey HSD

pH	N	Subset	
		1	2
6	9	6.7222	
4	9	7.7778	
5	9		10.1889
Sig.		.481	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 3.614.

suhu

Multiple Comparisons

antibakteri

Tukey HSD

(I) suhu	(J) suhu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
30	37	-1.8667	.89622	.122	-4.1540	.4206
	44	2.1444	.89622	.068	-.1429	4.4317
37	30	1.8667	.89622	.122	-.4206	4.1540
	44	4.0111*	.89622	.001	1.7238	6.2984
44	30	-2.1444	.89622	.068	-4.4317	.1429
	37	-4.0111*	.89622	.001	-6.2984	-1.7238

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 3.614.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

antibakteri

Tukey HSD

suhu	N	Subset	
		1	2
44	9	6.1778	
30	9	8.3222	8.3222
37	9		10.1889
Sig.		.068	.122

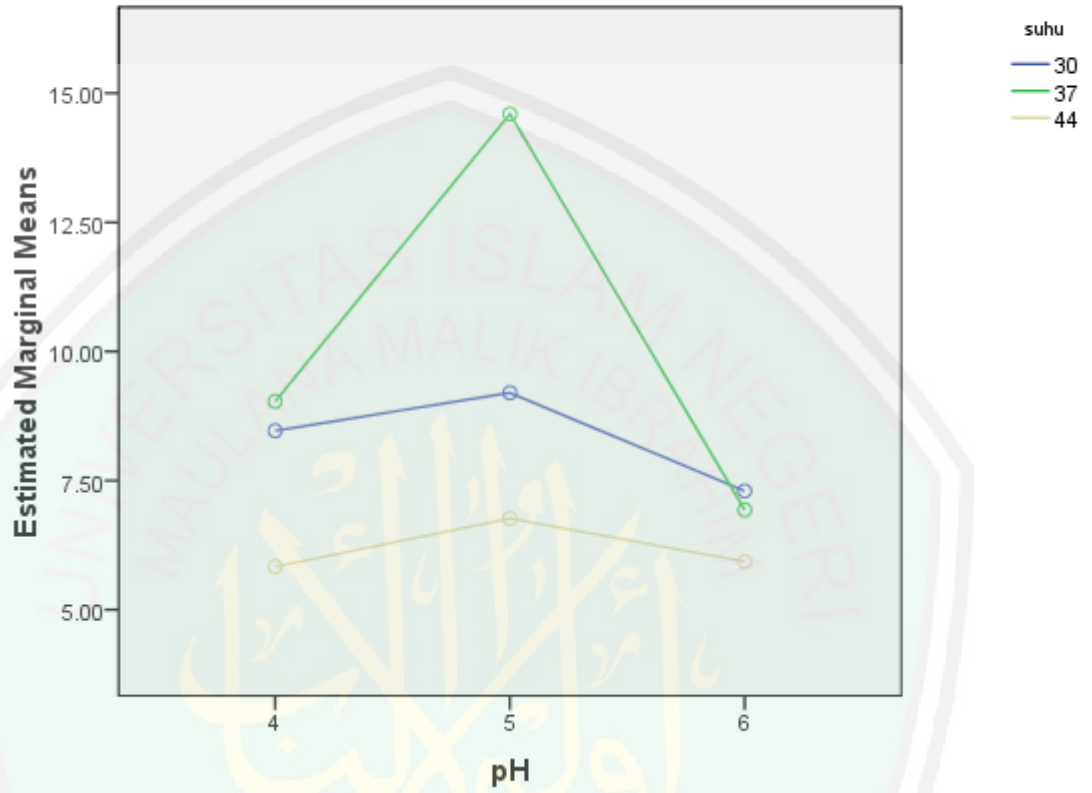
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 3.614.

Profile Plots

Estimated Marginal Means of antibakteri



L.6.2 *Staphylococcus aureus*

```
UNIANOVA antibakteri BY pH suhu
  /METHOD=SSTYPE(3)
  /INTERCEPT=INCLUDE
  /POSTHOC=pH suhu(TUKEY)
  /PLOT=PROFILE(pH*suhu)
  /EMMEANS=TABLES(pH)
  /EMMEANS=TABLES(suhu)
  /EMMEANS=TABLES(pH*suhu)
  /PRINT=HOMOGENEITY DESCRIPTIVE
  /CRITERIA=ALPHA(.05)

  /DESIGN=pH suhu pH*suhu.
```

Univariate Analysis of Variance

[DataSet0]

Between-Subjects Factors

		N
pH	4	9
	5	9
	6	9
suhu	30	9
	37	9
	44	9

Descriptive Statistics

Dependent Variable: antibakteri

pH	suhu	Mean	Std. Deviation	N
4	30	8.3333	3.36502	3
	37	9.3667	4.53468	3
	44	6.2333	.41633	3
	Total	7.9778	3.15071	9
5	30	7.6000	1.82483	3
	37	11.5667	1.90351	3
	44	6.3000	.55678	3
	Total	8.4889	2.73150	9

6	30	7.5667	1.55671	3
	37	6.0333	.30551	3
	44	6.1667	.90185	3
	Total	6.5889	1.17201	9
Total	30	7.8333	2.10000	9
	37	8.9889	3.44835	9
	44	6.2333	.57228	9
	Total	7.6852	2.53813	27

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: antibakteri

F	df1	df2	Sig.
4.076	8	18	.006

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + pH + suhu + pH * suhu

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: antibakteri

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	82.187 ^a	8	10.273	2.168	.082
Intercept	1594.676	1	1594.676	336.482	.000
pH	17.401	2	8.700	1.836	.188
suhu	34.465	2	17.233	3.636	.047
pH * suhu	30.321	4	7.580	1.599	.218
Error	85.307	18	4.739		
Total	1762.170	27			
Corrected Total	167.494	26			

a. R Squared = .491 (Adjusted R Squared = .264)

Estimated Marginal Means

1. pH

Dependent Variable:antibakteri

pH	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
4	7.978	.726	6.453	9.502
5	8.489	.726	6.964	10.013
6	6.589	.726	5.064	8.113

2. suhu

Dependent Variable:antibakteri

suhu	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
30	7.833	.726	6.309	9.358
37	8.989	.726	7.464	10.513
44	6.233	.726	4.709	7.758

3. pH * suhu

Dependent Variable:antibakteri

pH	suhu	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
4	30	8.333	1.257	5.693	10.974
	37	9.367	1.257	6.726	12.007
	44	6.233	1.257	3.593	8.874
5	30	7.600	1.257	4.959	10.241
	37	11.567	1.257	8.926	14.207
	44	6.300	1.257	3.659	8.941
6	30	7.567	1.257	4.926	10.207
	37	6.033	1.257	3.393	8.674
	44	6.167	1.257	3.526	8.807

Post Hoc Tests

pH

Multiple Comparisons

antibakteri

Tukey HSD

(I) pH	(J) pH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
4	5	-.5111	1.02624	.873	-3.1302	2.1080
	6	1.3889	1.02624	.385	-1.2302	4.0080
5	4	.5111	1.02624	.873	-2.1080	3.1302
	6	1.9000	1.02624	.182	-.7191	4.5191
6	4	-1.3889	1.02624	.385	-4.0080	1.2302
	5	-1.9000	1.02624	.182	-4.5191	.7191

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 4.739.

Homogeneous Subsets

antibakteri

Tukey HSD

pH	N	Subset
		1
6	9	6.5889
4	9	7.9778
5	9	8.4889
Sig.		.182

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 4.739.

suhu**Multiple Comparisons**

antibakteri

Tukey HSD

(I) suhu	(J) suhu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
30	37	-1.1556	1.02624	.511	-3.7747	1.4636
	44	1.6000	1.02624	.288	-1.0191	4.2191
37	30	1.1556	1.02624	.511	-1.4636	3.7747
	44	2.7556*	1.02624	.038	.1364	5.3747
44	30	-1.6000	1.02624	.288	-4.2191	1.0191
	37	-2.7556*	1.02624	.038	-5.3747	-.1364

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 4.739.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

antibakteri

Tukey HSD

suhu	N	Subset	
		1	2
44	9	6.2333	
30	9	7.8333	7.8333
37	9		8.9889
Sig.		.288	.511

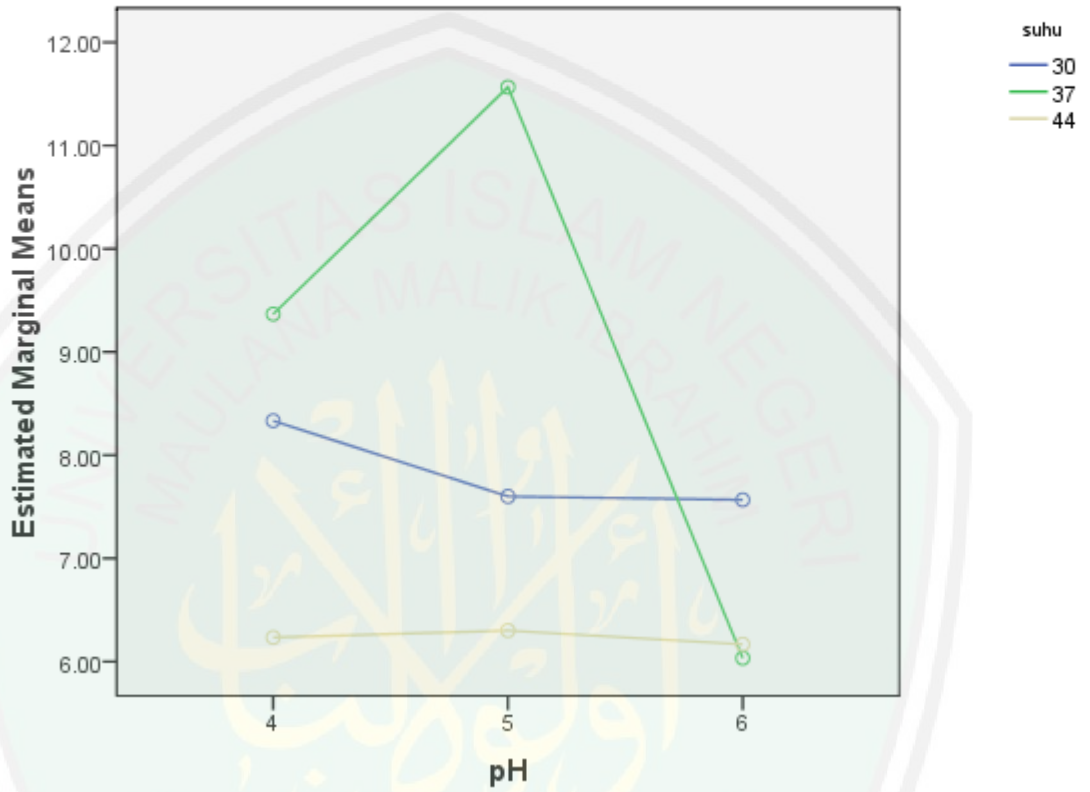
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 4.739.

Profile Plots

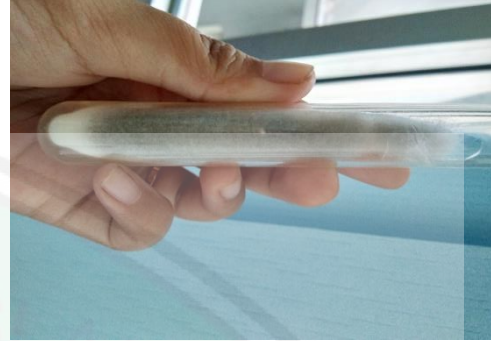
Estimated Marginal Means of antibakteri



Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian



Preparasi media bekatul sebelum dilakukan proses fermentasi



Regenerasi jamur *Rizhopus oryzae* dalam media padat PDA



Proses fermentasi bekatul



Hasil pengeringan bekatul terfermentasi



Proses ekstraksi maserasi



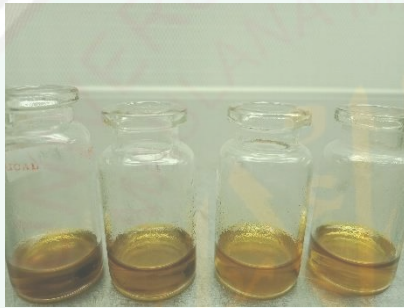
Proses penyaringan bekatul terfermentasi



Filtrat hasil penyaringan proses ekstraksi



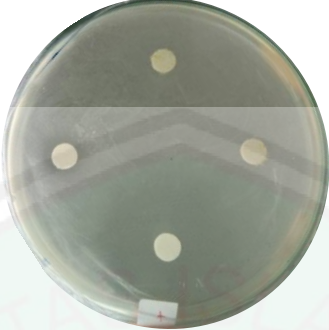
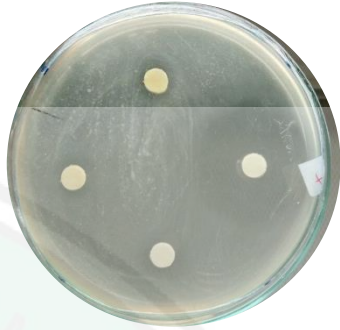




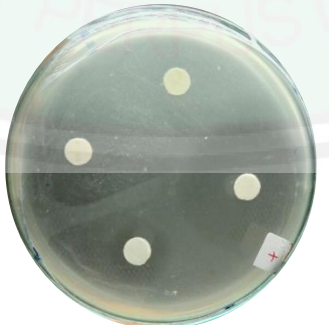
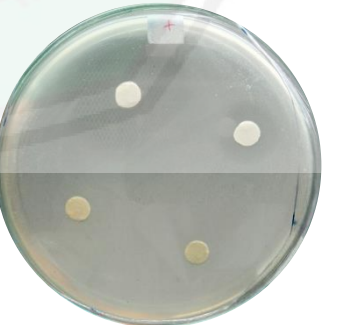
Ekstrak pekat bekatul terfermentasi

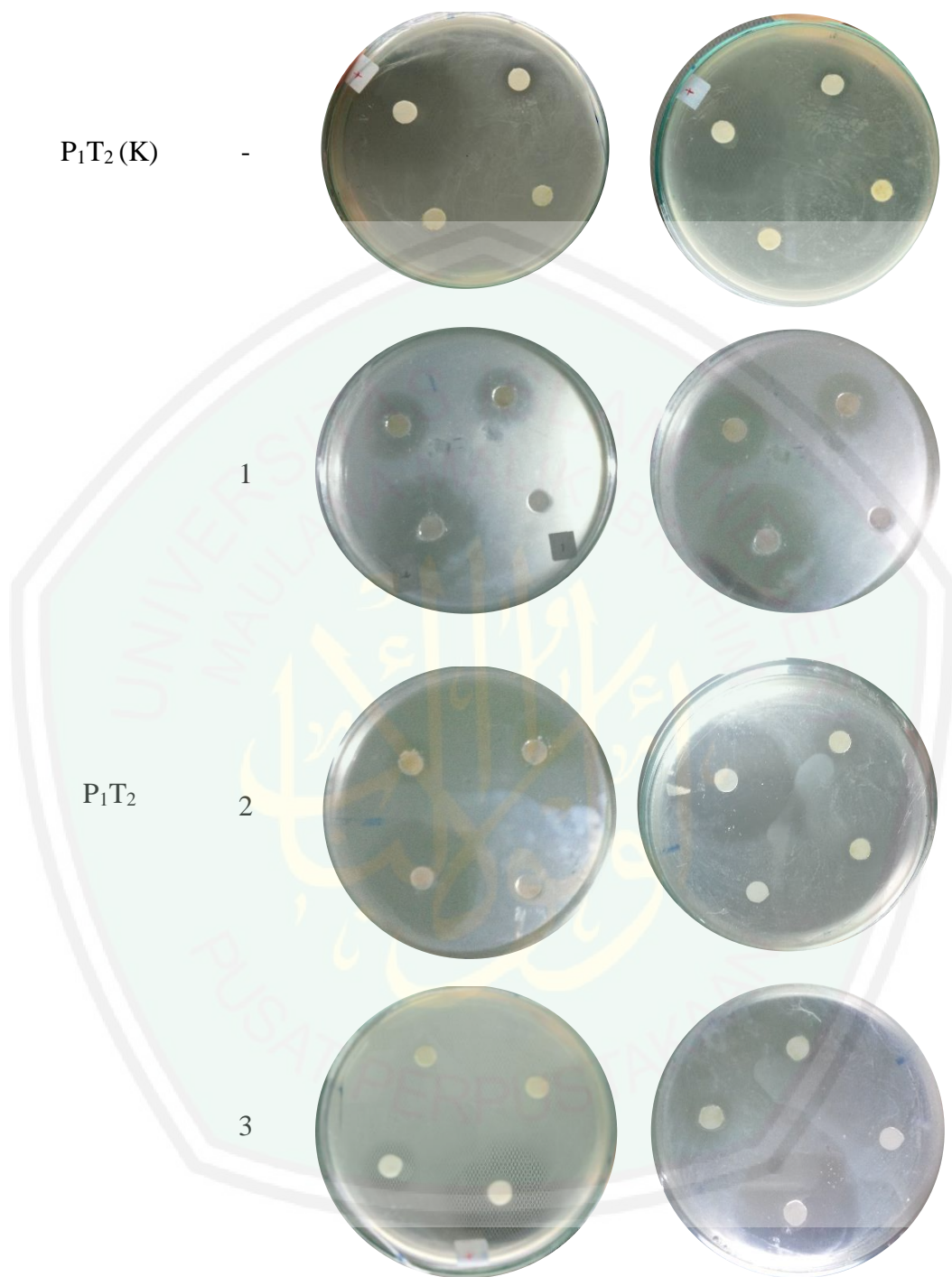


Hasil pengenceran ekstrak bekatul terfermentasi dengan DMSO 100%



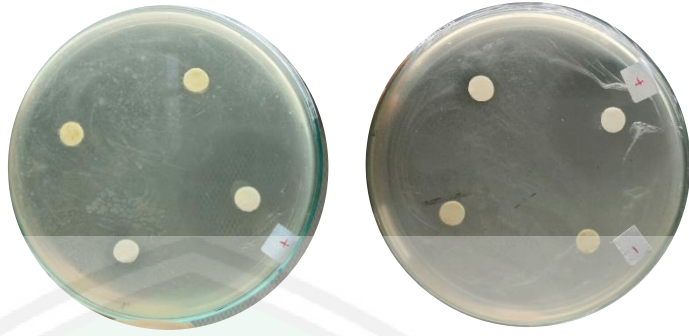
Lampiran 8. Gambar Zona Hambat

Sampel	Ulangan	Bakteri <i>E. coli</i> (mm)	Bakteri <i>S. aureus</i> (mm)
P ₁ T ₁ (K)	-		
	1		
P ₁ T ₁	2		
	3		



P₁T₃(K)

-

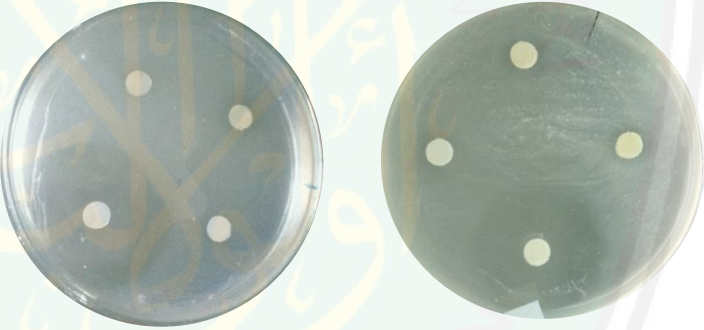


1

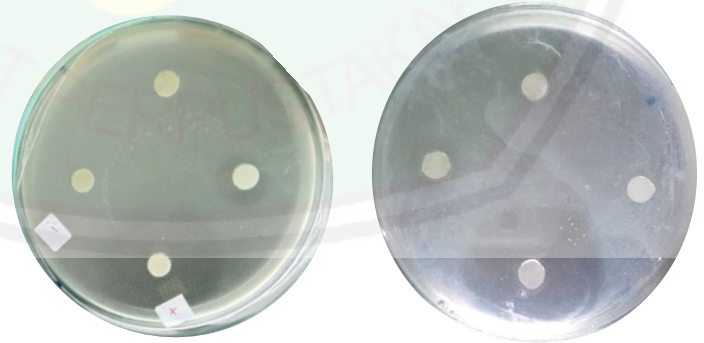


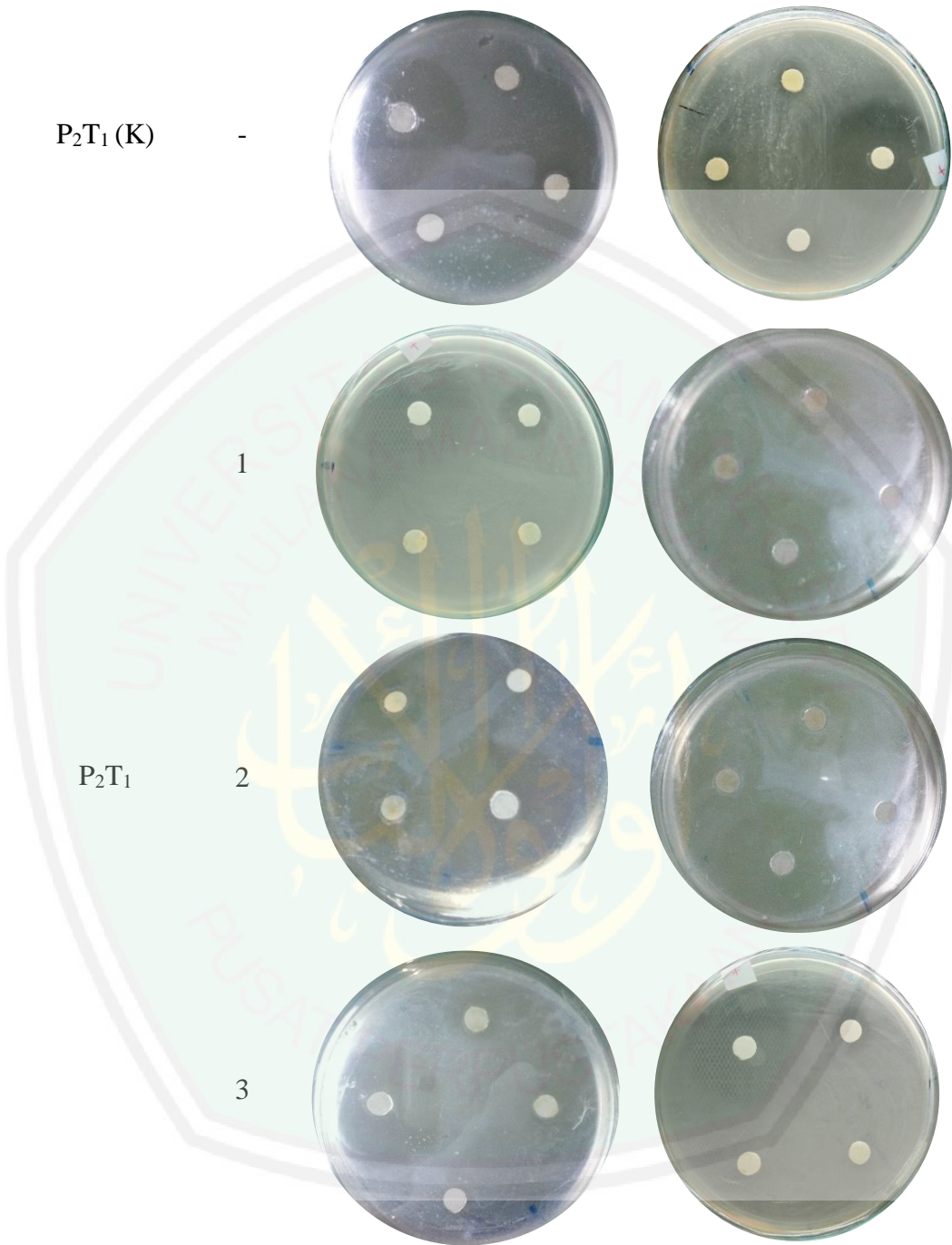
P₁T₃

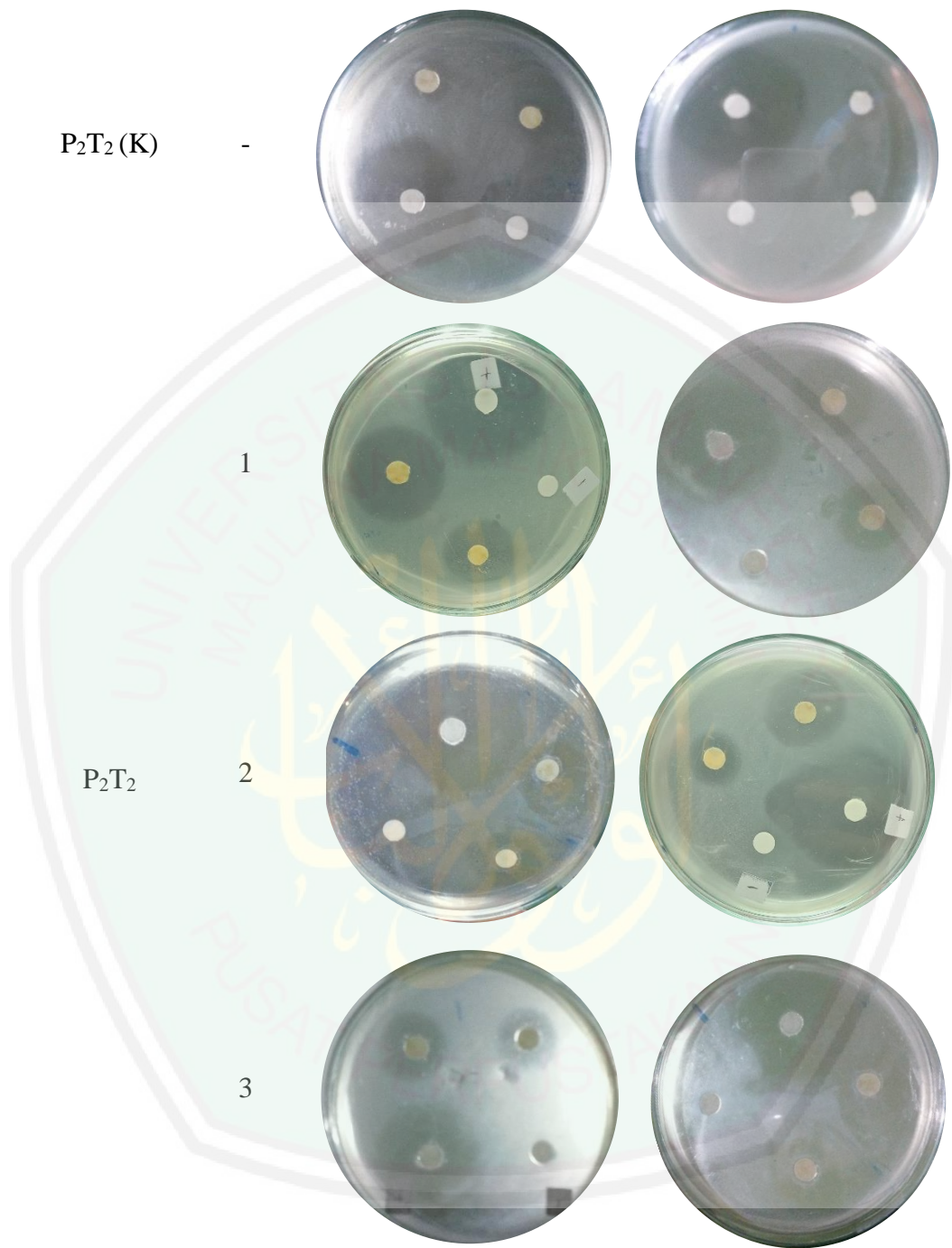
2



3

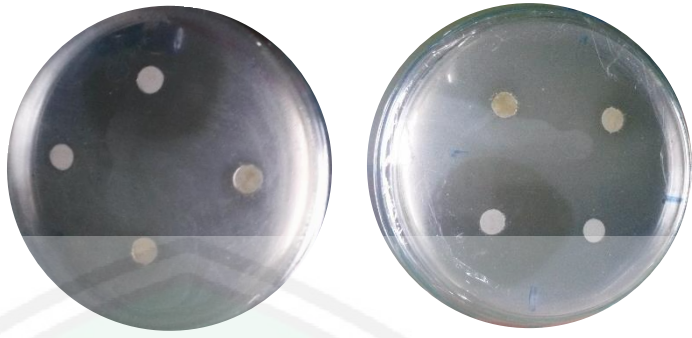




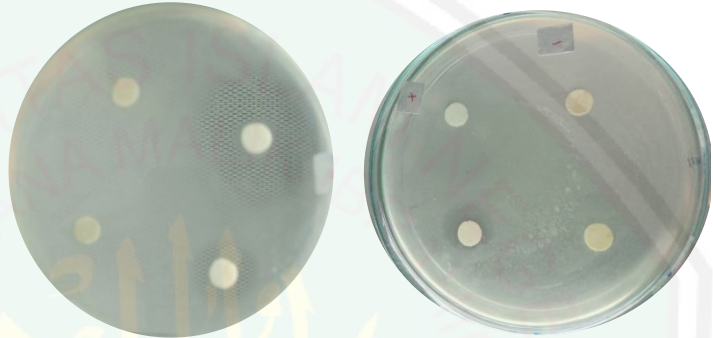


P₂T₃ (K)

-

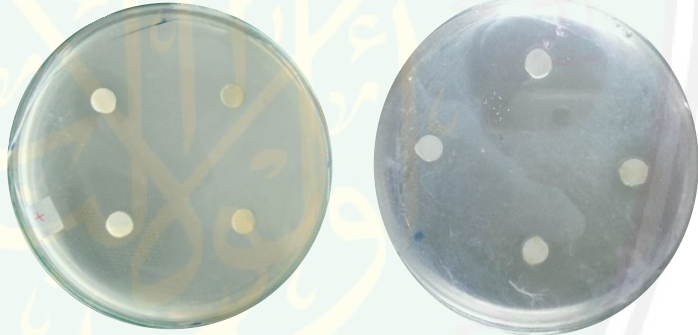


1



P₂T₃

2



3

