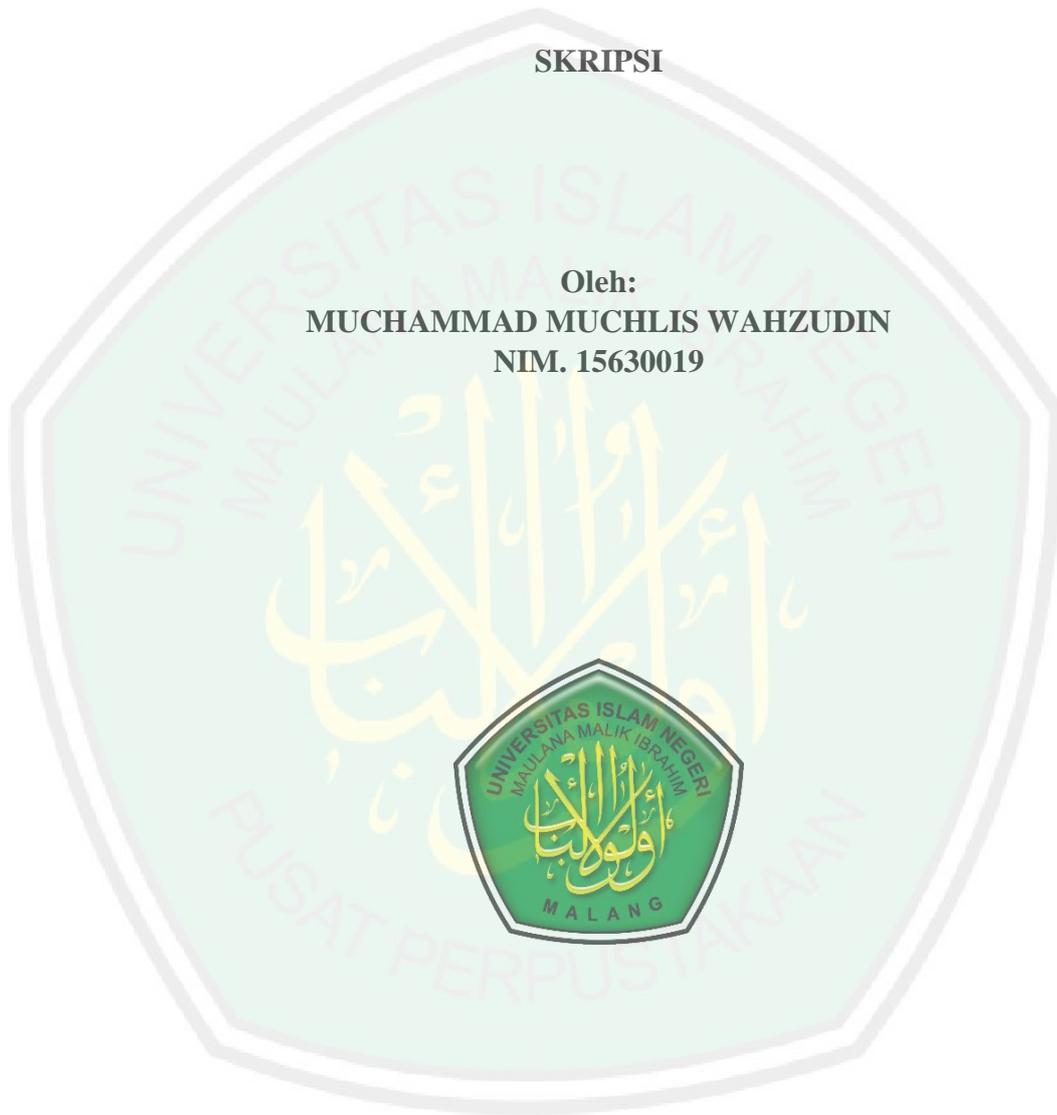


**PENGARUH SUHU DAN LAMA FERMENTASI
TERHADAP PENINGKATAN MINYAK BEKATUL
TERFERMENTASI *Rhizopus oryzae***

SKRIPSI

Oleh:
MUCHAMMAD MUCHLIS WAHZUDIN
NIM. 15630019



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**PENGARUH SUHU DAN LAMA FERMENTASI
TERHADAP PENINGKATAN MINYAK BEKATUL
TERFERMENTASI *Rhizopus oryzae***

SKRIPSI

Oleh:
MUCHAMMAD MUCHLIS WAHZUDIN
NIM. 15630019

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
2020

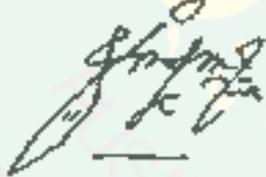
**PENGARUH SUHU DAN LAMA FERMENTASI
TERHADAP PENINGKATAN MINYAK BEKATUL
TERFERMENTASI *Rhizopus oryzae***

SKRIPSI

Oleh:
MUCHAMMAD MUCHLIS WAHZUDIN
NIM. 15630019

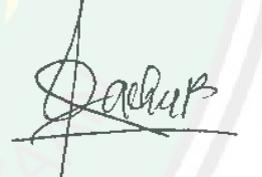
Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal 4 Juni 2020

Pembimbing I



Anik Maunatin, S.T., M.P
NIDT. 19760105 20180201 2 248

Pembimbing II



Ahmad Abtokhi, M. Pd
NIP. 19761003 200312 1 004

Mengetahui,
Ketua Jurusan



Elok Kamilah Hayati M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

**PENGARUH SUHU DAN LAMA FERMENTASI
TERHADAP PENINGKATAN MINYAK BEKATUL
TERFERMENTASI *Rhizopus oryzae***

SKRIPSI

Oleh:
MUCHAMMAD MUCHLIS WAHZUDIN
NIM. 15630019

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal, 18 Juni, 2020

Penguji Utama	: A. Ghanaim Fasya, M.Si NIP. 198220616 200604 1 002	(..... )
Ketua Penguji	: Dr. Akyunul Jannah, S.Si., M.P NIP. 19750410 200501 2 009	(..... )
Sekretaris Penguji	: Anik Maunatin, S.T., M.P NIDT. 19760105 20180201 2 248	(..... )
Anggota Penguji	: Ahmad Abtokhi, M. Pd NIP. 19761003 200312 1 004	(..... )

Mengetahui,
Ketua Jurusan



Elok Kamilah Hayati M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Muchammad Muchlis Wahzudin

NIM :15630019

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Pengaruh Suhu dan Lama Fermentasi Terhadap
Peningkatan Minyak Bekatul Terfermentasi *Rhizopus*
Oryzae

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai 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 perbuatan tersebut.

Malang, 11 Juni 2020

Yang membuat pernyataan,



Muchammad Muchlis Wahzudin
NIM. 15630019

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah dengan penuh rasa syukur kepada Allah SWT, saya mengucapkan terimakasih atas segala nikmat yang telah diberikan. Sholawat serta salam semoga terus mampu saya ucapkan sebagai bentuk rasa cinta kepada Baginda Nabi besar Muhammad SAW.

Sebagai bentuk terimakasih, Skripsi ini saya persembahkan kepada beberapa pihak:

1. Kedua orang tua, Bapak Tohirin dan Ibuk Zumrotin, serta Kakak saya M. Miftachur Rozikin yang berdoa tak ada ujung, yang berusaha tak ada henti, yang selalu memberikan semangat, motivasi, dan selalu mendukung apa yang saya lakukan.
2. Bapak ibu pembimbing dan penguji, Anik Maunatin, S.T., M.P, Dr. Akyunul Jannah, S.Si., M.P, Ahmad Abtokhi, M. Pd, A. Ghanaim Fasya, M.Si. yang telah sabar membimbing, memberi banyak ilmu, pengalaman, dan juga tak lelah memberi motivasi-motivasi.
3. Teman-teman ku semua, khususnya teman-teman yang selalu setia menemani dalam proses pengerjaan skripsi ini.

MOTTO

Tak ada pilihan yang salah,
Jangan larut terhadap ke ragu-ragu an,
Renungkan sejenak, lalu segera tentukan, lakukan, dan nikmati.

“JUST ENJOY IT”

Padahal Allah SWT-lah yang menciptakan kamu

Dan apa yang kamu perbuat itu

(QS. As-saffat:96)

KATA PENGANTAR



Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada hamba-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir (skripsi) yang berjudul “**Pengaruh Suhu dan Lama Fermentasi Terhadap Peningkatan Minyak Bekatul Terfermentasi *Rhizopus oryzae***” walaupun masih jauh dari kesempurnaan. Shalawat dan salam tak lupa penulis sampaikan kepada junjungan Nabi Besar Muhammad SAW serta keluarga, dan sahabat yang telah membimbing kita menuju jalan yang lurus dan diridhoi Allah SWT.

Laporan hasil penelitian ini disusun sebagai tahapan untuk mencapai gelar Strata 1 serta sebagai pengaplikasian ilmu yang telah didapat. Seiring dengan terselesainya penulisan laporan hasil penelitian ini, penulis mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian tugas akhir ini kepada:

1. Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag, selaku rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si, selaku dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Elok Kamilah Hayati, M.Si. selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Anik Maunatin, S.T., M.P, Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P, Ahmad Abtokhi, M. Pd selaku dosen pembimbing yang telah banyak memberikan masukan

baik mengenai penelitian, penulisan laporan, serta dengan rela meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, saran, motivasi, dukungan baik moril ataupun materil.

5. Seluruh dosen dan laboran Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah membagi ilmu, pengetahuan, pengalaman, dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
6. Orang tua beserta saudara yang selalu mendoakan, memberi nasehat, serta memberikan motivasi.
7. Seluruh rekan-rekan mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, khususnya angkatan 2015 yang telah memberikan semangat, motivasi, wawasan baru dan pengalaman yang tak pernah terlupakan.
8. Sahabat-sahabat nongkrong khususnya Anshori, Hanani, Raisal, Rizki, Anwar, Thoif, Asrul, Nasrul, Faiz, Pras, Irfan, Ain, Fiya. Teman-teman lab khususnya Aan, Dedew, Ayuma, Izza, Nende, Nisak, Ihsani. Teman-Teman Ikatan Mahasiswa Jombang, dan pada umumnya teman-teman ku yang tak mampu ku sebutkan satu per satu. Terimakasih atas segala bantuan, doa, dan kehadirannya.
9. Semua pihak yang telah membantu penyusunan laporan ini secara langsung maupun tidak langsung.

Penulis menyadari bahwa masih banyak terdapat kekurangan dalam penyusunan tugas akhir ini. Namun demikian dengan segala keterbatasan dan

kemampuan yang ada, penulis telah berusaha untuk menyelesaikan tugas akhir dengan sebaik-baiknya. Akhir kata semoga tugas akhir ini dapat diambil manfaatnya oleh semua pihak, khususnya bagi pembaca.

Amin Ya Rabbal Alamin.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb

Malang, Juni 2020

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	v
MOTTO	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvi
المخلص مستخلص.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Batasan Masalah	6
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Pemanfaatan Tanaman dalam Prespektif Islam	7
2.2 Bekatul	8
2.3 Minyak Bekatul	11
2.4 Fermentasi	13
2.5 <i>Rhizopus oryzae</i>	19
2.6 Ekstraksi Minyak Bekatul Metode Soxhlet	21
2.7 Asam Lemak.....	23
2.8 Asam Lemak Bebas	26
2.9 Hidrolisis Minyak	27
2.10 Esterifikasi Asam Lemak.....	28
2.11 Kromatografi Gas- Spektrofotometri Masa (KG-SM)	29
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	33
3.2 Alat dan Bahan	33
3.2.1 Alat	33
3.2.2 Bahan	33
3.3 Rancangan Penelitian.....	34
3.4 Tahapan Penelitian.....	35
3.5 Pelaksanaan Penelitian.....	36
3.5.1 Preparasi Bekatul.....	36
3.5.2 Persiapan Kultur <i>Rhizopus oryzae</i>	36
3.5.3 Fermentasi Bekatul oleh <i>Rhizopus oryzae</i>	37

3.5.4 Ekstraksi Minyak Bekatul Terfermentasi oleh <i>Rhizopus oryzae</i> Metode Soxhlet.....	37
3.5.5 Analisis Kadar Randemen Minyak Bekatul Terfermentasi oleh <i>Rhizopus oryzae</i>	37
3.5.6 Analisis Kadar Asam Lemak Bebas Minyak Bekatul Terfermentasi oleh <i>Rhizopus oryzae</i>	38
3.5.7 Identifikasi Asam Lemak Minyak Bekatul Terfermentasi oleh <i>Rhizopus oryzae</i>	38
3.6 Analisis Data.....	39
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Preparasi Bekatul	40
4.2 Regenerasi Jamur <i>Rhizopus oryzae</i> dan Pembuatan Inokulum	40
4.3 Fermentasi Bekatul oleh <i>Rhizopus oryzae</i>	42
4.4 Ekstraksi Minyak Bekatul Terfermentasi oleh <i>Rhizopus oryzae</i> Metode Soxhlet.....	44
4.5 Analisis Kadar Asam Lemak Bebas Minyak Bekatul Terfermentasi oleh <i>Rhizopus oryzae</i>	48
4.6 Identifikasi Asam Lemak pada Minyak Bekatul Terfermentasi Menggunakan KG-SM	53
4.6.1 Hidrolisis Minyak Bekatul Terfermentasi	53
4.6.2 Esterifikasi Asam Lemak Minyak Bekatul Terfermentasi	55
4.6.3 Identifikasi Senyawa Minyak Bekatul Terfermentasi Menggunakan Instrumen KG-SM.....	57
BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	70
5.2 Saran	70
DAFTAR PUSTAKA	71
LAMPIRAN	78

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian	78
Lampiran 2 Diagram Alir	79
Lampiran 3 Perhitungan	84
Lampiran 4 Data Pengamatan	87
Lampiran 5 Data Analisis KG-SM.....	89
Lampiran 6 Dokumentasi Penelitian.....	91



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Bagian-bagian biji padi	9
Gambar 2.2	Reaksi Pembukaan Matriks Serat Selulosa	17
Gambar 2.3	Kurva Pertumbuhan Jamur <i>Rizhopus oryzae</i>	21
Gambar 2.4	Rangkaian Ekstraktor Soxhlet.....	23
Gambar 2.5	Struktur Umum Asam Lemak	24
Gambar 2.6	Reaksi Hidrolisis Minyak.....	27
Gambar 2.7	Mekanisme Reaksi Esterifikasi	28
Gambar 4.1	Reaksi Hidrolisis Minyak Bekatul	49
Gambar 4.2	Reaksi Asam Lemak Bebas dengan NaOH.....	49
Gambar 4.3	Reaksi Hidrolisis Gliseril Olein	54
Gambar 4.4	Reaksi Pembentukan Asam Lemak.....	55
Gambar 4.5	Mekanisme Reaksi ALB dan Metanol dengan Katalis H ₂ SO ₄	56
Gambar 4.6	Kromatogram Minyak Bekatul Tanpa Fermentasi.....	57
Gambar 4.7	SpektraMS Puncak 1 Minyak Bekatul Tanpa Fermentasi	58
Gambar 4.8	Pola Fragmentasi Asam Palmitat	59
Gambar 4.9	Spektra MS Puncak 2 Minyak Bekatul Tanpa Fermentasi	60
Gambar 4.10	Pola Fragmentasi Asam Linoleat	61
Gambar 4.11	Spektra MS Puncak 3 Minyak Bekatul Tanpa Fermentasi	61
Gambar 4.12	Pola Fragmentasi Asam Oleat	62
Gambar 4.13	Spektra MS 9-Octadecenoic acid	63
Gambar 4.14	Kromatogram Minyak Bekatul Terfermentasi	64
Gambar 4.15	Spektra MS puncak 1 Minyak Bekatul Terfermentasi	66
Gambar 4.16	Spektra MS puncak 2 Minyak Bekatul Terfermentasi	66
Gambar 4.17	Spektra MS puncak 3 Minyak Bekatul Terfermentasi	67

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Komposisi Nutrisi Bekatul.....	10
Tabel 2.2 Komposisi Minyak Bekatul	11
Tabel 2.3 Sifat Fisika-Kimia Minyak Bekatul	12
Tabel 2.4 Komposisi Asam Lemak Pada Minyak Bekatul Padi	13
Tabel 2.5 Kadar Asam Lemak Minyak Nabati	25
Tabel 2.6 Basis Data Puncak-Puncak Senyawa Asam Lemak.....	31
Tabel 3.1 Kombinasi perlakuan Suhu dan Waktu Fermentasi	34
Tabel 4.1 Randemen Minyak Bekatul Terfermentasi dan Tanpa Fermentasi.....	46
Tabel 4.2 Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Randemen Minyak Bekatul.....	47
Tabel 4.3 Kadar Asam Lemak Bebas Minyak Bekatul Terfermentasi	50
Tabel 4.4 Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar FFA	51
Tabel 4.5 Hasil Kromatogram Minyak Bekatul Tanpa Fermentasi	57
Tabel 4.6 Hasil Senyawa Minyak Bekatul Tanpa Fermentasi	64
Tabel 4.7 Hasil Kromatogram Minyak Bekatul Terfermentasi.....	65
Tabel 4.8 Hasil Senyawa Minyak Bekatul Terfermentasi	68
Tabel 4.9 Perbandingan Hasil Analisis Senyawa.....	68

ABSTRAK

Wahzudin, Muchammad Muchlis. 2020. **Pengaruh Suhu dan Lama Fermentasi Terhadap Peningkatan Minyak Bekatul Terfermentasi *Rhizopus oryzae***. Pembimbing I: Anik Maunatin S.T., M. P., Pembimbing II: Ahmad Abtokhi, M. Pd., Konsultan: Dr. Akyunul Jannah, S.Si., M.P.

Kata Kunci : Bekatul, Minyak Bekatul, Fermentasi, *Rhizopus oryzae*, Ekstraksi, Asam Lemak.

Bekatul merupakan salah satu hasil samping proses penggilingan padi yang berpotensi dimanfaatkan karena mengandung minyak bekatul sebanyak 10-13%. Minyak bekatul bermanfaat untuk menurunkan kadar kolesterol, antioksidan dan antibakteri. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk meningkatkan produksi minyak bekatul menggunakan metode fermentasi oleh *Rhizopus oryzae*.

Penelitian ini menggunakan pendekatan kuantitatif dan kualitatif. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang selama 5 bulan. Subyek dari penelitian adalah bekatul. Bekatul difermentasi *Rhizopus oryzae* dengan variasi suhu yaitu 25 °C, dan 37 °C dan variasi lama fermentasi yaitu 3, 5, dan 7 hari. Bekatul hasil fermentasi di ekstraksi menggunakan metode sokhlet dengan pelarut n-heksan dengan perbandingan bekatul dan pelarut (1:4). Minyak bekatul dianalisis randemen dan kadar FFA. Minyak bekatul yang dipilih dianalisis profil asam lemak menggunakan KG-SM. Analisa data melalui tiga tahap: reduksi data, penyajian data, dan penarikan kesimpulan.

Penelitian ini menghasilkan minyak bekatul terfermentasi dengan randemen terbaik sebesar 13,4% dan kadar FFA terbaik sebesar 6,91%. Kandungan asam lemak minyak bekatul yaitu asam palmitat, linoleat, dan asam oleat dengan jumlah masing-masing senyawa berturut-turut 38,12%; 22,66%; 39,21%.

ABSTRACT

Wahzudin, Muchammad Muchlis. 2020. **Effects of Temperature and Duration of Fermentation on Increased *Rhizopus oryzae* Fermented Rice Bran Oil**, Advisor I: Anik Maunatin S.T., M. P., Advisor II: Ahmad Abtokhi, M. Pd., Consultant: Akyunul Jannah, S.Si., M.P.

Keywords: Rice Bran Oil, Fermentation, *Rhizopus oryzae*, Fatty Acids, extraction.

Rice bran is one of the byproducts of rice milling process which is potentially exploited because it contains containing 10-13% rice bran oil. Rice bran oil is useful for reducing cholesterol, antioxidant and antibacterial levels. The purpose of this research was to increase the production of rice bran oil using the fermentation method by *Rhizopus oryzae*.

This research uses quantitative and qualitative approaches. The study was conducted at the Biochemical Laboratory of UIN Maulana Malik Ibrahim Malang for 5 months. The subject of the research is rice bran. Rice bran was fermented with temperature variations of 25 °C and 37 °C and fermentation time variations of 3, 5, and 7 days. The fermented rice bran was extracted using the soxhlet method with n-hexane using ratio of rice bran and solvent (1: 4). Rice bran oil was analyzed of yield and Free Fatty Acid (FFA). The selected rice bran oil was analyzed fatty acid profile using GC-MS. Analysis of data through three stages: data reduction, data presentation, and drawing conclusions.

This study showed that the highest fermented rice bran oil yield of 13.4% and non-fermentation of 10.22%. The best FFA levels of fermented rice bran oil where 6.91% and non-fermented oil was 10.57%. The content of bran oil fatty acids are palmitic acid, linoleic acid, and oleic acid with the number of each compound respectively 38.12%; 22.66%; 39.21%.

الملخص مستخلص

وحز الدين، محمد مخلص. ٢٠٢٠. أثر حرارة ومدة التخمير على ارتفاع زيت نخالة الأرز المتخمر بالرازية الرزية. المشرفة الأولى: أنيك مونتين، الماجستير، المشرف الثاني: أحمد أبطخي، الماجستير، المستشار: الدكتورة أكيونو الجنة، الماجستير.

الكلمات الرئيسية : نخالة الأرز، زيت نخالة الأرز، التخمير، الرازية الرزية، الاجتثاث، التعطين، الأحماض الدهنية.

نخالة الأرز هي إحدى المنتجات الإضافية من عملية الطحن للأرز وتحتل الاستفادة لأن تحتوي زيت نخالة الأرز قدر ١٠-١٣%. تفيد زيت نخالة الأرز تخفيض درجة الكولسترول، مضاد التأكسد ومضاد الجراثيم. أهداف هذا البحث هو أن يرتفع إنتاج زيت نخالة الأرز بطريقة التخمير بالرازية الرزية.

استخدم هذا البحث المدخل الكمي والكيفي. قام البحث بمعمل الكيمياء الحيوية لجامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج طول ٥ أشهر. فاعل لهذا البحث هو نخالة الأرز. كان تخمير نخالة الأرز بالرازية الرزية ويتعدد استخدام الحرارة هي ٢٥ درجة مئوية، و٣٧ درجة مئوية واستخدام المدة هي ٣، ٥، و٧ يوما. اجتثت نخالة الأرز بطريقة استخدام جهاز سوكسليت ون-هكسان حيث يكون مقدار المقارنة بينهما ١ (نخالة الأرز): ٤ (ن-هكسان). ويحلل زيت نخالة الأرز حسب نتيجة المقارنة بين المستخرج وذات الأصل ودرجة الأحماض الدهنية الحرة. ويحلل زيت نخالة الأرز المختار على صورة الأحماض الدهنية باستخدام الاستشراب الغازي - مطياف الكتلة. جرت عملية تحليل البيانات على الخطوات الثلاثة: تقليل البيانات، تقديم البيانات، والاستخلاص.

أنتج هذا البحث على زيت نخالة الأرز المتخمرة حسب أفضل المقارنة بين المستخرج وذات الأصل ١٣،٤% ودرجة الأحماض الدهنية الفضلى ٦،٩١%. وتحتوي الأحماض الدهنية لزيت نخالة الأرز على حمض البلمتيك، اللينوليك، والأوليغات مع عدد مركب كلها الثلاثة هو ٣٨،١٢%؛ ٢٢،٦٦%؛ ٣٩،٢١%.

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Meningkatnya produksi beras berdampak pada meningkatnya pula hasil samping dari proses produksi tersebut. Hasil samping dari proses produksi beras meliputi dedak dan bekatul. Dedak merupakan hasil samping penggilingan padi yang pertama yaitu bagian terluar dari padi. Sedangkan bekatul merupakan bagian lebih dalam yang secara fisik lebih halus dari pada dedak (Sukma, 2010). Menurut Utami (2009), bekatul yang dihasilkan dari proses penggilingan padi mencapai 8 – 12%.

Indonesia merupakan salah satu Negara penghasil beras yang cukup besar. Menurut Badan Pusat Statistik tahun 2017 produksi padi Indonesia mencapai 81,3 juta ton atau setara beras 47,29 juta ton. Penggilingan satu ton padi menghasilkan bekatul sebanyak 60 – 80 kg (Goffman, dkk., 2003). Sehingga berdasarkan data produksi padi tahun 2017 dapat dihasilkan bekatul sekitar 6.5 juta ton. Bekatul memiliki kandungan senyawa bioaktif yang berguna bagi pencegah penyakit degeneratif. Senyawa bioaktif yang banyak ditemukan dalam bekatul adalah antioksidan fenolik. Bekatul juga kaya akan vitamin B, diantaranya B1, B2, B3, B5, dan B6 serta tokoferol dan tokotrienol. Komponen bioaktif tersebut sangat berguna bagi kesehatan misalnya dapat menurunkan kandungan kolesterol dan sebagai sumber antioksidan (Zhang, dkk., 2010).

Selama ini bekatul hanya dimanfaatkan sebagai bahan tambahan dalam pakan ternak. Salah satu metode untuk menjadikan bekatul lebih mempunyai

banyak manfaat adalah dengan mengolah bekatul menjadi minyak. Produksi minyak dari bekatul dapat meningkatkan nilai ekonomi dalam sistem agroindustri padi di pedesaan (Hadipernata, 2007). Pengolahan bekatul menjadi minyak hanya dapat dilakukan oleh orang yang berfikir. Allah SWT telah menyinggung hal tersebut dalam Al-Qur'an surat Ali 'Imran ayat 191:

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ

Artinya :“(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”

Ayat tersebut menjelaskan bahwa semua yang ada di bumi ini merupakan ciptaan Allah dan semua yang diciptakan Nya tidak ada yang sia-sia. Semua itu hanya diketahui oleh orang-orang yang mau berfikir disetiap keadaan. Orang-orang yang terus berfikir dalam keadaan apapun akan dapat menemukan manfaat dari semua yang ada di langit dan di bumi. Salah satunya mengetahui manfaat dari limbah penggilingan padi yaitu bekatul.

Bekatul padi mengandung minyak, protein, karbohidrat, dan serat pangan, juga kaya dengan berbagai jenis senyawa fenolik (Feridoun, 2010). Menurut Most, dkk., (2005), bekatul mengandung minyak sekitar 20 – 30%. Minyak bekatul memiliki sifat yang luar biasa dibandingkan dengan minyak nabati lainnya (Fajriyati dan Pabbenteng, 2016). Minyak bekatul mengandung 20% asam lemak jenuh dan 80% asam lemak tak jenuh. Minyak bekatul mengandung asam oleat

36 – 38%, linoleat 35 – 38%, dan α -linoleat 1,8 – 2,4% yang merupakan asam lemak tak jenuh, serta asam palmitat 21 – 25% dan stearat 2,7 – 8,0% yang merupakan asam lemak jenuh (Gopala, 2006). Minyak bekatul mengandung senyawa fitokimia yang mempunyai aktivitas antioksidan alami, terutama $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ tokoferol dan tokotrienol, serta fraksi oryzanol (Xu, dkk., 2001).

Selain itu minyak bekatul juga mempunyai kemampuan untuk menurunkan kadar trigliserida dan kolesterol (Kahlon dan Chow, 1997). Penurunan kadar kolesterol disebabkan karenan banyaknya kandungan asam lemak tak jenuh dalam minyak bekatul. Asam lemak tak jenuh jenis jamak juga berperan penting dalam transpor dan metabolisme lemak, fungsi imun, mempertahankan fungsi dan integritas membran sel, mencegah penyakit jantung koroner dan artritis. Asam lemak tak jenuh asam alfa linolenat (omega-3) dianggap penting untuk memfungsikan otak dan retina secara baik (Sartika, 2008). Minyak bekatul juga dapat menurunkan kadar hiperlipidaemia (Kuriyan, dkk., 2005), penurunan LDL (*low density lipoprotein*) tanpa penurunan HDL (*high density lipoprotein*), pencegahan penyakit kardiovaskular, kanker, serta menghambat waktu menopause (Dewi, 2007).

Tahun 2015 – 2016 Indonesia hanya mampu memproduksi minyak bekatul sebanyak 0,15 ribu ton yang masih kecil jumlahnya jika dibandingkan dengan beberapa negara lain. Jumlah tersebut menunjukkan masih perlunya dikembangkan lagi metode-metode dalam memproduksi minyak bekatul (Yogita, 2017). Salah satu teknik pengambilan minyak bekatul (*rice bran oil*) yang pernah dilakukan yaitu menggunakan metode ekstraksi soxhlet. Penelitian Susanti (2012) mengatakan bahwa penggunaan metode soxhlet dengan pelarut n-heksana pada

suhu 68 °C menghasilkan randemen minyak bekatul yang paling banyak yaitu 14,94 % dibandingkan dengan pelarut lain meliputi etil asetat, metanol, dan etanol. Hasil tersebut lebih tinggi dari penelitian Iqbal (2016) yang menggunakan metode maserasi dengan pelarut n-heksana : metanol yang menghasilkan randemen sebesar 7,9 % dengan tiga kandungan asam lemak yaitu asam oleat, asam palmitate, asam linoleate (Iqbal, 2016).

Salah satu cara yang telah dilakukan untuk meningkatkan kandungan asam lemak tak jenuh dan randemen minyak bekatul yaitu menggunakan metode fermentasi (Sukma, 2010). Fermentasi merupakan metode yang memanfaatkan mikroorganisme untuk memecahkan senyawa organik menjadi senyawa sederhana (Pujaningsih, 2015) sehingga dapat meningkatkan randemen minyak bekatul dan memperbanyak kandungan asam lemak tak jenuh pada minyak bekatul. Mikroorganisme yang potensial digunakan pada proses fermentasi adalah jamur, karena jamur terlibat dalam penguraian selulosa dalam serat (Indrawati, 2005). Selain itu, jamur juga lebih mudah ditangani, dapat tumbuh pada kisaran pH yang rendah, dapat mendegradasi sumber karbon yang kompleks, dan dapat tumbuh cepat dalam limbah serta dapat menghasilkan berbagai asam lemak (Sahara, dkk., 2016).

Penelitian Sukma (2010), menggunakan metode fermentasi oleh kapang *Aspergillus terreus* dengan variasi inokulum 3, 5, dan 7 mL dan lama fermentasi 4, 6, dan 8 hari yang kemudian diekstraksinya menggunakan metode maserasi selama 24 jam menghasilkan randemen minyak bekatul sebanyak 16,140% pada variasi inokulum 3 mL dan lama inkubasi 6 hari. Jenis asam lemak yang diperoleh antara lain asam palmitat, asam oleat, asam linoleat, asam eikosenoat. Kapang lain

yang digunakan untuk meningkatkan kualitas dan kuantitas minyak bekatul adalah *Rhizopus oryzae*. Penelitian Sahara (2016) menggunakan kapang *Rhizopus oryzae* dengan metode ekstraksi maserasi didapatkan komposisi asam lemak tak jenuh antara lain asam palmitat, asam oleat, asam linoleat, asam eikosenoat, asam erukat dan asam arakhidonat. Penelitian Sahara (2016) menunjukkan bahwa kadar asam lemak tertinggi didapat pada volume inokulum 7 mL dan lama fermentasi 3 hari yaitu dengan kadar total 35,94% b/b. Hasil ini lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol dengan kadar total asam lemak tak jenuh 32,11% b/b.

Berdasarkan latar belakang di atas, untuk memaksimalkan hasil minyak bekatul dengan meminimalisir biaya produksi, penelitian ini dilakukan untuk mengembangkan penelitian sebelumnya yaitu mengekstraksi minyak bekatul menggunakan metode soxhletasi dengan fermentasi menggunakan *Rhizopus oryzae* dengan variasi suhu dan lama fermentasi.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang, dirumuskan beberapa permasalahan yaitu:

1. Bagaimana pengaruh suhu dan lama fermentasi terhadap rendemen dan kadar FFA minyak bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae* .?
2. Bagaimana profil asam lemak dari ekstrak bekatul terbaik hasil fermentasi oleh *Rhizopus oryzae* dengan variasi suhu dan lama fermentasi?

1.3. Tujuan

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui pengaruh suhu dan lama fermentasi terhadap rendemen dan kadar FFA minyak bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae*
2. Untuk mengetahui kandungan asam lemak dari ekstrak bekatul terbaik hasil fermentasi oleh *Rhizopus oryzae*.

1.4. Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian adalah:

1. Penelitian ini menggunakan variasi suhu fermentasi 25 °C, dan 37 °C variasi lama fermentasi 3, 5, dan 7 hari
2. Metode ekstraksi menggunakan metode sokhlet sedangkan penentuan kadar FFA menggunakan metode titrasi
3. Metode esterifikasi menggunakan metode Fischer dan analisis profil asam lemak menggunakan instrumen Kromatografi Gas-Spektrofotometer Masa (KG-SM)
4. Peningkatan minyak bekatul meliputi rendemen dan kadar FFA

1.5. Manfaat Penelitian

1. Mahasiswa dapat mengambil minyak dari bekatul
2. Masyarakat dapat mengetahui adanya kandungan minyak dalam bekatul
3. Masyarakat dapat mengetahui manfaat lain yang lebih banyak dari bekatul

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pemanfaatan Tanaman dalam Prespektif Islam

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

إِنَّ اللَّهَ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَىٰ يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَمُخْرِجُ الْمَيِّتِ مِنَ الْحَيِّ ذَٰلِكُمْ اللَّهُ فَالِقُ

تُؤَفِّكُونَ

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 A-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 manfaat yang diharapkan dari tumbuhan adalah dapat digunakan sebagai obat. Padi merupakan tumbuhan berbutir yang diciptakan Allah yang memiliki banyak manfaat. Tidak hanya butir buahnya, limbah dari butir padi juga mempunyai banyak manfaat salah satunya jika diolah menjadi minyak. Minyak dari bekatul mampu menurunkan kadar kolesterol, anti kanker, dan anti diabetes.

Pemanfaatan bahan alam menjadi obat akhir-akhir ini meningkat. Bahkan beberapa bahan alami telah diproduksi dalam skala besar. Hal ini dikarenakan obat tradisional lebih efektif dan memiliki efek samping yang lebih sedikit

dibanding dengan obat-obatan bahan kimia. Akan tetapi pemanfaatan bahan alam menjadi obat hanya dapat dilakukan oleh orang yang berakal. Sebagai mana firman Allah SWT dalam Q.S Al-imran ayat 190:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَأَخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِأُولِي الْأَلْبَابِ

Artinya: “*sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan pergantian malam dan siang, terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang berakal*”.

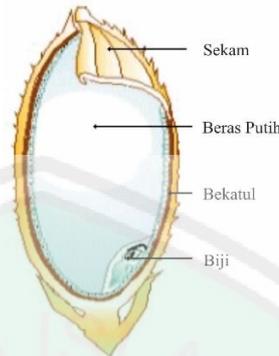
Menurut tafsir AL-Maraghi (1986), mendefinisikan orang-orang yang berakal yaitu orang yang mau menggunakan pikirannya, mengambil faedah, hidayah, dan menggambarkan keagungan Allah. Sebagai manusia yang berakal, merupakan bentuk petunjuk bagi manusia untuk terus mengkaji segala ciptaan Nya. Salah satunya dengan melakukan penelitian untuk mengetahui manfaat minyak bekatul.

2.2. Bekatul

Bekatul merupakan salah satu hasil samping dari proses penggilingan padi selain dedak. Dedak merupakan bagian terluar dari padi, sedangkan bekatul merupakan bagian lebih dalam, sehingga secara fisik bekatul lebih halus daripada dedak (Sukma, 2010). Bekatul merupakan lapisan yang menyelimuti endosperma beras yang akan terpisah akibat penggilingan (Astawan, 2009).

Menurut Badan Pusat Statistik tahun 2017 produksi padi Indonesia mencapai 81,3 juta ton atau setara beras 47,29 juta ton. Penggilingan satu ton padi menghasilkan bekatul sebanyak 60 – 80 kg (Goffman, dkk., 2003). Sehingga

berdasarkan data produksi padi tahun 2017 dapat dihasilkan bekatul sekitar 6.5 juta ton. Bagian-bagian padi dapat dilihat pada Gambar 2.1



Gambar 2.1 Bagian-bagian biji padi (BB Pascapanen, 2007)

Secara morfologi bekatul terdiri atas lapisan pericarp, testa dan lapisan *aleurone*. Lapisan-lapisan ini mengandung sejumlah nutrisi seperti protein, lemak dan serat pangan serta sejumlah vitamin dan mineral (Tabel 2.1). Jenis serat pangan terdiri atas selulosa, hemiselulosa, pektin, arabinosilan, lignin, dan β -glukan (Tuarita, dkk., 2017). Bekatul mengandung karbohidrat sekitar 51 – 55 g/100 g dan protein sekitar 11 – 13 g/100 g. Selain itu bekatul juga mengandung mineral antara lain kalsium sebesar 500 – 700 mg/100 g, magnesium 1.000 – 2.200 mg/100 g (Astawan, 2009). Menurut Issara dan Rawdkuen, (2016), nilai gizi bekatul yaitu protein 14,1 – 18,2%, Lemak 1,6 – 20,9%, karbohidrat 43,5 – 54,3%, abu 12,8 – 15,3%, dan serat kasar 8,4 – 10,5%. Berdasarkan penelitian Chen dan Bergman (2005), bekatul mengandung komponen bioaktif seperti tokoferol, tokotrienol, dan oryzanol. Menurut Most, dkk., (2005), bekatul mengandung minyak yang cukup tinggi sekitar 20-30%. Menurut Suprijana (2002), bekatul mempunyai kandungan minyak bervariasi antara 12-15% tergantung dari varietas padi dan tingkat penyongsohan.

Bekatul biasanya hanya digunakan sebagai komponen pakan ternak dan unggas (Suprijana, 1997), di samping sebagai pakan ternak sebenarnya bekatul padi mempunyai beberapa kegunaan lain. Bekatul mempunyai kemampuan untuk menurunkan kadar trigliserida (sifat hipolipemik) dan kolesterol (sifat hipokolesterolemik) darah (Kahlon dan Chow, 1997). Bekatul mengandung lemak tak jenuh yang tinggi sehingga aman dikonsumsi oleh para penderita kolesterol dan penyakit jantung. Oleh karena itu bekatul dapat dimanfaatkan sebagai suplemen pangan untuk meningkatkan kesehatan manusia (Cahyanine, dkk., 2008; Ovani, 2013).

Tabel 2.1. Komposisi Nutrisi Bekatul (*edible grade*)

Nutrien	Kandungan (per 100 g)	Nutrien	Kandungan (per 100 g)
Analisis Proksimat		Vitamin	
Protein	16,5 g	Biotin	5,5 mg
Lemak	21,3 g	Kolin	226 mg
Mineral	8,3 g	Asam folat	83 µg
Total		Inositol	982 mg
karbohidrat	49,4 g	Mineral	
kompleks		Besi (Fe)	11,0 mg
Serat kasar	11,4 g	Seng (Zn)	6,4 mg
Serat pangan	25,3 g	Mangan (Mg)	28,6 mg
Serat larut air	2,1 g	Iodin	67 µg
Pati	24,1 g	Kalsium (Ca)	80 mg
Gula sederhana	5,0 g	Fosfor (P)	2,1 g
Tembaga (Cu)	0,6 mg	Kalium (K)	1,9 g
Vitamin		Natrium (Na)	20,3 g
Tiamin (B1)	3,0 mg	Magnesium (Mg)	0,9 g
Riboflavin (B2)	0,4 mg		
Niasin (B3)	43 mg		
Asam pantotenat (B5)	7 mg		
Piridoksin (B6)	0,49 mg		

Sumber: Rao, (2000)

2.3. Minyak Bekatul

Minyak bekatul atau lebih dikenal dengan *Rice Bran Oil* (RBO) merupakan minyak hasil ekstraksi bekatul. Minyak bekatul dapat diperoleh melalui ekstraksi dengan beberapa pelarut organik seperti heksan (*food grade*) (Diana, dkk., 2012). Komponen utama dari minyak bekatul adalah triasilgliserol berjumlah sekitar 80% dari minyak kasar bekatul dan tiga asam lemak utama yang terdiri dari palmitat, oleat dan linoleat dengan kisaran kandungan asam lemak berturut-turut adalah 12 – 18%, 40 – 50%, dan 20 – 42% (Luh, dkk., 1991). Minyak bekatul juga mengandung antioksidan alami seperti tokoferol, tokotrienol, dan γ -oryzanol (Diana, dkk., 2012). Komposisi kimia minyak bekatul dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Table 2.2 Komposisi minyak bekatul

Komposisi	% (b/b)
Triasilgliserol	80,5
Asam Lemak Bebas	6,8
Diasilgliserol	4,8
Monoasilgliserol	1,7
Oryzanol	2,0
Phosphat	1,3
Lilin	2,9

Sumber: Yogita, dkk. (2017)

Minyak bekatul yang baru diekstrak biasanya berwarna hijau kecoklatan dan berbau khas minyak bekatul. Minyak bekatul memiliki aroma dan tampilan yang baik serta nilai titik asapnya cukup tinggi (254 °C). Nilai titik asap tersebut merupakan yang paling tinggi dibandingkan minyak nabati lainnya, maka minyak

bekatul merupakan minyak goreng terbaik dibanding minyak kelapa, minyak sawit maupun minyak jagung (Hadipernata, 2006). Menurut Mardiah, dkk., (2006), sifat fisika-kimia minyak bekatul dapat dilihat pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Sifat fisika-kimia minyak bekatul

No	Parameter	Nilai
1.	Viskositas (25°C)	64,08
2.	Indeks Bias (25°C)	1,46 – 1,47
3.	FFA (%) asam oleat	2,97
4.	Bilangan Asam (mg NaOH/g minyak)	5,91
5.	Bilangan Iod (g/100 g minyak)	99,8
6.	Titik Nyala	>250 °C
7.	SFA	19,0
	MUFA	42,06
	PUFA	38,96
8.	Gamma oryzanol (mg/100 g minyak)	174,67

Sumber: Kupongsak, dkk. (2013)

Minyak bekatul sangat bermanfaat bagi kesehatan diantaranya sebagai anti oksidan (Rana, dkk., 2004), dan penurunan kolesterol dalam darah (Kahlon, dkk., 1996). Menurut Rukmini (1986), penelitian pada tikus menunjukkan bahwa minyak bekatul dapat menurunkan kadar kolesterol total, lipoprotein berkerapatan rendah (LDL), dan lipoprotein berkerapatan sangat rendah (VLDL). Penelitian sukma (2010), komposisi asam lemak yang terkandung dalam minyak bekatul terfermentasi meliputi asam linoleat 44,89%, asam oleat 15,22%, asam stearat 2,38%, asam eikosenoat 1,81%, dan asam palmitat 27,24%. Hasil tersebut lebih baik dibandingkan penelitian Krishna (2006) yang menyatakan kandungan asam

lemak dalam minyak bekatul hanya asam oleat, linoleat, asam palmitat dan stearat. Komposisi asam lemak minyak bekatul dapat dilihat pada Tabel 2.4.

Tabel 2.4 Komposisi asam lemak pada minyak bekatul padi

Jenis asam lemak	Komposisi (% berat)
Asam Palmitat C16:0	27,24
Asam Stearat C18:0	2,38
Asam Oleat C18:1	15,22
Asam Linoleat C18:2	44,89
Asam Eikosenoat C20:1	1,81

Sumber: Sukma (2010)

2.4. Fermentasi

Fermentasi merupakan suatu proses pemecahan senyawa organik menjadi senyawa sederhana yang melibatkan mikroba (Pujaningsih, 2005). Fermentasi adalah suatu reaksi oksidasi reduksi di dalam sistem biologi yang menghasilkan energi dan sebagai donor dan akseptor elektron menggunakan senyawa organik. Senyawa organik yang biasa digunakan adalah karbohidrat dalam bentuk glukosa. Pada fermentasi senyawa tersebut akan diubah oleh reaksi reduksi dengan katalis enzim menjadi suatu bentuk lain misalnya aldehyd dan dioksidasi menjadi asam. (Winarno, dkk., 1986).

Proses fermentasi terhadap bahan pangan menghasilkan beberapa keuntungan diantaranya meningkatkan mutu bahan pangan tersebut baik dari aspek gizi maupun daya cernanya, selain itu juga meningkatkan daya simpannya (Buckle, dkk., 1987). Hal yang perlu diperhatikan untuk memperoleh hasil fermentasi yang baik yaitu kondisi fermentasi yang optimum. Kondisi yang kurang cocok bagi perkembangan mikroba akan menghambat proses fermentasi

dan juga merangsang tumbuhnya mikroba lain yang tidak dikehendaki (Winarno, 1993).

Faktor-faktor yang harus diperhatikan dalam proses fermentasi antara lain air, suhu, pH, fermentor, susunan bahan dasar dan bahan yang bersifat mendukung (Rahayu dan Sudarmaji, 1989). Menurut Judoamidjojo, dkk., (1989) yang terpenting dalam proses fermentasi adalah bahan baku dan bahan pembantu yang disebut medium atau substrat. Fungsi substrat antara lain adalah sebagai sumber energi, bahan pembentuk sel, dan sebagai produk metabolisme. Medium fermentasi harus bisa menyediakan semua nutrisi pembentuk sel dan biosintesa produk-produk metabolisme.

Keberhasilan fermentasi ditentukan oleh beberapa faktor yaitu:

1. Lama Fermentasi

Waktu yang dibutuhkan dalam proses fermentasi

2. Konsentrasi Inokulum

Konsentrasi inokulum sangat mempengaruhi efektivitas 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 lingkungan.

4. Suhu

Suhu selama proses fermentasi sangat menentukan jenis mikroorganisme dominan yang akan tumbuh. Umumnya diperlukan suhu 30 °C untuk pertumbuhan mikroorganisme. Fermentasi dengan menggunakan variasi suhu akan menunjukkan terjadinya tingkat fermentasi maksimum pada suhu tertentu. Hal ini bergantung pada jenis mikroba yang digunakan pada saat fermentasi.

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

2.4.1. Fermentasi Bekatul untuk Peningkatan Minyak Bekatul

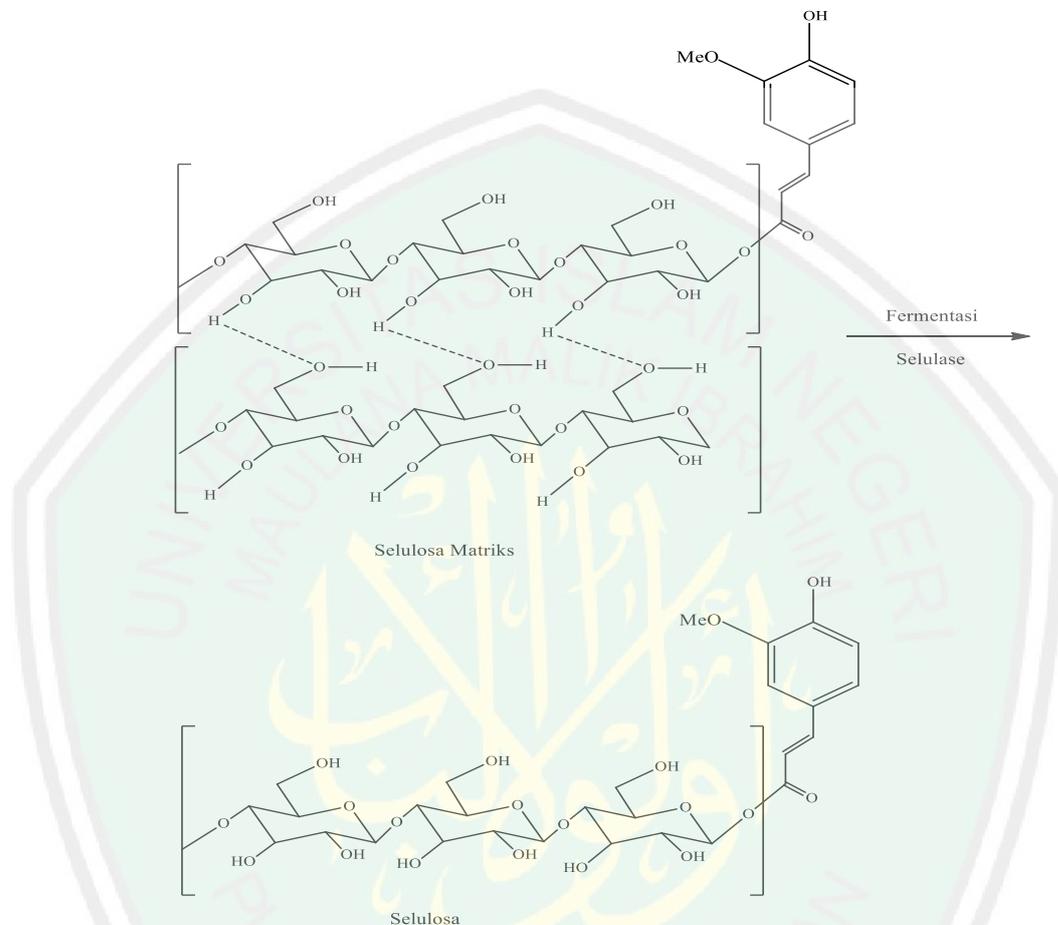
Banyak mikroba yang dapat digunakan sebagai inokulum dalam proses fermentasi bekatul, salah satunya adalah kapang. Di samping dapat meningkatkan pencernaan nutrisi, fermentasi bekatul dengan menggunakan kapang dapat pula meningkatkan kandungan asam lemak tak jenuh pada bekatul (Yosi, dkk., 2014). Hal ini seperti yang dilaporkan oleh Jang, dkk., (2003) bahwa bekatul yang difermentasi dengan kapang *Mortierella alpine* mengandung banyak asam lemak tak jenuh. Kandungan asam lemak tak jenuh pada minyak bekatul hasil proses fermentasi juga umumnya lebih tinggi dibandingkan yang tidak melalui proses fermentasi. Hal ini diduga karena adanya kemampuan kapang untuk mengakumulasi lipid (Sukma, dkk, 2010). Ratledge dan Waynn (2002)

menyatakan bahwa akumulasi lipid yang demikian dapat terjadi pada saat nitrogen kecuali karbon yang terkandung di dalam substrat telah habis digunakan untuk pertumbuhan kapang, kemudian karbon yang berlebih dikonversi menjadi triasilgiserida.

Penelitian Sukma (2010) melaporkan bekatul terfermentasi menggunakan kapang jenis *Aspergillus terreus* dengan variasi volume inokulum yaitu 3 mL, 5 mL, dan 7 mL, dan lama fermentasi 4, 6, dan 8 hari menghasilkan randemen paling banyak 16,14% (b/b) dengan terdapat 5 jenis asam lemak yaitu asam linoleat 44,89%, asam oleat 15,22%, asam stearat 2,38%, asam eikosanoat 1,81%, asam eikosenoat 1,68%, dan asam palmitat 27,24% pada variasi inokulum 3 mL dan lama fermentasi 6 hari. Hal ini diakibatkan karena semakin banyak inokulum semakin banyak pula nutrisi yang dibutuhkan, ketika nutrisi tidak tercukupi maka kapang tidak dapat memperbanyak selnya sehingga aktivitas metabolismenya terhambat dan kapang banyak mengalami kematian (Sukma, 2010).

Jenis kapang lain yang juga berpotensi untuk fermentasi adalah kapang *Rhizopus oryzae*. *Rhizopus oryzae* mengandung enzim selulase yang mampu membuka atau menghidrolisis serat selulosa menjadi rantai oligosakarida yang lebih sederhana, sehingga ikatan senyawa bioaktif seperti minyak yang terikat diantara selulosa akan lemah dan mudah terlepas. Selulosa ditemukan sebagai dinding sel tumbuhan, tidak larut dalam air, ditemukan banyak pada batang, dahan, tangkai, daun, dan hampir semua jaringan tumbuhan. Selulosa dilapisi oleh polimer yang sebagian besar terdiri dari xilan dan lignin. Jika xilan dan lignin dihilangkan selulosa dapat didegradasi oleh selulase dari *Rhizopus oryzae* untuk menghasilkan selobiosa dan glukosa (Bayer, dkk., 1994)

Dugaan reaksi yang terjadi pada saat pembukaan atau pemutusan matriks serat pada saat fermentasi dengan bantuan enzim selulase ditunjukkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Reaksi pembukaan matriks serat (Amalia, 2016)

Hasil penelitian Sahara (2016) menggunakan *Rhizopus oryzae* untuk proses fermentasi yang menggunakan variasi volume inokulum 3, 5, 7 mL dan lama fermentasi 3, 6, 9 hari melaporkan bahwa randemen terbanyak didapat pada variasi volume 7 mL dan lama fermentasi 3 hari yaitu 35,94% dengan 2 penambahan jenis asam lemak tak jenuh yaitu asam erukat dan asam arakhidonat.

Pribadi (2005), menyatakan bahwa kondisi baik lingkungan maupun sistem sangat mempengaruhi hasil fermentasi. Kondisi yang kurang cocok bagi

perkembangbiakan mikroba akan menghambat fermentasi dan merangsang tumbuhnya mikroba lain yang tidak diharapkan untuk tumbuh. Faktor faktor yang mempengaruhi antara lain suhu fermentasi, pH media, kecukupan air, oksigen, nutrien untuk tumbuhnya mikroorganisme dan lama fermentasi (Fardiaz, 1992).

Suhu mempengaruhi efisiensi konversi media menjadi massa sel, yaitu konversi maksimum dicapai pada suhu sedikit dibawah suhu optimal pertumbuhan kapang (Wang, dkk., 2007). Ennie dan Hasibuan (1986) menyatakan bahwa kapang termasuk golongan mesofilik yang dapat tumbuh pada suhu 25 – 45 °C dan tumbuh baik pada suhu 30 – 37 °C. Hasil penelitian Hikmah (2018), melaporkan suhu optimum pada jamur *Ryzopus oryzae* yaitu pada suhu 37 °C ditandai dengan tingginya aktifitas antibakteri pada ekstrak bekatul terfermentasi.

Waktu inkubasi atau lama fermentasi juga erat hubungannya dengan kesempatan mikroorganisme untuk memanfaatkan nutrisi yang tersedia pada substrat, serta efektivitas sistem metabolisme mikroorganisme dalam memanfaatkan nutrisi tersebut (Sukma, 2016). Menurut Nawangsari (1996), waktu inkubasi terbaik pada fermentasi menggunakan kapang yaitu pada fase stasioner. Karena pada saat fase stasioner produksi lipid meningkat. Waktu fermentasi mempengaruhi hasil fermentasi karena berhubungan dengan laju pertumbuhan mikroba. Setiap mikroba memiliki laju pertumbuhan optimal yang berbeda-beda (Nurul, 2010). Penelitian Sukma (2016), melaporkan bahwa lama fermentasi 6 hari menggunakan kapang *Ryzopus oryzae* menghasilkan asam lemak tak jenuh lebih tinggi disbanding lama fermentasi 4 hari dan 8 hari. Hal ini disebabkan karena aktivitas enzim yang dihasilkan oleh kapang. Diduga pada hari ke enam inkubasi kapang telah mengalami fase stasioner.

2.5. *Rhizopus Oryzae*

Kapang genus *Rhizopus oryzae* adalah kapang yang sering digunakan untuk pembuatan tempe ataupun oncom. *Rhizopus oryzae* memiliki karakteristik, yaitu miselium berwarna putih, ketika dewasa miselia putih akan tertutup oleh sporangium yang berwarna abu-abu kecokelatan (Rahmi, 2008). Menurut Germain (2006), klasifikasi *Rhizopus oryzae* sebagai berikut:

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

Rhizopus oryzae ini bersifat heterolitik, yaitu reproduksinya dapat berupa seksual dengan membentuk zigospora, oospora atau aseksual dengan membentuk sporangiospor dan kadang dengan kondisi konidia, habitat alamiahnya di air, tanah dan hewan. Kapang ini mampu menghasilkan enzim proteolitik, urease dan lipase. 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 saprofit.

Rhizopus oryzae merupakan salah satu jenis kapang yang sering dimanfaatkan dalam bidang farmasi sebagai antibiotik. *Rhizopus oryzae* merupakan kapang penghasil enzim selulase. Enzim selulase merupakan enzim yang memegang peranan penting dalam proses biokonversi limbah-limbah

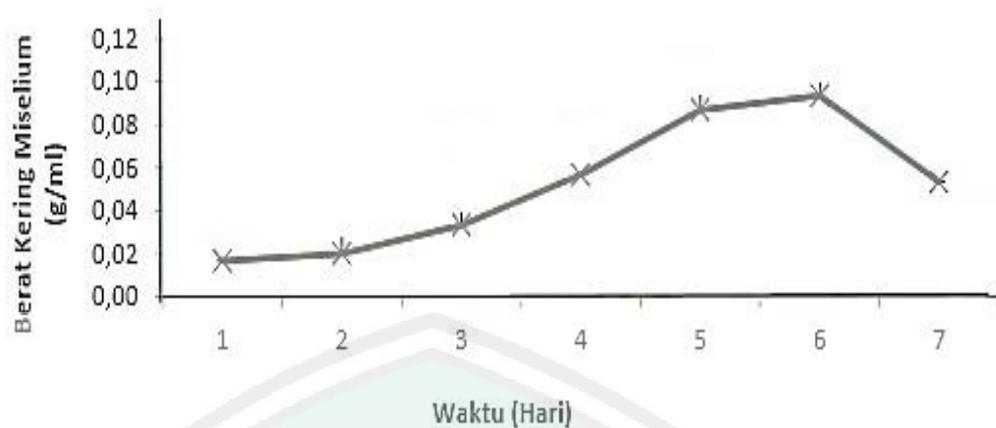
organik berselulosa menjadi glukosa (Chalal, 1983). Pembentukan glukosa secara enzimatis sesuai dengan reaksi katalitik sebagai berikut:



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

Pemilihan *Rhizopus oryzae* sebagai penghasil enzim selulase memiliki keuntungan yaitu, kebutuhan air jamur lebih sedikit dibandingkan dengan bakteri (Krishna, 2005). sehingga randemen yang dihasilkan tidak terlalu banyak yang ikut terbuang dengan air. Selain itu enzim selulase mampu membuka atau menghidrolisis serat selulosa menjadi rantai oligosakarida yang lebih sederhana, sehingga ikatan bioaktif yang terikat diantara selulosa akan lemah dan mudah terlepas.

Menurut Kuswanto dan Slamet (1989), suhu optimal untuk pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae* adalah 35 °C dan maksimal pertumbuhan pada suhu 44 °C. Menurut Sorenson (1986), *Rhizopus oryzae* tumbuh baik pada kisaran pH 4, 5, dan 6. Sedangkan untuk Kurva pertumbuhan jamur *Rhizopus oryzae* dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Kurva Pertumbuhan Jamur *Rizhopus oryzae* (Fikriyah, 2018)

Kurva 2.3 menyebutkan bahwa fase pertumbuhan jamur *Rizhopus oryzae* diantaranya adalah fase adaptasi (lag) berada pada masa inkubasi 0 – 2 hari, fase logaritmik (eksponensial) pada masa inkubasi 2-4 hari, fase stasioner berada pada masa inkubasi 4 – 6 hari, dan fase kematian dipercepat pada masa inkubasi diatas 6 hari.

2.6. Ekstraksi Minyak Bekatul Metode Soxhlet

Metode ekstraksi soxhlet adalah metode ekstraksi dengan prinsip pemanasan dan perendaman sampel. Hal itu menyebabkan terjadinya pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel. Dengan demikian, metabolit sekunder yang ada di dalam sitoplasma akan terlarut ke dalam pelarut organik. Larutan itu kemudian akan menguap ke atas dan melewati pendingin udara yang akan mengembunkan uap tersebut menjadi tetesan yang akan terkumpul kembali. Bila larutan melewati batas lubang pipa samping soxhlet, maka akan terjadi sirkulasi. Sirkulasi yang berulang itulah yang menghasilkan ekstrak yang baik (Departemen Kesehatan RI, 2006).

Menurut Vogel (1984) bahwa ekstraksi dengan menggunakan pelarut merupakan proses pemisahan komponen zat terlarut berdasarkan sifat distribusinya dalam dua pelarut yang tidak saling melarut. Dengan memanfaatkan perbedaan kelarutannya senyawa yang diinginkan dapat dipisahkan secara selektif. Beberapa faktor yang mempengaruhi proses ekstraksi yaitu perbedaan metode, pelarut, suhu, serta waktu ekstraksi akan berpengaruh terhadap jumlah rendemen serta kualitas ekstrak yang didapatkan. Menggunakan metode, pelarut serta waktu yang sesuai akan menghasilkan rendemen serta kualitas ekstrak yang maksimal (Xiao, dkk., 2010).

Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan ekstraksi adalah pemilihan pelarut. Pemilihan pelarut yang paling sesuai untuk ekstraksi minyak atau lemak adalah berdasarkan tingkat kepolarannya. Pemilihan pelarut pada umumnya dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain: selektivitas, titik didih pelarut, pelarut tidak larut dalam air, pelarut bersifat inert sehingga tidak bereaksi dengan komponen lain, harga pelarut semurah mungkin, pelarut mudah terbakar (Guenther, 1987, dalam Ari dkk, 2012). Pada dasarnya suatu bahan akan mudah larut dalam pelarut yang sama polaritasnya. Karena polaritas lemak berbeda-beda maka tidak ada bahan pelarut umum untuk semua jenis lemak. Lipid merupakan senyawa organik yang tidak larut dalam air, tetapi larut pada pelarut organik non polar, seperti aseton, alkohol, eter, benzena, kloroform dan sebagainya (Nilasari dalam Sri, 2013).

Ekstraksi dengan alat soxhlet merupakan cara ekstraksi yang efisien dan efektif untuk menentukan kadar minyak atau lemak suatu bahan, karena pelarut yang digunakan dapat diperoleh kembali dan waktu yang digunakan untuk

ekstraksi relatif singkat. Proses ekstraksi dipengaruhi oleh metode, pelarut, suhu, serta waktu ekstraksi yang akan berpengaruh terhadap konsentrasi serta kualitas ekstrak minyak yang dihasilkan. Alat soxhlet adalah suatu alat terbuat dari gelas yang bekerja secara kontinyu dalam penyari. Adanya pemanasan menyebabkan pelarut ke atas lalu setelah di atas akan diembunkan oleh pendingin udara menjadi tetesan-tetesan yang akan terkumpul kembali dan bila melewati batas lubang pipa samping soxhlet, maka akan terjadi sirkulasi yang berulang-ulang akan menghasilkan penyarian yang baik (Harbone,1987).

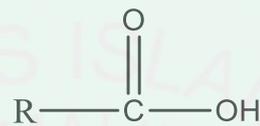


Gambar 2.4 Rangkaian Ekstraktor Soxhlet (Purwanto, dkk. 2014)

2.7. Asam Lemak

Asam lemak merupakan asam organik berantai panjang yang mempunyai 4 – 24 atom dengan pembagian antara lain asam lemak rantai pendek (2 – 4 atom karbon), rantai medium (6 – 12 atom karbon), dan rantai panjang (>12 atom karbon). Semua lemak bahan pangan hewani dan sebagian besar minyak nabati mengandung asam lemak rantai panjang (Sartika, 2008). Asam lemak memiliki

gugus karboksil tunggal dan ujung hidrokarbon non-polar yang panjang. Sehingga hampir semua lipid tidak larut dalam air. Poedjiadi (1994) menyatakan bahwa asam lemak merupakan asam organik yang terdapat dalam bentuk ester trigliserida atau lemak. Asam ini adalah asam karboksilat yang mempunyai rantai karbon panjang dengan rumus umum seperti yang terlihat pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Struktur umum Asam Lemak. Poedjiadi, (1994)

Berdasarkan atom hidrogen yang berikatan dengan atom karbon, asam lemak dibedakan menjadi dua (Poedjiadi, 1994) :

1. Asam lemak jenuh

Merupakan asam lemak dimana dua atom hidrogen terikat pada satu atom karbon. Dikatakan jenuh karena atom karbon telah mengikat hidrogen secara maksimal. Efek dominan dari asam lemak jenuh adalah peningkatan kadar kolesterol total dan kolesterol LDL. Namun, hal tersebut tergantung dari jenis bahan makanan. Minyak kelapa banyak mengandung asam lemak jenuh (palmitat), tetapi jenis ini tidak menyebabkan peningkatan kadar kolesterol darah. Hasil penelitian menyebutkan bahwa asupan asam lemak jenuh rantai panjang menyebabkan peningkatan kolesterol darah yang berbeda daripada asam lemak jenuh rantai medium (De, 2001).

2. Asam lemak tak jenuh

Merupakan asam lemak yang memiliki ikatan rangkap. Atom karbon belum mengikat atom hidrogen secara maksimal. Asam lemak tak jenuh terbagi menjadi dua yaitu asam lemak tak jenuh tunggal (MUFA), dan asam lemak tak jenuh Jamak (PUFA). Salah satu contoh MUFA yaitu asam oleat yang Asam lemak tak jenuh efektif untuk menurunkan kadar kolesterol darah. Sedangkan yang termasuk PUFA antara lain asam linoleat, linolenat dan arakhidonat yang berperan penting dalam transpor dan metabolisme lemak, fungsi imun, mempertahankan fungsi dan integritas membran sel (Mayes, 2003).

Konsumsi lemak total maksimal perhari yang dianjurkan adalah 30 % dari energi total, yang meliputi 10 % asam lemak jenuh, 10 % asam lemak tak jenuh tunggal, dan 10 % asam lemak tak jenuh jamak (Lichtenstein, 2006). Minyak bekatul mempunyai kandungan asam lemak jenuh lebih sedikit dan asam lemak tak jenuh lebih banyak dibandingkan dengan minyak nabati lain. Kadar asam lemak dari berbagai minyak nabati ditunjukkan pada Tabel 2.5

Tabel 2.5 Kadar Asam Lemak Minyak Nabati

Minyak	Asam Lemak Jenuh (%)	Asam Lemak Tak Jenuh Tunggal (%)	Asam Lemak Tak Jenuh Jamak (%)
Sawit	50	40	10
Jagung	13	23	59
Kelapa	92	6	2
Bekatul	22	43	35

Sumber: Yogita (2017)

2.8. Asam Lemak Bebas

Asam lemak bebas adalah asam lemak yang berada sebagai asam bebas tidak terikat sebagai trigliserida. Asam lemak bebas dihasilkan oleh proses

hidrolisis dan oksidasi. Reaksi ini akan dipercepat dengan adanya faktor faktor panas air, keasaman, dan katalis (enzim). Semakin lama reaksi ini berlangsung, maka semakin banyak kadar ALB yang terbentuk (Ketaren, 1986). Semakin tinggi kandungan asam lemak bebas dalam minyak, maka menunjukkan bahwa semakin tinggi pula kerusakan yang dialami oleh minyak (Herwanda., 2011).

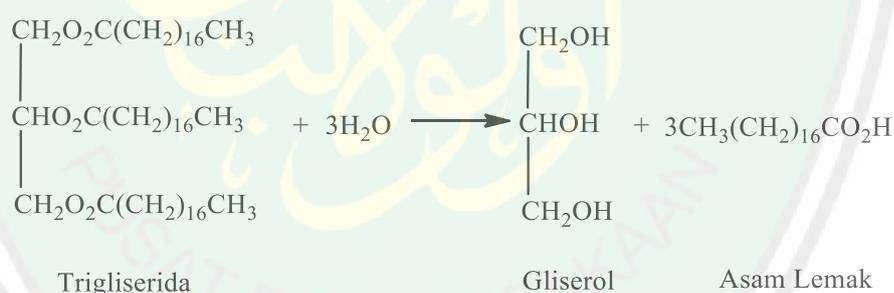
Beberapa variabel proses yang sangat berpengaruh terhadap perolehan asam lemak seperti pengaruh suhu, kematangan buah, pelukaan buah, pengadukan, penambahan air dan lama penyimpanan. Selain itu proses esterifikasi juga mempengaruhi kadar asam lemak bebas minyak bekatul (Kupongsak, 2013). Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh bahwa kadar asam lemak bebas yang paling tinggi terdapat pada suhu kamar (25 °C – 27 °C). Enzim lipase sudah tidak aktif pada suhu pendinginan 8 °C dan pada suhu pemanasan 50 °C (Marlina, dkk., 2017).

Kupongsak, (2013) menyatakan kadar asam lemak bebas minyak bekatul sebesar 2,97%. Sedangkan Mingyai (2017), yang mengekstrak minyak bekatul menggunakan metode ekstraksi pelarut dengan pelarut n-heksan memperoleh minyak bekatul dengan kadar Asam Lemak Bebas sebesar 5.83%. Suryati (2015), mengekstrak minyak bekatul menggunakan metode soxhlet selama 4 jam dengan pelarut n-heksan pada suhu 60 °C memperoleh minyak bekatul dengan kadar FFA sebesar 6,8%. Adigarha (2012), yang mengoptimisasi produk minyak bekatul menggunakan metode fermentasi oleh *Aspergillus niger* dengan waktu inkubasi selama 8 hari memperoleh minyak bekatul terfermentasi dengan kadar FFA sebesar 20,2%. Pusat penelitian dan pengembangan pertanian Bogor tahun 2005 menyatakan standar baku mutu minyak bekatul pada kadar FFA yaitu 1,4-1,47%.

Sedangkan kadar FFA untuk minyak goreng berdasarkan SN101-3555-1998 adalah 0.3%.

2.9. Hidrolisis Lemak

Hasanah (2003), menyatakan bahwa asam lemak dapat diperoleh dari hidrolisis lemak/minyak sampel yang dilakukan dengan penambahan NaOH 2M, metanol, dan NaCl yang selanjutnya dipisahkan padatan sabunya dan dinetralkan dengan menggunakan HCl 1M hingga pH 1. Kemudian diekstrak kembali dengan menggunakan n-heksana dan diambil filtratnya. Selanjutnya ditambahkan dengan Na₂SO₄ anhidrat serta diuapkan pelarutnya sehingga didapatkan asam lemak dari sampel. Reaksi pada proses hidrolisis dapat dilihat pada Gambar 2.6.



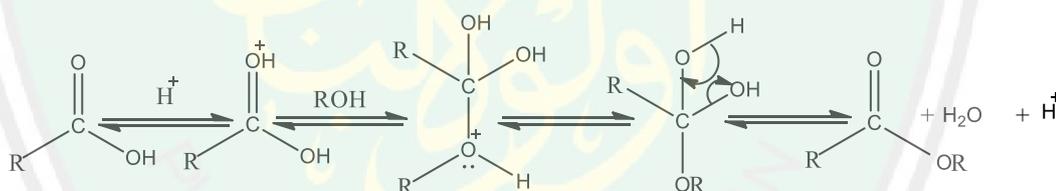
Gambar 2.6 Reaksi Hidrolisis minyak

Menurut (Fasya, 2011) dalam penelitiannya menyatakan bahwa isolasi/hidrolisis minyak menjadi asam lemak dapat dilakukan dengan menggunakan katalis basa KOH 12 % dengan pelarut metanol disertai penambahan H₂SO₄ 1M hingga pH = 1 untuk membentuk asam lemak. Randemen yang didapatkan cukup tinggi, yaitu sebesar 75,01%.

2.10 Esterifikasi Asam Lemak

Ester adalah salah satu senyawa organik yang sangat bermanfaat, dapat dirubah menjadi aneka senyawa lain. Menurut Nimitz (1991) ester dapat dibuat dengan cara mereaksikan alkohol dengan turunan asam karboksilat yang lebih reaktif seperti anhidrida asam atau klorida asam. Reaksi esterifikasi tersebut dikenal sebagai esterifikasi Fischer dengan bantuan katalis asam (Carey, 2000). Katalis asam berperan sebagai sumber proton, sehingga terjadi protonasi atom oksigen pada gugus karbonil dan membentuk karbokation yang menyebabkan kerapatan elektron pada gugus karbonil semakin berkurang (Matsjeh, 1993).

Asam karboksilat, alkohol, dan katalis asam biasanya (HCl atau H₂SO₄), dipanaskan terdapat keseimbangan dengan ester dan air. Mekanisme reaksi esterifikasi dengan menggunakan katalis asam ditunjukkan pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Mekanisme reaksi esterifikasi dengan menggunakan katalis asam (Widiyarti dan Hanafi, 2010)

Salah satu faktor penting pada reaksi esterifikasi ialah waktu reaksi, semakin lama waktu reaksi maka kemungkinan kontak antar zat semakin besar sehingga akan menghasilkan konversi terhadap produk yang besar. Berdasarkan penelitian Hikmah dan Zuliyana (2010) diperoleh rendemen tertinggi pada waktu 60 menit yaitu sebesar 44,87 % dengan melakukan esterifikasi terhadap minyak dengan mereaksikan minyak dan metanol menggunakan katalis H₂SO₄ pada

waktu 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, dan 120 menit.

2.11. Kromatografi Gas- Spektrofotometri Masa (KG-SM)

Kromatografi merupakan suatu metode yang digunakan untuk memisahkan campuran komponen berdasarkan distribusi komponen tersebut diantara dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak (Stoinoiu, dkk., 2006). Fase diam digunakan untuk mengikat komponen zat, sedangkan fase bergerak berguna untuk mengangkut komponen lain yang tidak terikat. Oleh karena adanya sistem pengikatan dan pengangkutan ini maka suatu komponen zat dapat dipisahkan (Suhartono, 1989). Menurut Harbone (1987), terdapat empat macam teknik kromatografi, yaitu kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, kromatografi gas cair, dan kromatografi cair kinerja tinggi.

Kromatografi gas merupakan teknik instrumental yang dikenalkan pertama kali pada tahun 1950-an. Instrumentasi ini merupakan metode yang dinamis untuk pemisahan dan deteksi senyawa-senyawa organik yang mudah menguap dan senyawa gas anorganik dalam suatu campuran (Rohman dan Gandjar, 2012). Prinsip dari kromatografi gas adalah pemisahan yang didasarkan pada titik didih suatu senyawa dikurangi dengan semua interaksi yang mungkin terjadi antara solut dengan fase diam. Fase gerak yang merupakan gas akan mengelusi solute dari ujung kolom lalu menghantarkan solut ke detektor. Penggunaan suhu yang meningkat bertujuan untuk menjamin bahwa solute akan cepat menguap dan akan terelusi (Rohman dan Gandjar, 2012). Kromatografi Gas merupakan salah satu teknik kromatografi yang hanya dapat digunakan untuk mendeteksi senyawa-

senyawa yang mudah menguap. Kriteria menguap adalah dapat menguap pada kondisi vakum tinggi dan tekanan rendah serta dapat dipanaskan (Drozd, 1985).

Cara kerja dari Kromatografi Gas adalah suatu fase gerak yang berbentuk gas mengalir di bawah tekanan melewati pipa yang dipanaskan dan disalut dengan fase diam cair atau dikemas dengan fase diam cair yang disalut pada suatu penyangga padat. Analit tersebut dimuatkan ke bagian atas kolom melalui suatu portal injeksi yang dipanaskan. Suhu oven dijaga atau diprogram agar meningkat secara bertahap. Ketika sudah berada dalam kolom, terjadi proses pemisahan antar komponen. Pemisahan ini akan bergantung pada lamanya waktu relatif yang dibutuhkan oleh komponen-komponen tersebut di fase diam (Sparkman dkk, 2011). Seiring dengan perkembangan teknologi maka instrumen kromatografi gas digunakan secara bersama-sama dengan instrumen lain seperti Mass-Spectrometer (MS).

Spektrum masa adalah alur kelimpahan jumlah relatif fragmen bermuatan positif berlainan dibanding masa permuatan (m/z atau m/e) dari fragmen-fragmen tersebut. Muatan ion dari kebanyakan partikel yang dideteksi dalam suatu spektrometer masa adalah +1, maka nilai m/z sama dengan masa molekulnya (M). Bagaimana suatu molekul atau ion menjadi fragmen-fragmenya bergantung pada kerangka karbon dan gugus fungsional yang ada. Oleh karena itu struktur dan massa fragmen memberikan petunjuk mengenai struktur molekul induknya. Selain itu juga sering untuk menentukan bobot molekul suatu senyawa dari spektrum massa (Supratman, 2010).

Pada spektrum massa molekul-molekul organik ditembak dengan berkas elektron dan diubah menjadi ion bermuatan positif bertenaga tinggi lepasnya

elektron dari molekul menghasilkan radikal kation yang dinyatakan sebagai M^+ . Ion-ion molekuler, ion pecahan, dan ion radikal pecahan dipisahkan oleh pembelokan dalam medan magnet yang dapat berubah sesuai dengan massa dan muatannya, sehingga menimbulkan arus pada kolektor yang sebanding dengan limpahan relatifnya. Menurut Sastrohamidjoyo (2001), partikel-partikel netral yang dihasilkan dalam pemecahan (fragmentasi) tidak dapat dideteksi dalam spektrofotometer masa, yaitu molekul yaitu molekul yang tidak bermuatan (m_2) atau radikal (M_2^+). Puncak yang memiliki kelmpahan tertinggi belum tentu merupakan ion molekul tetapi dapat dimungkinkan sebagai pengotor, karena latar belakang yang diperoleh sebelum cuplikan yang dimasukkan sering kali didapati pucak kecil pada m/e 41,43,55,57 yang merupakan latar belakang hidrokarbon (Sudjadi, 1985). Basis data puncak-puncak senyawa asam lemak dapat dilihat pada Tabel 2.4

Tabel 2.6 Basis data puncak-puncak senyawa asam lemak

NO	Puncak Ion Fragmen	BM/Rumus Molekul	Nama
1	242, 211, 199, 185, 171,157, 143,129, 115, 101, 87, 74 , 57, 41	242/ $C_{15}H_{30}O_2$	Metil tetradekanoat/ Metil miristat
	270, 239, 227, 199, 185, 171, 143, 129, 115, 101, 87, 74 , 57, 43, 41	270/ $C_{17}H_{34}O_2$	Metil heksadekanoat/Metil palmitat
3	264, 222, 180, 137, 123, 98, 87, 74, 69, 55 , 41	296/ $C_{19}H_{36}O_2$	Metil-9- oktadekenoat/ Metil oleat

*) bagian yang dicetak tebal menunjukkan puncak dasar
Sumber: Jujur, (2006).

Spektrum massa ditampilkan sebagai grafik batangan. Setiap puncak dalam spektrum massa menyatakan suatu fragmen molekul. Intensitas puncak sebanding dengan kelimpahan relatif fragmen-fragmen bergantung pada stabilitas relatifnya.

Menurut kesepakatan, puncak tertinggi dalam suatu spektrum disebut puncak dasar (*base peak*), diberi intensitas 100%, sedangkan puncak-puncak lebih kecil dilaporkan sebagai 20%, 30%, menurut nilai relatifnya terhadap puncak dasar. kadang-kadang puncak disebabkan oleh ion molekul, namun lebih sering berasal dari suatu fragmen yang lebih kecil. Tabel 2.4 merupakan basis data dari puncak-puncak senyawa asam lemak pada spektra KG-SM



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei - Agustus 2019 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat yang digunakan antara lain alat kukusan, ayakan 60 mesh, gelas arloji, spatula, timbangan analitik, *beaker glass* 250 mL, *beaker glass* 100 mL seperangkat alat soxhlet, kertas saring, pompa air, *hot plat*, tabung reaksi, pipet ukur 10 mL, pipet ukur 5 mL, kapas, *plastic wrap*, jarum ose, bunsen, labu ukur 100 mL, batang pengaduk, erlenmeyer 250 mL, *aluminium foil*, alat laminar, inkubator, botol fermentasi, *beaker glass* 500 mL, corong buchner, pompa vakum, evaporator, alat refluks, pH meter, pipet ukur 10 mL, corong pisah, *beaker glass* 50 mL, maknetik sterer, thermometer, *autoclave*, oven. Gas-Spektrofotometer Masa (KG-SM)

3.2.2. Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah bekatul yang diperoleh di tempat penggilingan padi yang terletak di Desa Tengaran, Peterongan, Jombang, Jawa Timur. Bahan lain yang digunakan antara lain kultur stok kapang *Rhizopus oryzae*, aquades, kertas saring, wrapping, aluminium foil,

NaOH, n-heksan p.a, methanol p.a, KOH 12%, H₂SO₄ p.a, N₂, Alkohol Netral, KOH, Indikator pp.

3.3. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui 2 tahap pengujian eksperimental di laboratorium, pertama menentukan suhu fermentasi dan lama inkubasi optimum untuk menghasilkan minyak bekatul dengan randemen terbaik dan kedua analisis profil asam lemak menggunakan KG-MS. Sampel diambil dari hasil samping penggilingan padi berupa bekatul. Bekatul segar distabilisasi menggunakan oven pada suhu 120 °C selama 15 menit. Bekatul kering sebanyak 50 gram diayak ≥ 40 mesh dan dikemas dalam wadah plastik bertutup.

Bekatul difermentasi menggunakan inokulum *Rhizopus oryzae* dengan variasi suhu fermentasi yaitu 25, dan 37 °C serta lama fermentasi yaitu 3, 5 dan 7 hari yang diulang sebanyak 2 kali. Kombinasi perlakuan suhu dan waktu pada Tabel 3.1

Tabel 3.1 Kombinasi perlakuan Suhu dan Waktu Fermentasi bekatul oleh *Rhizopus oryzae*

Waktu (S)	Suhu (T)	
	25 °C	37 °C
3 hari	S ₁ T ₁	S ₁ T ₂
5 hari	S ₂ T ₁	S ₂ T ₂
7 hari	S ₃ T ₁	S ₃ T ₂

Sebagai kontrol adalah bekatul tanpa proses fermentasi yang langsung dilakukan ekstraksi. Bekatul terfermentasi diekstraksi minyak bekatulnya menggunakan metode soxhlet dengan pelarut n-heksane. Selanjutnya masing-masing hasil

minyak bekatul dihitung kadar randemen dan kadar FFA kemudian ditentukan suhu dan lama fermentasi yang menghasilkan kadar randemen dan kadar FFA terbaik.

Proses selanjutnya adalah hidrolisis minyak bekatul dengan katalis KOH 12%. Direfluks selama 60 menit pada suhu 60 °C. Kemudian ditambahkan aquades dan pelarut hingga terbentuk 2 lapisan (fase organik dan fase air). Lapisan air diambil ditambahkan dengan asam sulfat 1M hingga pH = 1 dan ditambahkan dengan 20 ml pelarut terbaik. Kemudian dilakukan pemisahan menggunakan corong pisah dan diambil fase organik. Selanjutnya fase organik tersebut dipekatkan menggunakan N₂.

Selanjutnya dilakukan identifikasi profil asam lemak minyak bekatul terfermentasi yang memiliki randemen terbaik yang terlebih dahulu telah diesterifikasi menggunakan katalis H₂SO₄ metanol. Proses identifikasi profil asam lemak minyak bekatul terfermentasi menggunakan instrumen KG-SM (Kromatografi Gas - Spektrofotometer Masa).

3.4. Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui tahapan-tahapan berikut :

- 1) Preparasi bekatul;
- 2) Persiapan kultur *Rhizopus oryzae*;
- 3) Fermentasi bekatul oleh *Rhizopus oryzae*;
- 4) Ekstraksi minyak bekatul terfermentasi menggunakan metode soxhlet;
- 5) Hidrolisis minyak bekatul terfermentasi;
- 6) Esterifikasi asam lemak minyak bekatul;

- 7) Identifikasi senyawa asam lemak menggunakan Instrumen Kromatografi Gas-Spektrofotometer Masa (KG-SM)
- 8) Analisis data

3.5. Pelaksanaan Penelitian

3.5.1. Preparasi Bekatul (Mas'ud, 2016)

Bekatul padi yang baru terpisah dengan beras segera distabilisasi dengan cara dioven selama 15 menit pada suhu 120 °C. Bekatul kering diayak ≥ 40 mesh dan dikemas dalam wadah plastik tertutup. Bekatul ditimbang 50 gram kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL. Kemudian ditutup rapat dengan kapas dan dibungkus plastik kemudian siap disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C.

3.5.2. Persiapan Kultur *Rhizopus oryzae*

3.5.2.1. Pembuatan Media *Potato Dextrosa Agar* (Fikriyah, 2018)

Pembuatan media PDA dilakukan dengan cara melarutkan 4 gram media PDA bubuk dalam 100 mL aquades dalam beaker glass 250 mL dan dipanaskan hingga mendidih sambil distirer. Larutan tersebut dituang ke dalam 16 tabung reaksi masing-masing sebanyak 6 mL dan ditutup mulut tabung reaksi dengan kapas dan *plastic wrap*. Selanjutnya media PDA disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C. Kemudian didinginkan dalam keadaan miring hingga memadat.

3.5.2.2. Regenerasi *Rhizopus oryzae* (Fikriyah, 2018)

Jamur yang akan digunakan harus diregenerasi terlebih dahulu. Disiapkan media miring PDA dalam tabung reaksi yang sudah disterilisasi. Jamur induk

diambil satu ose dan digoreskan pada media miring yang baru. Jamur yang sudah ditanam dibiarkan selama 5 hari pada suhu kamar.

3.5.2.3. Pembuatan Inokulum *Rhizopus oryzae* (Irfan,2012)

Jamur yang sudah diregenerasi dalam media PDA kemudian diinokulasikan 4 ose ke dalam aquades 10 mL secara aseptik. Kemudian divortex hingga larutan keruh.

3.5.3. Fermentasi Bekatul oleh *Rhizopus oryzae* (Razak, dkk., 2015)

Bekatul yang telah disterilkan ditambah aquades steril 50 mL dan inokulum spora *Rhizopus oryzae* sebanyak 10% (v/b) atau sebanyak 10 mL dan diaduk dengan spatula. Kemudian diinkubasi pada variasi suhu 25 °C, 37 °C dan lama fermentasi 3, 5, dan 7 hari.

3.5.4. Ekstraksi Minyak Bekatul Terfermentasi oleh *Rhizopus oryzae* Metode Soxhlet (Purwanto, dkk., 2014)

Bekatul yang telah distabilisasi ditimbang sebanyak 40 gram kemudian dibungkus dengan kertas saring. Setelah itu dimasukkan ke dalam soxhlet. Pelarut n-heksana sebanyak 200 ml dimasukkan ke dalam labu leher tiga. Kemudian diekstraksi selama \pm 3 jam. Setelah itu, minyak hasil ekstraksi didestilasi terlebih dahulu untuk menghilangkan pelarut yang masih terbawa dalam minyak kemudian dioven hingga diperoleh berat minyak konstan.

3.5.5. Analisis Kadar Randemen Minyak Bekatul Terfermentasi oleh *Rhizopus oryzae*

Randemen minyak dari ekstrak dapat dihitung dengan cara menghitung berat total minyak yang terekstrak, kemudian menghitung berat sampel menggunakan persamaan (Harbone,1987):

$$\% \text{ Randemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sample}} \times 100\%$$

3.5.6. Analisis Kadar FFA Minyak Bekatul Terfermentasi oleh *Rhizopus oryzae* (Agustina, 2008)

Minyak atau lemak yang akan diuji ditimbang sebanyak 2,5 gram di dalam erlenmeyer 250 mL, ditambahkan 25 mL alkohol netral 95% dan 10 mL n-heksan, kemudian dipanaskan selama 10 menit dalam penangas air sambil diaduk. Setelah didinginkan dititrasi dengan NaOH 0,1N dengan indikator pp, sampai larutan tepat berwarna pink.

Perhitungan:

$$\text{Kadar asam lemak bebas} = \frac{M \times A \times N}{1000 \times G} \times 100\%$$

Keterangan: M = Bobot molekul asam lemak (282 untuk asam oleat)
 A = Jumlah ml NaOH untuk titrasi
 N = Normalitas larutan NaOH
 G = Bobot contoh (gram)

3.5.7. Identifikasi Asam Lemak Minyak Bekatul Terfermentasi

3.5.7.1. Hidrolisis Minyak Bekatul Terfermentasi (Fasya, 2011)

Satu gram minyak bekatul hasil ekstraksi dari perlakuan terbaik dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan dengan 5 mL metanol dan KOH 12%. Dilakukan refluks pada suhu 60 °C selama 90 menit. Selanjutnya ditambahkan sebanyak 40 ml aquades dan 20 mL pelarut terbaik dikocok dan didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan yaitu lapisan air dan lapisan organik. Lapisan air diambil ditambahkan dengan asam sulfat 1M hingga pH = 1 dan ditambahkan dengan 20 mL pelarut terbaik. Kemudian dilakukan pemisahan menggunakan corong pisah dan diambil fase organik. Selanjutnya fase organik tersebut dipekatkan menggunakan N₂.

3.5.7.2. Esterifikasi Asam Lemak (Fasya, 2011)

Sebanyak 0,4 gram asam lemak hasil hidrolisis dimasukkan kedalam erlenmeyer. Selanjutnya ditambah 0,5 mL H₂SO₄ dan 2,4 gram metanol. selanjutnya dilakukan pengadukan menggunakan maknetik stirer selama 60 menit. Hasil esterifikasi lemak kemudian diidentifikasi senyawa asam lemak menggunakan KG-SM

3.5.7.3. Indentifikasi Asam Lemak pada Minyak Bekatul Terfermentasi Menggunakan Instrumen KG-SM (Iqbal, 2016)

Sebanyak 1 µL minyak bekatul hasil esterifikasi diinjeksikan ke dalam instrumen KG-MS yang dioperasikan menggunakan kolom *Agilent 30 m* dan diameter 0,25 mm dengan suhu oven diprogram antara 50 – 300 °C, gas pembawa helium bertekanan 12.0 kPa dan total laju 15,9 mL/menit.

3.6. Analisis Data

Data yang diperoleh meliputi randemen dan kadar FFA dilakukan uji *Analysis of Variance* (ANOVA) Dua Arah (*two-way analysis of variance*). Two way anova digunakan untuk menguji banyak kelompok sampel yang melibatkan klasifikasi ganda (lebih dari satu variabel dependen).

Selain itu dilakukan identifikasi kandungan asam lemak menggunakan metode KG-SM. Data yang ditampilkan adalah khromatogram KG-SM sehingga dapat diidentifikasi senyawa asam lemak yang terkandung dalam minyak hasil fermentasi. Kromatogram diinterpretasikan dalam bentuk tabel untuk mempermudah menentukan senyawa yang didapatkan.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Preparasi Bekatul

Bekatul diayak ≤ 40 mesh untuk memperluas permukaan, sehingga interaksi antara bekatul dan inokulum saat proses fermentasi menjadi lebih tinggi. Bekatul distabilisasi dengan cara dioven pada suhu 120 °C selama 15 menit untuk menghentikan kerja enzim lipase dalam bekatul. Menurut Juliano (1985) dalam Janathan (2007) ketidakstabilan pada bekatul terjadi akibat lipase yang menghidrolisis lemak menjadi asam lemak dan gliserol.

Sebelum difermentasi bekatul disterilisasi terlebih dahulu menggunakan autoklaf dengan suhu 121 °C. Sterilisasi berfungsi untuk membunuh dan mencegah pertumbuhan mikroorganisme yang tidak diinginkan. Uap panas ditambah dengan tekanan sebesar 15 – 17,5 psi (2atm) akan membunuh sel mikroorganisme dalam bekatul yang dapat mengganggu proses fermentasi (Nester, dkk. Dalam Adji, dkk., 2007).

4.2. Regenerasi Jamur *Rhizopus oryzae* dan Pembuatan Inokulum

Mikroorganisme yang digunakan dalam proses fermentasi pada penelitian ini adalah jamur *Rhizopus oryzae*. Proses regenerasi bertujuan untuk memperbarui sel-sel jamur. Selain itu regenerasi juga bertujuan untuk mendapatkan jamur yang berada pada fase logaritma, dimana pada fase tersebut sel jamur dalam keadaan aktif membelah (Herdyastuti, dkk., 2009) Pemilihan media PDA pada proses

regenerasi dikarenakan kandungan nutrisi pada media PDA sesuai dengan nutrisi yang dibutuhkan oleh jamur *Rhizopus oryzae*.

Berdasarkan komposisinya, PDA merupakan media semi sintetis karena tersusun atas bahan alami (kentang) dan bahan sintetis (*dextrose* dan agar). Kentang merupakan sumber karbon (karbohidrat), vitamin dan energi, *dextrose* sebagai sumber gula dan energi, sedangkan komponen agar berguna untuk memadatkan medium. Pertumbuhan jamur sangat dipengaruhi oleh kandungan nutrisi media seperti karbon dan nitrogen (Barnet dan Hunter, 1998), dan karbohidrat sederhana (Kelley, 1997).

Proses regenerasi dilakukan dengan menggoreskan 1 ose jamur induk pada permukaan media PDA, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 5 hari. Penggunaan suhu 37 °C disesuaikan dengan suhu optimum *Rhizopus oryzae*. Waktu inkubasi 5 hari merupakan waktu dimana sel-sel jamur mengalami pembelahan secara aktif. Hasil dari regenerasi ini adalah berupa biakan jamur yang telah tumbuh pada media PDA dengan warna spora putih kehitaman.

Pembuatan inokulum dilakukan dengan memindahkan hifa biakan jamur ke dalam aquades steril dan dihomogenkan kemudian disaring menggunakan kasa steril. Penyaringan bertujuan untuk menahan miselium jamur, sehingga yang tersaring adalah spora jamur. Hasil yang diperoleh yaitu inokulum berwarna putih keruh. Inokulum yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10 % (v/b). Penambahan inokulum 10% mampu meningkatkan konsentrasi komponen bioaktif pada bekatul (Razak, dkk., 2014).

4.3. Fermentasi Bekatul oleh *Rhizopus oryzae*

Bekatul merupakan bahan alam yang dapat digunakan sebagai obat karena kandungan senyawa aktifnya. Saat ini manusia mempunyai banyak cara untuk meningkatkan nilai ekonomi salah satunya dengan memanfaatkan proses fermentasi. Hal ini merupakan bentuk rahmat dan karunia Allah SWT bagi manusia yang berakal. Sebagaimana firman Allah SWT dalam Q.S Azz-zumar ayat 21:

أَلَمْ تَرَ أَنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَسَلَكَهُ يَنْبِيعَ فِي الْأَرْضِ ثُمَّ يُخْرِجُ بِهِ زَرْعًا مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ
ثُمَّ يَهْبِجُ فَتَرْلُهُ مُصْفَرًّا ثُمَّ يَجْعَلُهُ حُطَمًا إِنَّ فِي ذَلِكَ لَذِكْرًا لِأُولِي الْأَلْبَابِ

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 tanaman-tanaman yang bermacam-macam warnanya, lalu menjadi kering lalu kamu melihatnya kekuningan, 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), ayat di atas menjelaskan bahwa Allah SWT telah menciptakan tumbuhan yang bermacam-macam warnanya, kemudian menjadi kering dan hancur atau berderai-derai. Proses hancurnya daun terjadi karena berbagai hal seperti pelapukan, salah satunya disebabkan oleh proses fermentasi. Fermentasi sendiri merupakan suatu proses terjadinya perubahan (pemecahan) kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme.

Salah satu mikroorganisme yang digunakan dalam proses fermentasi adalah jamur, yang mana jamur tersebut juga memberikan 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 مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا فَأَمَّا الَّذِينَ ءَامَنُوا 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

Artinya: “*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 daripada itu”. Contohnya adalah kuman, kuman tidak dapat dilihat dengan kasat mata melainkan dapat dilihat dengan bantuan mikroskop. Begitu pula dengan jamur yang pertumbuhannya tidak dapat secara langsung.

Tujuan dari proses fermentasi pada penelitian ini adalah untuk memecah kompleks selulosa dalam serat bekatul dengan bantuan jamur *Rhizopus oryzae* yang merupakan jamur penghasil enzim selulase. Jamur ini mengeluarkan enzim selulase yang mampu membuka atau menghidrolisis serat selulosa menjadi rantai oligosakarida yang lebih sederhana, sehingga ikatan senyawa bioaktif seperti minyak yang terikat diantara selulosa akan lemah dan mudah terlepas. Menurut Chang (2001), jamur *Rhizopus oryzae* mampu memecah serat selulosa bekatul

sehingga senyawa minyak yang terkandung dalam bekatul akan terlepas dan larut dengan pelarut.

Proses fermentasi diawali dengan menambahkan aquades steril dengan perbandingan (1:1) dengan substrat bekatul. Penambahan aquades steril dimaksudkan untuk mengkondisikan kelembapan media fermentasi agar sesuai dengan kondisi pertumbuhan jamur. Penggunaan perbandingan aquades dengan substrat tersebut berdasarkan hasil penelitian Fikriyah, (2018). Hasil penelitiannya menyebutkan perbandingan (1:1) antara substrat dengan aquades menghasilkan nilai peningkatan aktivitas antioksidan tertinggi. Penambahan inokulum sebanyak (10 %) ke dalam bekatul yang sudah disterilisasi merujuk pada penelitian Razak, dkk., (2014). Penelitiannya menyebutkan penambahan inokulum (10 %) mampu meningkatkan konsentrasi komponen bioaktif pada bekatul. Fermentasi pada penelitian ini dilakukan dengan mengkombinasikan variasi waktu inkubasi yaitu 3, 5, dan 7 hari dengan suhu inkubasi 27 °C dan 37 °C.

4.4. Ekstraksi Minyak Bekatul Terfermentasi oleh *Rhizopus oryzae* Metode Soxhlet

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah soxhlet yang merupakan salah satu metode ekstraksi yang menggunakan proses pemanasan dan perendaman sampel. Pada proses ekstraksi pelarut yang dipilih harus yang mudah dipisahkan dari zat terlarut untuk dapat digunakan kembali. Oleh karena itu, pelarut biasanya dipilih bertitik didih rendah (Mas'ud dan Pabbenteng, 2016). Ekstraksi pada penelitian ini menggunakan pelarut n-heksana yang mempunyai

titik didih 69 °C. Proses ekstraksi dilakukan selama 3 jam pada suhu 50 °C. Selama 3 jam proses ekstraksi terjadi kurang lebih 13 siklus ekstraksi.

Penelitian Susanti (2012) menyebutkan ekstraksi minyak bekatul menggunakan pelarut n-heksana menghasilkan randemen minyak bekatul yang paling banyak yaitu sebesar 14,94% dibanding pelarut lain seperti etil asetat, metanol, etanol, isopropanol, dan aseton. Pelarut yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 200 mL atau perbandingan 1:4 dengan sampel. Penggunaan jumlah pelarut merujuk pada hasil penelitian yang dilakukan oleh Mas'ud (2016) yang melaporkan bahwa hasil randemen optimum minyak bekatul diperoleh pada variasi pelarut 1:4 yaitu sebesar 7,9%.

Waktu ekstraksi juga mempengaruhi randemen minyak bekatul yang diperoleh, semakin lama waktu ekstraksi semakin lama juga waktu kontak antara pelarut n-hexane dengan bahan baku bekatul, sehingga semakin banyak senyawa minyak terlarut di dalam n-heksana. Proses ekstraksi minyak bekatul pada penelitian ini dilakukan selama 3 jam yang merujuk pada penelitian Nasir (2009) yang menyatakan bahwa waktu ekstraksi 3 jam menghasilkan randemen minyak bekatul paling tinggi yaitu sebesar 21,28% dibandingkan dengan waktu ekstraksi 1 dan 2 jam.

Ekstrak minyak bekatul dipekatan dengan *rotary evaporator vacum* pada suhu 50 °C untuk menguapkan pelarut hingga diperoleh ekstrak pekat minyak bekatul. Proses penguapan dihentikan ketika sudah tidak ada pelarut yang menguap yang dilihat dari sudah tidak ada lagi pelarut yang menetes dalam labu destilat. Minyak bekatul yang diperoleh berwarna kuning kehijauan untuk sampel

bekatul terfermentasi dan berwarna coklat untuk sampel bekatul tanpa fermentasi.

Randemen minyak bekatul ditunjukkan pada Tabel 4.1:

Tabel 4.1 Randemen Minyak Bekatul Terfermentasi dan tanpa Fermentasi

Kode	Randemen %	% Peningkatan
S ₁ T ₁	10,42 ± 0,077	1,95
S ₁ T ₂	10,07 ± 0,219	-1,46
S ₂ T ₁	12,32 ± 0,459	20,54
S ₂ T ₂	13,4 ± 1,294	31,11
S ₃ T ₁	11,82 ± 1,166	15,65
S ₃ T ₂	12,36 ± 1,081	20,93
Tanpa Fermentasi	10,22 ± 0,035	-

Keterangan : S₁: Lama Fermentasi 3 Hari
 S₂: Lama Fermentasi 5 Hari
 S₃: Lama Fermentasi 7 Hari
 T₁: Suhu Fermentasi 27 °C
 T₂: Suhu Fermentasi 37 °C

Berdasarkan Tabel 4.1 randemen minyak bekatul terfermentasi lebih besar dibandingkan dengan randemen minyak bekatul tanpa fermentasi. Hal tersebut dimungkinkan karena pada saat fermentasi selulosa dalam bekatul dipecah oleh enzim selulase menjadi rantai oligosakarida yang lebih sederhana, sehingga ikatan senyawa bioaktif seperti minyak yang terikat diantara selulosa akan lemah dan mudah terlepas. Selaras dengan penelitian Razak, dkk. (2015) yang melaporkan bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae* menghasilkan senyawa bioaktif yang lebih banyak dibanding bekatul tanpa fermentasi. Suryati (2015), menyebutkan bahwa minyak bekatul yang diekstrak dengan metode soxhlet dari sampel bekatul tanpa fermentasi menggunakan pelarut n-heksan menghasilkan randemen sebesar 10,8%. Sedangkan Sukma (2010), menyatakan minyak bekatul terfermentasi menggunakan *Aspergillus terreus* yang diekstrak dengan metode maserasi menghasilkan randemen sebesar 16,14%.

Hasil randemen tertinggi didapat pada waktu fermentasi 5 hari dengan suhu fermentasi 37 °C yakni sebesar 13,4%. Hal tersebut dimungkinkan terjadi karena pada fermentasi 5 hari enzim selulase mampu mendegradasi serat selulosa secara maksimal, sehingga senyawa minyak yang terikat pada serat selulosa dengan ikatan ester lebih mudah terlepas. Selaras dengan penelitian Sukma, dkk. (2010) yang menyatakan waktu fermentasi 6 hari menggunakan *Aspergillus terreus* menghasilkan randemen minyak bekatul yang paling tinggi dibanding waktu fermentasi 4 hari dan 8 hari. Suhu 37 °C merupakan suhu optimum jamur *Rhizopus oryzae* yang menyebabkan reaksi enzim selulase dengan serat selulosa berjalan dengan cepat. Sehingga enzim selulase mampu mendegradasi serat selulosa secara maksimal. Penelitian Hikmah (2018), melaporkan suhu optimum jamur *Rhizopus oryzae* yaitu pada suhu 37 °C ditandai dengan tingginya aktifitas antibakteri pada ekstrak bekatul terfermentasi.

Perlakuan lama fermentasi memberikan pengaruh signifikan terhadap nilai rendemen minyak bekatul, selanjutnya diuji lanjut menggunakan *Tukey* untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Hasil analisis lanjutan *Tukey* disajikan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Randemen Minyak Bekatul

Lama Fermentasi	Randemen
3 hari	10,7600 ^a
5 hari	12,8550 ^b
7 hari	12,0950 ^{ab}

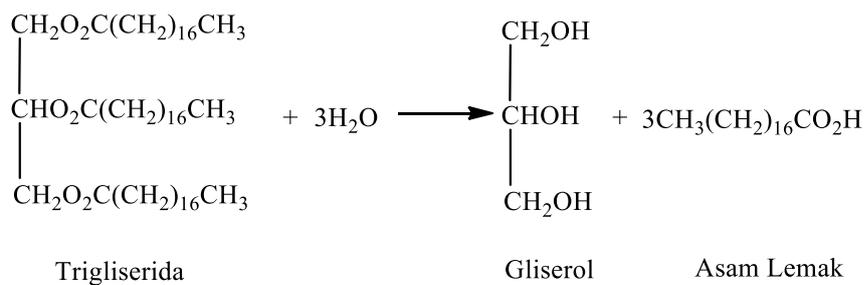
Tabel 4.2 menunjukkan bahwa pada perlakuan 5 hari memberikan perbedaan yang nyata terhadap perlakuan lama fermentasi 3 hari. Hal tersebut

dikarenakan pada fermentasi 3 hari jamur masih dalam fase pembelahan sel, yang mana enzim yang dihasilkan oleh jamur belum maksimal. Sehingga dimungkinkan kerja enzim dalam membuka serat selulosa belum optimal. Sedangkan pada fermentasi 5 hari enzim selulase banyak bereaksi dengan serat selulosa yang menyebabkan terjadi pemutusan ikatan pada matriks serat selulosa. Sehingga senyawa minyak yang terikat pada serat selulosa lebih mudah untuk diekstrak.

Hasil tersebut selaras dengan penelitian Fikriyah (2018) yang melaporkan waktu fermentasi 5 hari merupakan waktu yang baik bagi jamur untuk mendegradasi atau merenggangkan matriks selulosa. Hasil penelitiannya menyatakan bahwa bekatul yang di fermentasi dengan *Rhizopus oryzae* selama 5 hari dan diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol memperoleh randemen ekstrak bekatul paling banyak dibandingkan dengan fermentasi 3 hari dan 4 hari.

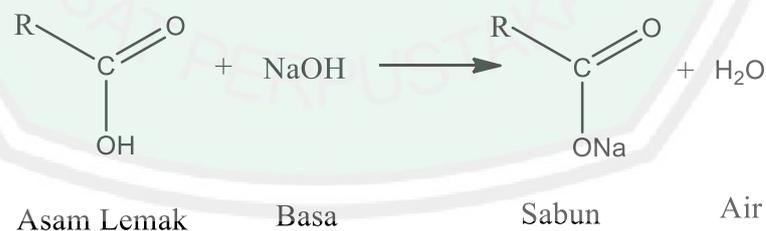
4.5. Analisis Kadar Asam Lemak Bebas Minyak Bekatul Terfermentasi oleh *Rhizopus oryzae*

Asam lemak bebas (FFA) adalah asam lemak yang berada sebagai asam bebas tidak terikat sebagai trigliserida. Asam lemak bebas dihasilkan oleh proses hidrolisis dan oksidasi trigliserida. Semakin tinggi kandungan asam lemak bebas dalam minyak, maka menunjukkan bahwa semakin tinggi pula kerusakan yang dialami oleh minyak (Herwanda., 2011). Reaksi hidrolisis minyak ditunjukkan pada Gambar 4.1



Gambar 4.1 Reaksi Hidrolisis Minyak Bekatul

Penentuan kadar Asam Lemak Bebas (FFA) pada penelitian ini menggunakan metode titrasi asam basa. Metode ini menganalisis asam lemak bebas berdasarkan jumlah NaOH yang dibutuhkan dalam titrasi hingga membentuk warna merah jambu. Penentuan kadar FFA pada penelitian ini menggunakan pelarut etanol 95% netral yang berfungsi untuk melarutkan minyak sehingga dapat bereaksi dengan basa NaOH. Pemanasan bertujuan untuk memaksimalkan pelarutan minyak pada pelarut. Penggunaan indikator pp pada proses tirasi bertujuan sebagai tanda batas bahwa asam lemak yang berada dalam minyak habis bereaksi dengan basa NaOH. Reaksi antara asam lemak dengan NaOH ditunjukkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Reaksi Asam Lemak Bebas dengan NaOH

Berdasarkan reaksi pada gambar 4.2 penambahan NaOH terus dilakukan sampai asam lemak habis bereaksi dengan NaOH. Asam lemak habis bereaksi dengan NaOH ditandai dengan perubahan warna dari tidak berwarna menjadi

merah muda. Semakin banyak NaOH yang ditambahkan menunjukkan kandungan asam lemak bebas yang cukup tinggi. Data hasil analisa FFA ditunjukkan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil Analisa Kadar Asam Lemak Bebas (FFA) Minyak Bekatul Terfermentasi oleh *Rhizopus oryzae*

Kode	FFA %
S ₁ T ₁	7,47 ± 0,197
S ₁ T ₂	7,19 ± 0,197
S ₂ T ₁	7,33 ± 0,395
S ₂ T ₂	6,91 ± 0,197
S ₃ T ₁	7,60 ± 0,999
S ₃ T ₂	8,74 ± 0,799
Tanpa Fermentasi	10,57 ± 0,601

Data pada Tabel 4.3 menunjukkan rata-rata minyak bekatul terfermentasi mempunyai kadar FFA yang lebih rendah daripada minyak bekatul tanpa fermentasi. Hal tersebut dimungkinkan karena dengan adanya proses fermentasi senyawa minyak lebih mudah diekstrak dalam bentuk trigliserida. Sedangkan pada bekatul tanpa fermentasi ketika proses ekstraksi terjadi pemutusan ikatan asam lemak dengan gliserol. Sehingga minyak yang terekstrak banyak mengandung asam lemak bebas. Tingginya kandungan asam lemak bebas dalam minyak menunjukkan kualitas minyak yang buruk. Sehingga dari Tabel 4.3 dapat dikatakan bahwa minyak bekatul hasil fermentasi mempunyai kualitas yang lebih baik daripada minyak bekatul tanpa fermentasi.

Variasi lama fermentasi dan suhu fermentasi mempengaruhi kadar FFA yang dihasilkan. Data pada Tabel 4.3 menunjukkan hasil kadar FFA terbaik diperoleh pada variasi lama fermentasi 5 hari dan suhu fermentasi 37 °C. Hal

tersebut dimungkinkan pada fermentasi 5 hari dan suhu 37 °C aktivitas enzim lipase yang dihasilkan oleh *Rhizopus oryzae* sudah mulai menurun. Berbeda dengan fermentasi 3 hari yang menghasilkan kadar FFA lebih tinggi, dimungkinkan aktivitas enzim lipase berada pada kondisi optimum, sehingga proses hidrolisis trigliserida menjadi gliserol dan asam lemak bebas berjalan optimum. Sedangkan fermentasi 7 hari kadar FFA minyak sangat tinggi. Hal tersebut dimungkinkan terjadi akibat adanya proses hidrolisis trigliserida oleh air, karena terjadi kontak antara senyawa minyak dengan air dengan waktu yang cukup lama.

Kadar FFA minyak bekatul yang didapat diuji dengan analisis avarians (Anova) *Two way* menggunakan SPSS 20. Analisis ini digunakan untuk mengetahui nilai signifikansi pengaruh lama fermentasi dengan suhu fermentasi, serta pengaruh antara kedua variasi yang digunakan. Data variasi lama fermentasi menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan, maka selanjutnya diuji menggunakan *Tukey* untuk mengetahui ada dan tidaknya perbedaan antara ketiga perlakuan terhadap randemen minyak bekatul. Hasil analisis lanjutan *Tukey* disajikan pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar FFA

Lama Fermentasi	Kadar FFA
3 hari	7,3300 ^a
5 hari	7,1200 ^a
7 hari	8,6740 ^b

Tabel 4.4 menunjukkan bahwa pada perlakuan 7 hari memberikan perbedaan yang nyata terhadap perlakuan lama fermentasi 3 hari dan 5 hari. *Rhizopus oryzae*

berada pada fase Logaritma pada hari ke 2 sampai ke 4. Fase ini sel-sel jamur mengalami pertumbuhan yang sangat cepat dan aktivitas nya juga mengalami peningkatan. Metabolit primer diproduksi oleh *Rhizopus oryzae* pada saat pembelahan sel. Sehingga pada fase logaritma *Rhizopus oryzae* menghasilkan metabolit primer yang produksinya mengikuti kurva pertumbuhan *Rhizopus oryzae*. Sehingga pada fase awal stasioner yaitu pada hari ke 5, *Rhizopus oryzae* telah menghasilkan metabolit primer yang sangat banyak. Metabolit primer yang dihasilkan oleh *Rhizopus oryzae* yaitu protein atau enzim.

Fermentasi hari ke 5 menghasilkan kadar FFA yang paling baik karena pada fase itu enzim selulase mempunyai aktivitas yang sangat baik. Enzim selulase mampu menghidrolisis selulosa menjadi glukosa yang menyebabkan perenggangan ikatan antara minyak dan selulosa. Sehingga minyak dapat mudah untuk di ekstrak. Minyak yang dihasilkan pada hari ke 5 belum terjadi reaksi hidrolisis akibat reaksi enzimatik atau reaksi dengan air.

Lama fermentasi 7 hari terjadi lebih banyak reaksi hidrolisis antara trigliserida dan air dibandingkan lama fermentasi 5 hari dan 3 hari. Semakin lama terjadi reaksi pada trigliserida semakin banyak pula asam lemak bebas yang dihasilkan. Selain itu, enzim lipase yang juga dihasilkan oleh *Rhizopus oryzae* mulai akan bekerja dengan adanya komponen minyak dalam media. Semakin lama proses fermentasi, menyebabkan semakin banyak pula senyawa minyak yang terhidrolisis oleh enzim lipase. Sehingga kadar FFA di hari ke 7 berbeda nyata dengan hari ke 5.

Selaras dengan penelitian Guehi, dkk. (2008) yang melaporkan fermentasi biji coklat selama 6 hari menghasilkan kadar FFA yang lebih tinggi dibanding

fermentasi 4 hari dan 5 hari. Penelitian Adigarha, dkk. (2012) menyatakan kadar FFA minyak bekatul terfermentasi oleh *Aspergillus niger* selama 8 hari dengan ekstraksi selama 1 jam menggunakan pelarut etanol 96% menghasilkan minyak bekatul dengan kadar FFA sebesar 20,2%.

4.6. Identifikasi Asam Lemak pada Minyak Bekatul Terfermentasi Menggunakan KG-SM

4.6.1. Hidrolisis Minyak Bekatul Terfermentasi

Hidrosolis pada penelitian ini bertujuan untuk memutus ikatan antara asam lemak dengan gliserol sehingga dapat teridentifikasi jenis asam lemak dalam instrumen KG-SM. Sampel yang digunakan yakni sampel minyak bekatul yang telah difermentasi pada suhu 37 °C dengan lama fermentasi 5 hari. Penambahan KOH pada proses hidrolisis berfungsi sebagai katalis basa. KOH sering digunakan dalam reaksi saponifikasi karena lebih mudah membentuk garam asam lemak dibanding natrium hidrosida. Kalium dan natrium merupakan unsur-unsur yang berada pada golongan yang sama dalam periodik, yaitu golongan I (golongan alkali). Dalam satu golongan, kereaktifan unsur-unsur bertambah dari atas ke bawah, begitu juga dengan sifat elektropositif lebih besar dibandingkan natrium. Oleh karena itu, kecenderungan kalium untuk membentuk ion positif lebih besar dibandingkan natrium, karena jari-jari atom kalium lebih besar daripada natrium.

Tahapan selanjutnya yaitu refluks yang merupakan proses pencampuran suatu larutan dengan disertai pemanasan. Pemanasan akan mempercepat pergerakan partikel sehingga tumbukan antar partikel lebih sering terjadi. Semakin banyak terjadi tumbukan antar partikel, semakin mempercepat laju

reaksi. Warna larutan yang dihasilkan dari proses refluk adalah kuning kecokelatan. Reaksi yang terjadi pada proses hidrolisis gliseril olein ditunjukkan pada Gambar 4.3.

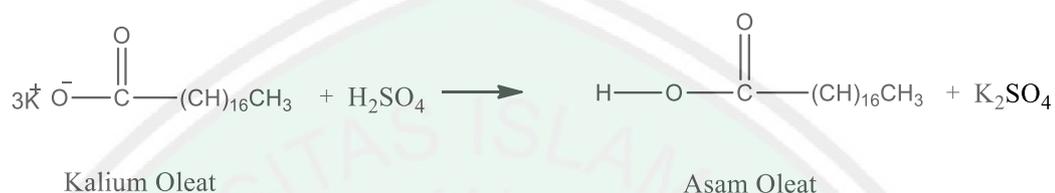


Gambar 4.3 Reaksi Hidrolisis Gliseril Olein (Malik, 2015)

Tujuan dari pembuatan KOH yang berlebih karena apabila KOH yang digunakan dalam proses hidrolisis lebih kecil daripada jumlah komponen minyak, maka tidak semua minyak dapat tersabunkan (hidrolisis parsial) sehingga hal tersebut tentu akan mempengaruhi kuantitas produk yang dihasilkan atau dapat disebut bahwa proses penyabunan tidak maksimal (Perwitasari, S, 2011). Pemilihan metanol sebagai pelarut karena metanol memiliki gugus polar dan non polar, sehingga dapat mencampurkan KOH yang bersifat polar dan minyak yang bersifat non polar.

Garam kalium yang larut dalam air yang didapatkan kemudian dipisahkan dari pengotornya menggunakan corong pisah dengan cara penambahan 40 mL aquades dan 20 ml pelarut (n-heksana). Pada proses pemisahan tersebut terbentuk 2 lapisan, yaitu lapisan organik dan lapisan air. Lapisan organik berada pada bagian atas dan lapisan air berada pada bagian bawah yang disebabkan oleh perbedaan densitas antara lapisan organik dan lapisan air.

Fase air ditambah H_2SO_4 1 M untuk merubah garam menjadi asam lemak. Penambahan H_2SO_4 dilakukan hingga $\text{pH}=1$ untuk memastikan bahwa seluruh garam yang terbentuk telah berubah menjadi asam lemak. Reaksi yang terjadi pada saat penambahan H_2SO_4 nampak pada Gambar 4.4



Gambar 4.4 Reaksi Pembentukan Asam Lemak

Asam lemak yang terbentuk karena masih campuran, maka dilakukan pemisahan dengan penambahan pelarut terbaik yaitu n heksan dan air sehingga terbentuk 2 lapisan. Asam lemak bersifat non polar sehingga terlarut pada fase organik. Oleh karena itu, fase organik (bagian atas) diambil dan dilakukan penguapan pelarut.

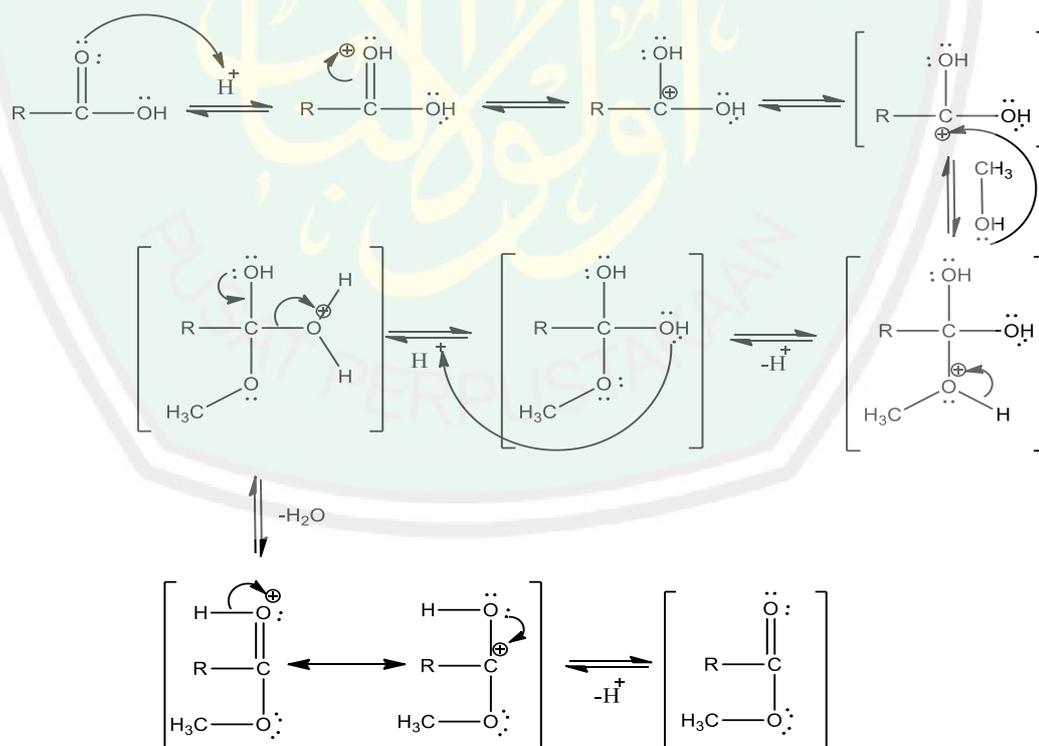
Asam lemak hasil hidrolisis akan berwujud cair pada suhu kamar apabila komposisi utama asam lemak memiliki rantai karbon pendek dan medium (atom $\text{C} < 12$) atau yang komposisi utamanya asam lemak jenuh, tetapi akan berwujud padat di suhu kamar apabila komponen utamanya adalah asam lemak dengan atom (atom $\text{C} > 14$) (Poedjiadi, 2005).

4.6.2. Esterifikasi Asam Lemak Minyak Bekatul Terfermentasi

Esterifikasi digunakan untuk mengubah asam lemak bebas menjadi larutan metil ester. Larutan metil ester merupakan larutan mudah menguap sehingga mudah terdeteksi pada instrumen KG-SM. Metanol yang ditambahkan pada asam

lemak hasil hidrolisis bertindak sebagai reaktan. Penambahan metanol dengan perbandingan 1:6 merujuk dari penelitian Shakti dan Fatmawati (2013) yang melakukan proses esterifikasi dari minyak sebagai kajian awal sintesis biodiesel menghasilkan konversi maksimal yaitu 80,59%.

Penambahan H_2SO_4 , sebagai katalis asam kuat diharapkan mampu meningkatkan laju esterifikasi. Katalis asam kuat juga merupakan *dehydrating agent* (Kusmiyati,2008). Kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 60 menit agar cepat bereaksi. Pengadukan akan menambah kecepatan gerak partikel yang menyebabkan semakin sering partikel-partikel asam lemak dan metanol saling bertumbukan, sehingga dapat mempercepat reaksi. Mekanisme reaksi asam lemak dengan metanol dengan katalis H_2SO_4 ditunjukkan pad Gambar 4.5



Gambar 4.5 Mekanisme Reaksi ALB dan Metanol dengan Katalis H_2SO_4

4.6.3. Identifikasi Senyawa Minyak Bekatul Terfermentasi menggunakan Instrumen Kromatografi Gas Spektrofotometer Massa (KG-SM)

Instrumen GCMS digunakan untuk mengetahui jumlah senyawa yang terdapat dalam sampel berdasarkan kromatogram yang dihasilkan dan meramalkan struktur senyawa berdasarkan spektra masa yang muncul. Identifikasi senyawa dikhususkan pada minyak bekatul tanpa fermentasi dan minyak bekatul terfermentasi 5 hari pada suhu fermentasi 37 °C. Hasil kromatogram sampel tanpa fermentasi dapat dilihat pada Gambar 4.6.



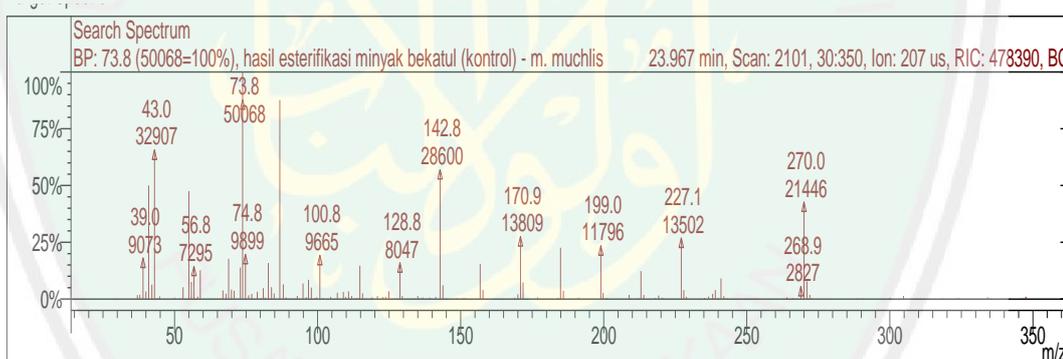
Gambar 4.6 Kromatogram Minyak Bekatul tanpa Fermentasi

Tabel 4.5 Hasil Kromatogram Minyak Bekatul Tanpa Fermentasi

Nama Puncak	Waktu Retensi (Menit)	Luas Area	Persen Area (%)
Puncak 1	23,961	158764	29,81
Puncak 2	25,596	118572	22,26
Puncak 3	25,651	255104	47,91

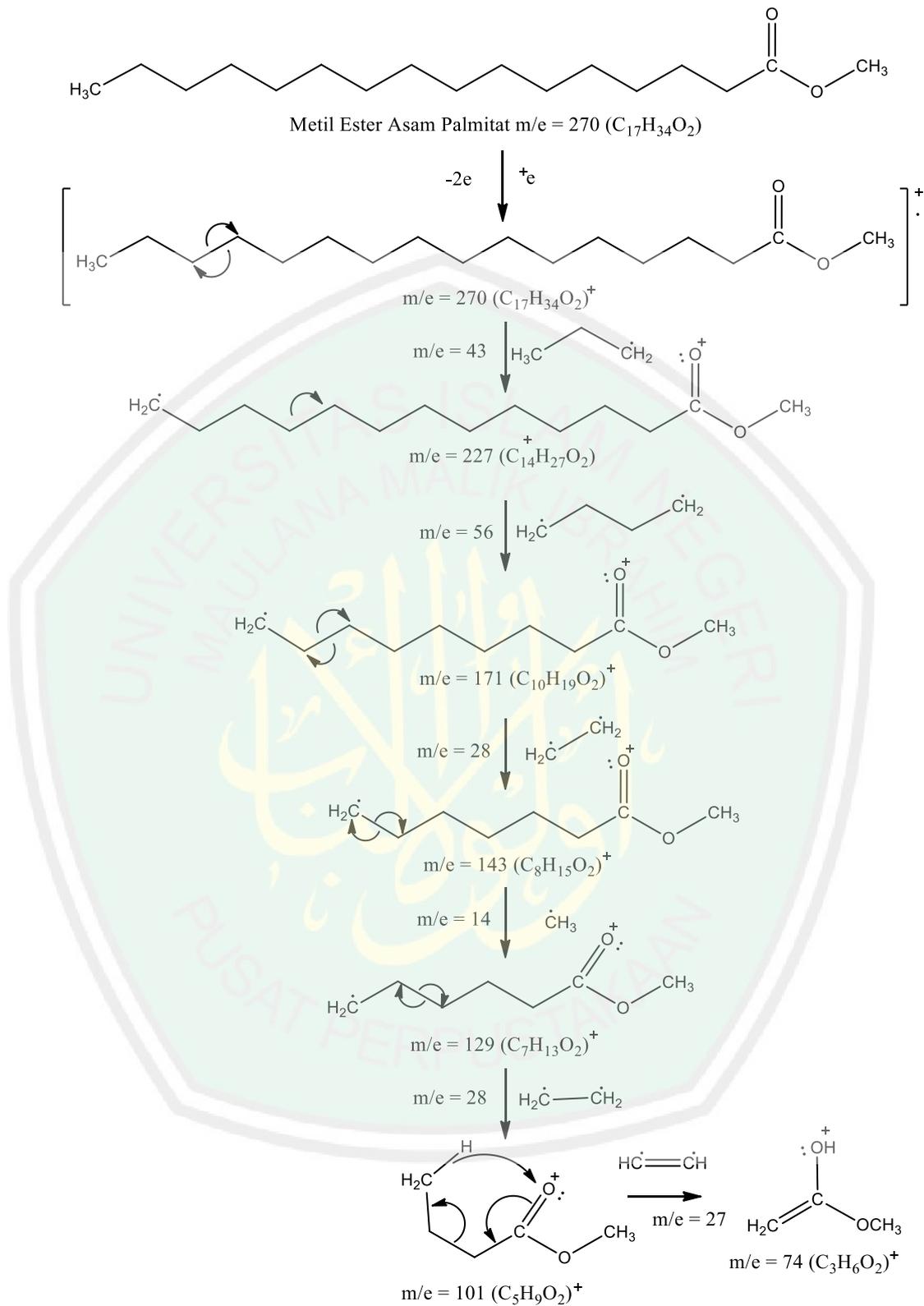
Hasil kromatogram pada Gambar 4.6 menunjukkan adanya 3 senyawa yang digambarkan dengan munculnya 3 puncak pada kromatogram dengan total luas area 532,440. Dari nilai persen area dapat diketahui bahwa puncak ketiga merupakan senyawa dengan konsentrasi terbanyak dalam minyak bekatul tanpa fermentasi. Masing-masing puncak dapat diidentifikasi dari nilai Rt dan spektra MS yang muncul.

Puncak 1 dengan Rt 23,961 menit memberikan puncak-puncak m/z sebagai berikut: 270, 227.1, 199, 170.1, 142.8, 128.8, 100.8, 74.8, 73.8, dan 43. Berdasarkan pendekatan literatur dapat diperkirakan bahwa Rt 23,961 menit adalah senyawa asam heksadekanoat (asam palmitat). Spektra MS untuk senyawa pada puncak 1 dapat dilihat pada Gambar 4.7



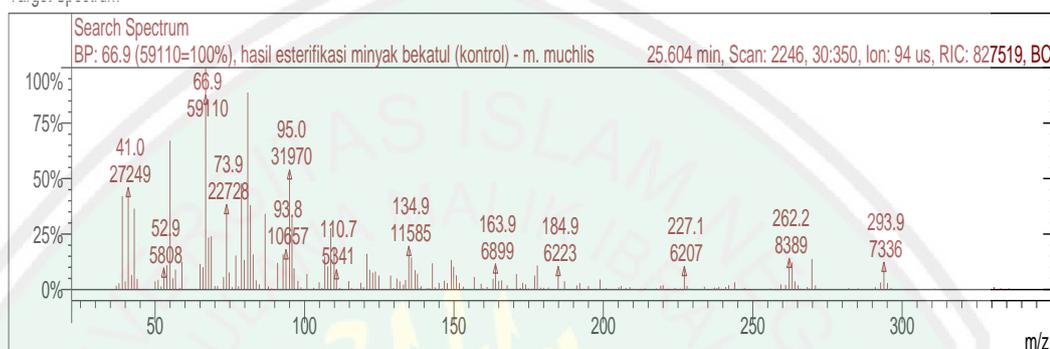
Gambar 4.7 Spektra MS Puncak 1

Hasil spektra massa puncak 1 mempunyai ion molekuler dengan m/z sebesar 270 yang berasal dari $C_{17}H_{34}O_2^+$. *Base peak* pada spektra MS puncak 1 berada pada m/z 73,8 berasal dari $C_3H_6O_2^+$ terbentuk dari penataan ulang Mc Lafferty. Pecahan m/z 227 berasal dari lepasnya $C_3H_7^+$ sebagai m/z 43. Perkiraan fragmentasi dari masing-masing puncak dapat dilihat pada Gambar 4.8



Gambar 4.8 Pola Fragmentasi Asam Palmitat

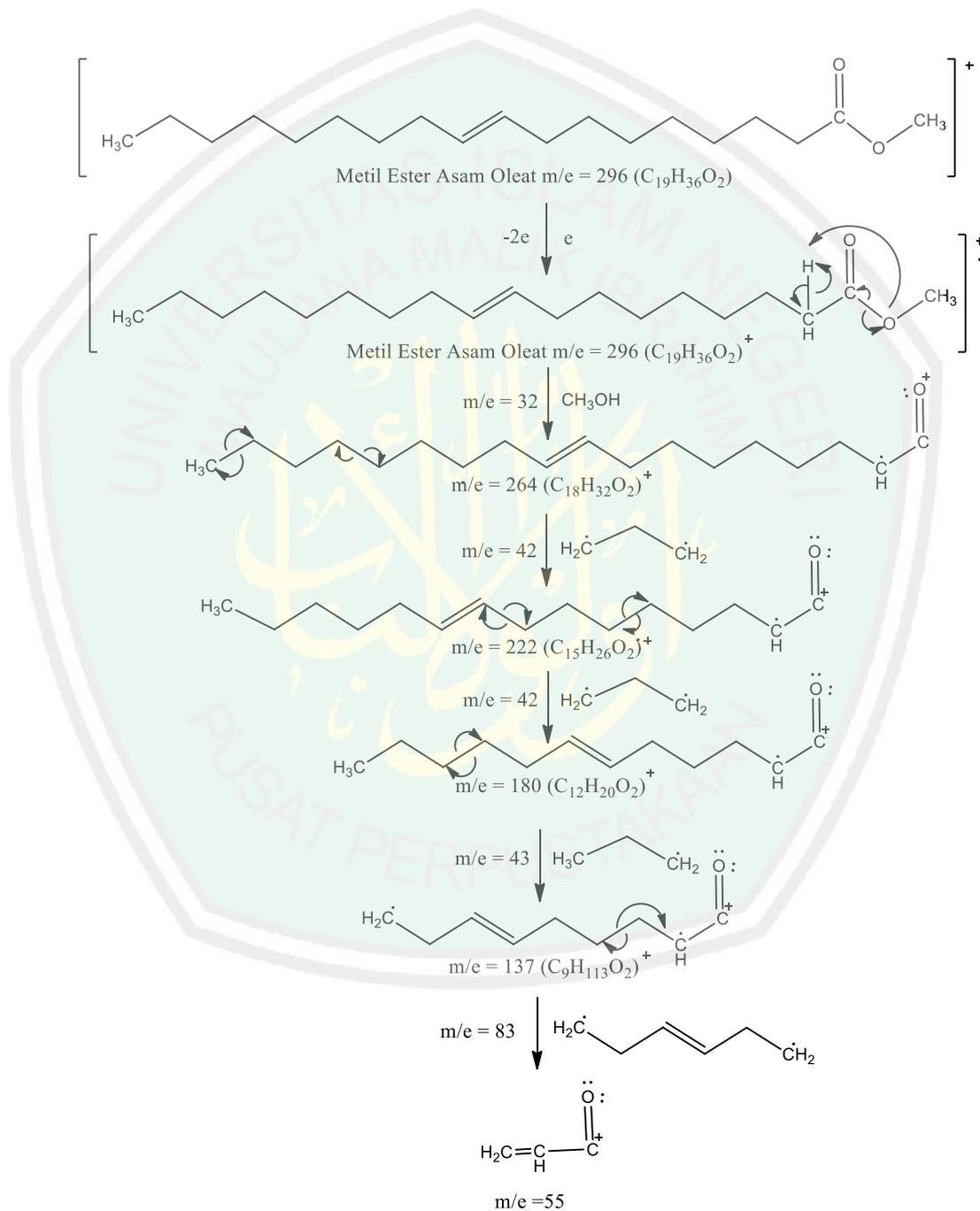
Puncak 2 menghasilkan Rt 25,596 menit dan memiliki pola fragmentasi sebagai berikut: 293.9, 262.2, 227.1, 184.9, 163.9, 134.9, 110.7, 95, 66.9, 52.9, dan 41. Berdasarkan literatur senyawa tersebut merupakan 9,12 oktadekanoat (asam linoleat). Puncak 2 menghasilkan spektra ms seperti pada Gambar 4.9.



Gambar 4.9 Spektra MS Puncak 2

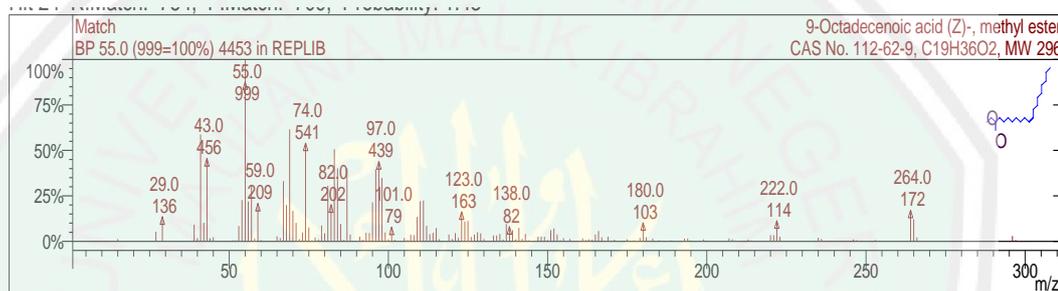
Spektra MS puncak 2 menunjukkan senyawa tersebut mempunyai berat molekul 293,9 yang mirip dengan senyawa asam linoleat yang mempunyai berat molekul 294 dengan rumus struktur $C_{19}H_{34}O_2$. Perkiraan tersebut diperkuat dengan hasil pola fragmentasi yang muncul. *Base peak* pada senyawa ini berada pada m/z 67 yang merupakan ciri dari *base peak* asam linoleat. Ion molekuler dengan m/z 262 berasal dari $C_{18}H_{30}O^+$ yaitu hasil dari terlepasnya CH_3O dari $C_{19}H_{34}O_2$. Perkiraan pola fragmentasi dapat dilihat pada Gambar 4.10

ditunjukkan adanya 2 puncak yang muncul di sebelah kanan dari puncak 294. Sehingga senyawa pada puncak 3 bisa dikatakan mempunyai berat molekul 296 yang berasal dari $C_{19}H_{36}O_2^+$. Perkiraan pola fragmentasi pada puncak 3 disajikan pada Gambar 4.12



Gambar 4.12 Perkiraan Pola Fragmentasi Asam Oleat

Puncak pada m/z 264 diperoleh dari lepasnya CH_3O dari $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_2^+$. Jika dilihat dari pola fragmentasi tidak ada senyawa yang sesuai dengan hasil tersebut. Namun dilihat dari *library* yang muncul, pola fragmentasi tersebut terdapat kemiripan dengan pola fragmentasi senyawa 9-Octadecenoic acid (z) (Metil Oleat). Spektra MS 9-Octadecenoic acid (z) (Metil Oleat) dapat dilihat pada gambar 4.13.



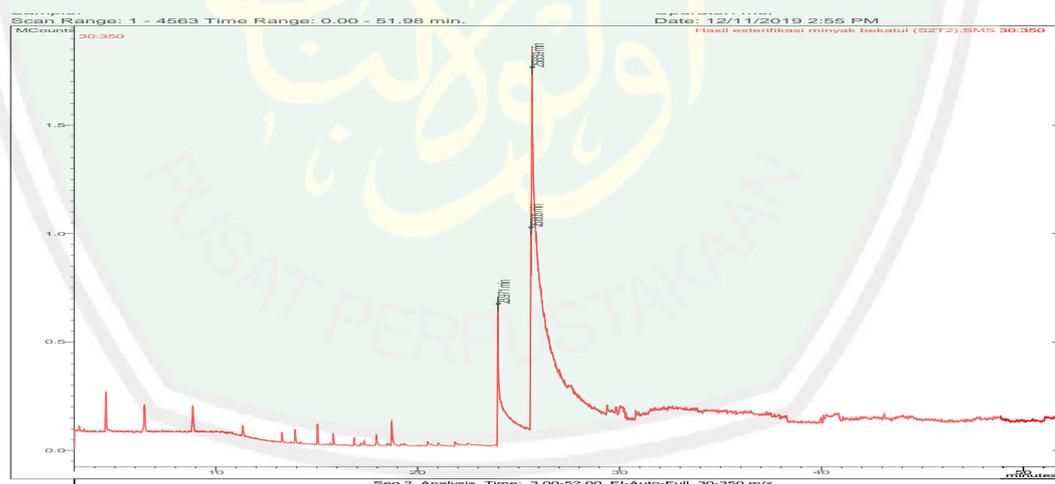
Gambar 4.13 Spektra MS 9-Octadecenoic acid (z)

Berdasarkan hasil kromatogram dan spektra MS, minyak bekatul tanpa fermentasi mengandung 3 senyawa yang dapat dilihat pada Tabel 4.6. Tabel tersebut menunjukkan bahwa ketiga senyawa tersebut merupakan asam palmitat, asam linoleat, dan asam oleat. Banyaknya rantai karbon dan jumlah ikatan rangkap mempengaruhi kepolaran senyawa. Asam palmitat mempunyai kepolaran yang paling tinggi dibanding asam linoleat dan asam oleat dikarenakan rantai karbon yang lebih pendek. Sedangkan asam linoleat sedikit lebih polar dari asam oleat karena pada asam linoleat mempunyai jumlah ikatan rangkap yang lebih banyak dibanding asam oleat.

Tabel 4.6 Senyawa pada Minyak Bekatul Tanpa Fermentasi

Peak	tR (menit)	% Area	BM / Rumus Molekul	Nama Senyawa
1	23,961	29,81	270 / C ₁₇ H ₃₄ O ₂	Asam heksadekanoat/ asam palmitate
2	25,596	22,26	294 / C ₁₉ H ₃₄ O ₂	9,12-asam oktadekanoat/ asam linoleate
3	25,651	47,91	296 / C ₁₉ H ₃₆ O ₂	9-asam oktadekanoat (z)/ asam oleat

Berdasarkan berat molekul masing-masing senyawa, terjadi kesesuaian dengan waktu retensi. Bahwa semakin kecil berat molekul suatu senyawa, maka semakin cepat pula gerakan dalam melewati kolom. Berdasarkan tingkat kepolaran, senyawa yang cenderung lebih polar akan keluar melewati kolom terlebih dahulu, dikarenakan pada penelitian ini menggunakan jenis kolom yang bersifat non-polar.



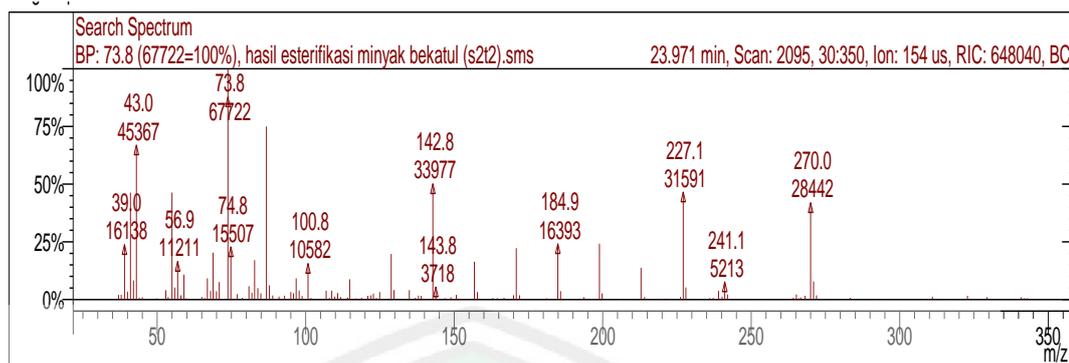
Gambar 4.14 Kromatogram Minyak Bekatul Lama Fermentasi 5 hari pada Suhu Fermentasi 37 °C

Tabel 4.7 Hasil Kromatogram Minyak Bekatul Fermentasi 5 hari pada Suhu 37 °C

Nama Puncak	Waktu Retensi (Menit)	Luas Area	Persen Area (%)
Puncak 1	23,971	211395	38,12
Puncak 2	25,605	125665	22,66
Puncak 3	25,659	217386	39,21

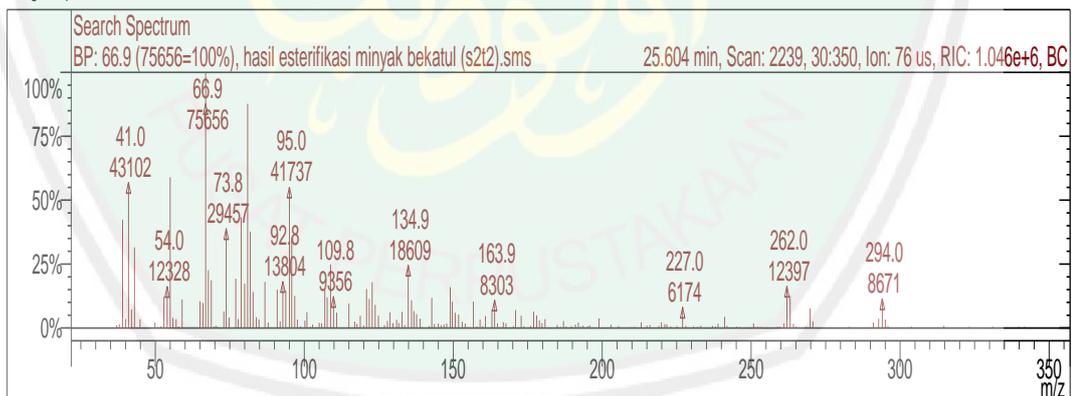
Hasil kromatogram minyak bekatul terfermentasi 5 hari pada suhu 37 °C diperoleh 3 puncak (*peak*) seperti pada Gambar 4.14. Senyawa yang teridentifikasi oleh Kromatogram mengandung 3 puncak (*peak*) yang menandakan adanya 3 senyawa. Dari luas area yang didapat, minyak bekatul terfermentasi mempunyai luas area total sebesar 554,446 lebih banyak di bandingkan minyak bekatul tanpa fermentasi yaitu sebesar 532,440. Luas area tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi senyawa asam lemak yang terkandung dalam minyak bekatul terfermentasi lebih banyak dibanding minyak bekatul tanpa fermentasi. Luas area masing-masing puncak dapat dilihat pada tabel 4.7.

Berdasarkan nilai R_t dari kromatogram, ketiga puncak yang muncul diperkirakan merupakan senyawa asam palmitat pada puncak 1, asam linoleat pada puncak 2 dan asam oleat pada puncak 3. Berdasarkan % area masing-masing puncak, puncak 3 merupakan senyawa dengan konsentrasi terbanyak. Perkiraan senyawa-senyawa tersebut diperkuat dari hasil spektra MS dari masing-masing puncak. Spektra MS pada puncak 1 disajikan pada Gambar 4.15



Gambar 4.15 Spektra MS puncak 1

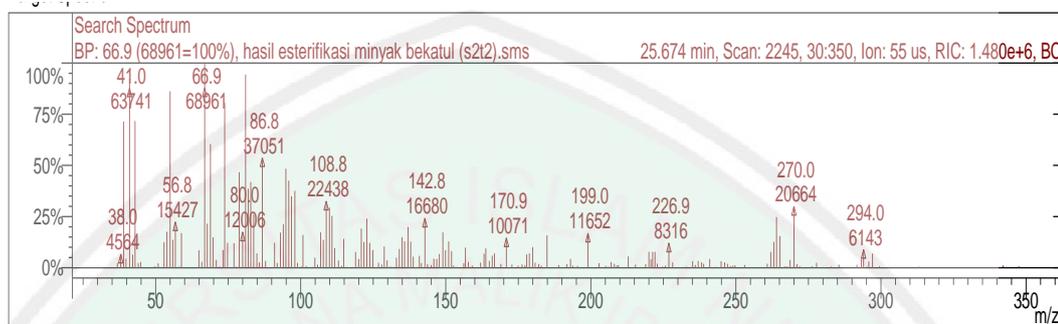
Gambar 4.15 menunjukkan bahwa puncak 1 merupakan senyawa dengan berat molekul m/z 270 dengan puncak dasar muncul pada m/z 73,8. Pola fragmentasi yang muncul yaitu 270, 227, 18,9, 142,8, 100,8, 73,8, 56,9, 43,0. Berdasarkan berat molekul dan pola fragmentasi kemungkinan besar senyawa pada puncak 1 merupakan senyawa asam palmitat. Didukung dengan *base peak* 74 yang merupakan *base peak* dari asam palmitat.



Gambar 4.16 Spektra MS puncak 2

Gambar 4.16 menunjukkan bahwa pada puncak 2 menghasilkan ion molekuler m/z 294 dengan *base peak* 66,9. Pola fragmentasi yang terbentuk yaitu pada m/z 294, 262, 227, 263,9, 134,9, 109,8, 95, 73,8, 66,9, 54, 41. Berdasarkan

ion molekuler yang didukung dengan pola fragmentasi, semakin menunjukkan bahwa senyawa pada puncak 2 merupakan senyawa asam linoleat. Berdasarkan literatur asam linoleat mempunyai *base peak* pada m/z 67.



Gambar 4.17 Spektra MS puncak 3

Gambar 4.17 merupakan spektra MS puncak 3. Senyawa ini memiliki berat molekul (m/z) 296 dan memiliki puncak dasar m/z 66,9. Selanjutnya puncak-puncak yang muncul pada fragmentasi senyawa tersebut adalah m/z 294, 270, 226,9, 199, 170,9, 142,8, 108,8, 86,8, 66,9, 56,8, 41, dan 38. Jika dilihat dari berat molekul, pola fragmentasi dan *base peak*, tidak ada senyawa yang sesuai dengan hasil tersebut. Namun jika dilihat dari *library*, peak-peak tersebut mempunyai kemiripan dengan pola fragmentasi senyawa 9-asam oktadekanoat (z) atau asam oleat.

Berdasarkan nilai R_t pada kromatogram, ion molekuler, *base peak*, dan pola fragmentasi pada spektra MS, sangat dimungkinkan pada minyak bekatul terfermentasi 5 hari pada suhu 37 °C mengandung 3 senyawa yaitu asam palmitat, asam linoleat, dan asam oleat dengan kandungan terbanyak yaitu asam oleat. Ketiga puncak senyawa hasil analisis spektrofotometer massa dapat dilihat pada Tabel 4.8

Tabel 4.8 Spektra MS minyak bekatul terfermentasi 5 hari pada suhu 37 °C

Peak	tR (menit)	% Area	BM / Rumus Molekul	Nama Senyawa
1	23,971	38,12	270 / C ₁₇ H ₃₄ O ₂	Asam heksadekanoat/ asam palmitat
2	25,605	22,66	294 / C ₁₉ H ₃₄ O ₂	9,12-asam oktadekanoat/ asam linoleat
3	25,659	39,21	296 / C ₁₉ H ₃₆ O ₂	9-asam oktadekanoat (z)/ asam oleat

Tabel 4.8 menunjukkan bahwa terdapat 3 kemungkinan senyawa yang ada pada sampel minyak bekatul. luas area terbesar terdapat pada puncak ke-3 yaitu 39,21% dengan waktu retensi 25,659 menit yang merupakan senyawa dengan rumus C₁₉H₃₆O₂ dengan nama senyawa 9-asam oktadekanoat (z) yang merupakan derivat senyawa asam oleat.

Hasil pada Tabel 4.8 menunjukkan bahwa minyak bekatul terfermentasi mempunyai kandungan asam lemak jenuh rantai panjang yaitu asam palmitat lebih banyak dari pada minyak bekatul tanpa fermentasi. Asam palmitat merupakan asam lemak sumber kalori yang merupakan penyusun utama minyak sawit dan minyak kelapa.

Tabel 4.9 Perbandingan Hasil Analisis Senyawa Asam Lemak Minyak Bekatul Terfermentasi

No	Asam Lemak	% Area	Nama Senyawa
1	16:0	27,24	Asam Palmitat
2	18:0	2,38	Asam stearat *
3	18:1	15,22	Asam oleat
4	18:2	44,89	Asam linoleat
5	20:0	1,81	Asam eikosoanoat *
6	20:1	1,64	Asam eikosenoat *

Sumber: Sukma (2010)

*: senyawa yang tidak didapatkan pada penelitian ini

Kandungan asam lemak pada penelitian ini lebih sedikit jika dibandingkan dengan penelitian Sukma dkk., 2010 yang menghasilkan 6 senyawa asam lemak. Perbedaan hasil tersebut dimungkinkan karena terdapat perbedaan sensitivitas instrumen. Dapat dilihat bahwa senyawa-senyawa dengan konsentrasi kecil seperti asam stearat, asam eikosanoat, dan asam eikosenoat tidak muncul dalam penelitian ini. Instrumen yang dipakai pada penelitian ini tidak mampu mendeteksi senyawa-senyawa dengan konsentrasi kecil. Kandungan asam lemak tak jenuh terutama asam oleat dalam minyak bekatul menjadikan minyak bekatul dapat menurunkan kadar kolesterol darah (Mayes, 2013). Selain itu asam lemak tak jenuh asam alfa linolenat (omega-3) dianggap penting untuk memfungsikan otak dan retina secara baik (Sartika, 2008).

BAB V

PENUTUP

5.1. Kesimpulan

1. Randemen tertinggi dan kadar FFA terendah diperoleh pada sampel bekatul terfermentasi dengan lama fermentasi 5 hari menggunakan suhu fermentasi 37 °C dengan hasil masing-masing sebesar 13,4% dan 6,91%. Hasil tersebut lebih baik dibandingkan dengan randemen dan kadar FFA sampel bekatul tanpa fermentasi yaitu sebesar 10,2% dan 10,15%.
2. Minyak bekatul terfermentasi mengandung tiga senyawa asam lemak yaitu asam palmitat, asam linoleat, dan asam oleat dengan berat molekul masing-masing 270, 294, 296 dengan kadar masing-masing asam lemak secara berurutan yaitu 38,12%, 22,66%, dan 39,21%.

5.2. Saran

Esterifikasi asam lemak lebih dimaksimalkan pada proses refluks dengan menggunakan pemanasan dan waktu refluks ditambah 30 menit. Sehingga proses reaksi esterifikasi lebih maksimal dan senyawa metil ester yang teridentifikasi lebih jelas.

DAFTAR PUSTAKA

- Adigarha, M. R. 2012. Optimasi Ekstraksi Rice Bran Oil dari Bekatul dengan Pretreatment Fermentasi Menggunakan *Aspergillus niger*. ETD. UGM.
- 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.
- Agustina, S. 2008. Penentuan Kadar Asam Lemak Bebas dari CPO Non Edible Oil yang diperoleh dari Pencampuran CPO dan PFAD (4:1). *Skripsi*. Universitas Sumatra Utara.
- Al-Maraghi, A. M. 1996. Terjemah Tafsir Al-Maraghi 4. Semarang: Cv Toha Putra.
- Ansel, H.C. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi. Edisi III*. Jakarta: UI Press.
- Astawan, M. 2009. *Sehat dengan Hidangan Kacang dan Biji-bijian*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pertanian. 2007. Mengolah Dedak menjadi Minyak (*Rice Bran Oil*). *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian*. 29 (4).
- Barnett, H. L., Hunter, B. B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi, 4 Edition. *Macmillian Publishing Company*, New York, NY. 218.
- Buckle, K. A. 1978. *Ilmu Pangan*. Jakarta: Penerbit UI PRESS
- Cahyanine, M., Estiasih, E., dan Nisak, F. C. 2008. Fraksi Kaya Tokoferol dari Bekatul Beras dengan Teknik Rekrystalisasi Pelarut Suhu Rendah. *Jurnal Teknologi Pertanian* . 9 (3) : 165-172
- Carey, F.A. 2000, *Organic Chemistry 4th Edition*, McGraw Hill, Amerika
- De R.N.M., Bots, M.L., dan Katan, M.B. 2001. Replacement of dietary saturated faty acid by trans fatty acids lowers serum HDL cholesterol and impairs endothelial function in healthy men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 21(7): 1233-7
- Delvian. 2006. *Koleksi Isolat Cendawan Mikrozia Arbuskula Asal Hutan Pantai*. Universitas Sumatera Utara.
- Dewi, C., Pangastuti, A., dan Tjahjadi, P. 2005. Produksi Gula Reduksi oleh *Rhizopus oryzae* dari Substrat Bekatul. *Bioteknologi* 2 (1): 21-26

- Dewi, M. A. P. 2007. Stabilisasi Bekatul dalam Upaya Pemanfaatannya Sebagai Pangan Fungsional. Ilmu dan Teknologi pangan. Universitas Udayana.
- Diana, A.S., Ardiana D., Gita P., dan Bening Y.G., 2012. Polaritas Pelarut Sebagai Pertimbangan Dalam Pemilihan Pelarut Untuk Ekstraksi Minyak Bekatul Dari Bekatul Varietas Ketan (*Oriza Sativa Glatinosa*). *Simposium Nasional. RAPI XI FT UMS*
- Enie, A.B., dan Hasibuan, S.A. 1986. Fermentasi pellet ketela pohon dengan kapang tempe (*Rhizopus oryzae*) dan kapang kecap (*Rhizopus oligosporus*). *Med. Pet.* 3: 38-42
- Fardiaz, S. 1992. Mikrobiologi Pangan. PAU Pangan dan Gizi IPB. Jakarta : Gramedia.
- Fasya, A. G. 2011. *Sintesis Metil 10,12,14-oktadekatrienoat dari (Asam α -linoleat) Biji Salisih (*Ocimum basilicum*) dan Uji Bioaktifitasnya*. Thesis : Universitas Brawijaya Malang
- Feridoun S. A., Omid, P., dan Yoshidaa, H. 2010. Production of phenolic compounds from rice bran biomass under subcritical water conditions. ScienceDirect. *Chemical Engineering Journal* 160 : 259-266.
- Fikriyah, Z. 2018. *Pengaruh Lama Fermentasi dan Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Antioksidan Bekatul Terfermentasi Oleh *Rizhopus oryzae**. Skripsi. UIN Maliki Malang.
- Goffman, F.D., Pinson,S., dan Bergman, C. 2003. Genetic Diversity For Lipid Content And Fatty Acid Profile in Rice Branc. *J. Am. Oil Chem Soc.* 485-490.
- Gopala, K. 2006. Study on the composition of rice bran oil and its higher free fatty acids value. *J Amer Oil Chem Soc.* 83 : 117-20.
- Guenther, E. 1987. *Minyak Atsiri Jilid 1*. Jakarta : UI Press.
- Hadipernata, M. 2007. *Mengolah Dedak menjadi Minyak (Rice Bran Oil)*. Balai Penelitian dan Pengembangan Pasca Panen Pertanian Bogor.
- Hadipernata, M. 2007. *Mengolah Dedak menjadi Minyak (Rice Bran Oil)*. *Balai Penelitian dan Pengembangan Pasca Panen Pertanian Bogor.* 29 (4).
- Harbone, J.B. 1987. Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan, Terbitan Ke-2, Terjemahan K. Bandung: Penerbit ITB.
- Hart, H., Leslie, E., Craine., dan David J. H. 1990. *Kimia Organik. Terjemahan Seminar Setiadi Achmadi*. Jakarta: Erlangga.

- Hart, H., Craine, L. E., dan David, J. H. 2003. *Kimia Organik Suatu Kuliah Singkat*. Jakarta: Erlangga.
- Hasanah, N. 2003. Hidrolisis dan Rekonstruksi Triglicerida. *Skripsi*. Bogor: IPB.
- Herdyastutu, N., Raharjo, T. J., Mudasar, 2009. Kitin Dari Limbah Cangkang Udang Sebagai Media Bakteri Kitinolitik yang Diisolasi Dari Lumpur Sawah. *Jurnal Manusia dan Lingkungan*. 16(2): 115 – 121.
- Herwanda, A. E. 2011. Kajian Proses Pemurnian Minyak Biji Bintaro (Cerbera manghas L) Sebagai Bahan Bakar Nabati. *Skripsi*. Teknologi Pertanian. IPB.
- Indrawati, I., Djajasupena, S. 2005. Isolasi Jamur dari Seresah dan Uji Keefektifannya dalam Penguraian Selulosa. *Jurnal Ilmiah Biologi*. 4 (2). 18 – 21.
- Iqbal, 2016. Uji Aktivitas dan Identifikasi Senyawa Antioksidan dari Ekstrak Minyak Bekatul Beras Ketan Hitam (*Oryza sativa* Glutinosa). *Skripsi* : Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Irfan, M., Nadeem, M., dan Syed, Q. 2012. Media Optimasi for Amylase Production in Solid State Fermentation of Wheat Bran by Fungal Strains. *Jurnal of Cell and Molecular Biology*, 10(1): 55 – 64.
- Ishak, Aji, A., Israwati, 2016. Pengaruh Waktu Fermentasi Dan Berat Bonggol Nanas Pada Pembuatan *Virgin Coconut Oil* (VCO). *Jurnal Teknologi Kimia*, UNIMAL 5(1): 66 – 77.
- Issara, U., Rawdkuen, S. 2016. Rice bran: a potential of main ingredient in healthy beverage. *International Food Research Journal* 23(6): 2306-2318
- Janathan. 2007. karakteristik Fisikokimia tepung Bekatul serta Optimasi Formulasi dan Pendugaan Umur simpan Minuman Campuran Susu skim dan tepung Bekatul. *Skripsi*. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Jang, D.H., Y. Lin, S. S., dan Yang. 2000. Polyunsaturated fatty acid production mortierella alpina by solid substrate fermentation. Department of Agricultural Chemistry, National Taiwan University, Taipei. *Botanicsl Bulletin of Academia Sinica*. 41.
- Kahlon, T., Chow, F.I. 1997. Hypocholesterolemic effects of oat, rice and barley dietary fiber and fractions. *Cereal Food World*, 42 : 86-92.

- Kelley, W. D. 1977. Interaction of *Phytophthora Cinnamomi* and *Trichoderma* spp. In relation to propagule production in soil cultures at 26 degrees C. *Can J Microbiol.* 23: 288 – 294.
- Ketaren, S. 1986. Minyak dan lemak Pangan. Cetakan Pertama. Jakarta: UI Press. 18-32, 66-69, 263-267.
- Khopkar, S.M. 2008. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Pres.
- Kupongsak, S., Lucharit, P. 2013. Process Development for Lipase Extraction and the Effect of Extracted Lipase on Triglyceride Base System. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.* 4 (4): 1247.
- Kuriyan, R., Gopinath, N., Vas, M., dan Kurpad, A. V. 2005. Use of rice bran oil in patients with hyperlipidaemia. *The National Medical Journal of India.* 18 (6).
- Kusmiyati, 2008. Reaksi katalis esterifikasi asam oleat dan metanol menjadi biodiesel dengan metode distilasi reaktif. *Jurnal Reaktor,* 12(2): 78 – 82.
- Latifah, U. 2018. Pengaruh Jenis Pelarut Dan Suhu Terhadap Ekstrak Minyak Bekatul Padi (*Oryza Sativa*). *Skripsi: Universitas Muhammadiyah Surakarta.*
- Luh, 1991. Properties of The Rice Carryopsis. In The Rice Production. 2nd ed. *PublishingCo., Wespaort, CT.pp.* 1 (6): 389-314
- Mahajati, R. 2008. Efektivitas bungkil biji jarak pagar (*Jatropha curcas L*) yang difermentasi berbagai jenis kapang sebagai pakan mencit (*Mus musculus*). *Skripsi: Fakultas Peternakan. Institut Pertanian Bogor*
- Mardiah, 2006. Pengaruh Asam Lemak dan Konsentrasi Asam Terhadap Karakteristik dan Konversi Biodiesel Pada Transesterifikasi Dedak Padi. *Skripsi: Institut Teknologi Sepuluh November (ITS) Surabaya.*
- Marlina, L., Ramdan, I. 2017. Identifikasi Asam Lemak Bebas pada Berbagai Jenis Minyak Goreng Nabati. *TEDC.* 11 (1).
- Mas'ud F., dan Pabbenteng. 2016 Rasio Bekatul Padi dengan Pelarut pada Ekstraksi Minyak Bekatul Padi. *Journal INTEK.* 3 (2) : 82-86.
- Mayes, P.A. 2003. Biosintesis Asam Lemak. Biokimia. Jakarta
- Matsjeh, S. 1993. *Kimia Organik Dasar I.* Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Yogyakarta: UGM

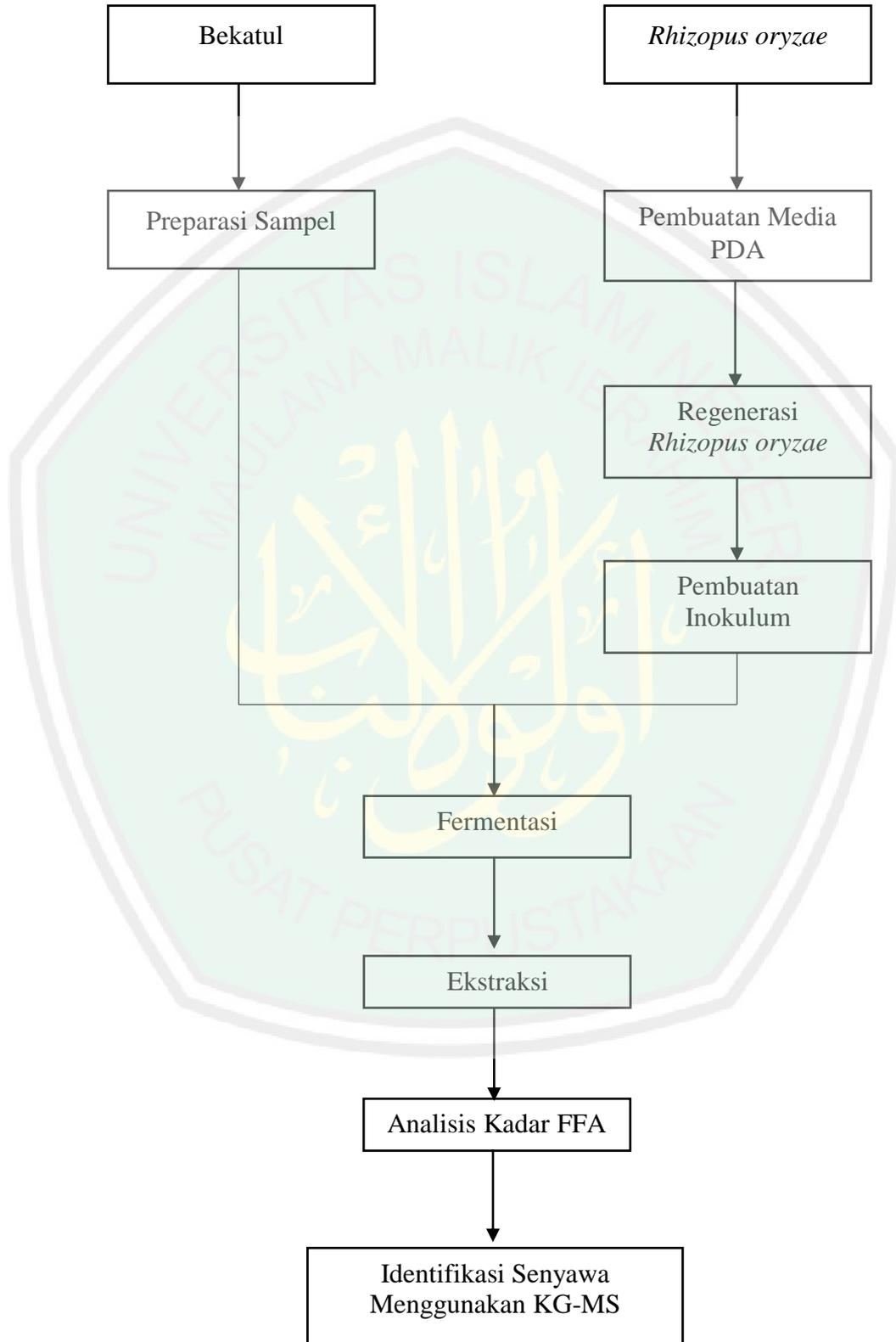
- Mingyai, S., Kettawan, A., Srikaeo, K. 2017. Physicochemical and Antioxidant Properties of Rice Bran Oils Produced from Colored Rice Using Different Extraction Methods. *Journal of Oleo Science*. 66, (6): 565 – 572.
- Most, M. M., Tulley, R., M. Silvia., Lefevre., dan Michael. 2005. Rice bran oil, Not Fiber, *Lower Cholesterol in Humans 1-3*. *American Journal Clincinal Nutrition*. Vol. 81: 64-8.
- Nasir, S., Fitriyanti, Kamila. H. 2009. Ekstraksi Dedak Padi Menjadi Minyak Mentah Dedak Padi (Crude Rice Bran Oil) Dengan Pelarut N-Hexane Dan Ethanol. *Jurnal Teknik Kimia*. 2 (16).
- Nawang Sari, R.T. 1996. Berbagai Penggunaan Sumber Karbon dan Produksi Minyak Sel Tunggal Oleh Kapang *Mucor inaequisporus* M05II/4. *Skripsi*. Teknologi Hasil Pertanian. UGM. Yogyakarta.
- Nimitz, J.S., 1991. *Experiments In Organic Chemistry From Microscale to Macroscale*. Prentice Hall, new Jersey.
- Nurul, 2010. Pengaruh Lama Fermentasi Menggunakan *Rhizopus Oryzae* Terhadap Protein Kasar Dan Serat Kasar Ampas Sagu (Metroxilon Rumphii). *Skripsi*. Fakultas Peternakan. Institut Pertanian Bogor
- Nuryono, T. I., dan Pranowo, D. 2006. Petunjuk Praktikum Kimia Anorganik. Laboratorium Kimia Dasar. Yogyakarta: FMIPA UGM
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: UI-Press.
- Pujaningsih, I.R. 2015. *Teknologi Fermentasi dan Peningkatan Kualitas Pakan. Laboratorium Makanan Ternak. Fakultas Peternakan. Universitas Diponegoro*.
- Purwanto, A., Fajriyati, A. N., Wahyuningtyas, D. 2014. Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Randemen dan Aktivitas Antioksidan dalam Ekastrak Minyak Bekatul Padi (*Rice Bran Oil*). *Ekulibrium*. 13(1): 29 – 34.
- Pradana, R. C., Soetjipto, H., Kristijanto, A.I., 2014, Karakterisasi dan Komposisi Kimia Minyak Biji Petai Cina (*Leucaena Leucochepala* (Lam.) de Wit), *Skripsi*, Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga.
- Pribadi, W. 2005. Pengaruh konsentrasi hidrolisat pati sagu dan jenis sumber nitrogen terhadap produksi asam laktat oleh *Rhizopus oryzae*. *Skripsi*. Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Rana, P.S., dan Sony, G. 2004. In Vivo antioksidant potential rice bran oil (RBO) in albino rats. *Indian J. Physol Pharmacol*. 48 (4)

- Rao B.S.N. 2000. Nutritive Value of Rice Bran. Nutrition Foundation of *India*: 58
- Ratledge dan Waynn, 2002. *Advances in Applied Microbiology*. J51
- Razak, Dang L. A., Nur Y. A. R., Anisah J., Shaiful A. S., dan Kamariah Long. 2014. Enhancement of Phenolic Acid Content and Antioxidant Activity of Rice Bran Fermented with *Rhizopus oligosporus* and *Monascus purpureus*. *Biotechnology Research Center, Malaysia Agricultural Research and Development*, 14(2): 26–32.
- Rukmini, C. 1986. *Rice bran oil and hypocholesterolemia in rats*. *Lipids*, 21:715-717.
- Sahara, E., Yosi, F., dan Sandi, S., 2016. Peningkatan Asam Lemak Tak Jenuh (Pufas) Dengan Menggunakan *Rhizopus Oryzae* Dalam Fermentasi Bekatul. *Jurnal Lahan Suboptimal*. 5 (1): 78-84
- Sartika, R. A. D. (2008). Pengaruh Asam Lemak Jenuh Tidak Jenuh dan Asam Lemak Trans Terhadap Kesehatan. *Jurnal Kesehatan Masyarakat Nasional*, Vol.2, No.4, p.154-160
- Shakti, D. P. dan Fatmawati, D. 2013. Reaksi metanolisis limbah minyak ikan menjadi metil ester sebagai bahan biodiesel dengan menggunakan katalis NaOH. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*, 2: 68 – 75.
- Sofia, L. 2006. *Isolasi dan Uji Bioaktivitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah dengan Metode Uji Brine Shrimp*. Medan: USU Press.
- Sudjadi, 1988. *Metode Pemisahan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Sukma, L. N., Gun, G. G., dan Zackiyah. 2010. Pengkayaan Lemak Tak Jenuh Pada Bekatul Dengan Cara Fermentasi Padat Menggunakan *Aspergillus Terius*. *Journal Sains dan Teknologi Kimia*. 1 (1): 66-72
- Supratman, 2010. *Elusidasi Struktur Senyawa Organik*. Bnadung: Widya Padjajaran.
- Susanti A.D., Ardiana D., Gumelar G. P., Polaritas Pelarut Sebagai Pertimbangan Dalam Pemilihan Pelarut Untuk Ekstraksi Minyak Bekatul Dari Bekatulvarietas Ketan (*Oriza Sativa Glatinosa*). *Simposium Nasional RAPI XI FT UMS*
- Suprijana, O., Hidayat., Ace, T., Soedjanaatmadja., dan Ukun. MS. 2002. Bekatul Padi Sebagai Sumber Produksi Minyak dan Isolat Protein. *Jurnal Bionatura*. 4 (2), pp.61-68

- Suryati, Ismail, A., Afryanti. 2015. Proses Pembuatan Minyak Dedak Padi (*Rice Bran Oil*) menggunakan Metode Ekstraksi. *Jurnal Teknologi Kimia Unimal*. 4 (2): 37 – 45.
- Taurita, M., Z., Sadek N., F., Sukarno, Yuliana, N., D. 2017. Pengembangan Bekatul sebagai Pangan Fungsional: Peluang, Hambatan, dan Tantangan. *Ilmu dan Teknologi Pangan*. IPB.
- Utami, C. 2009. Studi In Vivo Produk Sereal dari Tepung Bekatul dan Tepung Ubi Jalar Sebagai Pangan. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. 14 (2)
- Wang H., A.M. Jenner, C.Y., Lee, G., Shui, S.Y., Tang, M., Whiteman, M.R. Wenk., dan Halliwell, B. 2007. The identification of antioxidants in dark soy sauce. *Free Radicals Research*. 41: 479-488.
- Widiyarti G., dan Hanafi M. 2008. Pengaruh konsentrasi katalis dan perbandingan molaritas reaktan pada sintesis senyawa α monolaurin. *J Reaktor*. 12(2): 90-97.
- Winarno, F. G. S., dan Fardiaz, D. 1986. *Pengantar Teknologi Pangan*. Gramedia, Jakarta.
- Xu, Z., dan Godber, JS. 2000. Comparison of supercritical fluid and solvent extraction method in extracting, gamma oryzanol from rice bran, *Journal of the American oil chemist' societe* 77: 1127-1131.
- Xu, Z., Hua, N., dan Godber, JS. 2001. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols and γ -oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride. *J. Agric.Food Chem.*; 49: 2077-81.
- Yogita, P., dan Amit, P. 2017. Rice Bran Oil: A Versatile Source for Edible and Industrial Applications. *Journal of Oleo Science. J. Oleo Sci.* 66 (6): 551-556.
- Yosi, F., Sahara, E., dan Sandi, S. 2014. Analisis Sifat Fisik Bekatul dan Ekstrak Minyak Bekatul Hasil Fermentasi *Rhizopus sp.* dengan Menggunakan Inokulum Tempe. *Jurnal Peternakan Sriwijaya*. 3 (1): 7-13.
- Zhang, M. W. 2010. Phenolic Profiles and Antioxidant activity of Black Rice Bran of Different Commercially Available Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(13): 7580 – 7587.
- Zulkarnain, A., Amelia, S., Syaiful. 2009. Hidrolisa minyak jagung (*corn oil*) secara enzimatik, penentuan kondisi optimum, permodelan matematik dan penentuan konstanta kapasitas. *Jurnal Teknik Kimia*, 3 (16).

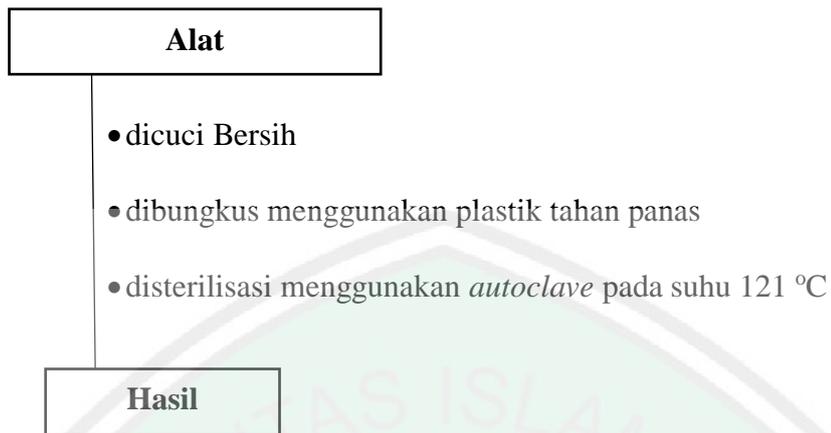
LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian

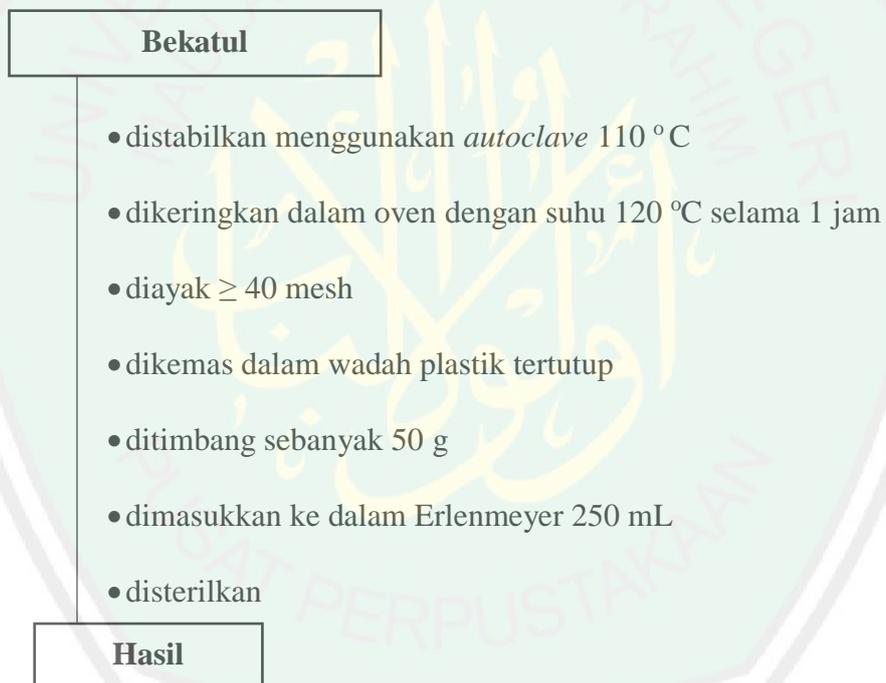


Lampiran 2. Diagram Alir

L.2.1 Sterilisasi Alat



L.2.2 Preparasi Bekatul



L.2.3 Pembuatan Media *Potato Dextrosa Agar* (PDA)

PDA

- ditimbang 4 gr PDA
- dilarutkan dalam 100 mL aquades
- dipanaskan hingga mendidih dengan distirer
- dituang ke dalam 16 buah tabung reaksi
- ditutup mulut tabung reaksi dengan kapas dan plastik *warp*
- disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C
- didinginkan dalam keadaan miring hingga memadat

Hasil

L.2.4 Regenerasi *Rhizopus oryzae*

Jamur *Rhizopus oryzae*

- digoreskan 1 ose biakan dari stok jamur ke media PDA yang masih baru secara aseptis
- diinkubasi pada suhu ruang selama 120 jam

Hasil

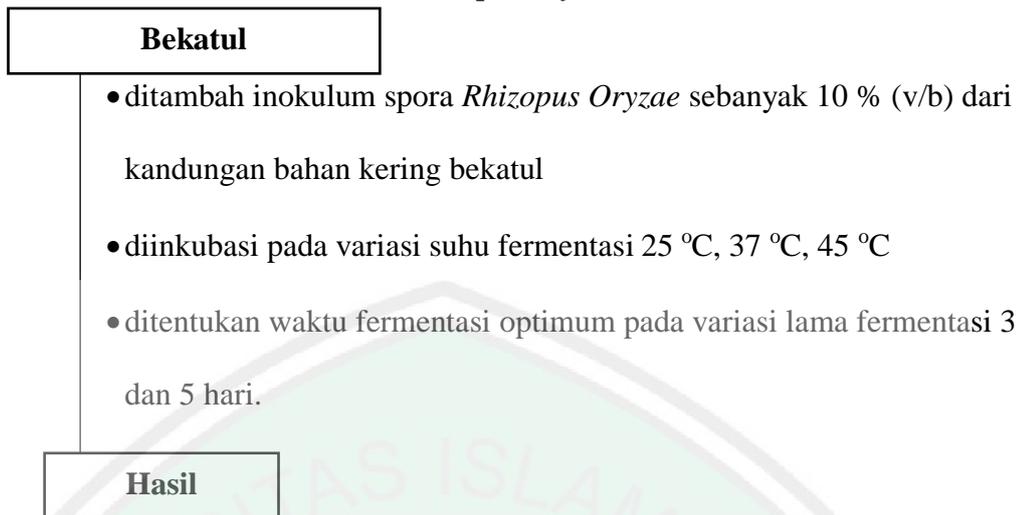
L.2.5 Pembuatan Inokulum *Rhizopus oryzae*

Jamur *Rhizopus oryzae*

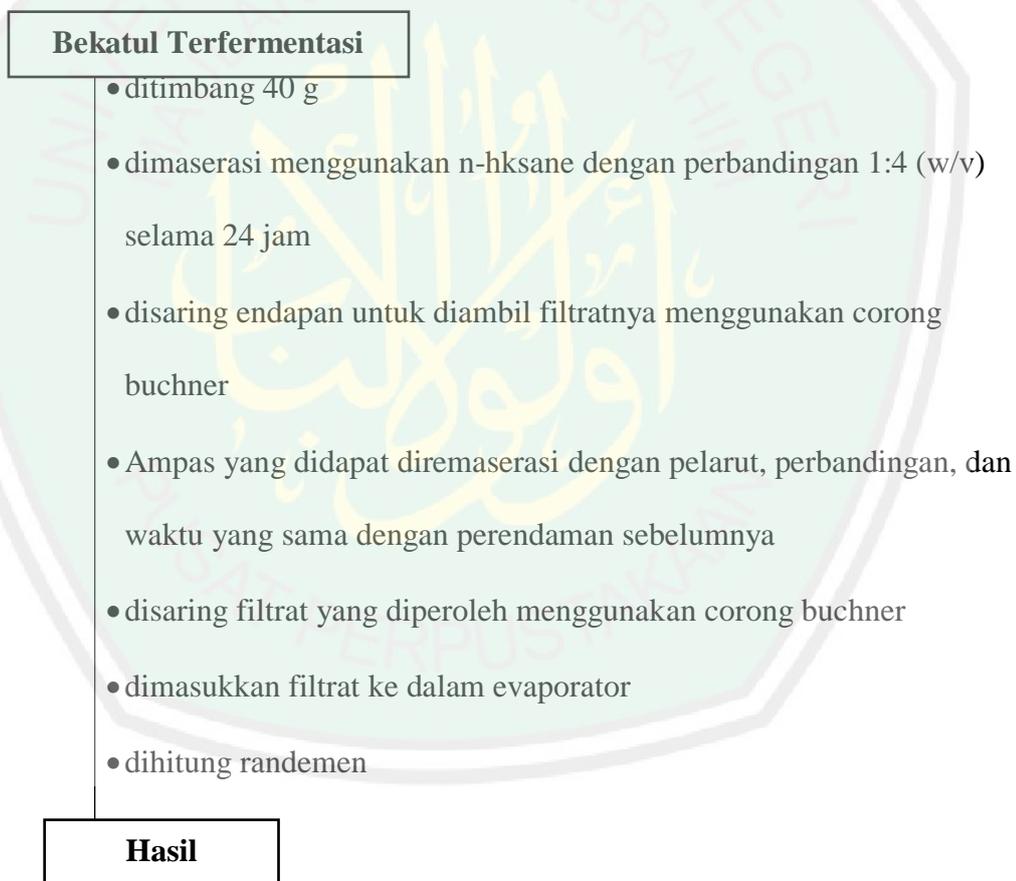
- diambil sebanyak 4 ose
- diinokulasikan ke dalam 10 mL aquades steril secara aseptik
- divortex hingga larutan keruh

Hasil

L.2.6 Fermentasi Bekatul Oleh *Rhizopus oryzae*



L.2.7 Ekstraksi Minyak Bekatul Terfermentasi Oleh *Rhizopus oryzae*



L.2.8 Analisis Kadar FFA

Minyak Bekatul

- ditimbang 2,5 gram
- dimasukkan dalam Erlenmeyer 250 mL
- ditambahkan 25 mL alkohol netral 95% dan 10 mL n-heksan
- dipanaskan 10 menit sambil diaduk
- didinginkan
- dititrasi dengan KOH 0,1 N dengan indikator pp
- diamati perubahan warna yang terjadi
- dihitung kadar FFA

Hasil

L.2.9 Hidrolisis Minyak Bekatul

Minyak bekatul Terfermentasi

- dimasukkan 1 gram minyak bekatul hasil ekstraksi ke dalam erlenmeyer
- ditambahkan dengan 5 mL metanol dan KOH 12%.
- direfluks pada suhu 60 °C selama 90 menit
- ditambahkan sebanyak 40 mL aquades dan 20 mL pelarut terbaik
- dikocok dan didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan
- diambil lapisan air ditambahkan dengan asam sulfat 1M hingga pH 1
- ditambahkan dengan 20 mL pelarut terbaik
- dilakukan pemisahan dan diambil fase organik
- dipekatkan menggunakan N₂

Hasil

L.2.10 Esterifikasi Asam Lemak

Minyak bekatul Terfermentasi Hasil Hidrolisis

- diambil 0,4 gram asam lemak hasil hidrolisis dan dimasukkan kedalam erlenmeyer
- ditambah 0,5 mL H_2SO_4 dan 2,4 gram metanol
- diadukan menggunakan magnetik stirer selama 60 menit

Hasil

L.2.11 Identifikasi Senyawa Menggunakan Instrumen KG-SM

Minyak Bekatul Hasil Esterifikasi

- diinjeksikan 1 μ L minyak bekatul hasil esterifikasi kedalam instrumen KG-SM
- dikondisikan instrumen sebagai berikut
- kolom *Agilent* 30 m dan diameter 0,25 mm dengan temperatur oven diprogram antara 50 °C – 300 °C, gas pembawa helium bertekanan 12.0 kPa dan total laju 15,9 mL/menit.

Hasil

Lampiran 3. Perhitungan

L.3.1 Pembuatan KOH 12%

$$\text{BM KOH} = 56 \text{ g/mol}$$

$$\text{Massa} = 56/12 = 4,6/100 = 0,046 \text{ gram}$$

$$\text{Labu takar } 5 \text{ mL} \times 0,046 \text{ g} = 0,23$$

jadi untuk membuat larutan KOH 12 % dibutuhkan 0,21 gr KOH dalam 1,75 mL aquades

L.3.2 Pembuatan Larutan H₂SO₄ 1 M

$$\text{BM} = 98,08 \text{ g/mol}$$

$$\text{Massa zat terlarut} = \text{ml Larutan} \times \text{massa jenis} \times \% \text{ massa}$$

$$\text{Mol zat terlarut} = \frac{\text{ml larutan} \times \text{massa jenis} \times \% \text{ massa}}{\text{Mr zat terlarut}}$$

$$M = \frac{1000 \times \text{massa jenis} \times \% \text{ massa}}{\text{Mr zat terlarut}}$$

$$M = \frac{1000 \times 1,84 \times 98/100}{98,08}$$

$$M = 18 \text{ mol/mL}$$

H₂SO₄ dalam 10 mL

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$18 \text{ M} \times V_1 = 1 \text{ M} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,56 \text{ mL} = 0,6 \text{ mL}$$

L.3.3 Randemen Ekstrak Minyak Bekatul Terfermentasi

$$\% \text{ Randemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sample}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Randemen} = \frac{x}{40 \text{ g}} \times 100\%$$

- Randemen Sampel S₂T₂ Ulangan 1

$$\% \text{ Randemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sample}} \times 100\%$$

$$\begin{aligned}\% \text{ Randemen} &= \frac{5.72}{40} \times 100\% \\ &= 14,3\end{aligned}$$

- Randemen Sampel S₂T₂ Ulangan 2

$$\% \text{ Randemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sample}} \times 100\%$$

$$\begin{aligned}\% \text{ Randemen} &= \frac{5.0}{40} \times 100\% \\ &= 12,5\end{aligned}$$

- Randemen Sampel S₂T₂ Rata-rata

$$\frac{14,3 + 12,5}{2} = 13,4\%$$

L.3.4 Pembuatan Larutan Pereaksi KOH 0,1 N

$$N = \frac{\frac{\text{gr}}{Mr} \times \text{Valensi}}{\text{Volume}}$$

$$0,1 = \frac{\frac{\text{gr}}{56} \times 1}{1000}$$

$$\text{gr} = 5,6$$

5,6 gram kristal KOH dilarutkan ke dalam aquades, dimasukkan ke dalam labutakar 1000 mL dan ditanda bataskan.

L.3.5 Standarisasi Larutan KOH 0,1 N

5 mL larutan H₂C₂O₄.2H₂O 0,1 N dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 mL, ditambah 5 tetes indikator pp, dititiasi dengan KOH.

$$\text{Normalitas KOH} \quad V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

Dimana: $V_1 = \text{Volume KOH (mL)}$

$$V_2 = \text{Volume H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \text{ (mL)}$$

$$N_1 = \text{Normalitas KOH}$$

$$N_2 = \text{Normalitas H}_2\text{C}_2\text{O}_4$$

L.3.6 Pembuatan Alkohol Netral

200 mL etanol ke dalam Erlenmeyer 250 ml, ditambah beberapa tetes indikator Timol Blue 1%. Ditambah beberapa tetes larutan KOH 0,1009 N.

L.3.7 Pembuatan Indikator Phenolphthalein 1%

1 gr pp dilarutkan dengan etanol, dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL ditanda bataskan

L.3.8 Kadar FFA Minyak Bekatul terfermentasi

$$\% \text{ FFA} = \frac{M \times A \times N}{1000 G} \times 100\%$$

Keterangan: M = Bobot molekul asam lemak (282 untuk asam oleat)

A = Jumlah ml KOH untuk titrasi

N = Normalitas larutan KOH

G = Bobot contoh (gram)

- Kadar FFA S₂T₂ Ulangan 1

$$\% \text{ FFA} = \frac{M \times A \times N}{1000 G} \times 100\%$$

$$\% \text{ FFA} = \frac{282 \times 1.2 \times 0.1}{1000 \times 0.5} \times 100\%$$

$$\% \text{ FFA} = 6,77\%$$

L.3.9 Persen Peningkatan

$$\% \text{ Peningkatan} = \frac{\text{Nilai sampel} - \text{Nilai Kontrol}}{\text{Nilai Kontrol}} \times 100\%$$

$$\text{Kadar Randemen S}_2\text{T}_2 = \frac{13.4 - 10.22}{10.22} \times 100\%$$

$$= \frac{3.18}{10.22} \times 100\%$$

$$\% \text{ Peningkatan S}_2\text{T}_2 = 31.11$$

Lampiran 4. Data Pengamatan**L.4.1 Kadar Randemen**

Kode	Randemen %	
	Ulangan 1	Ulangan 2
S1 T1	10,35	10,5
S1 T2	10,92	11,23
S2 T1	12,65	12,0
S2 T2	14,3	12,5
S3 T1	12,65	11,0
S3 T2	13,13	11,60
Kontrol	10,25	10,2

L.4.2 Kadar Asam Lemak Bebas

Kode	Volume NaOH (mL)				%FFA	
	Ulangan 1		Ulangan 2		Ulangan 1	Ulangan 2
	1	2	1	2		
S1 T1	1,3	1,4	1,2	1,4	7,61	7,33
S1 T2	1,4	1,2	1,2	1,3	7,33	7,05
S2 T1	1,5	1,2	1,1	1,4	7,61	7,05
S2 T2	1,2	1,3	1,2	1,2	7,05	6,77
S3 T1	1	1,8	1,6	1,7	7,90	9,31
S3 T2	1,4	1,5	1,5	1,8	8,18	9,31
Kontrol	1,7	1,9	1,8	2,1	10,15	11,00

L.4.3 Two Way Anova Randemen

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	10,811 ^a	5	2,162	2,901	,114
Intercept	1700,272	1	1700,272	2281,479	,000
Sushu Fermentasi	1,658	1	1,658	2,224	,186
Lama Fermentasi	8,998	2	4,499	6,037	,037
Suhu Fermentasi * Lama Fermentasi	,154	2	,077	,104	,903
Error	4,472	6	,745		
Total	1715,554	12			
Corrected Total	15,282	11			

L.4.5 Tukey HSD Kadar Randemen

Multiple Comparisons

Dependent Variable: RANDEMEMEN

Tukey HSD

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
LAMA_FERMEN TASI	LAMA_FERMEN TASI					
3 hari	5 hari	-2,0950*	,61043	,032	-3,9680	-,2220
	7 hari	-1,3350	,61043	,152	-3,2080	,5380
5 hari	3 hari	2,0950*	,61043	,032	,2220	3,9680
	7 hari	,7600	,61043	,472	-1,1130	2,6330
7 hari	3 hari	1,3350	,61043	,152	-,5380	3,2080
	5 hari	-,7600	,61043	,472	-2,6330	1,1130

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,745.

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

L.4.6 Tukey HSD Kadar Randemen

RANDEMEMEN

Tukey HSD

LAMA_FERMENTASI	N	Subset	
		1	2
3 hari	4	10,7600	
7 hari	4	12,0950	12,0950
5 hari	4		12,8550
Sig.		,152	,472

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,745.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

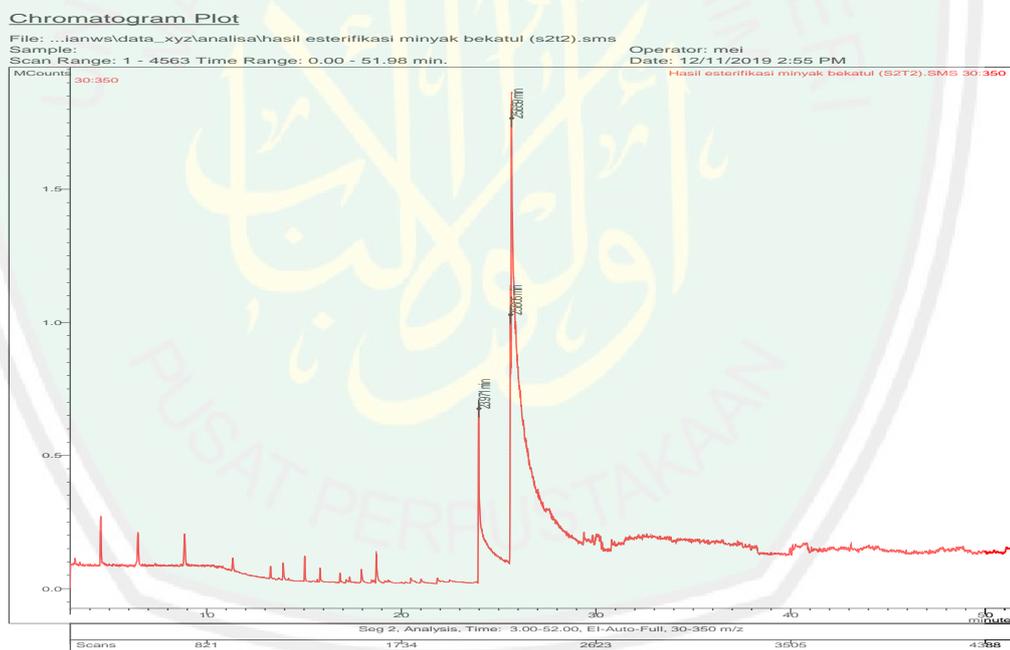
b. Alpha = ,05.

L.4.7 Two Way Anova Kadar FFA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5,962 ^a	5	1,192	3,741	,070
Intercept	712,959	1	712,959	2236,679	,000
Suhu Fermentasi	,104	1	,104	,326	,589
Lama Fermentasi	5,687	2	2,844	8,921	,016
Suhu Fermentasi * Lama Fermentasi	,171	2	,086	,269	,773
Error	1,913	6	,319		
Total	720,834	12			
Corrected Total	7,875	11			

Lampiran 5. Data Analisis KG-SM

L.5.1 Hasil Kromatografi Gas Minyak Beaktul Terfermentasi

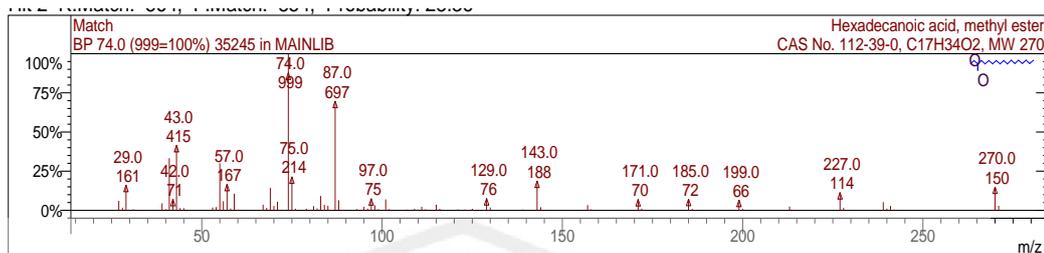


Target Compounds

Compd. Number	RT (min)	Area	Amount/RF
1	23.971	211395	211395
2	25.605	125665	125665
3	25.659	217386	217386

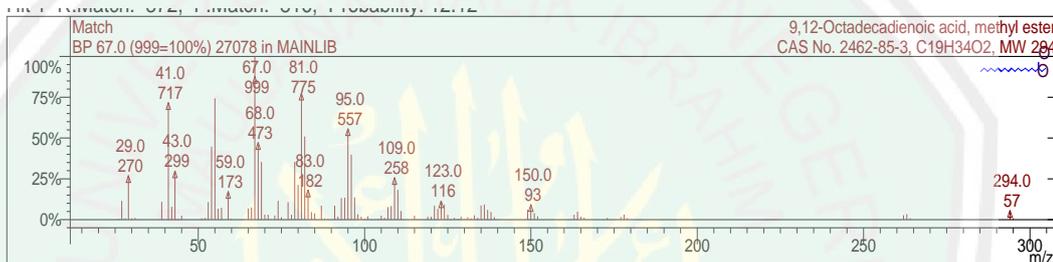
L.5.2 Hasil Spektrofotometer Massa Minyak Bekatul Terfermentasi

L.5.2.1 Puncak Ke-1



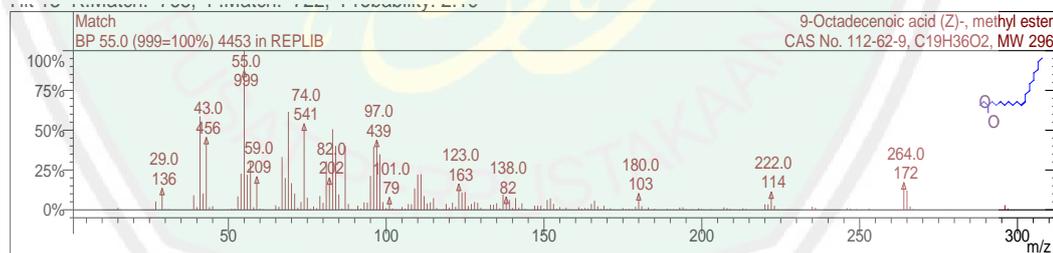
Spectrum 35245 from MAINLIB Library
Name: Hexadecanoic acid, methyl ester
Pair Count: 152 MW: 270 Formula: C17H34O2
CAS No: 112-39-0 Acquired Range: 26.0 - 272.0 m/z

L.5.2.2 Puncak Ke-2



Spectrum 27078 from MAINLIB Library
Name: 9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester
Pair Count: 123 MW: 294 Formula: C19H34O2
CAS No: 2462-85-3 Acquired Range: 25.0 - 295.0 m/z

L.5.2.3 Puncak Ke-3



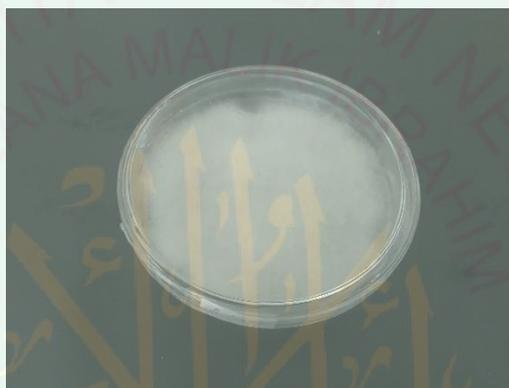
Spectrum 4453 from REPLIB Library
Name: 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester
Pair Count: 208 MW: 296 Formula: C19H36O2
CAS No: 112-62-9 Acquired Range: 15.0 - 298.0 m/z

Lampiran 6. Dokumentasi Penelitian

L.6.1 Preparasi Sampel



L.6.2 Regenerasi Jamur *Rhizopus oryzae*



L.6.3 Fermentasi Bekatul



L.6.4 Ekstraksi Minyak Bekatul



L.6.5 Pengujian Kadar FFA%



L.6.6 Hidrolisis Minyak Bekatul

