

**PENGARUH PELARUT TERHADAP PENINGKATAN KONSENTRASI
TOTAL FENOLIK DAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK
BEKATUL TERFERMENTASI *Rhizopus oryzae***

SKRIPSI

**OLEH:
KHARISMA MUTMAINNAH
NIM. 18630113**



**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2022**

**PENGARUH PELARUT TERHADAP PENINGKATAN KONSENTRASI
TOTAL FENOLIK DAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK
BEKATUL TERFERMENTASI *Rhizopus oryzae***

SKRIPSI

**OLEH:
KHARISMA MUTMAINNAH
NIM. 18630113**

**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)**

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2022**

PENGARUH PELARUT TERHADAP PENINGKATAN KONSENTRASI
TOTAL FENOLIK DAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK
BEKATUL TERFERMENTASI *Rhizopus oryzae*

SKRIPSI

Oleh:
KHARISMA MUTMAINNAH
NIM. 18630113

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 12 Desember 2022

Pembimbing I



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

Pembimbing II



Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I
NIDT. 19890113 20180201 1 244

Mengetahui
Ketua Program Studi


Raehmawati Angsih, M.Si
NIP. 19810804 200501 2 010

PENGARUH PELARUT TERHADAP PENINGKATAN KONSENTRASI
TOTAL FENOLIK DAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK
BEKATUL TERFERMENTASI *Rhizopus oryzae*

SKRIPSI

Oleh:
KHARISMA MUTMAINNAH
NIM. 18630113

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan untuk
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 12 Desember 2022

Penguji Utama	: Eny Yulianti, M.Si NIP. 19760611 200501 2 006	(.....)
Ketua Penguji	: Dr. Anik Maunatin, MP NIDT. 19760105 20180201 2 248	(.....)
Sekretaris Penguji	: Dr. Hj. Akyunul Jannah, S.Si, M.P NIP. 19750410 200501 2 009	(.....)
Anggota Penguji	: Oky Bagas Prasetyo M.Pd.I NIDT. 19890113 20180201 1 244	(.....)

Mengesahkan
Ketua Program Studi



Rachmawati Nugrah, M.Si
NIP. 19810801 200801 2 010

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Kharisma Mutmainnah
NIM : 18630113
Program Studi : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Skripsi : Pengaruh Pelarut Terhadap Peningkatan Konsentrasi
Total Fenolik dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak
Bekatul Terfermentasi *Rhizopus oryzae*

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

Malang, 22 Desember 2022
yang membuat pernyataan



Kharisma Mutmainnah
NIM. 18630113

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah dengan penuh rasa syukur kepada Allah SWT. Saya mengucapkan terimakasih atas segala nikmat yang telah diberikan. Shalawat serta salam semoga tetap tercurah limpahkan kepada Nabi Muhammad SAW. sebagai bentuk rasa cinta yang besar kepada beliau.

Sebagai bentuk terimakasih, skripsi ini saya persembahkan kepada:

1. Kedua orang tua yaitu Bapak Basori Alwi dan Ibu Sulastri yang senantiasa memberikan semangat, motivasi, dukungan dan doa restu kepada saya dalam menuntut ilmu.
2. Adik saya, Saila Farizqiyah dan seluruh keluarga besar yang senantiasa memberikan doa dan semangat kepada saya dalam menuntut ilmu.
3. Pembimbing Skripsi, Ibu Dr. Hj Akyunul Jannah, S.Si. M.P dan Bapak Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I yang telah sabar membimbing, memberi banyak ilmu, pengalaman, dan motivasi
4. Penguji Skripsi, Ibu Dr. Anik Maunatin, S.T. MP dan Ibu Eny Yulianti, M.Si yang telah memberikan banyak pengarahan, bimbingan, saran, dan motivasi kepada penulis sampai terselesaikannya naskah skripsi dengan baik.
5. Sahabatku, Nur Kamilah Shafiyanti dan Maulinda Putri Anggraini yang selalu setia menemani dalam proses penyusunan skripsi ini.

Malang, 21 Desember 2022

Kharisma Mutmainnah
NIM. 18630113

MOTTO

خَيْرُ النَّاسِ أَنْفَعُهُمْ لِلنَّاسِ

“Sebaik-baik manusia adalah yang paling bermanfaat bagi manusia.”

**Kunci Ketenangan, Kebahagiaan, Kesejahteraan dan Keharmonisan Hidup
Berada Pada Keseimbangan Berperilaku. Untuk Mencapainya Harus
Menjaga Keharmonisan Hubungan Dengan Tuhan Yang Maha Esa, Sesama
Makhluk Dan Alam Lingkungan.**

KATA PENGANTAR

السلام عليكم ورحمة الله وبركاته

Syukur alhamdulillah atas kehadiran Allah SWT. yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah skripsi yang berjudul “**Pengaruh Pelarut Terhadap Peningkatan Konsentrasi Total Fenolik dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Bekatul Terfermentasi *Rhizopus oryzae***”. Shalawat dan salam senantiasa penulis haturkan kepada Nabi Muhammad SAW, sang tauladan yang telah menunjukkan jalan kebenaran melalui ajaran agama Islam.

Naskah skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan Pendidikan Strata Satu (S1) Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

Penulis menyadari bahwa penyusunan naskah skripsi ini tidak lepas dari bimbingan, motivasi dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih banyak kepada:

1. Allah SWT. atas limpahan rahmat, taufiq, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah skripsi dengan baik.
2. Kedua orang tua yaitu Ibu Sulastri dan Bapak Basori Alwi yang senantiasa memberikan semangat, motivasi, dukungan dan doa restu kepada penulis dalam menuntut ilmu.
3. Adik Saila Farizqiyah dan seluruh keluarga besar yang senantiasa memberikan doa dan semangat kepada penulis dalam menuntut ilmu.

4. Prof. Dr. H. M. Zainuddin, MA, selaku rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Dr. Sri Harini, M.Si., selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
6. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si, selaku ketua program studi Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
7. Ibu Dr. Hj. Akyunul Jannah, S.Si, M.P selaku dosen pembimbing utama yang telah memberikan banyak pengarahan, bimbingan, saran, dan motivasi kepada penulis sampai terselesaikannya naskah skripsi dengan baik.
8. Bapak Oky Bagas Prasetyo, M.Si selaku dosen pembimbing agama yang telah memberikan banyak pengarahan, bimbingan, saran, dan motivasi kepada penulis sampai terselesaikannya naskah skripsi dengan baik.
9. Ibu Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc selaku dosen wali yang telah memberikan dukungan dan motivasi untuk selalu berkembang.
10. Seluruh dosen dan staf program studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang memberikan ilmu, pengetahuan, pengalaman, wawasan, dan pelayanan yang baik kepada penulis.
11. Seluruh teman Kimia Angkatan 2018, khususnya kelas kimia C yang banyak memberikan dukungan dan bantuan hingga naskah skripsi ini selesai.

Semoga semua bantuan yang telah diberikan mendapatkan balasan dari Allah SWT. Penulis telah melaksanakan tanggung jawab secara maksimal. Penulis menyadari bahwa dalam naskah skripsi ini masih terdapat kekurangan.

Penulis berharap saran, kritik dan masukan yang membangun. Semoga naskah skripsi ini dapat memberikan manfaat kepada para pembaca khususnya penulis secara pribadi. *Aamiin Yaa Robbal Alamin.*

Malang, 17 Desember 2022

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
MOTTO	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvi
ملخص	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	8
1.3 Tujuan Penelitian	8
1.4 Batasan Masalah	8
1.5 Manfaat Penelitian	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1 Bekatul	10
2.2 Senyawa Fenolik Bekatul	12
2.3 Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	16
2.4 Fermentasi Bekatul Menggunakan <i>Rhizopus oryzae</i>	18
2.5 Ekstraksi Senyawa Fenolik Bekatul Metode Maserasi	23
2.6 Analisis Konsentrasi Total Fenolik (KTF) Ekstrak Bekatul	26
2.7 Spektrofotometer Uv-Vis	29
2.8 Bagian-bagian Spektrofotometer	30
2.9 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Penyerapan Uv-Vis	31
2.10 Antibakteri	33
2.11 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Bekatul	34
2.12 <i>Staphylococcus aureus</i>	36
2.13 <i>Eschericia coli</i>	39

BAB III METODOLOGI PENELITIAN	41
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	41
3.2 Alat dan Bahan	41
3.2.1 Alat	41
3.2.2 Bahan	41
3.3 Rancangan Penelitian	42
3.4 Tahapan Penelitian	42
3.5 Prosedur Penelitian.....	43
3.5.1 Preparasi Sampel	43
3.5.2 Uji Kadar Air Bekatul Metode Termogravimetri.....	44
3.5.3 Pembuatan Media	45
3.5.4 Regenerasi Mikroorganisme.....	47
3.5.5 Pembuatan Inokulum.....	47
3.5.6 Fermentasi Bekatul Menggunakan Isolat <i>Rhizopus oryzae</i>	48
3.5.7 Ekstraksi Fenolik dari Bekatul Menggunakan Variasi Pelarut	49
3.5.8 Analisa Konsentrasi Total Fenolik dengan metode <i>Folin-Ciocalteu</i>	49
3.5.9 Pembuatan Kontrol Uji Aktivitas Antibakteri.....	50
3.5.10 Preparasi Uji Aktivitas Antibakteri Metode Difusi Agar	51
3.5.11 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Bekatul	51
3.6 Analisis Data	52
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	53
4.1 Preparasi Sampel.....	53
4.2 Analisis Kadar Air Bekatul	54
4.3 Regenerasi Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	58
4.4 Pembuatan Inokulum Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	59
4.5 Fermentasi Bekatul Menggunakan Inokulum Jamur <i>Rhizopus Oryzae</i>	60
4.6 Ekstraksi Bekatul Terfermentasi Jamur <i>Rhizopus oryzae</i>	66
4.7 Analisis Konsentrasi Total Fenolik (KTF) Metode <i>Folin-Ciocalteu</i>	72
4.7.1 Pembuatan Kurva Standart Asam Galat	72
4.7.2 Penentuan Konsentrasi Total Fenolik (KTF) Ekstrak Bekatul	74
4.8 Uji Aktivitas Antibakteri Metode Difusi Agar	77
BAB V PENUTUP	82
5.1 Kesimpulan	82
5.2 Saran	82
DAFTAR PUSTAKA	83
LAMPIRAN	92

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Morfologi Gabah Kering	10
Gambar 2.2 (a) Asam Ferulat (C ₁₀ H ₁₀ O ₄). (b) Asam Salisilat (C ₇ H ₆ O ₃). (c) Asam Kafeat (C ₉ H ₈ O ₄). (d) Asam Kumarat (C ₉ H ₈ O ₃)	14
Gambar 2.3 Jamur <i>Rhizopus oryzae</i> . A. Sporangium B. Sporangiofora C. Sporangiospora D. Kolumela.....	17
Gambar 2.4 Hasil fermentasi bekatul	19
Gambar 2.5 Struktur Asam Fenolat	24
Gambar 2.6 Etanol	25
Gambar 2.7 Aseton (C ₃ H ₆ O)	26
Gambar 2.8 Reaksi fenol dengan reagen Folin-Ciocalteu	28
Gambar 2.9 Cara Kerja Spektrofotometer	30
Gambar 2.10 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	36
Gambar 2.11 Bakteri <i>Escherichia coli</i>	40
Gambar 4.1 Stabilisasi Sampel Bekatul	54
Gambar 4.2 Bekatul yang sudah dihilangkan kadar airnya	56
Gambar 4.3 Bekatul dalam takaran 20 gram	57
Gambar 4.4 Regenerasi jamur <i>Rhizopus oryzae</i> umur 3 hari	58
Gambar 4.5 Inokulum jamur	60
Gambar 4.6 Bekatul terfermentasi selama 5 hari	65
Gambar 4.7 Rendemen ekstrak bekatul	68
Gambar 4.8 Interaksi pelarut etanol dengan senyawa asam lemak	71
Gambar 4.9 Kurva standart asam galat.....	73
Gambar 4.10 Konsentrasi total fenolik.....	74
Gambar 4.11 Grafik zona hambat ekstrak bekatul pelarut aseton	78
Gambar 4.12 Grafik zona hambat ekstrak bekatul pelarut metanol	79
Gambar 4.13 Grafik zona hambat ekstrak bekatul pelarut etanolGrafik zona hambat ekstrak bekatul pelarut etanol	79
Gambar 4.14 Zona hambat ekstrak bekatul dengan variasi pelarut terhadap bakteri <i>Escherichia coli</i>	81
Gambar 4.15 Zona hambat ekstrak bekatul dengan variasi pelarut terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	81

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian.....	92
Lampiran 2. Diagram Alir.....	93
Lampiran 3. Perhitungan Kadar Air Sampel Bekatul	104
Lampiran 4. Perhitungan Berat Ekstrak Bekatul Hasil Maserasi.....	106
Lampiran 5. Perhitungan Hasil rendemen ekstrak bekatul.....	107
Lampiran 6. Analisis Konsentrasi Total Fenolik (KTF)	109
Lampiran 7. Data Hasil Penelitian dan Perhitungan KTF.....	118
Lampiran 8. Data Hasil Zona Hambat Aktivitas Antibakteri.....	120
Lampiran 9. Dokumentasi	123
Lampiran 10. Data Hasil Absorbansi Spektrofotometer UV VIS analisis konsentrasi total fenolik	141

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Hasil penetapan Konsentrasi Total Fenolik ekstrak bekatul	75
--	----

ABSTRAK

Mutmainnah, Kharisma. 2022. **Pengaruh Pelarut Terhadap Peningkatan Konsentrasi Total Fenolik dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Bekatul Terfermentasi *Rhizopus oryzae***. Skripsi. Program Studi Kimia. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
Pembimbing I: Dr. Hj. Akyunul Jannah, S.Si, M.P; Pembimbing II: Oky Bagas Prasetyo, M.Si

Kata kunci: Bekatul, Fermentasi, *Rhizopus oryzae*, Fenolik, Antibakteri.

Bekatul merupakan lapisan kulit padi yang berada pada endosperma. Bekatul dihasilkan dari proses penggilingan padi menjadi beras. Bekatul berpotensi dimanfaatkan sebagai alternatif bahan baku pangan maupun obat. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut terhadap nilai konsentrasi total fenolik (KTF) dan aktivitas antibakteri ekstrak bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae* yang diekstraksi dengan metode maserasi. Fermentasi menggunakan kapang *Rhizopus oryzae* dilakukan untuk meningkatkan metabolit sekunder yang berupa senyawa fenolik pada ekstrak bekatul. Ekstrak bekatul diperoleh menggunakan metode maserasi dengan variasi pelarut aseton, metanol dan etanol. Analisis KTF ekstrak bekatul menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* dan uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi agar. Pembuatan kurva standart asam galat dilakukan dengan menghitung absorbansi larutan baku asam galat konsentrasi 10, 50, 100 dan 150 ppm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 765 nm. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak sampel menggunakan kontrol positif obat kloramfenikol dan kontrol negatif pelarut dimetil sulfoksida (DMSO). Bakteri uji yang digunakan adalah *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Hasil rendemen ekstrak bekatul terbanyak pada pelarut etanol dengan rata-rata rendemen ekstrak non fermentasi 42,12% dan ekstrak terfermentasi *Rhizopus oryzae* 44,71%, pelarut aseton dengan rata-rata rendemen ekstrak non fermentasi 12,79% dan ekstrak terfermentasi *Rhizopus oryzae* 19,54%, dan yang paling rendah pelarut metanol dengan rata-rata rendemen ekstrak non fermentasi 15,15% dan ekstrak terfermentasi *Rhizopus oryzae* 15,81%. Analisis konsentrasi total fenolik menunjukkan jika pelarut metanol mampu mengekstrak senyawa fenolik paling baik dengan memperoleh KTF ekstrak bekatul non fermentasi 105,7 ppm dan KTF ekstrak bekatul terfermentasi 108,9 ppm. Nilai KTF berbanding lurus dengan aktivitas antibakteri, maka ekstrak metanol memiliki zona hambat paling besar yaitu ekstrak non fermentasi memiliki ukuran 4,2 mm dan ekstrak terfermentasi 6,25 mm saat diujikan pada bakteri *Staphylococcus aureus*. Namun saat diujikan pada bakteri *Escherichia coli* ekstrak aseton memiliki zona hambat paling besar yaitu ekstrak non fermentasi memiliki ukuran 4,6 mm dan ekstrak terfermentasi 9,7 mm

ABSTRACT

Mutmainnah, Kharisma. 2022. **Effect of Solvents on Increase Total Phenolic Concentrations and Antibacterial Activity of Fermented Rice Bran Extract by *Rhizopus oryzae***. Thesis. Chemistry Department. Faculty of Science and Technology. Maulana Malik Ibrahim State Islamic University Malang.
Supervisor I: Dr. Hj. Akyunul Jannah, S.Si, M.P; Supervisor II: Oky Bagas Prasetyo, M.Si

Kata kunci: Rice bran, Fermentation, *Rhizopus oryzae*, Phenolic, Antibacteri.

Rice bran is a outer layer of rice seed that is on the endosperm. Bran is produced from the process of milling rice. Rice bran has the potential to be used as an alternative raw material for food and medicine. The purpose of this study was to determine the effect of different solvents on total phenolic concentration and antibacterial activity of fermented rice bran extract by *Rhizopus oryzae* that extracted by maceration method. Fermentation using *Rhizopus oryzae* was carried out to increase secondary metabolites in the form of phenolic compounds in rice bran extract. Rice bran extract was obtained using the maceration method with variations of acetone, methanol and ethanol solvents. Total phenolic concentration analysis of rice bran extract used the *Folin-Ciocalteu* method and the antibacterial activity test used the agar diffusion method. Gallic acid standard curves were prepared by calculating the absorbance of standard gallic acid solutions with concentrations of 10, 50, 100 and 150 ppm using a UV-Vis spectrophotometer at a wavelength of 765 nm. Testing the antibacterial activity of the sample extracts used a positive control of chloramphenicol and a negative control of dimethyl sulfoxide (DMSO) solvent. The test bacteria used were *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The highest yield of bran extract was in ethanol solvent with an average yield of non-fermented extract of 42.12% and fermented extract of *Rhizopus oryzae* 44.71%, acetone solvent with an average yield of non-fermented extract of 12.79% and fermented extract of *Rhizopus oryzae* 19.54%, and the lowest methanol solvent with an average yield of 15.15% non-fermented extract and 15.81% fermented extract of *Rhizopus oryzae*. Analysis of the total phenolic concentration showed that the methanol solvent was able to extract the best phenolic compounds by obtaining total phenolic concentration of non-fermented rice bran extract of 105.7 ppm and total phenolic concentration of fermented rice bran extract of 108.9 ppm. Total phenolic concentration value is directly proportional to the antibacterial activity, so the methanol extract has the largest inhibition zone, namely the non-fermented extract has a size of 4.2 mm and the fermented extract is 6.25 mm when tested on *Staphylococcus aureus* bacteria. However, when tested on *Escherichia coli* bacteria, the acetone extract has the largest inhibition zone, namely the non-fermented extract has a size of 4.6 and the fermented extract has 9.7.

ملخص

مطمئنة ، كاريزما ٢٢٠٢. تأثير المذيب على زيادة تركيز الفينول الكلي والنشاط المضاد للبكتيريا لمستخلص نخالة الأرز المخمر من *Rhizopus oryzae* بحث الجامعي .قسم الكيمياء .كلية العلوم والتكنولوجيا .جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج المشرف الأول :اكيونول جنة الماجستير، المشرف الثاني :أوكي باجاس براستيتو ماجستير .

الكلمات المفتاحية: نخالة ، تخمير ، رهيزوبس أوريزا ، فينول ، مضاد للجراثيم

النخالة عبارة عن طبقة من نخالة الأرز توجد على السويداء ، ويتم إنتاج النخالة من عملية طحن الأرز إلى أرز. يمكن استخدام نخالة الأرز كمواد خام بديلة للأغذية والأدوية ، وكان الهدف من هذه الدراسة هو تحديد تأثير المذيبات المختلفة لزيادة المستقبلات الثانوية *Rhizopus oryzae* المستخرج بطريقة النقع. تم إجراء التخمير باستخدام قالب *oryzae* في شكل مركبات فينولية في مستخلص نخالة الأرز. تم الحصول على مستخلص نخالة الأرز باستخدام طريقة النقع مع *Folin-Ciocalteu* مستخلص نخالة الأرز طريقة KTF اختلافات في الأسيتون والميثانول ومذيبات الإيثانول. استخدم تحليل واستخدم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا طريقة نشر الأجار. تم تحضير المنحنيات المعيارية لحمض الغال *Ciocalteau* عن طريق حساب امتصاص محاليل حمض الغال القياسية بتركيزات ٠.١ و ٠.٥ و ٠.٠١ و ٠.٥١ جزء في المليون باستخدام بطول موجة ٥٦٧ نانومتر. استخدم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا لعينة UV-Vis مقياس الطيف الضوئي (DMSO) وكانت المستخلصات تحكماً إيجابياً في الكلورامفينيكول والتحكم السليبي في مذيب ثنائي ميثيل سلفوكسيد (بكتيريا الاختبار المستخدمة هي الإشريكية القولونية والمكورات العنقودية الذهبية. كان أعلى إنتاج لمستخلص النخالة في *Rhizopus oryzae* مذيب الإيثانول بمتوسط إنتاجي للمستخلص غير المخمر ٢٤,٢١٪ والمستخلص المخمر من ، يليه مذيب الأسيتون بمتوسط إنتاجية للمستخلص غير المخمر ٢١,٩٧٪ والمستخلص المخمر. من ٤٤,١٧ ، وأقل مذيب ميثانول بمتوسط إنتاجية مستخلص غير مخمر ٥١,٥١٪ والمستخلص ٩١,٤٥٪ *Rhizopus oryzae* . أظهر تحليل إجمالي تركيز الفينول أن مذيب الميثانول كان قادراً على ١٨,٥١٪ *Rhizopus oryzae* المخمر من مستخلص نخالة الأرز غير المخمر ٧,٥٠١ جزء في KTF استخلاص أفضل المركبات الفينولية من خلال الحصول على بشكل مباشر مع KTF من مستخلص نخالة الأرز المخمر ٩,٨٠١ جزء في المليون. تتناسب قيمة KTF المليون و النشاط المضاد للبكتيريا ، لذلك فإن مستخلص الميثانول لديه أكبر منطقة تثبيط ، أي أن المستخلص غير المخمر له حجم . ومع ذلك ، متى تم *Staphylococcus aureus* ٢,٤ مم والمستخلص المخمر ٥٢,٦ مم عند اختباره على بكتيريا ، يحتوي مستخلص الأسيتون على أكبر منطقة تثبيط ، وهي المستخلصات *Escherichia coli* اختباره على بكتيريا غير المخمرة ، بحجم ٦,٤ ملم و ٧,٩ م للمستخلصات المخمرة.

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bekatul (*bran*) berasal dari kulit ari padi yang terpisah dari sekam (kulit luar gabah) yang berbentuk serbuk halus berwarna coklat muda atau krem. Proses penggilingan padi menghasilkan produk utama berupa beras 60-65% (Luthfianto *et al.*, 2017) dan beberapa produk samping antara lain sekam (kulit luar padi) 15-20 %, bekatul (kulit ari padi) 8-12%, dan menir (bagian beras hancur) \pm 5% (Widowati, 2001; Astawan, *et al.*, 2013). Q. S. Al-An'Am (6) ayat 95 berbunyi:

إِنَّ اللَّهَ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَى يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَمُخْرِجُ الْمَيِّتِ مِنَ الْحَيِّ بِإِذْنِ اللَّهِ فَآتَى ثُؤفُكُونَ

Arti : “Sungguh, Allah yang menumbuhkan butir (padi-padian) dan biji (kurma)...

Bekatul substansinya adalah hasil samping dari penggilingan padi, secara umum dimanfaatkan sebagai pakan ternak bahkan tidak jarang dibuang karena sifat bekatul yang mudah rusak dan mengalami ketengikan. Jika setiap tahun produksi beras bertambah maka produk samping dari penggilingan padi menjadi beras juga bertambah, termasuk bekatul (Sugiarti, 2021). Menurut Departemen Pertanian, perkiraan jumlah bekatul yang dihasilkan di Indonesia 4,5–5 juta ton/tahun. Berbagai penelitian sebelumnya menyatakan bahwa bekatul memiliki komposisi kimia dan kandungan bioaktif yang baik, seperti dinyatakan oleh Astawan & Febrinda, (2010) bekatul mengandung nilai gizi lebih tinggi dari pada beras (*endosperma*). Di dalam bekatul terdapat komponen

biomolekul yang berperan dalam proses metabolisme dengan persentase perkiraannya antara lain, karbohidrat 67,58 – 72,74%, lemak 2,52 – 5,05 %, serat 370,91 - 387,3 kalori dan protein 13,11 – 17,19%. Jenis-jenis karbohidrat yang terdapat pada bekatul antara lain *b-glucan*, hemiselulosa, pati dan selulosa, dan jenis asam lemak dalam bekatul antara lain linoleate, asam oleat dan palmitat (Luthfianto *et al.*, 2017).

Bekatul juga mengandung komponen mineral seperti aluminium, besi, fosfor, kalsium, magnesium, mangan, dan seng serta banyak kandungan vitamin B seperti *thiamin* (Vit. B1) (Astawan & Febrinda, 2010). Selain itu bekatul juga mengandung senyawa bioaktif seperti golongan fenolik, seperti vanillin, kafeat, asam ferulat, klorogenat, asam galat, protokatekuat, dan siringat (Schmidt *et al.*, 2014). Beberapa kelompok fenolik dalam bekatul seperti asam ferulat, asam salisilat, asam kafeat, asam kumarat dan α -tokoferol yang dianggap dapat mereduksi radikal bebas, memengaruhi aktivitas enzimatik, mengubah lintasan metabolisme seperti sintesis kolesterol hingga sebagai agen pencegah kanker (Ryan, 2011). Fenolik adalah golongan senyawa kimia yang terdapat di setiap bagian tumbuhan yang mampu merespons terhadap stres lingkungan. Fenolik mampu bertindak sebagai antioksidan (Saraswaty *et al.*, 2013) yang bisa menangkal radikal bebas dengan cara menyumbang elektron pada radikal bebas (Kawamura *et al.*, 2011; Rifai, *et al.*, 2018).

Angka produksi bekatul yang tinggi dan diiringi dengan banyaknya kandungan gizi dan senyawa bioaktif dalam bekatul, maka bekatul berpotensi dimanfaatkan sebagai alternatif bahan baku pangan maupun obat. Perlu adanya upaya pemanfaatan dari jumlah bekatul yang terus menerus bertambah

setiap harinya, karena jika tidak dimanfaatkan dengan baik maka bekatul hanya akan menjadi bahan pakan ternak dan bahkan akan menjadi limbah yang akan mencemari lingkungan. Upaya pemanfaatan bekatul ini juga dianjurkan oleh Allah SWT dalam Q. S. Asy-syu'ara' ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

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

Ayat ini mengajak manusia untuk berpikir dan mengkaji setiap ciptaan Allah SWT di bumi termasuk tumbuhan (Shihab, 2002). Muhammad Quraish Shihab menafsirkan penggalan surah Asy-syuara ayat 7 dalam *Tafsir Al-Misbah* “sebenarnya, jika mereka (manusia) bersedia merenungi dan mengamati hal itu, niscaya mereka akan mendapatkan petunjuk. Kamilah (Allah SWT.) yang mengeluarkan dari bumi ini beraneka ragam tumbuh-tumbuhan yang mendatangkan manfaat”. Penggalan surah Asy-syuara ayat 7 mendorong pelaksanaan penelitian ini untuk menanamkan perspektif baru mengenai bekatul supaya bermanfaat lebih dan tidak hanya untuk pakan ternak. Upaya pemanfaatan bekatul salah satunya dengan pengolahan bekatul konvensional menjadi bekatul fungsional. Bekatul fungsional memiliki gizi, sifat fisik-kimia, daya terima, dan umur simpan yang jauh lebih baik, sehingga dapat mendukung pengembangan pangan fungsional untuk pencegahan berbagai penyakit, selain mengurangi limbah bekatul hal ini akan meningkatkan nilai ekonomis dari bekatul (Astawan, *et al.*, 2013).

Proses pemanfaatan bekatul terkendala oleh mutu sensorinya. Bekatul memiliki sifat yang mudah rusak dan mengalami ketengikan, karena dalam bekatul (*endogenous*) terdapat aktivitas enzim lipase yang menyebabkan bekatul terhidrolisis dan teroksidatif serta pengaruh dari bakteri yang merusak komponen bioaktif dalam bekatul (Luthfianto *et al.*, 2017), maka diperlukan proses pengolahan untuk meningkatkan mutu sensori bekatul, salah satunya menggunakan metode fermentasi. Fermentasi merupakan proses biokimia yang berfungsi untuk memperpanjang umur simpan bahan organik dengan bantuan mikroorganisme seperti bakteri dan kapang (Ardiansyah *et al.*, 2020). Umumnya fermentasi dilakukan pada makanan untuk mengawetkan makanan tersebut, namun fermentasi juga dapat meningkatkan kandungan nutrisi, fungsionalitas, sifat sensorik, komponen bioaktif bahan organik dan juga meningkatkan nilai ekonomis bahan pangan (Robinson & Nigam, 2003), sehingga fermentasi dapat dilakukan untuk mengawetkan bekatul agar tidak mengalami ketengikan serta untuk meningkatkan senyawa bioaktif didalamnya. Beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan fermentasi antara lain jumlah mikroba, lama waktu fermentasi, pH (keasaman), substrat (medium), suhu, alkohol, oksigen, garam dan kadar air (kelembaban).

Jamur *Rhizopus oryzae* termasuk salah satu kapang yang efektif dalam fermentasi bekatul karena dapat meningkatkan kandungan senyawa bioaktif dalam bekatul melalui aktivitas enzim yang dihasilkan kapang (Schmidt *et al.*, 2014; Razak dkk., 2015). Selain itu jamur *Rhizopus oryzae* tidak menghasilkan zat toksik (Oliveira dkk., 2012). Hasil studi Oliveira dkk. (2012) menyebutkan bahwa penggunaan kapang *Rhizopus oryzae* sebagai starter dapat meningkatkan total

senyawa fenolik, aktivitas antioksidan, dan dapat menghambat terjadinya oksidasi lipid pada bekatul fermentasi. Jamur *Rizhopus oryzae* mampu menghasilkan enzim selulase (Yosmar dkk., 2013) yaitu -glukosidase α -D-glukanase, dan endo-1,4- β -D-glukanase (Ikram dkk., 2005). Selama fermentasi, Enzim yang dihasilkan oleh jamur *Rhizopus oryzae* mampu mendegradasi atau menghidrolisis selulosa yang berikatan dengan lignin dan memutus ikatan β -1,4-D glikosida untuk menghasilkan glukosa atau oligosakarida pada bekatul (Aruben, 2016). Ikatan selulosa yang terputus pada bekatul menyebabkan senyawa fenolik yang terikat pada bekatul banyak terekstrak. Hal ini dikarenakan sekitar 40-50% komponen fenolik yang terkandung pada bekatul berikatan dengan komponen struktural dinding sel seperti lignin, selulosa dan protein melalui ikatan ester sehingga kadar fenolik dari bekatul fermentasi mengalami peningkatan (Zhang dkk., 2010). Senyawa fenolik dan bioaktif lainnya akan terlepas akibat hidrolisis oleh enzim selulase yang dihasilkan oleh *Rhizopus oryzae*, sehingga dapat memudahkan proses ekstraksi dan senyawa bioaktif bekatul tidak banyak terbuang selama proses ekstraksi.

Pada penelitian ini proses ekstraksi menggunakan metode maserasi untuk mengambil ekstrak bekatul. Maserasi dilakukan dengan cara perendaman bekatul dalam pelarut pada temperatur ruang. Salah satu faktor yang mempengaruhi laju ekstraksi yaitu jenis pelarut (Prasetyowati & Tera, 2010). Selama ekstraksi, komponen bioaktif akan terlarut oleh pelarut yang sesuai sifat kepolarannya. Senyawa fenolik sifatnya polar (Robinson, 1995), sehingga memerlukan pelarut yang sifatnya polar untuk mengekstraksi senyawa tersebut (Rifai, *et al.*, 2018), menurut teori “*like dissolve like*” senyawa-senyawa akan larut dalam larutan yang

sesuai dengan kepolarannya. Aseton, metanol dan etanol adalah jenis pelarut yang sering kali digunakan untuk mengekstrak fenolik pada tumbuhan karena bersifat polar sehingga dapat mengekstrak senyawa fenolik lebih banyak (Delazar dkk., 2012; Nugraha dkk., 2017), Seperti penelitian Ardiansyah dkk., (2020) yang mengekstraksi fenolik bekatul varietas sintanur dan inpari 24 menggunakan pelarut metanol. Selain itu kandungan senyawa dalam bekatul memiliki polaritas yang cenderung polar. Penelitian Jannah dkk., (2021) mengekstraksi bekatul dengan variasi pelarut berdasarkan sifat kepolaran berbeda yaitu etanol, etil asetat dan n-heksana. Penelitiannya menghasilkan nilai rendemen paling tinggi yaitu ekstrak bekatul dari pelarut etanol yaitu 18,159-19,132%.

Uji kuantitatif konsentrasi total fenolik pada ekstrak bekatul menggunakan metode *Folin Ciocalteu* (Tahir dkk., 2020). Metode ini umum digunakan untuk menentukan kandungan fenolik total suatu tanaman karena kesederhanaan tekniknya. Senyawa fenolik bereaksi dengan Reagen *Folin Ciocalteu* membentuk larutan yang dapat terukur absorbansinya. Asam galat merupakan salah satu fenolik alami dan stabil maka dapat digunakan sebagai larutan standar atau pembanding dalam penelitian ini. Penelitian Aruben (2016) telah membuktikan adanya pengaruh fermentasi terhadap peningkatan konsentrasi total fenolik pada variasi lama fermentasi hari ke-4 dengan jumlah 5,01 mg/g. Penelitian serupa oleh Rashid *et al.*, (2015) bahwa total senyawa fenolik pada bekatul mengalami peningkatan 110% (2,4-5,1 mg/g) setelah difermentasi dengan menggunakan kapang *Rizhopus oryzae* selama 120 jam. Beberapa senyawa fenolik yang mengalami peningkatan setelah proses fermentasi yaitu asam ferulat (14,7 mg/g), galat (2,6-154,5 mg/g), klorogenat (20,9-76,1

mg/g), kafeat (4,8-28,7 mg/g), protokatekuat (7,7-13,6 mg/g), vanillin (8,6-13,1 mg/g) dan siringat (2,1-12,7 mg/g) (Schmidt *et al.*, 2014).

Secara umum fenolik diketahui bersifat antioksidan, namun penelitian Anggraeni dan Anam (2016) melaporkan bahwa fenolik juga memiliki aktivitas antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan dan metabolisme mikroba serta mematikan mikroorganisme patogen (Agustrina, 2011). Hasil penelitiannya yaitu golongan fenolik yaitu asam ferulat memiliki aktivitas antimikroba dalam uji penghambatan bakteri (*Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*) dan jamur *Candida albicans* dengan nilai diameter hambat berturut-turut $10,65 \pm 0,14$ mm, $10,35 \pm 0,07$ mm, dan $8,53 \pm 0,19$ mm. Senyawa fenolik juga bersifat fungistatik yang dapat mendenaturasi protein dinding jamur *Candida albicans*. protein yang terdenaturasi adalah protein enzim, maka enzim tidak dapat bekerja dan menyebabkan metabolisme terganggu (Septiadi dkk., 2013). Ardiansyah dkk., (2020) juga melaporkan bahwa terdapat adanya sifat antibakteri dari senyawa fenolik yang terdapat pada bekatul varietas Inpari 24. Penelitian Sitorus *et al.*, (2021) menggunakan senyawa fenolik dengan konsentrasi 5%, 10%, 15% dan 20% untuk direaksikan pada inokulum *Staphylococcus aureus* dan memiliki diameter hambat berturut-turut 1,2; 1,3; 1,4 dan 2 cm. Mekanisme fenolik sebagai antibakteri yaitu dengan merusak dinding sel dan merusak enzim-enzim pada bakteri (Mhaske *et al.*, 2012).

Berdasarkan latar belakang di atas, maka perlu dilakukan penelitian ini untuk menentukan pelarut yang paling baik dalam mengekstrak bekatul untuk meningkatkan rendemen dan konsentrasi total fenolik ekstrak bekatul serta untuk mengidentifikasi potensi aktivitas antibakteri pada ekstrak fenolik bekatul

terfermentasi *Rhizopus oryzae* yang diekstraksi dengan metode maserasi. Penelitian ini juga sarana untuk memaksimalkan pemanfaatan bekatul sebagai upaya meningkatkan nilai ekonomi dari bekatul.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh perbedaan pelarut terhadap nilai konsentrasi total fenolik (KTF) dan aktivitas antibakteri ekstrak bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae* yang diekstraksi dengan metode maserasi?

1.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut terhadap nilai konsentrasi total fenolik (KTF) dan aktivitas antibakteri ekstrak bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae* yang diekstraksi dengan metode maserasi.

1.4 Batasan Masalah

1. Bekatul diperoleh dari tempat penggilingan padi di Kecamatan Ngoro Kabupaten Jombang,
2. Fermentasi bekatul menggunakan *Rhizopus oryzae*,
3. Ekstraksi senyawa fenolik pada bekatul menggunakan metode maserasi dengan variasi pelarut aseton, metanol dan etanol,
4. Penguapan pelarut dan pemekatan filtrat ekstrak bekatul dengan *rotary evaporator*,
5. Analisis konsentrasi total fenolik (KTF) menggunakan metode *Folin-Ciocalteu*,

6. Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar menggunakan bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

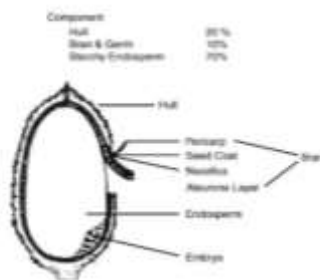
1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada pembaca mengenai metode fermentasi menggunakan kapang *Rhizopus oryzae* dapat meningkatkan mutu sensori dan senyawa bioaktif bekatul dan menginformasikan mengenai pengaruh perbedaan pelarut terhadap peningkatan konsentrasi total fenolik (KTF) dan aktivitas antibakteri ekstrak bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae* yang diekstraksi dengan metode maserasi.

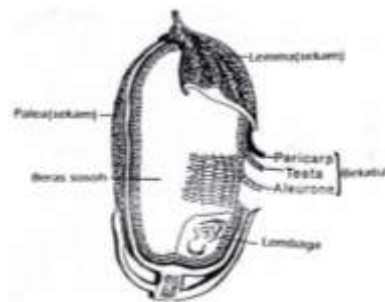
BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bekatul

Mayoritas masyarakat menganggap jika dedak dan bekatul adalah produk yang sama. Namun fakta penelitian menurut FAO dalam (Astawan dan Leomitro, 2009) menyatakan bahwa dedak (*rice bran*) dan bekatul (*rice polish*) adalah produk samping penggilingan biji padi yang berbeda. Dedak (*rice bran*) terdiri dari lapisan luar bulir beras (perikarp dan tegmen) serta sejumlah lembaga, sedangkan bekatul terdiri atas lapisan dalam bulir beras yaitu aleuron (kulit ari) beras serta sebagian kecil endosperma. Singkatnya adalah saat proses penggilingan padi, dedak diproduksi saat proses penyosohan pertama, sedangkan bekatul saat proses penyosohan kedua (Astawan & Febrinda, 2010). Bekatul mengandung persentase gizi lebih tinggi dari pada beras (*endosperma*). Struktur Bekatul terdiri atas aleuron, germ, subaleuron, lapisan luar germ, endosperma dan, perikarp (Estiasih *et al.*, 2021).



(Orthofer, 2005)



(Champagne, 1994 dalam Swastika, 2009)

Gambar 2.1 Morfologi Gabah Kering

Pada tahun 2018 produksi padi di Indonesia sekitar 56,54 juta ton (BPS, 2018) maka perkiraan limbah bekatul yang dihasilkan sebesar 4,52 juta ton (Faizah *et al.*, 2020). Angka produksi padi ini terus mengalami peningkatan, pada tahun 2019 produksi beras mencapai 26,91 juta ton sehingga diperkirakan produksi bekatul juga mengalami peningkatan. Namun upaya dalam pemanfaatan bekatul masih sangat minim. Padahal di dalam bekatul mengandung banyak zat gizi, yaitu air (8,54-9,70%), karbohidrat (42,32-51,99%), lemak (16,80-23,75%), protein (13,20-13,37%), abu (9,47-10,86%) dan serat kasar (13,56-17,97%) (Hartati *et al.*, 2015; Faizah *et al.*, 2020) serta kaya akan vitamin B, terutama vitamin B1 (*thiamin*) (Luthfianto *et al.*, 2017). Bekatul juga diketahui mengandung beberapa senyawa bioaktif, yaitu fenol, flavonoid tokotrienol, tokoferol, skualen, polikosanol (Estiasih *et al.*, 2021) γ -*oryzanol*, fitosterol, asam ferulat, asam fitat asam kafeat, *tricine*, asam kumarat, vitamin E, dan karotenoid (AJ & Ollila CA, 2012). Beberapa komponen biomolekul dalam bekatul tersebut sangat dibutuhkan dalam tubuh untuk proses metabolisme serta senyawa bioaktifnya bermanfaat sebagai antikanker (Forster GM, 2013), antiinflamasi, antidiabetes, hipoalergenik, dan hipolipidemik (Islam MS, 2011).

Senyawa biomolekul yang ada dalam bekatul merupakan komponen yang baik bagi tubuh dan berpotensi sebagai alternatif bahan pangan, hal ini bersifat menguntungkan bagi industri pangan untuk pengembangan pangan fungsional. Produk pangan dengan bahan bekatul mengandung senyawa bioaktif multikomponen yang dapat memberikan efek positif terhadap kesehatan. Sebagian besar kandungan dari bekatul yaitu karbohidrat terutama pati. Pati bekatul ini dapat

digunakan pada produk pangan berbasis pati dan berbagai produk pangan lainnya (Estiasih *et al.*, 2021). Begitu juga dengan protein, protein dalam bekatul memiliki kualitas yang setara dengan protein hewani (Han *et al.*, 2015) sehingga dapat dimanfaatkan dan diolah untuk tambahan bahan pangan dan farmasi. Kadar protein bekatul sekitar 10-15% yang terdiri dari 37% protein larut air, 31% larut garam, 2% larut alkohol, dan 27% larut alkali dengan sifat hipoalergenik dan antikanker (Fabian & Ju, 2011). Bekatul juga mengandung serat yang cukup tinggi yaitu sebesar 6-14%, bersifat hipolipidemik dan dapat digunakan untuk mengontrol diabetes (Qureshi *et al.*, 2002). Serat bekatul dapat digunakan untuk menurunkan kadar lemak dalam produk pangan dan meningkatkan serat pangan. Serat bekatul juga mempunyai kemampuan mengemulsikan dan mengikat lemak (Estiasih *et al.*, 2021).

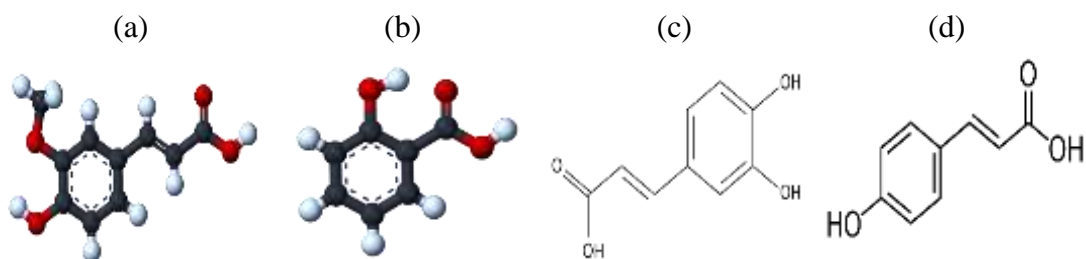
2.2 Senyawa Fenolik Bekatul

Fenolik merupakan golongan senyawa yang ada di dalam tumbuhan sebagai respons terhadap stres lingkungan. Senyawa ini mampu bertindak sebagai antioksidan yang mampu menangkal radikal bebas dengan menyumbang elektron pada radikal bebas (Kawamura *et al.*, 2011; Rifai *et al.*, 2018). Bekatul mengandung komponen fenolik, seperti asam ferulat, asam galat, klorogenat, asam kafeat, protokatekuat, vanillin, asam salisilat, asam kumarat, α tokoferol dan siringat (Schmidt *et al.*, 2014) yang mampu menghambat reaksi senyawa radikal bebas, mempengaruhi aktivitas enzimatik dan mengubah lintasan biokimia seperti sintesis kolesterol dan sebagai agen untuk pencegahan kanker (Ryan, 2011).

Bekatul mengandung asam ferulat yang signifikan. Asam ferulat ditemukan bebas atau dalam bentuk dimer dengan teresterifikasi polisakarida dan protein pada dinding sel (Fazary dan Ju, 2007). Asam ferulat merupakan antioksidan potensial yang terikat pada ester dengan polimer dinding sel. Asam ferulat biasanya ditemukan sebagai fraksi yang tidak larut. Ikatan ester asam ferulat pada dinding sel memerlukan hidrolisis asam atau basa untuk memutus ikatan senyawa ini dari matriks dinding sel (Gani, *et al.*, 2012).

Asam ferulat terdiri dari asam trans-sinamat yang mengandung metoksi dan substituen hidroksi pada posisi 3 dan 4 masing-masing pada cincin fenil. Asam ferulat memiliki peran sebagai antioksidan, metabolit tanaman, agen anti-inflamasi, inhibitor apoptosis dan agen kardioprotektif (PubChem, 2022). Senyawa fenolik bekatul seperti asam ferulat juga dapat bertindak sebagai antiploriferasi, proapoptosis yang bekerja secara langsung dalam menghambat terjadinya kanker (Phutthaphadoong, *et al.*, 2010).

Asam salisilat adalah asam beta hidroksi alami pada tumbuhan. Senyawa ini berpotensi sebagai agen antiinflamasi dan bertindak sebagai antibakteri topikal karena kemampuannya untuk mempromosikan pengelupasan kulit. Asam salisilat juga merupakan asam monohidroksibenzoat yaitu asam benzoat dengan gugus hidroksi pada posisi orto. Senyawa ini memiliki peran sebagai agen antiinfeksi, antijamur, obat keratolitik, inhibitor EC 1.11.1.11 (L-ascorbate peroxidase), metabolit tanaman, metabolit alga dan hormon tanaman (PubChem, 2022). Struktur molekul dari golongan senyawa fenolik pada bekatul antara lain:



Gambar 2. 2 (a) Asam Ferulat (C₁₀H₁₀O₄). (b) Asam Salisilat (C₇H₆O₃). (c) Asam Kafeat (C₉H₈O₄). (d) Asam Kumarat (C₉H₈O₃) (PubChem, 2022)

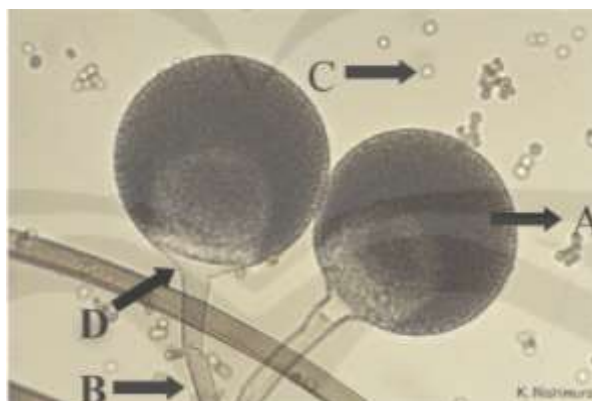
Senyawa antioksidan alami umumnya turunan dari senyawa fenolik atau polifenolik seperti golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, dan tokoferol (Aruben, 2020). Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenolik. Sebagian besar tanaman mengandung satu atau lebih senyawa flavonoid dengan komposisi kandungan flavonoid yang khas (Indrawati & Razimin, 2013). Setiap bagian tumbuhan yang mengandung flavonoid seperti daun, akar, kulit tepung sari, nektar, bunga, buah, biji, kacang-kacangan, bulir padi, dan rempah dapat digunakan sebagai obat (Neldawati *et al.*, 2013). Tanaman obat yang mengandung flavonoid dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri, antivirus, antioksidan, antiradang, antialergi dan antikanker (Artanti *et al.* 2006). Senyawa flavonoid adalah mengandung unsur senyawa C₁₅ yang terdiri atas dua inti fenolat yang berikatan dengan tiga satuan karbon (Sastrohamidjojo, 1996; Nugraha, *et al.*, 2017). Senyawa flavonoid memiliki aktivitas antioksidan yang dapat meningkatkan pertahanan diri terhadap penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas. Aktivitas antioksidan pada senyawa flavonoid mampu mengatasi masalah obesitas yang menjadi penyebab penyakit Diabetes karena dapat mencegah terjadinya penumpukan lemak (Anwar, *et al.*, 2017). Selain itu senyawa flavonoid

bisa mengurangi risiko penyakit jantung dan kanker (Ukoha *et al.*, 2011); (Hanin & Pratiwi, 2017).

Senyawa fenolik juga berperan dalam aktivitas fisik dan metabolisme pada manusia seperti melindungi dari sinar UV-B dan kematian sel untuk melindungi DNA dari dimerisasi (Lai & Lim, 2011); (Hanin & Pratiwi, 2017). Komponen dalam senyawa ini juga dapat berperan sebagai agen pencegah dan obat beberapa penyakit seperti arteriosklerosis, disfungsi otak, kanker (Garg, *et al.*, 2016), jantung, mengurangi peradangan, dan diabetes (Khoddami, *et al.*, 2013). Fenolik memiliki ciri khas dengan struktur cincin benzene dan gugus hidroksil. Senyawa ini memiliki struktur yang beragam, seperti fenol sederhana yang memiliki cincin aromatik dengan satu gugus hidroksil, hingga Polifenol yang memiliki banyak gugus fenol dalam molekulnya. Berdasarkan jumlah gugus hidroksil yang terikat dan ikatan yang menghubungkan cincin benzene, maka terbentuk senyawa fenolik dengan berbagai struktur seperti anggota dari kelompok asam fenolat, tannin, flavonoid dan stilben (Singh *et al.*, 2016); (Diniyah & Lee, 2020), senyawa-senyawa tersebut memiliki kelarutan yang berbeda dan memiliki banyak manfaat biologis seperti melindungi terhadap stres oksidatif dan penyakit degeneratif juga bermanfaat untuk antioksidan, antikarsinogen, antibakteri dan lain-lain (Balasundram *et al.*, 2006); (Diniyah & Lee, 2020).

2.3 Jamur *Rhizopus oryzae*

Rhizopus oryzae termasuk jamur berfilamen. Jamur berfilamen sering disebut kapang. *Rhizopus oryzae* merupakan anggota *Zygomycetes*. *Rhizopus oryzae* memiliki karakteristik, yaitu miselia berwarna putih, ketika dewasa maka miselia putih akan tertutup oleh sporangium yang berwarna abu-abu kecoklatan (Rahmi, 2008). Hifa kapang terspesialisasi menjadi 3 bentuk, yaitu rhizoid, sporangiofor, dan sporangium. Rhizoid merupakan bentuk hifa yang menyerupai akar (tumbuh ke bawah). Sporangiofor adalah hifa yang menyerupai batang (tumbuh ke atas). Sporangium adalah hifa pembentuk spora dan berbentuk bulat. Pitt dan Hocking (1985) meneliti *Rhizopus Sp.* Pada media *Malt Extract Agar* (MEA) dan mengungkapkan bahwa *Rhizopus oligosporus* memiliki sporangiofor dengan panjang 150-400 μm lebih pendek dari *Rhizopus oryzae* yang panjangnya lebih dari 1500 μm . *Rhizopus oligosporus* memiliki rhizoid yang pendek, sporangium berdiameter 80 –120 μm dan saat 7 hari spora keluar kolumela dengan diameter 25-75 μm karena sporangiumnya pecah. Sedangkan *Rhizopus oryzae* memiliki diameter sporangium lebih dari 150 μm , kolumela berdiameter lebih dari 100 μm . Penelitian serupa (Nurholipah & Ayun, 2021) menunjukkan sporangiospora *Rhizopus oligosporus* berwarna coklat kehitaman dan panjangnya 7-10 μm . Bentuk Columella globuse, biasanya memiliki rhizoid yang pendek, panjang sporangiosfor sekitar 150-400 μm lebih pendek dari *Rhizopus oryzae* dan memiliki tekstur halus. Morfologi jamur *Rhizopus oryzae* ditunjukkan pada Gambar 2.3



Gambar 2.3 Jamur *Rhizopus oryzae*. A. Sporangium B. Sporangiofora C. Sporangiospora D. Kolumela (Nishimura, 1999)

Klasifikasi *Rhizopus oryzae* antara lain (Atlas, 1984):

Divisi : Zygomycota
 Kelas : Zygomycetes
 Bangsa: Mucorales
 Suku : Mucoraceae
 Marga : *Rhizopus*
 Jenis : *Rhizopus oryzae*

Suhu optimum dalam perkembangbiakan *Rhizopus oryzae* adalah 30°C. penelitian Hikmah (2018) menginformasikan bahwa pertumbuhan *Rhizopus oryzae* pada hari ke 0-2 jamur dalam fase adaptasi (fase lag). Hari ke 2-4 jamur dalam fase logaritmik (eksponensial) dimana terjadi peningkatan produksi misellium. Hari ke 4-6 jamur berada pada fase stasioner dan pada hari ke 6-7 jamur mengalami penurunan berat misellium (kematian). *Rhizopus sp.* merupakan salah satu jamur yang memiliki potensi besar dalam pengembangan riset bioetanol karena memiliki enzim glukoamilase yang dapat mengubah pati menjadi glukosa (Rahmi, 2008). *Rhizopus oryzae* memproduksi enzim pendegradasi karbohidrat seperti amilase, selulase, xylanase, glukoamilase dan sebagainya. Selama fermentasi, karbohidrat akan berkurang karena dirombak menjadi gula-gula sederhana (Nur, 2006). Jamur *Rizhopus oryzae* juga mampu menghasilkan enzim

selulase (Yosman *et al.*, 2013) yaitu glukosidase $\text{exo-1,4-}\beta\text{-D}$ glukonase, dan $\text{endo-1,4-}\beta\text{-D}$ -glukanase (Ikram *et al.*, 2005). Enzim selulase yang dihasilkan oleh *Rhizopus oryzae* mampu menghidrolisis kadar serat kasar dalam bekatul sehingga senyawa fenolik dan bioaktif lainnya akan terlepas, dari hal ini maka memberikan keuntungan yaitu senyawa bioaktif bekatul tidak banyak terbuang selama proses ekstraksi.

2.4 Fermentasi Bekatul Menggunakan *Rhizopus oryzae*

Fermentasi merupakan teknik memperpanjang umur simpan bahan organik menggunakan bantuan mikroba atau fungi. Umumnya fermentasi dilakukan pada makanan untuk mengawetkan makanan tersebut, namun ternyata fermentasi juga dapat meningkatkan kandungan nutrisi, fungsionalitas, sifat sensorik, komponen bioaktif bahan organik juga meningkatkan nilai ekonomis bahan pangan (Robinson & Nigam, 2003). Fermentasi dapat memperbaiki stabilitas dan palatabilitas bekatul (Ryan, 2011) sehingga fermentasi dapat dilakukan sebagai proses pengolahan bekatul untuk meningkatkan komponen bioaktif dalam bekatul.

Selama proses fermentasi berlangsung kapang menghasilkan aktivitas enzim lipase yang menyebabkan degradasi lemak pada substrat menjadi gliserol dan asam lemak bebas. Senyawa alkohol akan bereaksi dengan asam lemak dan membentuk senyawa ester yang menimbulkan aroma pada bekatul fermentasi (Ardiansyah dkk., 2017).



Gambar 2.4 Hasil fermentasi bekatul (Ardiansyah dkk., 2020)

Hasil pengamatan fisik menunjukkan bahwa terdapat perubahan tekstur, aroma, dan penampakan dari bekatul fermentasi. Bekatul fermentasi memiliki tekstur yang lembab (Ardiansyah dkk., 2020). Hal ini menunjukkan adanya peningkatan kadar air yang disebabkan oleh aktivitas kapang dalam mengubah substrat menjadi biomassa, CO₂, dan H₂O (Pandey & Ramachandran., 2006). Hasil fermentasi bekatul menghasilkan aroma khas “tempe” dan sedikit asam serta fermentasi selama 48 jam terlihat pertumbuhan miselia berwarna putih. Semakin lama fermentasi berlangsung, warna miselia terlihat semakin putih kehitaman. Berdasarkan hasil studi Oliveira dkk. (2011), bekatul mengandung mineral-mineral seperti zat besi, fosfor, dan magnesium, serta mengandung 11–13% protein kasar, 11,5% serat, dan sejumlah besar minyak. Tumbuhnya miselia kapang ini juga dapat disebabkan oleh kandungan mineral pada bekatul seperti Ca dan Mn (Suparjo, 2010). Perubahan warna miselia dari putih menjadi putih kehitaman seiring bertambahnya waktu fermentasi dapat disebabkan oleh adanya paparan oksigen (Ardiansyah dkk., 2020).

Faktor yang mempengaruhi keberhasilan fermentasi antara lain jumlah mikroba, lama waktu fermentasi, pH (keasaman), substrat (medium), suhu, alkohol, oksigen, garam dan kadar air (kelembaban). Dari beberapa faktor tersebut Fikriyah (2018) melaksanakan penelitian mengenai pengaruh kombinasi lama waktu fermentasi dan konsentrasi substrat terhadap peningkatan aktivitas antioksidan bekatul yang difermentasi oleh *Rhizopus oryzae*, dari penelitian ini memperoleh hasil randemen ekstrak bekatul paling banyak pada variasi lama waktu fermentasi selama 5 hari dan konsentrasi substrat 1:1 yaitu sebesar 12,33%. Lama fermentasi 5 hari merupakan waktu yang optimum bagi jamur untuk mendegradasi matriks selulosa pada bekatul, sehingga senyawa fenolik dan metabolit sekunder lainnya yang terikat dalam ikatan glikosida lebih mudah terekstrak. Pada perlakuan variasi lama fermentasi 5 hari dan konsentrasi substrat 1:1 juga diperoleh peningkatan aktivitas antioksidan tertinggi sebesar 13,37 %. Hikmah (2018) juga telah melaksanakan penelitian berdasarkan faktor pengaruh kombinasi pH dan suhu terhadap peningkatan aktivitas antibakteri bekatul yang difermentasi oleh *Rhizopus oryzae*, dari penelitian ini diperoleh hasil randemen ekstrak bekatul paling banyak pada variasi pH 5 dan suhu 37°C. Ekstrak meningkat dibandingkan ekstrak bekatul tanpa fermentasi yaitu dari 9,09% menjadi 12,91%. Pada perlakuan variasi pH 5 dan suhu 37°C juga diperoleh peningkatan aktivitas antibakteri tertinggi, dimana aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* meningkat sebesar 8,5 mm dan terhadap *Staphylococcus aureus* meningkat sebesar 7,5 mm. Jamur *Rhizopus oryzae* dapat tumbuh baik pada kisaran pH 4-6 (Sorenson, 1986) dan suhu 35°C (Kuswanto dan Slamet, 1989).

Pada bekatul Lebih dari 1% fenolik berikatan kovalen dengan serat tidak larut sehingga ketersediaannya rendah. Fenolik sulit diekstraksi karena banyaknya ikatan kovalen dalam serat tidak larut bekatul. Senyawa fenolik terkonjugasi adalah senyawa fenolik yang strukturnya teresterifikasi dengan gugus gula atau komponen molekul lainnya (Wang *et al.*, 2015). Sedangkan, senyawa fenolik terikat adalah senyawa fenolik yang sukar larut dalam pelarut polar seperti metanol, etanol, dan aseton tanpa bantuan hidrolisis alkali. Senyawa fenolik terikat pada struktur komponen dinding sel seperti selulosa, hemiselulosa, lignin, pektin, dan protein (Pinelo *et al.*, 2006).

Biasanya senyawa fenolik dalam tanaman berikatan dengan komponen lain seperti teresterifikasi (terikat dengan lignin sebagai ester) atau sebagai glikosida yang berikatan dengan polisakarida dinding sel (Muntana & Prasong, 2010) sehingga bioavailabilitasnya menjadi rendah (Ryan, 2011). Fermentasi menggunakan mikroba atau kapang yang mampu menghasilkan enzim selulase, dapat menghidrolisis ikatan kovalen pada serat tidak larut bekatul (Miller, 2001). Maka fenolik yang terikat pada serat tidak larut dapat meningkat ketersediaannya. Enzim hidrolitik juga dapat memetabolisme serat tidak larut seperti selulosa dan hemiselulosa. Ikatan kovalen yang terputus pada selulosa bekatul menyebabkan meningkatnya fenolik (Karppinen, 2003). Fermentasi bekatul menggunakan *Rhizopus oryzae* dapat meningkatkan kandungan fenolik dalam bekatul karena kapang *Rhizopus oryzae* dapat mendegradasi susunan lignoselulosa dan polisakarida secara enzimatik (Schmidt CG, 2012).

Saat fermentasi kapang mensintesis enzim untuk memutus fenolik yang terikat membentuk fenolik bebas, sehingga konsentrasi fenolik meningkat (Rhasid

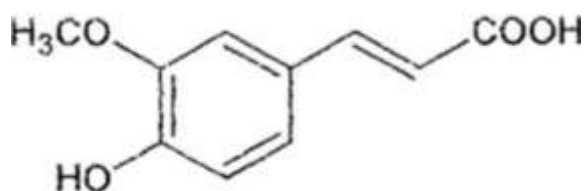
2011) dalam (Kurniati *et al.*, 2017). Enzim β -glukosidase dan enzim esterase atau enzim lakase yang dapat menghidrolisis senyawa fenolik yang berupa glikosida untuk membebaskan aglikon fenolik dari glikon (gula) (Zheng & Shetty, 2000). Enzim lakase dapat mendegradasi senyawa fenolik yang teresterifikasi atau terikat dengan lignin membentuk fenolik bebas dan terakumulasi dalam vakuola sel (Schmidt, 2014). Saat fermentasi asam ferulat yang terikat pada dinding sel seperti hemiselulosa dan lignin dapat dibebaskan melalui aktivitas enzim ferulik esterase. Kapang memiliki dua jenis sistem enzimatis ekstraselular, sistem hidrolitik dapat menghasilkan hidrolase yang berperan mendegradasi polisakarida dan sistem ligninolitik oksidatif yang dapat membuka cincin fenil (Martins, *et al.*, 2011). Komponen fenolik bekatul dapat terbentuk karena adanya proses dekomposisi lignin, selulosa, dan hemiselulosa selama fermentasi (Oliveira, *et al.*, 2010). Semakin lama fermentasi semakin maksimal kerja enzim lakase dalam mendegradasi cincin fenil, sehingga senyawa fenolik meningkat (Schmidt, 2014). Faizah *et al.*, (2020) menyatakan bahwa bekatul yang difermentasi memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan bekatul nonfermentasi, yang dipengaruhi oleh lamanya waktu fermentasi. Aktivitas antioksidan meningkat 5% dibandingkan bekatul nonfermentasi hingga waktu fermentasi selama 72 jam, namun menurun bila waktu fermentasi diperpanjang hingga 120 jam.

2.5 Ekstraksi Senyawa Fenolik Bekatul Metode Maserasi

Maserasi yaitu metode untuk mengambil ekstrak dari sampel organik dengan cara sampel direndam dalam pelarut organik pada temperatur ruangan. Saat sampel direndam, pelarut masuk ke dalam dinding sel dan rongga sel yang mengandung metabolit sekunder, sehingga dinding atau membran sel sampel terpecah, maka metabolit sekunder yang terdapat dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik (Nurchayanti, 2015). Saat perendaman sampel, terdapat perbedaan konsentrasi larutan di dalam dan di luar sel, hal ini menyebabkan tekanan antara dalam dan luar sel, maka larutan dengan konsentrasi lebih pekat akan keluar sel membawa metabolit sekunder. Proses ini berkelanjutan hingga konsentrasi seimbang antara larutan di dalam dan di luar sel (Hukmah, 2007).

Beberapa faktor yang mempengaruhi laju ekstraksi antara lain jenis pelarut, rasio bahan & pelarut, waktu ekstraksi, suhu dan luas permukaan sampel (Prasetyowati & Tera, 2010). Selama ekstraksi, komponen bioaktif akan terlarut oleh pelarut yang sesuai sifat kepolarannya. Sesuai dengan teori “*like dissolve like*” yang menyatakan bahwa senyawa nonpolar akan larut dalam pelarut nonpolar sedangkan senyawa polar akan larut dalam pelarut polar. Jenis asam fenolat seperti turunan asam hidrosibenzoat dan asam hidrosisinamat banyak terdapat pada tumbuhan. Senyawa fenolat bebas dan terkonjugasi umumnya mudah larut pada pelarut polar, sedangkan fenolat terikat tidak dapat terlarut, strukturnya teresterifikasi pada dinding sel (Wang *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2017). Asam fenolat dengan struktur yang terikat kovalen pada polimer dinding sel seperti selulosa, hemiselulosa (*arabinoxilan*), lignin, pectin maka tidak larut pada air (Luo *et al.*, 2013). Asam fenolat bebas dapat larut pada larutan solvolisis

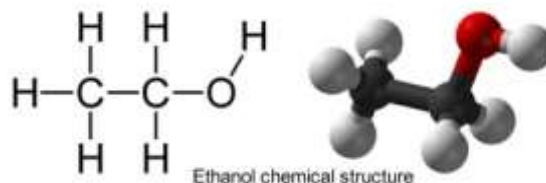
sehingga bisa diekstraksi menggunakan pelarut air, methanol, etanol, dan aseton. Senyawa fenolik memiliki sifat polar (Robinson, 1995), sehingga memerlukan pelarut yang bersifat polar untuk mengekstraksi senyawa tersebut (Rifai *et al.*, 2018), seperti etanol, metanol dan aseton (Delazar *et al.*, 2012). Metanol 80% sering digunakan sebagai pelarut untuk mengekstrak fenolat bebas. Namun Fenolat terikat biasanya bisa diekstrak menggunakan basa kuat dari residu hasil ekstraksi asam fenolat bebas (Alves *et al.*, 2016).



Gambar 2.5 Struktur Asam Fenolat

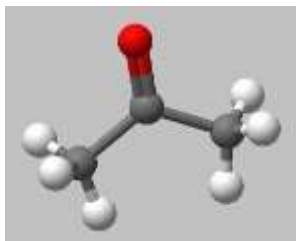
Etanol sering digunakan sebagai pelarut dalam ekstraksi maserasi senyawa fenolik karena sifatnya polar sehingga bisa melarutkan senyawa fenolik (Nugraha *et al.*, 2017). Penelitian Jannah *et al.* (2021) mengekstraksi bekatul menggunakan variasi pelarut dengan kepolaran berbeda-beda yaitu etanol, etil asetat dan n-heksana. Penelitiannya menghasilkan nilai rendemen paling tinggi yaitu ekstrak bekatul dari pelarut etanol yaitu 18,159-19,132%. Hal ini mengindikasikan senyawa yang terkandung dalam bekatul memiliki polaritas yang cenderung sama dengan etanol. Etanol juga sering digunakan sebagai pelarut dalam proses ekstraksi senyawa organik, karena mampu meningkatkan permeabilitas dinding sel simplisia sehingga proses ekstraksi lebih efisien dalam menarik komponen polar hingga semipolar. Etanol memiliki titik didih 78,37°C, larut dalam air dan

pelarut organik serta toksisitasnya sebagai pelarut tidak bersifat beracun pada sampel (Wati & Tarigan, 2017).



Gambar 2.6 Etanol (PubChem, 2022)

Hal serupa aseton juga sering digunakan sebagai pelarut untuk mengekstraksi senyawa fenolik. Penelitian Rifai *et al.* (2018) mengekstrak fenolik dari biji alpukat menggunakan variasi pelarut etanol, metanol, dan aseton. Total fenolik ekstrak biji alpukat tertinggi terdapat pada perlakuan pelarut aseton dengan rasio bahan dengan pelarut 1:15 yaitu 803,46 mg/100 gram. Aseton adalah bahan kimia buatan yang juga ditemukan secara alami di lingkungan. Aseton memiliki ciri fisik cairan yang tidak berwarna dengan bau dan rasa yang berbeda, sifatnya mudah menguap, mudah terbakar, dan larut dalam air. Aseton juga disebut dimetil keton, 2-propanon, dan beta-ketopropana. Aseton adalah salah satu bahan dalam pembuatan plastik, kain dan obat-obatan. Aseton dapat disintesis secara alami pada tanaman, pohon, gas vulkanik, kebakaran hutan, dan sebagai produk pemecahan lemak tubuh. Aseton juga dapat ditemukan pada knalpot kendaraan, asap tembakau, dan tempat pembuangan sampah. Proses industri menyumbangkan lebih banyak aseton ke lingkungan daripada proses alami (PubChem,2022).



Gambar 2.7 Aseton (C₃H₆O) (PubChem,2022)

Rasio bahan dan pelarut juga mempengaruhi rendemen hasil ekstraksi. Selama ekstraksi, peningkatan volume pelarut akan berbanding lurus dengan rendemen yang dihasilkan. Dengan volume pelarut yang digunakan semakin banyak maka senyawa target yang keluar terbawa oleh pelarut lebih optimal sehingga hasil rendemen juga semakin meningkat, hal ini juga berfungsi untuk menghindari kejenuhan pelarut. Akan tetapi, jika jumlah pelarut dinaikkan dalam jumlah tertentu maka peningkatan rendemen relatif kecil dan cenderung konstan (Ahmad *et al.*, 2008).

2.6 Analisis Konsentrasi Total Fenolik (KTF) Ekstrak Bekatul

Fenolik mempunyai cincin aromatik dan gugus hidroksil (-OH) serta gugus lain penyertainya. Flavonoid merupakan kelompok terbesar dari fenolik (Khadijah *et al.*, 2017). Jenis senyawa fenolik di alam begitu banyak dan memiliki variasi struktur yang beragam serta dapat ditemukan dengan mudah di setiap bagian tumbuhan. Senyawa fenolik yang telah diketahui strukturnya antara lain golongan flavonoid, fenol monosiklik sederhana, fenil propanoid, polifenol (lignin, melanin, tanin), dan kuinon fenolik (Fauziah, 2008).

Metode *Folin Ciocalteu* adalah salah satu metode pengujian dalam menentukan konsentrasi total fenolik pada ekstrak sampel. Metode ini banyak

digunakan untuk menentukan kadar fenolik total dalam tanaman karena pengerjaannya lebih sederhana (Meng, *et al.*, 2011). Metode ini memiliki prinsip mengoksidasi gugus hidroksil pada senyawa fenolik. Pada metode ini menggunakan reagen *Folin Ciocalteu*. Reagen *Folin Ciocalteu* bereaksi dengan senyawa fenolik membentuk larutan yang bisa diukur absorbansinya (Chun *et al.*, 2003). Nilai absorbansi yang terukur menyatakan intensitas senyawa fenol di dalam ekstrak sampel. Nilai absorbansi berbanding lurus dengan kandungan senyawa fenol pada ekstrak sampel (Lailiyah *et al.*, 2014). Reagen Folin mengoksidasi garam alkali, mereduksi asam heteropoli menjadi suatu kompleks *molibdenum-tungsten* (Mo-W). Fenolat stabil pada larutan basa, tetapi pereaksi ini dan produknya tidak stabil pada suasana basa. Saat Reagen Folin ditambahkan pada ekstrak sampel maka terjadi reaksi yang menyebabkan gugus hidroksil pada senyawa fenolik bereaksi dengan pereaksi *Folin Ciocalteu* menghasilkan kompleks fosfotungstat-fosfomolibdat berwarna biru dengan struktur belum diketahui dan bisa dideteksi dengan spektrofotometer. Kepekatan warna biru seiring dengan konsentrasi ion fenolat yang terbentuk, yang berarti semakin besar konsentrasi senyawa fenolik maka semakin banyak ion fenolat yang akan mereduksi asam heteropoli (*fosfomolibdat-fosfotungstat*) menjadi kompleks molibdenumtungsten sehingga warna biru yang dihasilkan semakin pekat (Singleton & Rossi, 1965) dan (Viranda, 2009).

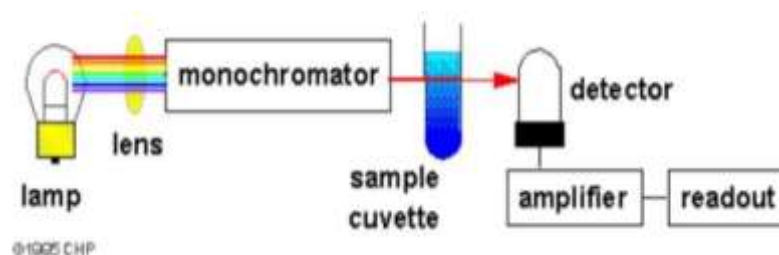
2.7 Spektrofotometer Uv-Vis

Spektrofotometer adalah alat yang digunakan untuk mengukur transmittan atau absorban sampel menggunakan cahaya pada panjang gelombang tertentu yang dilewatkan pada kuarsa atau kuvet yang terisi sampel didalamnya. Sebagian cahaya akan diserap dan sisanya akan dilewatkan. Prinsip kerja spektrofotometer adalah sampel yang dianalisis akan menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu. Setiap sampel yang dianalisis memiliki absorbansi pada panjang gelombang yang berbeda. Panjang gelombang dengan absorbansi tertinggi digunakan untuk menganalisis konsentrasi zat. Absorbansi dari cahaya yang diserap oleh sampel berbanding lurus dengan konsentrasi zat dari sampel di dalam kuvet (Sastrohamidjojo, 2001). Tiap sampel akan menyerap cahaya pada panjang gelombang yang berbeda tergantung pada senyawa atau warna yang terbentuk (Cairns, 2009). Untuk memantapkan ketepatan pengukuran, maka bahan yang hendak diukur konsentrasinya dibandingkan dengan larutan standar yang telah diketahui konsentrasinya (Kemenkes, 2010).

Teknik analisis spektrofotometri UV-Vis yaitu pengukuran serapan cahaya menggunakan sumber radiasi elektromagnetik dengan panjang gelombang sinar ultraviolet (190-380 nm) dan sinar visible (380-780 nm) oleh suatu senyawa menggunakan instrumen spektrofotometer (Mulja dan Suharman, 1995). Spektrofotometri UV-Vis memerlukan energi elektronik cukup besar untuk molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometri UV-Vis biasanya dipakai untuk analisis kuantitatif. Serapan UV atau VIS (cahaya tampak) mengakibatkan transisi elektronik, yaitu perpindahan elektron dari orbital keadaan dasar yang

berenergi rendah ke orbital tereksitasi yang berenergi lebih tinggi (Skoog et al., 2007 dalam Mulja dan Suharman, 1995).

2.8 Bagian-bagian spektrofotometer



Gambar 2.9 Cara Kerja Spektrofotometer

a. Sumber cahaya

Spektrofotometri UV-Vis merupakan teknik pengukuran energi cahaya oleh suatu sistem kimia pada panjang gelombang tertentu (Day, 2002). Sinar ultraviolet (UV) memiliki panjang gelombang antara 200-400 nm, dan sinar tampak (visible) memiliki panjang gelombang 400-800 nm. Spektrum UV-Vis sangat bermanfaat untuk pengukuran kuantitatif konsentrasi zat di dalam bahan yang dianalisis, yaitu dengan cara mengukur absorbansi pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer (Rohman, 2007).

b. Monokromator

Monokromator digunakan sebagai pengurai cahaya polikromatis menjadi cahaya monokromatis yang terdispersi menjadi beberapa komponen panjang gelombang tertentu yang berbeda.

c. Detektor

Detektor adalah alat untuk mengubah cahaya menjadi sinyal listrik yang dapat ditampilkan oleh piranti pembaca berupa angka/jarum.

d. Mikroprosesor

Mikroprosesor adalah alat untuk menghitung konsentrasi sampel dan output *software* dari kalibrator dapat disimpan (Kemenkes,2010).

e. Piranti pembaca

piranti pembaca akan menampilkan angka dari detektor. Data digambarkan dalam bentuk yang dapat dibaca oleh penganalisis (Kemenkes,2010).

2.9 Faktor-faktor yang mempengaruhi penyerapan Uv-Vis

1. Kromofor

Kromofor adalah gugus dalam senyawa organik yang dapat menyerap sinar UV dan sinar visible. Pada molekul organik juga dikenal istilah aoksokrom yaitu gugus fungsional yang mempunyai elektron bebas, seperti: -OH, -O, NH₂ dan -OCH. Gugus kromofor yang mengikat gugus aoksokrom akan menggeser pita absorpsi menuju pada panjang gelombang yang lebih besar (Gandjar dan Rohman, 2012; Pavia *et al.*, 2006).

2. Pemilihan pelarut

Pelarut yang digunakan untuk melarutkan sampel yang dianalisis akan mempengaruhi Spektrum serapan UV. Maka harus diperhatikan dalam memilih pelarut (Gandjar dan Rohman, 2012). Kriteria pemilihan suatu pelarut sebagai berikut:

a. Umumnya pelarut yang tidak mengandung sistem terkonjugasi merupakan

pelarut pilihan. Agar tidak menyerap sinar UV pada daerah yang sama dengan daerah zat yang akan dianalisis

- b. Pengaruh pada struktur halus dan tajam (*fine structure*) pada pita serapan. Pelarut nonpolar tidak berikatan hidrogen dengan senyawa yang terlarut, dengan demikian menghasilkan spektrum senyawa yang mendekati spektrum senyawa dalam keadaan gasnya, yang mana struktur halus dan tajam dapat teramati. Dalam pelarut polar, ikatan hidrogen membentuk kompleks dengan senyawa pelarut, dan struktur halus dan tajam tidak muncul.
- c. Mampu mempengaruhi panjang gelombang dari sinar UV yang diabsorpsi dalam keadaan dasar dan tereksitasi. Saat keadaan tereksitasi pelarut polar tidak membentuk ikatan hidrogen semudah saat keadaan dasar, sehingga meningkatkan energi transisi elektronik molekul. Pelarut polar menggeser transisi dari $n \rightarrow \pi^*$ sehingga panjang gelombang menjadi lebih pendek. Namun dalam kasus tertentu, keadaan tereksitasi dapat membentuk ikatan hidrogen lebih kuat dari keadaan dasar. Dalam kasus seperti itu, pelarut polar menggeser panjang gelombang menjadi lebih panjang karena energi dari transisi elektronik menurun. Pelarut polar menggeser transisi dari $\pi \rightarrow \pi^*$ sehingga panjang gelombang menjadi lebih panjang (Gandjar dan Rohman, 2012; Pavia et al., 2006).

3. Pengaturan suhu

Suhu rendah menyebabkan pita serapan lebih tajam daripada suhu kamar. Resolusi vibrasional akan lebih baik karena level vibrasional yang ditempati

lebih sedikit dan tingkat interaksi solute-pelarut minimal (Gandjar dan Rohman, 2012).

4. Ion-ion organik

Terdapat 2 sifat kromoforik yang ada dalam senyawa anorganik, yaitu melibatkan beberapa atom seperti MnO_4^- dan $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ dan melibatkan atom tunggal yang memiliki kulit elektron terluar d- yang tidak lengkap (Gandjar dan Rohman, 2012).

2.10 Antibakteri

Antibakteri adalah senyawa kimia yang berfungsi untuk menghambat pertumbuhan atau mematikan bakteri patogen (Agustrina, 2011). Senyawa antibakteri dapat dihasilkan melalui bahan alami ataupun sintesis. Senyawa antibakteri dapat diperoleh melalui isolasi sumber daya alam hayati seperti bagian daun, batang dan akar pada tumbuhan. Senyawa antibakteri alami bersifat ramah terhadap sel mamalia termasuk manusia (Rusdin, Ys, & Syamsuddin, 2018). Secara umum senyawa fenol memiliki sifat bakteriosid, antimetik, antihelmintik, antiasmatik, analgetik, antiinflamasi, meningkatkan mortalitas usus, antimikroba, dan masih banyak lagi (Andarwulan *et al.*, 2012). Turunan fenolik yang bersifat antibakteri pada bekatul yaitu golongan flavonoid (Ambujakshi dkk, 2009) alkaloid, saponin, steroid, dan tannin (Ningsih, *et al.*, 2016).

Mekanisme kerja dari senyawa antibakteri adalah menghambat sintesis bahan penting bakteri, antara lain (Anief, 2009); (Dwidjoseputro, 1994) :

1. Menghambat sintesis dinding sel, penghambatan proses sintesis menyebabkan dinding sel kurang sempurna dan rentan terhadap tekanan osmose plasma,

sehingga dinding sel akan pecah,

2. Menghambat ketahanan permeabilitas dinding sel bakteri, mengganggu sintesis molekul lipoprotein membran dalam dinding sel bakteri, sehingga zat penting isi sel seperti polipeptid dapat keluar, karena membran lebih permeable,
3. Menghambat kerja enzim, dan
4. Menghambat sintesis asam nukleat (RNA) dan protein.

Berdasarkan pada daya bunuh bakteri, maka antibakteri dibagi menjadi (Anief, 2009):

- a. Antibiotik *narrow spectrum* (spektrum sempit)

spektrum sempit artinya senyawa antibakteri bekerja aktif hanya terhadap satu golongan bakteri saja, seperti hanya pada bakteri Gram positif ataupun hanya pada bakteri Gram negatif (WHO, 2014)

- b. Antibiotik *broad spectrum* (spektrum luas)

Spektrum luas artinya senyawa antibakteri bekerja aktif terhadap banyak jenis bakteri baik bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif (WHO, 2014).

- c. Antibiotik *part spectrum* (spektrum sebagian atau khusus).

2.11 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Bekatul

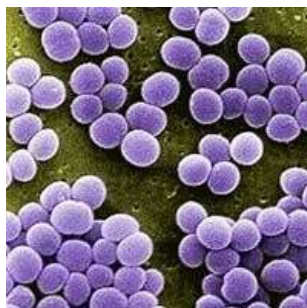
Uji Antibakteri dalam penelitian ini menggunakan metode difusi agar. Metode difusi adalah pengamatan diameter zona bening yang terbentuk di sekitar cakram setelah didiamkan selama 18-24 jam dan diukur menggunakan jangka sorong. Metode *disc diffusion* atau metode Kirby Bauer adalah metode yang menggunakan kertas cakram yang berisi zat antimikroba dan diletakkan pada media agar yang telah ditanami bakteri uji.^{34,35} (Hudzicki, 2016) dan (Nagoba,

2009). Bakteri uji yang digunakan adalah *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Pada penelitian ini menggunakan kontrol positif berupa *chloramphenicol* dan kontrol negatif berupa pelarut *dimethyl sulfoxide* (DMSO). Kontrol positif berfungsi sebagai kontrol dari sampel ekstrak fenolik dengan membandingkan diameter zona hambat yang terbentuk. Kontrol negatif berfungsi untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pelarut terhadap pertumbuhan bakteri *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Nugraha, Prasetya, & Mursiti, 2017). Sampel dikatakan mampu menghambat pertumbuhan koloni bakteri apabila terjadi daerah bening disekitar cakram kertas akibat pengaruh senyawa bioaktif sampel (Wardhani & Supartono; 2015).

2.12 *Staphylococcus aureus*

Klasifikasi bakteri *S. aureus* antara lain (Salle, 1961):

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



Gambar 2.10 Bakteri *Staphylococcus aureus* (Yudhie, 2009)

Staphylococcus aureus merupakan salah satu bakteri gram positif berbentuk kokus. Sel dari *Staphylococcus aureus* berbentuk bola dengan garis tengah 0,5-1,5 μm yang tersusun dalam kelompok-kelompok tidak teratur. *Staphylococcus aureus* tidak memiliki kapsul dan spora. *Staphylococcus aureus* bersifat non-motil, nonspora, anaerob fakultatif, katalase positif dan oksidase negatif. *Staphylococcus aureus* tumbuh pada suhu 35-40°C (Pelczar dan Chan, 1986) dan pada pH 4,2-9,3 (Todar, 1998; Nurwantoro, 2001; Paryati, 2002). Namun suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri ini adalah 37°C, dan membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25°C) (Supardi dan Sukanto, 1999). Dinding sel bakteri ini terdiri atas beberapa lapisan peptidoglikan yang membentuk struktur yang tebal dan kaku. Dalam struktur dinding sel

Staphylococcus aureus mengandung polisakarida dan protein yang bersifat antigenik (Supardi dan Sukanto, 1999) serta beberapa substansi yang disebut asam teikoat (Nugraha, Prasetya, & Mursiti, 2017). Peptidoglikan merupakan suatu polimer polisakarida yang mengandung subunit-subunit yang tergabung, merupakan eksoskeleton yang kaku pada dinding sel (Jawetz *et al.*, 2005). Carter and Wise (2004) melaporkan, bahwa peptidoglikan dan polimer polisakarida bersama asam teikoat membentuk dinding sel yang rigid, dalam hal ini asam teikoat berfungsi menghubungkan peptidoglikan dan antigen.

Koloni *Staphylococcus aureus* tumbuh dalam waktu 24 jam dengan diameter mencapai 4 mm. Koloni pada perbenihan padat berbentuk bundar, halus, menonjol dan berkilau. koloni *Staphylococcus aureus* berwarna abu-abu sampai kuning emas tua. *Staphylococcus aureus* membentuk pigmen lipochrom yang menyebabkan koloni tampak berwarna kuning keemasan dan kuning jeruk. Pigmen kuning tersebut membedakannya dari *Staphylococcus epidermidis* yang menghasilkan pigmen putih (Todar, 2002). Pigmen kuning keemasan timbul pada pertumbuhan selama 18-24 jam pada suhu 37°C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25°C). Pigmen tidak dihasilkan pada biak anaerobik atau pada kaldu (Burrows, 1950; Jawetz *et al.*, 2001). Pada permukaan sel *S. aureus* juga terdapat pigmen karoten yang memberi warna orange.

Saat uji pewarnaan gram, bakteri *Staphylococcus aureus* berubah warna dari orange menjadi ungu. Pewarnaan gram bertujuan untuk mengamati morfologi sel bakteri dan mengetahui kemurnian sel bakteri (Fardiaz, 1993). *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif dan berbentuk kokus yang menghasilkan warna ungu pada pewarnaan gram. Warna ungu disebabkan karena bakteri

mempertahankan warna pertama, yaitu gentian violet. Perbedaan sifat gram dipengaruhi oleh kandungan pada dinding sel, yaitu bakteri gram positif kandungan peptidoglikan lebih tebal jika dibanding dengan gram negatif (Fardiaz, 1993; Pelczar, 1998).

Staphylococcus aureus menghasilkan tujuh tipe enterotoksin, yaitu: A, B, C, C1, C2, D dan E (Nurwantoro dan Abbas, 2001). Faktor virulensi *S. aureus* yang dapat menyebabkan infeksi meliputi (Todar, 1998):

1. Protein permukaan yang mempromosikan kolonisasi dalam jaringan hospes (protein A, adhesin, hemaglutinin, glikoprotein, fibrionectin),
2. Invasin membantu bakteri menyebar dalam jaringan (leukocidin, kinase, hyaluronidase),
3. Faktor permukaan yang menghalangi fagositosis (kapsul, protein A),
4. Faktor biokimia yang meningkatkan ketahanan bakteri di dalam fagosit (carotenoid, produksi katalase),
5. Reaksi imunologis (protein A, coagulase, clotting factor),
6. Toksin merusak membran (hemolysin, leukotoxin, leukocidin) dan
7. Eksotoksin dalam jaringan menimbulkan kerusakan dan gejala penyakit (SEA-G, TSST, ET).

Staphylococcus aureus merupakan bakteri patogen penyebab penyakit infeksi, nekrosis dan pembentukan abses (Warsa, 1993). *Staphylococcus aureus* penyebab 70% kasus infeksi nosokomial (Kayser dkk., 2005). Bakteri ini juga penyebab infeksi pada kulit dan jaringan lunak secara invasif seperti pneumonia, osteomielitis, meningitis dan endokarditis (Nugraha dkk., 2017) serta menyebabkan jerawat yang menghasilkan nanah (Kursia, *et al.*, 2016).

2.13 *Escherichia coli*

Sistem klasifikasi *Escherichia coli* antara lain (Salle, 1961):

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

Escherichia coli adalah bakteri gram negatif yang berbentuk batang pendek lurus (kokobasil) dengan ukuran 1,1-1,5 μm x 2,0-6,0 μm . *Escherichia coli* tidak memiliki kapsul dan spora. *Escherichia coli* bersifat anaerob fakultatif, tumbuh dengan mudah pada medium nutrisi sederhana (Pelczar dan Chan, 1986). *Escherichia coli* tumbuh pada suhu antara 10-40°C dengan suhu optimum 37°C. pH optimum untuk pertumbuhannya adalah pada 7-7,5, pH minimum pada 4 dan maksimum pada 9. Dinding sel bakteri *Escherichia coli* terdiri atas satu atau lebih 20 lapisan peptidoglikan yang tipis dan membran di bagian luar lapisan peptidoglikan. Dinding sel bakteri ini lebih rentan terhadap guncangan fisik, seperti pemberian antibiotik atau bahan antibakteri lainnya karena hanya mengandung sedikit lapisan peptidoglikan dan tidak mengandung asam teikoat (Nugraha, Prasetya, & Mursiti, 2017). Kontrol positif yang biasa digunakan untuk bakteri ini yaitu streptomisin 6,25 mg/mL (Soetan, 2006), Karena *Escherichia coli* termasuk Bakteri Gram negatif, dimana Bakteri Gram negatif cukup peka terhadap streptomisin (Volk dan Wheeler, 1993). Bakteri ini juga sangat sensitif terhadap panas (Supardi dan Sukamto, 1999).



Gambar 2.11 Bakteri *Escherichia coli* (Robert, 2009).

Escherichia coli menjadi patogen jika jumlah bakteri ini dalam saluran pencernaan meningkat atau berada di luar usus. Penyakit diare disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli*. Berdasarkan informasi kemenkes kematian bayi (31,6%) dan balita (25,2%) disebabkan oleh diare (Agtini, 2011). *Escherichia coli* umumnya selalu ada dalam saluran pencernaan hewan dan manusia karena secara alamiah *Escherichia coli* merupakan salah satu penghuni tubuh. Penyebaran *Escherichia coli* dapat terjadi dengan cara kontak langsung (bersentuhan, berjabat tangan dan sebagainya) kemudian diteruskan melalui mulut, akan tetapi *Escherichia coli* dapat ditemukan tersebar di alam sekitar kita. Penyebaran secara pasif dapat terjadi melalui makanan dan minuman (Soemarno, 2000). Media umum untuk mengidentifikasi bakteri *E. coli* adalah agar karena *E. coli* dapat tumbuh subur pada media ini dari pada media lainnya (Kurniadi, 2014).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan menggunakan jenis penelitian eksperimental laboratorium di Laboratorium Riset Biokimia dan Bioteknologi program studi Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Juli hingga September 2022.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Adapun peralatan yang diperlukan untuk penelitian ini antara lain: timbangan analitik, ayakan 60 mesh, Erlenmeyer 250 mL, autoklaf, *hot plate*, stirrer, cawan petri, *incubator*, jarum *ose*, *shaker incubator*, vortex, mikropipet, korek, Bunsen, oven, pompa vakum, *rotary evaporator*, penyaringan *buchner* dan spektrofotometer uv-vis.

3.2.2 Bahan

Bekatul, aquades, kapas, plastik wrap, kertas label, *tissue*, *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Potato Dextrose Broth* (PDB), *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, buffer asam sitrat pH 5, etanol, metanol, aseton, asam galat, reagen *folin-ciocalteau*, Na₂CO₃ 20%, kloramfenikol, DMSO, dan kertas cakram.

3.3 Rancangan Penelitian

Sampel dalam penelitian ini yaitu bekatul beras putih dari tempat penggilingan padi di Kecamatan Ngoro Kabupaten Jombang. Penelitian ini menggunakan dua faktor variasi perlakuan yaitu fermentasi dan perbedaan jenis pelarut. Faktor pertama adalah bekatul fermentasi dan non-fermentasi, faktor kedua adalah perbedaan jenis pelarut. Sampel bekatul difermentasi menggunakan *Rhizopus oryzae*. Ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan variasi pelarut aseton, metanol dan etanol. Setiap ekstraksi menggunakan rasio bahan dan pelarut (1:3 b/v). Perlakuan ekstraksi pada bekatul terfermentasi diulang sebanyak 2 kali (duplo) sehingga diperoleh 9 unit sampel ekstraksi. Kemudian ekstrak diuji konsentrasi total fenolik (KTF) menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* dan uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi agar pada bakteri *Staphylococcus aureus* sebagai bakteri Gram positif dan *Escherichia coli* sebagai bakteri Gram negatif.

3.4 Tahapan Penelitian

- 1) Preparasi Sampel
- 2) Analisis kadar air
- 3) Pembuatan Media
 - a. *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Anggraeni & Anam, 2016)
 - b. *Nutrient Agar* (NA) (Anggraeni & Anam, 2016)
 - c. *Nutrient Broth* (NB) (Mayaserli & Anggraini, 2019)
- 4) Sterilisasi alat dan bahan
- 5) Regenerasi mikroorganisme

- a. Jamur *Rhizopus oryzae*
 - b. Bakteri *S. aureus* dan *E. coli* (Mayaserli & Anggraini, 2019)
- 6) Pembuatan Inokulum mikroorganisme
 - 7) Fermentasi Bekatul Menggunakan Isolat *Rhizopus oryzae*
 - 8) Ekstraksi Bekatul Menggunakan Pelarut Aseton, metanol dan Etanol.
 - 9) Analisis Konsentrasi Total Fenolik (KTF)
 - a. Pembuatan kurva kalibrasi larutan baku asam galat dengan reagen *Folin-Ciocalteu*
 - b. Penentuan konsentrasi total fenolik (KTF) ekstrak bekatul
 - 10) Pembuatan Kontrol Positif (Maradou, *et al.*, 2019)
 - 11) Penentuan OD
 - 12) Preparasi Uji Aktivitas Antibakteri
 - 13) Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Bekatul Metode Difusi Agar (*disc diffusion Kirby and Bauer*) (Maradou, *et al.*, 2019)

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Preparasi Sampel

Bekatul diperoleh dari tempat penggilingan padi di Kecamatan Ngoro Kabupaten Jombang. Bekatul selanjutnya dideterminasi di Laboratorium Riset Biokimia dan Bioteknologi Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Lalu distabilisasi di dalam oven suhu 110°C selama ± 15 menit. Setelah itu bekatul dikeluarkan dari oven dan didiamkan pada suhu ruang hingga suhunya turun, lalu dimasukkan ke dalam plastik dan disimpan di kulkas untuk analisis selanjutnya.

3.5.2 Uji Kadar Air Bekatul Metode Termogravimetri

Uji kadar air bertujuan untuk menghilangkan kadar air dalam bekatul dan membatasi maksimal 10% (b/b) agar reaksi enzimatik pengurai senyawa aktif dalam bekatul berhenti. Selain itu, kadar air dibawah 10% (b/b) dapat memaksimalkan proses ekstraksi dan memperpanjang umur simpan. Uji kadar air terdiri dari 3 tahapan. Tahapan pertama adalah aktivasi silika gel. Aktivasi silika gel berfungsi untuk menguapkan kadar air dalam silika gel. Dipanaskan silika gel dalam oven pada suhu 100°C selama ± 30 menit. Kemudian didinginkan pada suhu ruang selama ± 20 menit. selanjutnya dimasukkan ke dalam desikator. Setelah itu tahapan kedua yaitu penguapan kadar air pada cawan porselen kosong. Disiapkan 3 cawan porselen untuk 3 kali ulangan. Kemudian ditimbang masing-masing cawan porselen menggunakan neraca analitik. Lalu dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama ± 15 menit. Selanjutnya disimpan cawan porselen dalam desikator selama 20 menit. Lalu ditimbang kembali cawan porselen. Diulang langkah pemanasan hingga penimbangan hingga berat cawan porselen kosong konstan. Tahapan terakhir yaitu penguapan kadar air dalam sampel bekatul terstabilisasi. Serbuk bekatul yang telah distabilisasi dimasukkan ke dalam cawan porselen yang beratnya konstan lalu ditimbang. Kemudian cawan+bekatul ditimbang. Lalu dimasukkan dalam oven pada suhu 105°C ± 15 menit. Kemudian diletakkan dalam desikator ± 20 menit, lalu ditimbang. Kemudian dilakukan perlakuan yang sama hingga berat sampel konstan.

Apabila berat sampel sudah konstan lalu dihitung kadar airnya dan sampel bisa langsung digunakan untuk tahapan penelitian selanjutnya atau disimpan didalam toples dan ditutup rapat untuk analisis selanjutnya.

Perhitungan kadar air menggunakan persamaan (3.1)

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100\% \dots\dots\dots (3.1)$$

Dengan *a* sama dengan Bobot cawan kosong, *b* bobot sampel+cawan sebelum dikeringkan dan *c* bobot sampel+cawan setelah dikeringkan.

Setelah selesai melakukan uji kadar air bekatul Metode Termogravimetri kemudian sampel bekatul beserta seluruh bahan dan alat yang akan digunakan dalam penelitian disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

3.5.3 Pembuatan Media

3.5.3.1 *Potato Dextrose Agar (PDA)*

Potato Dextrose Agar berfungsi untuk media pertumbuhan dan asupan nutrisi jamur *Rhizopus oryzae*. Proses pembuatan Media PDA yaitu Disiapkan serbuk PDA (39 gr/liter). dimasukkan 3,9 gram serbuk PDA ke dalam Erlenmeyer 250 ml lalu ditambahkan 100 mL akuades. Kemudian dilarutkan serbuk PDA dengan menggunakan pemanasan dan stirrer hingga mendidih. Lalu dikeluarkan stirrer dari Erlenmeyer. ditutup erlenmeyer dengan sumpel dan dilapisi dengan *plastic wrap*. disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1-2 atm selama 15 menit. Kemudian dituang larutan media PDA steril pada cawan petri secara aseptis. Lalu ditutup cawan petri dan dilapisi dengan *plastic wrap* Kemudian media didinginkan hingga memadat.

3.5.3.2 *Nutrient Agar* (NA)

Media *nutrient Agar* berfungsi untuk media regenerasi dan asupan nutrisi bakteri *Staphylococcus aureus* (gram positif) dan *Escherichia coli* (gram negatif) yang akan dikembangkan. Proses pembuatan Media NA yaitu Disiapkan serbuk NA (20 gr/liter). dimasukkan 2 gram serbuk NA ke dalam Erlenmeyer 250 mL. Lalu ditambahkan 100 mL akuades. Kemudian dilarutkan serbuk NA dengan menggunakan stirrer dan pemanasan pada *hotplate* hingga mendidih. Kemudian ditutup erlenmeyer dengan sumpel dan dilapisi dengan *plastic wrap*. Lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1-2 atm selama 15 menit. Dimasukkan larutan NA steril ke dalam cawan petri secara aseptis. Lalu cawan petri ditutup dan dilapisi dengan *plastic wrap*. Kemudian media didinginkan hingga memadat (Hikmah , 2018).

3.5.3.3 *Nutrient Broth* (NB)

Media *nutrient Broth* berfungsi untuk media pembuatan inokulun bakteri *Staphylococcus aureus* (gram positif) dan *Escherichia coli* (gram negatif). Proses pembuatan Media NB yaitu disiapkan serbuk NB (8 gr/liter). Kemudian dimasukkan 0,8 gram serbuk NB ke dalam Erlenmeyer 250 mL. Ditambahkan 100 mL akuades. Lalu dilarutkan menggunakan pemanasan dan stirrer hingga mendidih. Ditutup erlenmeyer dengan sumpel dan dilapisi dengan *plastic wrap*. Disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1-2 atm selama 15 menit. Kemudian media disimpan didalam lemari es (Hikmah , 2018).

3.5.4 Regenerasi Mikroorganisme

3.5.4.1 Jamur *Rhizopus oryzae*

Disiapkan media PDA dalam cawan petri yang steril. Diambil akar isolate jamur *Rhizopus oryzae* menggunakan jarum ose. Ditanam akar jamur *Rhizopus oryzae* pada media PDA secara aseptis. Ditutup cawan petri dan dilapisi dengan *plastic wrap*. diinkubasi di dalam inkubator suhu 37°C selama 3 hari.

3.5.4.2 Bakteri *S. aureus* dan *E. coli* (Mayaserli & Anggraini, 2019)

Regenerasi bakteri dilakukan dengan cara menyiapkan media NA miring dalam tabung reaksi yang steril. Dipanaskan jarum ose diatas Bunsen hingga berpijar warna merah. Diambil masing-masing isolate bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menggunakan jarum ose. digoreskan pada media NA miring secara aseptis. ditutup tabung reaksi dengan sumpel dan dilapisi dengan *plastic wrap*. Diinkubasi di dalam inkubator suhu 37°C selama 24 jam (*Escherichia coli*) dan selama 18 jam (*Staphylococcus aureus*).

3.5.5 Pembuatan Inokulum

3.5.5.1 Jamur *Rhizopus oryzae*

Media PDA dalam cawan petri yang telah ditumbuhi jamur selama 3 hari ditambahkan 50 mL aquades steril untuk melarutkan spora jamur. Dikikis akar jamur dari media PDA menggunakan kaca preparat steril. Disaring larutan jamur menggunakan kasa steril untuk memisahkan antara filtrate yang berisi spora jamur dengan badan jamurnya.

3.5.5.2 Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Dipanaskan jarum ose diatas Bunsen hingga berpijar warna merah. Diambil masing-masing isolate bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menggunakan jarum ose. Dimasukkan masing-masing ke dalam media NB steril yang berbeda. Diinkubasi di dalam inkubator suhu 37°C selama 24 jam (*Escherichia coli*) dan selama 18 jam (*Staphylococcus aureus*). Kemudian ditentukan Optical Density (OD) dari masing-masing inokulum menggunakan seperangkat instrument UV-VIS untuk pengukuran absorbansi. Diukur pada Panjang gelombang 600 nm. Dimasukkan larutan NB steril pada kuvet sebagai blanko. Dimasukkan masing-masing inokulum bakteri dalam kuvet. Diencerkan hingga mencapai nilai OD 0,5

3.5.6 Fermentasi Bekatul Menggunakan Isolat *Rhizopus oryzae* (Ardiansyah dkk., 2020)

Sampel bekatul ditimbang 20 gram lalu dimasukkan dalam Erlenmeyer 250 mL. Ditutup erlenmeyer dengan sumpel dan dilapisi dengan *plastic wrap*. Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1-2 atm selama 15 menit. Sampel bekatul yang telah steril ditambahkan larutan *buffer* asam sitrat pH 5 steril sebanyak 10 mL. Lalu diaduk menggunakan spatula steril. Kemudian ditambah dengan inokulum jamur 10% (v/b) atau 2 mL secara aseptis. Lalu ditutup kembali erlenmeyer dengan sumpel dan dilapisi dengan *plastic wrap*. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 hari. Selanjutnya dikeringkan didalam oven pada suhu 40°C selama 24 jam. Setelah itu, dilakukan ekstraksi maserasi dengan variasi pelarut aseton, metanol dan etanol.

3.5.7 Ekstraksi Fenolik dari Bekatul Menggunakan Variasi Pelarut Aseton, Metanol dan Etanol.

Bekatul hasil fermentasi dan non-fermentasi diekstraksi maserasi dengan variasi pelarut aseton, metanol dan etanol. Dimasukkan 20 gram bekatul ke dalam Erlenmeyer 250 mL. Ditambahkan 60 mL pelarut (1:3 b/v). Ditungkup erlenmeyer dengan sumpel dan dilapisi dengan *plastic wrap*. dimaserasi menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu ruang selama 5 jam. Selanjutnya disaring menggunakan pompa vakum. Filtrat hasil ekstraksi dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga pelarut menguap dan didapatkan ekstrak kental. Kemudian ditimbang ekstrak dan dihitung hasil rendemen dari setiap variasi pelarut.

3.5.8 Analisa Konsentrasi Total Fenolik (KTF) dengan metode *Folin-Ciocalteu*.

3.5.8.1 Pembuatan Kurva Standart Asam Galat

Ditimbang 0,05 gram (50 mg) asam galat. Kemudian dilarutkan dalam 100 mL akuades. Setelah itu diencerkan larutan menjadi konsentrasi 10, 50, 100 dan 150 ppm dengan variasi pipet 0,2 mL, 1 mL, 2 mL dan 3 mL dari larutan induk. Lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml. Ditambahkan aquades hingga tanda batas. Masing-masing konsentrasi tersebut selanjutnya dipipet 0,2 ml dan ditambahkan 15,8 ml akuades lalu divortex sampai homogen. Didiamkan selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 3 ml larutan Na₂CO₃ 20%. Divortex kembali hingga homogen. Kemudian didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar. Diukur

serapannya pada panjang gelombang 765 nm. Dibuat kurva kalibrasi dengan menghubungkan konsentrasi asam galat dengan absorbansi.

3.5.8.2 Penentuan KTF Ekstrak Bekatul (Sitorus dkk., 2021)

Ditimbang 0,1 gram (100 mg) ekstrak. Lalu dilarutkan sampai 10 ml dengan akuades (10 mg/mL). kemudian dipipet 0,2 mL dan dimasukkan pada tabung reaksi. Ditambahkan 15,8 mL aquades dan 1 ml Reagen *Folin-Ciocalteau*. Divortex lalu didiamkan 10 menit. Kemudian ditambahkan 3 ml larutan Na_2CO_3 20%. Divortex lalu didiamkan 2 jam pada suhu ruang. Diukur serapannya pada panjang gelombang 765 nm. Dibandingkan absorbansi sampel dengan kurva standart asam galat. Terakhir dihitung Konsentrasi Total Fenolik (KTF).

3.5.9 Pembuatan Kontrol Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian antibakteri ekstrak sampel menggunakan kontrol positif dan kontrol negatif sebagai pembanding, dimana kontrol positif menggunakan obat kloramfenikol yang sudah (paten) digunakan sebagai obat antibakteri dan kontrol negatif menggunakan pelarut dimetil sulfoksida (DMSO). Kontrol positif dibuat dengan melarutkan 250 mg obat kloramfenikol ke dalam 1 mL DMSO.

3.5.10 Preparasi Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Bekatul Metode Difusi

Agar (*disc diffusion Kirby and Bauer*)

Dimasukkan kertas cakram steril ke dalam botol vial steril. Ditimbang 500 mg ekstrak bekatul. Dilarutkan dengan 1 mL DMSO. Setelah itu diperoleh ekstrak bekatul konsentrasi 500 mg/mL. Lalu dipipet 100 μ L dan ditetaskan pada kertas cakram di dalam botol vial steril hingga terendam. Didiamkan selama 30 menit.

3.5.11 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Bekatul dengan Metode Difusi

Agar

Uji aktivitas antibakteri dengan metode *disc diffusion* dimulai dengan mengambil 100 μ L masing-masing inokulum bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Dimasukkan ke dalam cawan petri steril. Ditambahkan media NA ke dalam cawan petri. Dihomogenkan dengan cara digoyang cawan membentuk angka 8 sebanyak 10 kali. Ditunggu media dalam cawan memadat. Diletakkan kertas cakram yang sudah direndam ekstrak, kontrol positif, (kloramfenikol) dan kontrol negatif (DMSO) di atas media NA yang berisikan masing-masing bakteri uji *E. coli* dan *S. aureus*. Diinkubasi selama 1x24 jam (*Escherichia coli*) dan selama 18 jam (*Staphylococcus aureus*). Diamati aktivitas antibakteri yang berupa zona bening pada tepian kertas cakram. Diukur diameter zona bening dalam satuan milimeter (mm) menggunakan jangka sorong.

3.6 Analisis Data

Data yang dianalisis pada penelitian ini yaitu rendemen ekstrak bekatul, konsentrasi total fenolik (KTF) dan aktivitas antibakteri. Konsentrasi total fenolik dengan metode *Folin-Ciocalteu* dan aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar. Terdapat dua tahapan dalam analisis KTF yaitu pembuatan kurva standart asam galat dan penentuan KTF ekstrak sampel. Kurva standart asam galat dibuat dengan konsentrasi 10, 50, 100 dan 150 ppm lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 765 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Selanjutnya dibuat kurva dengan sumbu x adalah konsentrasi asam galat dan sumbu y adalah absorbansi. Melalui kurva, akan diperoleh persamaan regresi linear $y = ax + b$ dengan y sebagai absorbansi dan x konsentrasi. Pembuatan kurva kalibrasi asam galat berfungsi sebagai pembanding absorbansi ekstrak sampel. KTF diekspresikan sebagai mg ekuivalen asam galat per gram bekatul terfermentasi (mg EAG/g).

Uji aktivitas antibakteri ekstrak sampel menggunakan metode difusi agar (*disc diffusion Kirby and Bauer*). Dalam uji ini menggunakan kontrol positif berupa obat kloramfenikol dan kontrol negatif berupa DMSO. Kontrol berfungsi sebagai pembanding. Kertas cakram (*paper disc*) yang digunakan pada pengujian antibakteri ini berukuran 6 mm dengan daya serap 100 μ l tiap kertas cakram. Kemudian seluruh kertas cakram diletakkan diatas media NA yang berisikan masing-masing bakteri uji *E. coli* dan *S. aureus*. Setelah 24 jam kemudian dilakukan pengamatan pada tepian kertas cakram untuk mengukur diameter zona hambat yang diukur dalam satuan milimeter (mm) menggunakan mistar berskala dengan cara mengukur diameter total zona hambat dari kertas cakram

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi sampel

Bekatul yang diperoleh dari tempat penggilingan masih berupa serbuk kasar, kemudian dideterminasi dengan cara diayak menggunakan ayakan 60 mesh. Determinasi dilakukan untuk memilah antara dedak, bekatul dan menirnya. Selain itu determinasi berfungsi untuk memperluas permukaan sampel bekatul sehingga didapatkan partikel bekatul yang lebih kecil dan seragam. Salah satu faktor yang mempengaruhi laju ekstraksi yaitu luas permukaan sampel (Prasetyowati & Tera, 2010). Semakin besar permukaan sampel, maka proses pelarutan komponen bioaktifnya semakin mudah dikarenakan interaksi antara pelarut dengan sampel semakin besar. Setelah diperoleh bekatul 60 mesh, lalu serbuk bekatul distabilisasi. Cara kerja stabilisasi yaitu dimasukkan sampel bekatul kedalam erlenmeyer, lalu mulut Erlenmeyer ditutup aluminium foil setelah itu dioven pada suhu 110°C selama ± 15 menit. Stabilisasi bekatul dilakukan sebagai upaya mengawetkan bekatul agar tidak mudah tengik. Penelitian tentang stabilisasi bekatul telah dilakukan dengan berbagai cara diantaranya *drum drier*, *ekstruder*, penyangraian, pengukusan dan *autoclave* (Yuniarrahani, 2001; Damayanthi, 2002). Metode stabilisasi lainnya yaitu pengovenan bekatul pada suhu 100-140°C selama 5-15 menit seperti penelitian Tengah dkk (2011) dalam menstabilisasikan bekatul beras merah dari kabupaten Tabanan Bali.

Bekatul mengandung lemak yang relatif tinggi dan kaya akan zat gizi sehingga mudah mengalami kerusakan, tidak tahan lama, cepat berbau dan menjadi tengik karena semakin tinggi kandungan zat gizi suatu bahan pangan,

maka akan semakin mudah mengalami kerusakan akibat mikroba maupun enzimatis (Buckle *et al.*, 1987). ketidakstabilan pada bekatul terjadi akibat lipase yang menghidrolisis lemak menjadi asam lemak dan gliserol. Asam lemak bebas dioksidasi oleh enzim lipoksigenase menjadi bentuk peroksida, keton dan aldehid, sehingga bekatul menjadi tengik (Juliano, 1985; Janathan, 2007). Stabilisasi bekatul dilakukan untuk menginaktivkan aktivitas lipase dan lipoksigenase karena bekatul mengandung enzim yang masih aktif dan mensterilkan bekatul.



Gambar 4.1 stabilisasi sampel bekatul

Setelah itu bekatul dikeluarkan dari oven dan didiamkan pada suhu ruang hingga suhunya turun, lalu dimasukkan ke dalam plastik dan disimpan dalam kulkas untuk analisis selanjutnya.

4.2 Analisis Kadar Air Bekatul

Analisis kadar air dilakukan menggunakan metode thermogravimetri. Prinsip kerja dari metode ini yaitu penguapan air yang ada di dalam sampel pada suhu 100-105°C. Analisis kadar air bertujuan untuk menghilangkan kadar air dalam bekatul sehingga bekatul dapat disimpan dalam jangka waktu yang cukup panjang. Kadar air dalam sampel bekatul dibatasi maksimal 10% (b/b). Kadar air yang kurang dari 10% (b/b) dapat menghentikan reaksi enzimatis pengurai

senyawa aktif dalam sampel sehingga dapat memperpanjang umur simpan bekatul (Jannah dkk, 2021). Selain itu, kadar air dibawah 10% (b/b) dapat memaksimalkan proses ekstraksi. Semakin kecil kadar air suatu sampel, maka semakin mudah pelarut untuk mengekstrak komponen senyawa aktif, sehingga akan diperoleh rendemen semakin besar (Jannah dkk., 2021).

Analisis kadar air metode thermogravimetri diawali dengan aktivasi silica gel dalam desikator. Silica gel digunakan untuk menyerap kadar air dari sampel setelah di oven, sehingga proses penguapan air dari sampel maksimal. Silica gel yang telah penuh terisi air akibat penyerapan, tidak dapat menjalankan fungsinya, sehingga aktivasi silica gel dilakukan sebagai upaya menghilangkan kadar air dalam silica gel.

Tahapan selanjutnya yaitu menghilangkan kadar air dalam cawan porselen. Cawan porselen digunakan sebagai wadah dari sampel yang akan dianalisis. Ditimbang cawan porselen untuk mengetahui berat awal, kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu $105^{\circ}\text{C} \pm 15$ menit untuk menguapkan kadar air di dalam cawan. Selanjutnya cawan diletakkan dalam desikator sekitar 20 menit agar air yang masih terkandung didalam cawan dapat terserap oleh silica gel di dalam desikator, selain itu untuk menurunkan suhu agar konstan saat ditimbang. Lalu ditimbang kembali cawan porselen untuk mengetahui penurunan kadar air yang telah teruapkan. Kemudian diulang langkah pemanasan hingga penimbangan hingga berat cawan porselen kosong konstan, lalu dilanjutkan pada tahapan menghilangkan kadar air dalam sampel bekatul.

Serbuk bekatul yang telah distabilisasi dimasukkan ke dalam cawan porselen yang beratnya konstan hingga cawan porselen penuh. Kemudian

ditimbang cawan porselen yang berisi bekatul, selanjutnya dimasukkan dalam oven pada suhu $105^{\circ}\text{C} \pm 15$ menit untuk menguapkan kadar air di dalam bekatul. Kemudian diletakkan dalam desikator ± 20 menit agar air yang masih terkandung didalam bekatul terserap oleh silica gel, lalu ditimbang kembali. Diulang langkah pemanasan hingga penimbangan hingga berat cawan porselen dan bekatul konstan. Setelah itu dihitung kadar air sampel bekatul.



Gambar 4.2 Bekatul yang sudah dihilangkan kadar airnya

Pada penelitian ini dilakukan 3 kali analisis kadar air, setiap analisis terdapat 3 kali ulangan, sehingga terdapat 9 perlakuan untuk analisis kadar air. Hasil kadar air pada bekatul diperoleh rata-rata sebesar 4,2%, 1,82 % dan 5,07 %, dari hasil tersebut dapat diartikan bahwa hasil analisis kadar air bekatul tidak melebihi batas maksimum kadar air yang telah ditetapkan sehingga sampel bekatul dapat disimpan dan layak untuk dilakukan uji lanjutan. Kadar air merupakan sifat fisikokimia yang dapat menentukan kualitas suatu bahan dan parameter penting yang berhubungan dengan stabilitas bahan selama penyimpanan (Yuliani dkk., 2019). Enzim lipase dalam bekatul berperan sebagai katalis yang memacu terjadinya proses ketengikan bekatul. Lemak atau minyak dalam bekatul yang terkontaminasi air akan terjadi reaksi ketengikan enzim.

Semakin tinggi kadar air maka kemungkinan terjadi ketengikan pada bekatul semakin besar (Hadipernata dkk., 2012).



Gambar 4.3 Bekatul dalam takaran 20 gram

Sampel bekatul yang sudah selesai ditimbang beserta seluruh bahan dan alat yang akan digunakan dalam penelitian disterilisasi di dalam autoklaf. Sterilisasi bertujuan untuk membunuh dan mencegah pertumbuhan mikroorganisme lain yang tidak diinginkan dan dapat menjadi faktor hasil dari penelitian ini. Prinsip dari sterilisasi yaitu menguapkan air yang bertekanan sebagai pensterilnya. Selama sterilisasi di dalam autoklaf terjadi peningkatan suhu sebesar 121°C dan tekanan 15-17,5 psi (2 atm). Air di dalam autoklaf akan mendidih tepat pada tekanan 15 psi suhu 121°C yang menyebabkan seluruh kehidupan dari mikroorganisme akan mati. Suhu tinggi disertai tekanan yang besar di dalam autoklaf dapat mendenaturasi protein dan sel-sel pada organisme hidup, maka organisme tersebut akan mengalami kematian, sehingga setelah melalui tahapan sterilisasi maka seluruh alat dan bahan akan terbebas dari terkontaminasi mikroorganisme dan didapatkan alat dan bahan yang steril.

4.3 Regenerasi Jamur *Rhizopus oryzae*

Jamur yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Rhizopus oryzae*. Jamur *Rhizopus oryzae* dapat digunakan untuk fermentasi karena memiliki sifat yang tidak toksin (Oliveira *et al.*, 2012). Jamur *Rizhopus oryzae* mampu menghasilkan enzim selulase (Yosman *et al.*, 2013) yaitu glukosidase $\text{exo-1,4-}\beta\text{-D}$ glukonase, dan $\text{endo-1,4-}\beta\text{-D}$ -glukanase (Ikram *et al.*, 2005). Enzim selulase yang dihasilkan oleh *Rhizopus oryzae* mampu menghidrolisis kadar serat kasar dalam bekatul sehingga senyawa fenolik dan bioaktif lainnya akan terlepas, dari hal ini maka memberikan keuntungan yaitu senyawa bioaktif bekatul tidak banyak terbuang selama proses ekstraksi.

Adapun tahapan dalam regenerasi jamur yaitu disiapkan media PDA dalam cawan petri yang steril sebagai media pertumbuhan jamur. Kemudian diambil akar isolate jamur *Rhizopus oryzae* menggunakan jarum ose lalu ditanam akar jamur *Rhizopus oryzae* pada media PDA secara aseptis. Setelah cawan terisi penuh oleh akar lalu ditutup cawan petri dan dilapisi dengan *plastic wrap* dan diinkubasi di dalam inkubator suhu 37°C selama 3 hari.



Gambar 4.4 Regenerasi jamur *Rhizopus oryzae* umur 3 hari

Regenerasi jamur dilakukan untuk memperbarui sel-sel dan meremajakan kembali supaya memperoleh jamur pada fase logaritmik agar lebih produktif saat fermentasi sampel. Berdasarkan hasil pengamatan oleh Hikmah (2018) bahwa fase pertumbuhan *Rhizopus oryzae* pada hari ke 0-2 jamur dalam fase adaptasi (fase lag). Hari ke 2-4 jamur dalam fase logaritmik (eksponensial) dimana Jamur *Rhizopus oryzae* dapat tumbuh dengan cepat dan terjadi peningkatan produksi misellium. Hari ke 4-6 jamur berada pada fase stasioner dan pada hari ke 6-7 jamur mengalami penurunan berat misellium (kematian), maka untuk pembuatan inokulum jamur menggunakan koloni jamur yang berada saat fase logaritmik.

4.4 Pembuatan Inokulum Jamur *Rhizopus oryzae*

Kultur jamur yang diinokulasikan ke dalam suatu cairan disebut inokulum. Pembuatan inokulum jamur bertujuan untuk memudahkan jamur dapat bercampur dengan sampel dan mempermudah proses fermentasi. Proses pembuatan inokulum jamur yaitu ditambahkan 50 mL aquades steril ke dalam cawan petri yang telah ditumbuhi jamur pada fase log, yang mana pada penelitian ini telah melalui masa inkubasi selama 3 hari. Kemudian dikikis akar jamur dari media PDA menggunakan kaca preparat steril untuk melarutkan spora jamur. Selanjutnya disaring larutan jamur menggunakan kasa steril untuk memisahkan antara filtrate yang berisi spora jamur dengan badan jamurnya



Gambar 4.5 Inokulum jamur

4.5 Fermentasi Bekatul Menggunakan Inokulum Jamur *Rhizopus Oryzae*

Alloh SWT berfirman dalam Al-Qur'an Surah Luqman (31) ayat 10:

خَلَقَ السَّمٰوٰتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَّرَوٰهَا وَاَلْقٰى فِي الْاَرْضِ رَوٰاسِيًّٓ اَنْ تَمَيِّدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيْهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ وَاَنْزَلْنَا
مِّنَ السَّمٰوٰءِ مَآءً فَاَنْبَتْنَا فِيْهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيْمٍ

Artinya : “Dia menciptakan langit tanpa tiang sebagaimana kamu melihatnya, dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembangbiakkan segala macam jenis makhluk bergerak yang bernyawa di bumi. Dan Kami turunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik”

Kata “tumbuhan” merujuk pada semua tanaman yang terdapat di Bumi.

Allah SWT mengatakan “tumbuhan yang baik” dikarenakan memiliki banyak manfaat dan kegunaan. Tumbuhan merupakan sumber daya alam yang sering menjadi bahan eksplorasi dan pengembangan untuk diteliti dan diambil senyawa bioaktifnya, karena hampir seluruh bagian tumbuhan mengandung senyawa bioaktif seperti pada bagian biji, akar, bunga, daun dan buah (Neldawati *et al.*, 2013). Begitu juga Bekatul yang merupakan bagian dari tanaman padi.

Kata زَوْجٍ dalam penggalan Surah Luqman (31) ayat 10 bermakna “pasangan” yang mana Allah SWT menciptakan seluruh makhluk di bumi berpasang-pasangan, seperti terciptanya makhluk berjenis kelamin laki-laki dan perempuan, terjadinya pergantian siang dan malam serta dengan dihidirkan penyakit dan juga obatnya. Nabi Muhammad SAW bersabda

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

Artinya: *Allah tidak akan menurunkan penyakit melainkan menurunkan obatnya juga.* (HR Bukhari)

Fermentasi bekatul dilakukan untuk meningkatkan komponen bioaktif dalam bekatul yaitu senyawa fenolik. Fenolik dapat digunakan sebagai zat antibakteri untuk menghambat pertumbuhan atau mematikan bakteri, maka bekatul dapat diolah menjadi obat antibakteri atau dijadikan sebagai bahan baku obat. Perkembangan teknologi berperan dalam proses pengolahannya. Maha besar Allah yang menciptakan manusia sebagai makhluk yang dapat berpikir. Adanya penelitian ini sebagai sarana untuk dapat mengetahui kebesaran Allah SWT dengan perantara bekatul. Al-Qur'an Surah Yunus (10) ayat 5:

هُوَ الَّذِي جَعَلَ الشَّمْسُ ضِيَاءً وَالْقَمَرَ نُورًا وَقَدَّرَهُ مَنَازِلَ لِتَعْلَمُوا عَدَدَ السِّنِينَ وَالْحِسَابَ مَا

خَلَقَ اللَّهُ ذَلِكَ إِلَّا بِالْحَقِّ يُفَصِّلُ الْآيَاتِ لِقَوْمٍ يَعْلَمُونَ

Artinya: *“...Dia menjelaskan tanda-tanda (Kebesaran-Nya) kepada orang-orang yang mengetahui”*

Firman Allah SWT dalam Al-Qur'an surat Az-Zumar ayat 21:

أَلَمْ تَرَ أَنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَسَلَكَهُ ۙ يَنْبِيعَ فِي الْأَرْضِ ثُمَّ يُخْرِجُ بِهِ ۙ زَرْعًا مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ ۗ
ثُمَّ يَهْبِطُ فَتَذِرُوهُ مَصْفَافًا ۗ ثُمَّ يُجْعَلُهُ ۗ حُطَامًا ۗ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَذِكْرًا لِأُولِي الْأَبْصَارِ

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

Dalam tafsir Al-maraghi, surat Az-Zumar menjelaskan bahwa Allah SWT telah menciptakan tumbuhan yang bermacam-macam warnanya, kemudian menjadi kering dan hancur atau berderai-derai. Hal ini sesuai analogi dari proses fermentasi. Pada saat fermentasi terjadi proses perubahan fisik pada sampel bekatul disebabkan oleh aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Fermentasi bertujuan untuk meningkatkan komponen bioaktif dalam bekatul. Ribeiro dkk., (2017) melaporkan bahwa fermentasi dedak oleh *Rhizopus oryzae* mampu meningkatkan senyawa fenolik dan nutrisi proksimat bekatul seperti protein, serat, lipid dan mineral. Rendemen ekstrak bekatul terfermentasi yang dihasilkan juga lebih besar dibandingkan dengan perlakuan tanpa fermentasi dengan hasil ekstrak bekatul terfermentasi selama 7 hari adalah 9,6910% dan ekstrak bekatul terfermentasi selama 5 hari 9.4330 % sedangkan rendemen ekstrak bekatul non-fermentasi terkecil yaitu 7.3603% (Jannah *et al.*,2019). Fermentasi juga dapat meningkatkan senyawa aktif yang berpotensi sebagai antibakteri. Pada bekatul Lebih dari 1% fenolik berikatan kovalen dengan serat tidak larut sehingga ketersediaannya rendah. Fenolik sulit diekstraksi karena banyaknya ikatan

kovalen dalam serat tidak larut bekatul (Wang dkk., 2015). Fermentasi menggunakan *Rhizopus oryzae* mampu menghasilkan Enzim hidrolitik enzim selulase dan hemiselulosa yang dapat menghidrolisis ikatan kovalen pada serat tidak larut bekatul (Miller, 2001). Maka fenolik yang terikat pada serat tidak larut dapat meningkat ketersediaannya. Ikatan kovalen yang terputus pada selulosa bekatul menyebabkan meningkatnya fenolik (Karppinen, 2003).

Fermentasi pada penelitian ini menggunakan metode *Solid state fermentation* (SSF). SSF merupakan metode yang efektif untuk fermentasi bekatul guna meningkatkan kandungan bioaktif (Schmidt dkk., 2014). Metode SSF juga dilaporkan sesuai untuk pertumbuhan kapang dan memiliki banyak manfaat dibandingkan dengan fermentasi substrat cair (*submerged*) antara lain tingkat produktivitas tinggi, teknik sederhana, jumlah air yang dibuang sedikit, dan recovery produknya lebih baik (Kupski dkk., 2012).

Sampel bekatul sebanyak 20 gram yang telah disterilisasi kemudian ditambahkan larutan *buffer* asam sitrat pH 5 steril sebanyak 10 mL (2:1). Jamur *Rhizopus oryzae* dapat tumbuh baik pada kisaran pH 4-6 (Sorenson, 1986) dan suhu 35°C (Kuswanto dan Slamet, 1989). Hal ini telah dibuktikan dengan hasil penelitian Hikmah (2018) tentang pengaruh kombinasi pH dan suhu terhadap peningkatan aktivitas antibakteri bekatul yang difermentasi oleh *Rhizopus oryzae*, dari penelitian ini diperoleh hasil randemen ekstrak bekatul paling banyak pada variasi pH 5 dan suhu 37°C. Ekstrak meningkat dibandingkan ekstrak bekatul tanpa fermentasi yaitu dari 9,09% menjadi 12,91%. Pada perlakuan variasi pH 5 dan suhu 37°C juga diperoleh peningkatan aktivitas antibakteri tertinggi, dimana

aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* meningkat sebesar 8,5 mm dan terhadap *Staphylococcus aureus* meningkat sebesar 7,5 mm.

Selanjutnya sampel ditambahkan inokulum jamur 10% (v/b) atau 2 mL secara aseptis kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 hari. Masa inkubasi 5 hari yaitu masa peralihan jamur dari masa logaritmik ke masa stasioner dimana tingkat produktivitas sel jamur mengalami peningkatan (Melgar dkk., 2013). Lama fermentasi 5 hari merupakan waktu yang optimum bagi jamur untuk mendegradasi matriks selulosa pada bekatul, sehingga senyawa fenolik dan metabolit sekunder lainnya yang terikat dalam ikatan glikosida lebih mudah terekstrak. Hal ini sesuai dengan penelitian Jannah dkk., (2019) tentang pengaruh lama waktu fermentasi bekatul oleh *Rhizopus Oryzae* terhadap rendemen ekstrak bekatul dan aktivitas antibakteri *Salmonella thypi*. Bekatul fermentasi 5 hari menghasilkan ekstrak dengan intensitas warna paling bagus pada uji proksimat dibandingkan dengan tanpa fermentasi dan fermentasi 7 hari. Begitu juga dengan uji aktivitas antibakteri yang memperoleh zona hambat paling tinggi terhadap pertumbuhan *Salmonella thypi*. Zona hambat ekstrak bekatul fermentasi selama 5 hari sebesar $13,03 \pm 3,08$ mm, 7 hari $7,9 \pm 3,44$ mm dan tanpa fermentasi $9,73 \pm 1,1$ mm. Penelitian serupa juga dilaksanakan Fikriyah (2018) mengenai pengaruh kombinasi lama waktu fermentasi dan konsentrasi substrat terhadap peningkatan aktivitas antioksidan bekatul yang difermentasi oleh *Rhizopus oryzae*, dari penelitian ini memperoleh hasil rendemen ekstrak bekatul paling banyak pada variasi lama waktu fermentasi selama 5 hari dan konsentrasi substrat 1:1 yaitu sebesar 12,33%. Pada perlakuan variasi lama fermentasi 5 hari dan konsentrasi substrat 1:1 juga diperoleh peningkatan aktivitas antioksidan tertinggi sebesar

13,37 %. Setelah dilakukan fermentasi selama 5 hari selanjutnya bekatul dikeringkan di dalam oven pada suhu 40°C selama 24 jam.



Gambar 4.6 Bekatul terfermentasi selama 5 hari

Hasil fermentasi bekatul menghasilkan aroma khas “tempe” dan sedikit asam. Selama proses fermentasi berlangsung kapang menghasilkan aktivitas enzim lipase yang menyebabkan degradasi lemak pada substrat menjadi gliserol dan asam lemak bebas. Senyawa alkohol akan bereaksi dengan asam lemak dan membentuk senyawa ester yang menimbulkan aroma pada bekatul fermentasi (Ardiansyah dkk., 2017). Hasil pengamatan fisik menunjukkan bahwa terdapat perubahan tekstur, aroma, dan penampakan dari bekatul fermentasi. Bekatul fermentasi memiliki tekstur yang lembab. Hal ini menunjukkan adanya peningkatan kadar air yang disebabkan oleh aktivitas kapang dalam mengubah substrat menjadi biomassa, CO₂, dan H₂O (Pandey & Ramachandran., 2006).

Pada fermentasi selama 48 jam terlihat pertumbuhan miselia berwarna putih. Semakin lama fermentasi berlangsung, warna miselia terlihat semakin putih kehitaman. Berdasarkan hasil studi Oliveira dkk. (2011), bekatul mengandung mineral-mineral seperti zat besi, fosfor, dan magnesium, serta mengandung 11–13% protein kasar, 11,5% serat, dan sejumlah besar minyak. Tumbuhnya miselia

kapang ini juga dapat disebabkan oleh kandungan mineral pada bekatul seperti Ca dan Mn (Suparjo, 2010). Perubahan warna miselia dari putih menjadi putih kehitaman seiring bertambahnya waktu fermentasi dapat disebabkan oleh adanya paparan oksigen.

4.6 Ekstraksi Bekatul Terfermentasi Jamur *Rhizopus oryzae* Menggunakan Variasi Pelarut Aseton, Metanol dan Etanol

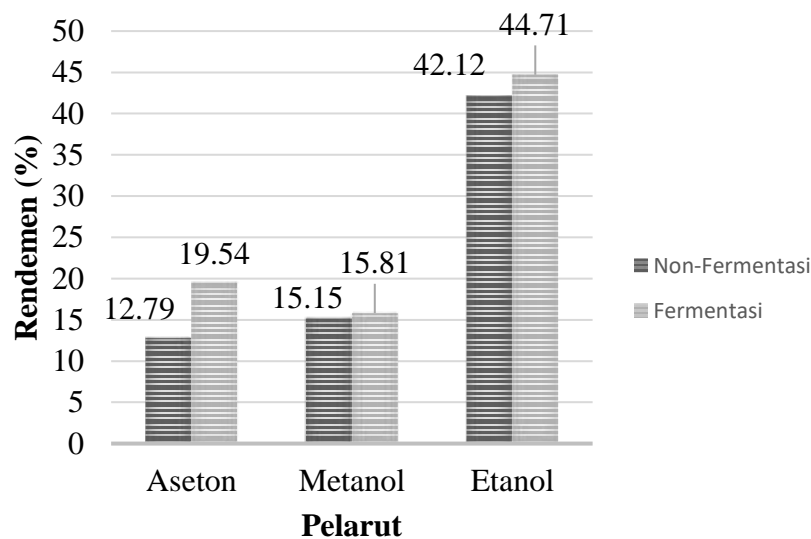
Ekstraksi sampel bekatul dalam penelitian ini menggunakan metode maserasi. Maserasi yaitu metode untuk mengambil ekstrak dari sampel organik dengan cara merendam sampel dalam pelarut organik pada temperatur ruangan. Saat sampel direndam, pelarut masuk ke dalam dinding sel dan rongga sel yang mengandung metabolit sekunder, sehingga dinding atau membran sel sampel terpecah, maka metabolit sekunder yang terdapat dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik (Nurchayanti, 2015). Saat perendaman sampel, terdapat perbedaan konsentrasi larutan di dalam dan di luar sel, hal ini menyebabkan tekanan antara dalam dan luar sel, maka larutan dengan konsentrasi lebih pekat akan keluar sel membawa metabolit sekunder. Proses ini berkelanjutan hingga konsentrasi seimbang antara larutan di dalam dan di luar sel (Hukmah, 2007).

Efektivitas ekstraksi suatu senyawa oleh pelarut sangat tergantung kepada kelarutan senyawa tersebut dalam pelarut, komponen bioaktif akan terlarut oleh pelarut yang sesuai sifat kepolarannya. Sesuai dengan teori “*like dissolve like*” yang menyatakan bahwa senyawa nonpolar akan larut dalam pelarut nonpolar sedangkan senyawa polar akan larut dalam pelarut polar (Sudarmadji dkk., 1997). Jenis asam fenolat seperti turunan asam hidroksibenzoat dan asam

hidroksisinamat banyak terdapat pada tumbuhan. Senyawa fenolat bebas dan terkonjugasi umumnya mudah larut pada pelarut polar, sedangkan fenolat terikat tidak dapat terlarut, strukturnya teresterifikasi pada dinding sel (Wang et al., 2015; Chen et al., 2017). Asam fenolat bebas dapat larut pada larutan solvolisis sehingga bisa diekstraksi menggunakan pelarut air, metanol, etanol, dan aseton. Senyawa fenolik memiliki sifat polar (Robinson, 1995), sehingga memerlukan pelarut yang bersifat polar untuk mengekstraksi senyawa tersebut (Rifai *et al.*, 2018), seperti etanol, metanol dan aseton (Delazar *et al.*, 2012).

Salah satu faktor yang berpengaruh pada metode maserasi adalah jenis pelarut. Pemilihan jenis pelarut harus mempertimbangkan beberapa faktor antara lain selektivitas, kemampuan untuk mengekstrak, toksisitas, kemudahan untuk diuapkan dan harga pelarut (Harborne, 1987). Berdasarkan literatur diatas maka dalam penelitian ini menggunakan 3 variasi pelarut aseton metanol, dan etanol untuk mengekstraksi senyawa bioaktif dalam sampel bekatul. Adapun tahapan dalam mengekstraksi senyawa bioaktif dalam sampel bekatul yaitu ditimbang bekatul kering hasil fermentasi, lalu dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL. Setelah itu ditambahkan variasi pelarut aseton, metanol dan etanol p.a (1:3 b/v) pada masing-masing sampel. Kemudian ditutup erlenmeyer dengan sumpel dan dilapisi dengan *plastic wrap* agar pelarut tidak menguap karena sifat dari ketiga pelarut tersebut volatile. Selain itu untuk menghindari kontaminasi mikroorganisme dari luar yang dapat mempengaruhi hasil randemen ekstrak. Setelah itu sampel dimaserasi menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu ruang selama 5 jam. Kelebihan dari metode maserasi adalah biayanya yang murah, mudah untuk dilakukan dan tanpa pemanasan sehingga

tidak merusak senyawa metabolit sekunder didalamnya (Cuppet *et al.*, 1954). Selanjutnya sampel disaring menggunakan penyaringan *buchner*. Metode penyaringan *Buchner* dapat mempercepat proses penyaringan. Metode penyaringan *Buchner* menggunakan corong *Buchner*, kertas saring dan vakum. Fungsi dari vakum dapat mempercepat proses penyaringan dan filtrat hasil metode ini lebih jernih. Penyaringan berfungsi untuk memisahkan filtrat yang terisi oleh ekstrak dengan endapan yang berisi residunya. Filtrat yang telah didapatkan dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Kemudian ditimbang ekstrak dari setiap variasi pelarut.



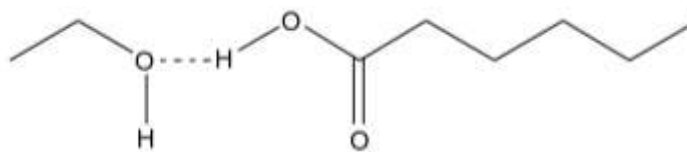
Gambar 4.7 Rendemen ekstrak bekatul

Gambar 4.7 menunjukkan rendemen ekstrak bekatul. Hasil rendemen terbanyak pada pelarut etanol dengan rata-rata rendemen ekstrak non fermentasi 42,12% dan ekstrak terfermentasi *Rhizopus oryzae* 44,71%, lalu aseton dengan rata-rata rendemen ekstrak non fermentasi 12,79% dan ekstrak terfermentasi

Rhizopus oryzae 19,54%, dan yang paling rendah pelarut metanol dengan rata-rata rendemen ekstrak non fermentasi 15,15% dan ekstrak terfermentasi *Rhizopus oryzae* 15,81%. Tingginya rendemen ekstrak bekatul dengan menggunakan pelarut etanol menunjukkan bahwa pelarut etanol mampu mengekstrak senyawa lebih baik, karena jumlah rendemen tersebut bergantung pada kesamaan sifat kepolaran jenis pelarut. Penelitian ini menunjukkan bahwa kepolaran senyawa yang terkandung pada ekstrak bekatul mempunyai kepolaran yang mendekati kepolaran etanol, sehingga dapat terekstrak lebih tinggi. Hasil ini sesuai dengan penelitian Widarta dkk (2013) yang mengekstraksi komponen bioaktif bekatul beras lokal (bekatul beras putih, merah dan hitam) menggunakan pelarut metanol dan etanol. Nilai rata-rata rendemen bekatul beras putih pelarut etanol sebesar 9,99%, lebih tinggi dibandingkan hasil rendemen pelarut metanol yaitu 7,82 %. Susanti dkk (2012) juga mengekstraksi bekatul dari varietas ketan (*oriza sativa glatinosa*) menggunakan beberapa pelarut dengan perbedaan polaritas yaitu aseton, metanol, etanol, n-heksan, etyl asetat, dan isopropanol menggunakan metode ekstraksi soxhlet. Penelitian ini menghasilkan rendemen minyak bekatul pelarut etanol lebih tinggi dibandingkan rendemen pelarut aseton dan metanol. Nilai rendemen pelarut etanol 96% yaitu 14,7 % sedangkan rendemen pelarut aseton 9,30% dan metanol 9,16. secara umum ekstrak bekatul berupa minyak atau lemak yang mengandung komponen polar lebih banyak dibandingkan komponen non-polar, sehingga etanol dapat mengekstrak komponen dalam bekatul lebih banyak. 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 polar, seperti aseton, alkohol, eter, benzena, kloroform dan sebagainya. (Sahriawati dan Daud., 2016). Menurut Purwanto, dkk (2016) hal ini juga menunjukkan bahwa kandungan dalam minyak bekatul merupakan senyawa-senyawa polar seperti asam lemak berupa asam oleat, linoleat, linolenat, palmitat, dan stearat.

Pelarut etanol memiliki dua sisi yang terdiri dari gugus OH- yang bersifat polar dan gugus CH_2CH_3 yang bersifat nonpolar sehingga dapat mengekstrak senyawa aktif baik dari golongan polar maupun nonpolar. Menurut hasil pengamatan Rahmiati, Darmawati dan Mukaromah (2017) Etanol merupakan larutan yang bersifat semi polar, yang artinya dapat melarutkan senyawa polar maupun nonpolar. Pelarut semi polar dapat menginduksi tingkat kepolaran molekul-molekul pelarut nonpolar. Etanol bertindak sebagai perantara (*Intermediete solvent*) untuk mencampurkan pelarut polar dengan nonpolar. Hal ini berarti larutan etanol sangat bagus digunakan sebagai pelarut bahan alam karena sangat baik untuk menarik senyawa zat aktif yang terkandung di dalamnya seperti flavonoid, saponin, tanin yang bersifat polar dan alkaloid yang bersifat nonpolar. Hal ini sesuai dengan penelitian Kemit dkk., (2016) dan Simamora dkk, (2021) bahwa jenis pelarut sangat berpengaruh dalam menghasilkan ekstrak yang baik. pelarut etanol mampu menghasilkan rendemen tertinggi dibandingkan dengan pelarut metanol, aseton dan aquades dalam mengekstrak bahan alam. Berikut gambar interaksi yang terjadi antara pelarut etanol dengan senyawa asam lemak yang terdapat dalam minyak bekatul:



Gambar 4.8 Interaksi pelarut etanol dengan senyawa asam lemak

Interaksi pelarut etanol dengan senyawa asam lemak terjadi melalui ikatan hidrogen intramolekuler antara O pada etanol dengan H pada asam lemak. Pada ikatan hidrogen terjadi gaya tarik menarik antara atom H dengan atom O yang mempunyai keelektronegatifan lebih besar sehingga dapat menyebabkan atom O pada etanol dan atom H pada asam lemak terjadi muatan listrik parsial dengan polaritas yang berlawanan maka interaksi ini menyebabkan senyawa asam lemak yang ada pada etanol terektaksi lebih banyak dari pada aseton dan metanol.

Pelarut organik berdasarkan konstanta dielektriknya dibedakan menjadi dua yaitu pelarut polar dan nonpolar. Konstanta dielektrik dinyatakan sebagai gaya tolak menolak antara dua partikel yang bermuatan listrik dalam suatu molekul. Semakin tinggi konstanta dielektriknya maka pelarut bersifat semakin polar. Konstanta dielektrik pada air, metanol, etanol dan aseton masing-masing mempunyai nilai yaitu 80, 33, 24 dan 21 (Sudarmadji dkk., 1997).

Pada perlakuan fermentasi dan non-fermentasi menunjukkan selisih rendemen yang signifikan. Fermentasi bekatul menggunakan *Rhizopus oryzae* mampu meningkatkan senyawa fenolik dan nutrisi proksimat bekatul seperti protein, serat, lemak, abu dan mineral (Jannah dkk., 2019). Fermentasi juga dapat meningkatkan senyawa aktif yang berpotensi sebagai antibakteri. Hal ini sesuai dengan penelitian Jannah dkk (2019) bahwasanya hasil rendemen ekstrak bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae* lebih besar dibandingkan dengan perlakuan tanpa

fermentasi dengan hasil ekstrak bekatul terfermentasi selama 7 hari adalah 9,6910% dan ekstrak bekatul terfermentasi selama 5 hari 9.4330 % sedangkan rendemen ekstrak bekatul non-fermentasi terkecil yaitu 7.3603% (Jannah *et al.*,2019). *Rhizopus oryzae* mampu menghasilkan Enzim hidrolitik enzim selulase dan hemiselulosa yang dapat menghidrolisis ikatan kovalen pada serat tidak larut bekatul (Miller, 2001). Maka fenolik yang terikat pada serat tidak larut dapat meningkat ketersediaannya. Ikatan kovalen yang terputus pada selulosa bekatul menyebabkan meningkatnya fenolik (Karppinen, 2003).

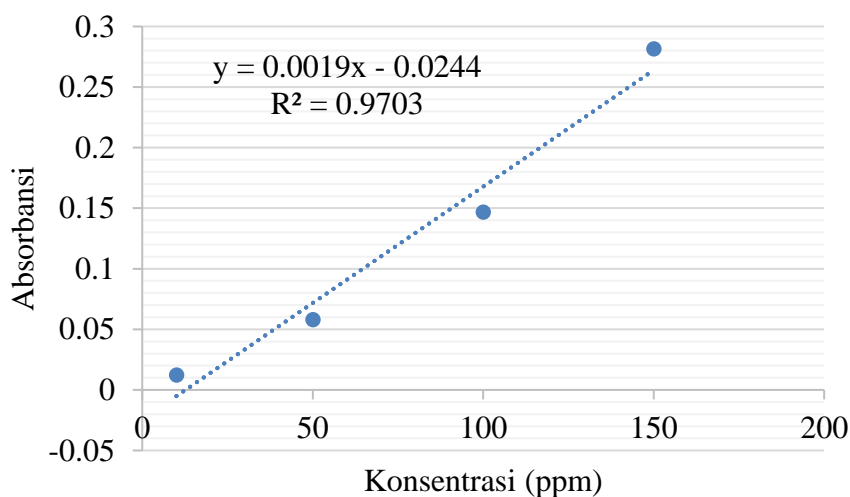
4.7 Analisis Konsentrasi Total Fenolik (KTF) Metode *Folin-Ciocalteu*

4.7.1 Pembuatan Kurva Standart Asam Galat

Analisis (KTF) ekstrak bekatul menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* dan pengukuran absorbansi kurva standar asam galat menggunakan instrumen spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 765 nm (Sitorus *et al.*, 2020). Asam galat digunakan sebagai larutan standar karena asam galat adalah asam fenol sederhana yaitu fenolik alami turunan dari hidroksibenzoat yang bersifat murni dan stabil (Chun dkk., 2003). Konsentrasi asam galat yang digunakan untuk kurva standart dalam penelitian ini yaitu 10, 50, 100 dan 150 ppm.

Penentuan KTF dapat dilakukan dengan menambahkan reagen *Folin-Ciocalteu* dan Na_2CO_3 pada larutan standart asam galat dan larutan ekstrak (Lee, *et al.*, 2003; Pratimasari, 2009). Reagen *Folin Ciocalteau* bereaksi dengan Asam galat membentuk warna kuning yang mengindikasikan fenolik (Lee dkk., 2003). Selanjutnya ditambahkan larutan Na_2CO_3 untuk memberikan suasana basa (Lee dkk., 2003) agar terjadi disosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat

sehingga dapat bereaksi dengan reagen *Folin-Ciocalteu* (Prayoga, dkk, 2019). Setelah penambahan Na_2CO_3 kemudian didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar agar larutan bereaksi sempurna. Reagen *Folin-Ciocalteu* terdiri dari campuran asam heteropoli, asam fosomolibdat, dan fosfotungstat yang dapat mereduksi senyawa *fosfomolybdotungstat* menjadi *heteropolimolybdenum* yang menghasilkan warna biru (Ardila, 2020). Selanjutnya diukur absorbansi pada panjang gelombang 765 nm menggunakan spektrofotometri UV-Vis (Sitorus *et al.*, 2020).



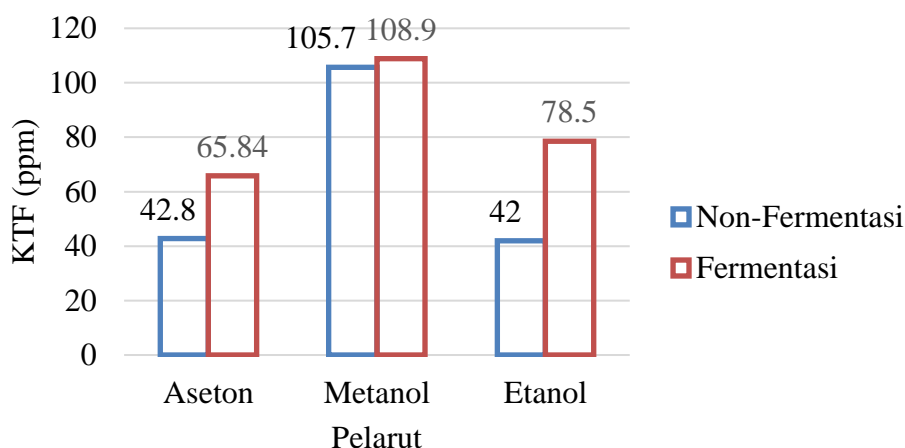
Gambar 4.9 Kurva standart asam galat

Dari gambar 4.9 diperoleh persamaan regresi linier yang akan digunakan untuk penetapan KTF dalam sampel (konsentrasi larutan sebagai koordinat x dan absorbansi dari larutan standart sebagai koordinat y) (Paramita *et al.*, 2020). Gambar 4.9 berupa grafik kurva standart asam galat yang menunjukkan persamaan $y = 0.0019x - 0.0244$ dengan $R^2 = 0.9703$. Nilai R^2 yang mendekati 1 menunjukkan adanya hubungan yang linier sehingga dapat dikategorikan sebagai

korelasi sangat kuat. Koordinat X dalam kurva merupakan konsentrasi asam galat dan koordinat Y merupakan absorbansi. Pengujian kadar total fenol dihitung dengan menggunakan persamaan kurva kalibrasi asam galat ($y = 0.0019x - 0.0244$) dan menggunakan rumus TPC.

4.7.2 Penentuan Konsentrasi Total Fenolik (KTF) Ekstrak Bekatul

Senyawa fenolik yang terkandung dalam ekstrak sampel merupakan hasil metabolit sekunder yang potensial sebagai sumber bahan baku obat yang berperan sebagai antioksidan maupun antibakteri (Tahir *et al.*, 2020). Konsentrasi ekstrak bekatul yang digunakan dalam penelitian ini 10 mg/mL.



Gambar 4.10 Konsentrasi total fenolik

Gambar 4.10 menunjukkan konsentrasi total fenolik dari variasi pelarut aseton, metanol dan etanol. Data tersebut menunjukkan jika pelarut metanol mampu mengekstrak senyawa fenolik paling baik, dengan memperoleh KTF ekstrak bekatul non fermentasi 105,7 ppm dan KTF ekstrak bekatul terfermentasi 108,9 ppm. Kemudian pelarut etanol memperoleh KTF ekstrak bekatul non

fermentasi 42 ppm dan rata-rata KTF ekstrak bekatul terfermentasi 78,5 ppm. Ekstrak pelarut aseton mengandung KTF paling sedikit yaitu ekstrak bekatul non fermentasi 42,8 ppm dan rata-rata KTF ekstrak bekatul terfermentasi 65,8 ppm.

Tabel 4.1 Hasil penetapan Konsentrasi Total Fenolik ekstrak bekatul

Ekstrak sampel bekatul	Konsentrasi Total Fenolik (ppm)		Nilai peningkatan KTF
	Non-fermentasi	Fermentasi	
Aseton	42,8	65,8	23
Metanol	105,7	108,9	3,2
Etanol	42	78,5	36,5

Tabel 4.1 menunjukkan adanya pengaruh perbedaan pelarut terhadap nilai konsentrasi total fenolik ekstrak bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae* yang diekstraksi dengan metode maserasi. Hal ini ditunjukkan oleh adanya perbedaan nilai KTF dari masing-masing pelarut serta peningkatan KTF yang sangat tinggi jika bekatul diekstrak menggunakan pelarut metanol. Hal ini dikarenakan sifat kepolaran dari senyawa fenolik, baik senyawa fenolik bebas maupun terkonjugasi umumnya bersifat polar sehingga lebih mudah larut pada pelarut polar (Wang et al., 2015; Chen et al., 2017). Sesuai teori “*like dissolve like*” yang menyatakan bahwa senyawa polar akan larut dalam pelarut polar sedangkan senyawa nonpolar akan larut dalam pelarut nonpolar (Sudarmadji dkk., 1997).

Pelarut metanol mampu mengekstrak senyawa fenolik paling banyak karena metanol merupakan pelarut yang bersifat polar dan memiliki konstanta dielektrik paling tinggi. Semakin tinggi konstanta dielektriknya maka pelarut

bersifat semakin polar. Konstanta dielektrik pada metanol, etanol dan aseton masing-masing mempunyai nilai yaitu 33, 24 dan 21 (Sudarmadji dkk., 1997). Penelitian ini menunjukkan sifat kepolaran fenolik dalam bekatul sesuai sifat kepolaran dari metanol, sehingga fenolik dapat terekstrak lebih banyak pada pelarut metanol. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Widarta (2013) yang juga menguji kadar total fenol dari ekstrak bekatul beras putih pada variasi pelarut metanol, etanol dan aqua DM. Hasil penelitian menyatakan bahwa metanol mampu mengekstrak fenolik pada bekatul lebih banyak dari pada pelarut etanol dan aqua DM dengan kadar total fenol 3,76 mg/100 gr bekatul.

Bekatul mengandung komponen fenolik, seperti asam ferulat, asam galat, klorogenat, asam kafeat, protokatekuat, vanillin, asam salisilat, asam kumarat, α tokoferol dan siringat (Schmidt dkk., 2014). Bekatul juga mengandung beberapa metabolit sekunder seperti alkaloid, terpenoid, steroid, saponin, tannin, dan flavonoid (Jannah dkk., 2020). Maka metanol juga mengekstrak alkaloid, terpenoid, steroid, saponin, tannin, dan flavonoid bekatul (Astarina dkk., 2013).

Hal ini juga berbanding lurus pada perlakuan fermentasi dan non-fermentasi. Pada perlakuan fermentasi dan non-fermentasi menunjukkan selisih peningkatan konsentrasi fenolik yang signifikan dikarenakan fermentasi bekatul oleh *Rhizopus oryzae* mampu meningkatkan senyawa fenolik. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Kurniati dkk (2017) bahwa kadar total fenol meningkat dari 2,4 mg/g menjadi 4 mg/g setelah bekatul difermentasi oleh kapang *Rhizopus oryzae*. Peningkatan KTF dari bekatul fermentasi disebabkan oleh kemampuan kapang untuk mendegradasi material *lignocellulosic* atau memutus senyawa selulosa yang berikatan dengan lignin. Hal ini dikarenakan sebagian besar (40-50%) senyawa

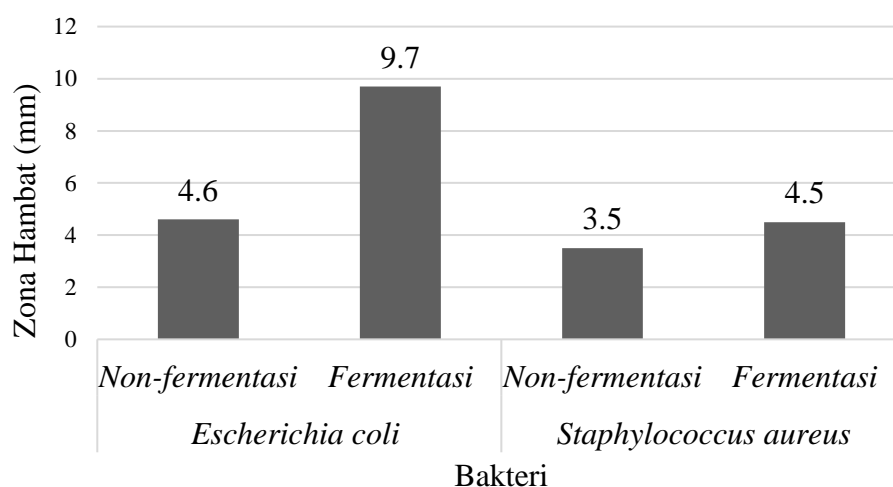
fenolik yang terdapat dalam bekatul merupakan senyawa fenolik yang terikat dengan komponen struktur dinding sel seperti selulosa, lignin, dan protein melalui ikatan ester (Zhang dkk., 2010; Min dkk., 2011). Oliveira (2010) menambahkan bahwa komponen fenolik bekatul dapat terbentuk karena adanya proses dekomposisi lignin, selulosa, dan hemiselulosa selama fermentasi.

Fenolik sulit diekstraksi karena banyaknya ikatan kovalen dalam serat tidak larut bekatul (Wang *et al.*, 2015). Fermentasi menggunakan *Rhizopus oryzae* mampu menghasilkan Enzim hidrolitik enzim selulase dan hemiselulosa yang dapat menghidrolisis ikatan kovalen pada serat tidak larut bekatul (Miller, 2001). Maka fenolik yang terikat pada serat tidak larut dapat meningkat ketersediaannya. Ikatan kovalen yang terputus pada selulosa bekatul menyebabkan meningkatnya fenolik (Karppinen, 2003).

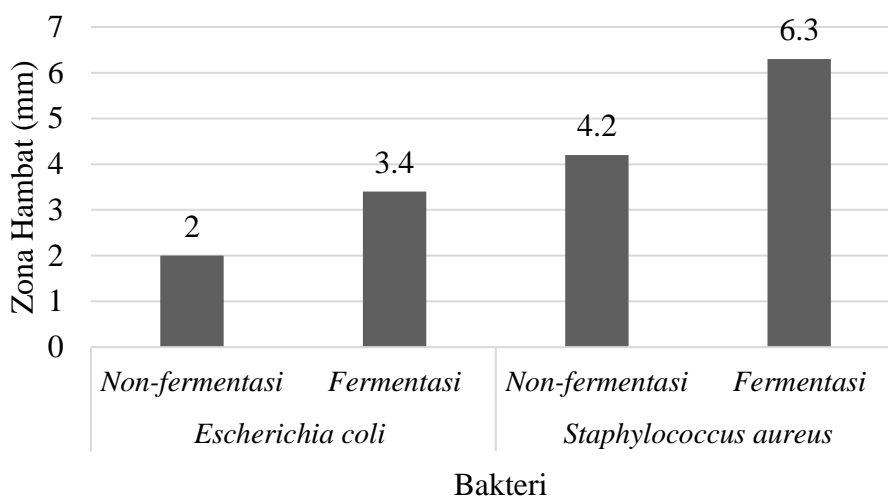
4.8 Uji Aktivitas Antibakteri Metode Difusi Agar

Antibakteri adalah senyawa kimia yang berfungsi untuk menghambat pertumbuhan atau mematikan bakteri patogen (Agustrina, 2011). Secara umum senyawa fenol memiliki sifat bakteriosid, antimetik, antihelminik, antiasmatik, analgetik, antiinflamasi, meningkatkan motilitas usus, antimikroba, dan masih banyak lagi (Andarwulan *et al.*, 2012). Uji Antibakteri dalam penelitian ini menggunakan metode difusi agar. Metode difusi adalah pengamatan diameter zona bening yang terbentuk di sekitar cakram setelah didiamkan selama 18-24 jam dan diukur menggunakan jangka sorong. Metode *disc diffusion* atau metode *Kirby Bauer* adalah metode yang menggunakan kertas cakram yang berisi zat antimikroba dan diletakkan pada media agar yang telah ditanami bakteri uji

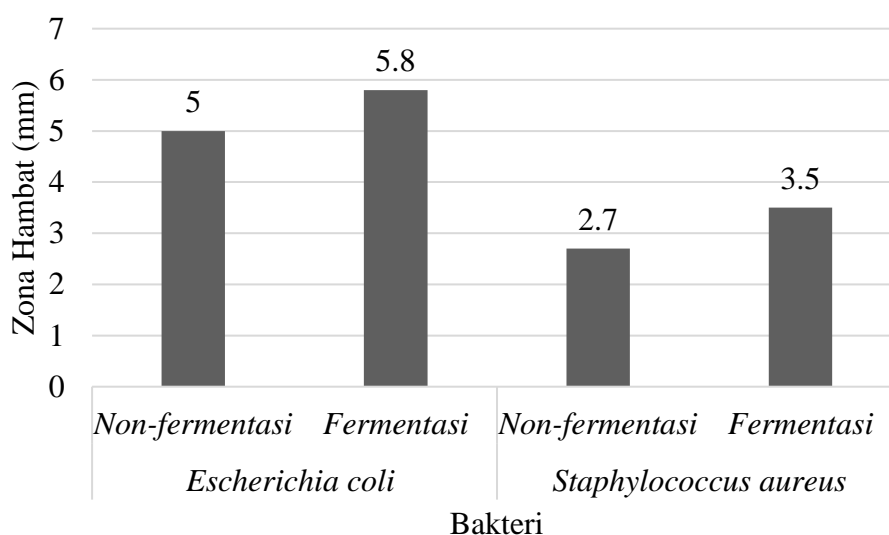
(Hudzicki, 2016) dan (Nagoba, 2009). Bakteri uji yang digunakan adalah *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Dalam penelitian ini juga menggunakan kontrol positif berupa *chloramphenicol* dan kontrol negatif berupa pelarut DMSO. Kontrol positif berfungsi sebagai kontrol dari sampel ekstrak dengan membandingkan diameter zona hambat yang terbentuk. Kontrol negatif berfungsi untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pelarut terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Nugraha dkk., 2017). Sampel dikatakan mampu menghambat pertumbuhan koloni bakteri apabila terjadi daerah bening disekitar cakram kertas akibat pengaruh senyawa bioaktif sampel (Wardhani & Supartono, 2015).



Gambar 4.11 Grafik zona hambat ekstrak bekatul pelarut aseton



Gambar 4.12 Grafik zona hambat ekstrak bekatul pelarut metanol

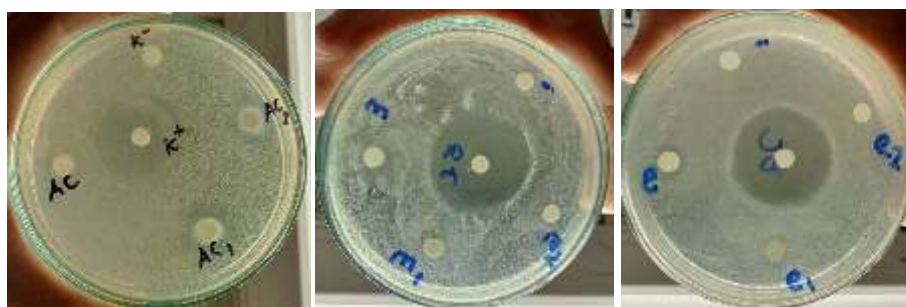


Gambar 4.13 Grafik zona hambat ekstrak bekatul pelarut etanol

Gambar 4.11 - 4.13 menunjukkan adanya pengaruh perbedaan pelarut terhadap aktivitas antibakteri ekstrak bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae* yang diekstraksi dengan metode maserasi. Hal ini ditunjukkan oleh adanya perbedaan nilai zona hambat dari masing-masing pelarut serta peningkatan nilai zona hambat

terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* jika bekatul diekstrak menggunakan pelarut metanol. Hal ini mengindikasikan bahwa total fenolik berbanding lurus dengan aktivitas antibakteri yang mana fenolik memiliki kemampuan untuk menghambat atau mematikan bakteri. Turunan fenolik yang bersifat antibakteri pada bekatul yaitu golongan flavonoid (Ambujakshi dkk, 2009) alkaloid, saponin, steroid, dan tannin (Ningsih, *et al.*, 2016).

Data rata-rata zona hambat dari ekstrak bekatul pelarut aseton, metanol dan etanol menunjukkan jika ekstrak dari semua variasi pelarut memiliki zat antibakteri. Perlakuan fermentasi pada bekatul berpengaruh terhadap peningkatan zona hambat, berarti semakin banyak senyawa fenolik yang terekstrak maka semakin besar pula kemampuan ekstrak dalam menghambat atau mematikan bakteri. Dari penelitian ini diperoleh aktivitas antibakteri terbaik pada bekatul terfermentasi yang diekstrak menggunakan pelarut aseton dengan nilai zona hambat 9,7 mm saat diujikan pada bakteri *Escherichia coli*. Hal ini sesuai dengan penelitian Jannah dkk (2019) yang menunjukkan aktivitas antibakteri dari ekstrak bekatul non-fermentasi dan terfermentasi. Aktivitas antibakteri dari ekstrak bekatul terfermentasi 5 hari dengan konsentrasi ekstrak 25% memiliki daya hambat paling besar yaitu 13 mm maka dikategorikan zona hambat kuat.



Gambar 4.14 Zona hambat ekstrak bekatul dengan variasi pelarut terhadap bakteri *Escherichia coli*

Penghambatan bakteri *Staphylococcus aureus* ekstrak bekatul paling efektif yaitu menggunakan pelarut metanol dengan nilai zona hambat ekstrak bekatul non fermentasi 4,2 mm dan ekstrak bekatul non fermentasi 6,3 mm. Ekstrak metanol bekatul fermentasi mengandung fenolik paling banyak dibandingkan ekstrak etanol dan ekstrak aseton. Maka penelitian ini menunjukkan pelarut yang efektif digunakan dalam ekstraksi maserasi bekatul untuk mengekstrak senyawa fenolik dan zat antibakteri lainnya yaitu pelarut metanol dikarenakan sifat kepolaran fenolik dalam bekatul mendekati sifat kepolaran dari metanol, sehingga fenolik dapat terekstrak lebih banyak.



Gambar 4.15 Zona hambat ekstrak bekatul dengan variasi pelarut terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh perbedaan pelarut terhadap peningkatan konsentrasi total fenolik (KTF) dan aktivitas antibakteri ekstrak bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae* yang diekstraksi dengan metode maserasi. Pelarut etanol efektif digunakan untuk mengekstrak sampel bekatul karena dapat memperoleh randemen tertinggi 42.12% (ekstrak non-fermentasi) dan 44.71% (ekstrak fermentasi) dibandingkan metanol 15.15% (ekstrak non-fermentasi) dan 15.81 % (ekstrak fermentasi) dan aseton 12.79% (ekstrak non-fermentasi) dan 19.54 % (ekstrak fermentasi). Pelarut metanol merupakan pelarut yang efektif untuk mengekstrak senyawa fenolik dari bekatul. KTF dalam ekstrak bekatul pelarut metanol mencapai 108,9 ppm untuk bekatul fermentasi dan 105,7 ppm untuk bekatul non-fermentasi. Total fenolik berbanding lurus dengan zona hambat yang dihasilkan maka ekstrak bekatul pelarut metanol menjadi pelarut yang efektif untuk mengekstraksi senyawa antibakteri dalam bekatul.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian sejenis dengan menggunakan variasi varietas bekatul untuk mempertegas bahwa bekatul mempunyai kemampuan aktivitas antibakteri.
2. Perlu dilakukan uji penyimpanan bekatul untuk mengetahui umur simpan dari sampel bekatul ataupun ekstrak bekatul

DAFTAR PUSTAKA

- Agtini, M. (2011). Morbiditas dan Mortalitas Diare pada Balita di Indonesia Tahun 2000-2007. *Buletin Jendela Data dan Informasi Kesehatan*, 2 (26), 1-3.
- Agustrina, G. (2011). *Potensi propolis lebah madu Apis mellifera sebagai bahan antibakteri*. . Bogor: Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor .
- Ahmad, A., Chan, C., Shukor, S., & Mashitah, M. (2008). Recovery of oil and carotenes from palm oil Mill. effluent. *Chemical Engineering Journal*, 141, 383-386.
- Aj, H., & Ollila Ca, K. A. (2012). Chemo- Preventive Properties Of Dietary Rice Bran: Current Status And Future Prospects. *Adv Nutr* , 3: 643-653. Doi: 10.3945/An.112.002303.
- Alves, G, H, Ferreira, C, D, Vivian, P, G, Monks, J, L, F, Elias, M, C, Vanier, L, N, de Oliveira, M., 2016, The revisited levels of free and bound phenolics in rice: Effects of the extraction procedure, *Food Chemistry*, 208:116–123.
- Andarwulan, N., Faradilla, & Fitri, R. (2012). *Senyawa Fenolik pada Buah Manggis Dari Indonesia*. Bogor Jawa Barat: SEAFast IPB.
- Anggraeni, E. V., & Anam, K. (2016). Identifikasi Kandungan Kimia dan Uji Aktivitas Antimikroba Kulit Durian (*Durio zibethinus* Murr.). *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 19 (3), 87-93.
- Anwar, K., Rahmanto, B., Triyasmono, L., Rizki, M. I., Halwany, W., & Lestari, F. (2017). The Influence of Leaf Age on Total Phenolic, Flavonoids, and Free Radical Scavenging Capacity of *Aquilaria beccariana*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 8(1S), 129-133.
- Apriliani, S. (2020). *Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Kemangi (Ocimum sanctum Linn) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Streptococcus mutans Pada Infeksi Odontogenik Secara In Vitro*. Medan: Universitas Sumatra Utara.
- Ardiansyah, A., Sabilla, D., David, W., Handoko, D. D., & Budijanto, S. (2020). Perubahan Aktivitas Antioksidan dan Profil Sensori Bekatul Fermentasi dari Varietas Sintanur dan Inpari 24. *agriTECH*, 40 (2), 150-160.
- Ardiansyah, A., Sabilla, D., David, W., Handoko, D. D., & Budijanto, S. (2020). Perubahan Aktivitas Antioksidan dan Profil Sensori Bekatul Fermentasi dari Varietas Sintanur dan Inpari 24. *agriTECH*, 40 (2), 150-160.

- Aruben, N. W. (2020). Peningkatan Konsentrasi Senyawa Fenolik Antioksidan Dari Dedak Dengan Cara Fermentasi. *Artikel Ilmiah*.
- Astawan, M., & Febrinda, A. (2010). Potensi Dedak Dan Bekatul Beras Sebagai Ingredient Pangan Dan Produk Pangan Fungsional. *Artikel Pangan, Vol. 19 No. 1*, 14-21.
- Astawan, M., Hadi Riyadi, & Elis Nurhayati. (2013). Perendaman Asam Askorbat Dapat Memperbaiki Sifat Fisik, Kimia, Sensori, dan Umur Simpan Tepung Bekatul Fungsional. *Artikel*, 50.
- Bakhtera, D. D., & Jubahar, J. (2018). Uji Aktivitas Fraksi Dari Ekstrak Daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens* (Lour) Merr.) Terhadap Bakteri *Shigella dysenteriae*. *J. Farm. Higea*, 10.
- Cairns D., 2009, *Essentials of Pharmaceutical Chemistry Second Edition* (Intisari Kimia Farmasi Edisi Kedua), Penerjemah : Puspita Rini, Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Chairani A, Harfiani A. Efektivitas getah jarak sebagai antiseptik terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida sp.* secara invitro. JK Unila 2018 ; 2(2) : 84-92.
- Chun, O., Kim, D., & Lee, C. Y. (2003). Superoxide Radical Scavenging Activity of The Major Polyphenols in Fresh Plums. *J Agric Food Chem*.
- Day, R A, dan Underwood, A L., 2002, *Analisis Kimia Kuantitatif Edisi Keenam*, Erlangga, Jakarta.
- Delazar, A., Nahar, L., Hamedeyaz, S., & Satyajit, S. (2012). Microwave-assisted extraction in natural products isolation natural products isolation, methods in molecular biology. *Springer Science, New York, 864*, 215-218.
- Diniyah, N., & Lee, S.-H. (2020). Komposisi Senyawa Fenol Dan Potensi Antioksidan Dari Kacangkacangan: Review. *Jurnal Agroteknologi*, , 14 , 91-102.
- Dwidjoseputro, S. (1994). *Mikrobiologi Pangan*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Estiasih, T., Ahmadi, K., & Santoso, V. (2021). Senyawa bioaktif dan potensi bekatul beras (*Oryza sativa*) sebagai bahan pangan fungsional. *Teknologi Pangan : Media Informasi dan Komunikasi Ilmiah Teknologi Pertanian*, 12, No. 1, 30-43.

- Fabian, C., & Ju, Y. (2011). A Review on rice bran protein: its properties and extraction methods. *Journal Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(9), 816-827. doi:<https://doi.org/10.1080/10408398.2010.482678>
- faizah, Kusnandar, F., & Nurjanah, S. (2020). Senyawa Fenolik, Oryzanol, Dan Aktivitas Antioksidan Bekatul Yang Difermentasi Dengan *Rhizopus oryzae*. *jurnal teknologi dan industri pangan*, 31 (1), 87-94.
- Fauziah, L. (2008). *Studi Dimerisasi Asam*. Depok: FMIPA, Universitas Indonesia.
- Forster Gm, R. K. (2013). Rice Varietal Differences In Bioactive Bran Components For Inhibition Of Colorectal Cancer Cell Growth. *J.Foodchem*, 141: 1545-1552.
- Gandjar, I.G. dan Rohman, A., 2012, Analisis Obat Secara Spektroskopi dan Kromatografi, Yogyakarta: Pustaka Pelajar, hal 59-93 dan 468- 490.
- Garg, N., Abdel-Aziz, S., & Aeron, A. (2016). *Microbes in Food and Health*, Springer, Switzerland.
- Hanin, N. N., & Pratiwi, R. (2017). Kandungan Fenolik, Flavonoid Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Paku Laut (*Acrostichum Aureum L.*) Fertil Dan Steril. *Journal Trop. Biodiv. Biotech.*, 2 , 51—56.
- Han, S., Chee, K., & Cho, S. (2015). Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. *Food Chemistry* 172, 766-9. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.127>
- Hastie, T., R, T., & J, F. (2013). The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference, and Prediction. *Springer Science & Business Media*, 545.
- Hermawan, G. P., & Laksono, H. (2013). Ekstraksi Daun Sirsak Menggunakan Pelarut Etanol. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industry*, 2 (2), 111-115.
- Hikmah , J. (2018). Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Antibakteri Bekatul Terfermentasi Oleh *Rhizopus Oryzae*. Dalam *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hudzicki J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. American Society For Microbiology 2016 ;1-18.
- Hukmah, S. (2007). *Aktivitas Antioksidan Katekin dari Teh Hijau (Camellia Sinensis O.K. Var. Assamica (mast)) Hasil Ekstraksi dengan Variasi Pelarut dan Suhu*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang.

- Indrawati, N. L., & Razimin. (2013). *Bawang Dayak : Si Umbi Ajaib Penakluk Aneka Penyakit*. Jakarta : PT AgroMedia Pustaka.
- Islam Ms, N. R. (2011). Biological Abilities Of Rice Bran Derived Antioxidant Phytochemicals For Medical Therapy - A Review. . *Curr Top Med Chem* , 11: 1847-1853.
- Jannah, D. W., Maunatin, A., & Jannah, A. (2021). Identifikasi dan Uji Toksisitas terhadap Larva Udang (*Artemia salina* L.) Ekstrak Bekatul Menggunakan Variasi Jenis Pelarut dan Lama Ekstraksi. *Alchemy : Journal Of Chemistry*, 16-23.
- Jawetz, E., Melnick, J.L. And Adelberg, E.A. (2005) Mikrobiologi Kedokteran. Buku 1. Penerbit Salemba Medika. Jakarta.
- Karppinen S., 2003, Dietary Fiber Component of Rye Bran and Their Fermentation In Vitro, Dissertation. Faculty of Science, Department of Bioscience, Divisions of Biochemistry, University of Helsinki, Finlandia.
- Kementerian kesehatan Indonesia., 2010, Profil kesehatan Indonesia tahun 2009, Jakarta: kementerian kesehatan RI.
- Kementerian Kesehatan, R. I. (2018). Kesehatan, B. P. Dan P. In Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Pp. 1–100.
- Khadijah, Jayali, A. M., Umar, S., & Sasmita, I. (2017). Penentuan Total Fenolik Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanolik Daun samama (*Anthocephalus macrophyllus*) Asal Ternate, Maluku Utara. *Jurnal Kimia Mulawarman, Volume 15 Nomor 1*, 11-18.
- Khatun, R., Nasrin, L., Roy, S., Tantry, M. A., & Abdur Rahman, M. A. (2017). Comparative Antimicrobial Evaluation Of Available Mikania Species In Bangladesh. *Int. J. Plant Res*, 7, 36– 38.
- Khoddami, A., Wilkes, M., & Roberts, T. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds, *Molecules*. 18L2328- 2375.
- Kurniati, Y., Budijanto, S., Nuraida, L., & Dewi, F. N. (2017). *Peningkatan Senyawa Fenolik Bekatul dengan SSF (Solid State Fermentation) sebagai Pencegah Kanker*. Bogor: Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Kursia, S., Lebang, J. S., Taebe, B., Burhan, A., Rahim, W. O., & Nursamsiar. (2016). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etilasetat Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *IJPST*, 72-77.

- Lailiyah, A., Adi, T. K., Hakim, A., & Yusnawan, E. (2014). Kapasitas Antioksidan Dan Kandungan Total Senyawa Fenolik Ekstrak Kasar Alga Coklat *Sargassum cristaefolium* Dari Pantai Sumenep Madura. *ALCHEMY, Vol.3 No. 1*, 18 - 30.
- Lee, S., Hwang, H., Ha, J., HS, J., & JH, K. (2003). Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sci*, 167-179.
- Luo, C., Wang, X., Gao, G., Wang, L., Li, Y., Sun, C., 2013, Identification and quantification of free, conjugate and total phenolic compounds in leaves of 20 sweetpotato cultivars by HPLC–DAD and HPLC–ESI–MS/MS, *Food Chemistry*. 141(3):2697–2706
- Luthfianto, D., Noviyanti, R. D., & Kurniawati, I. (2017). Karakterisasi Kandungan Zat Gizi Bekatul pada Berbagai Varietas Beras di Surakarta. *University Research Colloquium (URECOL)*, 371-376.
- Maradou, R. B., Losung, F., Mangindaan, R. E., Lintang, R. A., Pelle, W. E., & Sambali, H. (2019). Uji Aktivitas Antibakteri Beberapa Spons Dari Perairan Salibabu Kepulauan Talaud. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 7 (3), 234-241.
- Markham, K. (1988). *Cara Mengidentifikasi Flavonoid. Terjemahan Kosasi*. Bandung: ITB Press.
- Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez-Avila, G., MontañezSaenz, J., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. A. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. *Biotechnology Advances*, 29, 365-373.
- Mayaserli, D. P., & Anggraini, D. (2019). Identifikasi Bakteri *Escherichia Colli* Pada Jajanan Bakso Tusuk Di Sekolah Dasar Kecamatan Gunung Talang Tahun 2018. *Jurnal Kesehatan Perintis (Perintis's Health Journal)*, 6(1), 30-34.
- Meng, J., Y, F., A, Z., S, C., T, X., & Z, R. (2011). Phenolic content and antioxidant capacity of Chinese raisins produced in Xinjiang Province. *Food Res Int.*, 44(9):2830–6.
- Mhaske, M., Samad, B. N., Jawade, R., & Bhansali, A. (2012). Chemical Agents in Control of Dental Plaque in Dentistry: An Overview of Current Knowledge and Future Challenges. *Pelagia Research Library*, 3 (1), 268-272.
- Miller, G., 2001, Grain for the health: health effects of newly recognized grain constituent-antioxidants, phenolics, lignans, and phytochemicals, *Journal of the American College of Nutrition* 19: 312S-319S

- Mulja, M. dan Suharman., 1995, Analisis Instrumental. Surabaya: Airlangga University Press, hal. 19-48.
- Muntana, N., & Prasong, S. (2010). Study on total phenolic contents and their antioxidant activities of Thai white, red and black rice bran extracts. *Pakistan J. of Biological Sciences*, 13(4), 170-174.
- Nagoba BS. Microbiology for physiotherapy students. 1st ed. New Delhi : BI Publications Pvt Ltd, 2009 : 75-6.
- Neldawati, Ratnawulan, & Gusnedi. (2013). Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid untuk Berbagai Jenis Daun Tanaman Obat. *Pillar of Physics 2*, 76-83.
- Ningsih , Riana, D., & Zufahair, D. (2016). Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Serta Uji Aktivitas Ekstrak Sirsak Sebagai Antibakteri. *Molekul*, 11(1), 101-111.
- Nugraha, A. C., Prasetya, A. T., & Mursiti, S. (2017). Isolasi, Identifikasi, Uji Aktivitas Senyawa Flavonoid sebagai Antibakteri dari Daun Mangga. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 6 (2), 91-96.
- Nurchayanti, P. (2015). Ekstraksi Minyak Atsiri Daun Zodia (*Evodia Suaveolens*) Dengan Metode Maserasi dan Distilasi Air. *J. Bahan Alam Terbarukan*, 1–7. Diambil kembali dari <http://journal.unnes.ac.id/nju/index.php/pjbat> 4,
- Nurholipah, N., & Ayun, Q. (2021). Isolasi Dan Identifikasi *Rhizopus Oligosporus* Dan *Rhizopus Oryzae* Pada Tempe Asal Bekasi. *Jurnal Teknologi Pangan*, 98-104.
- Oliveira, M. S., Kupski, L., Feddern, V., Cipolatti, E., Badiale Furlong, E., & Souza- Soares, L. A. (2010). Physicochemical characterization of fermented rice bran biomass. *Journal of Food*, 8, 236-269.
- Oliveira M S, Cipolatti E P, Furlong E B and Soares L de S, 2012. Food Sci. Technol. Camp. 32 (3) 531–37
- Orthofer, F.T, 2005, Rice Bran Oil. Di dalam : Shahidi, F, editor. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Edible Oil And Fat Products: Edible oils. Ed ke- 6. Canada: A John Wiley & Sons, Inc. Vol 2, hlm 465-487
- Pavia, Donald L., Gary M. Lampman, George S. Kriz, Randall G. Engel., 2006, Introduction to Organic Laboratory Techniques (4th Ed.), Thomson Brooks/Cole. pp. 797–817.
- Phutthaphadoong, S., Y, Y., A, H., H, T., A, H., P, L., H, M. (2010). Chemopreventive effect of fermented brown rice and rice bran (FBRA) on the inflammation-related colorectal carcinogenesis in ApcMin/+ mice. *International Journal of Oncology*, 23:53-9.

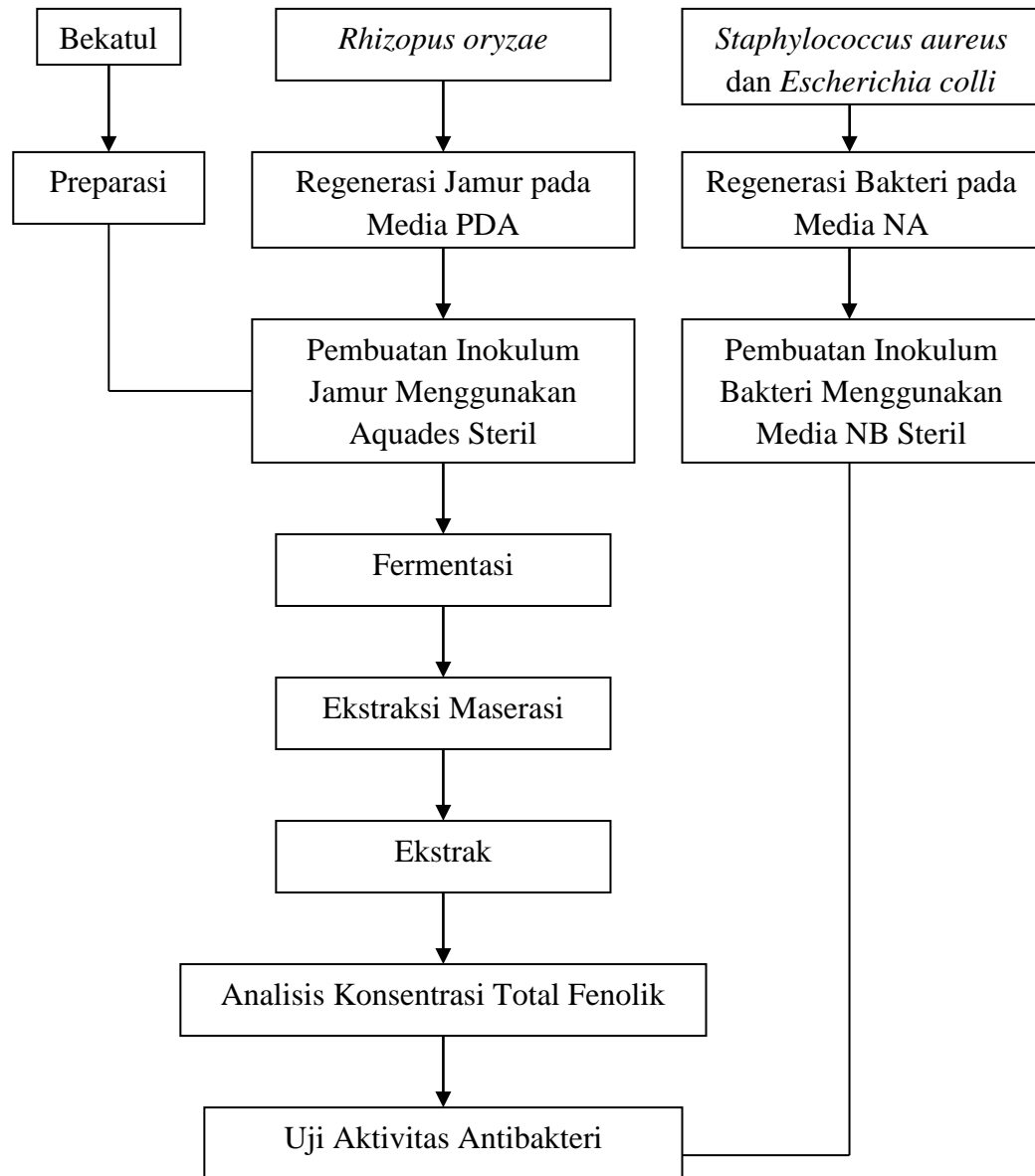
- Pinelo, M, Arnous, A, Meyer, A, S., 2006, Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release, *Trends in Food Science & Technology*, 17(11):579-590.
- Prasetyowati, R., & Tera, F. (2010). Pengambilan minyak biji alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan metode ekstraksi. *Jurnal Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Sriwijaya, Palembang*, 17(2), 16- 24.
- Qureshi, A., Sami, S., & Khan, F. (2002). Effects of stabilized rice bran, its soluble and fiber fractions on blood glucose levels and serum lipid parameters in humans with diabetes mellitus Types I and II. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(3), 175-187. doi: [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(01\)00211-X](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(01)00211-X)
- Ribeiro A C, Graca C D S, Chiattoni L M, Massarolo K C, Duarte F A, Mellado M D L S and Soares L A D S 2017 *Journal of Microbiology and Biotechnology* 6 (2) 45-52
- Rifai, G., Widarta, I. W., & Nociantiri, K. A. (2018). Pengaruh Jenis Pelarut dan Rasio Bahan dengan Pelarut Terhadap Kandungan Senyawa Fenolik dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.). *Jurnal ITEPA, Vol. 7 (2)*, 22-32.
- Robinson, T. (1995). *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. Penerjemah K. Padmawinata* . Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Robinson, T., & Nigam, P. (2003). Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 197-203.
- Rollando, & Monica, E. (2018). Penetapan Kandungan Fenolik Total Dan Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Air Ekstrak Metanol Kulit Batang Faloak (*Sterculia Quadrifida* R.Br). *Scientia Jurnal Farmasi dan Kesehatan*, 8 (1) , 29 – 36.
- Rusdin, F., Ys, H., & Syamsuddin. (2018). Studi Reaksi Senyawa Sitronelal Dengan L-Tirosina Dan Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap *Staphylococcus aureus*. *KOVALEN (Jurnal Riset Kimia)*, 4(1), 82-87.
- Ryan, E. (2011). Bioactive food components and health properties of rice bran. *JAVMA*, 238(5), 593-600.
- Saraswaty, V., Risdian, C., Budiwati, T. A., & Tjandrawati, M. (2013). *Aktivitas Antioksidan dari Kombinasi Ekstrak Etanol Kulit Manggis, DaunSirsak,dan Daun Sirih Merah*. Yogyakarta: Pusat Penelitian Kimia LIPI.
- Sari, T., Maryono, Hasri, & Abbas, G. H. (2021). Kandungan Fenolik Total Ekstrak Etanol Dan Etil Asetat Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*, L.)

- Serta Uji Bioaktivitas Terhadap Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Chemica* , 22 (1), 74-83.
- Sasmito, S. W. (2020). Senyawa Fenolik Dalam Fraksi Aktif Kulit Buah *Eleiodoxo conferta* Yang Berpotensi Antibakteri Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans*. *Pharmacy Medical Journal*, 3(1), 28-33.
- Sastrohamidjojo, H., 2001, Spektroskopi, Yogyakarta : Liberty.
- Schmidt, C. G. (2014). Antioxidant Activity and Enzyme Inhibition of Phenolic Acids from Fermented Rice Bran with Fungus *Rizhopus Oryzae*. 146, 371-372.
- Schmidt Cg, F. E. (2012). Effect Of Particle Size And Ammonium Sulfate Concentration On Rice Bran Fermentation With The Fungus *Rhizopus Oryzae*. . *Bioresource Technology*, 123: 36-41.
- Shihab, M. Q. (2002). *Tafsir Al-Misbah: Edisi 10*. Jakarta: Lentera Hati.
- Singleton, V., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents . *Am J Enol Viticult* 16, 144-158.
- Sitorus, F. C., Wulansari, E. D., & Sulistyarini, I. (2021). Uji Kandungan Fenolik Total Dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Asam Paya (*Eleiodoxa conferta* (Griff.) Burret) Terhadap *Staphylococcus aureus*. *Media Farmasi Indonesia*, 15 (2), 1617-1624.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., and Crouch, S.R., 2007, Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition, Canada: Thomson Corporation, pp. 367-390.
- Tahir, M., Muflihunna, A., & Syafrianti. (2020). Penentuan Kadar Fenolik Total Ekstrak Etanol Daun Nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) Dengan Metode Spektrofotometri Uv-Vis. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, Vol. 4 No.1. , 215-218.
- Viranda, P. (2009). Pengujian kandungan Senyawa yang terdapat dalam Tomat. *Jurnal Pertanian Universitas Indonesia*.
- Virgianti, D. P. (2015). Uji Antagonis Jamur Tempe (*Rhizopus* Sp) terhadap Bakteri Patogen Enterik. *Biosfera*, 162-168.
- Wang, W, Guo, J, Zhang, J, Peng, J, Liu, T, Xin, Z., 2015, Isolation, identification and antioxidant activity of bound phenolic compounds present in rice bran, *Food Chemistry*, 171:40-49
- Warsa, U. C. (1993). *Buku ajar Mikrobiologi Kedokteran: Kokus positif gram*. Jakarta: Binarupa Aksara.

- Wati, M., & Tarigan, D. (2017). Isolasi dan identifikasi senyawa metabolit sekunder dari fraksi etil asetat pada daun berwarna merah pucuk merah (*Syzygium myrtifilium* wal p.). *J. Kim. Mulawarman*, 14 .
- WHO. (2014). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014*. World Health Organization.
- Wipradnyadewi, P. A. (2021). Isolasi Dan Identifikasi *Rhizopus Oligosporus* Pada Beberapa Inokulum Tempe.
- Yanti, A. D., Budijanto, S., & Prangdimurti, E. (2021). Stabilitas Komponen Bioaktif Bekatul Selama Pengolahan. *Food Science and Technology*.
- Yosmar R, Suharti N, and Rasyid R 2013 Jurnal Farmasi Andalas. 1 (1) 5-12 [13]
Ikram U H, Javed M M, Khan T S and Shiddiq Z 2005 J. Agric & Biol. Sci. 1 329
- Zheng, Z., & Shetty, K. (2000). Solid state bioconversion of phenolics from cranberry pomace and role of *Lentinus edodes* β -glucosidase. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 48, 895-900.

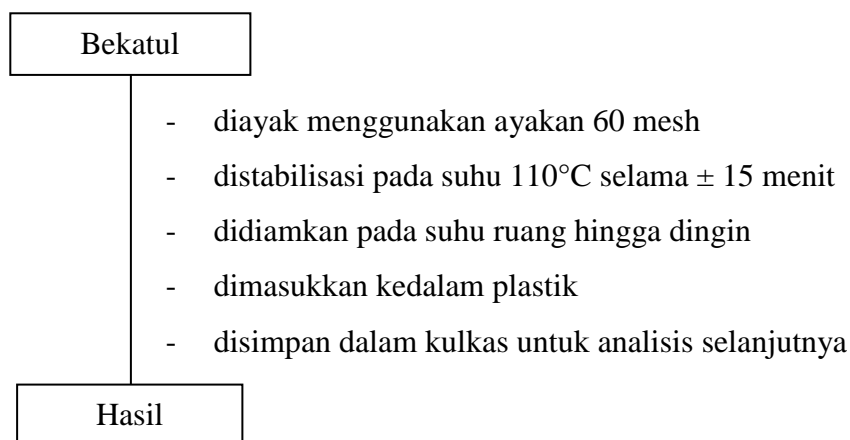
LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian



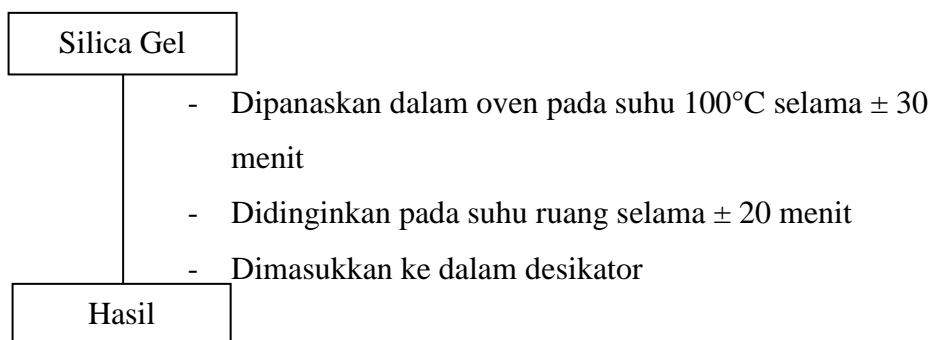
Lampiran 2. Diagram Alir

1. Preparasi Sampel

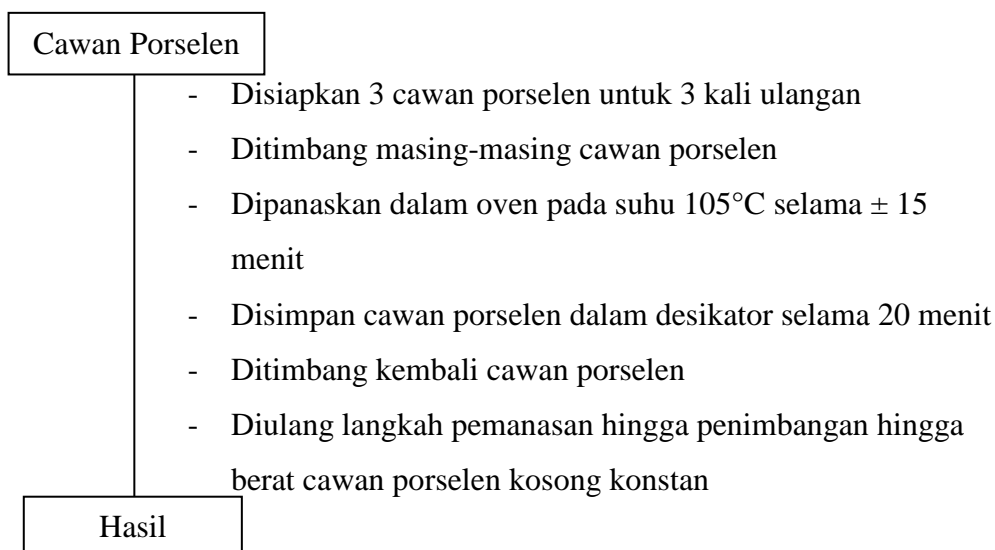


2. Analisis Kadar Air

a. Aktifasi Silica Gel



b. Menghilangkan Kadar Air Cawan Porselen Kosong



c. Menghilangkan Kadar Air Dalam Sampel Bekatul Terstabilisasi

Bekatul

- Dimasukkan sejumlah bekatul hingga cawan porselen penuh
- Ditimbang masing-masing cawan porselen + bekatul
- Dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama ± 15 menit
- Disimpan dalam desikator selama 20 menit
- Ditimbang kembali cawan porselen + bekatul
- Diulang langkah pemanasan hingga penimbangan hingga berat cawan porselen+ bekatul konstan
- Dihitung kadar air sampel bekatul dengan persamaan:

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{(b - c)}{(b - a)} \times 100\%$$

Keterangan: a = Bobot cawan kosong,

b = bobot sampel+cawan sebelum dikeringkan

c = bobot sampel+cawan setelah dikeringkan

Hasil

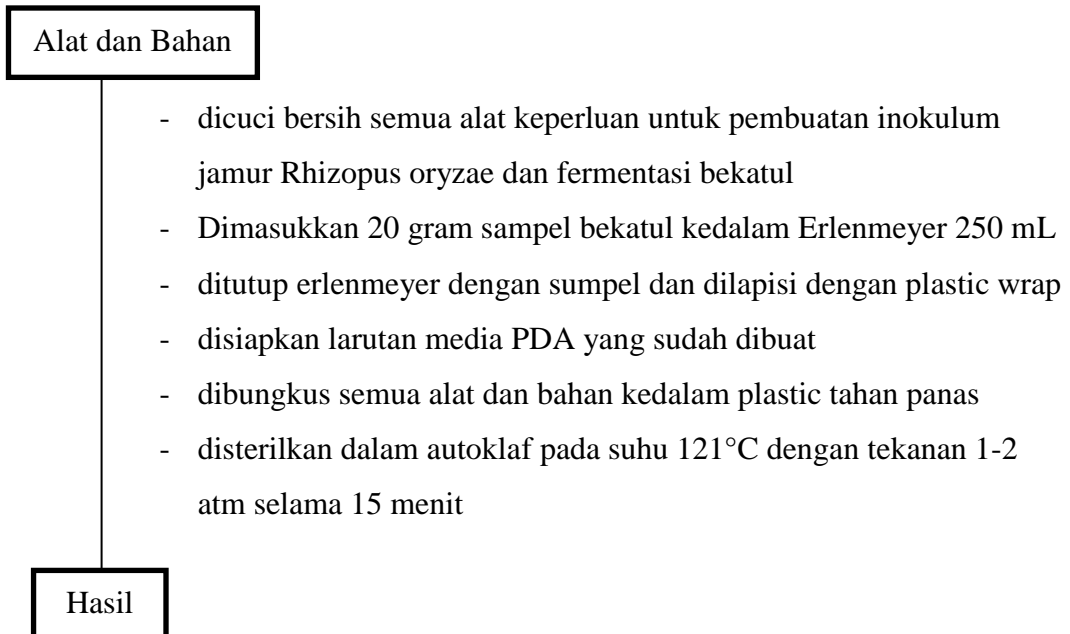
2. Pembuatan Media Potato Dextrose Agar

Potato Dextrose Agar (PDA)

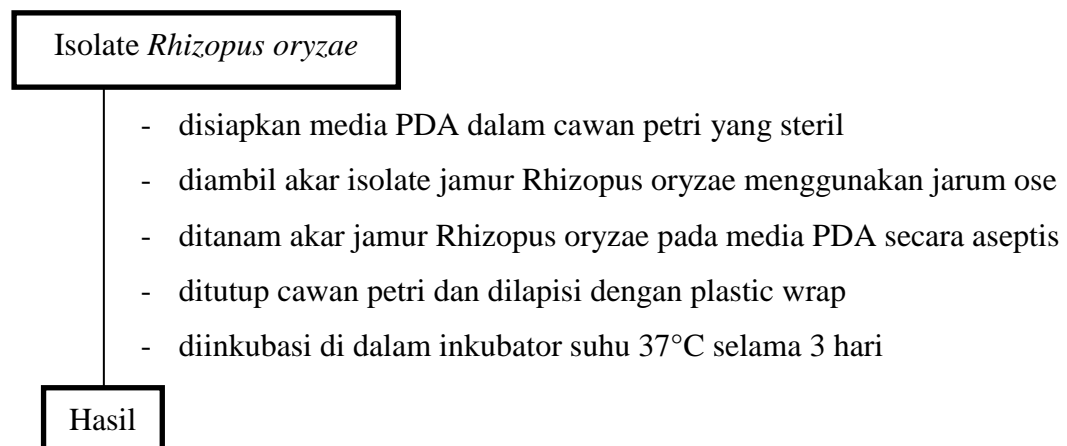
- Disiapkan serbuk PDA (39 gr/liter)
- dimasukkan 3,9 gram serbuk PDA ke dalam Erlenmeyer 250 mL
- ditambahkan 100 mL akuades
- dilarutkan menggunakan pemanasan dan stirrer hingga mendidih
- dikeluarkan stirrer dari Erlenmeyer
- ditutup erlenmeyer dengan sumpel dan dilapisi dengan plastic wrap
- disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1-2 atm selama 15 menit

Hasil

3. Sterilisasi Alat dan Bahan



4. Regenerasi Jamur *Rhizopus oryzae*



6. Pembuatan Inokulum Jamur *Rhizopus oryzae*

Jamur *Rhizopus oryzae*

- ditambahkan 50 mL aquades steril kedalam cawan petri yang telah ditumbuhi jamur untuk melarutkan spora jamur.
- Dikikis akar jamur dari media PDA menggunakan kaca preparat steril
- Disaring larutan jamur menggunakan kasa steril untuk memisahkan antara filtrate yang berisi spora jamur dengan badan jamurnya.

Hasil

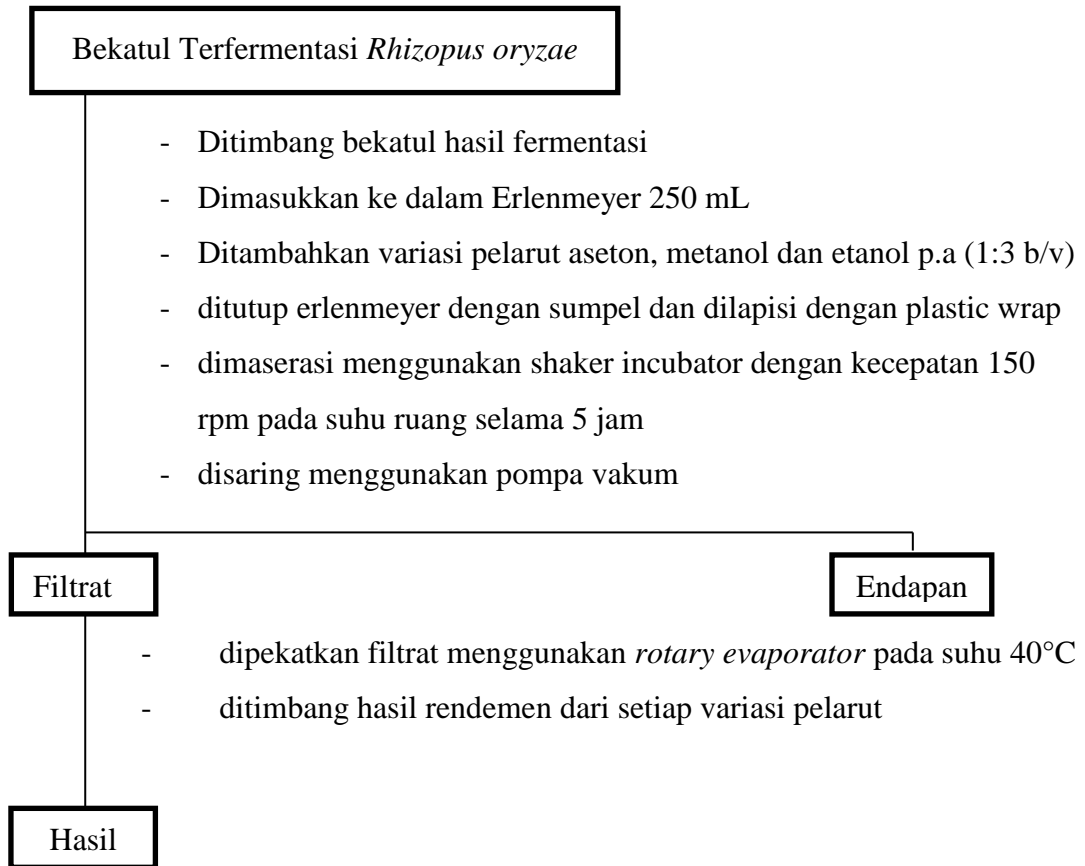
7. Fermentasi Bekatul Menggunakan Inokulum Jamur *Rhizopus Oryzae*

Bekatul

- Disiapkan 20 gram bekatul yang telah disterilisasi
- ditambahkan larutan buffer asam sitrat pH 5 steril sebanyak 10 mL
- ditambahkan inokulum jamur 10% (v/b) atau 2 mL secara aseptis
- ditutup erlenmeyer dengan sumpel dan dilapisi dengan plastic wrap
- diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 hari
- dikeringkan didalam oven pada suhu 40°C selama 24 jam

Hasil

**8. Ekstraksi Bekatul Terfermentasi Jamur *Rhizopus oryzae*
Menggunakan Variasi Pelarut Aseton, Metanol Dan Etanol P.A**



9. Analisis Konsentrasi Total Fenolik

1. Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Galat dengan Reagen *Folin-Ciocalteu*

Asam Galat

- Ditimbang 0,05 gram (50 mg)
- Dilarutkan dalam akuades 25 mL
- Dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL
- Ditambahkan aquades hingga tanda batas
- Diencerkan larutan menjadi konsentrasi 10, 50, 100 dan 150 ppm dengan variasi pipet 0,2 mL, 1 mL, 2 mL dan 3 mL dari larutan induk
- dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml
- Ditambahkan aquades hingga tanda batas

Larutan asam galat konsentrasi 10, 50, 100 dan 150 ppm

- Dari masing-masing konsentrasi larutan asam galat dipipet 0,2 mL
- Ditambahkan 15,8 mL aquades
- ditambahkan 1 ml Reagen Folin-Ciocalteu
- divortex sampai homogen
- didiamkan selama 10 menit
- ditambahkan 3 ml larutan Na_2CO_3 20%
- divortex hingga homogen
- didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar
- diukur serapannya pada panjang gelombang 765 nm
- dibuat kurva kalibrasi dengan menghubungkan konsentrasi asam galat dengan absorbansi

Hasil

2. Penentuan Konsentrasi Total Fenolik (KTF) Ekstrak Bekatul

Ekstrak sampel

- ditimbang 0,1 gram (100 mg)
- dilarutkan sampai 10 ml dengan akuades
- dihomogenkan (10 mg/mL)
- dipipet 0,2 mL dan dimasukkan pada tabung reaksi
- ditambahkan 15,8 mL aquades
- ditambahkan 1 ml Reagen *Folin-Ciocalteu*
- divortex sampai homogen
- didiamkan selama 10 menit
- ditambahkan 3 ml larutan Na_2CO_3 20%
- divortex hingga homogen
- didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar
- diukur serapannya pada panjang gelombang 765 nm
- dibandingkan absorbansi sampel dengan kurva standart asam galat
- dihitung Konsentrasi Total Fenolik (KTF)

Hasil

10. Uji Aktivitas Antibakteri Metode Difusi Agar

1. Pembuatan *Nutrient Agar*

Nutrient Agar (NA)

- Disiapkan serbuk NA (20 gr/liter)
- dimasukkan 2 gram serbuk NA ke dalam Erlenmeyer 250 mL
- ditambahkan 100 mL akuades
- dilarutkan menggunakan pemanasan dan stirrer hingga mendidih
- ditutup erlenmeyer dengan sumpel dan dilapisi dengan plastic wrap
- disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1-2 atm selama 15 menit

Hasil

2. Pembuatan *Nutrient Broth*

Nutrient Broth (NB)

- Disiapkan serbuk NB (8 gr/liter)
- dimasukkan 0,8 gram serbuk NB ke dalam Erlenmeyer 250 mL
- ditambahkan 100 mL akuades
- dilarutkan menggunakan pemanasan dan stirrer hingga mendidih
- ditutup erlenmeyer dengan sumpel dan dilapisi dengan plastic wrap
- disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1-2 atm selama 15 menit

Hasil

3. Regenerasi Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Isolate Bakteri

- Disiapkan media NA miring dalam tabung reaksi yang steril
- Dipanaskan jarum ose diatas Bunsen hingga berpijar warna merah
- Diambil masing-masing isolate bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menggunakan jarum ose
- digoreskan pada media NA miring secara aseptis
- ditutup tabung reaksi dengan sumpel dan dilapisi dengan plastic wrap
- Diinkubasi di dalam inkubator suhu 37°C selama 24 jam (*Escherichia coli*) dan selama 18 jam (*Staphylococcus aureus*).

Hasil

4. Pembuatan Inokulum Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia*

Isolate Bakteri

- Dipanaskan jarum ose diatas Bunsen hingga berpijar warna merah
- Diambil masing-masing isolate bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menggunakan jarum ose
- Dimasukkan masing-masing ke dalam media NB steril yang berbeda
- Diinkubasi di dalam inkubator suhu 37°C selama 24 jam
- *Escherichia coli*) dan selama 18 jam (*Staphylococcus aureus*).

Hasil

5. Pembuatan Kontrol Positif

Kloramfenikol

- ditimbang 250 mg
- dilarutkan ke dalam 1 mL DMSO

Hasil

6. Penentuan OD

Inokulum Bakteri

- Disiapkan seperangkat instrument UV-VIS untuk pengukuran absorbansi
- Diukur pada Panjang gelombang 600 nm
- Dimasukkan larutan NB steril pada kuvet sebagai blanko
- Dimasukkan masing-masing inokulum bakteri dalam kuvet
- Diencerkan hingga mencapai nilai OD 0,5

Hasil

7. Preparasi Uji Aktivitas Antibakteri

Ekstrak Bekatul

- Ditimbang 500 mg ekstrak bekatul
- Dimasukkan ke dalam botol vial steril
- Ditambahkan 1 mL DMSO
- Dihomogenkan

Ekstrak bekatul konsentrasi 500 mg/mL

- Dipipet 100 μ L
- Dimasukkan ke dalam botol vial steril
- dimasukkan kertas cakram kedalam ekstrak hingga terendam
- didiamkan selama 30 menit

Hasil

8. Uji Aktivitas Antibakteri Metode Difusi Agar

Inokulum Bakteri

- Diambil 100 μ L masing-masing inokulum bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*
- Dimasukkan ke dalam cawan petri steril
- Ditambahkan media NA ke dalam cawan petri
- Dihomogenkan dengan cara digoyang cawan membentuk angka 8 sebanyak 10 kali
- Ditunggu media dalam cawan memadat
- Diletakkan kertas cakram yang sudah direndam ekstrak, kontrol positif, (kloramfenikol) dan kontrol negative (DMSO) di atas media NA yang berisikan masing-masing bakteri uji *E. coli* dan *S. aureus*.
- diinkubasi selama 1x24 jam (*Escherichia coli*) dan selama 18 jam (*Staphylococcus aureus*)
- diamati aktivitas antibakteri yang berupa zona bening pada tepian kertas cakram
- diukur diameter zona bening dalam satuan milimeter (mm) menggunakan jangka sorong

Hasil

Lampiran 3. Perhitungan Kadar Air Sampel Bekatul

$$\% \text{ kadar air} = \frac{b - c}{b - a} \times 100\%$$

Keterangan: a = Bobot cawan kosong,

b = bobot sampel + cawan sebelum dikeringkan

c = bobot sampel + cawan setelah dikeringkan

Pengeringan	Ulangan	Cawan Kosong (gram)	Cawan + Bekatul Sebelum di Oven (gram)	Cawan + Bekatul Setelah di Oven (gram)	% kadar air
1	U1	54,641	93,065	91,389	4,36 %
	U2	58,703	95,327	93,838	4,06 %
	U3	56,925	95,021	93,418	4,2 %
2	U1	54,641	103,009	102,170	1,73 %
	U2	58,703	102,115	101,262	1,96 %
	U3	56,925	103,366	102,545	1,77 %
3	U1	54,641	83,303	81,795	5,26 %
	U2	58,703	89,638	87,961	5,42 %
	U3	56,925	89,132	87,672	4,53 %

Pengeringan 1

$$\% \text{ kadar air} = \frac{b - c}{b - a} \times 100\%$$

$$1.1 \quad \% \text{ kadar air} = \frac{93,065 - 91,389}{93,065 - 54,641} \times 100\% = \frac{1,676}{38,424} \times 100\% = 0,0436 \times 100\% = 4,36\%$$

$$1.2 \quad \% \text{ kadar air} = \frac{95,327 - 93,838}{95,327 - 58,703} \times 100\% = \frac{1,489}{36,624} \times 100\% = 0,0406 \times 100\% = 4,06\%$$

$$1.3 \quad \% \text{ kadar air} = \frac{95,021 - 93,418}{95,021 - 56,925} \times 100\% = \frac{1,603}{38,096} \times 100\% = 0,0420 \times 100\% = 4,2\%$$

Pengeringan 2

$$\% \text{ kadar air} = \frac{b - c}{b - a} \times 100\%$$

Keterangan: a = Bobot cawan kosong,

b = bobot sampel + cawan sebelum dikeringkan

c = bobot sampel + cawan setelah dikeringkan

$$1.1 \text{ \% kadar air} = \frac{103,009 - 102,170}{103,009 - 54,641} \times 100\% = \frac{0,8388}{48,3678} \times 100\% = 0,0173 \times 100\% = 1,73\%$$

$$1.2 \text{ \% kadar air} = \frac{102,115 - 101,262}{102,115 - 58,703} \times 100\% = \frac{0,8528}{43,4118} \times 100\% = 0,0196 \times 100\% = 1,96\%$$

$$1.3 \text{ \% kadar air} = \frac{103,366 - 102,545}{103,366 - 56,925} \times 100\% = \frac{0,8209}{46,4409} \times 100\% = 0,0177 \times 100\% = 1,77\%$$

Pengeringan 3

$$\% \text{ kadar air} = \frac{b - c}{b - a} \times 100\%$$

$$1.1 \text{ \% kadar air} = \frac{83,303 - 81,795}{83,303 - 54,641} \times 100\% = \frac{1,508}{28,662} \times 100\% = 0,0526 \times 100\% = 5,26\%$$

$$1.2 \text{ \% kadar air} = \frac{89,638 - 87,961}{89,638 - 58,703} \times 100\% = \frac{1,677}{30,935} \times 100\% = 0,0542 \times 100\% = 5,42\%$$

$$1.3 \text{ \% kadar air} = \frac{89,132 - 87,672}{89,132 - 56,925} \times 100\% = \frac{1,460}{32,207} \times 100\% = 0,0453 \times 100\% = 4,53\%$$

Lampiran 4. Perhitungan Berat Ekstrak Bekatul Hasil Maserasi

Berat ekstrak bekatul = (Berat wadah + Berat ekstrak pekat) - Berat wadah

F1 (Perlakuan)	F2 (Pelarut)	Berat sampel (gr)	Berat wadah (gr)	Berat wadah + ekstrak pekat (gr)	Berat ekstrak pekat (gr)	Rata-rata berat ekstrak (gr)
Non-fermentasi	Aseton	20	14,406	16,963	2,557	2,557
	Metanol	20	11,424	14,453	3,029	3,029
	Etanol	20	11,523	19,946	8,423	8,423
Terfermentasi	Aseton	17,080	62,353	65,353	3,000	3,495
		18,543	9,879	13,869	3,990	
	Metanol	18,284	13,063	15,866	2,803	2,557
		14,177	9,784	12,095	2,311	
	Etanol	19,091	11,254	17,706	6,452	6,776
		15,881	13,932	21,032	7,100	

Lampiran 5. Perhitungan Hasil rendemen ekstrak bekatul

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

Pelarut	Rendemen ekstrak bekatul Terfermentasi (%)	Rata-rata Rendemen ekstrak bekatul Terfermentasi (%)	Rendemen ekstrak bekatul Non-fermentasi (%)
Aseton	17,564	19,541	12,785
	21,518		
Metanol	15,330	15,814	15,145
	16,298		
Etanol	33,796	39,252	42,115
	44,708		

Perhitungan Rendemen Ekstrak Bekatul Pelarut Aseton

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

- Ekstrak Bekatul Non-fermentasi

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% = \frac{2,557 \text{ gram}}{20 \text{ gram}} \times 100\% = 12,785 \%$$

- Ekstrak Bekatul Terfermentasi

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% = \frac{3 \text{ gram}}{17,080 \text{ gram}} \times 100\% = 17,564 \%$$

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% = \frac{3,9901 \text{ gram}}{18,543 \text{ gram}} \times 100\% = 21,518 \%$$

Perhitungan Rendemen Ekstrak Bekatul Pelarut Metanol

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

- **Ekstrak Non-fermentasi**

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% = \frac{3,029 \text{ gram}}{20 \text{ gram}} \times 100\% = 15,145 \%$$

- **Ekstrak Bekatul Terfermentasi**

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% = \frac{2,803 \text{ gram}}{18,284 \text{ gram}} \times 100\% = 15,330 \%$$

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% = \frac{2,3106 \text{ gram}}{14,1770 \text{ gram}} \times 100\% = 16,298 \%$$

Perhitungan Rendemen Ekstrak Bekatul Pelarut Etanol

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

- **Ekstrak Non-fermentasi**

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% = \frac{8,423 \text{ gram}}{20 \text{ gram}} \times 100\% = 42,115 \%$$

- **Ekstrak Bekatul Terfermentasi**

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% = \frac{6,452 \text{ gram}}{19,091 \text{ gram}} \times 100\% = 33,796 \%$$

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% = \frac{7,1 \text{ gram}}{15,881 \text{ gram}} \times 100\% = 44,7075 \%$$

Lampiran 6. Analisis Konsentrasi Total Fenolik (KTF)

a. Pembuatan Kurva Standart Asam Galat dengan Reagen *Folin-Ciocalteu*

1. Pembuatan Larutan Induk Asam Galat 500 ppm

Pembuatan larutan induk 500 ppm dalam 100 mL

$$500 \text{ ppm} = \frac{500 \text{ gram}}{1000.000 \text{ mL}} = \frac{500.000 \text{ mg}}{1000.000 \text{ mL}} = \frac{50 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} = \frac{0,05 \text{ gram}}{100 \text{ mL}}$$

Asam galat ditimbang 50 mg kemudian dilarutkan dalam aquades 100 ml

2. Pengenceran Larutan Induk Asam Galat 500 ppm Menjadi Konsentrasi 10, 50, 100, dan 150 ppm

- 10 ppm dalam 10 mL

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

$$500 \text{ ppm} \times V_1 = 10 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{100 \text{ ppm.mL}}{500 \text{ ppm}} = 0,2 \text{ mL}$$

Larutan induk 500 ppm dipipet sebanyak 0,2 mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL. lalu ditambahkan aquades hingga tanda batas kemudian dihomogenkan.

- 50 ppm dalam 10 mL

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

$$500 \text{ ppm} \times V_1 = 50 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{500 \text{ ppm.mL}}{500 \text{ ppm}} = 1 \text{ mL}$$

Larutan induk 500 ppm dipipet sebanyak 1 mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL. lalu ditandabatkan dengan aquades kemudian dihomogenkan.

- 100 ppm dalam 10 mL

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

$$500 \text{ ppm} \times V_1 = 100 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{1000 \text{ ppm.mL}}{500 \text{ ppm}} = 2 \text{ mL}$$

Larutan induk 500 ppm dipipet sebanyak 2 mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL. lalu ditandabatkan dengan aquades kemudian dihomogenkan.

- **150 ppm dalam 10 mL**

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

$$500 \text{ ppm} \times V_1 = 150 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{150 \text{ ppm} \cdot \text{mL}}{500 \text{ ppm}} = 3 \text{ mL}$$

Larutan induk 500 ppm dipipet sebanyak 3 mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL. lalu ditandabatkan dengan aquades lalu dihomogenkan.

b. Penentuan Konsentrasi Total Fenolik (KTF) Ekstrak Bekatul

1. Pembuatan Larutan Induk ekstrak bekatul 10000 ppm

Diketahui:

Berat ekstrak bekatul = 100 mg

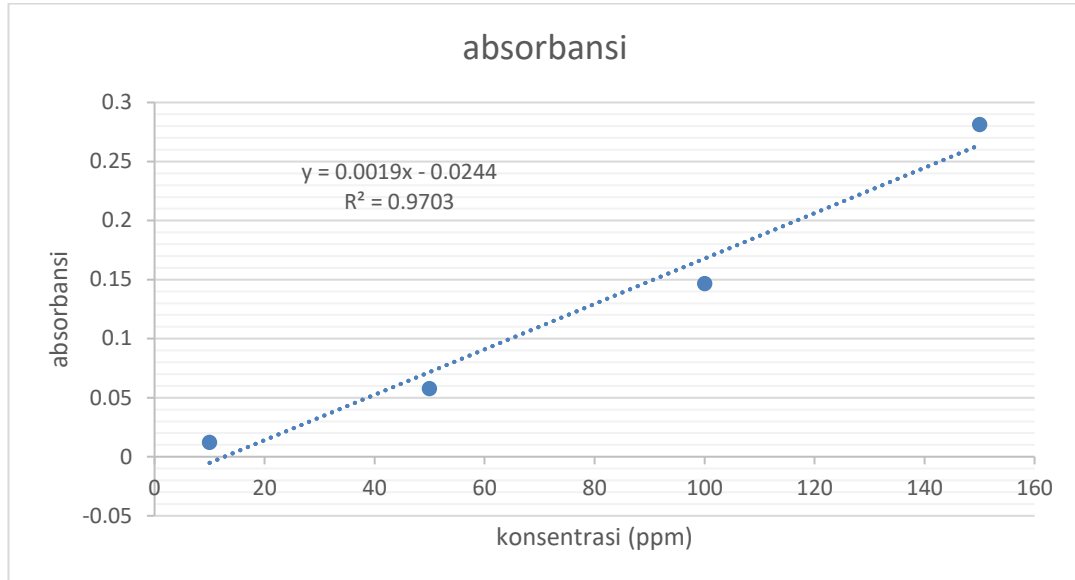
Volume = 10 mL

Sampel ditimbang 100 mg lalu dilarutkan sampai 10 ml dengan akuades

- Konsentrasi ekstrak bekatul = $\frac{\text{massa}}{\text{volume}} = \frac{100 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} = 10 \text{ mg/mL} = 10000 \text{ ppm}$

2. Pengenceran dan Analisis KTF Larutan Induk ekstrak bekatul 10000 ppm

Diketahui:



- a. Garis regresi linear: $y = 0,0019x - 0,0244$
- b. Faktor pengenceran = $V_2 : V_1 = 16 \text{ mL} : 0,2 \text{ mL} = 80$

a. Pelarut aseton

- Ekstrak bekatul Non-fermentasi

1.
$$y = 0,0019x - 0,0244$$

$$0,0570 = 0,0019x - 0,0244$$

$$0,0570 + 0,0244 = 0,0019x$$

$$x = \frac{0,0570 + 0,0244}{0,0019} = \frac{0,0814}{0,0019} = 42,8421 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ fenolik dalam bekatul} &= \frac{\text{konsentrasi pada kurva standart}}{\text{konsentrasi sampel}} \times \text{FP} \times 100\% \\ &= \frac{42,8421 \text{ ppm}}{10000 \text{ ppm}} \times 80 \times 100\% \\ &= 34,27368 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 2. \quad & y = 0,0019x - 0,0244 \\
 & 0,0364 = 0,0019x - 0,0244 \\
 & 0,0364 + 0,0244 = 0,0019x \\
 & x = \frac{0,0364 + 0,0244}{0,0019} = \frac{0,0608}{0,0019} = 32 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \% \text{ fenolik dalam bekatul} &= \frac{\text{konsentrasi pada kurva standart}}{\text{konsentrasi sampel}} \times \text{FP} \times 100\% \\
 &= \frac{32 \text{ ppm}}{10000 \text{ ppm}} \times 80 \times 100\% \\
 &= 25,6 \%
 \end{aligned}$$

- **Ekstrak bekatul terfermentasi**

$$\begin{aligned}
 1.1 \quad & y = 0,0019x - 0,0244 \\
 & 0,0920 = 0,0019x - 0,0244 \\
 & 0,0920 + 0,0244 = 0,0019x \\
 & x = \frac{0,0920 + 0,0244}{0,0019} = \frac{0,1164}{0,0019} = 61,2632 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \% \text{ fenolik dalam bekatul} &= \frac{\text{konsentrasi pada kurva standart}}{\text{konsentrasi sampel}} \times \text{FP} \times 100\% \\
 &= \frac{61,2632 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \times 80 \times 100\% \\
 &= 49,01056 \%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 1.2 \quad & y = 0,0019x - 0,0244 \\
 & 0,1007 = 0,0019x - 0,0244 \\
 & 0,1007 + 0,0244 = 0,0019x \\
 & x = \frac{0,1007 + 0,0244}{0,0019} = \frac{0,1251}{0,0019} = 65,8421 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \% \text{ fenolik dalam bekatul} &= \frac{\text{konsentrasi pada kurva standart}}{\text{konsentrasi sampel}} \times \text{FP} \times 100\% \\
 &= \frac{65,8421 \mu\text{g/mL}}{10 \text{ mg/mL}} \times 80 \times 100\% \\
 &= 52,67368 \%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 2.1 \quad & y = 0,0019x - 0,0244 \\
 & 0,0784 = 0,0019x - 0,0244 \\
 & 0,0784 + 0,0244 = 0,0019x \\
 x &= \frac{0,0784 + 0,0244}{0,0019} = \frac{0,1028}{0,0019} = 54,1053 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \% \text{ fenolik dalam bekatul} &= \frac{\text{konsentrasi pada kurva standart}}{\text{konsentrasi sampel}} \times \text{FP} \times 100\% \\
 &= \frac{54,1053 \mu\text{g/mL}}{10 \text{ mg/mL}} \times 80 \times 100\% \\
 &= 43,28424 \%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 2.2 \quad & y = 0,0019x - 0,0244 \\
 & 0,0763 = 0,0019x - 0,0244 \\
 & 0,0763 + 0,0244 = 0,0019x \\
 x &= \frac{0,0763 + 0,0244}{0,0019} = \frac{0,1007}{0,0019} = 53 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \% \text{ fenolik dalam bekatul} &= \frac{\text{konsentrasi pada kurva standart}}{\text{konsentrasi sampel}} \times \text{FP} \times 100\% \\
 &= \frac{53 \mu\text{g/mL}}{10 \text{ mg/mL}} \times 80 \times 100\% \\
 &= 42,4 \%
 \end{aligned}$$

b. Pelarut metanol

- Ekstrak bekatul Non-fermentasi

$$\begin{aligned}
 1. \quad & y = 0,0019x - 0,0244 \\
 & 0,1860 = 0,0019x - 0,0244 \\
 & 0,1860 + 0,0244 = 0,0019x \\
 x &= \frac{0,1860 + 0,0244}{0,0019} = \frac{0,2104}{0,0019} = 110,7368 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \% \text{ fenolik dalam bekatul} &= \frac{\text{konsentrasi pada kurva standart}}{\text{konsentrasi sampel}} \times \text{FP} \times 100\% \\
 &= \frac{110,7368 \mu\text{g/mL}}{10 \text{ mg/mL}} \times 80 \times 100\% \\
 &= 88,58944 \% \\
 & \quad y = 0,0019x - 0,0244 \\
 & \quad 0,1764 = 0,0019x - 0,0244 \\
 & \quad 0,1764 + 0,0244 = 0,0019x \\
 x &= \frac{0,1764 + 0,0244}{0,0019} = \frac{0,2008}{0,0019} = 105,6842 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \% \text{ fenolik dalam bekatul} &= \frac{\text{konsentrasi pada kurva standart}}{\text{konsentrasi sampel}} \times \text{FP} \times 100\% \\
 &= \frac{105,6842 \mu\text{g/mL}}{10 \text{ mg/mL}} \times 80 \times 100\% \\
 &= 84,54736 \%
 \end{aligned}$$

- **Ekstrak bekatul terfermentasi**

1.1

$$\begin{aligned}
 & \quad y = 0,0019x - 0,0244 \\
 & \quad 0,1396 = 0,0019x - 0,0244 \\
 & \quad 0,1396 + 0,0244 = 0,0019x \\
 x &= \frac{0,1396 + 0,0244}{0,0019} = \frac{0,164}{0,0019} = 86,3158 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \% \text{ fenolik dalam bekatul} &= \frac{\text{konsentrasi pada kurva standart}}{\text{konsentrasi sampel}} \times \text{FP} \times 100\% \\
 &= \frac{86,3158 \mu\text{g/mL}}{10 \text{ mg/mL}} \times 80 \times 100\% \\
 &= 69,05264 \%
 \end{aligned}$$

1.2

$$\begin{aligned}
 & \quad y = 0,0019x - 0,0244 \\
 & \quad 0,1647 = 0,0019x - 0,0244 \\
 & \quad 0,1647 + 0,0244 = 0,0019x \\
 x &= \frac{0,1647 + 0,0244}{0,0019} = \frac{0,1891}{0,0019} = 99,5263 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{\% fenolik dalam bekatul} &= \frac{\text{konsentrasi pada kurva standart}}{\text{konsentrasi sampel}} \times \text{FP} \times 100\% \\ &= \frac{99,5263 \mu\text{g/mL}}{10 \text{ mg/mL}} \times 80 \times 100\% \\ &= 79,62104 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2.1 \quad & y = 0,0019x - 0,0244 \\ & 0,1823 = 0,0019x - 0,0244 \\ & 0,1823 + 0,0244 = 0,0019x \\ x &= \frac{0,1823 + 0,0244}{0,0019} = \frac{0,2067}{0,0019} = 108,7895 \text{ ppm} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{\% fenolik dalam bekatul} &= \frac{\text{konsentrasi pada kurva standart}}{\text{konsentrasi sampel}} \times \text{FP} \times 100\% \\ &= \frac{108,7895 \mu\text{g/mL}}{10 \text{ mg/mL}} \times 80 \times 100\% \\ &= 87,0316 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2.2 \quad & y = 0,0019x - 0,0244 \\ & 0,1825 = 0,0019x - 0,0244 \\ & 0,1825 + 0,0244 = 0,0019x \\ x &= \frac{0,1825 + 0,0244}{0,0019} = \frac{0,2069}{0,0019} = 108,8947 \text{ ppm} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{\% fenolik dalam bekatul} &= \frac{\text{konsentrasi pada kurva standart}}{\text{konsentrasi sampel}} \times \text{FP} \times 100\% \\ &= \frac{108,8947 \mu\text{g/mL}}{10 \text{ mg/mL}} \times 80 \times 100\% \\ &= 87,15576 \% \end{aligned}$$

c. Pelarut etanol

- Ekstrak bekatul Non-fermentasi

$$\begin{aligned} 1. \quad & y = 0,0019x - 0,0244 \\ & 0,0554 = 0,0019x - 0,0244 \\ & 0,0554 + 0,0244 = 0,0019x \end{aligned}$$

$$x = \frac{0,0554 + 0,0244}{0,0019} = \frac{0,0798}{0,0019} = 42 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ fenolik dalam bekatul} &= \frac{\text{konsentrasi pada kurva standart}}{\text{konsentrasi sampel}} \times \text{FP} \times 100\% \\ &= \frac{42 \mu\text{g/mL}}{10 \text{ mg/mL}} \times 80 \times 100\% \\ &= 33,6 \% \end{aligned}$$

$$2. \quad y = 0,0019x - 0,0244$$

$$0,0415 = 0,0019x - 0,0244$$

$$0,0415 + 0,0244 = 0,0019x$$

$$x = \frac{0,0415 + 0,0244}{0,0019} = \frac{0,0659}{0,0019} = 34,6842 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ fenolik dalam bekatul} &= \frac{\text{konsentrasi pada kurva standart}}{\text{konsentrasi sampel}} \times \text{FP} \times 100\% \\ &= \frac{34,6842 \mu\text{g/mL}}{10 \text{ mg/mL}} \times 80 \times 100\% \\ &= 27,74736 \% \end{aligned}$$

- **Ekstrak bekatul terfermentasi**

$$1.1 \quad y = 0,0019x - 0,0244$$

$$0,0860 = 0,0019x - 0,0244$$

$$0,0860 + 0,0244 = 0,0019x$$

$$x = \frac{0,0860 + 0,0244}{0,0019} = \frac{0,1104}{0,0019} = 58,1053 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ fenolik dalam bekatul} &= \frac{\text{konsentrasi pada kurva standart}}{\text{konsentrasi sampel}} \times \text{FP} \times 100\% \\ &= \frac{58,1053 \mu\text{g/mL}}{10 \text{ mg/mL}} \times 80 \times 100\% \\ &= 46,48424 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 1.2 \quad & y = 0,0019x - 0,0244 \\
 & 0,0656 = 0,0019x - 0,0244 \\
 & 0,0656 + 0,0244 = 0,0019x \\
 x = & \frac{0,0656 + 0,0244}{0,0019} = \frac{0,09}{0,0019} = 47,3684 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \% \text{ fenolik dalam bekatul} &= \frac{\text{konsentrasi pada kurva standart}}{\text{konsentrasi sampel}} \times \text{FP} \times 100\% \\
 &= \frac{47,3684 \mu\text{g/mL}}{10 \text{ mg/mL}} \times 80 \times 100\% \\
 &= 37,89472 \%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 2.1 \quad & y = 0,0019x - 0,0244 \\
 & 0,1248 = 0,0019x - 0,0244 \\
 & 0,1248 + 0,0244 = 0,0019x \\
 x = & \frac{0,1248 + 0,0244}{0,0019} = \frac{0,1492}{0,0019} = 78,5263 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \% \text{ fenolik dalam bekatul} &= \frac{\text{konsentrasi pada kurva standart}}{\text{konsentrasi sampel}} \times \text{FP} \times 100\% \\
 &= \frac{78,5263 \mu\text{g/mL}}{10 \text{ mg/mL}} \times 80 \times 100\% \\
 &= 62,82104 \%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 2.2 \quad & y = 0,0019x - 0,0244 \\
 & 0,0889 = 0,0019x - 0,0244 \\
 & 0,0889 + 0,0244 = 0,0019x \\
 x = & \frac{0,0889 + 0,0244}{0,0019} = \frac{0,1133}{0,0019} = 59,6316 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \% \text{ fenolik dalam bekatul} &= \frac{\text{konsentrasi pada kurva standart}}{\text{konsentrasi sampel}} \times \text{FP} \times 100\% \\
 &= \frac{59,6316 \mu\text{g/mL}}{10 \text{ mg/mL}} \times 80 \times 100\% \\
 &= 47,70528 \%
 \end{aligned}$$

Lampiran 7. Data Hasil Penelitian dan Perhitungan KTF

- Ekstrak Bekatul Pelarut Aseton

Ulangan	Absorbansi	KTF (ppm)	% fenol	Rata-rata %fenol
Ekstrak bekatul Non-Fermentasi				
U1	0,0570	42,8421	34,27	29,935
U2	0,0364	32	25,6	
Ekstrak bekatul Terfermentasi				
1	0,0920	61,2632	49,01	50,84
	0,1007	65,8421	52,67	
2	0,0784	54,1053	43,28	42,82
	0,0763	53	42,4	

- Ekstrak Bekatul Pelarut Metanol

Ulangan	Absorbansi	KTF	% fenol	Rata-rata %fenol
Ekstrak bekatul Non-Fermentasi				
U1	0,1860	110,7368	88,59	86,57
U2	0,1764	105,6842	84,55	
Ekstrak bekatul Terfermentasi				
1	0,1396	86,3158	69,05	74,335
	0,1647	99,5263	79,62	
2	0,1823	108,7895	87,03	87,095
	0,1825	108,8947	87,16	

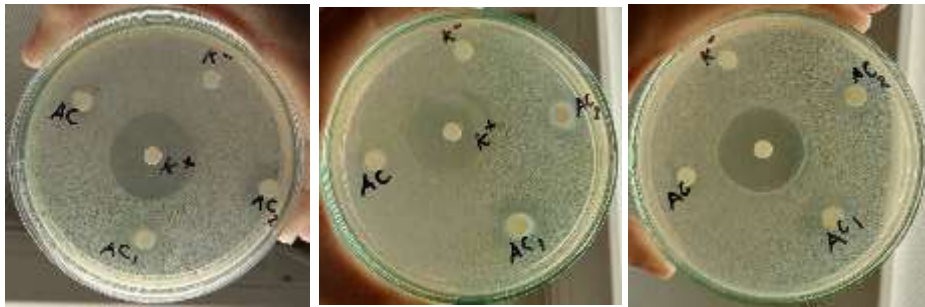
- **Ekstrak Bekatul Pelarut Etanol**

Ulangan	Absorbansi	KTF	%fenol	Rata-rata %fenol
Ekstrak bekatul Non-Fermentasi				
U1	0,0554	42	33,6	30,675
U2	0,0415	34,6842	27,75	
Ekstrak bekatul Terfermentasi				
1	0,0860	58,1053	46,48	42,185
	0,0656	47,3684	37,89	
2	0,1248	78,5263	62,82	55,265
	0,0889	59,6316	47,71	

Lampiran 8. Data Hasil Zona Hambat Aktivitas Antibakteri

F1 (Perlakuan)	F2 (Pelarut)	<i>Escherichia coli</i> (mm)			<i>S. aureus</i> (mm)		
		U1	U2	U3	U1	U2	U3
Non-fermentasi	Aseton	4,2	4,6	4	3,25	3,45	2,5
Fermentasi	Aseton	7	9,7	7,3	3,55	3,45	2,75
		7,7	9	7,2	4	4,5	2,7

1. *Escherichia coli*

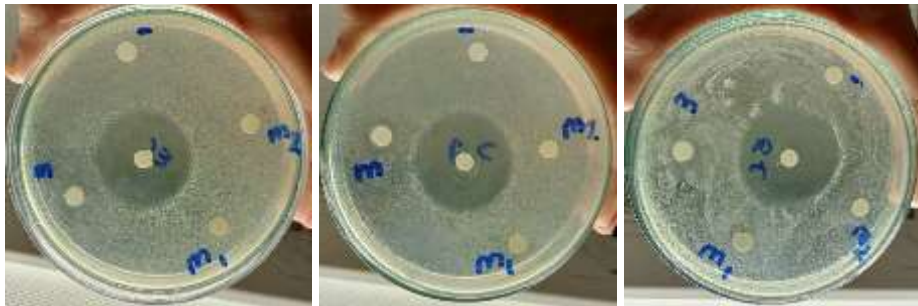


2. *Staphylococcus aureus*



F1 (Perlakuan)	F2 (Pelarut)	<i>Escherichia coli</i> (mm)			<i>S. aureus</i> (mm)		
		U1	U2	U3	U1	U2	U3
Non-fermentasi	Metanol	5,45	6	2	4,35	4,2	2
Fermentasi	Metanol	1	1,3	3,35	4	4	2,8
		0,5	3,35	3	5,1	6,25	2

1. *Escherichia coli*

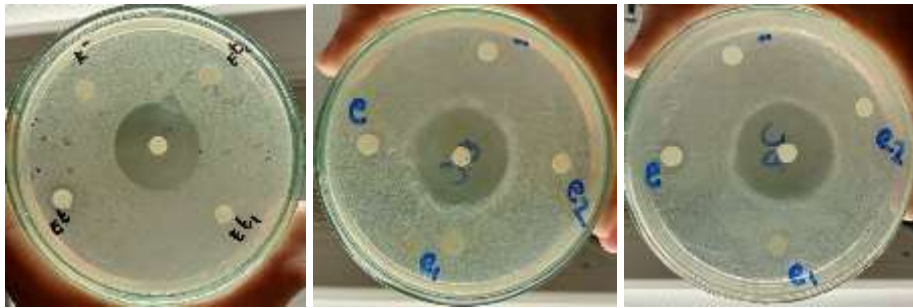


2. *Staphylococcus aureus*



F1 (Perlakuan)	F2 (Pelarut)	<i>Escherichia coli</i> (mm)			<i>S. aureus</i> (mm)		
		U1	U2	U3	U1	U2	U3
Non-fermentasi	Etanol	2	4,5	5	5,3	2,7	2,55
Fermentasi	Etanol	0,7	0,5	5,8	3,7	2	2
		0,5	0,7	0,6	2,3	3,5	2,7

1. *Escherichia coli*



2. *Staphylococcus aureus*



Lampiran 9. Dokumentasi

1. Preparasi Sampel

Gambar	Keterangan
	<p>Bekatul diayak menggunakan ayakan 60 mesh</p>
	<ul style="list-style-type: none"> - distabilisasi pada suhu 110°C selama \pm 15 menit - didiamkan pada suhu ruang hingga dingin - dimasukkan kedalam plastik - disimpan dalam kulkas untuk analisis selanjutnya

2. Analisis Kadar Air



Gambar	Keterangan
	<p>Diaktifasi Silica gel dengan cara dipanaskan dalam oven pada suhu 100°C selama \pm 30 menit</p>
	<p>Didinginkan pada suhu ruang selama \pm 20 menit</p> <p>Dimasukkan kembali ke dalam desikator</p>
	<ul style="list-style-type: none"> - Disiapkan 3 cawan porselen untuk dihilangkan Kadar Airnya - Ditimbang masing-masing cawan porselen - Dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama \pm 15 menit - Disimpan cawan porselen dalam desikator selama 20 menit - Ditimbang kembali cawan porselen - Diulang langkah pemanasan hingga penimbangan hingga berat konstan

  	<p>Dimasukkan sejumlah bekatul hingga cawan porselen penuh</p> <p>Ditimbang masing-masing cawan porselen + bekatul</p> <p>Dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama ± 15 menit untuk menghilangkan kadar air Bekatul</p> <p>Disimpan dalam desikator selama 20 menit</p> <p>Ditimbang kembali cawan porselen + bekatul</p> <p>Diulang langkah pemanasan hingga penimbangan hingga berat cawan porselen+ bekatul konstan</p>
	<p>Disimpan didalam toples dan ditutup rapat untuk dilakukan tahapan berikutnya</p>

3. Regenerasi Jamur *Rhizopus oryzae*

Gambar	Keterangan
	<p>disiapkan media PDA dalam cawan petri yang steril</p> <p>diambil akar isolate jamur <i>Rhizopus oryzae</i> menggunakan jarum ose</p>
	<p>ditanam akar jamur <i>Rhizopus oryzae</i> pada media PDA secara aseptis</p> <p>ditutup cawan petri dan dilapisi dengan <i>plastic wrap</i></p> <p>diinkubasi di dalam inkubator suhu 37°C selama 3 hari</p>

4. Pembuatan Inokulum Jamur *Rhizopus oryzae*

Gambar	Keterangan
	<p>ditambahkan 50 mL aquades steril ke dalam cawan petri yang telah ditumbuhi jamur untuk melarutkan spora jamur</p>
	<p>Dikikis akar jamur dari media PDA menggunakan kaca preparat steril</p> <p>Disaring larutan jamur menggunakan kasa steril untuk memisahkan antara filtrate yang berisi spora jamur dengan badan jamurnya.</p>

5. Fermentasi Bekatul Menggunakan Jamur *Rhizopus Oryzae*

Gambar	Keterangan
	<p>Disiapkan 20 gram bekatul yang telah disterilisasi ditambahkan larutan <i>buffer</i> asam sitrat pH 5 steril sebanyak 10 mL ditambahkan inokulum jamur 10% (v/b) atau 2 mL secara aseptis ditutup erlenmeyer dengan sumpel dan dilapisi dengan <i>plastic wrap</i></p>
	<p>diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 hari</p> <p>dikeringkan didalam oven pada suhu 40°C selama 24 jam</p>

**6. Ekstraksi Bekatul Terfermentasi Jamur *Rhizopus oryzae*
Menggunakan Variasi Pelarut Aseton, Metanol Dan Etanol P.A**

Gambar	Keterangan
	<p>Ditimbang bekatul hasil fermentasi</p> <p>Dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL</p>
	<p>Ditambahkan variasi pelarut aseton, metanol dan etanol p.a (1:3 b/v)</p> <p>ditutup erlenmeyer dengan sumpel dan dilapisi dengan <i>plastic wrap</i></p> <p>dimaserasi menggunakan <i>shaker incubator</i> dengan kecepatan 150 rpm pada suhu ruang selama 5 jam</p>
	<p>disaring menggunakan pompa vakum</p>

 	<p>Didapatkan endapan dan filtrat</p>
	<p>dipekatkan filtrat menggunakan <i>rotary evaporator</i> pada suhu 40°C</p>
	<p>ditimbang hasil rendemen ekstrak pekat dari setiap variasi pelarut</p>

7. Analisis Konsentrasi Total Fenolik

a. Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Galat dengan Reagen Folin-Ciocalteu

Gambar	Keterangan
	<ul style="list-style-type: none"> - Ditimbang 0,05 gram (50 mg) asam galat - Dilarutkan dalam akuades 25 mL - Dimasukkan labu ukur 100 mL - Ditambahkan aquades hingga tanda batas
	<ul style="list-style-type: none"> - Diencerkan larutan menjadi konsentrasi 10, 50, 100 dan 150 ppm dengan variasi pipet 0,2 mL, 1 mL, 2 mL dan 3 mL dari larutan induk - dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml - Ditambahkan aquades hingga tanda batas - Dari masing-masing konsentrasi larutan asam galat dipipet 0,2 mL - Ditambahkan 15,8 mL aquades - ditambah 1 mL Reagen <i>Folin-Ciocalteu</i> - divortex sampai homogen - didiamkan selama 10 menit - ditambahkan 3 ml larutan Na_2CO_3 20% - divortex hingga homogen - didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar





- diukur serapannya pada panjang gelombang 765 nm
- dibuat kurva kalibrasi dengan menghubungkan konsentrasi asam galat dengan absorbansi

b. Penentuan Konsentrasi Total Fenolik (KTF) Ekstrak Bekatul




Gambar	Keterangan
	<ul style="list-style-type: none"> - ditimbang 0,1gram (100 mg) ekstrak sampel - dilarutkan sampai 10 ml dengan akuades - dihomogenkan (10 mg/mL)
	<ul style="list-style-type: none"> - dipipet 0,2 mL dan dimasukkan pada tabung reaksi - ditambahkan 15,8 mL aquades - ditambahkan 1 ml Reagen <i>Folin-Ciocalteu</i> - divortex sampai homogen - didiamkan selama 10 menit - ditambahkan 3 ml larutan Na_2CO_3 20% - divortex hingga homogen - didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar - diukur serapannya pada panjang gelombang 765 nm - dibandingkan absorbansi sampel dengan kurva standart asam galat - dihitung Konsentrasi Total Fenolik (KTF)

8. Uji Aktivitas Antibakteri Metode Difusi Agar

a. Regenerasi Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Gambar	Keterangan
	<ul style="list-style-type: none"> - Disiapkan media NA miring dalam tabung reaksi yang steril - Dipanaskan jarum ose diatas Bunsen hingga berpijar warna merah
	<ul style="list-style-type: none"> - Diambil masing-masing isolate bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Escherichia coli</i> menggunakan jarum ose - digoreskan pada media NA miring secara aseptis - ditutup tabung reaksi dengan sumpel dan dilapisi dengan <i>plastic wrap</i> - Diinkubasi di dalam inkubator suhu 37°C selama 24 jam (<i>Escherichia coli</i>) dan selama 18 jam (<i>Staphylococcus aureus</i>).


b. Pembuatan Inokulum Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Gambar	Keterangan
	<ul style="list-style-type: none">- Dipanaskan jarum ose diatas Bunsen hingga berpijar warna merah
	<ul style="list-style-type: none">- Diambil masing-masing isolate bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Escherichia coli</i> menggunakan jarum ose
	<ul style="list-style-type: none">- Dimasukkan masing-masing pada media NB steril yang berbeda



- Diinkubasi di dalam inkubator suhu 37°C selama 24 jam (*Escherichia coli*) dan selama 18 jam (*Staphylococcus aureus*).

9. Preparasi Uji Aktivitas Antibakteri

Gambar	Keterangan
	<ul style="list-style-type: none"> - Ditimbang 500 mg ekstrak bekatul - Dimasukkan ke dalam botol vial steril - Ditambahkan 1 mL DMSO - Dihomogenkan - Didapatkan konsentrasi ekstrak 500mg/mL - Dipipet 100 μL - Dimasukkan ke dalam botol vial steril - dimasukkan kertas cakram kedalam ekstrak hingga terendam - didiamkan selama 30 menit

10. Uji Aktivitas Antibakteri Metode Difusi Agar

Gambar	Keterangan
	<ul style="list-style-type: none"> - Ditimbang 500 mg ekstrak bekatul - Dimasukkan ke dalam botol vial steril - Ditambahkan 1 mL DMSO - Dihomogenkan - Didapatkan konsentrasi ekstrak 500mg/mL - Dipipet 100 μL - Dimasukkan ke dalam botol vial steril - dimasukkan kertas cakram kedalam ekstrak hingga terendam - didiamkan selama 30 menit

11. *Staphylococcus aureus*

1.1 Aseton



1.2 Methanol

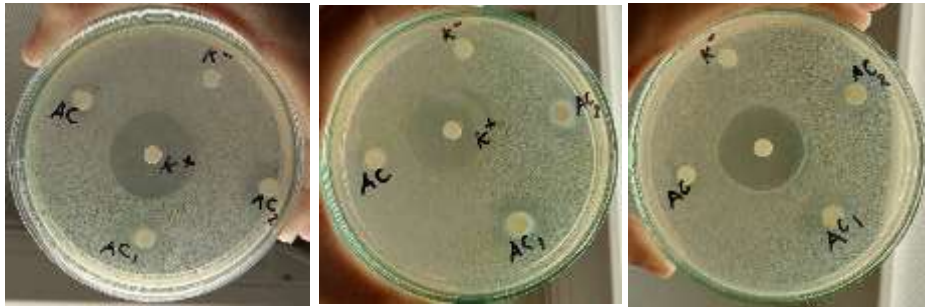


1.3 Etanol

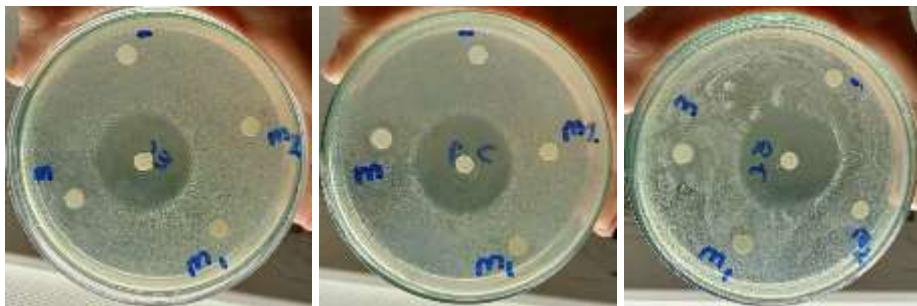


12. *Escherichia coli*

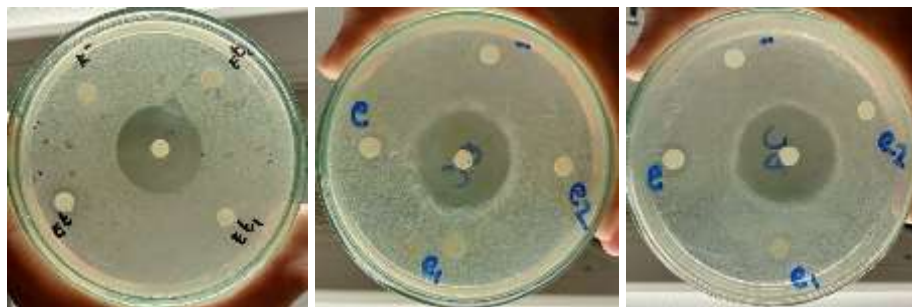
2.1 Aseton



2.2 Methanol



2.3 Etanol



Absorbansi Sampel Ekstrak Bekatul

Tanggal Analisa : 08 Oktober 2022

Advanced Reads Report

Report time 08/10/2022 3:27:43 PM
Method
Batch name D:\Mahasiswa On Going\Kharisma\Absorbansi Sampel Ekstrak Bekatul Aceton (08-10-20220).BAB
Application Advanced Reads 3.00 (339)
Operator Rika

Instrument Settings

Instrument Cary 50
Instrument version no. 3.00
Wavelength (nm) 765.0
Ordinate Mode Abs
Ave Time (sec) 0.1000
Replicates 3
Sample averaging OFF

Comments:

Zero Report

Read	Abs	nm
Zero	(0.1288)	765.0

Analysis

Collection time 9/16/2022 3:27:44 PM

Sample	F	Mean	SD	%RSD	Readings
Aceton Non fermentasi 1					0.0561 0.0568 0.0581
	0.0570	0.0010	1.73		
Aceton Non fermentasi 2					0.0364 0.0365 0.0362
	0.0364	0.0001	0.32		
Aceton Fermen 1.1					0.0889 0.0920 0.0950
	0.0920	0.0031	3.32		
Aceton Fermen 1.2					0.0994 0.1021 0.1005
	0.1007	0.0013	1.33		
Aceton Fermen 2.1					0.0788 0.0780 0.0783
	0.0784	0.0004	0.55		
Aceton Fermen 2.2					0.0764 0.0759 0.0767
	0.0763	0.0004	0.49		

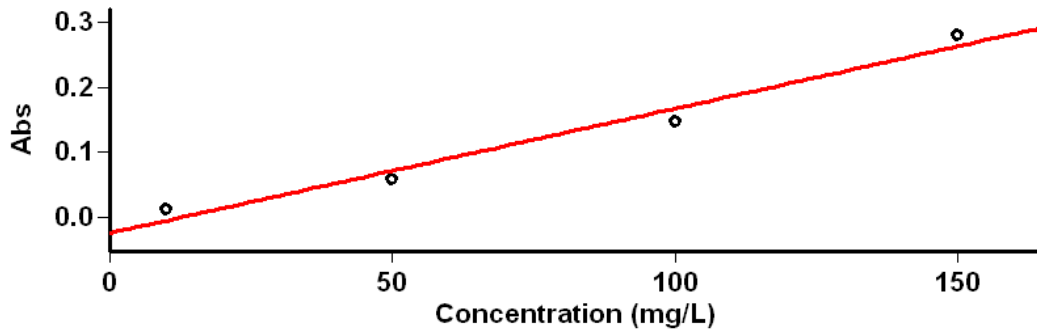
MetOH non-Fermen 1				0.1861
				0.1860
	0.1860	0.0001	0.08	0.1858
MetOH non-Fermen 2				0.1767
				0.1766
	0.1764	0.0004	0.24	0.1759
MetOH Fermen 1.1				0.1380
				0.1390
	0.1396	0.0019	1.38	0.1417
MetOH Fermen 1.2				0.1644
				0.1650
	0.1647	0.0003	0.20	0.1646
MetOH Fermen 2.1				0.1829
				0.1817
	0.1823	0.0006	0.33	0.1824
MetOH Fermen 2.2				0.1822
				0.1824
	0.1825	0.0003	0.19	0.1829
EtOH non-Fermen 1				0.0554
				0.0555
	0.0554	0.0001	0.21	0.0553
EtOH non-Fermen 2				0.0413
				0.0418
	0.0415	0.0002	0.55	0.0414
EtOH Fermen 1.1				0.0855
				0.0863
	0.0860	0.0004	0.51	0.0862
EtOH Fermen 1.2				0.0664
				0.0643
	0.0656	0.0011	1.69	0.0659
EtOH Fermen 2.1				0.1252
				0.1250
	0.1248	0.0005	0.39	0.1242
EtOH Fermen 2.2				0.0889
				0.0890
	0.0889	0.0001	0.09	0.0889

Results Flags Legend

R = Repeat reading

Kurva Standar Asam Galat

Tanggal Analisa : 04 Oktober 2022



Concentration Analysis Report

Report time 10/4/2022 2:53:35 PM
 Method
 Batch name D:\Mahasiswa On Going\Kharisma\Kurva Standar Asam Galat Ulang (04-10-2022).BCN
 Application Concentration 3.00(339)
 Operator Rika

Instrument Settings

Instrument Cary 50
 Instrument version no. 3.00
 Wavelength (nm) 765.0
 Ordinate Mode Abs
 Ave Time (sec) 0.1000
 Replicates 3
 Standard/Sample averaging OFF
 Weight and volume corrections OFF
 Fit type Linear
 Min R² 0.95000
 Concentration units mg/L

Comments:

Zero Report

Read	Abs	nm
Zero	(0.1090)	765.0

Calibration

Collection time 10/4/2022 2:53:52 PM

Standard	Concentration mg/L	F	Mean	SD	%RSD	Readings
Std 1						0.0121 0.0123 0.0124
	10.0		0.0123	0.0001	1.14	

Std 2					0.0576
					0.0581
	50.0	0.0578	0.0003	0.50	0.0578
Std 3					0.1464
					0.1470
	100.0	0.1467	0.0003	0.21	0.1467
Std 4					0.2813
					0.2816
	150.0	0.2815	0.0002	0.09	0.2818

Calibration eqn	Abs = 0.00192*Conc -0.02442
Correlation Coefficient	0.97030
Calibration time	10/4/2022 2:54:39 PM

Results Flags Legend

U = Uncalibrated	O = Overage
N = Not used in calibration	R = Repeat reading