

**ANALISA HASIL LC-MS FERMENTASI EKSTRAK BEKATUL OLEH  
Rhizopus oryzae MENGGUNAKAN PENDEKATAN  
CHEMINFORMATIKA**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
MUHAMMAD RIZQI MINANURROHMAN  
NIM. 18630111**



**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2023**

**ANALISA HASIL LC-MS FERMENTASI EKSTRAK BEKATUL OLEH  
*Rhizopus oryzae* MENGGUNAKAN PENDEKATAN  
CHEMINFORMATIKA**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
MUHAMMAD RIZQI MINANURROHMAN  
NIM. 18630111**

**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  
2023**


**ANALISA HASIL LC-MS FERMENTASI EKSTRAK BEKATUL OLEH  
*Rhizopus oryzae* MENGGUNAKAN PENDEKATAN  
CHEMINFORMATIKA**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**MUHAMMAD RIZQI MINANURROHMAN**  
18630111

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji Tanggal:  
14 Desember 2023

**Pembimbing I**

  
**Dr. Suci Amalia M.Sc**  
NIP. 19821104 200901 2 007

**Pembimbing II**

  
**Ahmad Hanapi M.Sc**  
NIDT. 19851225 20160801 1 069

**Mengetahui,**  
**Ketua Program Studi Kimia**  
  
**Rachmayanti Ningsih, M.Si**  
NIP. 19810811 200801 2 010

ANALISA HASIL LC-MS FERMENTASI EKSTRAK BEKATUL OLEH  
*Rhizopus oryzae* MENGGUNAKAN PENDEKATAN  
CHEMINFORMATIKA

SKRIPSI

Oleh:  
MUHAMMAD RIZQI MINANURROHMAN  
18630111

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 14 Desember 2023

Penguji Utama	: Elok Kamila Hayati, M.Si NIP. 19790620 200604 2 002	(.....)
Ketua Penguji	: Himmatul Baroroh, M.Si NIP. 19750730 200312 2 001	(.....)
Sekretaris Penguji	: Dr. Suci Amalia, M.Sc NIP. 19821104 200901 2 007	(.....)
Anggota Penguji	: Ahmad Hanapi, M.Sc NIDT. 19851225 20160801 1 069	(.....)

Mengesahkan,  
Ketua Program Studi Kimia



Rachman Hakim Ningsih, M.Si  
NIP. 19810814 200801 2 010

## SURAT PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Muhammad Rizqi Minanurrohman  
NIM : 18630111  
Program Studi : Kimia  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Judul Penelitian : Analisa Hasil LC-MS Fermentasi Ekstrak Bekatul Oleh  
*Rhizopus oryzae* Menggunakan Pendekatan  
Cheminformatika

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan, atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya, 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, 14 Desember 2023  
Yang membuat pernyataan



Muhammad Rizqi Minanurrohman  
NIM. 18630111

## **MOTTO**

“Jangan khawatirkan apa yang dipikirkan orang lain. Tegakkan kepalamu dan melangkahlah ke depan”

## KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah kehadiran Allah Swt yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada kita semua, selawat serta salam kita haturkan kepada baginda kita yakni Nabi Muhammad Saw yang telah memberikan suri tauladan kepada umatnya, sehingga dalam proses penulisan skripsi penelitian ini tidak terlepas dari nilai-nilai kehidupan yang menjadikan Allah Swt sebagai tujuan, sebagaimana yang telah diajarkan oleh Rasulullah Saw. Semoga kita menjadi umat yang pandai dalam mensyukuri segala nikmat yang telah diberikan Allah Swt, dan dengan harapan kelak mendapat syafaat dari baginda Nabi Muhammad Saw. Aamiin.

Skripsi ini dibuat untuk memenuhi salah satu kriteria kelulusan mata kuliah yang ada di jurusan kimia. Skripsi ini dapat disusun karena dukungan, motivasi serta bimbingan dari berbagai pihak. Tiada kata yang patut terucap untuk menguntai sedikit makna kebahagiaan ini.

Oleh karena itu, izinkanlah penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Zainuddin, MA selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Rachmawati Ningsih, M.Si. selaku Ketua Prodi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Dosen Pembimbing ibu Dr. Suci Amalia, M.Sc, Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc, ibu Himmatul Baroroh, M.Si dan ibu Elok Kamila Hayati, M.Si karena atas bimbingan, pengarahan, dan kesabarannya penulisan skripsi ini dapat terselesaikan.
5. Orang tua serta seluruh keluarga yang telah memberikan dukungan semangat, kasih sayang serta doa yang selalu dipanjatkan.

6. Teman seperjuangan yang selalu mensupport, memberikan semangat, senantiasa membantu, dan memberikan masukan dalam menyelesaikan skripsi ini.
7. Seluruh teman-teman kimia angkatan 2018 yang saling memberikan support semangat dalam proses penyelesaian skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Penulis sangat terbuka dengan saran dan kritik yang bersifat membangun dari berbagai pihak demi kesempurnaan laporan ini. Semoga laporan ini dapat menjadi sarana pembuka tabir ilmu pengetahuan baru, bermanfaat bagi kita semua dan untuk peradaban yang akan datang, Aamiin.

Malang, 14 Desember 2023

Penulis



## DAFTAR ISI

LEMBAR JUDUL .....	i
LEMBAR PERSETUJUAN .....	ii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
SURAT PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN .....	iv
MOTTO .....	v
KATA PENGANTAR .....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xii
ABSTRAK .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
مستخلص البحث.....	xv
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan .....	6
1.4 Batasan Masalah .....	6
1.5 Manfaat .....	6
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>7</b>
2.1 Bekatul.....	7
2.2 Fermentasi .....	9
2.3 Jamur <i>Rhizopus oryzae</i> .....	12
2.4 LC-MS .....	13
2.5 Pendekatan <i>In Silico Fragmentation</i> .....	15
2.6 Database Bioinformatika .....	17
2.7 Perangkat Lunak .....	19
2.8 Metode <i>Principal Component Analysis</i> (PCA).....	20
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>23</b>
3.1 Pelaksanaan Penelitian.....	23
3.2 Alat dan Bahan .....	23
3.2.1 Alat .....	23
3.2.2 Bahan .....	23
3.3 Rancangan Penelitian.....	24
3.4 Cara Kerja.....	24
3.4.1 Identifikasi dengan LC-MS .....	24
3.4.2 Pengolahan Gambar Hasil LC-MS dengan software Fiji ImageJ.....	25
3.4.3 Prediksi Spektra Hasil Riset Database.....	26
3.4.4 Analisa PCA ( <i>Principal Component Analysis</i> ) .....	26
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1 Identifikasi Menggunakan LC-MS.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

4.2 Pengolahan Spektra Hasil LC-MS.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.3 Analisa Menggunakan PCA .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.4 Penelitian Analisa Bekatul Terfermentasi Menggunakan Pendekatan Cheminformatika dalam Perspektif Islam..	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>BAB V PENUTUP .....</b>	<b>29</b>
5.1 Kesimpulan.....	29
5.2 Saran .....	29
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>30</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>36</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur Beras Putih.....	7
Gambar 2.2 In silico fragmentation dengan bantuan database .....	16
Gambar 2.3 Penyusunan data dalam PubChem .....	17
Gambar 2.4 Grafik fragmentasi asam asetat.....	19
Gambar 2.5 Hasil Plot Senyawa Tanaman Kemangi.....	22
Gambar 4.1 Kromatogram LC-MS ekstrak bekatul terfermentasi <i>Rhizopus oryzae</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 4.2 Spektra massa pada waktu retensi 0,354 .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 4.3 Spektra massa pada waktu retensi 7,485 .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 4.4 Spektra massa pada waktu retensi 14,64 .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 4.5 Spektra massa pada waktu retensi 15,947 .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 4.6 Spektra massa pada waktu retensi 16,35 .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 4.7 Spektra massa pada waktu retensi 16,352 .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 4.8 Spektra massa pada waktu retensi 17,85 .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 4.9 Spektra massa pada waktu retensi 18,257 .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 4.10 Spektra massa pada waktu retensi 20,21 .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 4.11 Score Plot PCA dari beberapa senyawa yang terdeteksi pada bekatul dan sampel.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 4.12 Scatter plot PCA berdasarkan kelompok volatilitas.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 4.13 Fragmentasi (1) (E)-Coniferaldehyde pada m/z 73 dan (2) 2-Hydroxy-2-phenylpropanoic acid pada m/z 105....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 4.14 Fragmentasi p-hydroxybenzoic acid pada m/z 65.	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 4.15 Fragmentasi gentisic acid pada m/z 79 .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 4.16 Fragmentasi (1) gallic acid pada m/z 85 dan (2) vanillin pada m/z 79 .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 4.17 Fragmentasi thymol pada m/z 65, 79, dan 149 .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 4.18 Fragmentasi myricetin pada m/z 97, 111, dan 263	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Gambar 4.19 Fragmentasi Quercetin pada m/z 271, 275, dan 285 .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

- Gambar 4.20 Struktur 2-((3-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)-4-oxo-6-propyl-4H-chromen-7-yl)oxy) acetic acid, yang memiliki kerangka flavonoid .....**Error! Bookmark not defined.**
- Gambar 4.21 Fragmentasi 2-((3-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)-4-oxo-6-propyl-4H-chromen-7-yl)oxy) acetic acid pada m/z 97, 239, 353, dan 395.....**Error! Bookmark not defined.**

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan zat gizi bekatul.....	8
---	---

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian .....	36
Lampiran 2. Diagram Alir.....	37
Lampiran 3. Spektra dan Struktur Senyawa Pembanding.....	40
Lampiran 4. Data m/z dan Intensitas Sampel.....	44
Lampiran 5. Posisi Tiap Titik pada Hasil Pengelompokkan Senyawa .....	47
Lampiran 6. Tabel Senyawa Database .....	48

## ABSTRAK

Minanurrohman, M. R. 2023. *Analisa Hasil LC-MS Fermentasi Ekstrak Bekatul oleh Rhizopus oryzae Menggunakan Pendekatan Cheminformatika*. Skripsi. Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Dr. Suci Amalia, M.Sc.; Pembimbing II: Ahmad Hanapi, M.Sc.

---

**Kata Kunci:** Hasil LC-MS Non-Library, fermentasi, ekstrak bekatul, *Rhizopus oryzae*, cheminformatika

LC-MS merupakan suatu teknik analisa kimia yang digunakan dalam mendeteksi suatu kandungan dalam sampel kimia. LC-MS yang digunakan pada penelitian ini yaitu Waters XEVO dengan metode TQD. Hasil dari LC-MS memiliki resolusi yang rendah sulit untuk diidentifikasi tanpa menggunakan bantuan dari komputer. Tujuan penelitian ini adalah untuk memprediksi dan menginterpretasi hasil LC-MS dari fermentasi ekstrak bekatul oleh *Rhizopus oryzae*. Interpretasi hasil LC-MS dilakukan dengan melihat spektra dan menentukan pengelompokan senyawa. Data yang berupa gambar spektra diolah dengan *software ImageJ* untuk menentukan koordinat titik X dan Y sehingga dapat diketahui intensitas dan nilai m/z. Data spektra dari database diperlukan untuk dapat melihat kelompok senyawa pada sampel. Data spektra dari database dibuat menggunakan CFM-ID sehingga dapat diketahui nilai intensitas dan m/z. Nilai intensitas dan m/z akan digunakan dalam analisa metode PCA dengan memanfaatkan *database*. Hasil pengolahan data menggunakan PCA memiliki *score* 14,6% dengan PC1=7,4% dan PC2=7,2% dan menunjukkan pengelompokan yang dibedakan dengan beberapa warna yang berbeda, yaitu merah (fenolik), biru (flavonoid), hijau (steroid), dan oranye (sakarida). Pengelompokan berdasarkan volatilitas menunjukkan dugaan sampel 1,2,7,8 dan 9 berupa non-volatil dan 3,4,5, dan 6 berupa volatil dengan *score* PCA 43%. Berdasarkan *score* plot PCA, Sampel 1-8 berada pada daerah fenolik dan sampel 9 pada flavonoid. Berdasarkan perbandingan diduga sampel 1-8 memiliki 2 struktur benzena dengan jenis fenolik dan sampel 9 memiliki struktur flavonoid.

## ABSTRACT

Minanurrohman, M. R. 2023. **Analysis of LC-MS Results of Rice Bran Extract Fermentation by *Rhizopus oryzae* Using a Cheminformatics Approach**. Thesis. Departement of Chemistry, Faculty of Science and Technology, State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Advisor I: Dr. Suci Amalia, M.Sc.; Advisor II: Ahmad Hanapi, M.Sc.

---

**Keywords:** *Non-Library LC-MS results, fermentation, rice bran extract, Rhizopus oryzae, cheminformatics*

LC-MS is a chemical analysis technique used to detect ingredients in chemical samples. The LC-MS used in this research is Waters XEVO with the TQD method. Low resolution LC-MS results are difficult to identify without using computer assistance. The aim of this research is to predict and interpret LC-MS results from fermentation of rice bran extract by *Rhizopus oryzae*. Interpretation of LC-MS results is done by looking at the spectra and determining compound groupings. The data in the form of spectral images is processed with ImageJ software to determine the coordinates of the X and Y points so that the intensity and m/z values can be determined. Spectra data from the database is needed to be able to see groups of compounds in the sample. Spectra data from the database is created using CFM-ID so that intensity and m/z values can be known. Intensity and m/z values will be used in the PCA method analysis using a database. The results of data processing using PCA have a score of 14.6% with PC1=7.4% and PC2=7.2% and show groupings that are differentiated by several different colors, namely red (phenolic), blue (flavonoid), green (steroid), and orange (saccharide). Grouping based on volatility shows that samples 1,2,7,8 and 9 are non-volatile and 3,4,5 and 6 are volatile with a PCA score of 43%. Based on the PCA score plot, Samples 1-8 are in the phenolic area and sample 9 is in flavonoid. Based on the comparison, it is suspected that samples 1-8 have 2 benzene structures with a phenolic type and sample 9 have flavonoid structure.



## مستخلص البحث

منا نور الرحمن، محمد رزقي. ٢٠٢٣. تحليل نتائج LC-MS لتخمير مستخلص نخالة الأرز بواسطة الرّازيّة الرّزيّة باستخدام منهج المعلوماتية الكيميائية. أطروحة. برنامج دراسة الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية، مالانج. املشرفة ١: د. سوجي أماليا، املاجستر؛ املشرفة ٢: أمحد حنفي، املاجستر.

الكلمات المفتاحية: نتائج LC-MS غير المكتبية، التخمير، مستخلص نخالة الأرز، الرّازيّة الرّزيّة، المعلوماتية الكيميائية

LC-MS هي تقنية تحليل كيميائي تستخدم للكشف عن المكونات في العينات الكيميائية. إن LC-MS المستخدم في هذا البحث هو Waters XEVO مع طريقة TQD. من الصعب تحديد نتائج LC-MS ذات الدقة المنخفضة دون استخدام مساعدة الكمبيوتر. الهدف من هذا البحث هو التنبؤ وتفسير نتائج LC-MS من تخمير مستخلص نخالة الأرز بواسطة الرّازيّة الرّزيّة. يتم تفسير نتائج LC-MS من خلال النظر في الأطياف وتحديد المجموعات المركبة. تتم معالجة البيانات على شكل صور طيفية باستخدام برنامج [ImageJ لتحديد إحداثيات نقطتي X و Y بحيث يمكن تحديد قيم الكثافة و m/z. هناك حاجة إلى بيانات الأطياف من قاعدة البيانات لتمكين من رؤية مجموعات المركبات في العينة. يتم إنشاء بيانات الأطياف من قاعدة البيانات باستخدام CFM-ID بحيث يمكن معرفة قيم الكثافة و m/z. سيتم استخدام قيم الشدة و m/z في تحليل طريقة PCA باستخدام قاعدة البيانات. حصلت نتائج معالجة البيانات باستخدام PCA على درجة 14.6% مع PC1 = 7, 4% و PC2 = 7, 2% وتظهر المجموعات التي يتم تمييزها بعدة ألوان مختلفة، وهي الأحمر (الفينول)، والأزرق (الفلافونويد)، والأخضر (الستيرويد)، والبرتقال (السكراريد). يظهر التجميع على أساس التقلب أن العينات ١، ٢، ٧، ٨ و ٩ غير متطابقة وأن ٣، ٤، ٥ و ٦ متقلبة مع درجة PCA تبلغ ٤٣٪. استناداً إلى مؤامرة النتيجة PCA، العينات ١-٩ موجودة في المنطقة الفينولية. بناءً على المقارنة، من المتوقع أن العينات من ١ إلى ٩ تحتوي على تركيبتين بنزين من النوع الفينولي.

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Beberapa tahun terakhir, teknologi semakin berkembang pesat dalam berbagai aspek kehidupan mulai dari politik, ekonomi, kebudayaan, dan bahkan dunia pendidikan. Perkembangan teknologi merupakan suatu hal yang tidak bisa dihindari dalam kehidupan. Seiring dengan kemajuan teknologi, ilmu pengetahuan juga akan berkembang. Kemajuan teknologi menciptakan inovasi dan memberikan manfaat positif bagi kehidupan manusia seperti memberikan kemudahan, serta menciptakan metode baru dalam bidang teknologi dan informasi (Jamun, 2018). Aspek yang terpengaruh perkembangan teknologi ini salah satunya pendidikan dalam bidang kimia.

Kimia dikenal sebagai bidang ilmu yang berlandaskan percobaan atau eksperimen. Hasil dari percobaan tersebut akan dipaparkan sebagai penjelasan ilmiah. Beberapa teori baru timbul setelah melakukan pengamatan terhadap hasil-hasil percobaan. Salah satu penemuan teori dalam kimia adalah mekanika kuantum. Sejak penemuan mekanika kuantum lahir, bidang baru yang disebut kimia komputasi mulai dikembangkan. Kimia komputasi menggunakan hasil dari kimia teori yang diterjemahkan ke dalam komputer untuk menghitung sifat-sifat molekul dan perubahannya. Kimia komputasi juga dapat melakukan perhitungan terhadap sistem besar seperti gas, cairan, padatan, dan kristal cair dan menerapkan program tersebut pada sistem nyata. Bantuan dari kimia komputasi dapat meliputi

melakukan simulasi reaksi, mendesain awal proses reaksi, menentukan sifat-sifat dari molekul pereaksi maupun produk, serta dapat membantu menganalisis suatu senyawa yang sulit diketahui (Prianto, 2007).

Ilmu kimia komputasi dapat membantu mengidentifikasi senyawa-senyawa metabolit kecil dari sampel biologis. Teknik tersebut disebut metabolomik yang meliputi deteksi, identifikasi, dan perhitungan dari senyawa yang memiliki berat molekul rendah. Identifikasi metabolit mengalami beberapa masalah sehingga beberapa metabolit belum terkarakterisasi struktur dan kegunaannya (Patti *et al.*, 2012). Metabolit senyawa kecil memiliki peran penting dalam sistem biologis dan untuk memahami penyakit fenotipe. Metabolit juga menunjukkan beragam kelompok struktur dengan berat molekul kecil seperti lipid, asam amino, peptida, asam nukleus, asam organik, vitamin, dan karbohidrat yang membuat tantangan yang sulit untuk analisis (Zhang *et al.*, 2012).

Setiap hal yang ada di dunia ini seperti tumbuhan, hewan dan ilmu pengetahuan diciptakan oleh Allah SWT. memiliki manfaat masing-masing dalam kehidupan. Seperti yang dijelaskan dalam surat Ali 'Imran ayat 191 yang berbunyi:

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَنُحُودًا وَعَلَىٰ كُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمٰوٰتِ وَالْاَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هٰذَا بَطٰلًا  
سُبْحٰنَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ

Artinya: (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka. (QS. Ali 'Imran:191)

Surat Ali 'Imran menjelaskan bahwa semua yang ada di bumi ini merupakan ciptaan Allah dan semua yang diciptakanNya tidak ada yang sia-sia. Semua hanya diketahui oleh orang yang mau berfikir disetiap keadaan. Orang-orang yang terus

berfikir dalam keadaan apapun akan menemukan manfaat dari semua yang ada di langit dan bumi. Ayat tersebut dapat digunakan landasan untuk penelitian ini, yakni bahwa bekatul yang merupakan hasil samping atau limbah juga dapat ditingkatkan manfaatnya sebagai bahan lain yang lebih bermanfaat dan memiliki nilai ekonomis di masyarakat.

Bekatul memiliki kandungan senyawa bioaktif yang dapat berguna sebagai pencegah penyakit degeneratif seperti kanker. Bekatul memiliki komponen bioaktif seperti asam ferulat,  $\gamma$ -oryzanol,  $\beta$ -sitosterol, tokotrienol/tokoferol, *tricine*, *p-coumaric*, *sinapic*, *syringic* dan asam fitat. Komponen lain yang terdapat dalam bekatul berupa protein, mineral, karbohidrat kompleks, vitamin, fitonutrien, dan asam lemak esensial (Kurniati *et al.*, 2017). Bekatul memiliki komponen nutrisi yang penting seperti minyak (12-22%), protein (11-17%), serat (6-14%), air (10-18%), dan abu (8-17%) dan didalam serat mengandung senyawa aktif seperti senyawa fenolik (Sharif *et al.*, 2014).

Salah satu cara untuk memaksimalkan penggunaan bekatul dengan metode fermentasi oleh jamur. Salah satunya yaitu jamur *Rhizopus oryzae* yang dapat menghasilkan enzim selulase pemecah karbohidrat dan memiliki kemampuan sistem oksidatif lignolitik yang mendegradasi cincin fenil sehingga komponen dari fenol bebas meningkat (Martins *et al.*, 2011). Enzim tersebut juga melemahkan ikatan senyawa bioaktif sehingga mudah terputus saat proses ekstraksi. Hal tersebut membuat penurunan kadar serat bekatul semakin tinggi (Aruben, 2010). Schmidt *et al.*, (2014) melakukan penelitian untuk mengetahui aktivitas antioksidan dalam bekatul terfermentasi oleh *Rhizopus oryzae* dan menemukan peningkatan senyawa antioksidan seperti senyawa fenolik setelah proses fermentasi. Hasil penelitian

Razak *et al.*, (2017) menyatakan bahwa jumlah senyawa fenolik pada bekatul terfermentasi bervariasi. Beberapa senyawa fenolik seperti asam ferulat, kafeat, protokatekuat mengalami peningkatan signifikan dibanding bekatul yang tidak terfermentasi.

Peningkatan senyawa dalam bekatul terfermentasi dapat diketahui dengan beberapa metode analisis. Salah satu metode analisis yang dapat digunakan yaitu analisis menggunakan LC-MS. *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LC-MS) atau Kromatografi Cair Spektrometri Massa (KC-SM) merupakan teknik analisis yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair dengan deteksi spektrometri massa. LC-MS dapat menampilkan hasil data berupa *peak*. Selain itu, dalam LC-MS terdapat informasi berupa berat molekul dari senyawa pada sampel. Keuntungan LC-MS yaitu dapat menganalisa komponen dalam suatu senyawa dengan lebih luas. Komponen tersebut meliputi senyawa termal, polaritas tinggi, hingga dapat menganalisis protein (Mangurana *et al.*, 2019).

Kromatografi Cair Spektroskopi Massa (LC-MS) merupakan teknologi yang dapat secara fisik memisahkan ribuan metabolit dan memberikan pandangan yang luas terhadap metabolisme. Teknik ini juga dapat mengidentifikasi ribuan senyawa dalam suatu sampel (Lin *et al.*, 2007). Tetapi, untuk mengidentifikasi hasil dari KC-SM memerlukan seorang ahli dalam bidang tersebut. Namun, seorang ahli juga tidak mungkin memberikan identifikasi yang tepat tanpa menggunakan database sebagai dasarnya. Struktur dari spektra dapat dengan mudah ditentukan melalui pencocokan spektra MS/MS dengan perpustakaan referensi yang telah mendapat lisensi. Tetapi, perpustakaan tersebut hanya terbatas untuk senyawa

kimia yang telah diketahui sehingga senyawa yang tidak terdapat dalam perpustakaan tidak dapat diidentifikasi (Stein, 2012). Masalah lain dalam interpretasi spektra MS yaitu kecilnya resolusi pada instrument LC-MS sehingga membuat spektra yang dihasilkan membuat beberapa puncak tumpang tindih dimana dua puncak spektra menumpuk menjadi satu dan mempersulit untuk mengidentifikasi peak pada spektra tersebut. Untuk mengidentifikasi senyawa yang sulit diketahui dibutuhkan *in silico fragmentation*.

Pendekatan fragmentasi *in silico* dapat memberikan informasi tentang molekul yang tidak terdapat referensi dalam pencocokan *database* (Böcker, 2017). Pendekatan *in silico* memiliki akses ke database struktur termasuk ChemSpider dan PubChem yang mencakup 100 juta senyawa. Hal tersebut lebih banyak dibanding mencari database spektra yang hanya mencakup 1 juta senyawa (Kim *et al.*, 2016). Identifikasi senyawa yang tidak diketahui melalui pendekatan *in silico* dapat menggunakan beberapa alat atau perangkat lunak, salah satunya CFM-ID. Perangkat lunak tersebut membantu mendeteksi senyawa yang mencakup beberapa database dan mengelusidasi senyawa yang tidak terdapat dalam database.

## 1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengelompokan dan prediksi senyawa hasil LC-MS bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae* dengan pendekatan cheminformatika menggunakan PCA berdasarkan data kelompok senyawa dan sifat volatilitas.

### 1.3 Tujuan

Untuk menginterpretasi dan memprediksi senyawa dari hasil LC-MS bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae* dengan pendekatan cheminformatika menggunakan PCA berdasarkan data kelompok senyawa dan sifat volatilitas.

### 1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Sampel merupakan hasil LC-MS dari bekatul yang telah terfermentasi oleh *Rhizopus oryzae* dari penelitian sebelumnya.
2. Sampel diambil pada 9 puncak pertama pada kromatogram
3. Identifikasi senyawa dengan analisa ahli, perangkat lunak CFM-ID dan PCA.
4. LC-MS yang digunakan beresolusi rendah dengan nama merk The Waters Xevo TQD

### 1.5 Manfaat

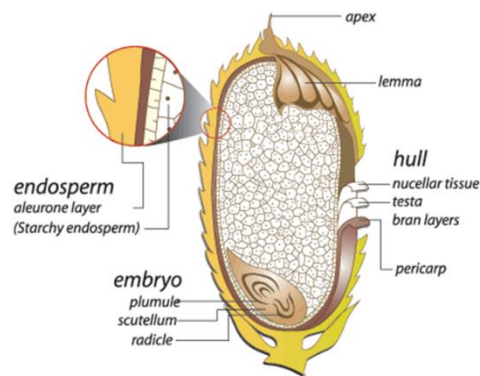
Manfaat penelitian ini adalah memberikan informasi dan pengetahuan tentang senyawa yang belum teridentifikasi dalam database (non-library) yang terdapat pada bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae*.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Bekatul

Bekatul merupakan hasil samping dari proses penggilingan padi yang terdiri dari lapisan bagian luar butir padi. Dalam proses penggilingan padi tersebut jumlah bekatul yang dihasilkan sekitar 8-10% dari total padi. Proses tersebut juga memiliki hasil samping berupa sekam sekitar 18-20% (Hadipernata *et al.*, 2012).



Gambar 2.1 Struktur Beras Putih

Menurut Departemen Pertanian (2020) rata-rata konsumsi beras nasional mencapai 111,58 kilogram per kapita per tahun. Pada periode ini angka produksi beras diperkirakan bertambah sebanyak 4,64 juta ton. Bekatul yang dihasilkan dari gabah kering giling di Indonesia sekitar 10%. Pada tahun 2020 produksi gabah Indonesia mencapai 46,9 juta ton. Jumlah tersebut sangat banyak jika tidak dimanfaatkan dan hanya dijadikan sebagai ampas. Bekatul sendiri memiliki manfaat bagi tubuh dikarenakan terdapat banyak nutrisi yang terkandung.



Zat gizi yang terkandung dalam bekatul antara lain:

Tabel 2.1 Kandungan zat gizi bekatul (Adli & Sjojfan, 2020)

No	Zat Gizi	Kadar
1	Karbohidrat	67,58-72,74%
2	Serat	7-10,1%
3	Protein	13,11-17,19%
4	Lemak	2,52-5,05%

Bekatul memiliki manfaat Kesehatan yang luas. Dalam industri makanan, bekatul berfungsi untuk meningkatkan kualitas nutrisi dalam proses pembuatan makanan. Dalam bekatul mengandung mineral yang meliputi besi, fosfor, magnesium dan protein kasar (Oliveira *et al.*, 2011). Selain itu, bekatul juga mengandung senyawa bioaktif dan merupakan sumber penting sebagai antioksidan seperti tokoferol, tokotrienol,  $\gamma$ -oryzanol, oktakosanol, squalene, pitosterol, asam  $\gamma$ -aminobutirat, karotenoid, dan senyawa fenolik (Zarei *et al.*, 2018). Tokol dan oryzanol merupakan antioksidan utama yang terkandung dalam bekatul dengan oryzanol memiliki aktivitas antioksidan 10 kali lebih tinggi daripada tokoferol (Abdel-Aal & Hucl, 1999). Senyawa antioksidan merupakan bagian penting dalam aktivitas antioksidan karena kapasitas mengumpulkan radikal bebas, mengganggu reaksi radikal berantai, dan membentuk ion logam.

Senyawa volatil merupakan zat kimia yang berperan penting dalam membentuk aroma dalam produk makanan. Beberapa peneliti mengungkapkan bahwa senyawa volatil juga terdapat pada bekatul. Peneliti menggunakan GC-MS untuk mengidentifikasi senyawa tersebut. Senyawa yang teridentifikasi dari bekatul berupa alkohol, alkana, keton, dan aldehid (Zeng *et al.*, 2012). Lee *et al.*, (2019)

menyatakan bahwa senyawa volatil pada bekatul yang difermentasi menggunakan bakteri asam laktat yang berbeda teridentifikasi berupa asam, aldehid, ester, turunan furan, keton, alkohol, benzena dan turunannya, hidrokarbon, dan terpen. Selain itu, pada penelitian Lee *et al.*, (2016) menggunakan bekatul terfermentasi oleh *Lactobacillus paracasei* menghasilkan beberapa senyawa volatil khususnya lakton, 2,3-butanedion, dan 3-hidroksi-2-butanon.

## 2.2 Fermentasi

Allah SWT telah menciptakan tumbuhan yang bermacam-macam warnanya, kemudian menjadi kering dan hancur atau berderai-derai seperti yang dijelaskan dalam surat Az-Zumar ayat 21 yang berbunyi:

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

Artinya: *Apakah kamu tidak memperhatikan, bahwa sesungguhnya Allah menurunkan air dari langit, maka diaturnya menjadi sumber-sumber air di bumi kemudian ditumbuhkan-Nya dengan air itu tanam-tanaman yang bermacam-macam warnanya, lalu menjadi kering lalu kamu melihatnya kekuning-kuningan, kemudian dijadikan-Nya hancur berderai-derai. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat pelajaran bagi orang-orang yang mempunyai akal. (QS. Az-Zumar:21)*

Hal tersebut menggambarkan proses fermentasi. Fermentasi sendiri merupakan suatu proses terjadinya perubahan (pemecahan) kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme.

Fermentasi mempunyai pengertian yaitu proses biokimia yang berlangsung dengan melibatkan mikroorganisme dengan tujuan untuk meningkatkan pencernaan bahan pakan. Mikroorganisme yang dipakai dalam fermentasi tergantung pada tujuan fermentasi yang dicapai (Munira *et al.*, 2016). Untuk dapat tumbuh dan berfungsi dengan normal, mikroorganisme memerlukan sumber energi, sumber

nitrogen, mineral, dan vitamin yang terdapat dalam bahan pangan. Mikroorganisme menyerap beberapa komponen-komponen dari bahan pangan tersebut (Rorong & Wiesje, 2020). Fermentasi juga dikenal sebagai pertumbuhan mikroorganisme tanpa disertai dengan oksigen (Eka & Halim, 2009).

Fermentasi merupakan proses kimiawi yang dimana menghasilkan komponen-komponen sebagai hasil pertumbuhan atau metabolisme mikroba. Mikroba yang sering digunakan dalam proses fermentasi adalah bakteri, khamir, dan kapang (Jannah, 2010). Teknologi fermentasi dapat meningkatkan nilai gizi terutama kadar protein dan menurunkan kadar serat melalui proses penyimpanan substrat, menanamkan mikroba, dan dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu dan waktu tertentu (Pasaribu, 2007). Hal yang terpenting dalam proses fermentasi yaitu bahan baku dan medium atau substrat. Fungsi dari substrat adalah sumber energi, bahan pembentuk sel, dan sebagai produk metabolisme. Semua nutrient pembentuk sel dan biosintesa produk harus disediakan oleh medium fermentasi (Seftian *et al.*, 2012). Faktor yang perlu diperhatikan dalam proses fermentasi yaitu:

1. Lama Fermentasi

Proses fermentasi perlu memperhatikan waktu sehingga hasil yang diperoleh bagus.

2. Inokulum

Efektivitas penghasil produk dipengaruhi oleh inokulum. Jika inokulum yang digunakan terlalu sedikit maka proses fermentasi berjalan lambat, sedangkan jika terlalu banyak akan mempengaruhi persaingan penambihan nutrisi, sehingga berpengaruh pada pertumbuhan mikroorganisme.

3. Substrat

Proses fermentasi memerlukan sumber energi sehingga mikroba yang digunakan dapat tumbuh dalam substrat dan mampu beradaptasi dengan lingkungan. Energi yang dibutuhkan oleh mikroorganisme berupa karbohidrat, protein, lemak, mineral dan zat gizi lainnya yang terdapat dalam substrat terutama glukosa.

#### 4. Suhu

Jenis mikroorganisme dominan yang tumbuh dipengaruhi oleh suhu. Pertumbuhan mikroorganisme umumnya memerlukan suhu 30°C. suhu tersebut juga bergantung pada jenis mikroba yang digunakan dalam fermentasi.

#### 5. Oksigen

Berhubungan dengan sifat mikroorganisme yang digunakan, ketersediaan oksigen perlu diatur dalam proses fermentasi.

#### 6. pH Substrat

pH optimum mayoritas bakteri berkisar 5,5 hingga 7,5. Di luar kisaran tersebut bakteri tidak dapat tumbuh dengan baik. Dalam fermentasi, kontrol pH sangat penting karena pH optimum harus dipertahankan selama fermentasi.

Dalam meningkatkan nilai gizi atau nutrisi suatu bahan, proses fermentasi dapat menggunakan mikroorganisme jenis jamur. Sukma *et al.*, (2018) menyatakan bahwa kandungan protein, lemak, dan abu dalam bekatul meningkat setelah mengalami fermentasi yaitu sebesar 58,5%, 124,5%, dan 18,6%. Sedangkan kandungan karbohidrat dan serat dalam bekatul mengalami penurunan sebesar 25,6% dan 51,2%. Menurut penelitian Faizah *et al.*, (2020) yang melakukan fermentasi bekatul menggunakan jamur *Rhizopus oryzae*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bekatul yang difermentasi dengan *Rhizopus oryzae* mengalami peningkatan aktivitas antioksidan, perubahan komposisi kimia, dan

peningkatan kadar total senyawa fenolik dan kadar  $\gamma$ -oryzanol. Sehingga diketahui jamur *Rhizopus oryzae* dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dan kadar total fenolik setelah dilakukan fermentasi.

### 2.3 Jamur *Rhizopus oryzae*

Jamur adalah salah satu jenis mikroorganisme yang sering digunakan dalam proses fermentasi. Terdapat banyak jenis jamur yang digunakan dalam proses fermentasi salah satunya yaitu jamur *Rhizopus oryzae*. Selain dapat digunakan dalam fermentasi, jamur *Rhizopus oryzae* dapat digunakan untuk produksi enzim, dan sintesis asam organik (Mertens *et al.*, 2006).

*Rhizopus oryzae* memiliki ciri-ciri koloni yang berwarna keputihan dan semakin bertambah usia berubah menjadi kecoklatan karena terdapat dinding halus yang menutupi miselia (Moensaku *et al.*, 2021). Menurut Germain & Summerbell, (1996), klasifikasi *Rhizopus oryzae* sebagai berikut:

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

Jamur *Rhizopus oryzae* dapat digunakan dalam pembuatan tempe. Hal tersebut karena jamur tersebut tidak menghasilkan toksin sehingga aman untuk dikonsumsi. Jamur *Rhizopus oryzae* mengandung enzim selulase yang berguna menghidrolisis serat selulosa menjadi rantai oligosakarida yang lebih sederhana, sehingga ikatan senyawa bioaktif akan mudah lepas. Selulosa merupakan polimer glukosa berbentuk rantai linier yang dihubungkan oleh ikatan  $\beta$ -1,4 glukosida.

Jamur akan mengkonsumsi glukosa sebagai sumber karbon dan sebagian terkandung dalam media tumbuh (Larasati *et al.*, 2015).

## 2.4 LC-MS

*Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LC-MS) merupakan salah satu teknik analisis dengan resolusi tinggi dan dapat digunakan dalam analisis kuantitatif maupun analisis struktural sehingga dapat memberikan pendekatan yang sangat berguna dalam menentukan profil suatu metabolit (Sumartini & Ikrawan, 2020). LC-MS merupakan instrumen berdasarkan pemisahan secara fisik menggunakan kromatografi cair (*Liquid chromatography*) yang menghasilkan ion dan pemisahan massa. *Mass analyzer* dan sumber ion merupakan dua komponen penting dalam LC-MS yang memiliki berbagai macam jenis yang disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang masing-masing memiliki kelebihan dan kekurangan (Agilent-Technologies, 2011).

Instrumen LC-MS sering digunakan oleh para peneliti bio-analisis karena memiliki kelebihan sebagai berikut (Vogeser & Seger, 2008):

1. Hasil analisa yang spesifik dan khas.
2. Preparasi sampel yang sederhana.
3. Tidak terbatas untuk molekul volatil dan mampu mengukur analit yang mempunyai sifat polar.
4. Waktu yang diperlukan untuk menganalisa relatif singkat.
5. Seleksi ion yang cepat dengan banyak parameter sehingga dapat memberikan data baik kualitatif maupun kuantitatif.

Teknik LC-MS telah berkembang sehingga dapat bekerja dalam pendekatan *soft ionization* yaitu mengionkan molekul kemudian dipilah berdasar rasio fragmentasi ( $m/z$ ). Teknik ionisasi ESI (*Electrospray Ionization*) sering digunakan dalam LC-MS karena dapat menganalisa senyawa organik yang bersifat kurang volatil. Teknik ESI dapat menghasilkan ionisasi dalam dua mode, yaitu mode positif dan negatif. Mode ion positif terjadi protonasi, yaitu penambahan proton, sehingga pada mode ini terdapat ion positif pada molekul yang dikenai ionisasi. Ionisasi ESI memiliki beberapa tahap (Rahayu *et al.*, 2017). Tahap pertama, analit dan eluen dipompa ke pipa kapiler bertegangan tinggi sehingga mengalami proses nebulasi dan memproduksi tetesan bermuatan. Tahap kedua, ukuran tetesan akan berkurang karena proses penguapan. Selain itu, muatan partikel akan semakin rapat dan tetesan akan terpecah menjadi lebih kecil. Tahap ketiga, analit akan dikirim ke penganalisa masa melalui lubang kapiler. Dalam LC-MS terdapat sistem Q-Tof (*Quadrupole time-of-flight*) yang dapat menganalisis ion induk dan produk secara akurat dan teliti. Sistem tersebut terdapat MS1 dan MS2 dimana Quadrupole berperan sebagai MS1 yang berfungsi menyeleksi ion berdasarkan kestabilan ion kemudian dianalisis  $m/z$  nya yang akan dikunci sebagai ion induk. Tof (*time-of-flight*) berperan sebagai MS2 yang mendeteksi fragmen berdasarkan waktu yang dibutuhkan untuk sampai detektor (Harahap *et al.*, 2019).

LC-MS memberikan daftar nilai  $m/z$ , waktu retensi, dan estimasi kelimpahan relatif metabolit yang sebenarnya tidak teridentifikasi. Metode LC-MS telah berhasil diterapkan dalam analisis metabolomik metabolit hidrofilik dalam sampel biologis (Lv *et al.*, 2011). Klasifikasi metabolit dari sampel yang berbeda dianalisa dengan metode PCA. Diagnosa LC-MS berbasis metabolomik memberikan

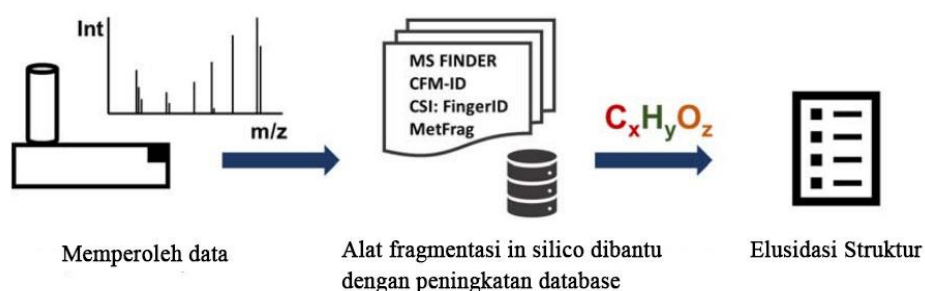
bantuan dan memiliki potensi untuk mengamati beberapa penyakit. LC-MS berbasis *nontargeted* metabolomik telah teruji dan diterapkan untuk mengidentifikasi dan memvalidasi biomarker metabolit. Metode LC-MS untuk mengamati beberapa reaksi metabolit polar dalam sample kompleks (Bajad & Shulaev, 2011).

## **2.5 Pendekatan *In Silico* Fragmentation**

Pendekatan *In Silico* merupakan metode analisis menggunakan teknik komputasi meliputi penggunaan database, pengolahan data, pemodelan, dan penambatan molekul (*molecular docking*) (Ekins *et al.*, 2007). Metode ini digunakan saat sampel yang digunakan tidak dapat dianalisis menggunakan pengamatan manusia seperti memprediksi beberapa metabolit yang terdapat pada sampel. Selain itu, hasil dari beberapa instrumen seperti LC-MS terkadang memiliki beberapa masalah seperti hasil yang memiliki kualitas rendah sehingga sulit untuk diidentifikasi menggunakan pengamatan. Sehingga muncullah metode analisis metabolomik. Metabolomik merupakan studi yang mempelajari metabolit kecil pada sistem biologis dengan menganalisa ribuan metabolit dalam sampel biologis sehingga memberikan gambaran status metabolik dan kejadian biokimia yang terjadi dalam organisme dan menjadi alat yang kuat dalam penelitian penyakit. Dalam metabolomik, biasanya berurusan dengan jumlah data yang besar yang dihasilkan oleh *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) atau *Mass Spectrometry* (MS) (Ren *et al.*, 2015)



Metabolomik adalah analisis komprehensif pada metabolit yang terkandung dalam makhluk hidup. Metabolomik menjelaskan tentang proses biokimia dan peran metabolit dalam metabolisme. Analisis metabolomik bergantung kepada teknologi seperti LC-MS yang mempunyai resolusi tinggi dan dapat mengukur jumlah metabolit yang besar (Theowidavitya *et al.*, 2019). Metabolomik berkaitan dengan analisis metabolit dengan molekul kecil endogen dan eksogen yang ditargetkan dan tidak ditargetkan. Analisis ini telah digunakan dalam menilai respon terhadap lingkungan, penemuan obat, toksikologi, dan penemuan produk alami (X. Wang *et al.*, 2011). Metabolomic merupakan analisa resolusi tinggi yang disertai dengan bantuan statistika kemometrik seperti *principal component analysis* (PCA) untuk memperoleh gambaran dari metabolisme edogen dan xenobiotic. Molekul kecil tersebut meliputi peptide, asam amino, asam nukleat, karbohidrat, asam organik, vitamin, polifenol, alkaloid dan senyawa anorganik yang berperan sebagai biomarker molekul kecil yang menunjukkan fenotip dalam sel, jaringan dan organisme (Arakaki *et al.*, 2008).



Gambar 2.2 *In silico* fragmentation dengan bantuan database

Pendekatan fragmentasi *in silico* untuk menjelaskan molekul *unknown* digunakan dalam kasus dimana tidak terdapat referensi spektra massa dalam pencocokan database. Umumnya melibatkan pencocokan spektra eksperimental terhadap pemilihan fragmen yang dihasilkan secara *in silico* yang dihitung

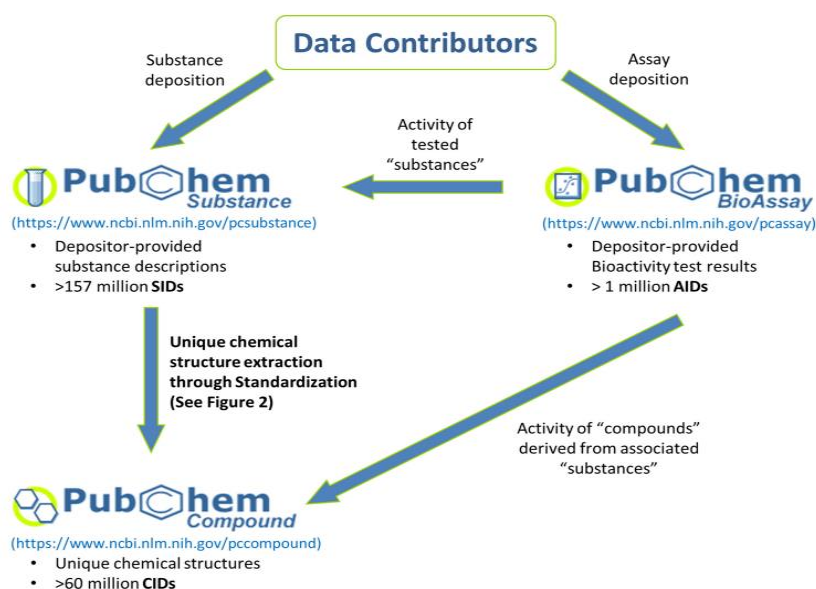
berdasarkan kandidat yang diambil dari database senyawa yang diketahui. Daripada mencari dalam database spektra massa yang terdapat hanya 1 juta senyawa, algoritma fragmentasi *in silico* memiliki akses ke database struktur molekul yang memiliki lebih banyak senyawa.

Pendekatan fragmentasi *in silico* bertujuan untuk mengidentifikasi “*known unknown*” yaitu seperti senyawa yang terdapat dalam database struktur molekul tetapi tanpa referensi spektra dengan menghitung antara spektra eksperimen dengan prediksi spektra atau fragmen (Blaženović *et al.*, 2018).

## 2.6 Database Bioinformatika

Pendekatan fragmentasi *in silico* menggunakan database dalam media internet sebagai referensi untuk menganalisa spektra. Database yang digunakan meliputi:

### 1. PubChem



Gambar 2.3 Penyusunan data dalam PubChem

PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) merupakan repositori/tempat penyimpanan umum untuk informasi zat kimia dan aktivitas biologinya. Sejak diluncurkan pada tahun 2004, PubChem telah berkembang menjadi kunci

pengetahuan yang membantu banyak komunitas peneliti ilmiah, termasuk *cheminformatic*, biokimia, kimia medis, dan penemuan obat. PubChem berisi salah satu dari database informasi kimia terbesar. PubChem terbagi menjadi tiga interlink database antara lain *Substance*, *Compound*, dan *BioAssay*.

Database Substance berisi informasi kimia yang disimpan oleh kontributor data individual ke PubChem, dan database Compound menyimpan struktur kimia unik yang diekstraksi dari database Substance. Data aktivitas biologis dari bahan-bahan kimia yang diuji dalam percobaan pengujian terkandung dalam database BioAssay (Kim *et al.*, 2016). Database ini digunakan sebagai referensi dalam analisa metabolomik.

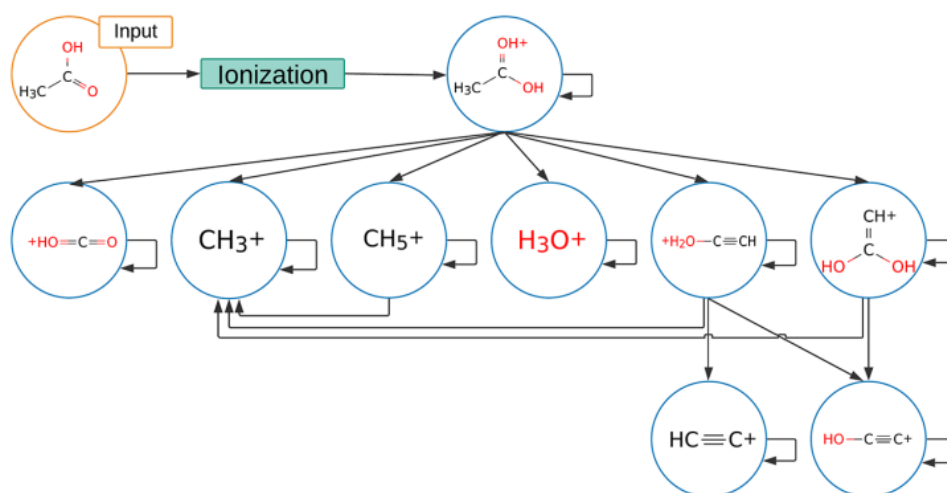
## 2. ChEBI

ChEBI (<https://www.ebi.ac.uk/chebi/>) merupakan sebuah database dan ontologi entitas kimia yang berisi data yang sangat banyak. Dalam database ini terdapat dua sub-ontologi yaitu *chemical entity ontology* dan *role ontology*. *Chemical entity ontology* terklasifikasi berdasarkan sifat strukturnya, sedangkan *role ontology* diklasifikasikan berdasarkan aktivitas biologis, sistem kimiawi, atau fungsi aplikasinya. Setiap catatan dalam database ini terdapat beberapa anotasi metadata termasuk gambaran struktur kimia, referensi dari database lain, sinonim dan nama alternatif dalam bahasa lain. ChEBI digunakan untuk banyak tujuan yang berbeda seperti sebagai sumber untuk mengidentifikasi bahan kimia dalam database bioinformatika. ChEBI juga digunakan sebagai dasar untuk pengolahan data karena berisi berbagai informasi tentang metabolit termasuk referensi spektra NMR dan MS (Hastings *et al.*, 2016).

## 2.7 Perangkat Lunak

### 1. CFM-ID

CFM-ID (*Competitive Fragmentation Modeling*) merupakan software yang digunakan dalam memprediksi spektra EI-MS maupun ESI-MS/MS dari sebuah senyawa. CFM-ID menggunakan pendekatan dimana spektra MS2 eksperimental dicari dan dinilai terhadap spektra terprediksi berdasarkan kemiripan. Algoritma CFM-ID dicoba dalam data eksperimen dan digunakan untuk menemukan aturan fragmentasi dan model prediksi dari spektra MS2. Spektra terprediksi lebih kompleks dari pada basisnya pada aturan fragmentasi yang spesifik, sementara menghindari ledakan kemungkinan fragmentasi dari metode kombinasi. Selanjutnya, CFM-ID memprediksi puncak intensitas yang dapat digabungkan dalam pencarian dan pencocokan spektra (Chao *et al.*, 2020).



Gambar 2.4 Grafik fragmentasi asam asetat

Metode CFM-ID menggunakan proses fragmentasi molekul dalam spektrometer massa. Pertama, CFM-ID menghasilkan semua kombinasi fragmen teoritis yang terstruktur dalam grafik fragmentasi (Gambar 2.4). Tiap titik dalam grafik fragmentasi menunjukkan ion fragmen teoritis dan setiap arah meningkatkan posibilitas salah satu fragmen ion secara langsung memproduksi fragmen lain

melalui satu kejadian fragmentasi. Kemudian CFM-ID memperkirakan kemungkinan tiap transisi menggunakan parameter yang diketahui dari kumpulan data molekul dan spektra MS nya. Terakhir, CFM-ID membangun spektra MS yang sesuai untuk molekul *input* dari grafik fragmentasi dan perhitungan yang terkait (F. Wang *et al.*, 2021).

Chao *et al.*, (2020) melakukan penelitian menganalisa senyawa yang tidak diketahui dengan pendekatan *in silico* menggunakan CFM-ID. Prediksi senyawa menggunakan CFM-ID menampilkan 77 senyawa yang teridentifikasi.

## 2. Fiji

Fiji merupakan versi terbaru dari software ImageJ yang digunakan dalam analisis gambar biologis. Fiji memperkenalkan software yang bagus dan cepat dari algoritma baru sebagai alat analisa gambar. Software ini memberikan fungsi yang luas untuk para peneliti mulai dari ahli biologi pemrograman-agnostik hingga ahli bioinformatika dan *software engineer* hingga peneliti sains komputer profesional. Fiji mempunyai fitur yang hamper sama dengan ImageJ dengan beberapa peningkatan. Fitur utama dari software ini yaitu perhitungan, pengukuran jarak dan luas dari suatu partikel dalam gambar, mengatur skala, membuat histogram, dan menentukan titik koordinat dari grafik (Schindelin *et al.*, 2012).

### 2.8 Metode *Principal Component Analysis* (PCA)

*Principal Component Analysis* (PCA) merupakan metode yang sering digunakan untuk eksplorasi dan analisis data dalam sains. Metode PCA mereduksi dimensi dan tentunya sangat berguna ketika terdapat data dengan banyak variabel dan berkolerasi tinggi (Kherif & Latypova, 2019). PCA adalah salah satu jenis metode interpretasi data dalam kemometri. Kemometri digunakan dalam ilmu

statistika dan matematika sebagai pengolah data. PCA bertujuan untuk menyederhanakan dimensi dari data yang besar menjadi dimensi yang lebih kecil sehingga deskripsi data lebih sederhana (Pratiwi & Harjoko, 2013).

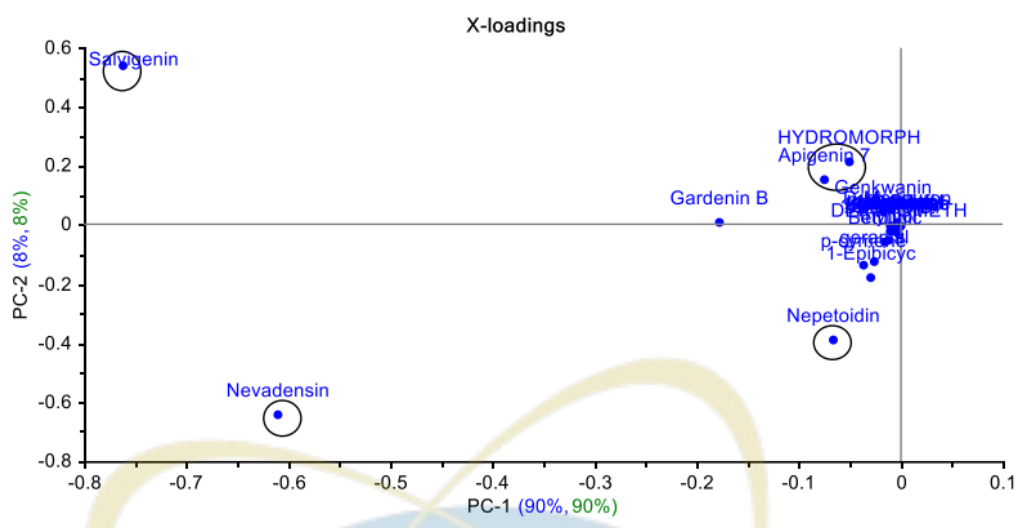
PCA merupakan sebuah metode untuk mengidentifikasi pola-pola data dan kemudian data tersebut ditampilkan dalam bentuk lain sehingga muncul persamaan dan perbedaan diantara pola-pola tersebut. Komponen utama (PC) diperoleh dengan penataan ulang data asli menjadi *eigenvector* dan *eigenvalue*. *Eigenvector* disesuaikan dengan arah varian data terbesar. *Eigenvector* dapat ditunjukkan sebagai V1 dan V2. Tiap *eigenvector* memiliki *eigenvalue* yang sesuai. Sebuah *eigenvalue* merupakan nilai yang menunjukkan jumlah varian data bersama *eigenvector* yang sesuai. Maka dari itu, *eigenvector* dengan *eigenvalue* terbesar akan menjadi komponen utama yang pertama. Setelah diperkirakan, komponen utama (PC) digunakan untuk membuat ruang koordinat baru dimana data dapat di tampilkan. Sehingga pemodelan dapat ditampilkan sebagai berikut:

$$Y = \lambda_1(U(:,1)) \times V(1,:) + \lambda_2(U(:,2)) \times V(2,:) + \dots + \lambda_p(U(:,p)) \times V(p,:) \dots (2.1)$$

Secara menyeluruh kegunaan PCA untuk klasifikasi sampel menjadi grup, mendeteksi *outliers*, pemodelan data, dan menyeleksi variabel untuk klasifikasi atau pemodelan. PCA memudahkan visualisasi pengelompokkan data, evaluasi awal kesamaan dan menemukan pola melalui korelasi. Komponen utama (PC) semakin besar jika nilai koefisien memiliki kontribusi yang besar terhadap variabel data yang baru.

PCA dapat digunakan dengan data dari hasil identifikasi kelompok senyawa. Metode ini cocok diterapkan dalam data multivariant yang diperoleh dari data FTIR, GC, HPLC, atau data spektroskopi yang melibatkan interval panjang

gelombang yang luas. Metode PCA sudah digunakan dalam banyak penelitian. Utomo, (2021) melakukan penelitian untuk mengidentifikasi senyawa dari tanaman kemangi dengan pendekatan PCA. Hasil penelitian menunjukkan terjadi



Gambar 2.5 Hasil Plot Senyawa Tanaman Kemangi

pengelompokan berdasarkan pada kemiripan nilai *Area (Max)*.

Pada Gambar (2.5) diketahui bahwa senyawa metabolit sekunder dari tanaman kemangi mengelompok pada titik tertentu. Penempatan tersebut berdasarkan besarnya area max. Semakin jauh jarak letak sampel dengan sampel yang lain, maka semakin sedikit kesamaan yang dimilikinya. Sebaliknya, semakin dekat jarak letak antar sampel, maka semakin banyak kesamaan yang dimiliki (J. N. Miller & Miller, 2010). Pada penelitian ini pengelompokan didasarkan pada kemiripan pola fragmentasi dan data diambil dari intensitas dan m/z senyawa dalam bekatul terfermentasi.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Pelaksanaan Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April-Juni 2023 di Laboratorium Kimia Komputasi Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah perangkat keras berupa Laptop dengan spesifikasi Prosesor Intel® Core™ i7-7700HQ CPU @2.80GHz, RAM 8.00 GB, 64-bit operating system, dan kartu grafis NVIDIA GeForce GTX 1050. Perangkat lunak yang digunakan diantaranya CFM-ID, Fiji ImageJ dan Orange.

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak bekatul yang telah terfermentasi oleh *Rhizopus oryzae* dari laporan penelitian oleh Jannah, A. dan Baroroh, H., (2019) dengan judul Potensi Ekstrak Bekatul Terfermentasi *Rizhopus oryzae* Sebagai Imunomodulator Mencit Terinfeksi *Salmonella typhi*.



### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif kualitatif eksploratif meliputi identifikasi dan menginterpretasikan hasil data sehingga dapat memberikan definisi atau penjelasan tentang konsep atau pola yang digunakan dalam penelitian. Tahapan dilakukan dengan menganalisis ekstrak bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae* menggunakan instrument LC-MS/MS sehingga mendapatkan hasil berupa 8 spektra. hasil LC-MS dari bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae* yang berupa gambar akan diolah menggunakan software Fiji ImageJ sehingga menghasilkan nilai koordinat X sebagai m/z dan Y sebagai intensitas. Data spektra dari beberapa senyawa yang teridentifikasi terdapat pada bekatul juga diperlukan sehingga dilakukan riset terhadap data spektra tersebut. Hasil riset akan diprediksi bentuk spektra menggunakan CFM-ID sehingga dapat diketahui nilai m/z dan intensitas yang digunakan untuk pengelompokan pada analisa PCA. Metode PCA akan mengelompokkan beberapa m/z dan intensitas dari data LC-MS senyawa-senyawa dari bekatul yang sudah dicari di database PubChem dan ChEBI serta data m/z dan intensitas dari sampel sehingga dapat diketahui ke arah mana sampel mengelompok.

### 3.4 Cara Kerja

#### 3.4.1 Identifikasi dengan LC-MS

Ekstrak bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae* dianalisis menggunakan LC-MS/MS. Instrumen LC-MS/MS yang digunakan yaitu merk Waters Xevo TQD. Kondisi alat yang digunakan adalah sebagai berikut: pelarut sampel berupa metanol, range massa 50-1200, kapiler 3,5 kV, cone 30V, suhu desolvasi 500°C, desolvasi 800 L/H, dan mode ion positif. Kolom sebagai fase diam memiliki

spesifikasi C<sub>18</sub> (1,7µm 2,1x100mm). Asam format dalam air sebanyak 0,1% digunakan sebagai fase gerak A dan asam format dalam metanol sebanyak 0,1% digunakan sebagai fase gerak B. Laju alir eluen diatur dengan kecepatan 0,4 mL/menit selama 30 menit. Sampel dilarutkan dengan metanol, kemudian disaring dengan millex 0,22 µm. Banyak volume yang diinjeksikan sebesar 2 µL.

### 3.4.2 Pengolahan Gambar Hasil LC-MS dengan software Fiji ImageJ

Gambar hasil LC-MS bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae* kemudian diolah dengan software Fiji ImageJ. Hasil LC-MS dengan format pdf dikonversi menggunakan Adobe Photoshop. Hasil LC-MS dibuka dengan Adobe Photoshop dengan menekan “File”, “Open”, dan dipilih Hasil LC-MS format pdf. Pada bagian “Resolution” diubah menjadi “2000 Pixels/Inch”. Gambar disimpan dengan menekan “File”, “Save As..”, pada bagian Format dipilih PNG. Gambar yang akan diolah dapat dibuka dengan menekan “File”, “Open”, dan dipilih gambar yang diinginkan. Gambar hasil LC-MS diseleksi dengan memilih ikon “*Rectangle Tool*” kemudian dipilih pada area diantara garis X dan Y. Pada area tersebut dibuat duplikat dengan memilih menu “Image”, “Duplicate” sehingga akan muncul jendela baru yang menampilkan duplikat dari gambar pada area yang dipilih. Koordinat titik X dan Y pada gambar disesuaikan dengan menekan “Image”, “Adjust”, “Coordinates..” dan pada bagian “Left” diisi 50, “Right” diisi 495, “Bottom” diisi 0, dan “Top” diisi 100. Gambar hasil LC-MS dicari titik koordinatnya dengan alat “Multi-point Tool” dan dititikan pada tiap puncak spektra sehingga dapat diketahui posisi titik X dan Y dengan titik X sebagai *m/z* dan titik Y sebagai intensitas puncak. Titik koordinat ditampilkan dalam bentuk data dengan memilih “Analyze”, “Measure”, pada jendela baru dipilih “Edit”, “Select All”, dan

“Copy”. Data koordinat dipindah ke excel dengan dibuka Microsoft Excel dan dipilih “Paste” pada bagian “Home”.

### 3.4.3 Prediksi Spektra Hasil Riset Database

Analisa hasil LC-MS menggunakan PCA membutuhkan data lain yang dapat mendukung identifikasi kelompok senyawa sampel seperti data senyawa yang terdapat pada bekatul. Riset dilakukan dengan mencari beberapa sumber jurnal yang menyebutkan daftar senyawa dalam bekatul. Daftar senyawa bekatul dicatat dan dilakukan pencarian untuk kode InChI. Kode InChI digunakan untuk prediksi spektra yang dilakukan pada website CFM-ID. Dibuka website CFM-ID kemudian dipilih *Spectra Prediction*. Kode InChI ditempel dibagian *Parent Compound Structure*. *Spectra Type* diisi ESI, *Ion Mode* diisi Positive, dan *Adduct Type* diisi [M+H]<sup>+</sup>. Setelah selesai mengatur parameter diklik Submit. Pada jendela baru muncul beberapa spektra dari 10V, 20V, dan 40V. Spektra pada 40V disalin m/z dan intensitas kemudian ditempel pada *Microsoft Excel*.

### 3.4.4 Analisa PCA (*Principal Component Analysis*)

Data nilai dari Fiji ImageJ yang dimasukkan dalam *Microsoft Excel*, selanjutnya dianalisis menggunakan metode PCA (*Principal Component Analysis*). Caranya dengan bantuan software Orange, tahap awal di buka software Orange kemudian tarik widget “File” kemudian klik 2 kali untuk membuka dan pilih file yang akan digunakan, tarik garis dari widget “File”. Selanjutnya tahap preprocessing dengan cara pilih “Add preprocessor”, “Normalize spectra”, “Min-Max Normalization”, “Final preview” dan “Commit Automatically” sehingga akan ditampilkan perbedaan spektra pada original data dan preprocessed data. Tarik garis dari widget “Spectra” dan klik 2 kali untuk melihat spektra hasil preprocessed data,

selanjutnya tarik garis dari widget “Spectra” dan pilih “PCA” untuk disetting mengenai “Components” yang digunakan dalam pembentukan data baru. Tahap berikutnya tarik garis dari “PCA” untuk pilih “Score Plot” dan “Linier Projection” klik 2 kali untuk melihat interpretasi gambar dari data baru.

**DIKOSONGKAN**

## BAB V

### KESIMPULAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian menggunakan metode PCA yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa 9 spektra pada hasil kromatogram ekstrak bekatul terfermentasi *Rhizopus oryzae* menunjukkan pengelompokan ke arah kelompok senyawa fenolik. Berdasarkan score plot PCA, sampel 1 berdekatan dengan (*E*)-*coniferaldehyde* dan *2-hydroxy-2-phenylpropanoic acid*, sampel 2 berdekatan dengan *p-hydroxybenzoic acid*, sampel 3 dan 8 berdekatan dengan *gentisic acid*, sampel 4 berdekatan dengan *gallic acid* dan *vanillin*, sampel 5 dan 6 berdekatan dengan *thymol*. Sampel 9 memiliki jarak yang paling dekat dengan *myricetin*. Berdasarkan perbandingan spektra sampel 1-8 yang memiliki jarak plot PCA yang dekat dengan sampel hasil riset diduga merupakan senyawa dengan jenis fenolik yang memiliki 2 cincin benzene dan sampel 9 diduga flavonoid dengan struktur 2-((3-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)-4-oxo-6-propyl-4H-chromen-7-yl)oxy)acetic acid . Dugaan sampel 1,2,7,8, dan 9 bersifat non-volatil dan sampel 3,4,5, dan 6 bersifat volatil.

#### 5.2 Saran

Analisa Spektra menggunakan PCA diperlukan nilai  $m/z$  dan intensitas dari sumber spektra yang dianalisa dengan parameter yang sama seperti *collision energy* dan instrument yang sama karena dapat menghasilkan pola tertentu sehingga menghasilkan data yang mudah untuk dianalisa. Dimensi PCA perlu ditambah sehingga nilai PC kumulatif meningkat sesuai jumlah dimensinya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Aal, E. S. M., & Hucl, P. (1999). A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry*, 76(3), 350–354. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1999.76.3.350>
- Adli, D. N., & Sjoefjan, O. (2020). Estimasi dan Validasi Kandungan Energi Bekatul Sebagai Pakan Unggas dari Komposisi Kimia Pakan. *Jurnal Nutrisi Ternak Tropis*, 3(2), 90–96. <https://doi.org/10.21776/ub.jnt.2020.003.02.6>
- Agilent-Technologies. (2011). *Basics of LC/MS*. Hewlett-Packard Company.
- Amadioha, A. C. (1998). Effect of infection by *Rhizopus oryzae* on biochemical composition of stored potato tubers. *Plant Foods for Human Nutrition*, 53(2), 145–151. <https://doi.org/10.1023/A:1008057403396>
- Arakaki, A. K., Skolnick, J., & McDonald, J. F. (2008). Marker Metabolites Can be Therapeutic Targets as Well. *Nature*, 456(7221), 443. <https://doi.org/10.1038/456443a>
- Ardiansyah, Ariffa, F., Astuti, R. M., David, W., Handoko, D. D., Budijanto, S., & Shirakawa, H. (2021). Non-volatile compounds and blood pressure-lowering activity of Inpari 30 and Cempo Ireng fermented and non-fermented rice bran. *AIMS Agriculture and Food*, 6(1), 337–359. <https://doi.org/10.3934/agrfood.2021021>
- Aruben, N. W. (2010). *Peningkatan Konsentrasi Senyawa Fenolik Antioksidan Dari Dedak Dengan Cara Fermentasi*. Universitas Diponegoro.
- Bajad, S., & Shulaev, V. (2011). LC-MS-Based Metabolomics. *Metabolic Profiling*, 708, 213–228. [https://doi.org/10.1007/978-1-61737-985-7\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-61737-985-7_13)
- Bhat, F. M., & Riar, C. S. (2017). Extraction, identification and assessment of antioxidative compounds of bran extracts of traditional rice cultivars: An analytical approach. *Food Chemistry*, 237, 264–274. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.113>
- Blaženović, I., Kind, T., Ji, J., & Fiehn, O. (2018). Software Tools and Approaches for Compound Identification of LC-MS/MS Data in Metabolomics. *Metabolites*, 8(2), 31. <https://doi.org/10.3390/metabo8020031>
- Böcker, S. (2017). Searching Molecular Structure Databases Using Tandem MS Data: Are We There yet? *Current Opinion in Chemical Biology*, 36, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.12.010>
- Bolarinwa, I. F., Hanis-Syazwani, M. G., & Muhammad, K. (2019). Optimisation of important processing conditions for rice bran sourdough fermentation using *Lactobacillus plantarum*. *Foods and Raw Materials*, 7(1), 131–142. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2019-1-131-142>
- Bro, R., & Smilde, A. K. (2014). Principal component analysis. *Analytical Methods*, 6(9), 2812–2831. <https://doi.org/10.1039/c3ay41907j>

- Chao, A., Al-Ghoul, H., McEachran, A. D., Balabin, I., Transue, T., Cathey, T., Grossman, J. N., Singh, R. R., Ulrich, E. M., Williams, A. J., & Sobus, J. R. (2020). In Silico MS/MS Spectra for Identifying Unknowns: A Critical Examination Using CFM-ID Algorithms and ENTACT Mixture Samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(6), 1303–1315. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02351-7>
- Eka, A., & Halim, A. (2009). Pembuatan Bioethanol Dari Nira Siwalan Secara Fermentasi Fese Cair Menggunakan Fermipan. *Universitas Diponegoro*, 024, 1–5.
- Ekins, S., Mestres, J., & Testa, B. (2007). In Silico Pharmacology for Drug Discovery: Methods for Virtual Ligand Screening and Profiling. *British Journal of Pharmacology*, 152(1), 9–20. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707305>
- Faizah, F., Kusnandar, F., & Nurjanah, S. (2020). SENYAWA FENOLIK, ORYZANOL, DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BEKATUL YANG DIFERMENTASI DENGAN *Rhizopus oryzae*. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan*, 31(1), 86–94. <https://doi.org/10.6066/jtip.2020.31.1.86>
- Germain, G. S., & Summerbell, R. (1996). *Identifying Filamentous Fungi: A Clinical Laboratory Handbook*. Star Publisher.
- Ghasemzadeh, A., Karbalaii, M. T., Jaafar, H. Z. E., & Rahmat, A. (2018). Phytochemical constituents, antioxidant activity, and antiproliferative properties of black, red, and brown rice bran. *Chemistry Central Journal*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0382-9>
- Hadipernata, M., Supartono, W., & A.F. Falah, M. (2012). Proses Stabilisasi Dedak Padi (*Oryza sativa* L) Menggunakan Radiasi Far Infra RED (FIR) Sebagai Bahan Baku Minyak Pangan. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, Vol.1 No.(4), 103–107.
- Harahap, Y., Harmita, A. A. K., & Supandi. (2019). *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)* (7th ed.). PT. ISFI Penerbitan.
- Hastings, J., Owen, G., Dekker, A., Ennis, M., Kale, N., Muthukrishnan, V., Turner, S., Swainston, N., Mendes, P., & Steinbeck, C. (2016). ChEBI in 2016: Improved Services and An Expanding Collection of Metabolites. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1214–D1219. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1031>
- Ho, C., Lam, C., Chan, M., Cheung, R., Law, L., Lit, L., Ng, K., Suen, M., & Tai, H. (2003). Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin Biochem Rev*, 24(February), 3–12.
- Huang, S., & Huang, G. (2021). Extraction, structural analysis, and activities of rice bran polysaccharide. *Chemical Biology and Drug Design*, 98(4), 631–638. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13916>
- Jamun, Y. M. (2018). *Dampak Teknologi Terhadap Pendidikan*. 10, 48–52.
- Jannah, A. M. (2010). Proses Fermentasi Hidrolisat Jerami Padi. *Jurnal Teknik*



*Kimia*, 17(1), 44–52.

- Jolliffe, I. T., & Cadima, J. (2016). Principal component analysis: A review and recent developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374(2065). <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>
- Kherif, F., & Latypova, A. (2019). Principal Component Analysis. *Machine Learning: Methods and Applications to Brain Disorders*, 1(C), 209–225. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815739-8.00012-2>
- Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., He, J., He, S., Shoemaker, B. A., Wang, J., Yu, B., Zhang, J., & Bryant, S. H. (2016). PubChem Substance and Compound Databases. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1202–D1213. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv951>
- Kurniati, Y., Budijanto, S., Nuraida, L., Nur, F., & Dewi, A. (2017). Peningkatan Senyawa Fenolik Bekatul dengan SSF (Solid State Fermentation) sebagai Pencegah Kanker Enhancement of Phenolic Compounds of Rice Bran with SSF (Solid State Fermentation) for Preventing Cancer. *Iptek Tanaman Pangan*, 12(2), 97–104. <http://ejurnal.litbang.pertanian.go.id/index.php/ippan/article/view/8175>
- Larasati, Mulyana, N., Angggriawan, M., & Effendi, Y. (2015). Produksi Enzim Selulase Oleh Fungi Selulolitik Yang Diradiasi Sinar Gamma Dalam Fermentasi Jerami Padi. *Jurnal Sains Materi Indonesia*, 16(3), 139–147.
- Lee, S. M., Hwang, Y. R., Kim, M. S., Chung, M. S., & Kim, Y. S. (2019). Comparison of Volatile and Non-Volatile Compounds in Rice Fermented by Different Lactic Acid Bacteria. *Molecules*, 24(6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules24061183>
- Lee, S. M., Oh, J., Hurh, B. S., Jeong, G. H., Shin, Y. K., & Kim, Y. S. (2016). Volatile Compounds Produced by *Lactobacillus paracasei* During Oat Fermentation. *Journal of Food Science*, 81(12), C2915–C2922. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13547>
- Lin, Z. J., Li, W., & Dai, G. (2007). Application of LC-MS for Quantitative Analysis and Metabolite Identification of Therapeutic Oligonucleotides. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44(2), 330–341. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.01.042>
- Lv, H., Palacios, G., Hartil, K., & Kurland, I. J. (2011). Advantages of Tandem LC-MS for The Rapid Assessment of Tissue-specific Metabolic Complexity Using A Pentafluorophenylpropyl Stationary Phase. *Journal of Proteome Research*, 10(4), 2104–2112. <https://doi.org/10.1021/pr1011119>
- Mangurana, W. O. I., Yusnaini, Y., & Sahidin, S. (2019). Analisis LC-MS/MS (Liquid Chromatography Mass Spectrometry) dan Metabolit Sekunder serta Potensi Antibakteri Ekstrak n-Heksana Spons *Callyspongia aerizusa* yang Diambil Pada Kondisi Tutupan Terumbu Karang yang Berbeda di Perairan Teluk Staring. *Jurnal Biologi Tropis*, 19(2), 131–141.

<https://doi.org/10.29303/jbt.v19i2.1126>

- Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. A. (2011). Bioactive Phenolic Compounds: Production and Extraction by Solid-State Fermentation. A Review. *Biotechnology Advances*, 29(3), 365–373. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.008>
- Mertens, J. A., Skory, C. D., & Ibrahim, A. S. (2006). Plasmids for expression of heterologous proteins in *Rhizopus oryzae*. *Archives of Microbiology*, 186(1), 41–50. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0121-9>
- Miller, A., & Engel, K. H. (2006). Content of  $\gamma$ -oryzanol and composition of steryl ferulates in brown rice (*Oryza sativa* L.) of European origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 8127–8133. <https://doi.org/10.1021/jf061688n>
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2010). Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. In *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London* (6th ed., Vol. 14, Issue 6). Ellis Horwood. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.14-6-677>
- Mittal, A., Kadyan, P., Gahlaut, A., & Dabur, R. (2013). Nontargeted Identification of the Phenolic and Other Compounds of *Saraca asoca* by High Performance Liquid Chromatography-Positive Electrospray Ionization and Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *ISRN Pharmaceutics*, 2013, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/293935>
- Moensaku, E., Sine, Y., & Pardosi, L. (2021). Isolasi dan Identifikasi Kapang *Rhizopus* pada Tempe Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.). *Jurnal Pendidikan Biologi Undiksha*, 8(2), 61–69.
- Munira, S., Nafiu, L. O., & Tasse, A. M. (2016). Performans Ayam Kampung Super pada Pakan yang Disubstitusi Dedak Padi Fermentasi dengan Fermentor Berbeda. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Peternakan Tropis*, 3(2), 21–29. <https://doi.org/10.33772/jitro.v3i2.1683>
- Oliveira, M. dos S., Feddern, V., Kupski, L., Cipolatti, E. P., Badiale-Furlong, E., & De Souza-Soares, L. A. (2011). Changes in Lipid, Fatty Acids and Phospholipids Composition of Whole Rice Bran after Solid-State Fungal Fermentation. *Bioresource Technology*, 102(17), 8335–8338. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.025>
- Pasaribu, T. (2007). Produk Fermentasi Limbah Pertanian Sebagai Bahan Pakan Unggas di Indonesia. *Wartazoa*, 17(3), 109–116.
- Patti, G. J., Yanes, O., & Siuzdak, G. (2012). Innovation: Metabolomics: The Apogee of the Omics Trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(4), 263–269. <https://doi.org/10.1038/nrm3314>
- Pourali, O., Asghari, F. S., & Yoshida, H. (2010). Production of phenolic compounds from rice bran biomass under subcritical water conditions. *Chemical Engineering Journal*, 160(1), 259–266.

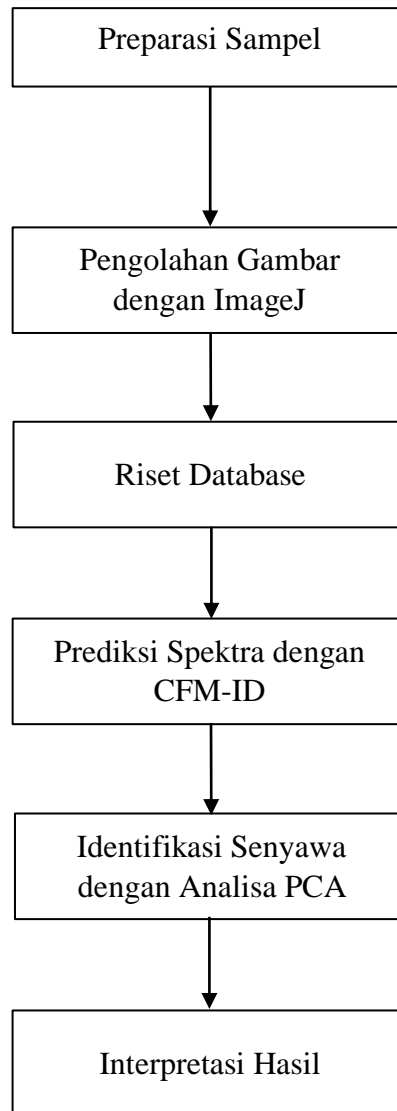
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.02.057>

- Pratiwi, D. E., & Harjoko, A. (2013). Implementasi Pengenalan Wajah Menggunakan PCA (Principal Component Analysis). *Ijeis*, 3(2), 175–184. <https://doi.org/10.22146/ijeis.3892>
- Prianto, B. (2007). Pemodelan Kimia Komputasi. *Berita Dirgantara*, 8(1), 4. [http://jurnal.lapan.go.id/index.php/berita\\_dirgantara/article/view/711](http://jurnal.lapan.go.id/index.php/berita_dirgantara/article/view/711)
- Rahayu, R. S., Suprihatin, I. E., & Rita, W. S. (2017). *PRODUK RNA MERAH K3 ( CI 15585 ) DALAM P KOSMETIK SEDIAA MS / MS AAN PERONA MATA SECARA LC- M. 5(Ci 15585)*.
- Razak, D. L. A., Rashid, N. Y. A., Jamaluddin, A., Sharifudin, S. A., Kahar, A. A., & Long, K. (2017). Cosmeceutical Potentials and Bioactive Compounds of Rice Bran Fermented with Single and Mix Culture of *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae*. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16(2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.04.001>
- Ren, S., Hinzman, A. A., Kang, E. L., Szczesniak, R. D., & Lu, L. J. (2015). Computational and Statistical Analysis of Metabolomics Data. *Metabolomics*, 11(6), 1492–1513. <https://doi.org/10.1007/s11306-015-0823-6>
- Rorong, J. A., & Wiesje, F. W. (2020). Keracunan Makanan Oleh Mikroba. *Techno Science Journal*, 2(2), 47–60.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmidt, C. G., Gonçalves, L. M., Prietto, L., Hackbart, H. S., & Furlong, E. B. (2014). Antioxidant Activity and Enzyme Inhibition of Phenolic Acids from Fermented Rice Bran with Fungus *Rhizopus oryzae*. *Food Chemistry*, 146, 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.101>
- Seftian, D., Antonius, F., & Faizal, M. (2012). Pembuatan Etanol dari Kulit Pisang Menggunakan Metode Hidrolisis Enzimatik dan Fermentasi. *Jurnal Teknik Kimia*, 18(1), 10–16.
- Sharif, M. K., Butt, M. S., Anjum, F. M., & Khan, S. H. (2014). Rice Bran: A Novel Functional Ingredient. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(6), 807–816. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.608586>
- Stein, S. (2012). Mass Spectral Reference Libraries: An Ever-Expanding Resource for Chemical Identification. *Analytical Chemistry*, 84(17), 7274–7282. <https://doi.org/10.1021/ac301205z>
- Sukma, A., Jos, B., & Sumardiono, S. (2018). Kinetic of Biomass Growth and Protein Formation on Rice Bran Fermentation Using *Rhizopus oryzae*. *MATEC Web of Conferences*, 156, 1–6. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201815601023>

- Sumartini, & Ikrawan, Y. (2020). Analisis Bunga Telang (*Clitoria ternatea*) Dengan Variasi pH Metode Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *Pasundan Food Technology Journal*, 7(2), 70–77. <https://doi.org/10.23969/pftj.v7i2.2983>
- Theowidavitya, B., Muttaqin, M., Miftahudin, & Tjahjoleksono, A. (2019). Analisis Metabolomik pada Interaksi Padi dan Bakteri. *Jurnal Sumberdaya Hayati*, 5(1), 18–24. <https://doi.org/10.29244/jsdh.5.1.18-24>
- Utomo, N. P. (2021). *Identifikasi Senyawa Antioksidan dari Tanaman Daerah Bogor dan Pandeglang dengan Pendekatan Metabolomik*. Universitas Islam Syarif Hidayatullah.
- Vogeser, M., & Seger, C. (2008). A Decade of HPLC – MS/MS in the Routine Clinical Laboratory — Goals for Further Developments. *Clinical Biochemistry*, 41(9), 649–662. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.02.017>
- Wang, F., Liigand, J., Tian, S., Arndt, D., Greiner, R., & Wishart, D. S. (2021). CFM-ID 4.0: More Accurate ESI-MS/MS Spectral Prediction and Compound Identification. *Analytical Chemistry*, 93(34), 11692–11700. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c01465>
- Wang, X., Sun, H., Zhang, A., Sun, W., Wang, P., & Wang, Z. (2011). Potential Role of Metabolomics Approaches in the Area of Traditional Chinese Medicine: As Pillars of the Bridge between Chinese and Western Medicine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55(5), 859–868. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.01.042>
- Zarei, I., Luna, E., Leach, J. E., McClung, A., Vilchez, S., Koita, O., & Ryan, E. P. (2018). Comparative Rice Bran Metabolomics Across Diverse Cultivars and Functional Rice Gene–Bran Metabolite Relationships. *Metabolites*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/metabo8040063>
- Zeng, M., Zhang, L., He, Z., Qin, F., Tang, X., Huang, X., Qu, H., & Chen, J. (2012). Determination of Flavor Components of Rice Bran by GC-MS and Chemometrics. *Analytical Methods*, 4(2), 539–545. <https://doi.org/10.1039/c2ay05671b>
- Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y., & Wang, X. (2012). Modern Analytical Techniques in Metabolomics Analysis. *Analyst*, 137(2), 293–300. <https://doi.org/10.1039/c1an15605e>

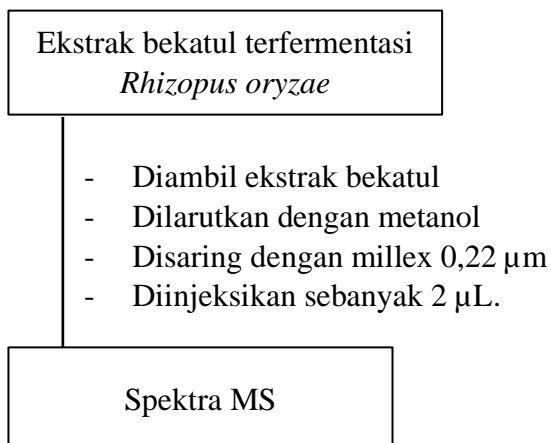
## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Rancangan Penelitian

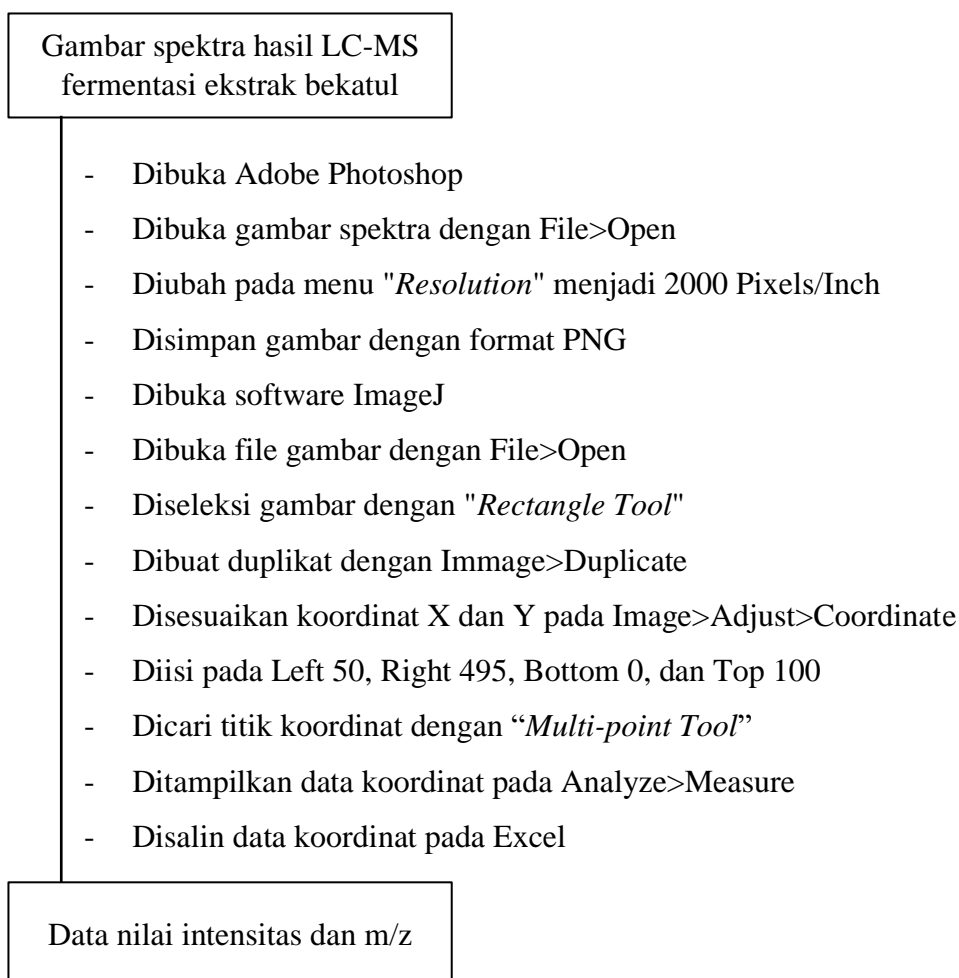


## Lampiran 2. Diagram Alir

### 1. Preparasi Sampel



### 2. Pengolahan Gambar Hasil LC-MS dengan ImageJ



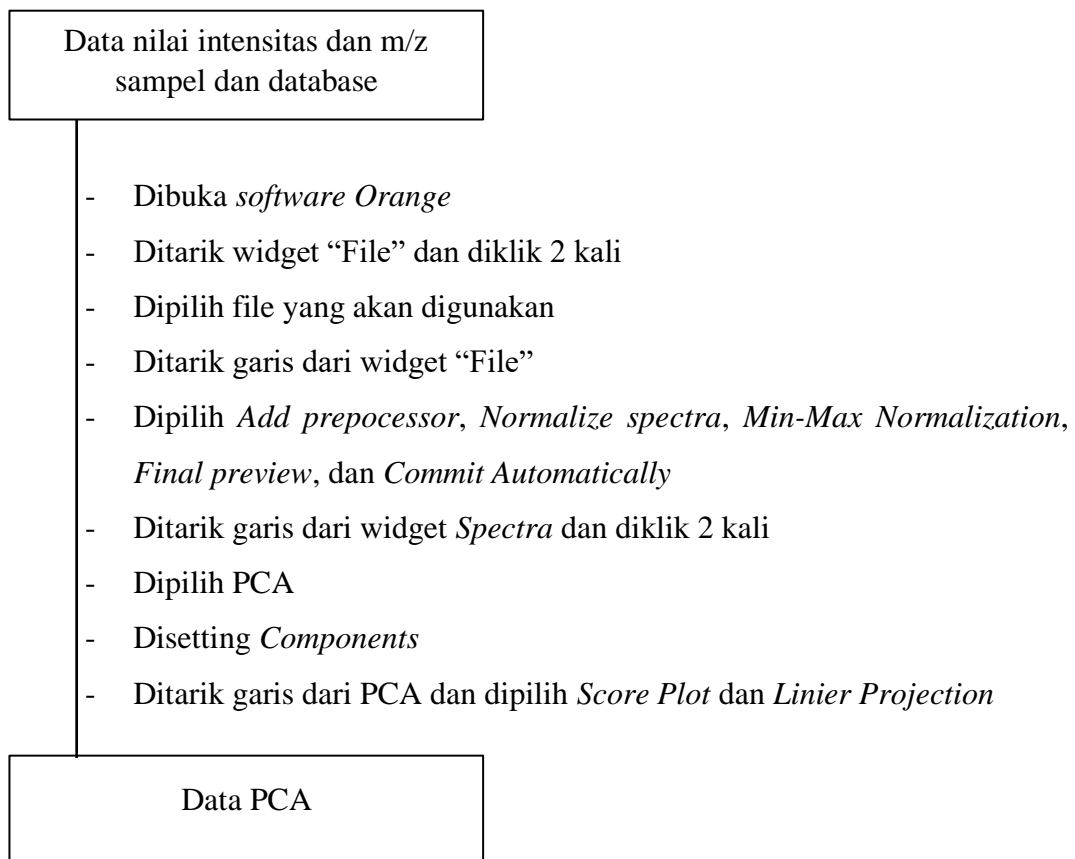
## 3. Prediksi Spektra dengan CFM-ID

Daftar senyawa hasil riset  
database

- Dibuka website PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- Dicari senyawa yang masuk daftar senyawa hasil riset
- Disalin InChI senyawa yang dicari
- Dibuka website CFM-ID ([cfmid.wishartlab.com](http://cfmid.wishartlab.com))
- Dipilih *Spectra Prediction*
- Ditempel InChI pada kotak *Parent Compound Structure*
- Diisi ESI pada *Spectra Type*
- Diisi *Positive* pada *Ion Mode*
- Diisi [M+H]<sup>+</sup> pada *Adduct Type*
- Diklik *Submit*
- Disalin m/z dan intensitas dari spektra yang muncul pada energy 40V
- Ditempel pada Microsoft Excel

Data m/z dan intensitas dari  
senyawa hasil riset

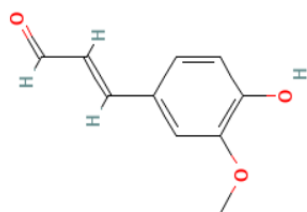
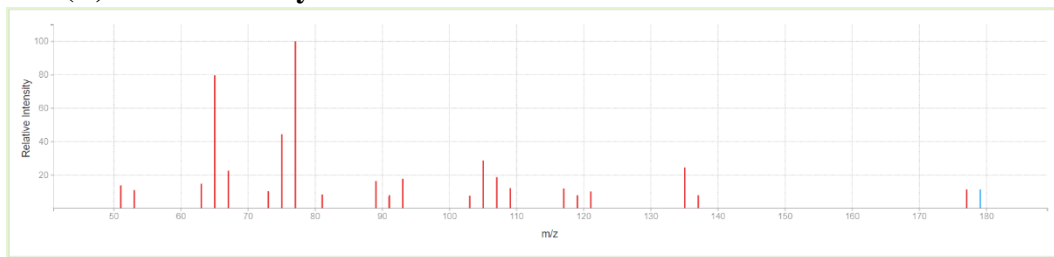
#### 4. Analisa PCA



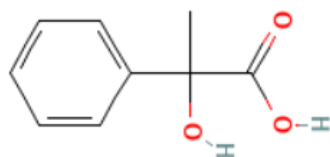
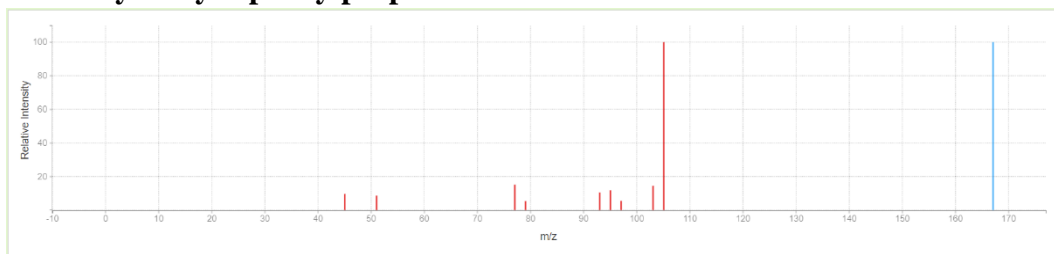


### Lampiran 3. Spektra dan Struktur Senyawa Pembanding

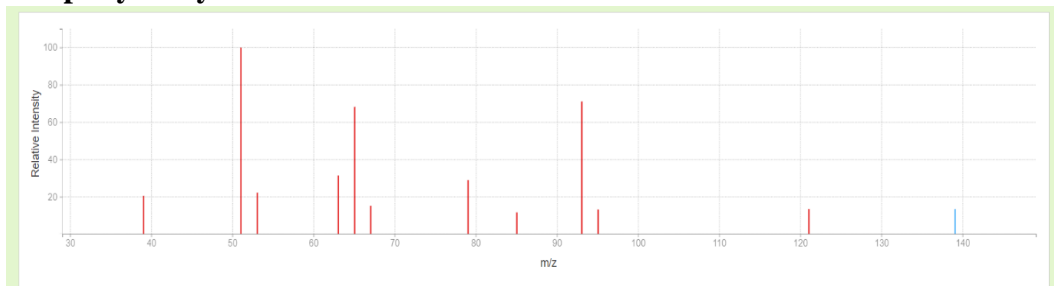
#### 1. (E)-Coniferaldehyde

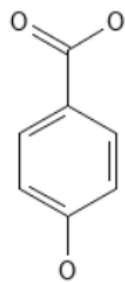


#### 2. 2-Hydroxy-2-phenylpropanoic acid

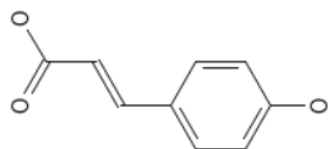
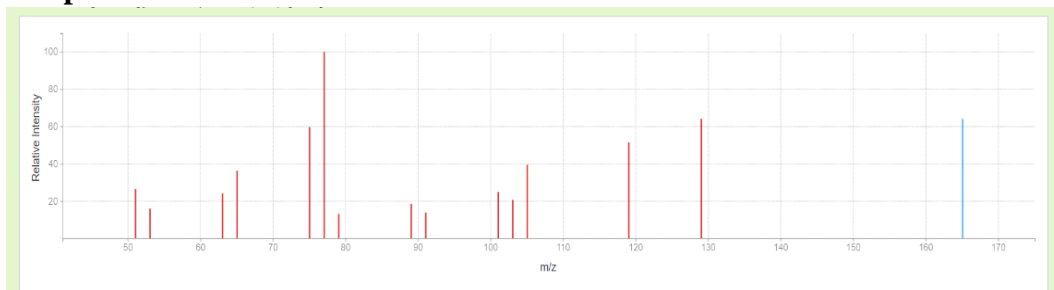


#### 3. p-Hydroxybenzoic Acid

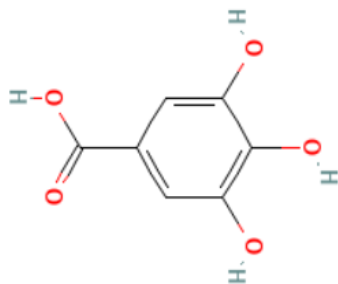
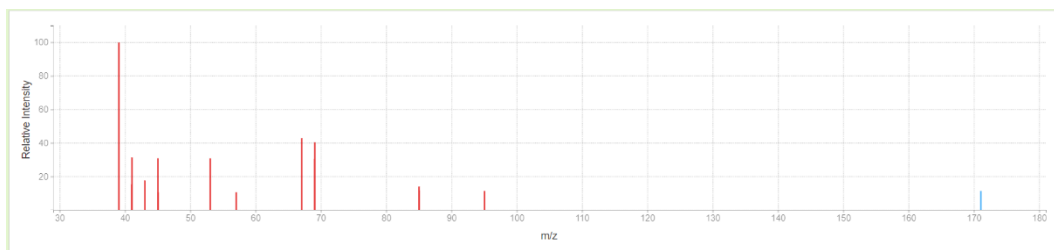




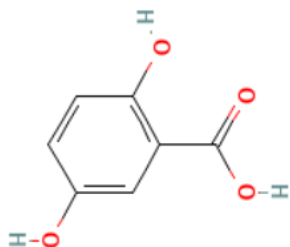
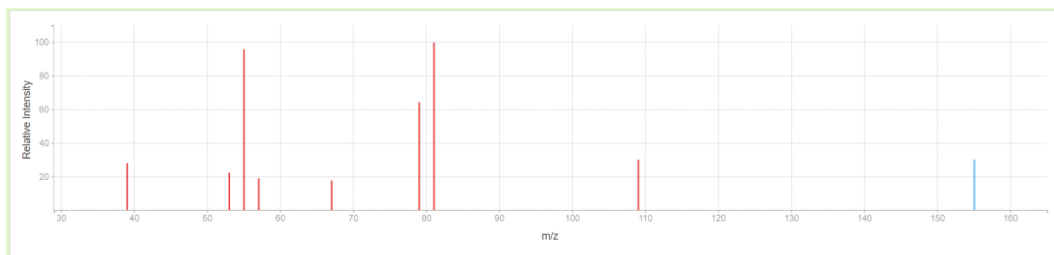
#### 4. p-Coumaric acid



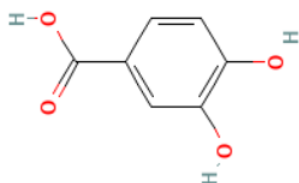
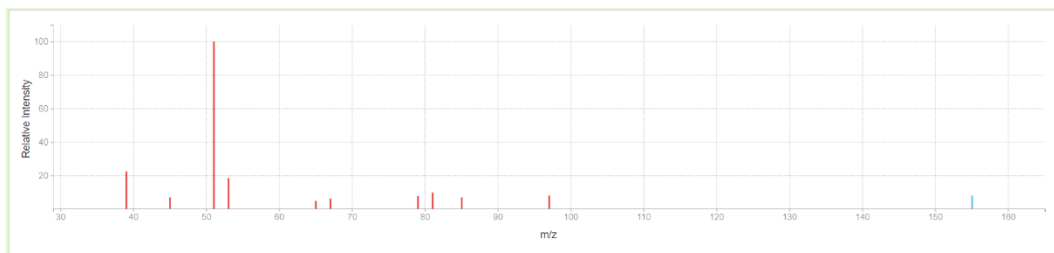
#### 5. Gallic acid



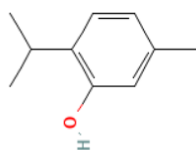
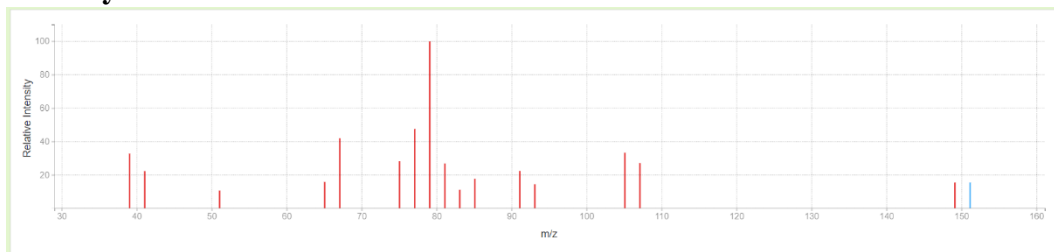
## 6. Gentisic acid



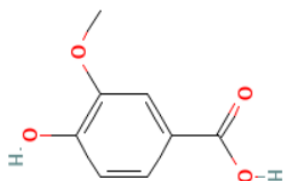
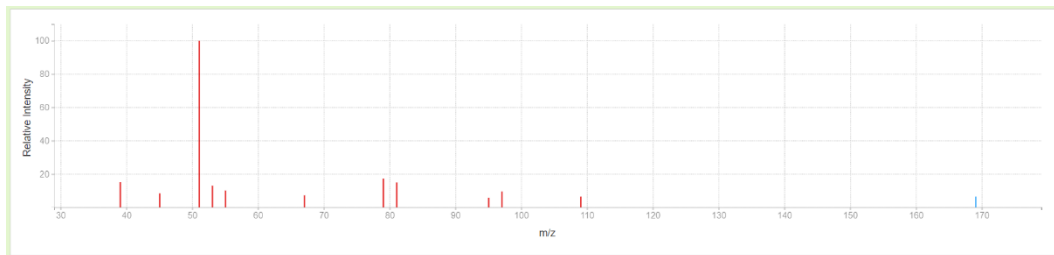
## 7. Protocatechuic acid



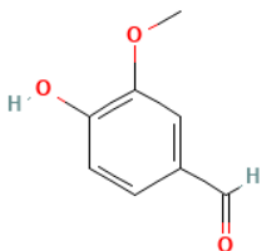
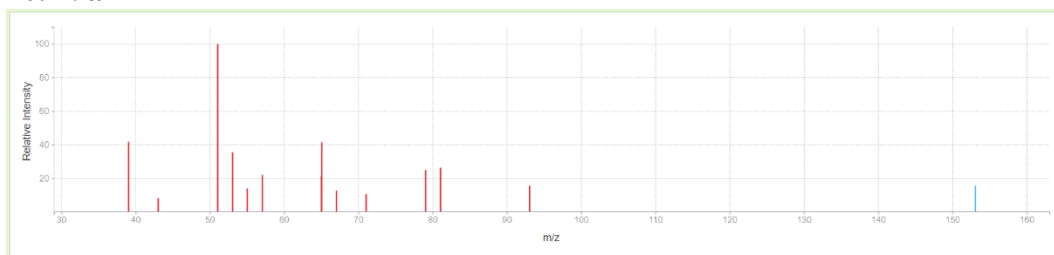
## 8. Thymol



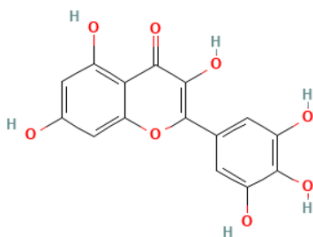
## 9. Vanillic acid



## 10. Vanillin



## 11. Myricetin



#### Lampiran 4. Data m/z dan Intensitas Sampel

Sampel 1

<b>m/z</b>	<b>Intensitas</b>
73.227	58.977
86.313	78.17
104.36	100
118.322	31.991
132.299	56.493
133.235	23.824
136.243	12.389
144.316	10.84
166.299	10.812
205.279	4.448
214.291	7.354
221.242	4.913
258.239	5.662
296.267	3.231

Sampel 2

<b>m/z</b>	<b>Intensitas</b>
65.316	100
74.263	9.072
104.256	16.877
133.157	14.725
155.219	19.903
183.265	61.483
205.206	53.94
214.223	15.812
236.147	4.578
387.31	3.137

Sampel 3

<b>m/z</b>	<b>Intensitas</b>
65.329	100
79.307	12.525
85.166	3.738
117.171	7.35
133.156	10.302
149.159	11.031
165.161	10.075
176.199	4.029
214.228	6.695
230.462	7.993
269.401	3.686
271.304	6.697
290.484	12.116
304.384	37.66
337.25	19.737
353.368	7.089
357.356	3.659

Sampel 4

<b>m/z</b>	<b>Intensitas</b>
65.186	100
79.209	13.919
85.067	3.58
117.169	8.289
133.175	10.539
149.156	11.671
165.156	9.372
181.258	3.804
214.256	6.169
258.384	36.854
259.482	7.533
295.354	4.839
299.425	14.975
301.415	23.812
335.396	17.47
343.453	11.294
351.615	1.57

Sampel 5

<b>m/z</b>	<b>Intensitas</b>
65.308	100.002
79.22	15.284
117.172	6.696
133.169	8.485
149.144	15.992
165.153	7.418
205.196	6.628
214.264	5.13
279.351	11.13
301.312	19.85
318.401	47.45
337.372	21.924
351.383	10.573
353.38	4.526

Sampel 6

<b>m/z</b>	<b>Intensitas</b>
65.204	100
79.225	14.644
117.161	7.151
133.158	8.927
149.167	17.505
205.207	7.582
214.259	5.083
273.385	3.591
279.36	10.342
301.32	22.331
318.407	57.239
335.386	26.079
337.388	16.798
351.389	12.378
353.383	4.476

Sampel 7

<b>m/z</b>	<b>Intensitas</b>
65.264	98.475
79.321	16.552
95.377	8.009
117.06	5.167
149.171	6.927
209.275	5.892
227.312	4.904
255.415	3.276
277.459	31.139
279.307	100
317.412	68.531
319.396	63.715
335.347	36.987
351.393	17.01
353.387	6.728
371.533	4.509
393.455	3.196

Sampel 8

<b>m/z</b>	<b>Intensitas</b>
65.258	78.879
79.31	10.836
97.249	7.204
149.271	5.494
183.241	5.926
217.244	3.84
263.39	7.255
279.44	43.757
297.363	41.52
319.393	100
321.402	50.557
337.319	37.494
353.374	10.82
355.383	7.843

Sampel 9

<b>m/z</b>	<b>intensitas</b>
65.333	48.63
97.298	38.643
111.313	28.211
125.287	15.429
165.401	10.077
179.415	14.548
211.346	11.554
239.471	17.99
263.381	47.154
281.501	66.441
303.509	68.573
331.443	36.675
353.519	99.999
379.496	91.157
380.42	23.958
395.536	10.966
396.487	3.368

## Lampiran 5. Posisi Tiap Titik pada Hasil Pengelompokkan Senyawa





**Lampiran 6. Tabel Senyawa Database**