

Kode>NamaRumpunIlmu :
162/Teknologi Hasil Pertanian

LAPORAN AKHIR PENELITIAN
Hak Cipta Penulis Dilindungi Undang-undang (No. 000108893)



**EVALUASI FITOKIMIA, AKTIVITAS
ANTIOKSIDAN DAN IMUNOMODULATOR
BERAS HITAM (*Oryza sativa L.indica*)**

OLEH :
Ir. Fadjar Kurnia Hartati, MP. (NIDN : 0711116601)

Dibiayai oleh
Direktorat Riset dan pengabdian Masyarakat Direktorat Jendral Penguatan Riset dan
Pengembangan Kementerian Riset, Teknologidan Pendidikan Tinggi
Sesuai Dengan Surat Perjanjian Tugas Pelaksanaan Program Penelitian
No. Kontrak : 007/SP2H/LT/DRPM/II/2016 tanggal 17 Pebruari 2016 dan/atau No.
218/SP2H/LT/DRPM/II/2016 tanggal 10 Maret

LEMBAGA PENELITIAN
UNIVERSITAS DR. SOETOMO
SURABAYA

RINGKASAN

FITOKIMIA, ANTIOKSIDAN DAN IMUNOMODULATOR BERAS HITAM (*Oryza sativa L. indica*)

Seiring dengan peningkatan pemahaman tentang *back to nature* maka terjadi peningkatan pula akan permintaan bahan pangan yang mengandung antioksidan tinggi. Salah satu alternatif bahan pangan lokal yang berpotensi mengandung antioksidan tinggi adalah beras hitam.

Tujuan khusus penelitian ini adalah “Mencari alternatif bahan pangan lokal yang dapat berfungsi sebagai sumber fenol, flavonoid, antioksidan dan imunomodulator”. Sedangkan target akhir penelitian ini adalah ”Pemanfaatan beras hitam sebagai sumber fenol, flavonoid, antioksidan dan imunomodulator secara *in vitro*”.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa Rendemen ekstrak etanol dan air beras hitam adalah sebesar 19,35 % dan 16,11 %, mengandung kadar total fenol sebesar $95,87 \pm 0,71$ dan $58,86 \pm 0,23$ mg GAE/g ekstrak dan mengandung kadar flavonoid sebesar $37,75 \pm 0,23$ dan $20,53 \pm 0,19$ mg QE/g ekstrak. Ekstrak etanol mengandung kadar total fenol dan flavonoid yang lebih besar bila dibandingkan dengan ekstrak air beras hitam.

Aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan air beras hitam tergolong tinggi karena mempunyai nilai IC_{50} kurang dari 200 yaitu sebesar 13,00 dan 14,29 bila diuji dengan metode DPPH. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan air beras hitam yang diuji dengan metode FRAP adalah sebesar 59,521 dan 49,979 mg AAE/g ekstrak. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan air beras hitam yang diuji dengan metode FTC adalah sebesar 53,42 % dan 44,16 %. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan air beras hitam yang diuji dengan metode AAT adalah sebesar 132,047 % dan 96,556 %. Jadi, aktivitas antioksidan ekstrak etanol beras hitam lebih tinggi bila dibandingkan dengan aktivitas antioksidan ekstrak air beras hitam.

Semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin tinggi pula jumlah relatif sel imunokompeten yang berproliferasi. Jumlah relatif sel imunokompeten yang berproliferasi paling tinggi terdapat pada perlakuan ekstrak etanol 200 μ g/ml yaitu sebesar $76,68 \pm 0,910\%$ dan yang terendah pada perlakuan ekstrak air 50 μ g/ml yaitu sebesar $42,40 \pm 0,950\%$.

Kata kunci: beras hitam, fenol, flavonoid, antioksidan, imunomodulator

PRAKATA

Dengan mengucapkan puji syukur ke hadirat Allah SWT, laporan akhir penelitian yang judul “Fitokimia, Antioksidan dan Imunomodulator Beras Hitam (*Oryza sativa* L. *Indica*)” dapat kami selesaikan.

Baik dalam pelaksanaan penelitian maupun dalam penyusunan laporan ini tidak lepas dari kesulitan dan hambatan, namun berkat bantuan dan kerjasama yang baik dari team peneliti, dan juga semua pihak akhirnya laporan ini selesai tepat pada waktunya. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat :

1. Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi, yang telah memberikan kesempatan dan mendanai penulis untuk bisa melaksanakan penelitian ini.
2. Dr. Sri Utami Ady, SE,MM. selaku Ketua Lembaga Penelitian Universitas Dr. Soetomo Surabaya, yang selalu berupaya untuk mendapatkan dukungan pendanaan bagi penelitian dosen di lingkungan Universitas Dr. Soetomo Surabaya.
3. Ir. A. Kusyairi, M.Si. selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Dr. Soetomo Surabaya yang telah memberi kesempatan dan kepercayaan kepada penulis.
4. Semua pihak yang tidak bisa kami sebutkan satu persatu, atas semua dukungannya.

Penulis menyadari bahwa laporan kemajuan penelitian ini masih jauh dari sempurna, untuk itu penulis mengharapkan kritik, saran dan masukan yang sifatnya membangun demi kesempurnaan laporan ini, semoga laporan ini dapat bermanfaat dan berguna baik bagi diri kami maupun pihak lain yang membacanya.

Surabaya,

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
RINGKASAN	ii
PRAKATA	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	2
1.3. Urgensi Penelitian	2
1.4. Tujuan Penelitian	2
1.5. Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Beras Hitam	4
2.2. Polifenol	6
2.3. Antioksidan	9
2.3.1. Mekanisme Flavonoid Sebagai Antioksidan	10
2.3.2. Uji Aktivitas Antioksidan	11
2.4. Imunomodulator	13
2.4.1. Mekanisme Flavonoid Sebagai Imunomodulator	14
2.4.2. Uji Aktivitas Imunomodulator	15
2.5. Penelitian Terdahulu	15
BAB III METODE PENELITIAN	18
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	18
3.2. Bahan dan Alat	18
3.2.1. Bahan Penelitian	18
3.2.2. Alat Penelitian	18
4.3. Metode Penelitian	19
3.3.1. Rancangan Percobaan	19
3.3.2. Pelaksanaan Penelitian	21
3.3.3. Analisa Data	24
BAB IV HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	28
4.1. Penelitian Tahap 1	28
4.2. Penelitian Tahap 2 (Uji Aktivitas Antioksidan)	30
4.3. Penelitian Tahap 3 (Uji Aktivitas Imunomodulator)	37
4.4. Luaran Yang Dihasilkan	40
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	41
7.1. Kesimpulan	41
7.2. Saran	41
DAFTAR PUSTAKA	42
LAMPIRAN-LAMPIRAN	46

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Roadmap Penelitian	12
Tabel 2. Rendemen, Rerata Kadar Total Fenol dan Flavonoid	28
Tabel 3. Nilai IC ₅₀ Ekstrak Etanol, Air Beras Hitam dan Standart Asam Askorbat dengan Metode DPPH	32
Tabel 4. Rerata Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol dan Air Beras Hitam Dengan Metode FRAP	33
Tabel 5. Persen Penghambatan Peroksidasi Lemak Pada Hari ke 6	35
Tabel 6. Rerata Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol dan Air Terhadap Standar Asam Askorbat Dengan Metode AAT	36
Tabel 7. Rerata Jumlah Relatif (%) Sel Imunokompeten Yang Mengalami Proliferasi Akibat Perlakuan Ekstrak Etanol dan Air	37

DAFTAR GAMBAR

	Halaman	
Gambar 1.	Beras hitam (<i>Oryza sativa</i> L. <i>indica</i>)	4
Gambar 2.	Fenol	6
Gambar 3.	Poliphenol	6
Gambar 4.	Struktur kelompok flavonoid yang sering ada pada tanaman	7
Gambar 5.	Sisi aktif flavonoid	11
Gambar 6.	Struktur DPPH	12
Gambar 7.	Diagram Alir Penelitian Tahap I	25
Gambar 8.	Diagram Alir Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH	26
Gambar 9.	Diagram Alir Uji Imunomodulator /Proliferasi Limfosit	27
Gambar 10.	Aktivitas antioksidan ekstrak beras hitam dengan metode DPPH	31
Gambar 11.	Profil kenaikan absorbansi metode FTC (ferri tiosianat) dalam waktu 7 hari	34
Gambar 12.	Profil kenaikan % penghambatan peroksidasi lemak dalam waktu 6 hari	35
Gambar 13.	Hasil pengamatan proliferasi sel imunokompeten (metode CFSE)	38

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1.	Produk dan Luaran	46
Lampiran 2.	Pelaksanaan Penelitian	47
Lampiran 3.	Biodata Peneliti	50
Lampiran 4.	Data Hasil Penelitian	53

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Seiring dengan peningkatan pemahaman tentang *back to nature* maka terjadi peningkatan pula akan permintaan bahan pangan yang mengandung antioksidan tinggi. Salah satu alternatif bahan pangan lokal yang berpotensi mengandung antioksidan tinggi adalah beras hitam. Beras hitam (*Oryza sativa* L.) adalah jenis beras yang istimewa dan dikonsumsi sejak dahulukala di Cina dan Asia Tenggara (Guo *et al.* 2007). Menurut sejarah, beras hitam hanya dikonsumsi oleh raja-raja di Cina dan Indonesia sehingga dikenal dengan sebutan *forbidden rice*, karena beras hitam (*Oryza sativa* L.) mempunyai dua keunggulan yaitu sebagai makanan pokok dan juga sebagai obat yang manjur. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa beras hitam (*Oryza sativa* L.) merupakan salah satu alternatif makanan pokok yang menyehatkan karena komponen bioaktifnya, terutama antosianin dan fenol (Shao, 2014; Hou *et al.* 2013; Walter, 2013; Zhang *et al.* 2006; Sompong, 2011; Chen *et al.* 2012), flavonoid, γ -oryzanols dan tocol (Nontasan, 2012; Zhang, 2013). Hal ini menunjukkan bahwa beras hitam (*Oryza sativa* L.) di Cina telah teridentifikasi mengandung antioksidan, bahkan antioksidannya lebih banyak daripada blueberry (Xu *et al.*, 2001). Selain sebagai antioksidan, senyawa-senyawa bioaktif tersebut juga dapat berfungsi sebagai antialergi, antiinflamasi (Min *et al.*, 2010), antibakteri (Shanmigan and Mody, 2002), imunomodulator (Yaqoob dan Calder, 2003), antivirus, antifungi, anti kanker (Strobel, 2004) dan lain sebagainya. Menurut Walter, *et al.* (2013), jenis dan konsentrasi senyawa bioaktif termasuk poliphenol dan flavonoid yang terdapat pada buah-buahan, sayuran dan biji-bijian dipengaruhi oleh varietas, lingkungan, kondisi proses dan metode ekstraksi.

Di seluruh dunia, negara yang menghasilkan beras hitam hanya Cina, Brazil, Srilangka, Thailand dan Indonesia. Beras hitam di Indonesia belum banyak dikenal dan informasi komponen bioaktif, aktivitas antioksidan, imunomodulator dan aktivitas biologinya, juga belum banyak diketahui. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui senyawa bioaktif (fenol dan flavonoid), aktivitas antioksidan dan imunomodulator dari beras hitam yang ditanam di Indonesia, khususnya pada ekstrak air dan etanol beras hitam (sebagai kontrol). Selanjutnya menyebarluaskan hasil penelitian ini agar masyarakat Indonesia lebih sehat dengan mengkonsumsi bahan pangan lokal asli Indonesia.

Berdasarkan laporan komponen bioaktif yang terkandung dalam beras hitam tersebut, maka perlu diketahui bagaimana potensi beras hitam Indonesia (*Oryza sativa L. indica*) sebagai sumber fenol, flavonoid, antioksidan dan imunomodulator.

1.2. Perumusan Masalah

Sehubungan dengan uraian latar belakang masalah, maka permasalahan dalam penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut :

- 1) Berapa banyak kandungan fenol dan flavonoid pada ekstrak air dan etanol beras hitam?
- 2) Bagaimana aktivitas antioksidan dari ekstrak air dan etanol beras hitam (*Oryza sativa L. indica*)?
- 3) Bagaimana aktivitas imunomodulator dari ekstrak air dan etanol beras hitam (*Oryza sativa L. indica*)?

1.3. Urgensi Penelitian

Seiring dengan peningkatan pemahaman tentang *back to nature* maka terjadi peningkatan pula akan permintaan bahan pangan yang mengandung fenol, flavonoid, antioksidan dan imunomodulator tinggi. Salah satu alternatif bahan pangan lokal yang berpotensi mengandung fenol, flavonoid, antioksidan dan imunomodulator tinggi adalah beras hitam. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui senyawa bioaktif (fenol dan flavonoid), aktivitas antioksidan dan imunomodulator dari beras hitam yang ditanam di Indonesia.

1.4. Tujuan Penelitian

Tujuan khusus penelitian ini adalah “Mencari alternatif bahan pangan lokal yang dapat berfungsi sebagai sumber fenol, flavonoid, antioksidan dan imunomodulator”. Sedangkan target akhir penelitian ini adalah ”Pemanfaatan beras hitam sebagai sumber fenol, flavonoid, antioksidan dan imunomodulator secara *in vitro*”. Adapun langkah untuk mencapai tujuan khusus tersebut harus melalui tahapan tujuan penelitian sebagai berikut: **tahap pertama** melakukan preparasi sampel dengan cara mengekstrak beras hitam (*Oryza sativa L. indica*) dengan pelarut air dan etanol sehingga diperoleh ekstrak air dan etanol beras hitam, **tahap kedua** menguji aktivitas antioksidan ekstrak air dan etanol beras hitam (*Oryza sativa L. indica*) menggunakan 4 (empat) metode yang berbeda dan **tahap ketiga**

menguji aktivitas imunomodulator ekstrak air dan etanol beras hitam (*Oryza sativa* L. *indica*) secara *in vitro*.

1.5. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat luas manfaat lain dari beras hitam (*Oryza sativa* L. *indica*) selain sebagai bahan makanan pokok. Adapun manfaat utama penelitian ini adalah :

- 1) Mengetahui konsentrasi fenol dan flavonoid pada ekstrak air dan etanol beras hitam?
- 2) Mengetahui aktivitas antioksidan dari ekstrak air dan etanol beras hitam (*Oryza sativa* L. *indica*)?
- 3) Mengetahui aktivitas imunomodulator dari ekstrak air dan etanol beras hitam (*Oryza sativa* L. *indica*)?

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Beras Hitam (*Oryza sativa L. indica*)

Beras hitam (*Oryza sativa L. indica*) merupakan varietas beras yang mengandung pigmen paling baik, berbeda dengan beras putih atau beras warna lain. Beras hitam memiliki rasa dan aroma yang baik dengan penampilan yang spesifik dan unik (Gambar 1). Di Asia, cara memasak beras hitam dicampur dengan beras putih untuk meningkatkan flavour, warna dan nilai gizi. Beras hitam sendiri memiliki flavour yang berbeda dengan beras lainnya, sedangkan flavour merupakan salah satu penentu mutu beras. Bila dimasak, nasi beras hitam warnanya menjadi pekat dengan rasa dan aroma yang khas (Yoshida *et al.*, 2010).

Beras hitam sampai saat ini belum menjadi bahan pangan pokok seperti halnya beras putih, meskipun beras berwarna hitam ini mempunyai nilai gizi tinggi, apalagi akhir-akhir ini bahan pangan warna hitam makin marak dipromosikan oleh industri pengolahan makanan dan minuman di Asia dan Eropa. Produk makanan dan minuman dari kacang hitam, wijen hitam, dan beras hitam menjadi populer.



Gambar 1. Beras hitam (*Oryza sativa L. indica*) (Dokumen pribadi, 2014)

Di Korea, beras hitam menjadi bagian penting dalam pemeliharaan kesehatan karena kaya akan vitamin, mineral, dan antioksidan (Anonim, 2010). Sedangkan di Indonesia beras hitam sudah dikonsumsi sejak ribuan tahun lalu dikalangan terbatas lingkungan kerajaan, bukan untuk konsumsi publik sehingga disebut *forbidden rice*. Padahal varietas beras hitam di Indonesia cukup banyak, antara lain Cempo Ireng, Wojalaka, Manggarai,

NTT dll. Beras hitam di Indonesia, khususnya yang ditanam di Kepanjen, Malang, Jawa Timur termasuk kelompok *Indica* (Shinta dkk., 2014).

Adapun klasifikasi beras hitam (*Oryza sativa* L.*indica*) sebagai berikut:

Regnum : Plantae
Divisio : Angiospermae
Kelas : Monocotyledoneae
Ordo : Poales
Familia : Poaceae
Genus : *Oryza*
Spesies : *Oryza sativa* L.*indica*

Ekstrak antosianin beras hitam dilaporkan dapat menghambat sel kanker liver (Chen *et al.*, 2012). Menurut Kim (2005); Xia *et al.*, (2006); Wang *et al.*, (2007) dan Zawistowski *et al.* (2009), antosianin beras hitam dapat menurunkan kadar kolesterol, trigliserida, LDL (*Low Density Lipoprotein*) dan meningkatkan HDL (*High Density Lipoprotein*) dan sangat potensi untuk terapi kardiovaskuler. Antosianin beras hitam juga dapat meningkatkan fungsi limpa, liver, lambung dan usus, juga sebagai agen *hematopoietic* dibidang farmasi (Yang *et al.*, 2011), mencegah arterosklerosis (Lu dan Foo, 2008), anti-inflamatori (Min *et al.*, 2010). Lebih lanjut Nontasan *et al.*, (2012) memanfaatkan dedak beras hitam sebagai pewarna alami dan Hou *et al.*, (2013) mengamati pengaruh ekstrak dedak beras hitam sebagai antioksidan dan hepatoprotektif.

Di Jepang beras berpigmen ini dikenal dengan nama *Kokushimai*, termasuk dalam katagori FOSHU (*Food for Specified Health Uses*) karena kandungan poliphenol serta antosianin yang tinggi (Shinta, 2011). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa beras hitam (*Oryza sativa* L.) merupakan salah satu alternatif makanan pokok yang menyehatkan karena komponen bioaktifnya, terutama antosianin dan fenol (Shao, 2014; Hoa *et al.*, 2013; Walter, 2013; Wei *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Sompong, 2011; Chen *et al.*, 2012), flavonoid dan γ -oryzanols dan tocol (Nontasan, 2012; Zhang, 2013).

Menurut Caro *et al.* (2013), beras hitam yang ada di Jepang (*Kokushimai*) mengandung komponen (lutein, zeaxanthin, likopen dan β -karoten), γ -oryzanols, flavon dan flavonoid (luteolin, apigenin, quercetin dan isorhamnetin). Lebih lanjut Walter *et al.*, (2013) menyatakan bahwa jenis dan konsentrasi komponen bioaktif termasuk poliphenol dan

flavonoid yang terdapat pada buah-buahan, sayuran dan biji-bijian dipengaruhi oleh faktor genetik, lingkungan, kondisi proses dan metode ekstraksi.

2.2. Polifenol

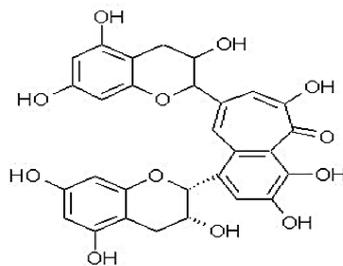
Polifenol adalah kelompok antioksidan yang secara alami ada di dalam sayuran (brokoli, kol, seledri), buah-buahan (apel, delima, melon, ceri, pir, dan stroberi), kacang-kacangan (walnut, kedelai, kacang tanah), minyak zaitun, dan minuman (seperti teh, kopi, cokelat dan anggur merah/red wine) (Awika dan Rooney, 2004; Vinardell dan Mitjans, 2008). Polifenol umumnya banyak terkandung dalam kulit buah. Senyawa polifenol terdiri dari beberapa subkelas yakni, flavonol, isoflavon (dalam kedelai), flavanon, antosianidin, katekin, dan biflavan (Gambar 3) (Beecher, 2003).



Gambar 2. Fenol (Vinardell dan Mitjans, 2008)

Turunan dari katekin seperti epikatekin, epigalo-katekin, apigalo-katekin galat, dan quercetin umumnya ditemukan dalam teh dan apel. Dua unsur terakhir merupakan antioksidan kuat, dengan kekuatan 4-5 kali lebih tinggi dibandingkan vitamin C dan vitamin E yang dikenal sebagai antioksidan potensial. Jenis polifenol lain adalah tanin yang banyak terkandung dalam teh dan cokelat.

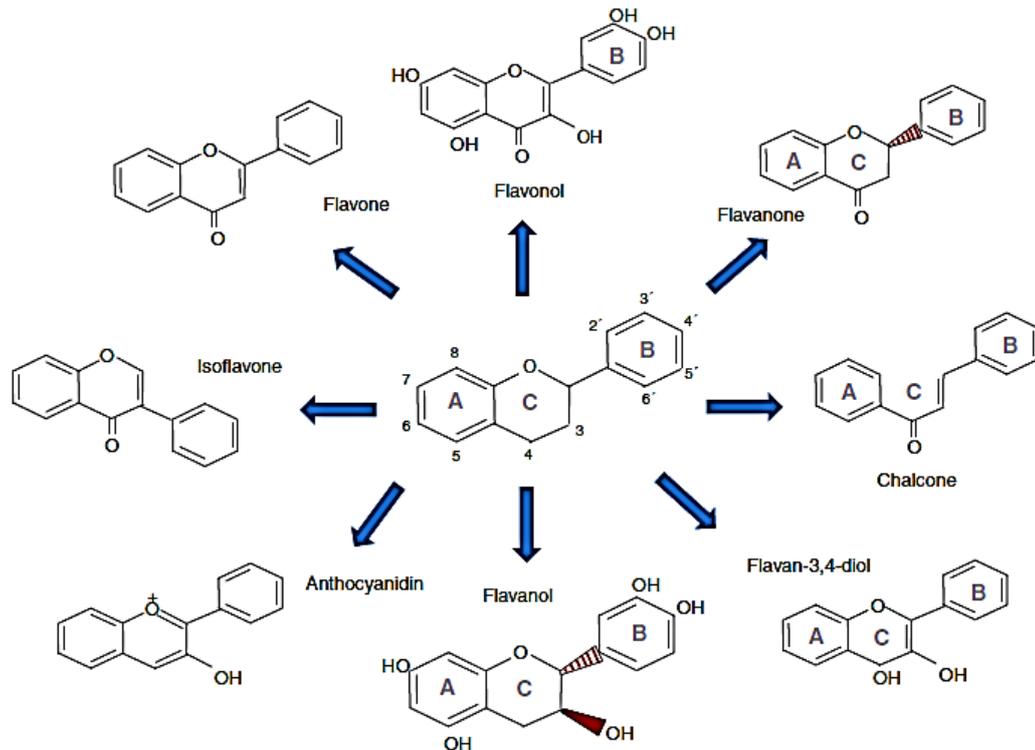
dalam teh dan cokelat.



Gambar 3. Poliphenol (Beecher, 2003).

Secara umum kekuatan senyawa fenol sebagai antioksidan tergantung dari beberapa faktor seperti ikatan gugus hidroksil pada cincin aromatik, posisi ikatan, posisi hidroksil bolak balik pada cincin aromatik dan kemampuannya dalam memberi donor hidrogen atau elektron serta kemampuannya dalam "merantas" radikal bebas (*free radical scavengers*). Semua polifenol mampu "merantas" oksigen dan radikal alkil dengan memberikan donor elektron sehingga terbentuk radikal fenoksil yang relatif stabil. Ada hubungan antara

kemampuan senyawa fenol sebagai antioksidan dan struktur kimianya. Konfigurasi dan total gugus hidroksil merupakan dasar yang sangat mempengaruhi mekanisme aktivitasnya sebagai antioksidan (Mokgope, 2006).



Gambar 4. Struktur kelompok flavonoid yang sering ada pada tanaman (Fraga dan Oteiza, 2011).

Flavonoid

Flavonoid banyak ditemukan pada berbagai tumbuh-tumbuhan dalam bentuk glikosida C6-C3-C6 atau beberapa gula yang berikatan pada satu atau lebih grup hidroksil fenolik (Sirait, 2007; Bhat *et al.*, 2009), seperti nampak pada Gambar 4. Flavonoid merupakan salah satu senyawa kelompok fenol dan terdapat sekitar 10 jenis flavonoid yaitu antosianin, proantosianidin, flavonol, flavon, glikoflavon, biflavonil, khalkon, auron, flavanon, dan isoflavon (Harborne, 2000).

Manfaat Fenol/Flavonoid Bagi Kesehatan

Menurut Sirait (2007), beberapa manfaat flavonoid bagi manusia adalah sebagai diuretik, antioksidan pada lemak dan stimulan pada pembuluh darah kapiler dan jantung. Hollman *et al.* (1996) berpendapat bahwa flavonoid golongan flavones dan flavonols dapat mempengaruhi respon imun. Namun menurut Wagner (1995), senyawa yang mempunyai bioaktivitas sebagai bahan imunostimulan adalah terpenoid, alkaloid,

polyphenol dan golongan senyawa polisakarida. Senyawa-senyawa bioaktif lainnya yang berpotensi dapat meningkatkan aktivitas sistem imun antara lain vitamin C dan E, limonoid, kurkumin dan katekin.

Berdasarkan hal tersebut di atas komponen senyawa flavonoid dari beberapa tanaman terbukti mempunyai efek positif terhadap respon proliferasi dan sitolitik pada sel limfosit tetapi bersifat antiproliferasi dan toksik terhadap sel kanker (Tang dan Eisenbrand, 1992). Flavonoid juga dapat menghambat penurunan kualitas dan kuantitas sel-sel imun limfosit T (CD4+), limfosit B, monosit/makrofag, sel *Natural Killer* (NK) dan sel *lymphokine activated killer* (LAK) yang disebabkan oleh radikal bebas sinar ultraviolet, bahan karsinogenik dan endotoksin (Serafini *et al.*, 2010).

Manfaat lain mengkonsumsi flavonoid antara lain sebagai anti-inflamasi, anti-alergi, antimikroba, hepatoprotektif, antivirus, antitrombotik, kardioprotektif, penguatan kapiler, efek antidiabetes, antikanker dan antineoplastik, dan lain-lain. Flavonoid merupakan antioksidan, imunomodulator yang secara signifikan mampu mempengaruhi sejumlah proses inflamasi selular, fungsi kekebalan tubuh, dan sel permukaan transduksi sinyal. Flavonoid mempunyai kemampuan untuk mengubah atau memodulasi aktivitas sejumlah sistem enzim yang terlibat dalam transduksi sinyal sel permukaan, fungsi kekebalan tubuh, transformasi sel, pertumbuhan tumor dan metastasis (Middleton (2000).

Flavonoid dapat digunakan sebagai bahan terapi kemopreventif karena dapat berikatan langsung dengan beberapa protein kinase, seperti Akt/protein kinase B(Akt/PKB), Fyn, Janus kinase 1 (JAK1), mitogen-activated protein (MAP) kinase 4 (MKK4), Raf1, dan rantai zeta terkait 70-kDa protein (ZAP-70) kinase. Protein kinase ini memainkan peran penting dalam pengaturan sinyal beberapa sel dan fungsi sel (Gopalakrishna dan Jaken, 2000; Cosentino-Gomes *et al.*, 2012).

Flavonoid juga dapat merubah ikatan DNA factor transkripsi *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B), dapat menghambat jalur fosfoinositid 3-kinase/Akt sehingga Akt tidak dapat mengaktifasi NF- κ B. Akt diketahui dapat mengaktifasi NF- κ B melalui fosforilasi dari I κ B. NF- κ B yang terfosforilasi bertranslokasi ke inti dan menyebabkan transkripsi beberapa gen (misal COX-2), sehingga produksi prostaglandin dan sitokin proinflamasi meningkat (Dempsey, 2000). Faktor transkripsi NF- κ B merupakan kunci regulator inflamasi dan bertindak *downstream* terhadap banyak reseptor permukaan sel termasuk molekul MHC kelas II dan *toll-like receptors/ TLR* (Krakauer, 2011). Faktor transkripsi NF- κ B yang aktif dapat menginduksi terbentuknya sitokin proinflamasi dalam sistem imun seperti sitokin TNF- α , IFN- γ , molekul adesi seperti: *vascular cell adhesion*

molecule-1 (VCAM-1), dan *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) (Middleton *et al.*, 2000).

2.3. Antioksidan

Antioksidan merupakan substansi nutrisi maupun non-nutrisi yang terkandung dalam bahan pangan, yang mampu mencegah atau memperlambat terjadinya kerusakan oksidatif dalam tubuh, mampu mencegah kerusakan sel karena kemampuannya mengikat radikal bebas dan molekul-molekul reaktif lainnya. Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (elektron donor) atau reduktan/reduktor. Senyawa ini mempunyai berat molekul kecil tapi mampu menginaktivasi reaksi oksidasi dengan mencegah terbentuknya radikal (Winarsi, 2007).

Menurut asalnya, antioksidan dikelompokkan menjadi dua yaitu antioksidan endogen dan eksogen. Antioksidan endogen adalah kelompok antioksidan yang bisa disintesis oleh tubuh, seperti misalnya katalase, superoksida dismutase (SOD) dan peroksidase. Katalase merupakan senyawa hemotetramer dengan kofaktor Fe, dan dapat ditemukan pada hewan maupun tumbuhan. Katalase dapat mengkatalisis berbagai peroksida dan radikal bebas menghasilkan oksigen dan air. Superoksida adalah kelas enzim oksidoreduktase yang berfungsi mengatalisis substrat organik dengan H_2O_2 dan mereduksinya menjadi H_2O . SOD disebut sebagai *scavenger* atau pembersih superoksida ($\bullet O_2^-$) karena mampu mengkatalisis radikal bebas superoksida ($\bullet O_2$) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Katalase merupakan senyawa hemotetramer dengan kofaktor Fe, dan dapat ditemukan pada hewan maupun tumbuhan. Peroksidase merupakan hemoprotein yang terdapat pada organisme prokariotik dan eukariotik. Glutation peroksidase (GPx) adalah salah satu jenis enzim peroksidase yang mengandung selenium (Se) pada sisi aktifnya. Enzim ini bekerja dengan cara memecah H_2O_2 dan berbagai lipid peroksida dengan mereduksinya menjadi H_2O . Proses tersebut melibatkan reaksi redoks dari glutation tereduksi (GSH) (Benzie, 2003).

Antioksidan yang diperoleh dari luar tubuh disebut dengan antioksidan eksogen, dan dapat diperoleh dari makanan sehari-hari, terutama sayuran, dan buah-buahan yang mengandung mineral (Zn, dan Se) dan vitamin (seperti vitamin A, C, dan E). Vitamin E adalah salah satu antioksidan eksogen yang paling banyak digunakan (Quezada, 2004).

Menurut fungsinya, antioksidan dibedakan menjadi empat yaitu

1. Antioksidan primer, berfungsi untuk mencegah terbentuknya radikal bebas baru, misalnya antioksidan primer di dalam tubuh manusia adalah enzim superoksida

dismutase (SOD). Enzim ini sangat penting sekali karena dapat melindungi sel-sel tubuh dari kerusakan akibat radikal bebas. Mineral-mineral yang dapat mempengaruhi kinerja enzim adalah Mn, Zn, Cu, dan Se (Kumalaningsih, 2008).

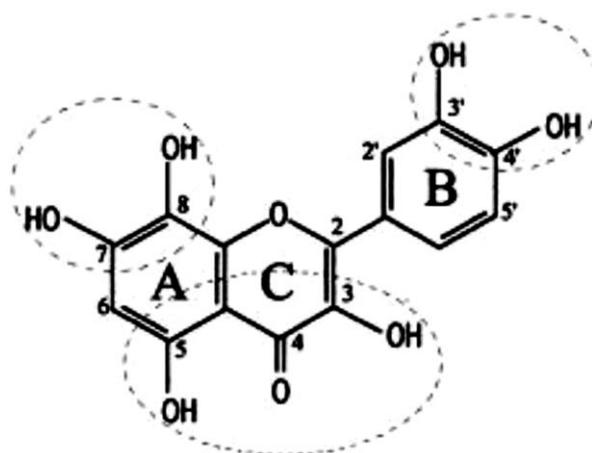
2. Antioksidan sekunder merupakan antioksidan yang mampu penangkap radikal bebas sehingga reaksi berantai dan kerusakan yang lebih hebat tidak terjadi. Kelompok antioksidan sekunder antara lain vitamin C, E, dan betakaroten (Li *et al.*, 2014). Vitamin C merupakan *oxygen scavenger* karena kemampuannya mengikat oksigen sehingga reaksi oksidasi oleh radikal bebas tidak dapat berlangsung (Aris *et al.*, 2009).
3. Antioksidan tersier, mampu memperbaiki kerusakan sel/jaringan yang disebabkan oleh radikal bebas. Salah satu contoh antioksidan tersier adalah metionin sulfoksidan reductase, yang dapat memperbaiki DNA dalam sel.

Antioksidan dapat diperoleh dengan dua cara, yaitu:

- (a) Antioksidan yang diperoleh dari tumbuhan dan bagian dari tumbuhan seperti kayu, kulit, akar, daun, bunga, buah, biji, rimpang, dan serbuk disebut dengan antioksidan alami (Halvorsen, 2002; Vinardell dan Mitjans, 2008), termasuk fenol dan flavonoid yang ada dalam beras hitam.
- (b) Antioksidan sintetik seperti *butylatedhydroxytoluene* (BHT), *Butylatedhydroxyanisole* (BHA), *tert-butyl hydroxyl quinon* (TBHQ), *propylgalatte* (PG), *nordihidroquairetic acid* (NDGA) dan α - tokoferol merupakan antioksidan sintetik yang sering digunakan dan dapat membahayakan kesehatan, karena dapat menyebabkan pembengkakan organ hati (Halvorsen, 2002.)

2.3.1. Mekanisme Flavonoid Sebagai Antioksidan

Mekanisme kerja golongan flavonoid mewakili polifenol sebagai antioksidan dan radikal “scavenger” dengan struktur bangun seperti pada Gambar 5 (Dragan dan Amic, 2003). Menurut Rice-Evans (2001) dan Schroeter, *et al.* (2002), fungsi polifenol sebagai anti radikal bebas sangat ditentukan oleh letak gugus OH karena dapat bertindak sebagai donor elektron yang merupakan target dari radikal bebas, misalnya dua hidroksil pada cincin B (3' dan 4'); cincin A, yaitu pada 7-OH dan 8-OH. Demikian juga OH pada cincin C3, dapat berfungsi sebagai antioksidan (Gambar 5).



Gambar 5. Sisi aktif flavonoid (Rice-Evans, (2001) dan Schroeter *et al.* (2002))

Adanya 3-OH dan 5-OH yang dikombinasi dengan 4-karbonil dan ikatan rangkap pada C2-C3 yang bekerja sama dengan gugus keto pada C4 dapat meningkatkan flavonoid sebagai “radical-scavenger” (peredam radikal bebas). Gambar di atas menunjukkan kemampuan flavonoid secara lengkap, namun kenyataannya tidak ada senyawa alami yang mempunyai struktur selengkap itu.

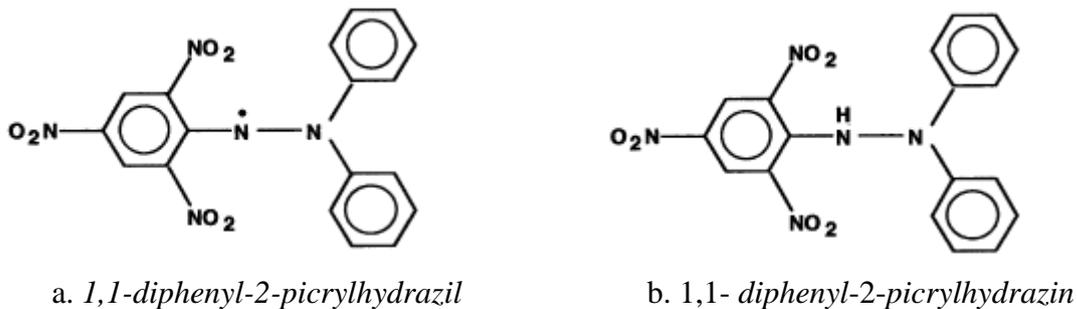
2.3.2. Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dapat dibedakan menjadi 3 golongan, yaitu golongan *Hydrogen Atom Transfer Methods* (HAT), seperti *Lipid Peroxidation Inhibition Capacity Assay* (LPIC/ missal FTC) dan *Oxygen Radical Absorbance Capacity Method* (ORAC). Golongan kedua dengan prinsip *Electron Transfer Methods* (ET), misal *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil* (DPPH) *Free Radical Scavenging Assay* dan *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP). Adapun yang termasuk golongan ketiga adalah metode seperti *Chemiluminescence*, *Total Oxidant Scavenging Capacity* (TOSC) dan *Total Aktivitas Antioksidan* (Badarinath *et al.*, 2010).

Metode uji aktivitas antioksidan yang paling banyak digunakan adalah DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*) karena cukup sederhana, cepat dan tidak membutuhkan banyak reagen seperti halnya metode lain (Badarinath *et al.*, 2010). Hasil pengukuran menggunakan metode ini menunjukkan kemampuan antioksidan sampel tidak berdasar jenis radikal yang dihambat tapi bersifat umum (Juniarti *et al.*, 2009). Radikal bebas yang digunakan pada metode ini adalah larutan DPPH, yang akan bereaksi dengan senyawa antioksidan sehingga DPPH akan berubah menjadi *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazin* yang bersifat non-radikal. Terjadinya perubahan warna dari ungu tua menjadi merah muda atau

kuning pucat merupakan tanda adanya peningkatan jumlah *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazin* yang terbentuk. Selanjutnya diamati absorbansinya dengan spektrofotometer untuk menentukan aktivitas antioksidannya (Dudonn'e *et al.*, 2009).

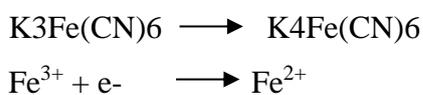
Prinsip spektrofotometri pada panjang gelombang sinar tampak sekitar 515-517 nm digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan dengan metode DPPH, yaitu dari warna ungu tua yang terbentuk karena reaksi senyawa DPPH dalam metanol.



Gambar 6. Struktur DPPH (a) Radikal Bebas dan (b) Radikal Bebas yang Telah Bereaksi dengan Antioksidan (Molyneux, 2004)

Parameter untuk menginterpretasikan hasil pengujian DPPH adalah dengan nilai IC_{50} (*Inhibitor Concentration*). IC_{50} merupakan konsentrasi larutan substrat atau sampel yang mampu mereduksi aktivitas DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan. Secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm ($IC_{50} < 50$ ppm), kuat (50 ppm $< IC_{50} < 100$ ppm), sedang (100 ppm $< IC_{50} < 150$ ppm), lemah (150 ppm $< IC_{50} < 200$ ppm), dan sangat lemah ($IC_{50} > 200$ ppm). Struktur DPPH radikal bebas dan DPPH yang telah bereaksi dengan antioksidan disajikan pada Gambar 6 (Molyneux, 2004).

Metode penentuan aktivitas antioksidan lainnya sering digunakan antara lain metode FRAP, FTC (*Ferric Thiocyanate*), TAA (*Total antioxidant activity*) dll. Uji aktivitas antioksidan dengan metode FRAP berdasarkan pada kemampuan senyawa antioksidan untuk mereduksi ion Fe^{3+} -TPTZ menjadi Fe^{2+} -TPTZ (Vichitpan, 2005). Daya reduksi merupakan salah satu indikator potensi suatu senyawa mempunyai aktivitas antioksidan (Kim, 2005), karena dapat menstabilkan radikal dengan mendonorkan elektron atau atom hidrogen sehingga senyawa radikal menjadi stabil. Adapun reaksinya adalah sebagai berikut:



Adapun nilai FRAP dinyatakan dalam mg equivalen asam askorbat/gr ekstrak (AAE) sehingga dibuat regresi dari konsentrasi (x) dengan nilai absorbansi (y) dari larutan standar asam askorbat.

Penentuan aktivitas antioksidan dengan metode TAA dalah berdasarkan pada reaksi reduksi-oksidasi dimana fosfomolibdat sebagai oksidator yang terdiri dari ammonium molibdat dan natrium fosfat yang akan membentuk ammonium fosfomolibdat. Reaksi yang terjadi pada metode ini berdasarkan reduksi Mo(VI) ke Mo(V) terhadap senyawa antioksidan (fenolik) dan terbentuknya kompleks hijau kebiruan fosfat-Mo(V) pada pH asam (Zengin, 2010), dan dapat dibaca serapannya pada spektrofotometri visible pada panjang gelombang 695 nm (Syahwar *et al*, 2012). Semakin pekat warna hijau kebiruan yang dihasilkan maka semakin banyak kompleks molybdenum (V) yang terbentuk. Hal ini terjadi karena semakin besar konsentrasi senyawa fenolik maka semakin banyak ion fenolat yang akan mereduksi molybdenum (VI) menjadi kompleks molybdenum (V). Penentuan aktivitas antioksidan dengan metode AAT ini menggunakan standar asam askorbat karena sudah terbukti memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Selanjutnya dibuat profil aktivitas antioksidan larutan standar asam askorbat untuk mengetahui seberapa besar aktivitas antioksidan asam askorbat dengan melihat grafik hubungan antara konsentrasi (mg/ml) dengan absorbansi. Semakin tinggi kadar larutan yang digunakan, maka akan semakin tinggi pula absorbansi yang dihasilkan.

2.4. Imunomodulator

Bahan yang dapat mengatur aktivitas dan fungsi sistem imun disebut sebagai imunomodulator (Rifai'I, 2014). Secara klinis menurut Kumar *et al*. (2012) cara kerja imunomodulator dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu:

- a. Immunoadjuvant (termasuk dalam system imun spesifik)
- b. Memperbaiki fungsi sistem imun (imunostimulasi)
- c. Menekan respon imun (imunosupresi)

Imunostimulan dikelompokkan menjadi dua yaitu imunostimulan biologi dan sintetik. Yang termasuk imunostimulan biologi adalah jamur dan tanaman obat (herbal), sitokin, dan antibody monoclonal. Adapun yang termasuk imunostimulan sintetik yaitu muramil peptidase, levamisol, dan isoprinosin (Djauzi, 2003).

Adanya senyawa-senyawa kimia yang dapat meningkatkan aktivitas sistem imun sangat membantu untuk mengatasi penurunan sistem imun dan senyawa-senyawa tersebut dapat diperoleh dari tumbuh-tumbuhan. Saat ini terdapat beberapa jenis tumbuhan yang

dideteksi berkhasiat sebagai imunomodulator, antara lain: *Echinacea angustifolia*, *Andrographis paniculata*, *Plantago major*, *Allium sativum*, *Zingiber officinalis*, *Curcuma xanthorrhiza* dll (Mill, 2000; Ebadi, 2002).

Senyawa-senyawa yang mempunyai prospek cukup baik yang dapat meningkatkan aktivitas sistem imun biasanya dari golongan flavonoid, kurkumin, limonoid, vitamin C, vitamin E (tokoferol) dan katekin. Hasil test secara *in-vitro* dari flavonoid golongan flavones dan flavonols telah menunjukkan adanya respon imun (Hollman *et al.* 1996). Sedangkan senyawa yang mempunyai bioaktivitas sebagai imunostimulan agent adalah golongan senyawa polisakarida, terpenoid, alkaloid dan polifenol (Wagner, 1995).

2.4.1. Mekanisme Flavonoid Sebagai Imunomodulator

Polifenol/flavonoid dan terbukti mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi, sehingga terbukti memiliki efek imunomodulasi (Nair *et al.*, 2006; Sternberg *et al.*, 2009). Hal ini juga sesuai dengan pendapat Lin dan Tang (2007), yang melaporkan bahwa kemampuan imunomodulasi melalui stimulasi proliferasi splenosit memiliki korelasi positif dengan kandungan polifenol dan flavonoid. Menurut Vaghasiya *et al.* (2010) dan Bharani *et al.* (2010), mekanisme aktivitas imunomodulator melalui stimulasi fagositosis, aktivasi makrofag, peningkatan fungsi sel imun, peningkatan produksi immunoglobulin spesifik, peningkatan jumlah sel darah putih dan IL-2.

Pandoyo (2000) menambahkan bahwa flavonoid dan senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan, dapat dikenal oleh reseptor sel B maupun sel T sebagai antigen. Senyawa tersebut dapat berikatan melalui ikatan hidrogen dengan reseptor permukaan sel T (*T cell reseptor*/TCR), sedangkan reseptor permukaannya (Ig M) berikatan dengan sel B. Ikatan tersebut dapat mengaktivasi G-protein sehingga terbentuk fosfolipase C. Hal ini menyebabkan yang hidrolisis fosfatidil inositol biofosfat (PIP2) menjadi inositol trifosfat (IP3) dan produk reaktif diasilgliserol (DAG). IP3 selanjutnya menstimulasi pelepasan Ca^{2+} ke dalam sitoplasma. Akibatnya konsentrasi Ca^{2+} meningkat, protein kinase C dan 5-lipoxygenase terstimulasi dan terbentuklah IL-2 sehingga mengaktifkan sel B dan sel T untuk berproliferasi.

Proliferasi Sel Limfosit

Proliferasi merupakan fungsi biologis mendasar pada sel limfosit, yaitu meliputi proses diferensiasi dan pembelahan sel. Aktivitas proliferasi limfosit merupakan salah satu parameter yang dapat digunakan untuk mengukur status imunitas karena proses proliferasi menunjukkan kemampuan dasar dari sistem imun (Roitt dan Delves, 2001). Limfosit

merupakan sel tunggal yang bertahan baik saat dikultur dalam media sintetik lengkap. Respon proliferasi kultur limfosit dalam media sintetik dapat digunakan untuk menggambarkan fungsi limfosit dan status imun individu (Tejasari, 2000). Lima *et al.* (2014) menyatakan bahwa proliferasi limfosit merupakan penanda adanya fase aktivasi respon imun tubuh.

Uji proliferasi limfosit dapat dilakukan melalui pengukuran kemampuan sel limfosit yang ditumbuhkan dalam kultur sel jangka pendek yang mengalami proliferasi klonal ketika dirangsang secara *in vitro* oleh antigen atau mitogen (Purwanto dkk., 2005). Bila sel dikultur dengan senyawa mitogen, maka limfosit akan berproliferasi secara tidak spesifik. Begitu pula bila limfosit dikultur dengan antigen spesifik maka limfosit akan berproliferasi secara spesifik.

2.4.2. Uji Aktivitas Imunomodulator

Ada beberapa metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas imunomodulator. Beberapa di antaranya adalah uji respon hipersensitivitas tipe lambat, pengukuran antibodi (titer antibodi), uji transformasi limfosit T, uji komplemen, indeks migrasi makrofag, uji granulosit, bioluminisensi radikal, respon fagositik, respon proliferasi limfosit (misal CFSE). Saat ini terdapat alat yang lebih efektif dan efisien untuk melihat respon sistem imun, yaitu *Flow Cytometry*.

Beberapa penelitian uji aktivitas imunomodulator yang menggunakan metode titer antibodi, antara lain pada ekstrak alkohol *Achillea millefolium* C. Koch dosis 100 µg/g (Sharififar *et al.*, 2009), pada ekstrak air dan alkohol *Ocimum sanctum* Linn. (*Labiatae*) dosis 200 mg/kg BB (Vaghasiya *et al.*, 2010), ekstrak metanol *Morus alba* Linn. (*Moraceae*) dosis 100 mg/kg BB (Bharani *et al.*, 2010).

Adapun penelitian aktivitas imunomodulator yang menggunakan metode respon proliferasi limfosit, antara lain: pada ekstrak oil *Boswellia spp.* pada dosis 100 µg/ml (Mikhaeil *et al.*, 2002), ekstrak air *Actinidia macrosperma* pada dosis 250 µg/ml (Lu *et al.*, 2007) dan ekstrak methanol *Cordia superba* Cham. dan *C. rufescens* A. DC pada dosis 100 µg/ml (Costa *et al.*, 2008).

2.5. Penelitian Terdahulu

Beberapa penelitian yang pernah dilakukan oleh peneliti terdahulu cukup banyak khususnya mengenai pemanfaatan dan identifikasi antosianin beras hitam (*Oryza sativa* L. *indica*) di beberapa negara lain.

Zhang, *et al.*, 2006 dalam judulnya” Separation, Purification and Identification of Antioxidant Compositions in Black Rice” menjelaskan bahwa beras hitam mengandung 4 jenis antosianin yaitu malvidin, pelargonidin-3,5-diglukosid, cyaniding-3-glukosid dan cyanidin-3,5-diglukosid.

Zawistowski, *et al.*, 2009 dalam judulnya”Effects of a black rice extract (*Oryza sativa* L. *indica*) on cholesterol levels and plasma lipid parameters in Wistar Kyoto rats” yang mengevaluasi efektivitas antosianin beras hitam untuk mengurangi terjadinya hiperkolesterolemia pada tikus yang diberi diet aterogenik

2.6. Roadmap Penelitian Tahun 2007-2018

Peta jalan (*Roadmap*) peneliti sejak tahun 2007 hingga sekarang adalah focus pada beras hitam khususnya manfaat beras hitam sebagai pangan fungsional, seperti pada Tabel 1 berikut

Tabel 1. Roadmap Penelitian

No	JUDUL/TOPIK	JURNAL/ ARTIKEL	EDISI
1.	Pemanfaatan Kelopak Bunga Rosela (<i>Hibiscus sabdariffa</i>) Untuk Pembuatan Krim	Berita Litbang Industri. ISSN,0215-7217	Vol. 1 No.2. 2015 (Cetak)
2.	Aktivitas Anti-inflamasi Ekstrak Etanol dan Air Beras Hitam (<i>Oryza sativa</i> L. <i>indica</i>) Pada Tikus Jantan Wistar	Rekapangan. ISSN 1978 - 4163	Vol.10 No.1 Juni 2016 (http://ejournal.upnjatim.ac.id/index.php/rekapangan/article/view/692)
3.	Respon Rasio Tepung Mocaf (Modified cassava flour) dan Tepung Terigu Terhadap Kadar Air, Serat Kasar dan Organoleptik Pada Brownies Kukus	Jurnal Teknologi Proses dan Inovasi Industri E-ISSN 2503-1236	Vol.1 No.1 Juli 2016 (http://ejournal.kemenerperin.go.id/JTPH/issue/view/387/showToc)
3.	Evaluasi Metode Pengujian ALT menggunakan Metode <i>Petrifilm Aerobic Count Plate</i> Terhadap Metode Uji SNI 01.2332.2006 Pada produk Perikanan di LPPMHP Surabaya	Jurnal Teknik Industri ISSN 1693 - 8232	Vol.13 No.2 Oktober 2016 (http://jurnal.untag-sby.ac.id/index.php/HEURISTIC/article/view/877)
4.	Anti-Hypercholesterolemia Effect of Black Rice Bran in Male Wistar Rat	Proceeding International Conference. UWM Surabaya	20 – 21 Oktober 2016 (http://repository.wima.ac.id/10704/)

5.	Pengabdian Pada Usaha Produktif Makanan Pokok Harian Berbahan Dasar Kedele	Difusi Iptek ISSN 2541 - 3996	Vol.2 No.1 Mei 2017 (http://journal.stie-mce.ac.id/index.php/difusi/article/view/18)
6.	Anti-Inflammatory Evaluation of Black Rice against TNF- α , IFN- γ and IL-6 Cytokines Produced by Immunocompetent Cells	Food and Agricultural Immunology (Scopus)	Vol. 28 (6) Juni 2017 http://dx.doi.org/10.1080/09540105.2017.1332006
7.	Antioxidant Activity And Immunomodulator Of Indonesia Black Rice (<i>Oryza sativa</i> L. <i>indica</i>) Extract	Journal of Global Pharma Technology (Scopus)	http://www.jgpt.co.in/index.php/jgpt/issue/view/108
8.	Analisis Boraks Dengan Cepat, Mudah dan Murah	Jurnal Tek. Proses dan Inovasi Industri. E-ISSN 2503-1236	Vol.2 No.1 Juli 2017 (http://ejournal.kemenerperin.go.id/JTPII/article/view/2827)
9.	Usaha Produktif Abon Kalsium Duri Bandeng	Jurnal Pengabdian Masyarakat E-ISSN 2407-7100	Vol. 2 No.3 September 2017 (http://jurnal.untagsby.ac.id/index.php/jpm17/article/view/1074)
10.	Pengembangan Produk Jelly Drink Temulawak (<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb.)	Jurnal Teknik Industri ISSN 1693-8232	Vol.14 No.2 Oktober 2017 (http://jurnal.untagsby.ac.id/index.php/HEURISTIC/article/view/1175)
11.	Metode Membuat Ekstrak Air Beras Hitam ((<i>Oryza sativa</i> L. <i>indica</i>) Sebagai Sumber Antioksidan dan Imunomodulator	HAKI Paten (Pemeriksaan)	No.PID201802225

BAB III. METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini rencana akan dilakukan mulai bulan April 2016 sampai dengan Nopember 2016. Pelaksanaan penelitian di Laboratorium Biokimia, Laboratorium Fisiologi Hewan, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, dan Laboratorium Nutrisi Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya, Malang.

3.2. Bahan dan Alat

3.2.1. Bahan Penelitian

Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini adalah beras hitam (*Oryza sativa* L. *indica*) yang ditanam di Kepanjen, Malang, Jawa Timur. Beras dikeringkan dan dihaluskan kemudian diayak dengan ukuran 80 mesh, selanjutnya dikemas dengan kantung plastik polyethylene dan disimpan pada suhu 0-4°C sampai digunakan untuk analisa selanjutnya.

Bahan lain yang diperlukan diantaranya meliputi beberapa reagen dan hewan coba. Reagen yang diperlukan adalah etil asetat, metanol, n-heksana, aquadest, PBS pH 7,2; Seluruh reagen yang digunakan adalah pure analysis (p.a) dengan merk Merck Jerman. Sedangkan hewan coba yang digunakan dalam penelitian imunomodulator adalah mencit (*Mus musculus*) galur Swiss, umur 8 minggu, berat 20-25 g, dalam keadaan sehat dan tidak ada kelainan anatomis. Sedangkan untuk uji antiinflamasi menggunakan tikus putih Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan, berat 160-200 gr dan umur \pm 3 bulan. Penggunaan hewan coba akan disertifikatkan ke Komite Etik Universitas Brawijaya Malang.

3.2.2. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian meliputi pengering oven (*Memmert*, Jerman), timbangan analitik (*Mettler AE 160*), pipet mikro, kertas saring *Whatman 1*, pH meter *School Gerale 09832*, grinder, freeze drying, rotary vacuum evaporator, peralatan gelas (gelas ukur, Erlenmeyer, beaker glass dll) merk *Duran*, kandang mencit, gunting, pinset, cawan sel, syriosnge 1 ml, tabung vac, sentrifuse, tabung ependorf 1 ml, pipet, propylene tube, mikroskop elektron, inkubator (*Working Strength*), microwave, *flowcytometer (FACS CaliburTM flowcytometer, BD-Bioscience, San Jose, CA)*.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental. Menurut Gomez and Gomez (1984) metode eksperimen adalah penelitian yang dilakukan dengan percobaan serta dengan mengadakan manipulasi terhadap obyek penelitian sehingga mudah diukur dan seharusnya ada kontrol sebagai pembanding. Penelitian ini terdiri dari 2 tahap yaitu:

Penelitian tahap I merupakan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui jenis pelarut dan dosis ekstrak yang paling tepat saat ekstraksi beras hitam (*Oryza sativa* L. *indica*) sehingga mempunyai kemampuan sebagai antioksidan, antiinflamasi dan imunomodulator terbaik.

3.3.1. Rancangan Percobaan

Penelitian ini terdiri dari pengamatan terhadap kemampuan ekstrak beras hitam (*Oryza sativa* L. *indica*) sebagai antioksidan dan imunomodulator, sehingga rancangan percobaannya tergantung pengamatan yang dilakukan, yaitu:

A. Antioksidan

Pada pengamatan aktivitas ekstrak beras hitam (*Oryza sativa* L. *indica*) sebagai antioksidan, menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang disusun secara faktorial. Faktor perlakuan yang dicoba terdiri dari 2 faktor dan masing-masing perlakuan diulang 2 kali. Banyak ulangan ditentukan berdasarkan rumus berikut : $(t - 1) (n - 1) \geq 15$ (Gomez & Gomez, 1995). Perlakuan yang dicoba terdiri dari:

1. Faktor pertama adalah jenis pelarut, terdiri dari 2 level, yaitu:
 - P1 = etanol
 - P2 = air
2. Faktor kedua adalah jenis metode, terdiri dari 4 level, yaitu:
 - R1 = DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*)
 - R2 = FTC (*Ferric Thiocyanate*)
 - R3 = FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)
 - R4 = TAA (*Total Antioxidant Activity*)

B. Antiinflamasi

Pada pengamatan aktivitas ekstrak beras hitam (*Oryza sativa* L. *indica*) sebagai antiinflamasi, menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang disusun secara faktorial. Faktor perlakuan yang dicoba terdiri dari 2 faktor dan masing-masing perlakuan diulang 3 kali.

Banyak ulangan ditentukan berdasarkan rumus berikut : $(t - 1) (n - 1) \geq 15$ (Gomez & Gomez, 1995). Perlakuan yang dicoba terdiri dari:

1. Faktor pertama adalah jenis pelarut, terdiri dari 2 level, yaitu:

P1 = etanol

P2 = air

2. Faktor kedua adalah dosis ekstrak beras hitam (Min *et al.*,2010), terdiri dari 5 level, yaitu:

K1 = kontrol sehat

K2 = kontrol sakit

K3 = 50 mg/kg BB

K4 = 100 mg/kg BB

K5 = 200 mg/kg BB

C. Imunomodulator

Pada pengamatan aktivitas ekstrak beras hitam (*Oryza sativa* L. *indica*) sebagai imunomodulator, menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang disusun secara faktorial. Faktor perlakuan yang dicoba terdiri dari 2 faktor dan masing-masing perlakuan diulang 3 kali. Banyak ulangan ditentukan berdasarkan rumus berikut : $(t - 1) (n - 1) \geq 15$ (Gomez & Gomez, 1995). Perlakuan yang dicoba terdiri dari:

1. Faktor pertama adalah jenis pelarut, terdiri dari 2 level, yaitu:

P1 = etanol

P2 = air

2. Faktor kedua adalah dosis ekstrak beras hitam (Min.*et al.*,2010), terdiri dari 5 level, yaitu:

M1 = kontrol sehat

M2 = kontrol sakit

M3 = 50 μ g/ml

M4 = 100 μ g/ml

M5 = 200 μ g/ml

3.3.2. Pelaksanaan Penelitian

A. Antioksidan

Tahapan atau prosedur kerja pada penelitian untuk mengetahui aktivitas ekstrak beras hitam sebagai antioksidan adalah sebagai berikut:

a. Pembuatan ekstrak beras hitam

Beras hitam dikeringkan dan dihaluskan (± 8 mesh), diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan n-heksana, etil asetat, etanol dan air sebanyak 1500 ml (1 : 10), maserasi selama 3 hari pada suhu kamar, selanjutnya disaring. Filtrat yang diperoleh dari masing-masing maserasi dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50°C sampai diperoleh filtrat yang kental. Filtrat kental yang diperoleh selanjutnya dikeringkan dengan proses *freeze drier* untuk menghilangkan sisa pelarut yang masih ada. Filtrat kering dikemas dalam aluminium foil dan disimpan sampai dilakukan pengujian lebih lanjut.

b. Pengamatan

Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Uji aktivitas antioksidan ekstrak beras hitam dilakukan dengan metode DPPH (Blois 1985 dalam Hanani *et al.*, 2005). Ekstrak kasar beras hitam dilarutkan dalam metanol p.a. hingga diperoleh konsentrasi 200, 400, 600 dan 800 ppm. Antioksidan sintetik BHT digunakan sebagai pembanding dan kontrol positif dilarutkan dalam pelarut metanol p.a. dengan konsentrasi 2, 4, 6 dan 8 ppm. Larutan DPPH dibuat dengan melarutkan kristal DPPH dalam pelarut metanol p.a. dengan konsentrasi 1 mM. Proses pembuatan larutan DPPH 1 mM dilakukan dalam suhu rendah dan terlindung dari cahaya matahari. Larutan ekstrak dan larutan antioksidan BHT masing-masing diambil 4,50 ml dan direaksikan dengan 500 μ l larutan DPPH 1 mM dalam tabung reaksi yang berbeda. Reaksi berlangsung pada suhu 37°C selama 30 menit kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 517 nm. Absorbansi larutan blanko diukur untuk melakukan perhitungan persen inhibisi. Larutan blanko dibuat dengan mereaksikan 4,50 ml pelarut metanol dengan 500 μ l larutan DPPH 1 mM dalam tabung reaksi. Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam persen inhibisi, yang dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Absorbansi blanko

Konsentrasi sampel dan persen inhibisinya diplot masing-masing pada sumbu x dan y pada persamaan regresi linear. Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} (*inhibitor concentration 50%*) dari masing-masing sampel dinyatakan dengan nilai y sebesar 50 dan nilai x yang akan diperoleh sebagai IC_{50} . Nilai IC_{50} menyatakan besarnya konsentrasi larutan sampel (ekstrak ataupun BHT) yang dibutuhkan untuk mereduksi radikal bebas DPPH sebesar 50%.

Uji Aktivitas Antioksidan Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Analisis total aktivitas antioksidan dengan metode FRAP, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ sebagai standar (Vichitphan, 2007). Pada pembuatan reagen FRAP, larutan buffer asetat 0,1 M (pH 3, 6), larutan TPTZ (*2,4,6-tripyridyl-s-triazine*) 10 mM dalam HCl 40 mM dan larutan $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 20 mM disiapkan terlebih dahulu kemudian larutan tersebut dicampur dengan perbandingan 10:1:1. Sebanyak 50 μ L larutan sampel dan 150 μ L akuades ditambahkan ke dalam tabung yang telah berisi 1,5 mL reagen FRAP. Campuran diinkubasi selama 8 menit di tempat gelap pada suhu ruang. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 594 nm dan hasilnya dihitung dalam Fe^{+2} ekuivalen (Fe^{+2} mM) menggunakan kurva standar $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,4; 0,8; 1,2; 1,6; dan Analisis total aktivitas antioksidan dengan metode FRAP, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ sebagai standar (Vichitphan, 2007). Pada pembuatan reagen FRAP, larutan buffer asetat 0,1 M (pH 3, 6), larutan TPTZ (*2,4,6-tripyridyl-s-triazine*) 10 mM dalam HCl 40 mM dan larutan $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 20 mM disiapkan terlebih dahulu kemudian larutan tersebut dicampur dengan perbandingan 10:1:1. Sebanyak 50 μ L larutan sampel dan 150 μ L akuades ditambahkan ke dalam tabung yang telah berisi 1,5 mL reagen FRAP. Campuran diinkubasi selama 8 menit di tempat gelap pada suhu ruang. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 594 nm dan hasilnya dihitung dalam Fe^{+2} ekuivalen (Fe^{+2} mM) menggunakan kurva standar $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,4; 0,8; 1,2; 1,6; dan 2 mM.

Uji Aktivitas Antioksidan Metode FTC (*Ferric Thiocyanate*).

Metode FTC (Lindsey *et al.* 2002). Sebanyak 30 μ L asam linoleat ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 3 mL metanol. Sebanyak 30 μ L supernatan di-tambahkan ke dalam campuran kemudian divortex. Campuran diinkubasi selama 24 jam di tempat gelap pada suhu ruang. Sebanyak 30 μ L $FeCl_2$ 0,014 M dan 30 μ L KSCN 30% ditambahkan pada campuran. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 500 nm. Untuk tabung kontrol, dilakukan pengujian yang sama terhadap vitamin C sebagai kontrol .

Uji Aktivitas Total Antioksidan (TAA)

a. Pembuatan reagen fosfomolibdat

Sebanyak 3,0 ml asam sulfat ditambahkan dengan 0,199 gram natrium fosfat. Kemudian ditambahkan pula sebanyak 0,247 gram ammonium molibdat. Ketiganya dilarutkan dalam aquadest hingga volume tepat 50,0 ml. Reagen ini harus selalu dibuat baru (Borah *et al*, 2011).

b. Sebanyak 1,0 ml larutan standar maupun sampel dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambah dengan 1,0 ml reagen fosfomolibdat. Campuran diinkubasi pada suhu 95 C selama 1 jam. Setelah diinkubasi ditambah dengan metanol absolut hingga tepat 5,0 ml kemudian didiamkan hingga *operating time*. Semua larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimumnya (695 nm) (Syahwar *et al*, 2012).

Imunomodulator

Tahapan atau prosedur kerja pada penelitian untuk mengetahui aktivitas ekstrak beras hitam sebagai imunomodulator dilakukan dengan mengukur kemampuan proliferasi limfosit (metode *CFSE*, Abcam 2013). Adapun tahap-tahap pelaksanaannya adalah sebagai berikut:

1. Isolasi limfosit dari limpa

Limfosit diisolasi dari limpa mencit dua minggu pasca transplantasi. Limpa diletakkan pada cawan 60 mm steril yang berisi 5 mL medium RPMI 1640. Limpa dipegang pada salah satu ujungnya dengan pinset steril, kemudian dilakukan penekanan sepanjang limpa. Suspensi sel yang diperoleh dipipet sedikit demi sedikit dengan pipet pasteur dan dilewatkan pada *nylon net* steril, dimasukkan ke dalam tabung steril. Kemudian ditambah dengan medium RPMI 1640 sampai 2/3 volume tabung. Suspensi sel tersebut disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 2000-3000 rpm. Filtrat dibuang, endapan ditambah kembali dengan medium RPMI 1640 dan disentrifugasi. Pencucian dilakukan 2 kali. Setelah itu endapan ditambah dengan 10 mL dapar amonium klorida untuk melisis eritrosit dan disentrifugasi. Kemudian endapan dicuci kembali dengan medium RPMI 1640 sebanyak 2 kali pencucian. Setelah dicuci, endapan ditambah dengan 3 mL medium RPMI 1640 yang mengandung 5% FBS, gentamisin, fungizone (untuk mencegah kontaminasi bakteri dan jamur) dan L-glutamin (untuk pertumbuhan sel).

2. Pemeliharaan dan pengujian proliferasi limfosit secara *in vitro*

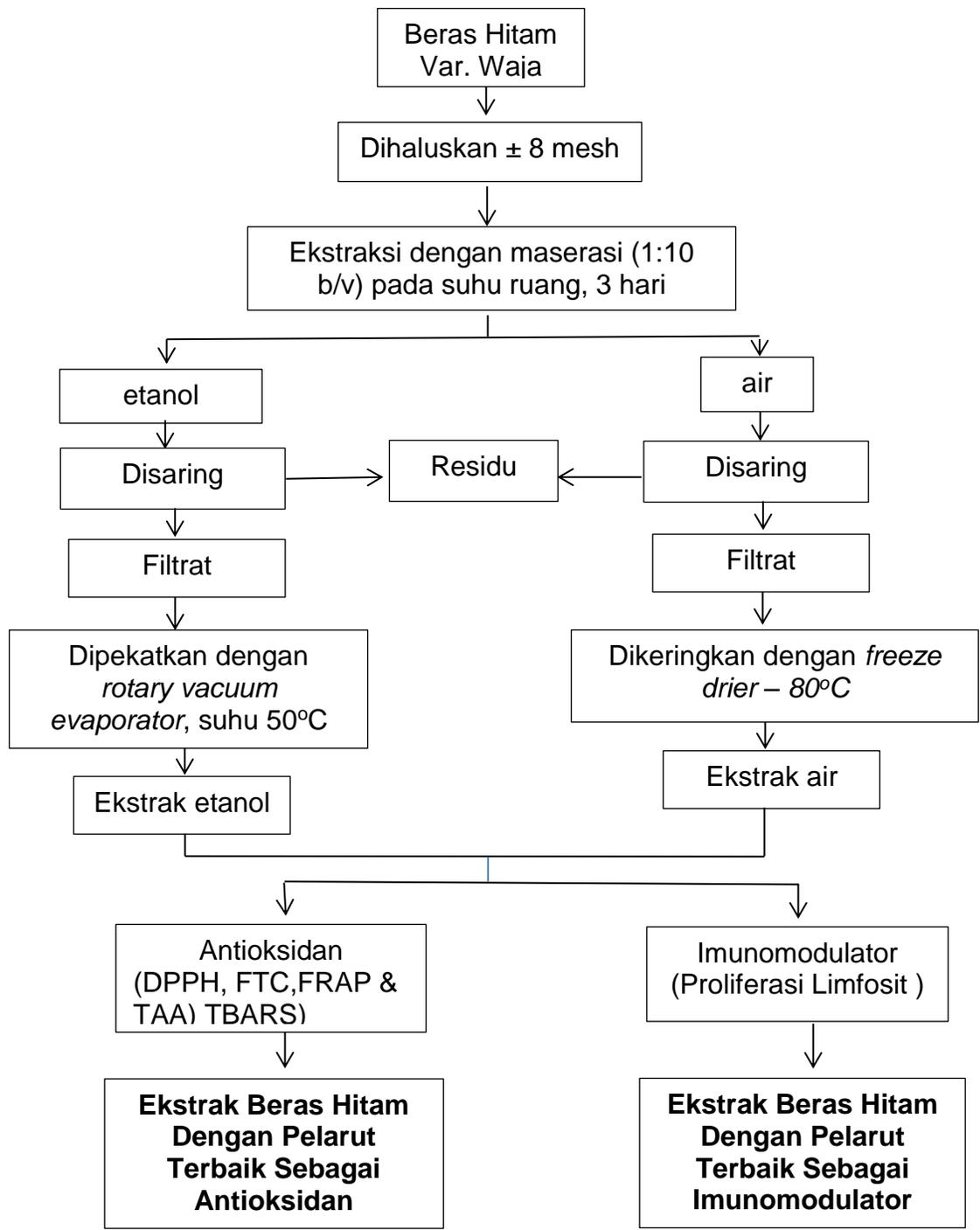
Limfosit dengan konsentrasi 1×10^6 sel/mL dipelihara pada medium RPMI 1640 yang mengandung 5% FBS, fungizone, gentamisin, L-glutamin, dan asam amino non esensial. Selanjutnya ditambah ekstrak beras hitam sesuai perlakuan dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% suhu 37°C selama 48 jam.

3. Penentuan jumlah limfosit (metode *CFSE*, Abcam,2013).

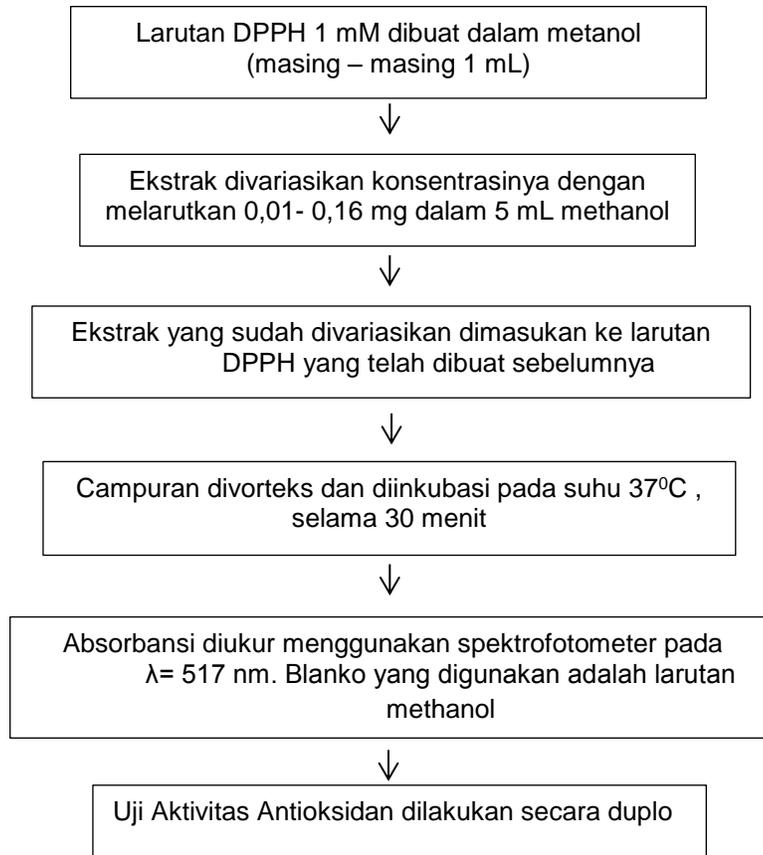
Penentuan jumlah limfosit dilakukan dengan cara memanen limfosit 48 jam setelah perlakuan. Sebanyak 0,1 mL suspensi sel diambil dengan mikropipet dan ditetesi dengan *CFSE* dan diinkubasi 10-15 menit pada suhu 37°C, selanjutnya disentrifuse 2500 rpm. Endapan yang diperoleh ditambah dengan media RPMI dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk selanjutnya diamati proliferasi limfosit menggunakan *flowcytometer*.

3.3.3. Analisa Data

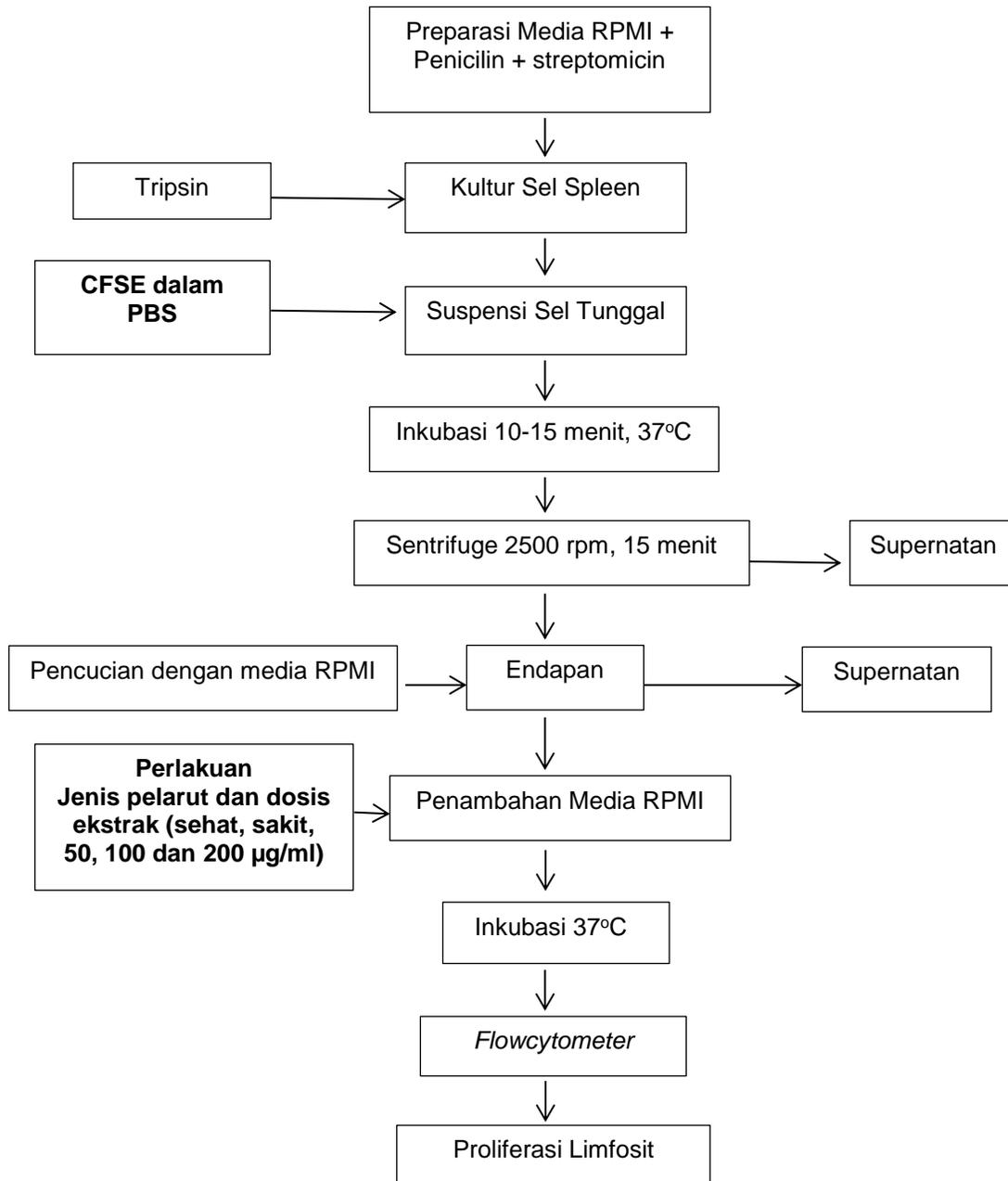
Hasil pengamatan pada penelitian tahap I ini diuji dengan ANOVA dengan selang kepercayaan 95%. Data yang digunakan berupa aktivitas antiinflamasi pada berbagai jenis pelarut dan konsentrasi ekstrak beras hitam, yang diuji statistik dengan uji normalitas dan homogenitas varian. Data yang telah berdistribusi normal dengan varian homogen, diuji dengan *two-way* ANOVA dengan nilai $\alpha = 0,05\%$. Apabila diperoleh $p > 0,05$ maka tidak terdapat perbedaan yang nyata antar masing-masing perlakuan, sebaliknya jika $p < 0,05$ maka menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan yang dibandingkan. Kemudian dilakukan *post-hoc test* dengan uji Tukey HSD (*High Significant Difference*). Analisis data dilakukan dengan menggunakan Minitab 20.



Gambar 7. Diagram Alir Penelitian Tahap I



Gambar 8. Diagram Alir Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH ((Blois, 1985 dalam Hanani *et al.*, 2005).



Gambar 9. Diagram Alir Uji Imunomodulator /Proliferasi Limfosit (Abcam, 2013)

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan sampel ekstrak etanol dan air beras hitam (*Oryza sativa* L. *indica*). Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara maserasi karena metode ini merupakan metode ekstraksi yang paling sederhana dan sesuai untuk ekstraksi senyawa-senyawa yang tidak tahan panas (Salamah dan Hanifah, 2014). Pemilihan etanol sebagai pelarut karena etanol mampu menggabungkan gugus polar dan non polar (Ukieyanna dan Elsha, 2012) sehingga komponen polar dan non polar dalam beras hitam dapat terekstrak. Adapun pemilihan air sebagai pelarut, karena sampel adalah bahan pangan, yang dalam pengolahannya selalu menggunakan air.

Berdasarkan hasil penelitian ini maka dapat diketahui rendemen, kadar total fenol dan kadar total flavonoid, aktivitas antioksidan dan imunomodulator dari ekstrak etanol dan air beras hitam (*Oryza sativa* L. *indica*) secara *in vitro*. Hasil pengamatan secara lengkap adalah sebagai berikut:

4.1. Penelitian Tahap 1 (Rendemen, Total Fenol dan Total Flavonoid Ekstrak Etanol dan Air Beras Hitam)

Rendemen yang diperoleh dari ekstraksi beras hitam menggunakan pelarut etanol dan air dapat dilihat pada Tabel 2 di bawah ini.

Tabel 2. Rendemen, Rerata Kadar Total Fenol dan Flavonoid

Ekstrak	Rendemen (%)	Kadar Total Fenol (mg GAE/g ekstrak)	Kadar Flavonoid (mg QE/g ekstrak)
Etanol	19,35	95,87 ± 0,71 a	37,75 ± 0,23 a
Air	16,11	58,86 ± 0,23 b	20,53 ± 0,19 b

Keterangan : Berbeda nyata bila angka diikuti huruf yang berbeda pula (Tukey 5%)

Rendemen yang diperoleh dari ekstraksi menggunakan pelarut etanol sebesar 19,35 %, lebih banyak bila dibandingkan dengan rendemen yang diperoleh dari ekstraksi menggunakan air yaitu sebesar 16,11 %. Hal ini sesuai dengan pendapat Ukieyanna dan Elsha (2012) bahwa etanol mampu menggabungkan gugus polar dan non polar sehingga rendemen yang diperoleh lebih banyak bila dibandingkan dengan rendemen ekstrak air, yang hanya mampu mengekstrak senyawa dengan gugus polar saja.

Kadar Total Fenol

Pengukuran kadar total fenol merupakan dasar dilakukannya pengujian aktivitas antioksidan karena telah diketahui bahwa senyawa fenolik berperan dalam mencegah terjadinya peristiwa oksidasi. Hal ini karena fenol mampu menyumbang elektron atau atom hidrogen pada radikal bebas sehingga dapat bertindak sebagai pereduksi, pengkelat logam dan peredam radikal bebas (Javanraedi *et al.*, 2003). Pengukuran kadar total fenol menggunakan pereaksi Folin-Ciocalteu, yang terdiri dari asam fosfomolibdat dan asam fosfotungstat. Pereaksi ini akan tereduksi oleh senyawa polifenol menjadi molibdenum-tungsten, ditandai dengan terbentuknya warna yang kemudian diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 756 nm. Kadar total fenol dalam ekstrak dapat diketahui dengan cara membandingkannya dengan grafik standar asam galat (Kusumaningati, 2009). Asam galat digunakan sebagai standar karena senyawa ini sangat efektif untuk membentuk senyawa kompleks dengan pereaksi Folin-Ciocalteu (Julkunen-Tiito dan Kiay, 2011). Persamaan regresi yang diperoleh dari grafik standar asam galat adalah $y = 0,9524 x + 0,0564$ dengan $R^2 = 0,9758$.

Adapun hasil pengukuran rerata kadar total fenol masing-masing ekstrak dapat dilihat pada Tabel 2. Rerata kadar total fenol ekstrak etanol sebesar $95,87 \pm 0,71$ mg GAE/g ekstrak, sedangkan rerata kadar total fenol ekstrak air sebesar $58,86 \pm 0,23$ mg GAE/g ekstrak, kedua perlakuan menunjukkan berbeda nyata pada $p < 0,05$. Rerata kadar total fenol ekstrak etanol lebih besar bila dibandingkan dengan rerata kadar total fenol ekstrak air. Hal ini karena etanol mampu menggabungkan gugus polar dan non polar (Ukieyanna dan Elsha, 2012) sehingga komponen polar dan non polar dalam beras hitam dapat terekstrak lebih banyak dan kandungan senyawa fenolnya juga lebih banyak bila dibandingkan dengan ekstrak air. Menurut Houghton dan Rahman (1998), air adalah kelompok pelarut sangat polar sehingga senyawa yang terekstrak adalah kelompok senyawa yang sangat polar saja. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa bioaktif yang terdapat dalam ekstrak beras hitam, diduga kelompok senyawa non polar dan polar lebih banyak bila dibandingkan dengan kelompok senyawa sangat polar.

Kadar Flavonoid

Penentuan kadar flavonoid ekstrak etanol dan air beras hitam dilakukan dengan mereaksikan masing-masing ekstrak dengan NaNO_2 dan AlCl_3 sehingga larutan berwarna kuning. Hal ini karena gugus keton atau gugus hidroksil dari flavon dan flavonol dan AlCl_3 membentuk kompleks asam yang stabil sehingga terbentuk larutan kuning (Karadag *et.al.*,

2009), ditambahkan larutan NaOH agar tercipta suasana basa yang ditandai dengan berubahnya warna larutan menjadi orange hingga merah (Sri dan Painsi, 2010). Perubahan ini diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 415 nm. Semakin pekat warna kuning yang terbentuk maka semakin banyak kandungan senyawa flavonoid dalam suatu ekstrak. Kadar total flavonoid dalam ekstrak dapat diketahui dengan cara membandingkannya dengan grafik standar quercetin (Taie *et al.*, 2008). Persamaan regresi yang diperoleh dari grafik standar quercetin adalah $y = 96,26 x + 0,1083$ dengan $R^2 = 0,9938$.

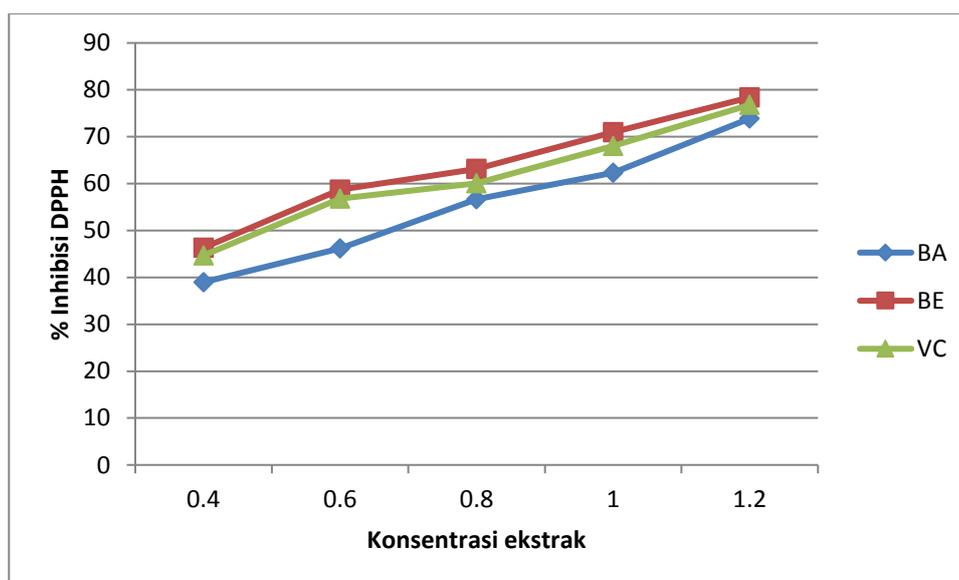
Hasil pengukuran rerata kadar total flavonoid masing-masing ekstrak dapat dilihat pada Tabel 2. Rerata kadar total flavonoid ekstrak etanol sebesar $37,75 \pm 0,23$ mg QE/g ekstrak, sedangkan rerata kadar total flavonoid ekstrak air sebesar $20,53 \pm 0,19$ mg QE/g ekstrak, keduanya menunjukkan berbeda nyata pada $p < 0,05$. Rerata kadar total flavonoid ekstrak etanol lebih besar bila dibandingkan dengan rerata kadar total flavonoid ekstrak air. Hal ini karena flavonoid merupakan senyawa polar. Senyawa polar akan larut dalam pelarut polar seperti butanol, metanol, etanol, dan air (Wijono, 2003). Lebih lanjut Prasad *et al.*, (2009) menyatakan bahwa flavonoid merupakan kelompok senyawa fenolik yang banyak terdapat di alam seperti pada sayur-sayuran, buah-buahan, biji-bijian dan lain-lain.

4.2. Penelitian Tahap 2 (Uji Aktivitas Antioksidan)

Uji aktivitas anti oksidan beras hitam dilakukan dengan 4 metode yang berbeda yaitu FTC (Ferri-tiosianat), DPPH, FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), dan TAA (Total Antioxidant Activity). Prinsip kerja metode FTC adalah mengukur jumlah peroksida pada proses awal peroksidasi lemak dan kompleks reaksi ferri-tiosianat yang terbentuk dibaca pada panjang gelombang 500 nm (Aris dkk., 2009). Absorbansi yang rendah menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi karena radikal bebas yang terbentuk selama peroksidasi lemak membentuk produk akhir yang stabil (Muhtadi, dkk., 2014). Pengukuran proses peroksidasi lemak dilakukan hingga diperoleh nilai absorbansi maksimum dari kontrol negatif dan pada penelitian ini nilai absorbansi maksimum kontrol negatif diperoleh pada hasil ke-6. Sampel dikatakan positif memiliki aktivitas antioksidan apabila memiliki nilai absorbansi dibawah kontrol negatif. Gambar 1 menunjukkan bahwa sampel yang diuji yaitu ekstrak air beras hitam (BA), ekstrak etanol beras hitam (BE), dan vitamin C sebagai kontrol, ketiganya memiliki aktivitas antioksidan karena nilai absorbansinya dibawah kontrol negatif.

Metode DPPH

Metode DPPH merupakan informasi dasar tentang aktivitas antioksidan suatu ekstrak dan indikator terdapatnya komponen phenol dan flavonoid pada suatu ekstrak (Rice-Evans, 2001). Metode ini dipilih karena paling banyak digunakan secara *in vitro*, selain itu metode ini dikenal sebagai metode pengukuran aktivitas antioksidan yang sensitif, sederhana, murah dan tidak membutuhkan banyak reagen (Ozcelik *et al.*, 2003). Radikal DPPH distabilkan dengan adanya donor satu atom H dari antioksidan atau donor elektron membentuk DPPHH. Ketika radikal DPPH direduksi oleh antioksidan maka warna DPPHH yang telah stabil akan berubah menjadi kuning (Molyneux, 2004). Perubahan intensitas warna ini sebanding dengan besar kecilnya aktivitas antioksidan suatu bahan bila konsentrasi dibuat sama.



Ket : BA= Ekstrak Air, Ekstrak Etanol dan VC= Standart Vit C

Gambar 10. Aktivitas antioksidan ekstrak beras hitam dengan metode DPPH

Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode DPPH ini menggunakan asam askorbat sebagai standar. Asam askorbat digunakan sebagai standar karena berfungsi sebagai antioksidan sekunder yaitu menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai, yang mampu menangkap berbagai radikal bebas ekstraseluler. Hal ini karena asam askorbat mempunyai gugus hidroksi bebas yang bertindak sebagai penangkap radikal

bebas dan mempunyai gugus polihidroksi yang dapat meningkatkan aktivitas antioksidan (Kim, 2005).

Hasil pengukuran absorbansi semua perlakuan tertera pada Lampiran 4 dan persen penghambatan radikal DPPH pada berbagai konsentrasi dapat dilihat pada Gambar 29. Adapun rerata aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan air beras hitam dengan standar asam askorbat menggunakan metode DPPH, yang dinyatakan dengan IC_{50} sebagai indikator kemampuan hambatan sebesar 50% dari sampel, dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai IC_{50} Ekstrak Etanol, Air Beras Hitam dan Standart Asam Askorbat dengan Metode DPPH

Perlakuan	IC_{50} (ppm)
Ekstrak Etanol	13,000 b
Ekstrak Air	14,290 c
As. askorbat	11,888 a

Keterangan : Berbeda nyata bila angka diikuti huruf yang berbeda (Tukey 5%)

Nilai IC_{50} diperoleh dari persamaan regresi dengan konsentrasi sebagai sumbu x dan nilai aktivitas antioksidan sebagai sumbu y (Lampiran 4). Persamaan regresi untuk ekstrak etanol adalah $y = 3,4439 x + 5,2287$ dengan $R^2 = 0,9256$ sehingga diperoleh nilai IC_{50} sebesar 13,000 ppm. Persamaan regresi untuk ekstrak air adalah $y = 3,2107 x + 4,1187$ dengan $R^2 = 0,9507$ sehingga diperoleh nilai IC_{50} sebesar 14,290 ppm. Sedangkan persamaan regresi untuk standar asam askorbat adalah $y = 03,7063 x + 5,9401$ dengan $R^2 = 0,9202$ sehingga diperoleh nilai IC_{50} sebesar 11,888 ppm. Nilai IC_{50} antar perlakuan menunjukkan berbeda nyata pada $p < 0,05$.

Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak air mempunyai nilai IC_{50} tertinggi, diikuti nilai IC_{50} ekstrak etanol dan selanjutnya asam askorbat sehingga yang mempunyai aktivitas antioksidan tertinggi adalah standar asam askorbat dan yang mempunyai aktivitas antioksidan terendah adalah ekstrak air karena semakin rendah nilai IC_{50} maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Namun demikian, baik ekstrak air maupun ekstrak etanol mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi karena mempunyai nilai IC_{50} kurang dari 200 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini sesuai dengan pendapat Molyneux (2004) yang menyatakan bahwa bahan uji dikatakan mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi bila mempunyai nilai IC_{50} kurang dari 200 $\mu\text{g/ml}$.

Metode FRAP

Nilai FRAP dinyatakan dalam mg equivalen asam askorbat (AAE)/gr ekstrak dari persamaan regresi larutan standar asam askorbat, dengan konsentrasi sebagai sumbu x dan sumbu y adalah nilai absorbansi (Lampiran 5). Persamaan regresi yang diperoleh adalah $y = 0,5656 x - 0,0372$ dengan $R^2 = 0,989$. Fungsi persamaan regresi ini digunakan untuk menghitung nilai aktivitas antioksidan sampel dengan cara memasukkan nilai absorbansi masing-masing ekstrak ke dalam persamaan tersebut.

Hasil pengukuran absorbansi dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan air beras hitam dapat dilihat pada Tabel 4, yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol mempunyai aktivitas antioksidan lebih tinggi (59,521 mg AAE/g ekstrak) bila dibandingkan dengan aktivitas antioksidan ekstrak air (49,979 mg AAE/g ekstrak) dan antar perlakuan menunjukkan berbeda nyata pada $p < 0,05$.

Tabel 4. Rerata Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol dan Air Beras Hitam Dengan Metode FRAP

Sampel	Aktivitas Antioksidan (mg AAE/g ekstrak)
Ekastrak Etanol	59,521 ± 0,102 a
Ekstrak Air	49,979 ± 0,124 b

Keterangan : tidak berbeda nyata bila angka diikuti huruf yang sama, sedangkan angka yang diikuti huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata (Tukey 5%)

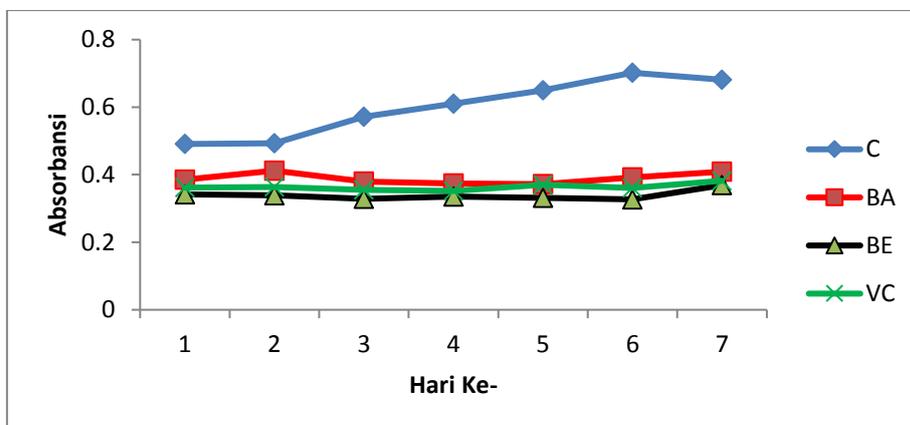
Jadi ekstrak etanol lebih kuat mereduksi ion Fe^{3+} -TPTZ menjadi Fe^{2+} -TPTZ sehingga ekstrak etanol mempunyai aktivitas antioksidan lebih kuat di-bandingkan dengan ekstrak air. Hal ini berbeda dengan hasil penelitian Dahham *et al.* (2016) yang menunjukkan bahwa ekstrak air *Terfezia claveryi* mempunyai nilai FRAP lebih tinggi (83,24 mg AAE.g ekstrak) bila dibandingkan dengan nilai FRAP ekstrak etanol (48,53 mg AAE.g ekstrak). Pada penelitian ini hasil rendemen ekstrak air juga lebih tinggi bila dibandingkan dengan rendemen ekstrak etanol. Jadi kemungkinan terdapat hubungan antara rendemen dan nilai FRAP, yaitu semakin tinggi rendemen ekstrak maka semakin tinggi pula nilai FRAP yang diperoleh.

Metode Penghambatan Peroksidasi Lemak/FTC (*Ferric Thiocyanate*).

Metode FTC (*Ferric Thiocyanate*) menggunakan asam lenoleat yang diinkubasi agar mengalami oksidasi, sebagai senyawa radikal yang bersifat reaktif. Aktivitas antioksidan suatu senyawa diukur berdasarkan kemampuannya dalam menghambat teroksidasinya asam lenoleat tersebut. Sebelum dilakukan pengukuran pada sampel, perlu dilakukan

pengamatan untuk mengetahui waktu yang diperlukan untuk mendapatkan absorbansi maksimum, baik pada kontrol, sampel dan standar. Adapun hasil pengamatan tersebut dapat dilihat pada Gambar 11.

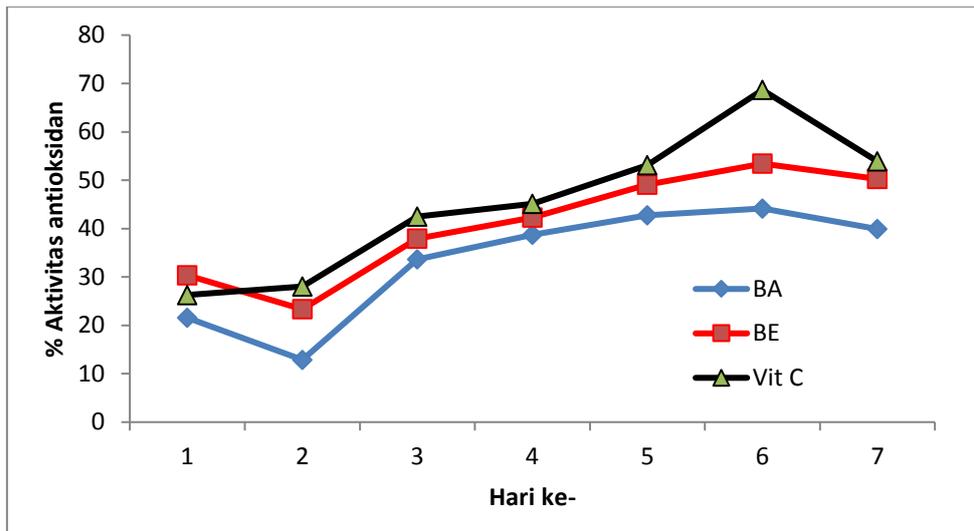
Gambar 11 menunjukkan kenaikan jumlah peroksida pada proses awal peroksidasi lemak yang ditunjukkan dengan nilai absorbansi kontrol negatif, sampel dan standar asam askorbat dari hari ke-0 sampai hari ke-7. Apabila absorbansi sampel berada dibawah absorbansi kontrol negatif maka sampel menunjukkan positif memiliki aktivitas antioksidan. Selanjutnya data absorbansi digunakan untuk perhitungan aktivitas antioksidan, sehingga diperoleh grafik berikut.



Keterangan: C=Kontrol (-); BA= ekstrak air; BE= ekstrak etanol dan VC= standart asam askorbat

Gambar 11. Profil kenaikan absorbansi metode FTC (ferri tiosianat) dalam waktu 7 hari

Gambar 12 menunjukkan bahwa kemampuan penghambatan peroksidasi lemak dari standar asam askorbat lebih tinggi jika dibandingkan dengan kemampuan penghambatan peroksidasi lemak dari ekstrak etanol dan air beras hitam. Adapun aktivitas antioksidan yang digunakan adalah aktivitas antioksidan tertinggi yaitu pada hari ke-6. Persen penghambatan peroksidasi lemak pada hari ke-6 dapat dilihat pada Tabel 5.



Keterangan: BA= ekstrak air; BE= ekstrak etanol dan VC= asam askorbat

Gambar 12. Profil kenaikan % penghambatan peroksidasi lemak dalam waktu 6 hari

Tabel 5 menunjukkan aktivitas antioksidan semua sampel pada hari ke-6. Aktivitas antioksidan tertinggi pada standar asam askorbat yaitu sebesar 68,65 %, sedangkan aktivitas antioksidan ekstrak etanol beras hitam lebih besar (53,42 %) bila dibandingkan dengan aktivitas antioksidan ekstrak air (44,16 %) beras hitam. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Lestario, dkk (2009) dengan metode yang sama, bahwa ekstrak etanol daun ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn) mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih tinggi (93,17 %) bila dibandingkan dengan ekstrak air (15,62 %). Namun berbeda dengan hasil penelitian Gul *et al.*, (2013) yang menyatakan bahwa ekstrak air daun *Abrus precatorius* mempunyai aktivitas antioksidan lebih tinggi (302,02 %) bila dibandingkan dengan ekstrak etanol (285,22 %).

Tabel 5. Persen Penghambatan Peroksidasi Lemak Pada Hari ke 6

Sampel	Absorbansi Sampel	Absorbansi Kontrol Negatif	Aktivitas Antioksidan (%)
Etanol	0,361	0.702	53,42 b
Air	0,327		44,16 c
Vitamin C	0,392		68,65 a

Keterangan : tidak berbeda nyata apabila angka diikuti huruf yang sama, sedangkan angka yang diikuti huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata (Tukey 5%)

Aktivitas antioksidan masing-masing ekstrak berbeda nyata ($p < 0,05$) karena dipengaruhi kandungan senyawanya. Menurut Sroynak *et al.* (2013) proses peroksidasi

lemak dapat dihambat oleh senyawa fenolik dan flavonoid karena dapat mendonorkan hidrogen bagi radikal bebas. Senyawa antioksidan ini mampu menghambat pembentukan radikal hidroperoksi pada fase awal peroksidasi lemak melalui pemecahan reaksi berantai.

Metode Aktivitas Antioksidan Total/AAT

Nilai AAT diperoleh dari penyetaraan nilai absorbansi sampel ke dalam persamaan regresi dari grafik standar asam askorbat, dimana konsentrasi sebagai sumbu x dan sumbu y adalah nilai absorbansi dari larutan standar asam askorbat (Lampiran 6). Persamaan regresi yang diperoleh adalah $y = 0,5656 x - 0,0372$ dengan $R^2 = 0,989$. Fungsi persamaan regresi ini digunakan untuk menghitung nilai aktivitas antioksidan sampel dengan cara memasukkan nilai absorbansi masing-masing ekstrak ke dalam persamaan tersebut.

Absorbansi sampel disetarakan dengan absorbansi asam askorbat. Absorbansi ini menggambarkan kekuatan aktivitas antioksidan sampel. Absorbansi larutan sampel dimasukkan sebagai fungsi y pada persamaan regresi linier standar asam askorbat $y = 0,495x + 0,0433$ dengan $R_2 = 0,9803$. Nilai x yang diperoleh dikalikan volume stok dan faktor pengenceran kemudian disetarakan terhadap satu gram ekstrak. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6 menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak etanol lebih besar yaitu $132,047 \pm 0,187$ mg AAE/g ekstrak, bila dibandingkan aktivitas antioksidan ekstrak air yaitu $96,556 \pm 0,867$ mg AAE/g ekstrak, dan antar perlakuan menunjukkan berbeda nyata pada $p < 0,05$. Hal ini berarti senyawa antioksidan yang terdapat pada beras hitam lebih banyak pada ekstrak etanol daripada di ekstrak air karena pelarut etanol mampu menggabungkan gugus polar dan non polar (Ukieyanna dan Elsha, 2012) sehingga komponen polar dan non polar dalam beras hitam lebih banyak terekstrak.

Tabel 6. Rerata Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol dan Air Terhadap Standar Asam Askorbat Dengan Metode AAT

Sampel	Aktivitas Antioksidan (%) Metode AAT
Ekstrak Etanol	$132,047 \pm 0,017$ a
Ekstrak Air	$96,556 \pm 0,105$ b

Keterangan : berbeda nyata apabila angka diikuti huruf yang berbeda, sedangkan angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata (Tukey 5%)

Berdasarkan keempat metode uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa baik ekstrak etanol maupun ekstrak air beras hitam keduanya memiliki aktivitas antioksidan. Ekstrak etanol memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan ekstrak air. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Chaudhary *et al.* (2015) bahwa dengan

metode AAT, ekstrak etanol *Nardostachys jatamansi* mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih tinggi (163,70 %) bila dibandingkan dengan ekstrak air (37,04 %).

Beras hitam memiliki aktivitas antioksidan karena adanya senyawa fenolik. Beras hitam memiliki jumlah senyawa fenolik yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan beras putih sedangkan jumlah senyawa fenolik sangat berhubungan dengan aktivitas antioksidan. Menurut Caro *et al.*, (2013), pigmen beras hitam memiliki peran yang paling baik diantara beras dengan warna lainnya. Pigmen yang terdapat pada beras hitam juga kaya akan flavonoid dan kadarnya lima kali lipat lebih banyak daripada beras putih. Menurut Dwijayanti *dkk.* (2016), flavonoid merupakan senyawa fenolik yang berperan sebagai antioksidan dan mencegah kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas. Kedua senyawa tersebut dapat mendonorkan ion hidrogen, menangkap radikal bebas secara langsung, memperbaiki DNA, memperbaiki kerusakan sel dan merangsang aktivitas sel-sel imunokompeten.

4.3. Penelitian Tahap 3 (Uji Aktivitas Imunomodulator)

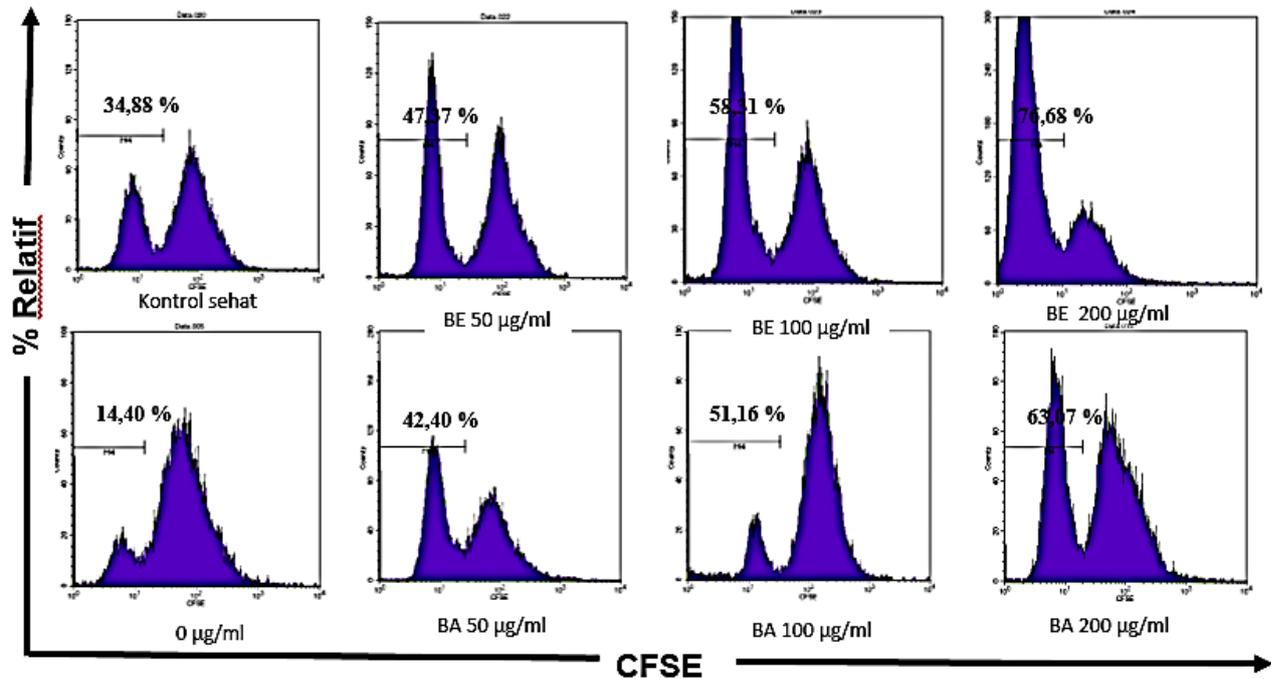
Sel imunokompeten yang dilabel dengan CFSE menunjukkan aktivitas pembelahan yang lebih tinggi ketika distimulus dengan pemberian ekstrak etanol dan air beras hitam (Gambar 10 dan Tabel 7). Sel yang mengalami pembelahan terdapat pada peak sebelah kiri pada analisis *flow-cytometri* karena menunjukkan penurunan pendaran CFSE. Hasil pengamatan jumlah sel (%) imunokompeten secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 7 dan rerata jumlah relatif (%) sel yang mengalami proliferasi akibat perlakuan ekstrak etanol dan air dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Rerata Jumlah Relatif (%) Sel Imunokompeten Yang Mengalami Proliferasi Akibat Perlakuan Ekstrak Etanol dan Air

Dosis ($\mu\text{g/ml}$)	Jumlah Relatif (%) Sel Imunokopeten	
	Ekstrak Etanol	Ekstrak Air
0	14,40 \pm 0,053 e	14,40 \pm 0,053 e
50	47,37 \pm 0,095 c	42,40 \pm 0,950 c
100	58,31 \pm 0,144 b	51,16 \pm 1,090 b
200	76,68 \pm 0,910 a	63,07 \pm 1,065 a
Kontrol Sehat	34,88 \pm 0,900 d	34,88 \pm 1,050 d

Keterangan : berbeda nyata apabila angka diikuti huruf yang tidak sama, sedangkan angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata (Tukey 5%)

Tabel 7 menunjukkan bahwa perlakuan kontrol tanpa ekstrak sebesar $14,40 \pm 0,053$. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak air maka semakin tinggi pula jumlah relatif (%) sel imunokompeten yang berproliferasi. Perlakuan pemberian ekstrak air beras hitam menunjukkan bahwa jumlah relatif (%) sel yang berproliferasi lebih tinggi secara signifikan ($p \leq 0,05$) dibandingkan dengan kontrol tanpa perlakuan dan kontrol sehat.



Gambar 13. Hasil pengamatan proliferasi sel imunokompeten (metode CFSE)

Kemampuan ekstrak etanol dan air beras hitam dalam menginduksi proliferasi sel karena mengandung polifenol/flavonoid dan terbukti mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi, sehingga terbukti memiliki efek imunomodulasi (Nair *et al.*, 2006; Sternberg *et al.*, 2009). Hal ini juga sesuai dengan pendapat Lin dan Tang (2007), yang melaporkan bahwa kemampuan imunomodulasi melalui stimulasi proliferasi splenosit memiliki korelasi positif dengan kandungan polifenol dan flavonoid. Menurut Vaghasiya *et al.* (2010) dan Bharani *et al.* (2010), mekanisme aktivitas imunomodulator melalui stimulasi fagositosis, aktivasi makrofag, peningkatan fungsi sel imun, peningkatan produksi immunoglobulin spesifik, peningkatan jumlah sel darah putih dan IL-2.

Pandoyo (2000) menambahkan bahwa flavonoid dan senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan, dapat berperan sebagai antigen yang mampu dikenal oleh reseptor sel B maupun sel T. Senyawa tersebut dapat berikatan dengan reseptor permukaan sel T (*T*

cell reseptor/TCR) melalui ikatan hidrogen, sedangkan sel B dapat terikat pada reseptor permukaannya (Ig M). Ikatan tersebut bersama dengan IL-1 dari APC (*Antigen Presenting Cell*) dapat mengaktivasi G-protein sehingga terbentuk fosfolipase C, yang mampu menghidrolisis fosfatidil inositol biofosfat (PIP₂) menjadi produk reaktif diasilgliserol (DAG) dan inositol trifosfat (IP₃). IP₃ selanjutnya menstimulasi pelepasan Ca²⁺ ke dalam sitoplasma. Akibatnya konsentrasi Ca²⁺ meningkat dan menstimulasi kerja enzim protein kinase C dan 5-lipoxygenase sehingga memproduksi IL-2. Produksi IL-2 ini kemudian mengaktivasi sel B maupun sel T untuk berproliferasi.

Peningkatan jumlah relatif sel yang mengalami proliferasi pada pemberian ekstrak beras hitam menunjukkan bahwa ekstrak beras hitam tidak mempengaruhi NF-κB pada pathway proliferasi sel. Kemampuan ekstrak beras hitam dalam menginduksi proliferasi sel terkait dengan kemampuannya dalam mempercepat penyembuhan luka. Baie dan Sheikh (2000) menjelaskan beberapa kandungan ekstrak ikan gabus...protein berperan sebagai bahan pembangun sel-sel dalam jaringan tubuh. Albumin dapat mempercepat penyembuhan luka dengan meningkatkan proliferasi sel.

Proliferasi sel erat kaitannya dengan progresi dari siklus sel. Peningkatan proliferasi sel dapat terjadi apabila sel diinduksi untuk memasuki fase S dan atau fase G₂/M. Pada penelitian ini senyawa yang terkandung dalam ekstrak beras hitam terbukti dapat menginduksi sel memasuki fase G₂/M dalam siklus sel. Senyawa yang terkandung dalam ekstrak beras hitam diduga dapat meningkatkan level cyclin A dan cyclin B. Adolfsson, dkk(2001) menjelaskan bahwa vitamin E dapat meningkatkan produksi sitokin IL-2 oleh sel T naive. IL-2 merupakan growth factor bagi sel imunokompeten yang dapat meningkatkan konsentrasi sikli D₂, E, dan A yang berperan penting dalam siklus sel. Setelah melewati fase S, cyclin A akan melepas Cdk2 dan mengikat Cdk1 menyebabkan kondensasi kromatin yang dibutuhkan untuk pembelahan sel (Lapenna dan Giordano, 2009).

Memasuki fase M, cyclin A akan didegradasi dan terjadi peningkatan ekspresi cyclin B yang akan mengikat Cdk1. Kompleks cyclin B1 dan B2 dengan cdk1 adalah komponen fase M atau maturing factor (MPF) yang meregulasi proses pembentukan benang spindle dan pasangan sister chromatid. Pines dan Hunter (1990) menjelaskan bahwa cyclin B meningkat selama fase mitosis sel. Kompleks cyclin B1/Cdk1 akan memacu mitosis dan berperan penting dalam kontrol *rearrangement* mikrotubul selama mitosis (Dhulipala, dkk., 2006)

4.4. Luaran Yang Dihasilkan

Penelitian ini menghasilkan beberapa luaran seperti :

- a. Submit pada jurnal Internasional *Food and Agricultural Immunology/ Elsevier* dengan judul “Inflammatory Evaluation of Black Rice Against TNF- α , IFN- γ and IL-6 Cytokines Produced by Immunocompetend Cells”. Jurnal ini termasuk kelompok SCOPUS dengan Impact Factor 1,54 (Lampiran 2a).
- b. Hasil penelitian pendahuluan telah terbit pada Jurnal Teknologi Pangan REKAPANGAN (ISSN 1978-4163 Vol. 10 No.1 Juni 2016).(Lampiran 2b).
- c. Disampaikan pada Seminar Nasional sebagai **pemakalah**, yang diadakan pada tanggal 25 Mei 2016 di Universitas Pembangunan Nasional “Veteran” Surabaya, Jawa Timur dengan tema “Pengembangan Industri Pangan Dalam Mendukung Ketahanan Pangan Dan Kemandirian Pangan Nasional” (Lampiran 2c).
- d. Disampaikan pada Seminar Internasional yaitu pada *International Food Conference 2016* sebagai **pemakalah**, yang diadakan pada tanggal 20 Oktober 2016 di Universitas Widya Mandala Surabaya (Lampiran 2d).
- e. Penelitian ini juga menghasilkan **produk** yaitu ekstrak air dan ekstrak etanol beras hitam (Lampiran 1a).
- f. Teknologi tepat guna yang digunakan untuk menghasilkan produk ini yaitu ekstraksi. Ekstrak air diperoleh dengan menggunakan alat *Freeze dryng*, sedangkan ekstrak etanol diperoleh dengan menggunakan alat *Rotary evaporator*.

BAB V. KESIMPULAN

5.1. Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Penelitian tahap 1:

Rendemen ekstrak etanol dan air beras hitam adalah sebesar 19,35 % dan 16,11 %, mengandung kadar total fenol sebesar $95,87 \pm 0,71$ dan $58,86 \pm 0,23$ mg GAE/g ekstrak dan mengandung kadar flavonoid sebesar $37,75 \pm 0,23$ dan $20,53 \pm 0,19$ mg QE/g ekstrak. Ekstrak etanol mengandung kadar total fenol dan flavonoid yang lebih besar bila dibandingkan dengan ekstrak air beras hitam.

2. Penelitian tahap 2:

Aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan air beras hitam tergolong tinggi karena mempunyai nilai IC_{50} kurang dari 200 yaitu sebesar 13,00 dan 14,29 bila diuji dengan metode DPPH. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan air beras hitam yang diuji dengan metode FRAP adalah sebesar 59,521 dan 49,979 mg AAE/g ekstrak. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan air beras hitam yang diuji dengan metode FTC adalah sebesar 53,42 % dan 44,16 %. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan air beras hitam yang diuji dengan metode AAT adalah sebesar 132,047 % dan 96,556 %. Jadi, aktivitas antioksidan ekstrak etanol beras hitam lebih tinggi bila dibandingkan dengan aktivitas antioksidan ekstrak air beras hitam.

3. Penelitian tahap 3:

Semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin tinggi pula jumlah relatif sel imunokompeten yang berproliferasi. Jumlah relatif sel imunokompeten yang berproliferasi paling tinggi terdapat pada perlakuan ekstrak etanol 200 μ g/ml yaitu sebesar $76,68 \pm 0,910\%$ dan yang terendah pada perlakuan ekstrak air 50 μ g/ml yaitu sebesar $42,40 \pm 0,950\%$.

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian ini maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang aktivitas biologi lainnya dari ekstrak beras hitam dan penelitian secara *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Aris, S. R. S., S. Mustafa, N. Ahmat, F. M. Jaafar, dan R. Ahmad. 2009. Phenolic Content and Antioxidant Activity of Fruit of *Ficus dettoidea* var. *Angustifolis* sp. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*. 13(2): 146-150
- Aupperle, K., B. Bennett, Z. Han, D. Boyle, A. Manning and G. Firestein, 2001. NF- κ B regulation by I κ B kinase-2 in rheumatoid arthritis synoviocytes. *J. Immunol.*, 166: 2705-2711.
- Abcam. 2013. Ab113853 - CFSE Fluorescent Cell Labeling Kit. UK,EU and Row, US. Canada and Latin America, China and Asia Pacific, Japan.
- Anonim^(a). 2010. Beras Hitam/Black Rice/Beras Ireng. <http://bp3kbamburuncingparakan>. diakses tanggal 5 April 2014.
- Anonim^(b). 2011. Tabel Komposisi Pangan Indonesia. DPD Persatuan Ahli Gizi Indonesia. Jawa Timur Surabaya.
- Baratawijaya, K.G.dan I. Rengganis. 2014. *Imunologi Dasar* Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Bonizzi, G., dan M. Karin. 2004. The Two NF- κ B Activation Pathways and Their Role in Innate and Adaptive Immunity. *Trends Immunol.* 25: 280-288.
- Caamano, J., dan C.A. Hunter. 2002. NF- κ B Family of Transcription Factors: Central Regulators of Innate and Adaptive Immune Functions. *Clin Microbiol Rev.* 15: 414-429.
- Chen, X.Q., N. Nagao, T. Itani and K. Irifune. 2012. Anti-oxidative Analysis, and Identification and Quantification of Anthocyanin Pigments in Different Coloured Rice. *Food Chemistry*, 135 (6): 2783-2788.
- Caro, G.P., S. Watanabe, A. Crozier, T. Fujimura and T. Yokota. 2013. Phytochemical Profile of a Japanese Black-purple Rice. *Food Chemistry*, 141 (7): 2821-2827
- Cruse, J.M. and R.E. Lewis. 1999. Cytokines. In: *Atlas of Immunology*. CRC Press. Boca Raton
- CCRC (Cancer Chemoprevention Research Center). 2009. Preparasi Sampel Untuk Flowcytometry. <URL:<http://www.ccrc.farmasi.ugm.ac.id>>.
- Corwin, E.J. 2008. *Handbook of Pathophysiology* 3th edition. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins, 138-143.
- Dyatmiko, W. 2003. Efek Antiinflamasi Perasan Kering Buah *Morinda Citrifolia* Linn Secara Peroral Pada Tikus Putih. *Berk. Penel. Hayati* 9: 53-55.

- Dwijayanti, D.R., Djati, M.S., Rifa'i, M. 2015. Decreasing the Expression Level of Macrophage Cell, Pro-Inflammatory Cytokines and NF- κ B by Using VipAlbumin® in vitro. *Asian Journal of Cell Biology*. Vol. 10 No. 2.
- Dwijayanti, D.R., Widodo, Ibrahim, M., Rifa'i, M. 2016. EMSA Eritin Polyherbal as an Anti-Oxidant Can Suppress NF- κ B Activation and Decrease IL-17 Cytokine in Irradiation Mice Model. *Food and Agricultural Immunology*.
- Fitriyani, A. 2009. Uji in Vitro Ekstrak Air dan Etanol Dari Buah Asam Gelugur, Rimpang Lengkuas, dan Kencur Sebagai Inhibitor Aktivitas Lipase Pankreas. FMIPA. IPB. Bogor.
- Guo, H., H. Ling, W.H. Wang, Q. Liu, C. Hu and M. Xia. 2007. Effect of Anthocyanin-rich Extract From Black Rice (*Oryza sativa* L.) on Hyperlipidemia and Insulin Resistance in Fructose-Fat Rats. *Plant Foods For Human Nutrition*, 62 (1): 1-6.
- Gordon I. 1994. *Functional Food, Food Design, Pharmafood*. New York: Champman danHall
- Hansen, J.B., 2011. Divalent metal transporter 1 regulates ironmediated ROS and pancreatic beta cell fate in response to cytokines. *Cell Metab.* 16: 449–461.
- Hollman, P.C.H. 1996. Analisis and Health Effects of Flavonoids. *Food Chemistry*, 57(1):43-46.
- Hou, Z., P. Qin, Y. Zhang, S. Cui and G. Ren. 2013. Identification of Anthocyanins Isolated from Black Rice (*Oryza sativa* L.) and Their degradation Kinetics. *Food Research International*, 50 (8): 691-697.
- Handojo, P.D. 2003. Purification of Gel Forming Component Extracted from Black Rice and Characterization dalam Prosiding Seminar PATPI. Malang. Juli 30-31.
- Katzung, B.G. 2002. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Buku II. Edisi VIII. Salemba Medika. Jakarta. 537-539.
- Kumalaningsih, S. 2008. Antioksidan, Sumber dan Manfaatnya. (On line) diakses 11 April 2015.
- Lelo, A. dan D. S. Hidayat, 2004, Penggunaan Antiinflamasi Non Steroid yang Rasional pada Penanggulangan Nyeri Reumatik. <http://library.usu.ac.id/download/fk/farmakol>
- Lindsey, K.L., Motsei, M.L. & Joger, A.K. 2002. Screening of south African food plants for antioxidant activity. *Journal of Food Science*. Vol 67 (6): 2129-2131.
- Lamb, R.E., dan B.J. Goldstein. 2008. Modulating an Oxidative–Inflammatory Cascade: Potential New Treatment Strategy for Improving Glucose Metabolism, Insulin Resistance, and Vascular Function. *Int. J. Clin.* 62: 1087–1095.

- Lawrence, T. 2009. The Nuclear Factor B Pathway in Inflammation. *Inflammation Biology Group*. 1-10.
- Liang, Y., Y. Zhou, dan P. Shen. 2004. NF- κ B and Its Regulation on The Immune System. *Chinese Society of Immunology*. 1 (5): 343-350.
- Min, S.W., S.N. Ryu, dan D.H. Kim. 2010. Anti-Inflammatory Effects Of Black Rice, Cyanidin-3-O-Beta-D-Glycoside, and Its Metabolites, Cyanidin And Protocatechuic Acid. *Int Immunopharmacol*. 10(8): 959-966.
- Morino K., K. F. Petersen, dan G. I. Shulman. 2006. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance in Humans and Their Potential Links With Mitochondrial Dysfunction. *Diabetes*. 55(2): S9-S13.
- Muhtadi, A. L. Hidayati, A. Suhendi, T. A. Sudjono, dan Haryoto. 2014. Pengujian Saya Antioksidan dari Beberapa Ekstrak Kulit Buah Asli Indonesia dengan Metode FTC. Simposium Nasional RAPI XIII. K50-K57
- Min, S., S. Ryu and D. Kim. 2010. Anti-inflammatory Effect of Black Rice, Cyanidin-3-O- β -glycoside, and Its Metabolites, Cyanidin and Protocatechuic Acid. *International Immunopharmacology*, 10 (7): 959-966.
- Nontasan, S., A. Moongngarm and S. Deeseenthum. 2012. Application Of Functional Colorant Prepared from Black Rice Bran in Yogurt. *Asia-Pacific Chemical, Biological & Environmental Engineering Society*, 2 (6): 62-67.
- Palupi,R.D. 2006. Isolasi Asam Usnat dari Tumbuhan *Lichen usnea blepharea motyka* dan Penentuan Aktivitas Anti Kanker. Tesis FMIPA UI. Jakarta.
- Pringgoutomo, S., S. Himawan, dan A.Tjarta. 2002. Buku Ajar Patologi 1 (umum). Edisi ke-1. Sagung Seto, Jakarta.
- Paul, W.E. 2008. *Fundamental Immunology Sixth Edition*. Lippincott & Witkins. USA.
- Purwanto, A.D., P.R. Retno dan P. Toto. 2005. Peningkatan Ekspresi gen IFN- γ dan Aktivasi Fungsi Immuno-surveillance Oleh Ekstrak Air Teh Hijau. Laporan Penelitian Lembaga Penelitian Universitas Airlangga
- Park, Y. S., S-J Kim, dan H-I Chang. 2008. Isolation of Anthocyanin from Black Rice (Heugjinjubyeo) and Screening of its Antioxidant Activities. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol*. 36(1): 55–60
- Rifa'i, M. 2014. Aspek Biologi Sel T Regulator CD4⁺ CD25⁺ pada Transplantasi Sumsum Tulang. *Journal of Tropical Life Science*. 4 (1): 1-9.
- Sakaguchi, S., K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin, dan T. Yamaguchi. 2009. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *International Immunology*. 21 (10): 1105–1111.

- Shao, Y., F. Xu, X. Sun and J. Bao. 2014. Identification and Quantification of Phenolic Acids and Anthocyanin as Antioxidants in Bran, Embryo and Endosperm of White, Red and Black Rice Kernels. *Food Chemistry Journal of Cereal Science*, 59 (8): 211-218.
- Shinta, T. 2011. Potensi Beras Hitam (*Oryza sativa* L.indica) di Indonesia. <http://2.bp.blogspot.com> diakses tanggal 3 Januari 2014.
- Sompong, R., S. Siebenhandl-Ehn, G. Linsberger-Martin and E. Berghofer. 2011. Physicochemical and Antioxidative Properties of red and Black Rice Varieties From Thailand, China and Sri Lanka. *Food Chemistry*, 124 (9): 132-140.
- Strobel, G.A. 2004. Natural Products from Endophytic Microorganism. *Journal of Natural Products*, 67:257-268.
- Taie,H.A.A, El-Mergawi, R. & Radwan, S. 2008. Isoflavonoid, flavonoid, phenolic acid, and antioxidant activity of soybean seeds as affected by organic and bioorganic fertilization. *Journal of Agricultural and Environmental Science* 4 (2): 207-213.
- Vichitphan, S., Vichitphan, K.,& Sirikhansaeng, P. 2007. Flavonoid content and antioksidan activity of krachaidum (*Kaemferia parviflora*) Wine. *Journal of Science Technology* (7): 97- 105.
- Walter, M., E. Marchesan, P.F.S. Massoni and L.P. Silva. 2013. Antioxidant Properties of Rice Grains With light Brown, Red and Black Pericarp Colors and The Effect of Processing. *Food Research International*, 50 (6): 698-703.
- Wagner, H. 1995. Immunostimulant from Medicinal Plants, In *Advances in Chinese Medicinal Materials Research* (Eds.) H.M. Chang, H.W. Yeung, W.W. Tso and A. Koo. Word Scientific Publ. Co. Singa-pore. 159-170.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kanisius. Yogyakarta.
- Xu, Z., N, Hua and J.S. Godber. 2001. Antioxidant Activity of Tocopherol, Tocotrienols and γ -oryzanol Component from Rice Bran Against Cholesterol Oxidation Accelerated by 2,2-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (5): 2077-2081.
- Zhang, M.W., B. Guo, R. Zhang, J. Chi, Z. Wei, Z. Xu, Y. Zhang and X. Tang. 2006. Separation, Purification and Identification of Antioxidant Compositions in Black Rice. *Agricultural Science*, 5 (6): 431-440.
- Zhang, X., Y. Shen, W. Prinyawiwatkul, J.M. King and Z. Xu. 2013. Comparison of The Activities of Hydrophilic Anthocyanins and Lipophilic Tocols in Black Rice Bran Against Lipid oxidation. *Food Chemistry*, 141 (7): 111-116.
- Zawistowski, J., A. Kopec and D.D. Kitts. 2009. Effect of a Black Rice Extract (*Oryza sativa* L.) on Cholesterol Levels and Plasma Lipid Parameters in Wistar Kyoto Rats. *Journal of Functional Foods*, 1 (7): 50-56.

Lampiran 1. Produk dan Luaran

a. Produk



Ekstrak etanol



Ekstrak air

b. Luaran

No	Jenis Luaran		Capaian tahun ke-1
1	Publikasi ilmiah ²⁾	Internasional	<i>submite</i>
		Nasional Terakreditasi	ISSN terbit
2	Pemakalah dalam pertemuan ilmiah ³⁾	Internasional	Surabaya, 20 Oktober 2016
		Nasional	Surabaya, 25 Mei 2016
3	Teknologi Tepat Guna ⁷⁾		Ekstraksi
4	Produk		Ekstrak Air dan Etanol
5	Model/Purwarupa/Desain/Karya seni/ Rekeyasa Sosial ⁸⁾		Produk dan Dosis terbaik

Lampiran 2. Pelaksanaan Penelitian

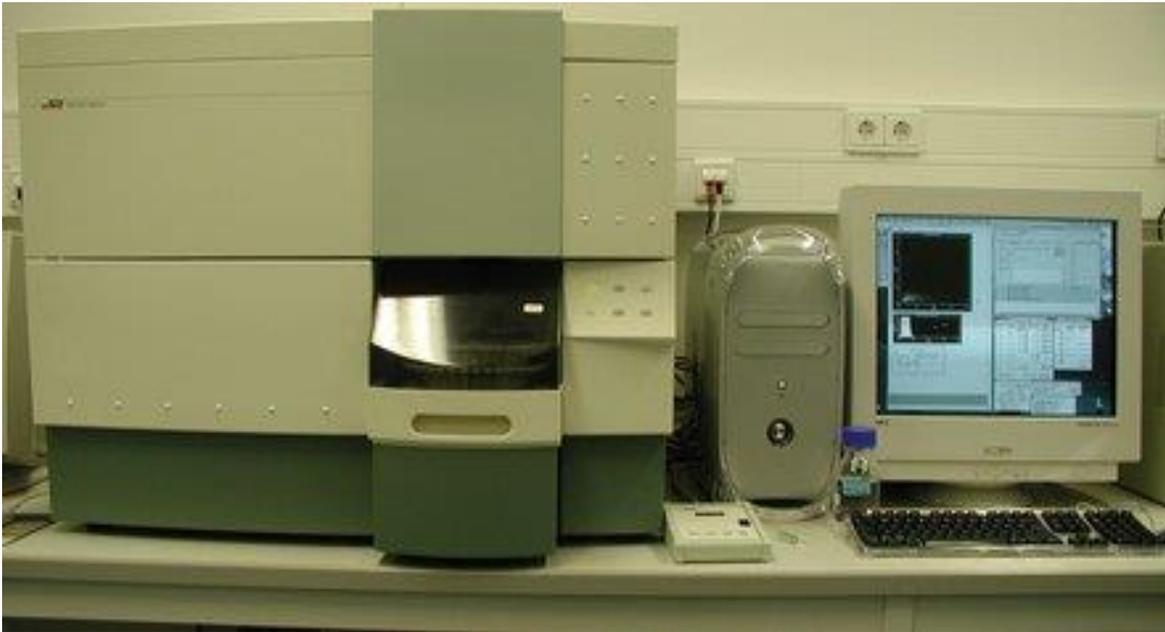
Freeze drying untuk ekstraksi air



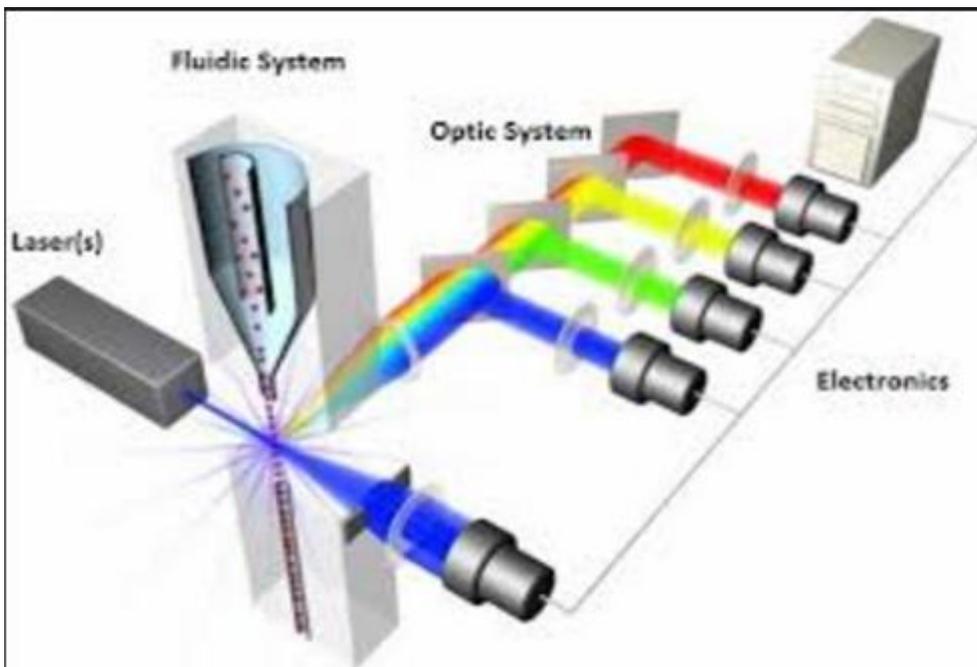
Rotary evaporator untuk ekstraksi etanol



Pembacaan uji aktivitas Imunomodulator dan Antiinflamasi menggunakan Flowcitometry



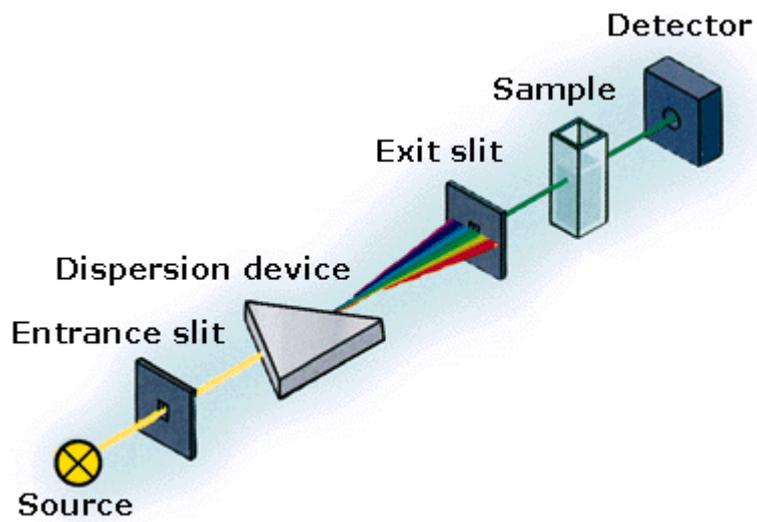
Cara kerja Flowcytometry



Pengamatan uji aktivitas antioksidan menggunakan Spektrofotometer UV-vis



Cara Kerja Spektrofotometer



Lampiran 3. Biodata Peneliti

A. Riwayat Hidup Ketua Tim Peneliti :

1. Namalengkapdangelar : Ir. FadjarKurniaHartati,MP.
2. Tempat&TanggalLahir : Surabaya, 11 Nopember 1966
3. JenisKelamin : Perempuan
4. Agama : Islam
5. Fakultas / Jurusan : Pertanian / TeknologiPertanian
6. PerguruanTinggi : Universitas Dr. Soetomo Surabaya
7. PangkatdanGolongan : III-d / PenataTk.I
8. Alamat Kantor : Jl. Semolowaru No. 84 Surabaya
Telp. (031) 5941969
9. Alamat email : fadjarkurnia@gmail.com
10. RiwayatPendidikan :

No.	Strata	Tempat	Tahun	Bidang	Gelar
1.	S1	UniversitasJember	1991	TeknologiPertanian	Ir.
2.	S2	UniversitasBrawijaya Malang	2001	TeknologiHasilPertanian	MP.

11. Pengalaman Penelitian

NO	JUDUL/TOPIK	TAHUN
1.	PengaruhJenisdan Ratio BahanPengisiTerhadapSifatFisik, Kimia danOrganoleptikSerbuk Effervescent Temulawak (<i>Curcuma xanthorizaRoxb.</i>)	2000
2.	PengaruhKonsentrasidanSuhuPemanasanTahapDeproteinasiPadapembuatanKitin Dari CangkangRajungan (<i>Portunuspelagikus</i>)	2001
3.	AnalisisMutu Kimia danOrganoleptikSusuKacangTunggak	2002
4.	PemanfaatanKacang-kacangan(<i>Leguminosae</i>) SebagaiPenggantiKedelai (<i>Glycine max (L) meriil</i>)	2003
5.	Faktor-faktor Yang BerpengaruhPadaTahapDeproteinasiMenggunakanEnzim Protease PadaPembuatanKitin Dari CangkangRajungan (<i>Portunuspelagikus</i>)	2004
6.	Penggunaan STTP (Sodium Tri Poliphosphat) SebagaiPenggantiGaram Borax DalamPembuatan Krupuk Gender	2005
7.	StudiKeamananPanganPenggunaan Borax, PewarnaSintetisdan MSG) pada Krupuk Yang Beredar di PasarDinoyo Malang	2006
8.	KajianPanganOlahanPenggantiBeras	2008
9.	EksplorasiUmbi-umbianSebagaiBahan Baku PembuatanBerasTiruan Dan AlternatifIndustri Kecil	2009
10.	StudiPenggunaanPewarnaSintetis, MSG danBoraksPadaKerupuk Yang Beredar di Pasar Kota Malang	2010
11.	Pembuatan Yogurt Dari SusuKacangBeras. KajianProporsi <i>Lactobacillus bulgaricus</i> : <i>Thermophiluuslactis</i> .	2011
12.	StudiPenggunaanBoraksPadaKerupuk Non-protein Yang Beredar di PasarTradisionalSemolowaru Surabaya	2013

12. Pengalaman Publikasi :

NO	JUDUL/TOPIK	JURNAL/ARTI KEL	EDISI
1.	Pengaruh Jenis dan Ratio Bahan Pengisi Terhadap Sifat Fisik, Kimia dan Organoleptik Serbuk <i>Effervescent</i> Temulawak (<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb.)	Jurnal Terakreditasi Agritek. Institut Pertanian Malang	Terakreditasi No.050/0/1/98; No.3 95/Dikti/Kep/2000. Edisi Khusus April 2001
2.	Enzim Protease Dalam Pembuatan Kitin Dari Cangkang Rajungan (<i>Portunus pelagicus</i>)	Jurnal Terakreditasi Tropika. Universitas Muhammadiyah Malang	Terakreditasi No.69/Dikti/Kep/2000. Vol.II No.2 Juli 2003
3.	Pemanfaatan Jambu Biji (<i>Psidium guajava</i>) dan Mangga Muda (<i>Mangifera indica</i>) Sebagai Tablet Vitamin C Alami	Jurnal Technow. Universitas Dr. Soetomo Surabaya	Vol.3.No.2, Nopember 2004
4.	Studi Kelayakan Minum Antara Air Minum Dalam Kemasan Air Minum Isi Ulang yang Beredar di Surabaya Selatan, Kajian Dari Cemar <i>Escherichia coli</i> , Kesadahan, pH dan Fisik.	Perpustakaan Universitas Dr. Soetomo Surabaya	No. Reg Perpustakaan No : 569/XII/2007
5.	Formulasi tepung beras hitam (<i>Oryza sativa</i> L. <i>indica</i>) dan tepung jagung untuk pembuatan flake	Berita Litbang Industri	ISSN:0215-7217. Vol.XXXVII No.2 Nopember 2007
6.	Pengaruh Komposisi Tepung Terigu dan Rumput Laut Dalam Pembuatan Stick Rumput Laut	Berita Litbang Industri	ISSN: 0215-7217. Vol.XXXIX No. 1 Juli 2008
7.	Pengaruh suhu dan lama pengeringan terhadap kadar tanin berashitam (<i>Oryza sativa</i> L. <i>indica</i>).	Berita Litbang Industri	ISSN: 0215-7217. Vol.XLVIII. No.3 Nopember 2011
8.	Aktivitas ekstrak etanol dan air beras hitam (<i>Oryza sativa</i> L. <i>indica</i>) Pada Tikus Wistar Jantan	Rekapangan, Jurnal Teknologi Pangan	ISSN 1978-4163 Vol.10 No.1 Juni 2016
9.	Respon rasio tepung Mocaf dan tepung terigu terhadap kadar air, serat kasar dan organoleptik Kue Brownies kukus	Jurnal Teknologi Proses dan Inovasi Industri	E-ISSN 2053-1236 Vol.1 No.1 Juli 2016

13. Pengalaman Pengabdian Pada Masyarakat ;

NO	JUDUL/TOPIK	TAHUN
1.	Memberi Penyuluhan Tentang Teknologi Tepat Guna Mengenai Penganekaragaman Bahan Baku Tempe dan Segala Hasil Olahannya, Desa Kedak Kec. Semen Kab. Kediri	Pebruari, 2001

2.	Memberi Penyuluhan Penganekaragaman Produk Dari Bawang Merah di Desa Kedak, Kec.Semen, Kab.Kediri	Agustus, 2002
3.	Memberi Pelatihan Proses Pembuatan Pisang Sale Skala Rumah Tangga di Desa Drajugurit, Kec. Ngimbang, Kab. Lamongan	April, 2003
4.	Memberi Pelatihan Penanganan Limbah Tepung Tapioka di Desa Kedak, Kec. Semen, Kab. Kediri.	Maret, 2004
5.	Memberi Penyuluhan Pengawetan Buah-buahan dan Sayur-sayuran di Desa Wadak Kidul, Kec. Daduk Sampeyan, Kab.Gresik.	September, 2006
6.	Memberi Pelatihan Pemanfaatan Jerami Sebagai Pengganti Garam Bleng Pada Pembuatan Krupuk di Desa Pepe, Kec. Sedati, Kab. Sidoarjo.	Januari, 2008
7.	Memberi Pelatihan Pembuatan Beras Tiruan dari Bahan Baku Umbi-umbian	Maret, 2009
8.	Instruktur Pelatihan Manajemen Produksi UMKM binaan Dinas Kelautan dan Perikanan di Hotel Utami Surabaya	Agustus, 2009
9.	Memberi Pelatihan Pemanfaatan Susu Sapi Sebagai Bahan Baku Pembuatan Krupuk, di Desa Masangan, Kec. Bungah, Kab. Gresik.	Juli, 2010
10.	Memberi Penyuluhan Pemanfaatan Kepala Ikan Lele Sebagai Bahan Baku Pembuatan Krupuk di Desa Sajen, Kec. Pacet, Kab. Mojokerto.	September, 2010
11.	IbM Makanan Khas Mojokerto	April- Nopember 2015
12.	IbM Makanan Tradisional Berbasis Kedele	April- Nopember 2016

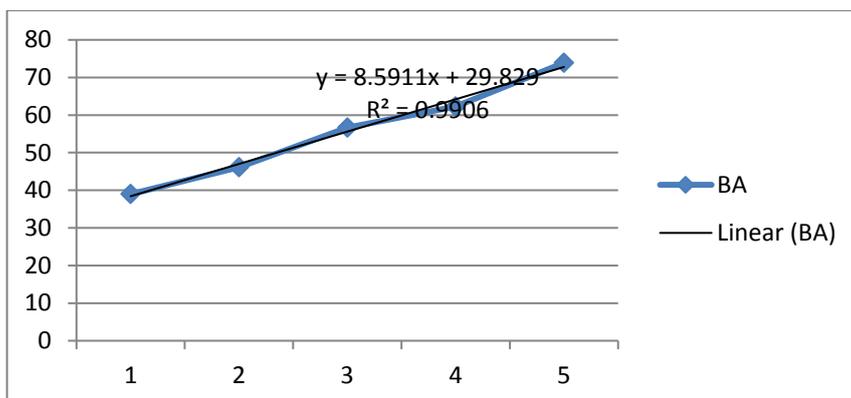
Surabaya, 18 Nopember 2016
Ketua Tim Pengusul,

Ir. Fadjjar Kurnia Hartati, MP.
NPP. 95.01.1.198

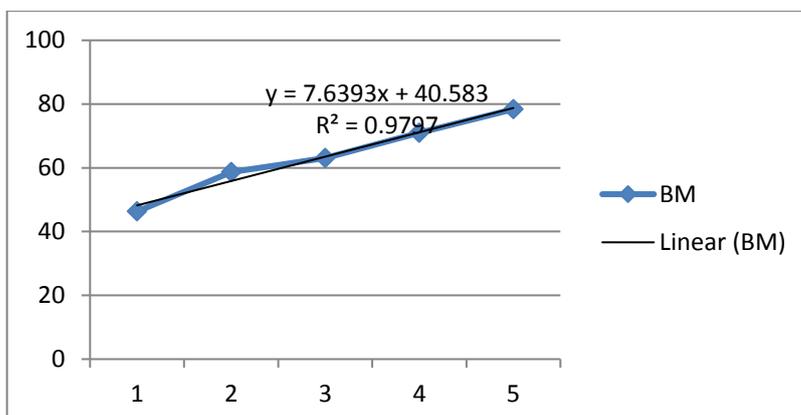
Lampiran 4. Data Hasil Penelitian

1. Data Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

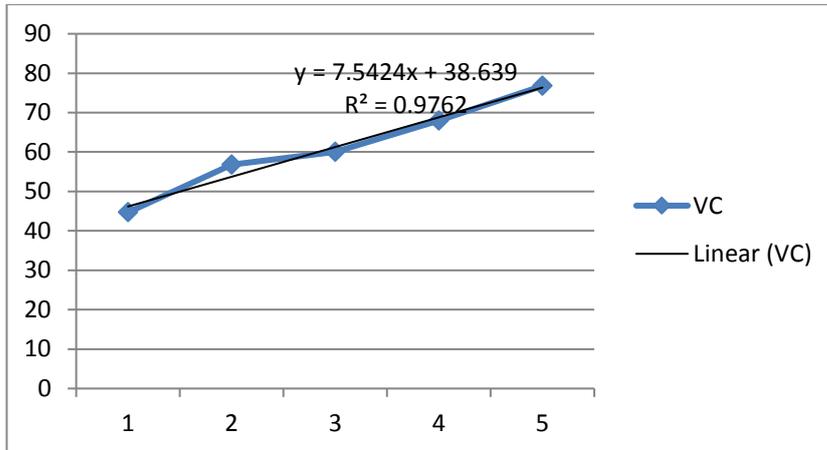
Sampel	Rata2	SD
BA I	38,98	0,059467
BA II	46,178	0,1035
BA III	56,681	0,059467
BA IV	62,293	0,1035
BA V	73,878	0,185397
BM I	46,315	0,059467
BM II	58,712	0,214972
BM III	63,1198	0
BM IV	70,985	0,059467
BM V	78,375	0,059467
VC I	44,693	0,158219
VC II	56,783	0,156899
VC III	60,053	0,059467
VC IV	68,013	0,057735
VC V	76,79	0,157162



IC 50 Ekstrak Air Beras Hitam = 2,347895



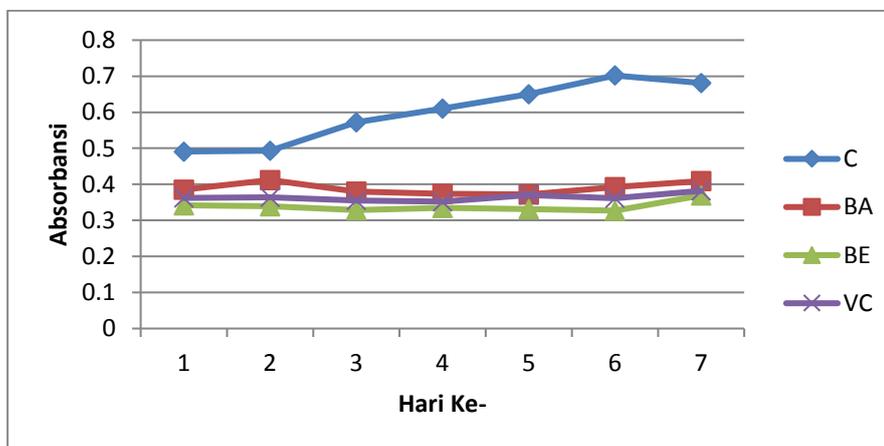
IC 50 Ekstrak Etanol Beras Hitam = 1,232705

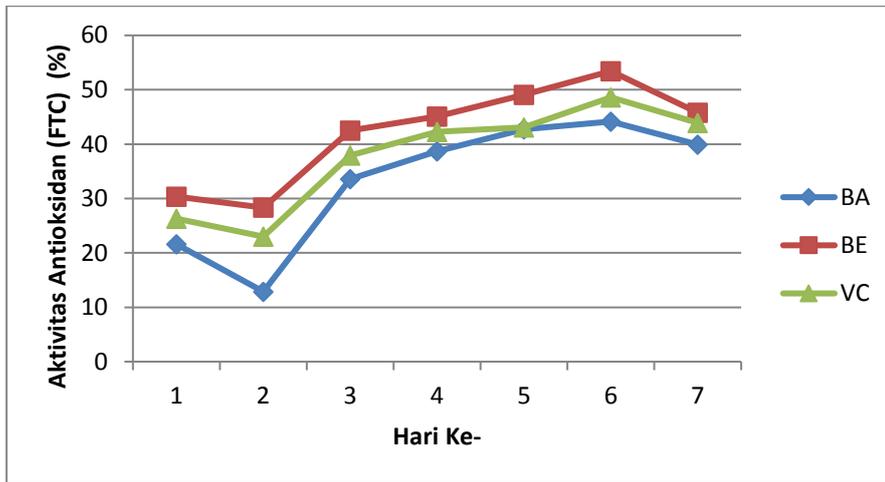


IC 50 Standart Vitamin C = 1,506284

2. Data Uji Aktivitas Antioksidan Metode FTC

	1	2	3	4	5	6	7
BA	21,59	12,88	33,61	38,71	42,77	44,16	39,94
BE	30,35	28,33	42,5	45,1	49,1	53,42	45,8
VC	26,28	23	37,94	42,3	43,1	48,6	43,91

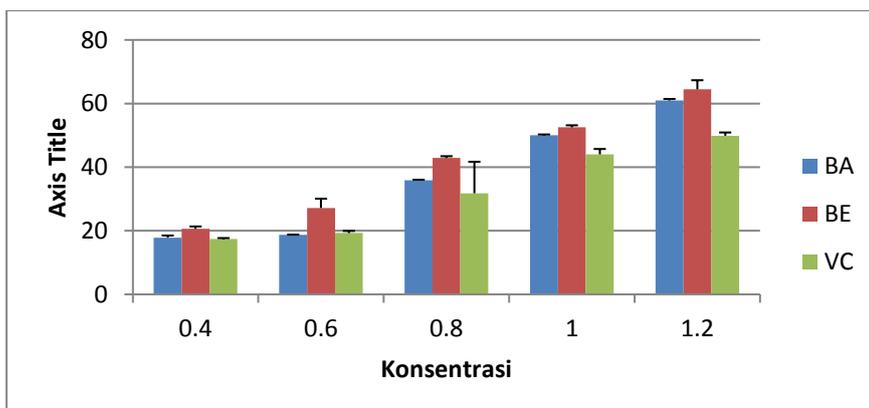




Sampel	Aktiv. Antiok(%)						
	1	2	3	4	5	6	7
ekst.Air	21,59	12,88	33,61	38,71	42,77	44,16	39,94
ekst.Met	30,35	28,33	42,5	45,1	49,1	53,42	45,8
vit. C	26,28	23	37,94	42,3	43,1	48,6	43,91

3. Data Uji Aktivitas Antioksidan Metode FRAP

Konsentrasi	BA	BE	VC	STDEV		
0,4	17,85	20,59	17,37	0,64	0,75	0,33
0,6	18,67	27,17	19,27	0,11	2,9	0,68
0,8	35,84	42,89	31,79	0,19	0,55	9,89
1	50	52,53	44,03	0,27	0,63	1,67
1,2	60,96	64,47	49,86	0,48	2,86	1,04



4. Data Uji Aktivitas Antioksidan Metode TAA (Total Antioxidant Activity)

Sampel mg/ml	Aktivitas Antioksidan mg vit C/ g ekstrak									
	Ekstrak Air					Ekstrak Etanol				
	I	II	III	Rata2	SD	I	II	III	Rata2	SD
0,4	25,47	27,08	28,37	26,97	1,45	42,52	41,67	42,79	42,33	0,58
0,6	29,98	30,26	31,07	30,43	0,57	44,22	43,17	46,26	44,55	1,57
0,8	31,39	31,73	31,68	31,60	0,18	45,26	46,69	48,20	46,72	1,47
1	33,56	34,94	34,28	34,26	0,69	46,27	49,88	50,17	48,77	2,17
1,2	38,51	38,54	39,04	38,70	0,30	52,38	51,68	53,08	52,38	0,70
Rata-rata						Rata-rata				

