

## PENGARUH LAMA FERMENTASI OLEH BACILLUS SUBTILIS STRAIN FNCC 0059 TERHADAP KANDUNGAN SENYAWA FITOKIMIA DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SECARA IN VITRO DARI KACANG UNDIS (CAJANUS CAJAN [L.] MILLSP)

Kadek Dinda Ayu Sri Winanti<sup>1</sup>, Agung Nova Mahendra<sup>2</sup>, Agung Wiwiek Indrayani<sup>2</sup>, I Wayan Sumardika<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Sarjana Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

<sup>2</sup>Departemen Farmakologi dan Terapi, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

e-mail: [wsumardika@unud.ac.id](mailto:wsumardika@unud.ac.id)

### ABSTRAK

Kacang undis (*Cajanus cajan* [L] Millsp) adalah jenis kacang kacangan kaya dengan kandungan senyawa fitokimia yang memiliki sifat antioksidan, senyawa fenol, flavonoid, tanin dan antosianin. *Reactive oxygen and nitrogen species* (RONS) adalah radikal bebas yang paling dominan terdapat dalam tubuh. Kapasitas RONS yang berlebihan dapat memicu stres oksidatif. Antioksidan diperlukan untuk melindungi tubuh dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas. *Bacillus subtilis* adalah mikroba dengan karakter fisiologi yang sangat baik. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh fermentasi kacang undis oleh *B. subtilis* FNCC 0059 terhadap karakteristik fitokimia dan aktivitas antioksidan ekstrak *in vitro*. Penelitian menggunakan metode *true experimental post test only control group design*. Sampel dibagi dalam 6 kelompok, kelompok kontrol terdiri kelompok kontrol negatif, 1 ml DPPH ditambah 1 ml metanol, dan kontrol positif, 1 ml larutan quersetin ditambah 1 ml DPPH serta kelompok perlakuan dengan variasi lama fermentasi 16 jam, 24 jam, 32 jam dan 40 jam, 1 ml sampel ditambah 1 ml DPPH. Data dianalisis menggunakan aplikasi pengolahan data dengan metode *One Way Anova*. Kadar total fenol, flavonoid dan tanin meningkat paling tinggi pada fermentasi 24 jam, sedangkan antosianin pada fermentasi 16 jam. Uji aktivitas antioksidan yang paling baik terjadi pada fermentasi 40 jam. Lama fermentasi tidak berpengaruh terhadap karakteristik fitokimia dan aktivitas antioksidan ekstrak.

**Kata kunci :** Kacang undis., Pengaruh lama fermentasi., *Bacillus subtilis* FNCC 0059.

### ABSTRACT

Pigeon pea (*Cajanus cajan* [L] Millsp) is a type of legume rich in phytochemical compounds that have antioxidant properties, phenolic compounds, flavonoids, tannins and anthocyanins. Reactive oxygen and nitrogen species (RONS) are the most dominant free radicals in the body. Excessive RONS capacity can trigger oxidative stress. Antioxidants are needed to protect the body from oxidative damage caused by free radicals. *Bacillus subtilis* is a microbe with excellent physiological characteristics. This study aims to determine the effect of pigeon pea fermentation by *B. subtilis* FNCC 0059 on the phytochemical characteristics and antioxidant activity of extract *in vitro*. The study was a true experimental post test only control group design method. The samples were divided into 6 groups, the control group consisted of a negative control group, 1 ml of DPPH added 1 ml of methanol, and the positive control, 1 ml of quercetin solution added 1 ml of DPPH and the treatment group with variations in fermentation time of 16 hours. 24 hours, 32 hours and 40 hours, 1 ml of sample added 1 ml of DPPH. The data were analyzed using a data processing application with One Way Anova method. The levels of total phenols, flavonoids and tannins increased highest at 24 hours of fermentation, while anthocyanins at 16 hours of fermentation. The best antioxidant activity test was at 40 hours of fermentation. Fermentation duration has no effect on the phytochemical characteristics and antioxidant activity of the extract.

**Keywords:** Pigeon pea., Effect of fermentation time., *Bacillus subtilis* FNCC 0059.

## PENDAHULUAN

Popularitas makanan fermentasi meningkat karena kualitas nutrisi dan manfaat kesehatannya. Di negara – negara Asia, terutama Jepang, terdapat olahan yang banyak dikonsumsi yaitu fermentasi kedelai dengan *Bacillus subtilis* yang disebut natto. Dalam studi yang dilakukan Katagiri dkk, menunjukkan asupan natto, berkaitan dengan penurunan risiko kematian akibat penyakit kardiovaskular. Dalam fermentasi makanan, terjadi perubahan biokimia dan modifikasi secara signifikan terhadap tekstur dan rasa yang disebabkan aktivitas enzim atau mikroorganisme. Fermentasi dapat memicu pemecahan dinding sel tanaman, yang membantu untuk membebaskan atau menghasilkan berbagai senyawa antioksidan, yang menyebabkan peningkatan fitokimia, polisakarida antioksidan, dan peptida antioksidan yang dihasilkan oleh hidrolisis atau biotransformasi mikroba sehingga sebagai hasilnya dapat meningkatkan aktivitas antioksidan.<sup>1</sup>

Radikal bebas dihasilkan dari proses metabolisme tubuh, cemaran makanan, sinar matahari, polusi udara, dan sebagainya. Radikal bebas yang paling dominan terdapat dalam tubuh adalah *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS). *Reactive oxygen and nitrogen species* (RONS) ini diproduksi oleh beberapa proses endogen dan eksogen, dan efek negatifnya muncul ketika kapasitas antara RONS dan antioksidan tidak seimbang, yang dapat menyebabkan stres oksidatif.<sup>2</sup>

Stres oksidatif dapat menimbulkan terjadinya berbagai penyakit, diantaranya penyakit kardiovaskular (hipertensi, aterosklerosis, gagal jantung, infark miokard, stroke), kanker, diabetes mellitus, penyakit paru obstruktif kronik (PPOK), penyakit ginjal kronis, penyakit Alzheimer, penyakit Parkinson, dan *Multiple sclerosis*.<sup>2</sup> Prevalensi penyakit tidak menular (PTM) terus meningkat. Menurut data WHO tahun 2021, penyebab kematian 41 juta orang setiap tahun atau kurang lebih 71% dari semua kematian global adalah PTM. Sekitar 77% dari semua kematian PTM terjadi di negara berpenghasilan rendah dan menengah. Sebagian besar kematian PTM disebabkan oleh penyakit kardiovaskular yaitu sekitar 17,9 juta orang setiap tahun, kanker 9,3 juta orang, penyakit pernapasan 4,1 juta orang, dan diabetes 1,5 juta orang.<sup>3</sup> Di Indonesia prevalensi PTM juga meningkat, menurut data tahun 2018 Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas), prevalensi diabetes melitus dari penduduk umur  $\geq 15$  tahun sekitar 10,9%, prevalensi hipertensi dari penduduk usia 18 tahun sekitar 34,1%, prevalensi aktivitas fisik kurang dari penduduk umur  $\geq 10$  tahun sekitar 33,5%, dan prevalensi merokok penduduk usia  $\leq 18$  tahun adalah 9,1%.<sup>4</sup>

Antioksidan sangat penting bagi tubuh agar bisa mencegah dan mengatasi stres oksidatif, karena dapat meredam radikal bebas di dalam tubuh. Antioksidan dapat dibedakan menjadi antioksidan endogen, yaitu *Glutathione Peroxidase* (GPx), *Superoksida Dismutase* (SOD), dan *Katalase* (Cat), serta antioksidan eksogen yang dapat diperoleh dari makanan.<sup>5</sup> Pada obat-obatan sintetis seperti vitamin C dan N-Asetil Sistein (NAC) terdapat kandungan antioksidan.<sup>5</sup> Antioksidan sintetis yang umum dipakai pada minuman, makanan maupun obat-obatan, terdapat kandungan senyawa aditif seperti *Butil Hidroksi Anisol* (BHA), *Butil Hidroksi Toluena* (BHT), *Tert-Butil Hidroksi Quinon*

(TBHQ), dan propil galat. Namun menurut hasil penelitian penggunaan bahan sintetis memiliki efek samping, seperti meningkatkan risiko penyakit kanker.<sup>6</sup>

Dengan adanya efek samping penggunaan obat sintetis tersebut, penelitian fermentasi kacang undis (*Cajanus cajan* [L] Millsp) oleh *Bacillus subtilis* FNCC 0059 ini untuk mengetahui karakteristik fitokimia dan antioksidannya.

## RADIKAL BEBAS

Radikal bebas berperan penting dalam proses fisiologis dan berpengaruh pada gangguan kesehatan. Berdasarkan sumbernya radikal bebas dibedakan 2 jenis yakni radikal bebas eksogen dan radikal bebas endogen. Radikal bebas adalah molekul yang sangat reaktif karena pada kulit terluarnya mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan, sehingga disebut juga sebagai *reactive oxygen species* (ROS). Mekanisme radikal bebas dalam memperoleh kestabilannya, melalui donasi hidrogen atau mengambil elektron dari molekul lain, namun proses ini membentuk radikal bebas yang lain.<sup>6</sup>

## Stres oksidatif

Stres oksidatif timbul karena terjadi ketidakseimbangan ROS dan antioksidan dalam tubuh. Kondisi ini akan mengganggu atau merusak fungsi fisiologis. Antioksidan diperlukan untuk mencegah terjadinya stres oksidatif sehingga terhindar dari induksi terhadap suatu penyakit.<sup>7</sup>

## Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu mencegah atau memperlambat kerusakan sel akibat radikal bebas, dengan menyumbangkan elektronnya kepada radikal bebas sehingga dapat menghentikan reaksi berantai radikal bebas. Senyawa fenol, flavonoid dan antosianin merupakan antioksidan alami dapat berfungsi sebagai antioksidan dalam tubuh sehingga terhindar dari stres oksidatif.<sup>6</sup>

## Quersetin

Quersetin merupakan turunan flavonoid termasuk golongan senyawa flavonol yang banyak terdapat pada sayuran dan buah – buahan.<sup>8</sup> Quersetin digunakan sebagai standar dalam penelitian ini.

## Kacang Undis (*Cajanus cajan* [L] Millsp)

Kacang undis memiliki kandungan nutrisi yang baik seperti karbohidrat, lemak, protein, vitamin dan mineral. Dalam kacang undis juga terdapat komponen yang menunjukkan efek bioaktif, yaitu senyawa fenolik, flavonoid, antosianin dan tanin. Pada penelitian ini kacang undis difermentasi oleh *Bacillus subtilis* FNCC 0059 dengan perbedaan lama fermentasi, yaitu 16 jam, 24 jam, 32 jam dan 40 jam.

## *Bacillus subtilis* FNCC 0059

*Bacillus subtilis* adalah bakteri anaerob fakultatif, gram positif, katalase positif, sel selnya berbentuk batang yang bisa tumbuh dengan baik pada suhu antara 25<sup>o</sup>C– 350<sup>o</sup>C, pH antara 7 – 8, dan memungkinkan bertahan hidup dilingkungan yang kurang mendukung sampai kondisi menjadi baik.<sup>9</sup> *Bacillus subtilis* FNCC 0059 yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari AGROTEKNO Kabupaten Bantul, Yogyakarta.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan rancangan eksperimen *post test only control group design*, yang bertujuan untuk mengetahui hubungan kausalitas variabel terikat dan variabel bebas terhadap kelompok kontrol dan sampel kelompok eksperimen. Penelitian ini dibagi enam (6) kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (K1) dimana larutan etanol DPPH tidak diberi bahan uji apapun, dan kelompok kontrol positif (K2) dimana larutan etanol DPPH diberi quersetin serta kelompok perlakuan dibagi empat kelompok berdasarkan perbedaan lamanya fermentasi kacang undis (*Cajanus cajan* [L] Millsp) yang diberikan pada larutan etanol DPPH, yaitu dengan lama fermentasi 16 jam (P1), 24 jam (P2), 32 jam (P3) dan 40 jam (P4).<sup>10</sup> Kacang undis (*Cajanus cajan* [L] Millsp) berasal dari Desa Kerta Pengalu, Kecamatan Payangan, Kabupaten Gianyar, Bali. Pelaksanaan penelitian ini dilakukan selama 4 bulan, dimulai bulan Agustus 2022 sampai bulan November 2022. Variabel *independent* pada penelitian ini adalah lama waktu fermentasi sedangkan variabel *dependent* pada penelitian ini adalah aktivitas antioksidan (IC50) dan kandungan senyawa fitokimia. Fermentasi kacang undis (*Cajanus cajan* [L] Millsp) dilakukan di Laboratorium Biomolekular Terpadu Divisi Pengembangan Obat dan Hewan Coba Fakultas Kedokteran, Ekstraksi dilakukan di

Laboratorium Analisis Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Udayana. Uji kuantitatif dan aktivitas antioksidan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dilakukan di Laboratorium Penelitian Terpadu FMIPA Universitas Udayana. Penentuan kadar total fenol, flavonoid, dan tanin menggunakan standar asam galat, quersetin,<sup>11</sup> dan asam tanat<sup>12</sup> sedangkan kadar antosianin menggunakan metode pH diferensial spektrofotometri.<sup>13</sup> Uji aktivitas antioksidan ekstrak dan standar quersetin menggunakan metode DPPH spektrofotometri.<sup>14</sup> Nilai *Antioxidant Activity Index* (AAI) dihitung untuk mengetahui kategori hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak dan standar quersetin.<sup>15</sup> Analisis data dilakukan menggunakan aplikasi pengolahan data dengan metode *one way Anova*.<sup>16</sup>

## HASIL

Analisis kuantitatif senyawa fitokimia, total fenol, flavonoid, dan tanin dari ekstrak etanol fermentasi kacang undis oleh *Bacillus subtilis* FNCC 0059 menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Analisis total antosianin dengan metode pH diferensial spektrofotometri. Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol fermentasi kacang undis oleh *Bacillus subtilis* FNCC 0059 terhadap DPPH dengan quersetin yang digunakan untuk kontrol positif serta metanol untuk kontrol negatif.

**Tabel 1** Hasil Analisis Senyawa Fitokimia Fermentasi Kacang Undis (*Cajanus cajan* [L] Millsp) oleh *Bacillus subtilis* FNCC 0059

Sampel	Kadar			
	Total Fenol mg GAE/100g	Flavonoid mg QE/100g	Tanin mg TAE/100g	Antosianin mg/100g
16 jam	871,95	100,43	925,68	14,11
24 jam	937,15	107,59	1244,74	4,02
32 jam	644,37	39,47	949,83	2,63
40 jam	808,93	59,04	819,24	-

**Tabel 2** Nilai IC50 Ekstrak Etanol Fermentasi Kacang Undis (*Cajanus cajan* [L] Millsp) oleh *Bacillus subtilis* FNCC 0059

Sampel	Persamaan Garis	Nilai Y	Nilai X / IC50
16 jam	$Y = 0,0234X + 10,366$	50	1693,76
24 jam	$Y = 0,0359X - 3,3505$	50	1486,09
32 jam	$Y = 0,0237X - 1,9885$	50	2193,61
40 jam	$Y = 0,0469X - 3,1297$	50	1132,83

**Tabel 3** Nilai IC50 Standar Quersetin

Sample	Persamaan Garis	Nilai Y	Nilai X / IC50
Quersetin	$Y = 14,304X - 1,1142$	50	3,57

**Tabel 4** AAI Sampel dan Standar

Sampel / Standar	IC50	AAI
16 jam	1693,76	0,02
24 jam	1486,09	0,03
32 jam	2193,61	0,02
40 jam	1132,83	0,04
Quersetin	3,57	11,2

Data hasil analisis kuantitatif senyawa fitokimia ekstrak etanol fermentasi kacang undis (*Cajanus cajan* [L] Millsp) dapat dilihat pada **Tabel 1**. Data hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak dan pembandingan quersetin berupa nilai IC50, ditampilkan pada **Tabel 2** dan **Tabel 3**. Analisis statistik menggunakan aplikasi pengolah data metode *One Way ANOVA (Analysis of Variance)* memenuhi syarat untuk dilakukan karena dalam uji *Shapiro-Wilk* diperoleh data berdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) dan uji *Levene*, diperoleh data homogen ( $p > 0,05$ ). Pada uji *One Way Anova* aktivitas antioksidan, diperoleh nilai signifikansi lebih besar dari 0,05 ( $p > 0,05$ ).

## PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil uji kuantitatif ekstrak etanol fermentasi kacang undis (*Cajanus cajan* [L] Millsp) oleh *Bacillus subtilis* strain FNCC 0059 secara deskriptif berpengaruh terhadap peningkatan kandungan senyawa fitokimia dan aktivitas antioksidan ekstrak, tetapi secara statistik, lama fermentasi tidak berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan ekstrak *in vitro*.

Kandungan total senyawa fenol (TSF) ekstrak pada umumnya menggunakan standar asam galat. Konsentrasi asam galat dibuat 10 – 100 ppm untuk mendapatkan nilai serapan yang ideal (0,2 - 0,8) sehingga kurva standar atau kurva kalibrasi asam galat yang terbentuk seperti pada hukum *Lambert Beer*, bahwa grafik serapan dengan konsentrasi akan membentuk garis linier. *Reagen follin chiocalteau phenol* (1:1) ditambahkan untuk dapat bereaksi dan mampu mereduksi inti aromatis pada senyawa fenol (gugus hidroksi fenolik), hal ini dapat merubah warna sampel ekstrak menjadi biru. Kemudian penambahan larutan sodium karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 5%, agar sampel ekstrak uji tidak terlalu asam (menciptakan suasana basa), sampel yang telah dicampur *reagen follin chiocalteau phenol*, dan sodium karbonat diinkubasi

30 menit sebelum dibaca serapannya di panjang gelombang 760 nm.<sup>17</sup>

Dari kurva standar didapatkan persamaan regresi linier,  $y = 0,013x + 0,0233$  dan koefisien korelasi ( $r = 0,9987$ , hal tersebut dapat diartikan kurva standar linier / lurus dan terdapat hubungan antara nilai absorbansi dengan konsentrasi asam galat.<sup>12</sup> Kandungan fenolik tertinggi adalah 937,15 mg GAE/100g, terjadi pada fermentasi 24 jam. Pada penelitian Lee dkk, diperoleh total fenol ekstrak fermentasi undis 1500,15 mg/100g dengan pelarut aquades pada lama fermentasi 32 jam.

Flavonoid adalah senyawa fenolik yang paling banyak ditemukan pada tumbuh - tumbuhan. Analisis kuantitatif flavonoid ekstrak bertujuan untuk mengetahui besarnya kandungan flavonoid sampel ekstrak. Penentuan kandungan flavonoid ini dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri UV-Vis berdasarkan prinsip kalorimetri menggunakan aluminium klorida ( $\text{AlCl}_3$ ). Keuntungan metode ini adalah memberikan cara sederhana, cepat dan jumlah sampel yang diperlukan sedikit. Penambahan  $\text{AlCl}_3$  2% pada sampel uji untuk dapat membentuk kompleks yang mengakibatkan perubahan panjang gelombang ke sinar tampak ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi lebih kuning.<sup>18</sup> Quersetin merupakan standar penentuan kandungan flavonoid, karena quersetin adalah salah satu flavonoid golongan flavonol yang bisa bereaksi dengan  $\text{AlCl}_3$  membentuk kompleks.<sup>19</sup> Dari kurva standar quersetin didapatkan persamaan regresi linier  $y = 0,032x + 0,0121$  dengan koefisien korelasi ( $r = 0,9964$ ). Kadar flavonoid tertinggi 107,59 mg QE/100g, diperoleh pada fermentasi 24 jam. Penelitian Lee dkk diperoleh flavonoid 539 mg QE/100g dengan pelarut aquades pada lama fermentasi 32 jam. Etanol adalah salah satu pelarut polar. Menurut Nomer dkk, pelarut polar mampu mengekstrak fenol lebih baik, termasuk flavonoid yang merupakan turunan tertinggi

fenol<sup>20</sup>. Namun flavonoid yang dihasilkan dari penelitian ini lebih rendah daripada Lee dkk.

Penentuan kandungan total tanin pada penelitian ini menggunakan asam tanat sebagai standar baku dan penambahan pereaksi pembentuk warna folin denis yang membentuk kompleks senyawa berwarna biru yang bisa diukur absorbansinya pada daerah sinar tampak. Pada pembuatan kurva standar asam tanat, absorbansi diukur pada panjang gelombang 725 nm<sup>17</sup>, diperoleh persamaan regresi linier  $y = 0,0094x - 0,0073$  dengan koefisien determinasi = 0,9981. Diperoleh kandungan total tanin tertinggi sebesar 1244,74 mg TAE/100g pada fermentasi 24 jam.

Antosianin merupakan golongan senyawa flavonoid memiliki sifat larut dalam air dan penyebab terjadinya warna ungu, biru dan merah pada bunga, sayuran, buah - buahan, dan kacang - kacangan. Analisis kuantitatif total antosianin metode diferensial pH menggunakan spektrofotometer sinar tampak. Pada penelitian ini diperoleh total antosianin tertinggi 14,11 mg/100g, yang terjadi pada fermentasi 16 jam. Hasil pada penelitian ini lebih rendah daripada penelitian Lee dkk, dimana pada penelitian mereka didapatkan total antosianin 85 mg/100g yang diperoleh pada fermentasi 32 jam. Hal ini mungkin disebabkan oleh beberapa faktor yang perlu diteliti lebih lanjut.

Hasil uji aktivitas antioksidan penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol fermentasi kacang undis (*Cajanus cajan* [L] *Millsp*) oleh *Bacillus subtilis* FNCC 0059 ini mempunyai aktivitas antioksidan yang diukur dengan menentukan IC50. Dari **Tabel 2**, diketahui aktivitas antioksidan sampel paling tinggi pada fermentasi 40 jam dengan nilai IC50 = 1132,83 ppm, termasuk antioksidan lemah dengan nilai AAI = 0,04 (< 0,5). Namun quersetin termasuk antioksidan sangat kuat dengan nilai AAI = 11,2 (> 2,0). Hasil pada penelitian ini lebih tinggi daripada penelitian Lee dkk, dimana pada penelitian mereka didapatkan nilai IC50 = 1,47 mg/ml = 1470 ppm yang diperoleh pada fermentasi 32 jam. Hal ini juga mungkin disebabkan oleh beberapa faktor yang perlu diteliti lebih lanjut.

Perbedaan kandungan total fenol, flavonoid, antosianin dan aktivitas antioksidan dibandingkan dengan penelitian sebelumnya Lee dkk, kemungkinan hal tersebut disebabkan faktor adaptasi dalam penelitian, penggunaan *strain Bacillus subtilis* yang berbeda dan pengaruh faktor lingkungan dan geografis terhadap kandungan senyawa metabolit sekunder pada tanaman. Disamping itu menurut Purwaniati dkk, senyawa antosianin bersifat mudah mengalami kerusakan dan kurang stabil. Kestabilannya dapat dipengaruhi pH dan suhu. Pada penelitian ini sampel mengalami pemanasan dengan autoklaf 121<sup>0</sup> C dan juga apabila selama penyimpanan terjadi kenaikan suhu dapat menyebabkan laju degradasi antosianin cenderung meningkat. Antosianin lebih stabil dalam suasana asam daripada suasana basa. Jadi kenaikan suhu dan pH dapat mengakibatkan degradasi antosianin.<sup>13</sup>

## SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh kesimpulan bahwa fermentasi kacang undis (*Cajanus cajan* [L] *Millsp*) oleh *Bacillus subtilis* FNCC 0059 tidak berpengaruh terhadap karakteristik fitokimia dan aktivitas antioksidan ekstrak *in vitro*. Pada penelitian ini total fenol, flavonoid, tanin paling tinggi terjadi pada lama fermentasi 24 jam, sedangkan total antosianin terjadi pada 16 jam. Aktivitas antioksidan yang paling baik terjadi pada lama fermentasi 40 jam.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, dengan melakukan pengukuran pH dan humiditas pada setiap periode fermentasi serta terkait sterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu yang lebih rendah, agar tidak terjadi degradasi senyawa metabolit sekunder. Studi komparatif diperlukan juga pada penelitian lebih lanjut, melalui perbandingan antara kacang undis (*Cajanus cajan* [L] *Millsp*) yang tidak difermentasi dengan yang difermentasi oleh *B. subtilis*.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Katagiri R, Sawada N, Goto A, Yamaji T, Iwasaki M, Noda M, Iso H, Tsugane S. Association of soy and fermented soy product intake with total and cause specific mortality: prospective cohort study. *BMJ*. 2020; 368:m34. DOI: 10.1136/bmj.m34
2. Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., Abete, P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*. 2018; 13 757–772.
3. WHO. Noncommunicable diseases. [online]. 2021. Tersedia di : <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>. (Diakses: 14 Oktober 2021)
4. Kemenkes. Buku Pedoman Penyakit Tidak Menular. *Kementerian Kesehatan Republik Indonesia*. 2019; pp. 1-101.
5. Werdhasari, A. Peran Antioksidan Bagi Kesehatan. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*. 2014; Vol. 3 No. 2, pp. 59-68.
6. Parwata, M.O.A. Bahan Ajar: Antioksidan. *Kimia Terapan Program Pascasarjana Universitas Udayana*. No. April. 2016; pp. 1-54.
7. Simanjuntak, E., Setia, J., Pasar, B. & Tanjung, I.I. Superoksida Dismutase (SOD) Dan Radikal Bebas Fakultas Kedokteran Methodist Indonesia. *Jurnal Keperawatan dan Fisioterapi*. 2020; Vol. 2 No. 2, pp.1-6.
8. Siswarni, M., Putri, Y.I. & Rinda, R. Ekstraksi Kuersetin dari Kulit Terong Belanda (*Solanum betaceum* Cav.) Menggunakan Pelarut Etanol dengan Metode Maserasi dan Sokletasi. *Jurnal Teknik Kimia USU*. 2017; Vol. 6 No. 1, p. 36.

9. Nirma, S. Aplikasi Bakteri *Bacillus subtilis* Dengan Dosis Yang Berbeda Terhadap Dinamika Fitoplankton Pada Tambak Intensif Udang (aname (*Litopenaeus vannamei*)). [skripsi]. 2018; pp. 1-54.
10. Lee, B.H., Lai, Y.S. & Wu, S.C. Antioxidation, angiotensin converting enzyme inhibition activity, nattokinase, and antihypertension of *Bacillus subtilis* (natto)-fermented pigeon pea. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2015; Vol. 23, pp. 7–598.
11. Yoga IB.K.W. Penentuan Konsentrasi Optimum Kurva Standar Antioksidan; Asam Galat, Asam Askorbat dan Trolox® terhadap Radikal Bebas DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 0,1 mM. *Proceedings Seminar Nasional FMIPA UNDIKSHA V Tahun 2015*. 2015; pp. 1-6.
12. Mardiah, Z., Oktaviani, R., Kusbiantoro, B., Handoko D.D. Pengaruh Proses Pemanasan Terhadap Senyawa Fenolik Pada Beras Berwarna. *Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, FMIPA, Departemen Biokimia, IPB*. 2014; pp. 1-9.
13. Purwaniati, Arif A.R., Yuliantini, A. Analisis Kadar Antosianin Total Pada Sediaan Bunga Telang (*Clitoria ternatea*) Dengan Metode Ph Diferensial Menggunakan Spektrofotometri Visible. *Jurnal Farmagazine*. 2020; Vol. VII No.1 pp. 1–6. DOI: <http://dx.doi.org/10.47653/farm.v7i1.157>
14. Rusdi, M., Hasan, T., Ardillah, A. & Evianti, E. Perbandingan Metode Ekstraksi terhadap Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan Batang *Boehmeria virgata*. *Ad-Dawaa' Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018; Vol. 1 No. 1, pp. 16–24.
15. Alfira, A. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Aktif Kulit Batang Sintok (*Cinnamomum Sintoc Blume*). [skripsi]. 2014; pp 1-73.
16. Dahlan, M. S. Statistik Untuk Kedokteran dan Kesehatan, Deskriptif, Bivariat, dan Multivariat, Dilengkapi Aplikasi Menggunakan SPSS. *Epidemiologi Indonesia, Jakarta*. 2014; Seri 1 Edisi 6.
17. Yoga IB.K.W. Analisis Senyawa Kimia Daun Kacapiring. *Plantaxia Yogyakarta*. 2018; pp 1-130.
18. Aminah, Tomayahu, N., Abidin, Z. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Kulit Buah Alpukat (*Persea americana Mill.*) Dengan Metode Spektrofotometri UV-VIS. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. 2016; Vol. 4 No. 2, pp. 1-5.
19. Ariskah, A. Pengaruh Ketinggian Tempat Tumbuh Terhadap Kadar Flavonoid Total Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Kipahit (*Tithonia diversifolia*). [skripsi]. 2022; pp 1-84.
20. Nomer, N.M.G.R., Duniaji, A.S., Nocianitri, K.A. Kandungan Senyawa Flavonoid dan Antosianin Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia sappan L.*) Serta Aktivitas Antibakteri Terhadap *Vibrio cholerae*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*. 2019; Vol. 8 No. 2, pp. 216-225.

