

repository.ub.ac.id

**FERMENTASI PADA KUBIS MENGGUNAKAN KULTUR *Lactobacillus plantarum*
UNTUK PENURUNAN ZAT ANTINUTRISI DAN IDENTIFIKASI METABOLIT
SEKUNDER**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister Sains dalam Bidang Kimia**



Oleh:

Aulin Risyda Fahmia

176090200111001

PROGRAM STUDI ILMU KIMIA

BIDANG MINAT BIOKIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

2019

UNIVERSITAS
BRAWIJAYA

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya, yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Aulin Risyda Fahmia

NIM : 176090200111001

Program Studi : Kimia

Bidang Minat : Biokimia

Judul Tesis : Fermentasi Pada Kubis Menggunakan Kultur *Lactobacillus plantarum*
untuk Penurunan Zat Antinutrisi dan Identifikasi Metabolit Sekunder

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah tesis ini tidak terdapat unsur-unsur plagiasi karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.
2. Apabila ternyata di dalam naskah tesis ini terdapat unsur-unsur plagiasi, maka saya bersedia tesis ini untuk digugurkan, serta diproses sesuai dengan aturan perundang-undangan yang berlaku (UU. No. 20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan Pasal 70).

Demikian pernyataan ini dibuat dengan kesadaran.

Malang, 22 November 2019
Mahasiswa,

Aulin Risyda Fahmia
NIM. 176090200111001

LEMBAR PENGESAHAN

Fermentasi Pada Kubis Menggunakan Kultur *Lactobacillus plantarum* untuk Penurunan Zat Anti Nutrisi dan Identifikasi Metabolit Sekunder

Oleh:

AULIN RISYDA FAHMIA

176090200111001

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 9 Desember 2019
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains dalam bidang **Ilmu Kimia**

**Menyetujui,
Komisi Pembimbing**

Ketua

Anggota

Anna Safitri, S.Si., M.Sc. Ph.D.
NIP. 19800813 200502 2 008

Dr. Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes.
NIP. 19720326 200212 2 001

**Mengetahui,
Ketua Program Studi S2 Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

Dr. Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes.
NIP. 19720326 200212 2 001

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1	Waktu fasa pertumbuhan <i>Lactobacillus plantarum</i>	35
Tabel 5.2	Analisis kadar tanin, glukosa, dan pH pada filtrat hasil fermentasi kubis menggunakan volume inokulum <i>L. plantarum</i> 5% (v/v), pH 6, pada kondisi anaerobik dan suhu ruang selama 48 dan 72 jam	43
Tabel 5.3	Identifikasi waktu retensi puncak asam asetat dan laktat pada filtrat hasil fermentasi kubis menggunakan volume inokulum <i>L. plantarum</i> –5% (v/v), pH 6, pada kondisi anaerobik dan suhu ruang selama 48 dan 72.....	45
Tabel 5.4	Identifikasi senyawa isotiosianat kubis segar dan kubis yang difermentasi (volume inokulum <i>L. plantarum</i> 5%, pH 3,6, kondisi anaerobik, lama fermentasi 72 jam)	47
Tabel 5.5	Kadar sulforafan kubis segar dan kubis terfermentasi (volume inokulum <i>L. plantarum</i> 5% (v/v), pH 3,6, kondisi anaerobik, suhu ruang, lama fermentasi 72 jam)	47
Tabel L4.1	Data densitas optik <i>L. plantarum</i>	66
Tabel L4.2	Data absorbansi larutan standar tanin	66
Tabel L4.3	Data absorbansi larutan standar glukosa	67
Tabel L4.4	Data luas area puncak standar sulforafan.....	68
Tabel L4.5	Data pengaruh volume inokulum terhadap kadar tanin biomassa	68
Tabel L4.6	Data pengaruh volume inokulum terhadap kadar tanin filtrat	69
Tabel L4.7	Data pengaruh volume inokulum terhadap kadar glukosa biomassa.....	71
Tabel L4.8	Data pengaruh volume inokulum terhadap kadar glukosa filtrate.....	74
Tabel L4.9	Data pengaruh pH terhadap kadar tanin biomassa.....	72
Tabel L4.10	Data pengaruh pH terhadap kadar tanin filtrat.....	73
Tabel L4.11	Data pengaruh waktu inkubasi 48 jam terhadap kadar tanin biomassa ..	73
Tabel L4.12	Data pengaruh waktu inkubasi 72 jam terhadap kadar tanin filtrate.....	73
Tabel L4.13	Data pengaruh waktu inkubasi 48 jam terhadap kadar glukosa biomassa ..	74
Tabel L4.14	Data pengaruh waktu inkubasi 72 jam terhadap kadar glukosa filtrate..	74
Tabel L4.15	Data volume H ₂ C ₂ O ₄ .2H ₂ O untuk standarisasi NaOH	74
Tabel L4.16	Volume asam total jam ke 48.....	74
Tabel L4.17	Volume asam total pada jam ke 72	74
Tabel L4.18	Data kadar sulforafan dalam kubis terfermentasi dan kubis	

segar	74
-------------	----



FERMENTASI PADA KUBIS MENGGUNAKAN KULTUR *Lactobacillus plantarum* UNTUK PENURUNAN ZAT ANTINUTRISI DAN IDENTIFIKASI METABOLIT SEKUNDER

Nama Mahasiswa : Aulin Risyda Fahmia

NIM : 176090200111001

Program Studi : Kimia

Bidang Minat : Biokimia

KOMISI PEMBIMBING

Ketua : Anna Safitri, S.Si., M.Sc. Ph.D.

Anggota : Dr. Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes.

TIM DOSEN PENGUJI

Dosen Penguji 1 : Dr. Sasangka Prasetyawan, MS.

Dosen Penguji 2 : Dr. Rurini Retnowati, M.Si.

Tanggal Ujian : 9 Desember 2019

RIWAYAT HIDUP

DATA PRIBADI

Nama Lengkap : Aulin Risyda Fahmia

NIM : 176090200111001

Tempat dan Tanggal Lahir : Sidoarjo, 18 Juli 1994

Alamat : Desa Kesambi, RT/RW: 10/03, Kecamatan Porong, Kabupaten
Sidoarjo 62174

Email : aulinrisydafahmia@gmail.com

RIWAYAT PENDIDIKAN

1. MI Sunan Ampel Kesambi Porong, Sidoarjo (2000-2006)
2. SMP Negeri I Porong, Sidoarjo (2006-2009)
3. SMA Negeri I Porong, Sidoarjo (2009-2012)
4. S1 Program Studi Kimia, Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Maulana Malik Ibrahim, Malang (2012-2016)
5. S2 Program Studi Ilmu Kimia, Bidang Minat Biokimia, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang (2017-2019).

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Tanaman Kubis (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>)5
Gambar 2.2	Biosintesis senyawa Glukosinolat dalam tanaman kubis.....8
Gambar 2.3	Mekanisme reaksi hidrolisis glukosinolat menjadi senyawa isotiosianat oleh enzim mirosinase9
Gambar 2.4	Degradasi glukosinolat dengan enzim mirosinase10
Gambar 2.5	Struktur glukosinolat dan turunan isotiosianat11
Gambar 2.6	Struktur senyawa tannin terhidrolisis.....12
Gambar 2.7	Mekanisme reaksi hidrolisis tannin oleh tanase.....13
Gambar 2.8	Skema metabolisme <i>Lactobacillus plantarum</i>14
Gambar 2.9	Skema metabolisme <i>Lactobacillus plantarum</i>17
Gambar 5.1	Kurva pertumbuhan <i>Lactobacillus plantarum</i>35
Gambar 5.2	Gambaran pelepasan senyawa tanin dalam kubis ke media fermentasi hasil metabolisme <i>L. plantarum</i> dan air37
Gambar 5.3	Pengaruh volume inokulum <i>L. plantarum</i> dan terhadap kadar tanin pada biomassa dan filtrat kubis yang difermentasi pada kondisi anaerobik selama 96 jam dengan suhu ruang38
Gambar 5.4	Pengaruh volume inokulum <i>L. plantarum</i> terhadap kadar glukosa pada biomassa dan filtrat kubis yang difermentasi pada kondisi anaerobik selama 96 jam dengan suhu ruang39
Gambar 5.5	Hubungan antara pH terhadap kadar tanin biomassa dan filtrat hasil fermentasi kubis pada kondisi anaerobik selama 96 jam dengan suhu ruang dan volume inokulum <i>L. plantarum</i> sebesar 5% (v/v).....40
Gambar 5.6	Mekanisme regulasi asam organik oleh mikroorganisme.....42
Gambar 5.7	Kromatogram asam organik pada filtrat hasil fermentasi kubis menggunakan volume inokulum <i>L. plantarum</i> 5% (v/v), pH 6 pada kondisi anaerobik dan suhu ruang selama 48 dan 72 jam44
Gambar 5.8	Struktur senyawa (a) asam laktat dan (b) asam asetat45
Gambar 5.9	Kromatogram LC-MS dari biomassa kubis terfermentasi menggunakan volume inokulum <i>L. plantarum</i> 5% (v/v), pH 3,6 pada kondisi anaerobik dan suhu ruang selama 72 jam (a) kromatogram senyawa iberin (b) kromatogram senyawa sulforafan46

Gambar 5.10	Kromatogram LCMS dari kubis segar (a) kromatogram senyawa iberin (b) kromatogram senyawa sulforafan	47
Gambar L4.1	Kurva hubungan antara konsentrasi larutan tanin dengan absorbansi ..	67
Gambar L4.2	Kurva hubungan antara konsentrasi glukosa dengan absorbansi.....	67
Gambar L4.3	Kurva hubungan antara konsentrasi sulforafan dengan luas puncak kromatogram sulforafan.....	68
Gambar L6. 1	Biakan (a) <i>Lactobacillus plantarum</i>	81
Gambar L6.2	Proses fermentasi pada suhu ruang selama 4 hari secara anaerobik (a) Pengaruh volume inokulum <i>L. plantarum</i> (b) Pengaruh pH terhadap kadar tanin kubis.....	81
Gambar L6.3	Ektrak air tanin dari biomassa kubis terfermentasi.....	81
Gambar L6.4	Pengukuran kadar tanin menggunakan metode Folin Denis.....	81
Gambar L6.5	Pengukuran kadar glukosa pada ekstrak etanol kubis terfermentasi...	82
Gambar L6.6	Hasil sentrifugasi filtrat hasil fermentasi untuk memisahkansel (pelet) dan filtrat (supernatan).....	82

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
IDENTITAS TIM PENGUJI	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS	iv
RIWAYAT HIDUP	v
RINGKASAN	vi
SUMMARY	viii
KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
BAB I.....	1
PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Batasan Masalah.....	4
1.4. Tujuan Penelitian	4
1.5. Manfaat Penelitian	4
BAB II.....	5
TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Tanaman Kubis (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>)	5
2.2. Fermentasi Kubis	13
2.3. Identifikasi Hasil Fermentasi	17
BAB III	22
KERANGKA KONSEPTUAL	22
3.1. Kerangka Penelitian	22
3.2. Kerangka konsep.....	23
3.3. Kerangka Operasional.....	24
3.4. Hipotesis Penelitian.....	25
BAB IV	26

METODOLOGI PENELITIAN.....	26
4.1. Waktu dan Tempat Penelitian	26
4.2. Alat dan Bahan Penelitian.....	26
4.2.2. Alat Penelitian.....	26
4.2.3. Bahan Penelitian.....	26
4.3. Tahapan Penelitian	27
4.4. Prosedur Penelitian.....	28
4.4.1. Preparasi media padat <i>Lactobacillus plantarum</i>	28
4.4.2. Peremajaan biakan murni <i>Lactobacillus plantarum</i>	28
4.4.3. Preparasi media cair	28
4.4.4. Preparasi Kubis	29
4.4.5. Pembuatan kurva pertumbuhan <i>Lactobacillus plantarum</i>	29
4.4.6. Penentuan kondisi optimum fermentasi	30
4.4.7. Penentuan kadar tanin	31
4.4.8. Penentuan kadar glukosa.....	32
4.4.9. Penentuan kadar asam total.....	33
4.4.10. Identifikasi asam laktat dan asam asetat menggunakan HPLC.....	33
4.4.11. Identifikasi turunan glukosinolat menggunakan LCMS	33
4.4.12. Analisis Data	34
BAB V.....	35
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	35
5.1. Kurva Pertumbuhan <i>Lactobacillus plantarum</i>	35
5.2. Optimasi pengaruh volume inokulum terhadap kadar tanin fermentasi	36
5.3. Pengaruh pH terhadap kadar tanin dalam kubis terfermentasi.....	40
5.4. Analisis metabolit sekunder target selama proses fermentasi.....	42
BAB VI	50
PENUTUP	50
6.1. Kesimpulan	50
6.2. Saran.....	50
DAFTAR PUSTAKA	51
LAMPIRAN.....	59



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	TAHAPAN PENELITIAN	59
Lampiran 2	PEMBUATAN REAGEN.....	60
Lampiran 2.1	Pembuatan larutan Na_2CO_3 jenuh	60
Lampiran 2.2	Pembuatan 50 mL larutan stok asam tanat 0,1 g/mL	60
Lampiran 2.3	Pembuatan 100 mL larutan fenol 5 % (b/v)	60
Lampiran 2.4	Pembuatan 50 mL larutan stok glukosa 100 ppm	60
Lampiran 2.5	Pembuatan etanol 80%	60
Lampiran 2.6	Pembuatan $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,05 M	60
Lampiran 2.7	Pembuatan NaOH 0,1 M	61
Lampiran 2.8	Pembuatan KH_2PO_4 10 mM pH 2,4	61
Lampiran 3	DIAGRAM ALIR PENELITIAN	62
Lampiran 3.1	Peremajaan isolat <i>Lactobacillus plantarum</i>	62
Lampiran 3.2	Pembuatan kurva pertumbuhan <i>L. plantarum</i>	62
Lampiran 3.3	Preparasi kubis	62
Lampiran 3.4	Optimasi volume inokulum campuran selama fermentasi	63
Lampiran 3.5	Optimasi pH media awal selama fermentasi	63
Lampiran 3.6	Penentuan kadar tanin dalam sampel kubis terfermentasi	63
Lampiran 3.7	Penentuan glukosa dalam kubis terfermentasi	64
Lampiran 3.8	Fermentasi pada kondisi optimum	64
Lampiran 3.9	Penentuan pH filtrat hasil fermentasi	65
Lampiran 3.10	Preparasi sampel filtrat hasil fermentasi untuk analisis HPLC	65
Lampiran 4	DATA HASIL PENELITIAN DAN PERHITUNGAN	66
Lampiran 4.1	Kurva pertumbuhan <i>L. plantarum</i>	66
Lampiran 4.2	Kurva baku tanin	67
Lampiran 4.3	Kurva baku glukosa	67
Lampiran 4.4	Kurva baku ESTD sulforafan	68
Lampiran 4.5	Data optimasi: pengaruh volume inokulum terhadap kadar tanin biomassa dan filtrat	68
Lampiran 4.6	Data optimasi: pengaruh volume inokulum terhadap kadar glukosa biomassa dan filtrat	69
Lampiran 4.7	Data optimasi: pengaruh pH terhadap kadar tanin biomassa dan filtrat	71

Lampiran 4.8	Data optimasi: pengaruh waktu inkubasi 48 jam dan 72 jam terhadap kadar tanin biomassa dan filtrat.....	72
Lampiran 4.9	Data optimasi: pengaruh waktu inkubasi 48 jam dan 72 jam terhadap kadar glukosa biomassa dan filtrat	73
Lampiran 4.10	Data pengaruh waktu inkubasi 48 jam dan 72 jam terhadap pH filtrat	73
Lampiran 4.11	Data analisis kuantitatif sulforafan dalam sampel kubis terfermentasi dan kubis segar	74
Lampiran 5	UJI STATISTIKA	76
Lampiran 5.1	Pengaruh volume inokulum terhadap kadar tanin biomassa	76
Lampiran 5.2	Pengaruh volume inokulum terhadap kadar tanin filtrat	76
Lampiran 5.3	Pengaruh pH terhadap kadar tanin biomassa	76
Lampiran 5.4	Pengaruh pH media terhadap kadar tanin filtrat	77
Lampiran 6	DOKUMENTASI PENELITIAN	81
Lampiran 7	SURAT KETERANGAN DETEKSI PLAGIASI.....	83
Lampiran 8	SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN KUBIS	84
Lampiran 9	LETTER OF ACCEPTANCE PUBLIKASI JURNAL	85
Lampiran 10	JURNAL ACCEPTED	86

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara dengan sektor pertanian luas dengan tanah yang subur dan kaya akan sumber daya alam khususnya di bidang pertanian dan perkebunan. Berbagai macam produksi telah dihasilkan dari kedua sektor tersebut. Dari sektor perkebunan menghasilkan sayuran seperti kubis, sawi dan sebagainya. Indonesia tidak hanya kaya akan keragaman kubis namun juga menjadi pusat penyebaran kubis. Diperkirakan terdapat banyak kultivar kubis yang tersebar di dunia. Beberapa diantaranya banyak ditanam di Indonesia (Nuryati, 2014). Menurut Fahey (2015) setiap tahun, masing-masing orang di dunia mengkonsumsi kubis sebanyak 6,3 kg, baik dalam bentuk mentah, direbus, dalam bentuk jus, atau difermentasi (*sauerkraut*) (Fahey, 2015). Pemanfaatan dan pengolahan yang tepat akan memberikan dampak positif terhadap kubis karena banyak kandungan yang bermanfaat yang ada di dalam kubis.

Kubis (*Brassica oleracea var capitata L.*) merupakan salah satu jenis sayuran yang dihasilkan dari produksi hasil perkebunan yang rata-rata di tanam di dataran tinggi. Kubis mengandung berbagai jenis vitamin (Vit, C, Vit, B1, Vit, B2, Vit, B6, Vit, A, Vit, E, Vit, K, folat) dan beberapa jenis mineral (magnesium, fosfor, kalsium, natrium, tembaga, mangan, selenium, kalsium) (Fahey, 2015). Kubis juga dikenal memiliki beberapa zat yang dapat mengurangi risiko penyakit. Salah satunya yaitu glukosinolat. Kubis merupakan sumber potensial glukosinolat sebagai antikanker. Glukosinolat (GLS) adalah senyawa non aktif dalam kubis yang terdiri dari oksit sulfonasi, β -tioglukosa serta rantai samping dari asam amino (Cartea, 2016). Glukosinolat dapat terhidrolisis dengan enzim mirosinase yang aktif oleh pemecahan dinding sel untuk membentuk berbagai macam produk. Salah satunya yaitu golongan isotiosianat yang memiliki aktivitas biologis (Palani, 2016). Beberapa senyawa glukosinolat yang telah diidentifikasi

dalam tanaman kubis yaitu glukobarisisin, glukorapanin, sinigrin, glukoiiberin, glukonapin, glukoiiberin, glukoesusin, glukonasturtin, dan glukoiiberin. Beberapa penelitian terdahulu menunjukkan bahwa senyawa golongan isotiosianat mampu menghambat pertumbuhan sel kanker, seperti *sulforaphane* (SFN) yang memiliki aktivitas antikanker terhadap sel kanker paru-paru. Iberin (IB, *1-isothiocyanate-3(methylsulfinyl)-propane*) mampu menginduksi apoptosis atau antiproliferasi sel neuroblastoma (Jadhav et al, 2007). Pada penelitian lain oleh Penas et al. (2012) mengidentifikasi senyawa turunan glukosinolat seperti iberin, alil isotiosianat, iberin nitril dan sulforafan pada kubis putih yang difermentasi dengan kultur campuran selama 7 hari dengan suhu 22-25 °C dengan bantuan bakteri asam laktat *Lactobacillus* dan *Leuconostoc* (Penas et al., 2012).

Selain kandungan nutrisi dalam kubis yang sangat melimpah seperti beberapa jenis vitamin dan mineral, kubis juga mengandung beberapa zat antinutrisi seperti tanin. Sifat antinutrisi dari tanin berasal dari kemampuannya untuk membentuk kompleks dengan protein, sehingga mengganggu ketersediaan dan pemanfaatan protein dalam tubuh (Beniwal et al. 2014). Pemanfaatan secara sederhana untuk menurunkan kandungan antinutrisi pada kubis saat ini yaitu melalui proses fermentasi. Hidrolisis tanin yang dikatalisis tanase dipengaruhi oleh jenis mikroorganisme, suhu dan pH. Penelitian oleh Mosha et al. (1995) menunjukkan bahwa pada kubis segar terdapat senyawa tanin sebesar 1266 mg tiap 100 gram berat kubis segar (Mosha et al. 1995). Penelitian lainnya oleh Obgede et al. (2015) menunjukkan adanya tanin pada kubis sebesar 2,3 mg/100 gram berat kering (Obgede et al. 2015). Penelitian oleh Palani et al, (2016) fermentasi dengan menggunakan bantuan bakteri asam laktat dapat mendegradasi senyawa tanin dengan adanya aktivitas enzim tanase. Aktivitas tannase yang berasal dari *L. plantarum* dan *L. brevis* diketahui dapat mendegradasi asam tanat dengan aktivitas optimum hingga 75 % pada suhu 30 °C sampai 50°C dan pH 5 (Palani et al, 2016). Oboh (2006) juga berhasil menurunkan kandungan zat antinutrisi (sianida dan asam fitat) dan meningkatkan protein pada kulit singkong

yang diinokulasi dengan cairan yang mengandung campuran *Lactobacillus delbruckii*, *Lactobacillus coryneformis*, dan *S. cerevisiae* (2:1:1) selama 7 hari pada suhu 30°C (Oboh, 2006).

Saat ini, fermentasi dengan memanfaatkan bakteri asam laktat banyak dikembangkan pada berbagai bahan pangan dan mendapatkan status aman dari FAO (Behera et al., 2018; Nuobariene et al., 2014). Berdasarkan beberapa penelitian diatas, penggunaan kultur campuran dapat menurunkan zat antinutrisi dan mengidentifikasi senyawa glukosinolat. Oleh karena itu, pada penelitian ini, dilakukan fermentasi dengan menggunakan kultur tunggal *L. plantarum* yang diketahui dapat menghasilkan tanase. Selama proses fermentasi, dilakukan penentuan kondisi optimum, khususnya volume inokulum dan pH. Tolak ukur kondisi optimum ditentukan berdasarkan penurunan kadar senyawa tanin. Selain itu, oleh karena *L. plantarum* merupakan bakteri heterofermentatif (Batt, 2014) yang mampu memproduksi asam laktat dan asetat sekaligus, maka dilakukan pula identifikasi kedua senyawa tersebut dalam filtrat sisa fermentasi. Kemudian, untuk mengetahui kandungan nutrisi dalam kubis terfermentasi, dilakukan identifikasi golongan senyawa isotiosianat yaitu iberin dan sulforafan yang telah diketahui memiliki aktivitas antikanker.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh volume inokulum *L. plantarum* terhadap kadar senyawa tanin dalam kubis yang telah difermentasi ?
2. Bagaimana pengaruh pH terhadap kadar senyawa tanin dalam kubis yang telah difermentasi menggunakan *L. plantarum* ?
3. Bagaimana pengaruh waktu fermentasi terhadap jenis asam organik dalam filtrat hasil fermentasi dan senyawa isotiosianat pada biomassa hasil fermentasi menggunakan *L. plantarum* ?

1.3 Batasan Masalah

1. Kubis yang digunakan diperoleh di desa Poncokusumo Kabupaten Malang.
2. Bakteri yang digunakan yaitu *Lactobacillus plantarum*.
3. Konsentrasi inokulum yang digunakan yaitu 5%, 10%, 15%, dan 20% (v/v).
4. pH yang digunakan yaitu 4, 5, 6, dan 7.
5. Variasi waktu inkubasi pada proses fermentasi yaitu jam ke-48 dan ke-72.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Menentukan volume inokulum *L. plantarum* optimum untuk menurunkan kadar tanin dalam kubis yang telah difermentasi.
2. Menentukan pH optimum untuk menurunkan kadar tanin dalam kubis yang telah difermentasi menggunakan *L. plantarum*.
3. Mengetahui pengaruh waktu inkubasi pada proses fermentasi terhadap jenis asam organik dalam filtrat hasil fermentasi dan senyawa isotiosianat pada biomassa hasil fermentasi menggunakan *L. plantarum*.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini yaitu untuk mengetahui kondisi optimum yang tepat dalam menurunkan kandungan zat antinutrisi dalam kubis melalui proses fermentasi menggunakan kultur *L. plantarum*. Selanjutnya, hasil dari fermentasi kubis yaitu senyawa isotiosianat juga diketahui berpotensi sebagai antikanker.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kubis (*Brassica oleracea L. capitata*)

Kubis adalah salah satu sayuran dari keluarga *Brassicaceae* (*Brassica oleracea L. capitata*) yang dapat menjadi pilihan makanan yang baik karena memberikan serat dan vitamin dasar namun rendah kalori. Sayuran ini dapat ditanam di dataran rendah maupun di dataran tinggi dengan curah hujan rata-rata 850-900 mm. Kubis mengandung sejumlah senyawa yang dapat merangsang pembentukan gas dalam lambung sehingga menimbulkan rasa kembung atau disebut dengan zat-zat goiterogen. Kubis juga mengandung kelompok glukosinolat yang dapat menyebabkan rasa agak pahit (Rokayya et al., 2013). Kubis yang banyak ditemui dan dikonsumsi di Indonesia adalah kubis hijau. Nilai kandungan kubis hijau per 100 gram dapat dilihat pada **Tabel 2.1**:



Gambar 2.1. Kubis (*Brassica oleracea L. capitata*)

Kubis dikenal memiliki beberapa zat yang dapat mengurangi risiko penyakit. Kubis merupakan sumber potensial glukosinolat sebagai antikanker dan antiinflamasi. Kubis mengandung 22 jenis asam amino, dengan kadar total berkisar antara 365,9 mg - 1089,1 mg/100 g kubis segar (Cartea et al., 2011). Penelitian menggunakan kubis segar dengan standar quercetin menyebutkan bahwa kandungan flavonoid total kubis adalah 39,95 mg/ g berat segar (Rokayya et al., 2013). Asam hidroksisinamat yang terkandung dalam sayuran *Brassica* antara lain asam p-kumarat, sinapat, ferulat, dan kafeat. Asam hidroksisinamat memiliki aktivitas anti

inflamasi, antimikroba, antialergi dan antitumor (Cartea et al., 2011). Selain memiliki berbagai nutrisi, kubis juga memiliki zat antinutrisi yaitu fitat, tanin dan oksalat.

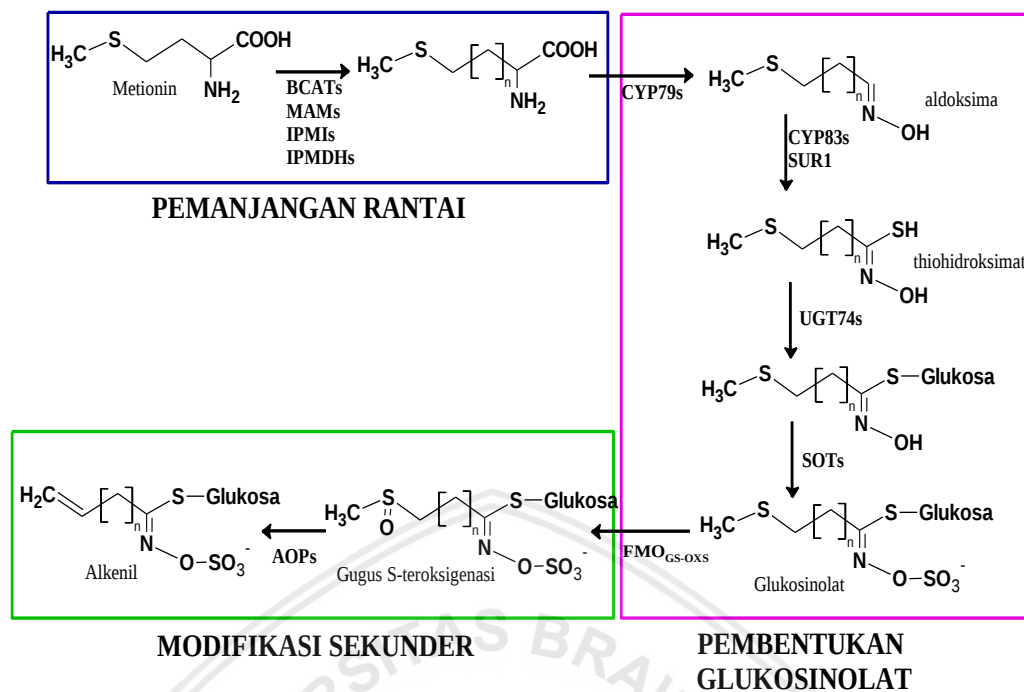
Kandungan Gizi	Kubis hijau
Gula (g)	3,2
Protein (g)	1,28
Lemak (g)	0,1
Karbohidat (g)	5,8
Kalsium (mg)	40
Fosfor (mg)	26
Zat besi (mg)	0,47
Natrium (mg)	8
Serat (mg)	2,5
Kalium (mg)	170
Vitamin B (mg)	0,1
Vitamin C (mg)	36,6
Magnesium (mg)	12

Tabel 2.1. Nilai kandungan gizi kubis hijau dalam 100 g.

Glukosinolat merupakan kelas senyawa organik yang mengandung sulfur dan nitrogen serta diturunkan dari glukosa dan asam amino (Palani et al., 2016). Molekul glukosinolat memiliki atom karbon yang terikat melalui atom sulfur ke gugus tioglukosa dan melalui atom nitrogen ke gugus sulfat. Di samping itu, karbon juga terikat ke gugus samping (R1). Glukosinolat yang berbeda memiliki gugus samping yang berbeda. Variasi gugus samping ini menyebabkan variasi aktivitas biologis pada senyawa ini. Glukosinolat dikelompokkan menjadi 3 kelompok yaitu Glukosinolat alifatik seperti sinigrin, terbentuk dari asam amino alifatik (biasanya metionin). Glukosinolat aromatik seperti sinalbin, terbentuk dari asam amino aromatik (fenilalanin atau tirosin) dan glukosinolat indol, yang terbentuk dari asam amino

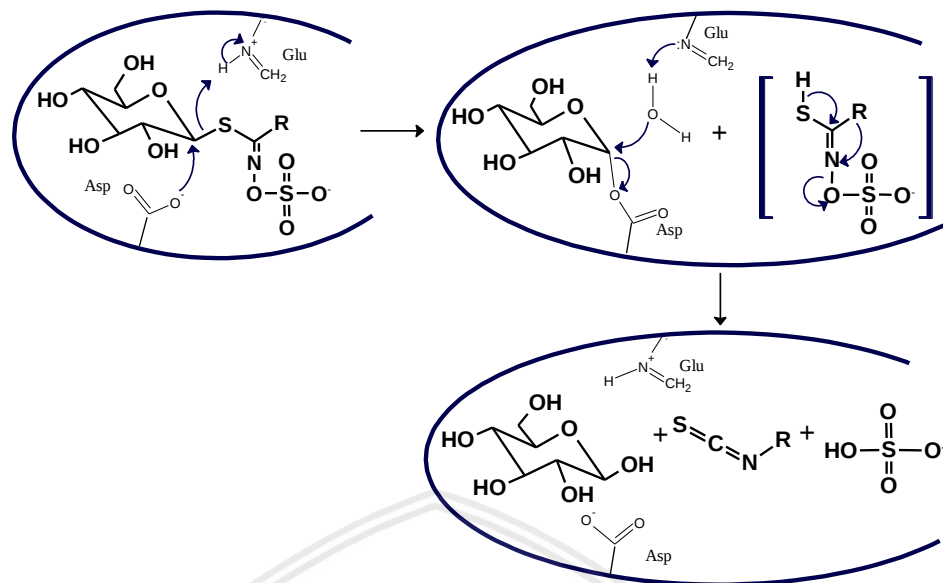
indol seperti triptofan (Ishida et al., 2014). Keragaman jenis glukosinolat tergantung pada modifikasi ikatannya dengan gugus lain melalui hidroksilasi dan metilasi. Senyawa glukosinolat yang teridentifikasi yaitu pada 100 g kubis segar mengandung sinigrin (60,38 μmol), glukoi berin (46,04 μmol), glukobrasisin (18,30 μmol), glukonapin (14,17 μmol), glukorafanin (7,57 μmol), glukoi berverin (2,11 μmol), progoitrin (1,23 μmol), dan senyawa lain dalam jumlah kecil yaitu glukoesurin, glukoesolin, glukotropaeolin, glukonasturtin (Palani et al., 2016; Vig et al., 2009).

Jalur biosintesis glukosinolat terdiri dari tiga tahap: perpanjangan rantai asam amino, konversi gugus amino menjadi struktur glukosinolat inti, dan modifikasi rantai samping (**Gambar 2.2**). Proses pertama dari perpanjangan rantai adalah deaminasi asam amino seperti metionin menjadi asam okso oleh asam amino rantai cabang amino transferase (BCAT), lalu diperpanjang dengan penambahan satu gugus metilena oleh aktivitas metilalkil malat sintase (MAM), isopropilmalat isomerase (IPMI), dan isopropilmalat dehidrogenase (IPMDH). Asam okso tersebut ditransformasikan ke asam amino yang sesuai oleh BCAT. Kemudian, asam amino mengalami proses pembentukan struktur inti glukosinolat. Asam amino diubah menjadi aldoksima oleh sitokrom P450 (CYP79s) yang kemudian dioksidasi menjadi bentuk yang diaktifkan oleh CYP83s. Bentuk aktif tersebut diubah menjadi tiorhidroksimat melalui reaksi konjugasi glutathione dan liase C-S (SUR1). Tiorhidroksimat diubah menjadi struktur glukosinolat oleh S-glukosiltransferase. Setelah pembentukan struktur glukosinolat, rantai samping dimodifikasi dengan berbagai cara seperti oksigenasi, hidroksilasi, alkenilasi, benzoilasi, dan metoksilasi (Ishida et al., 2014; Radojcic et al., 2008).



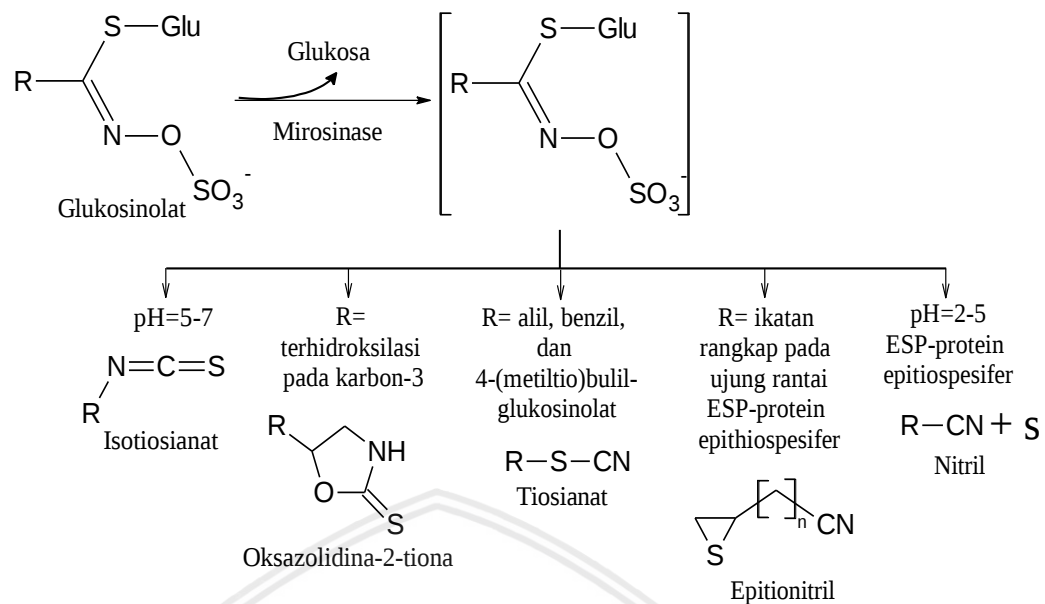
Gambar 2.2 Biosintesis senyawa glukosinolat dalam tanamankubis (*Brassicaceae*) (Ishida et al., 2014)

Glukosinolat bukan termasuk senyawa bioaktif. Glukosinolat dapat diubah menjadi senyawa bioaktif dengan bantuan enzim mirosinase. Enzim tersebut dapat menghidrolisis glukosinolat menjadi intermediat yang tidak stabil melalui penghilangan bagian glukosa, yang kemudian terdegradasi lebih lanjut membentuk berbagai produk, seperti isotiosianat, tiosianat, nitril, epitionitril (Palani et al., 2016). Pada **Gambar 2.3**, menunjukkan mekanisme hidrolisis glukosinolat oleh enzim mirosinase (Iori et al., 1996).



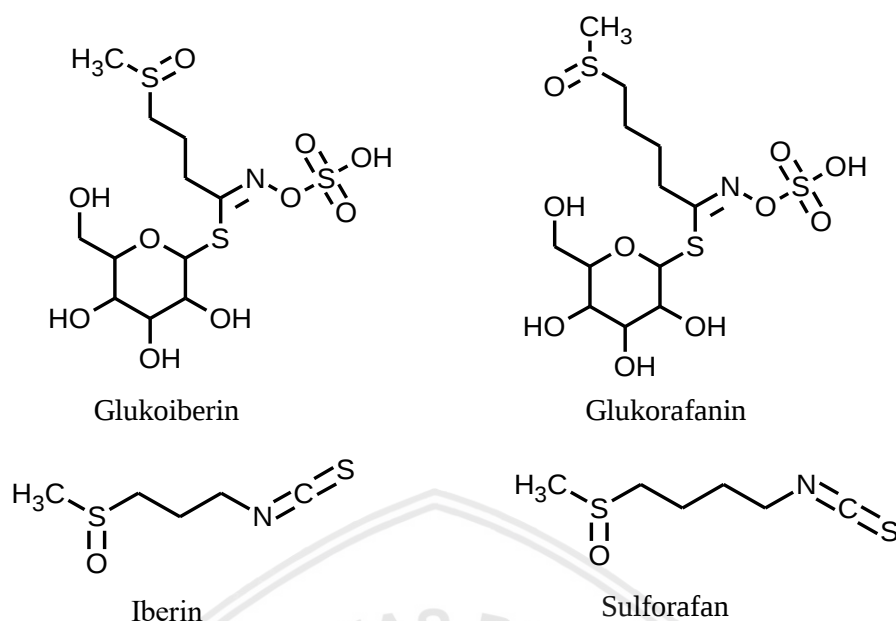
Gambar 2.3 Mekanisme hidrolisis glukosinolat menjadi senyawa isotiosanat dengan bantuan enzim mirosinase (Iori et al., 1996)

Pada kondisi netral, glukosinolat dapat terhidrolisis menghasilkan isotiosianat. Pada pH asam dan dengan adanya ion Fe^{2+} , terjadi pembentukan nitril, sedangkan penambahan faktor protein seperti protein epitiospesifer (ESP) terbukti mampu mendegradasi glukosinolat menjadi epitionitril. Manfaat kemopreventif dari sayuran ini dikaitkan dengan kandungan glukosinolatnya yang relatif tinggi (Wang, 2012). Sinigrin, *glucoiberin* dan *glucobrassicin* termasuk glukosinolat yang paling melimpah di kubis (Fenas, 2011). Pembentukan glukosinolat akan tergantung pada substrat, kondisi pH, ketersediaan ion besi, tingkat dan aktivitas mirosinase dan adanya beberapa kofaktor protein spesifik seperti protein epiteleptor (Bones, 2015). Pada **Gambar 2.4** menjelaskan tentang degradasi glukosinolat dengan bantuan enzim mirosinase.



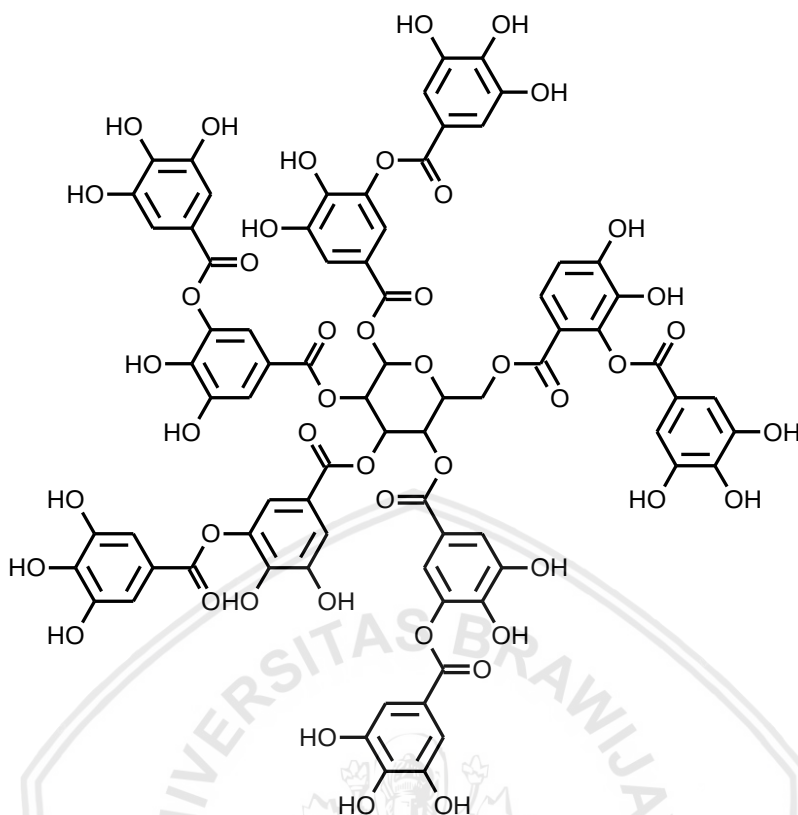
Gambar 2.4. Degradasi glukosinolat dengan enzim mirosinase (Radocjic et al., 2008)

Beberapa turunan glukosinolat, terutama isotiosianat, nitril dan indol telah menarik perhatian sebagai kemopreventif potensial agen melawan jenis kanker tertentu. Sulforafan merupakan golongan isotiosianat yang berasal dari glukosinolat *glucoraphanin* yang merupakan induser kuat. SFN juga menghambat aktivitas *histone deacetylase* sehingga inhibitor enzim ini memiliki potensi kemoterapi (Venema, 2014). Iberin (IB, *1-isothiocyanate-3(methylsulfinyl)-propane*) berasal dari dekomposisi glucoiberin yang memiliki potensi antikarsinogenik karena mampu menghambat proliferasi sel glioblastoma dan sel neuroblastoma manusia melalui induksi apoptosis sel (Jadhav, 2007). Suatu studi di *Fred Hutchinson Cancer Research Center* di Amerika serikat yang melibatkan lebih dari seribu orang mengungkapkan bahwa konsumsi kubis dapat menekan risiko kanker hingga 44%. Sementara studi di Belanda dengan sampel yang relatif sama mengungkapkan bahwa konsumsi kubis juga dapat mengurangi risiko kanker hingga 49%.



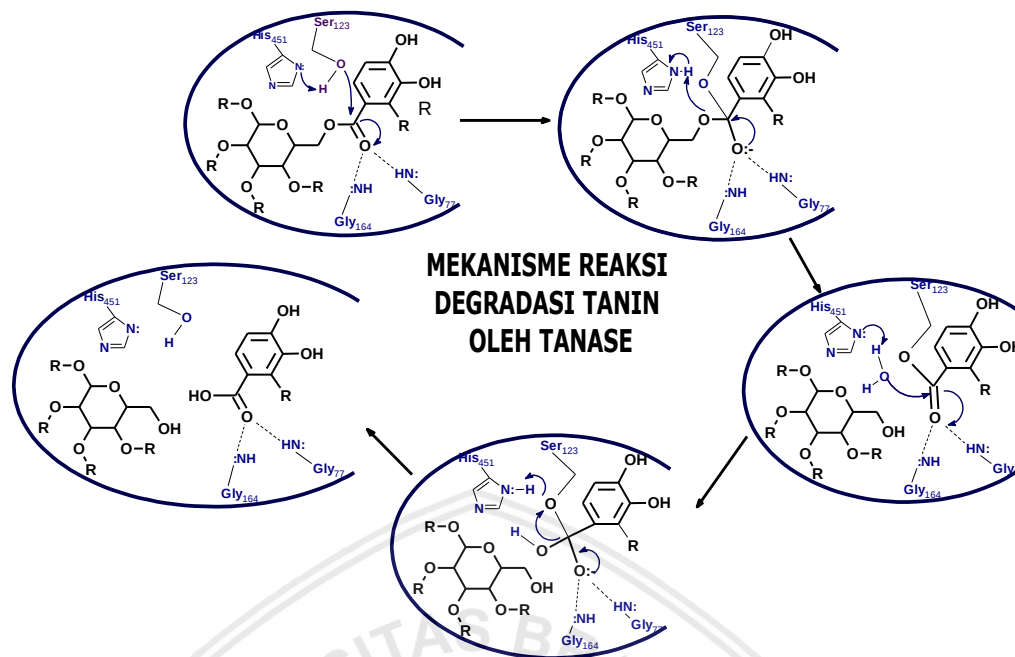
Gambar 2.5. Struktur glukosinolat dan turunan isotiosianat

Tanin merupakan salah satu dari zat antinutrisi yang ada dalam kubis. Kandungan tanin dalam kubis sebesar 2,84 mg/100 g berat kering (Obgede et al., 2015). Efek antinutrisi dari tanin dapat mengganggu asupan protein ke dalam tubuh. Hal ini dikarenakan tanin berikatan langsung dengan enzim-enzim pencernaan dan membentuk kompleks dengan protein melalui ikatan kovalen dan ikatan hidrogen yang membentuk substansi yang tahan terhadap enzim pencernaan. Hal inilah yang menyebabkan protein tidak dapat diserap secara baik oleh tubuh sehingga mengganggu ketersediaan protein dalam tubuh (Liener, 1998). Berdasarkan sifat dan strukturnya, tanin dibagi menjadi dua yaitu tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tanin terhidrolisis yaitu suatu senyawa fenolik yang dapat berikatan dengan glukosa atau galat, seperti metil galat, asam tanat, dan klorognat. Jenis tanin ini dapat ditemukan pada biji, daun, buah dan akar (Beniwal et al., 2014). Tanin terkondensasi dapat terbentuk dari kondensasi senyawa katekin dengan ikatan ganda seperti D-katekin dan L-epigallocatekin. Jenis tanin ini banyak ditemukan dalam bagian kulit kayu tanaman (Fekadu, 2014).



Gambar 2.6. Struktur senyawa tanin terhidrolisis (Beniwal et al., 2014)

Senyawa tanin dapat dihidrolisis oleh enzim tanase. Enzim ini dapat mengkatalisis pemecahan ester sehingga membebaskan glukosa dan asam galat (Beniwal et al., 2014). Berdasarkan struktur kristalnya, mekanisme hidrolisis oleh enzim tanase pada substrat tanin terjadi ketika berikatan dengan substrat, gugus hidroksil dari Ser163 akan memulai menyerang nukleofilik pada karbonil dari unit galloil. Serangan itu dibantu oleh His451 yang bertindak sebagai basa, sehingga terbentuk intermediat tetrahedral yang distabilkan oleh interaksi ikatan hidrogen dengan Gly77 dan Gly164 yang membentuk lubang oksianion. His 451-H akan bertindak sebagai asam dan intermediat tetrahedral tersebut akan terdegradasi untuk menghasilkan produk alkohol dan intermediat asil-enzim. Molekul air kemudian teraktivasi oleh His451 untuk menyerang asil-enzim dan membentuk intermediat tetrahedral kedua, yang akan terdegradasi melepaskan asam galat dan meregenerasi enzim (Ren et al., 2013).

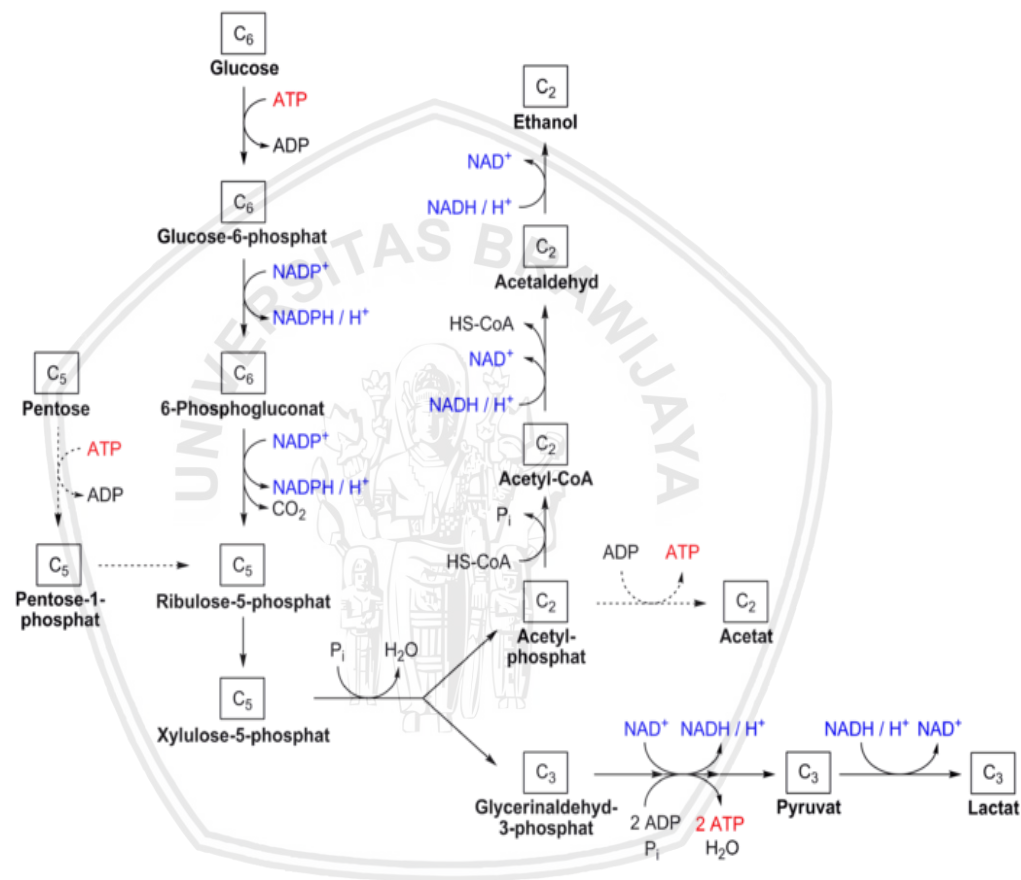


Gambar 2.7. Mekanisme reaksi hidrolisis tanin menjadi glukosa dan asam galat oleh tanase (Ren et al., 2013).

2.2. Fermentasi Kubis

Fermentasi adalah suatu aktivitas mikroorganisme terhadap senyawa molekul organik kompleks seperti protein, karbohidrat, dan lemak yang mengubah senyawa-senyawa tersebut menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana, mudah larut dan daya cerna tinggi. Fermentasi dapat terjadi karena adanya aktivitas mikroba penyebab fermentasi pada substrat organik yang sesuai. (Hidayat, 2006). Metode fermentasi dapat dibagi menjadi dua, yaitu fermentasi terendam dan fermentasi padat. Pada fermentasi terendam, kultur mikroorganisme dilakukan dalam media cair. Metode tersebut melibatkan pertumbuhan mikroorganisme (bakteri dan jamur) dalam wadah tertutup yang mengandung kaldu (*broth*) yang diperkaya nutrisi dan konsentrasi oksigen tinggi. Sementara itu, fermentasi padat biasanya melibatkan penanaman mikroorganisme pada substrat padat (Renge et al., 2012). Berdasarkan jenis bakteri yang digunakan, fermentasi kubis dapat menghasilkan asam laktat dan mengubah kandungan zat antinutrisi tanaman. Bakteri asam laktat terbagi menjadi dua jenis, yaitu homofermentatif dan heterofermentatif (Sariaslani, 2009). Pada fermentasi jenis

homofermentatif akan menghasilkan asam laktat sebagai produk utamanya sedangkan pada fermentasi jenis heterofermentatif akan dihasilkan asam laktat dan produk samping seperti asam asetat, etanol dan karbondioksida (CO₂). Secara garis besar, keduanya memiliki kesamaan dalam mekanisme pembentukan asam laktat, yaitu piruvat akan diubah menjadi asam laktat dan diikuti dengan proses transfer elektron dari NADH menjadi NAD⁺.



Gambar 2.8. Jalur fermentasi BAL heterofermentatif (Zhou et al., 2011)

Pertumbuhan mikroorganisme dan produksi metabolit selama proses fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu konsentrasi inokulum, komponen media, dan faktor fisik seperti suhu, pH, konsentrasi substrat (Sariaslani, 2009). Inokulum sangat berpengaruh dalam proses fermentasi. Jumlah atau konsentrasi, tipe (spora atau

vegetatif, terutama untuk golongan jamur), umur, dan viabilitas inokulum terutama dapat mempengaruhi produksi pellet. Penentuan ukuran atau jumlah inokulum selama proses fermentasi umumnya bertujuan untuk mencapai reproduibilitas proses dan aktivitas inokulum, dan menurunkan fasa lag jika media yang digunakan untuk kultivasi dan fermentasi berbeda (Sariaslani, 2009). pH dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme, yang pada gilirannya mempengaruhi laju produksi (Norouzian, 2008). Selain itu, pH juga berperan dalam menentukan jalur fermentasi, sehingga mampu menentukan produk fermentasi atau menggeser biosintesis metabolit secara umum ketika produk target adalah asam organik (Lin et al., 2014; Norouzian, 2008).

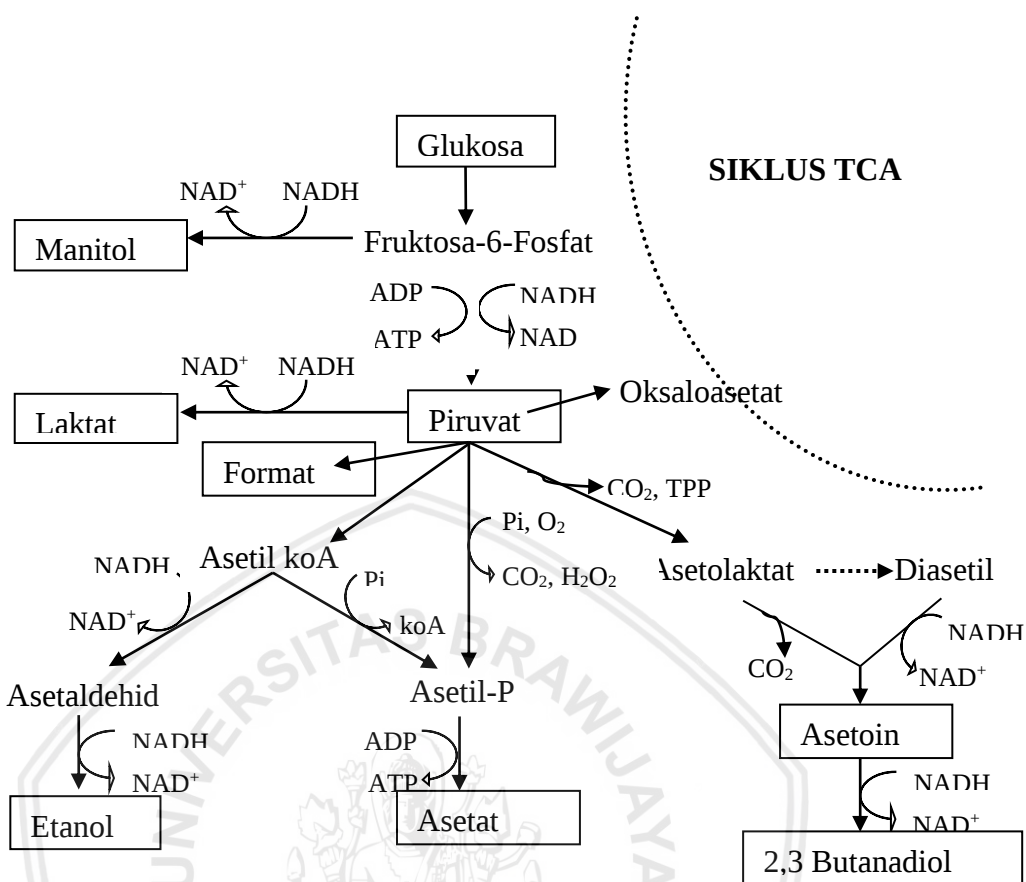
Secara keseluruhan, produk fermentasi dapat berbeda-beda. Produk fermentasi dapat digolongkan menjadi (Anderson, 2009):

- Metabolit primer seperti etanol, asam laktat, asam asetat, asam amino, protein, dan asam sitrat.
- Seluruh produk sel seperti ragi roti dan ragi bir.
- Metabolit sekunder seperti antibiotik, senyawa antitumor, senyawa antijamur, dan bioinsektisida.
- Senyawa penyimpanan energi seperti gliserol, polimer, minyak, dan polisakarida.
- Protein seperti enzim ekstraseluler dan intraseluler, protein sel tunggal, dan protein rekayasa genetika.

Salah satu jenis BAL yang sering digunakan yaitu *Lactobacillus plantarum* merupakan salah satu jenis bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri yang mempunyai kemampuan untuk membentuk asam laktat dari metabolisme karbohidrat dan tumbuh pada pH lingkungan yang rendah (Batt, 2014). *L. plantarum* adalah salah satu spesies bakteri asam laktat yang sering digunakan dalam fermentasi sayuran dan buah-buahan (Filannino et al., 2014), karena bakteri tersebut telah mendapatkan status *Generally Recognize as Safe* (GRAS) dan *Quantified Presumption of Safety* (QPS) oleh FAO dan WHO (Behera et al., 2018).

plantarum menghasilkan enzim invertase untuk mengubah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa, interaksi antara substrat dan enzim yang terjadi merupakan ikatan hidrogen. Adapun sisi aktif enzim sukrase merupakan kumpulan dari asam amino asparagin (Asp), glutamine (Glu), dan triptofan (Trp) (Alberto, 2014). Selain menghasilkan enzim invertase *Lactobacillus plantarum* juga menghasilkan enzim aldolase yang berperan untuk memecah fruktosa 1,6 difosfat menjadi molekul triosephosfat yang selanjutnya akan dikonversi menjadi asam laktat melalui piruvat (Alberto, 2014). Pertumbuhan optimal *Lactobacillus* yaitu pada suhu 30–40 °C, terutama pada suhu 37 °C, tetapi bakteri tersebut dapat tumbuh pada kisaran suhu 5–53 °C. *L. plantarum* memiliki pH pertumbuhan optimal 5,5–5,8, tetapi bakteri tersebut juga dapat tumbuh pada pH <5 (Batt, 2014). *L. plantarum* memiliki enzim tanase. Beberapa penelitian telah berhasil memproduksi enzim tanase dari bakteri *L. plantarum* melalui proses fermentasi. Penelitian oleh Natarajan & Rajendran (2009) telah mempelajari kondisi optimum produksi enzim tanase ekstraseluler dengan cara menumbuhkan kultur *L. plantarum* pada media yang mengandung 0,35% asam tanat. Bakteri tersebut mampu memproduksi enzim tanase dengan suhu optimum 30 °C, pH 6, dan kecepatan agitasi optimum 125 rpm, serta memiliki aktivitas sebesar 9,29 U/mL (Natarajan & Rajendran, 2009). Berdasarkan *Taxonomic Outline of the Prokaryotes*, *L. plantarum* diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Divisi	: <i>Firmicutes</i>
Kelas	: <i>Bacilli</i>
Ordo	: <i>Lactobacillales</i>
Famili	: <i>Lactobacillaceae</i>
Genus	: <i>Lactobacillus</i>
Spesies	: <i>L. plantarum</i>



Gambar 2.9. Skema metabolisme *L. plantarum* (Corsetti, 2011)

2.3 Identifikasi Hasil Fermentasi

Spektrofotometer UV-VIS merupakan instrumen spektrofotometer dengan kisaran sinar Ultraviolet 200-400 nm, dan visibel 400-750 nm. Konsentrasi analit dalam suatu sampel secara linear terkait dengan absorbansi seperti yang diberikan oleh hukum Lambert-Beer (Skoog et al., 2007):

$$A = -\log T = \log \frac{p_0}{p} = \epsilon bc$$

Keterangan: A = absorbansi; T = transmitansi; p_0 = cahaya sebelum melewati larutan; p = cahaya setelah melewati larutan; ϵ = koefisien ekstingsi molar; b = tebal kuvet; c = konsentrasi larutan

Transmisi atau absorbansi akan tertera pada layar LED. Untuk memperoleh pembacaan % transmitansi suatu sampel, kuvet yang mengandung blanko (umumnya

pelarut) dimasukkan ke dalam kompartemen sel terlebih dahulu dan ditekan tombol T 100%, sehingga sejumlah cahaya mencapai detektor. Proses ini disebut kalibrasi T 100%. Setelah itu, sampel yang akan diukur ditempatkan dalam kompartemen sel, dan persen transmitansi atau absorbansi dibaca langsung dari layar LED. Kandungan tanin dalam tanaman dapat ditentukan secara spektrofotometri menggunakan metode Folin-Denis. Metode tersebut didasarkan pada oksidasi molekul yang mengandung gugus hidroksil. Senyawa tanin akan mereduksi asam fosfotungstomolibdat dalam larutan basa untuk menghasilkan larutan berwarna biru. Intensitas larutan tersebut akan setara dengan jumlah tanin dan dapat ditentukan dengan standar asam tanat (Polshettiwar et al., 2007). Beberapa penelitian telah mengaplikasikan metode Folin Denis untuk penentuan senyawa tanin. Penelitian oleh Guriya et al. (2015) telah menunjukkan penentuan tanin dalam ekstrak brokoli (*Brassica oleracea*) melalui pengukuran absorbansi larutan yang mengandung 50 μL ekstrak + 7,5 mL akuades + 0,5 mL reagen Folin-Denis + 1 mL Na_2CO_3 pada panjang gelombang 700 nm (Guriya et al., 2015). Senyawa tanin yang berhasil dideteksi dengan analisis tersebut sebesar 1,84 $\mu\text{g/mL}$. Selain itu, Nair (2015) juga telah menunjukkan bahwa terdapat 1,7% (b/b) senyawa tanin dalam tumbuhan pinang (*Pann Masala*) yang dianalisis dengan metode Folin Denis pada panjang gelombang 760 nm (Nair et al., 2015).

Metode spektrofotometer juga dapat digunakan untuk penentuan gula atau karbohidrat. Metode asam sulfat fenol merupakan salah satu metode sederhana, cepat, dan sensitif, dan memberikan reproduksibilitas tinggi untuk pengukuran gula secara spektrofotometri (Dubois et al., 1956). Prinsip dari metode sulfat fenol yaitu dalam media asam yang panas, glukosa akan didehidrasi menjadi hidroksi metil furfural, yang nantinya akan berwarna kuning kecoklatan dengan penambahan fenol dan memiliki absorbansi maksimum pada 490 nm. Asam sulfat menyebabkan seluruh gula nonpereduksi dikonversi menjadi gula pereduksi, sehingga metode ini dapat menentukan gula total, termasuk mono-, di-, oligo- dan polisakarida yang ada di dalam makanan. Hasil pengukuran karbohidrat umumnya dinyatakan dalam bentuk karbohidrat tunggal, seperti glukosa. Metode sulfat fenol merupakan metode nonstoikiometri, sehingga diperlukan preparasi kurva kalibrasi menggunakan

serangkaian larutan standar dengan konsentrasi karbohidrat yang diketahui (Swaroopanand et al., 2015). Tata cara penentuan gula dengan metode sulfat fenol yaitu 2 mL larutan ditambahkan 0,05 mL fenol 80%, dilanjutkan dengan penambahan 5 mL asam sulfat pekat dengan cepat (10–20 detik) yang diarahkan langsung pada permukaan cairan (bukan pada sisi tabung reaksi) untuk mendapatkan pencampuran yang baik. Tabung didiamkan 10 menit, dikocok, dan ditempatkan selama 10 hingga 20 menit dalam penangas air selama 25–30 menit sebelum pembacaan pada panjang gelombang 490 nm. Konsentrasi gula kemudian dapat ditentukan dengan mengacu pada kurva standar (Dubois et al., 1956). Metode sulfat fenol telah diaplikasikan untuk penentuan total gula (sebesar 1,85–4,2% (b/b) dalam filtrat sisa pembuatan *sauerkraut* (Pandey & Garg, 2013). Teknik HPLC telah digunakan untuk analisis senyawa organik hasil proses fermentasi.

HPLC merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis bahan obat, baik dalam bulk atau dalam sediaan farmasetik (Thammana, 2016). Prinsip dasar dari HPLC adalah memisahkan setiap komponen dalam sample untuk selanjutnya diidentifikasi (kualitatif) dan dihitung berapa konsentrasi dari masing-masing komponen tersebut (kuantitatif). Analisa kualitatif bertujuan untuk mengetahui informasi tentang identitas kimia dari analit dalam suatu sampel. Sedangkan analisa kuantitatif untuk mengetahui jumlah dan konsentrasi analit tersebut dalam sampel. Dalam kromatografi cair, fase gerak berupa pelarut cair yang mengandung sampel sebagai zat terlarut (Skoog et al., 2014). Sebagai contoh Miranda et al. (2016) menggunakan teknik HPLC untuk menganalisis asam asetat dan kafein dalam teh kombucha fermentasi menggunakan metanol sebagai komponen organik dan 0,1% asam ortofosfat dalam akuades sebagai komponen cair dalam fasa gerak, yang dipantau masing-masing pada panjang gelombang 210 nm dan 273 nm. Pada penelitian itu pula, teknik HPLC juga dapat digunakan untuk mengkuantifikasi asam asetat secara lebih selektif dibanding dengan metode titrasi (Miranda et al., 2016). Penelitian lainnya juga berhasil memisahkan kandungan glukosinolat, yaitu sinigrin, glukobrasisin, glukoiiberin, dan glukorafanin dalam *sauerkraut* menggunakan teknik HPLC. Pemisahan tersebut didasarkan pada perbedaan waktu

retensi masing-masing senyawa dalam fasa gerak yang terdiri dari 0,05% TFA dalam akuades sebagai eluen A dan 100% asetonitril sebagai eluen B, pada panjang gelombang 217 nm (Palani et al., 2016). Selain HPLC, instrumentasi LC-MS juga digunakan untuk identifikasi metabolit sekunder dari hasil fermentasi kubis.

LC-MS merupakan dua alat yang digabungkan menjadi satu, yang berfungsi untuk memisahkan beberapa senyawa atau campuran senyawa berdasarkan kepolarannya. Setelah campuran senyawa tersebut terpisah, maka senyawa yang terpisah akan diidentifikasi berat molekulnya (Eichhorn and Knepper, 2001). Pemisahan senyawa-senyawa dalam kolom akan terpisah kemudian akan keluar atas dasar kepolaran yang berbeda, sehingga akan mempengaruhi kekuatan interaksi antara senyawa terhadap fasa diam. Senyawa-senyawa yang kurang kuat interaksinya dengan fasa diam akan keluar terlebih dahulu, dan sebaliknya senyawa yang berinteraksi kuat dengan fasa diam akan keluar lebih lama (Skoog et al., 2013; Silverstein et al., 2005; Ardrey, 2003). Sampel yang telah terpisah dengan *liquid chromatography* diidentifikasi berat molekulnya menggunakan *mass spectroscopy*. Masing-masing senyawa kimia memiliki pola pemutusan ikatan fragmentasi yang khas. Hasil spektrum *mass spectroscopy* berupa perbandingan antara intensitas (%) terhadap masa (m/z). Intensitas (%) yang paling tinggi sebagai base peak dan mass (m/z) yang paling besar sebagai $[M+H]^+$ (Silverstein et al., 2005). Menurut Ardrey (2003) bahwa berdasarkan tingkat polaritasnya teknik ionisasi terbagi menjadi tiga yaitu *Atmospheric Pressure Photoionization* (APPI), *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI) dan *Electrospray Ionization* (ESI). ESI merupakan metode ionisasi menggunakan kromatografi fasa terbalik yang sangat berguna untuk menganalisis molekul dari ukuran kecil sampai ukuran besar yang bersifat polar maupun sangat polar. (Ardrey, 2003). LC-ESI-MS (menggunakan sumber ionisasi *electrospray ionization*, ESI) dianggap sebagai metode pilihan terbaik untuk pembuatan profil metabolit dalam sampel biologis yang kompleks, karena kemampuan “*soft ionization*”-nya, yang mampu menghasilkan sejumlah besar ion melalui pertukaran muatan dalam larutan dan membentuk ion molekul utuh yang membantu identifikasi awal. Sistem LC-ESI-

MS dapat memisahkan senyawa semipolar seperti asam fenolik, flavonoid, steroid terglukosilasi, alkaloid, dan spesies terglukosilasi lainnya (B. Zhou et al., 2012).

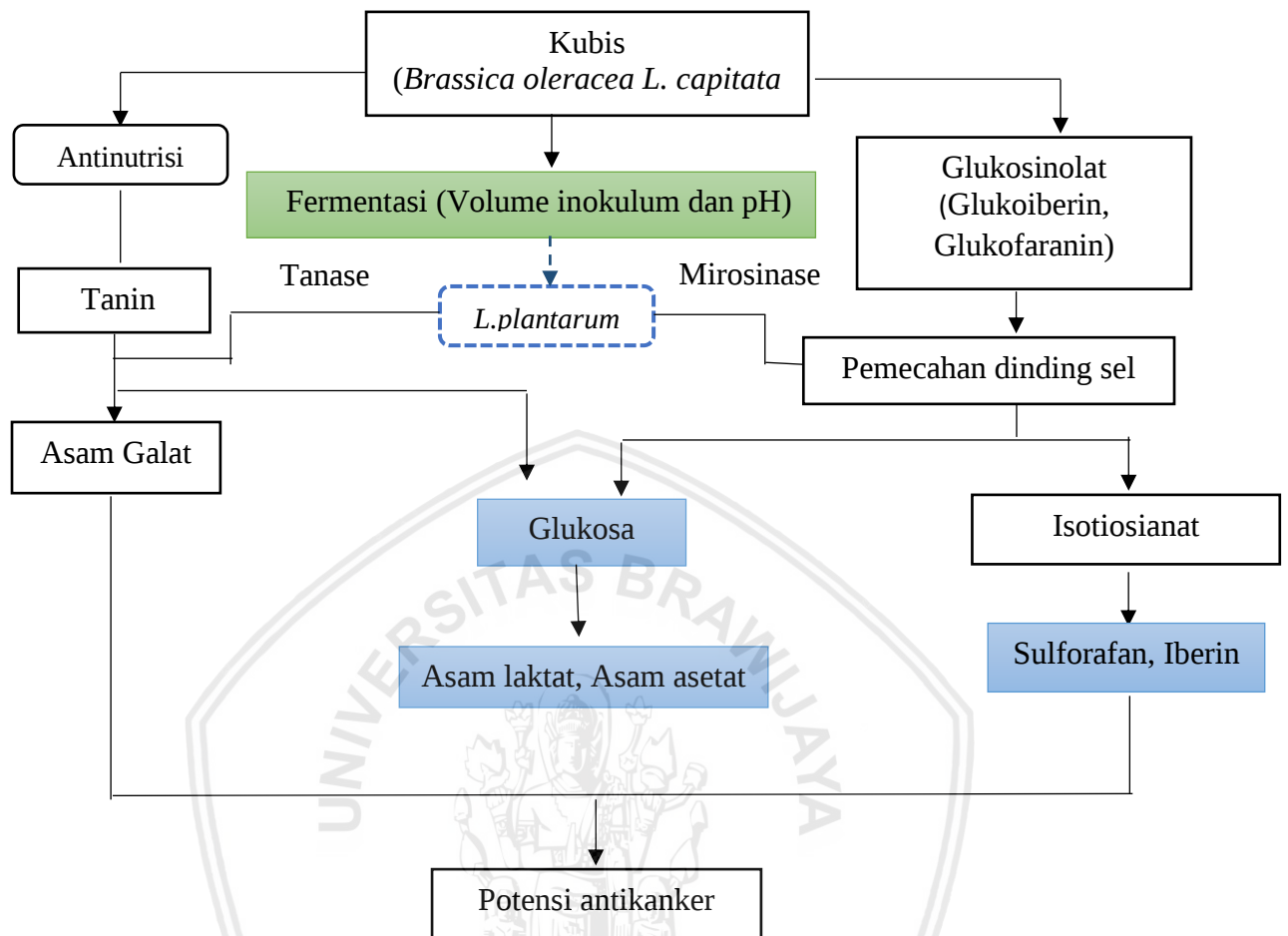
LC-MS telah digunakan untuk analisis metabolit selama fermentasi biji kakao (Mayorga-Gross et al., 2016), identifikasi komponen non-volatil dalam anggur (Di Stefano et al., 2012), dan identifikasi metabolit dalam kubis (Park, Arasu, et al., 2014). Sistem LC-MS yang dilengkapi dengan sumber ion ESI dan penganalisis massa Q-TOF dapat mendeteksi adanya senyawa sukrosa, flavonoid seperti epikatekin, prosianidin, antosianin, dan oligopeptida yang terdiri dari 3-12 asam amino biji kakao yang telah difermentasi selama 6 hari (Mayorga-Gross et al., 2016). Teknik LCMS juga mampu mengidentifikasi komponen nonvolatil dalam minuman anggur, seperti polifenol (antosianin, flavonol, tanin) yang berfungsi untuk karakterisasi warna; senyawa resveratrol yang berfungsi senyawa antioksidan, antikanker, dan anti penyakit kardiovaskular, protein (20-30 kDa) yang berperan penting dalam kualitas, rasa, kejernihan, dan stabilitas minuman anggur; serta senyawa *ochratoxin A*, yang merupakan mikotoksin yang cukup berbahaya pada minuman anggur (Di Stefano et al., 2012). Selain itu, LC-MS digunakan untuk mengidentifikasi senyawa antosianidin seperti sianidin dan peonidin, flavonol seperti quercetin dan kaempferol, asam hidroksisinamat, asam kafeat, asam p-kumarat, asam ferulat, dan asam sinapat dalam kubis (Park, Arasu, et al., 2014).

BAB III

KERANGKA PENELITIAN

Kubis (*Brassica olearacea L.var.capitata*) merupakan tanaman yang mengandung zat antinutrisi. Salah satu senyawa antinutrisinya adalah tanin. Tanin merupakan senyawa fenolik dalam kubis yang dapat berikatan dengan polisakarida dan protein pada dinding sel tanaman. Tanin dapat membentuk kompleks dengan protein sehingga dapat mengganggu pemanfaatan protein dalam tubuh. Glukosinolat merupakan senyawa alami pada tanaman yang bersifat tidak aktif. Senyawa ini akan aktif jika terjadi hidrolisis oleh enzim mirosinase yang menghasilkan glukosa dan isotiosianat. Salah satu, senyawa dari kelompok isotiosianat adalah iberin dan sulforafan. Pada penelitian ini metode fermentasi digunakan untuk mengurangi kadar antinutrisi yaitu tanin dalam kubis serta menghasilkan senyawa hasil degradasi glukosinolat yaitu isotiosianat. Fermentasi kubis dilakukan selama 4 hari menggunakan *Lactobacillus plantarum*. *L. plantarum* berfungsi untuk menghasilkan enzim tanase dan dapat memecah dinding sel. Tanase merupakan enzim ekstraseluler yang pembentukannya dirangsang oleh substrat fermentasi. Substrat yang digunakan adalah tanin yang dihasilkan dari sayuran kubis. Hidrolisis tanin oleh tanase menghasilkan asam galat dan glukosa. Untuk menurunkan konsentrasi tanin maka dilakukan optimasi kondisi fermentasi meliputi variasi konsentrasi volume inokulum dan pH. Pemantauan kondisi optimum fermentasi didasarkan pada kadar tanin. Kadar tanin dianalisis menggunakan penambahan reagen Folin-Dennis dan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 760 nm. Penentuan waktu inkubasi fermentasi dilakukan pada jam ke-48 dan ke-72. Penentuan waktu fermentasi dilakukan dengan memantau kadar glukosa, tanin, asam total (asam laktat dan asam asetat) dan identifikasi senyawa isotiosianat. Analisis kadar glukosa didasarkan pada kadar gula menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dan asam total menggunakan metode titrasi. Identifikasi asam organik dilakukan dengan menggunakan metode HPLC dan senyawa isotiosianat dengan LC-MS (*Liquid Chromatography Mass Spectrofotometri*).

3.1 Kerangka Konsep

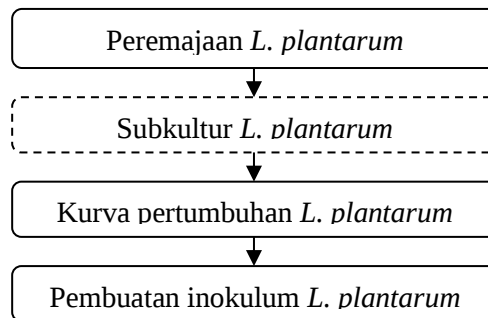


 : Variabel bebas

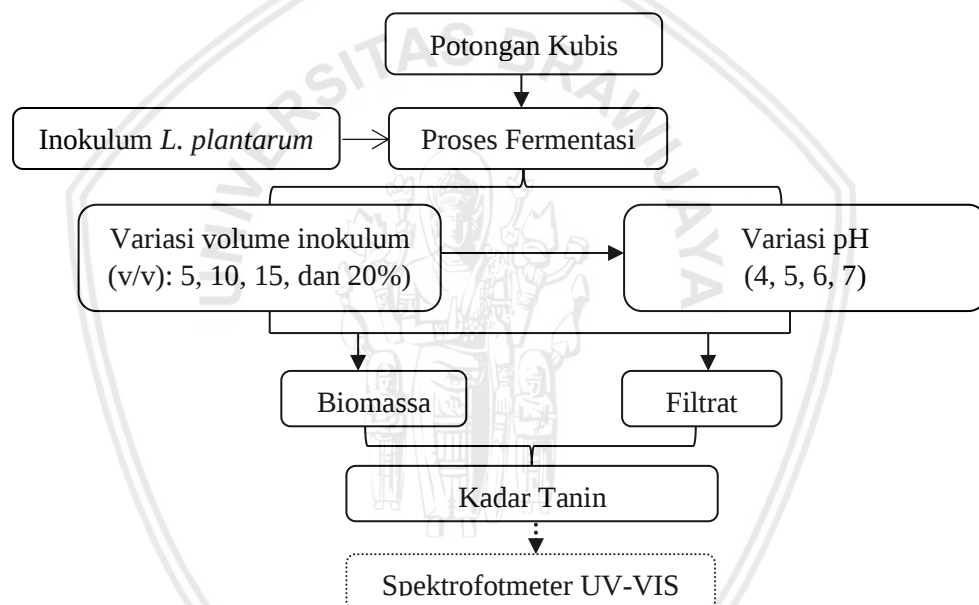
 : Variabel terikat

3.2 Kerangka Operasional

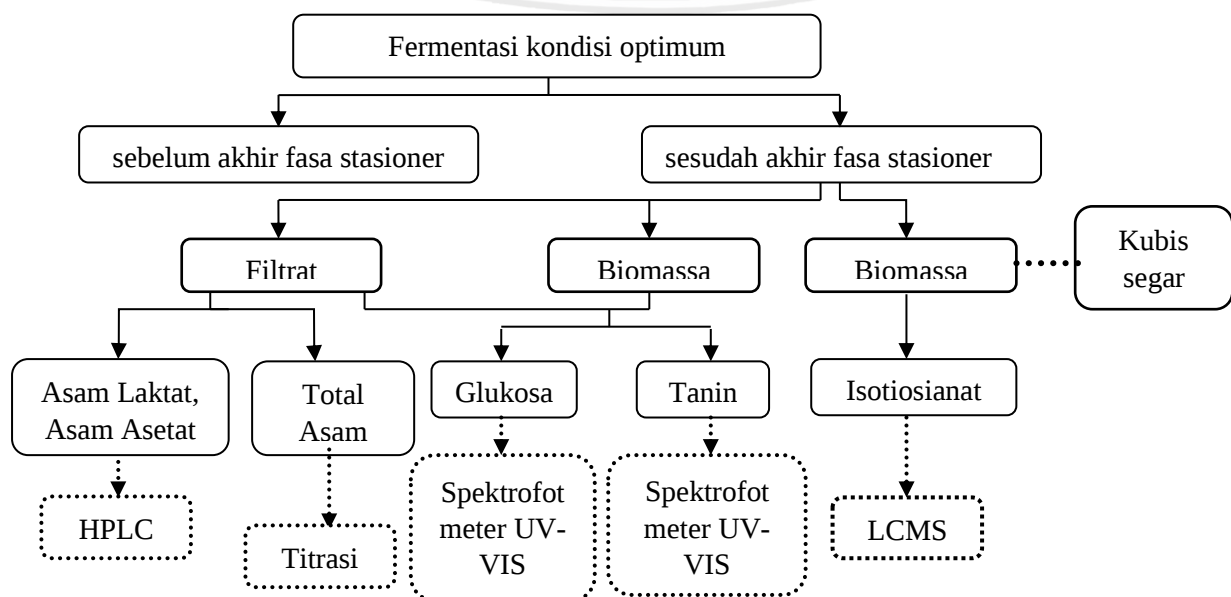
Tahap I Persiapan mikroorganisme dan pembuatan kurva pertumbuhan *Lactobacillus plantarum*



Tahap II. Penentuan kondisi optimum fermentasi



Tahap III: Analisis hasil fermentasi



3.3 Hipotesis

1. Variasi konsentrasi volume inokulum *Lactobacillus plantarum* dan pH berpengaruh terhadap kadar tanin dalam kubis yang telah difermentasi.
2. Filtrat hasil fermentasi memiliki kandungan glukosa yang dapat dimetabolisme oleh bakteri sehingga membentuk asam laktat dan asam asetat.
3. Terjadi hidrolisis senyawa glukosinolat dalam fermentasi kubis menjadi produk isotiosanat.



BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang. Analisa HPLC dilaksanakan di Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan analisa LC-MS dilaksanakan di Politeknik Negeri Malang pada bulan Januari 2019 - Maret 2019.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan selama penelitian meliputi seperangkat alat gelas, pisau, cawan petri, neraca analitik (*Mettler Toledo AL 204*), inkubator (*Heraeus Type B 5042*), *waterbath*, jarum ose, pH meter (*Inolab WTW*), kuvet, oven (*Memmert*), autoklaf (*LS-C35L Electric-Heated Vertical Steam Sterilizer*), laminar air flow, refrigerator, *magnetic stirrer* (*Ikamag*), sentrifuse dingin (*Hermle Labortechnik GmbH Siemensstr 25 Wehingen, Type Z326 K*), buret dan statif, aluminium foil, kapas steril, *plastic wrap*, kertas saring, dan busen. Alat instrumen yang digunakan ialah LC-MS (UHPLC ACCELLA tipe 1250 (Thermo Scientific) dengan spektrofotometer massa TSQ QUANTUM ACCESS MAX, UHPLC ACCELLA tipe 1250), HPLC (Thermo Scientific, Jepang), dan spektronik 20 (Genesis 20)..

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan baku yang digunakan berupa kubis segardari desa Poncokusumo, Kabupaten Malang yang telah di determinasi oleh Laboratorium Taksonomi, struktur dan perkembangan tumbuhan, Jurusan Biologi Universitas Brawijaya. Isolat *Lactobacillus plantarum* dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Teknologi Pangan, Universitas Brawijaya, Malang. Media yang digunakan untuk peremajaan dan pertumbuhan mikroorganisme yaitu MRSA (*Mann Rogosa Sharpe Agar*), dan

MRSB (*de-Mann Rogosa Sharpe Broth*). Selain itu, bahan lain yang digunakan ialah asam asetat (CH_3COOH), asam laktat ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$), asam fosfat (H_3PO_4), glukosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), asam sulfat (H_2SO_4) 95-98%, fenol ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$), asam tanat ($\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$), reagen Folin-Denis, natrium karbonat (Na_2CO_3), natrium hidroksida (NaOH), asam oksalat dihidrat ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), indikator penolptalein, asetonitril (CH_3CN), monokalium fosfat (KH_2PO_4), dan akuades.

4.2.3 Tahapan Penelitian

Tahapan-tahapan penelitian yang dilakukan yaitu:

1. Preparasi media pertumbuhan agar miring untuk *Lactobacillus plantarum* dan regenerasi biakan murni *L. plantarum*.
2. Pembuatan media cair dan preparasi substrat kubis untuk proses fermentasi.
3. Pembuatan kurva pertumbuhan.
4. Proses fermentasi yaitu preparasi inoculum *Lactobacillus plantarum*.
5. Analisa kadar tanin dalam kubis yang telah difermentasi berdasarkan pengaruh volume inokulum.
6. Analisa kadar tanin dalam kubis yang telah difermentasi berdasarkan pengaruh pH.
7. Analisa kandungan antinutrisi yang meliputi penentuan kadar tanin dan glukosa dalam biomassa dan filtrat, penentuan pH, titrasi dan identifikasi asam organik dalam filtrat hasil fermentasi kubis.
8. Identifikasi produk-produk hidrolisis glukosinolat yang meliputi sulforafan dan iberin dalam biomassa kubis yang telah difermentasi.
9. Analisa data.

4.3 Prosedur Penelitian

4.3.1 Preparasi media agar miring *Lactobacillus plantarum*

Media padat yang digunakan untuk meremajakan biakan murni *Lactobacillus plantarum* adalah MRSA (*Man, Rogosa and Sharpe Agar*). Pada preparasi media ini dibuat dengan menimbang 6,82 gram MRSA kemudian dilarutkan dengan 100 mL akuades dan dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut. Selanjutnya media tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 mL kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 15 psi. Larutan tersebut didinginkan dalam tabung reaksi pada keadaan miring hingga memadat. Media MRSA ini digunakan untuk regenerasi bakteri *Lactobacillus plantarum*.

4.3.2 Preparasi media cair *Lactobacillus plantarum*

Media pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* yang digunakan adalah MRSB (*Man, Rogosa and Sharpe Broth*) dibuat dengan menimbang 5,515 gram MRSB kemudian dilarutkan dengan 100 mL akuades dan dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut. Selanjutnya media tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 mL kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 15 psi. Media MRSB ini digunakan untuk pembuatan inokulum.

4.3.3 Peremajaan biakan murni *Lactobacillus plantarum*

Peremajaan biakan murni *Lactobacillus plantarum* dilakukan secara aseptis pada Laminar Air Flow. Pertama, jarum ose, mulut tabung reaksi, baik yang berisi biakan murni *Lactobacillus plantarum*, maupun media padat baru, dilewatkan pada nyala api bunsen untuk sterilisasi. Isolat *Lactobacillus plantarum* diambil 2 ose dan digoreskan secara zig-zag ke dalam tabung reaksi berisi media padat MRSA. Setelah itu, kedua tabung ditutup kembali dengan kapas steril dan *plastic wrap*. Biakan bakteri dalam media padat baru diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam (2 hari). *Lactobacillus plantarum* yang telah diregenerasi digunakan untuk pembuatan stok inokulum.

4.3.4 Preparasi kubis

Kubis segar disiapkan, di potong dengan menggunakan pisau. Ditimbang 100 gram. Dicuci bersih. Dikeringkan dengan dianginkan selama 5 menit.

4.3.5 Pembuatan kurva pertumbuhan *Lactobacillus plantarum*

4.3.5.1 Pembuatan media cair *Lactobacillus plantarum*

Pembuatan media cair *Lactobacillus plantarum* menggunakan media MRSB. 5,2 gram MRSB dilarutkan dalam 100 mL akuades dan dipanaskan hingga seluruh serbuk larut. Setelah itu, larutan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 15 psi, selama 15 menit.

4.3.5.2 Pembuatan kurva pertumbuhan *Lactobacillus plantarum*

Pembuatan kurva pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* dilakukan dengan menumbuhkan koloni bakteri dalam media cair. 2 mata ose subkultur *L. plantarum* hasil peremajaan dari media padat, dimasukkan secara aseptis ke dalam erlenmeyer yang berisi 100 mL media cair baru steril, dan dikocok. Setelah itu, media cair berisi subkultur diinkubasi pada suhu 30°C. Sebanyak 3 mL sampel diambil setiap 3 jam untuk pengukuran densitas optik. Pengukuran densitas optik dilakukan pada panjang gelombang 600 nm menggunakan spektrometri UV-Vis. Selanjutnya, dibuat kurva yang menggambarkan hubungan waktu inkubasi dalam satuan jam (sumbu x) dengan densitas optik (sumbu y).

4.3.5.3 Pembuatan inokulum *Lactobacillus plantarum*

Pembuatan inokulum *Lactobacillus plantarum* dilakukan secara aseptis dalam Laminar air flow. Media cair yang digunakan untuk *L. plantarum* ialah MRSB. Pada pembuatan inokulum, 2 mata ose subkultur *L. plantarum* hasil peremajaan dari media padat MRSA dimasukkan secara aseptis ke dalam tabung reaksi yang berisi 100 mL media cair steril yang baru. Mulut erlenmeyer dilewatkan pada nyala api bunsen, ditutup dengan kapas dan *plastic wrap*. Selanjutnya, media cair yang berisi subkultur ragi tersebut diinkubasi pada suhu 30°C hingga pertengahan fasa logaritma (ditentukan dari pembuatan kurva pertumbuhan *L. plantarum*).

4.3.6 Penentuan kondisi optimum fermentasi

4.3.6.1 Optimasi volume inokulum

Penentuan optimasi volume inokulum menggunakan variasi 5%, 10%, 15% dan 20% (volume dalam 100 g kubis). 100 g kubis yang telah dicuci bersih dimasukkan ke dalam botol kaca hingga padat. Setelah itu, ditambahkan inokulum (setengah fase logaritma) dengan berbagai variasi dan akuades hingga volume 100 mL secara aseptis. Kemudian, botol yang berisi masing-masing inokulum ditutup rapat, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 4 hari. Pemantauan kadar tanin diambil pada biomassa dan filtrat setelah perlakuan inkubasi 4 hari.

4.3.6.2 Optimasi pH

Penentuan optimasi pH menggunakan variasi 4, 5, 6 dan 7. Variasi pH dengan menambahkan asam asetat. 100 g Kubis dimasukkan ke dalam botol kaca hingga padat. Setelah itu, ditambahkan volume inokulum optimum 5% secara aseptis dengan variasi pH. Kemudian, botol yang berisi masing-masing inokulum ditutup rapat, dan diinkubasi pada suhu optimum selama 4 hari. Pemantauan kadar tanin dilakukan pada biomassa kubis dan filtrat setelah perlakuan inkubasi 4 hari.

4.3.6.3 Analisa produk hasil fermentasi kubis

Penentuan waktu fermentasi pada kubis dilakukan dengan menggunakan inokulum dan tanpa menggunakan inokulum. 100 g kubis dimasukkan ke dalam botol kaca hingga padat. Setelah itu, ditambahkan larutan inokulum 5% dengan pH 6 secara aseptis. Kemudian, botol yang berisi masing-masing inokulum ditutup rapat, dan diinkubasi pada suhu ruang. Sampling diambil pada jam ke-48 (awal fase stasioner) dan 72 (akhir fase stasioner). Biomassa dilakukan analisis kadar tanin, gula dan senyawa isotiosianat. Kandungan senyawa isotiosianat yang meliputi iberin dan sulforapan diidentifikasi menggunakan LC-MS. Filtrat disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit dan disaring menggunakan kertas saring. Setelah itu, filtrat dianalisis kandungan glukosa, etanol, tanin, asam laktat dan asam asetat.

4.3.7 Penentuan kadar tanin

4.3.7.1 Pembuatan kurva standar tanin

Larutan stok asam tanat (0,1 mg/mL) dibuat dengan melarutkan 5 mg asam tanat ke dalam 50 mL akuades. larutan standar asam tanat dengan konsentrasi 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, dan 0,1 mg/mL. 400 μ L larutan asam tanat dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 0,5 mL reagen Folin Denis dan 1 mL larutan Na_2CO_3 . Larutan tersebut divorteks dan diencerkan pada labu ukur 10 mL dengan akuades. Setelah itu, larutan didiamkan selama 30 menit, lalu dihitung absorbansinya menggunakan spektrometri UV pada panjang gelombang 760 nm. Hasil pengukuran diplotkan dalam suatu kurva yang menghubungkan konsentrasi asam tanat (sumbu x) dengan absorbansi (sumbu y) dan ditentukan persamaan regresi liniernya.

4.3.7.2 Penentuan kadar tannin pada sampel

2,5 g biomassa hasil fermentasi dihaluskan dengan mortar dan dimasukkan kedalam erlenmeyer 100 mL. 20 mL akuades ditambahkan dan dipanaskan selama 15 menit dan diaduk dengan stirer. Larutan disaring dan dicuci dengan 2 mL akuades. Filtrat diencerkan dengan labu ukur 25 mL dengan penambahan akuades. Filtrat dipipet 0,4 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 0,5 mL reagen Follin-Dennis dan 1 mL larutan bikarbonat jenuh. Campuran tersebut divorteks dan diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 760 nm menggunakan spektrometri UV. Nilai absorbansi dikonversi menjadi konsentrasi dengan menggunakan persamaan regresi linier pada kurva baku asam tanat. Hasil absorbansi dikonversi menjadi besaran konsentrasi (mg/mL) menggunakan persamaan pada kurva baku. Penentuan kadar tanin dalam filtrat hasil fermentasi memiliki tahapan yang sama dengan penentuan tanin dalam biomassa. Namun, filtrat hasil fermentasi disentrifugasi terlebih dahulu pada kecepatan 9000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan sel (pellet) dan cairan (supernatan) sebelum analisis.

4.3.8 Penentuan Kadar Glukosa

4.3.8.1 Pembuatan kurva standar glukosa

Pembuatan kurva standar diawali dengan pembuatan larutan glukosa dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm. Sebanyak 1 mL larutan glukosa dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 1 mL larutan fenol 5%. Larutan tersebut divorteks, ditambahkan larutan H_2SO_4 95–98% sebanyak 5 mL dengan cepat, dan didiamkan selama 10 menit. Selanjutnya larutan tersebut dimasukkan ke dalam penangas air dengan suhu 25–30 °C selama 15 menit. Kemudian, dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrometri UV pada panjang gelombang 485 nm. Setelah itu, dibuat kurva standar yang menghubungkan konsentrasi glukosa (sebagai sumbu x) dengan absorbansi (sebagai sumbu y) dan ditentukan persamaan regresi liniernya.

4.3.8.2 Penentuan kadar glukosa dalam sampel

Biomassa (setelah fermentasi) diekstraksi menggunakan pelarut etanol. 0,1 gram kubis hasil fermentasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 5 mL etanol 80% dan ditutup rapat dengan penutup karet dan *plastic wrap*. Larutan dipanaskan dalam penangas air pada suhu 80 °C selama 1 jam. Setelah didinginkan dalam suhu ruang, diambil 1 mL ekstrak dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah itu, ditambahkan 1 mL larutan fenol 5%, divorteks, dan ditambahkan larutan H_2SO_4 95–98% sebanyak 5 mL dengan cepat ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, larutan tersebut dimasukkan ke dalam penangas air dengan suhu 25°C sampai 30°C selama 15 menit. Kemudian, dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrometri UV pada panjang gelombang 485 nm. Hasil pengukuran absorbansi dikonversi menjadi besaran konsentrasi glukosa dalam sampel menggunakan persamaan kurva standar. Filtrat sisa fermentasi diambil sebanyak 10 mL dan disentrifugasi selama 10 menit. Setelah itu, supernatan diambil 1 mL dan diencerkan ke dalam labu ukur 10 mL dengan penambahan akuades. Larutan tersebut diambil sebanyak 1 mL untuk penentuan kadar glukosa filtrat menggunakan metode sulfat fenol seperti yang dilakukan pada biomassa.

4.3.9 Penentuan Kadar Asam Total

Filtrat hasil fermentasi diambil 1 mL, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas. Larutan diambil 5 mL dan ditambahkan 1 tetes indikator pp dan dititrasi dengan NaOH 1 M hingga terjadi perubahan warna dari tidak berwarna menjadi merah muda.

4.3.10 Identifikasi asam organik menggunakan HPLC

Identifikasi asam organik dalam filtrat hasil fermentasi ditentukan menggunakan HPLC. 10 mL filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2,5 g NaCl. Campuran divorteks selama 5 menit. Setelah itu, larutan ditambahkan dengan 1 mL dietil eter dan divorteks selama 5 menit. Kemudian, larutan disentrifugasi pada kecepatan 9000 rpm selama 15 menit. Fasa organik (atas) dipisahkan dan ditambahkan dengan Na₂SO₄ anhidrat untuk menghilangkan kelebihan air. Setelah itu, campuran disaring menggunakan *filter paper* 0,22 µm dan siap dianalisis menggunakan HPLC. Analisis sampel dilakukan menggunakan UHPLC (The Dionex Ultimate 3000 System, Thermo Scientific) yang terdiri dari solvent rack (SRD-3600), dual pump (DGP-3600A), autosampler (Well Plate Sampler, WPS-3000SL), column compartment (TCC 3200 2x2P-10P), UV detector (Variable Wavelength Detector, VWD-3400), dan kolom C18. Fasa gerak untuk penentuan senyawa menggunakan dua pelarut dengan mode isokratik: fase gerak A terdiri dari 80% KH₂PO₄ 10 mM pH 2,4 yang disesuaikan dengan penambahan asam fosfat, fase B terdiri dari 20% asetonitril. Kecepatan fasa gerak 1,5 mL/menit, waktu *running* 5 menit, suhu 30 °C, volume injeksi 15 µL, dan panjang gelombang 210 nm.

4.3.11 Identifikasi turunan glukosinolat menggunakan LCMS

2 gram sampel kubis (baik kubis segar maupun kubis terfermentasi) dihaluskan menggunakan mortar dan alu. Setelah itu, sampel diekstrak menggunakan pelarut diklorometana (3 x 10 mL) dan ditambahkan 2,5 gram Na₂SO₄. Setelah itu, larutan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 30 °C selama 10 menit.

Larutan ekstrak dilarutkan dalam asetonitril secukupnya dan disaring menggunakan *filter paper* 0,22 μm . Sampel diletakkan dalam botol vial dan siap dianalisis. Pembuatan kurva standar sulforafan, dibuat serangkaian larutan standar sulforafan dengan kadar 63, 125, 250, 500, dan 1000 ng/mL. Setelah disaring menggunakan *filter paper* 0,22 μm , larutan diinjeksikan ke dalam instrumen. Setelah itu, dilakukan pembuatan kurva kalibrasi yang menghubungkan kadar sulforafan (sumbu x) dengan luas area kromatogram (sumbu y) dan ditentukan persamaan regresi liniernya. Fasa gerak untuk penentuan senyawa menggunakan dua pelarut: Fase gerak A terdiri dari 0,1% asam format dalam aquabidest, fase B terdiri dari 0,1% asam format dalam asetonitril. Sebuah gradient linier dengan kecepatan 300 $\mu\text{L}/\text{menit}$, dengan pengaturan fasa gerak sebagai berikut: kolom dikendalikan pada 30°C, dan kompartemen auto sampler ditetapkan pada 16 °C.

4.3.12 Analisis data statistika

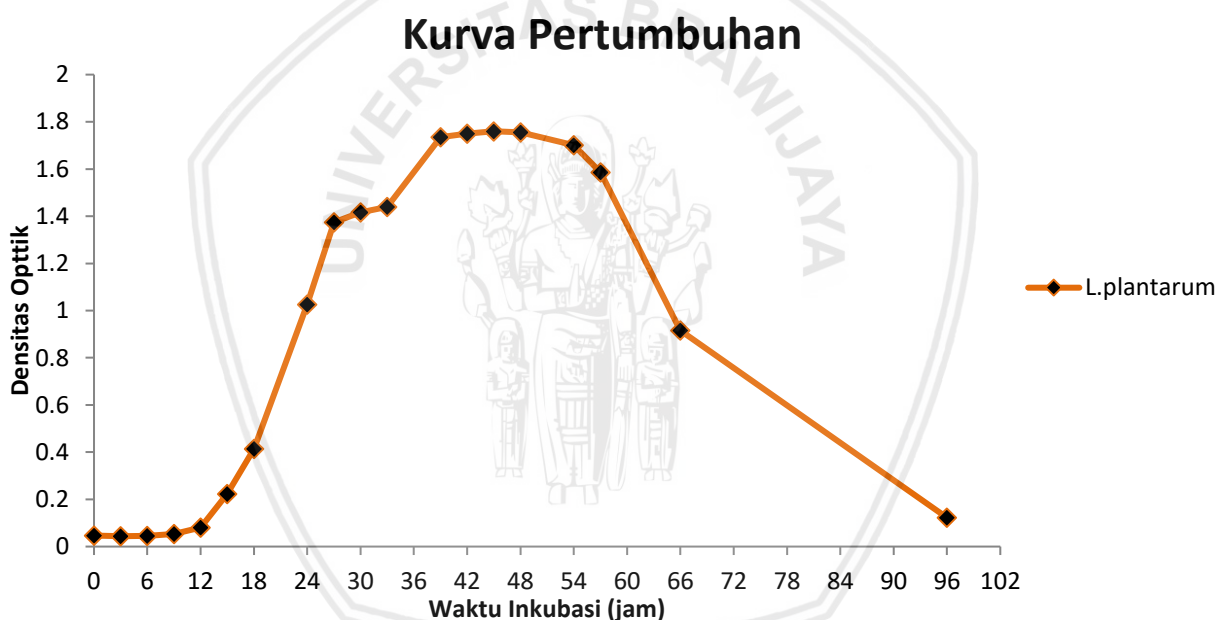
Data yang diperoleh dianalisis dengan *One Way* Analisis Varian (ANOVA) menggunakan SPSS 18 untuk menguji adanya pengaruh varian volume inokulum *L. plantarum* dan pH terhadap penurunan tanin dalam kubis terfermentasi. Apabila terdapat adanya pengaruh, maka dilanjutkan dengan Uji Tukey dengan taraf nyata 5% untuk penentuan beda nyata antar nilai perlakuan yang diuji.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus plantarum*

Kurva pertumbuhan mikroorganisme merupakan dasar untuk mengetahui fasa hidup suatu mikroorganisme. Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri digunakan sebagai acuan untuk pembuatan inokulum *Lactobacillus plantarum* serta untuk menentukan lama waktu fermentasi untuk menurunkan kadar antinutrisi dalam kubis. Pertumbuhan *L. plantarum* ditandai dengan adanya peningkatan pada nilai densitas (kekeruhan) jumlah sel dalam media MRSB yang sejalan dengan meningkatnya lama waktu inkubasi. Pengamatan jumlah sel tersebut dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer.



Gambar 5.1 Kurva pertumbuhan *Lactobacillus plantarum*

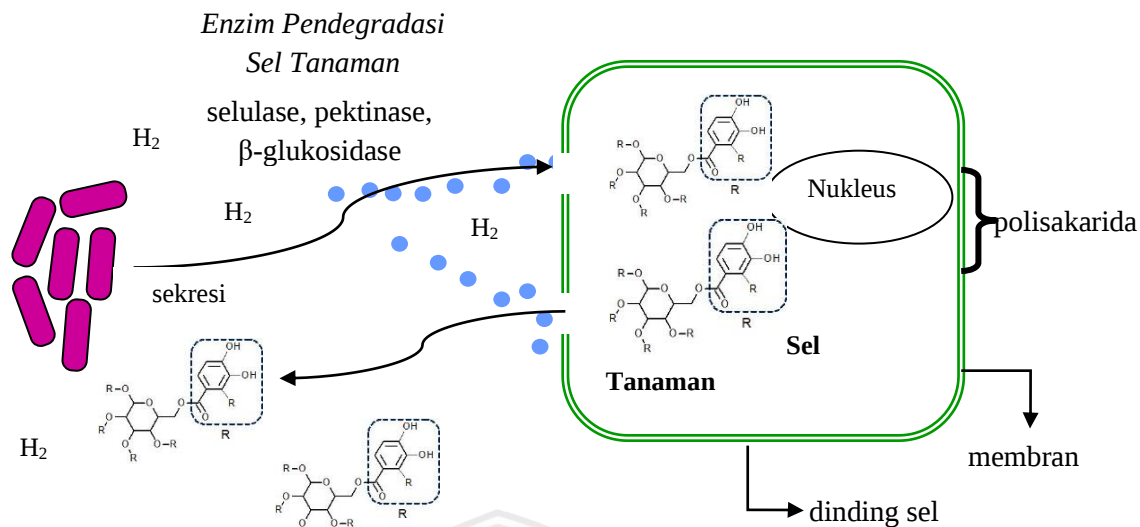
Tabel 5.1 Waktu fasa pertumbuhan *Lactobacillus plantarum*
Lama fasa pertumbuhan (jam)

Fasa lag	0 – 12
Fasa log	12 – 39
Fasa stationer	39 – 54
Fasa kematian	54– 96

Tahapan fase yang terjadi pada pertumbuhan *L. plantarum* diawali dengan fase lag atau fase lambat dan adaptasi yang terjadi pada jam awal inkubasi. Fase ini terjadi karena densitas belum meningkat secara nyata dan populasi *L. plantarum* belum mengalami pertumbuhan yang berarti dikarenakan baru saja menyesuaikan dalam medium yang baru. Fasa lag pada kurva ini pada jam ke-0 sampai jam ke-12. Fasa log atau fase eksponensial ditandai dengan bertambahnya populasi secara signifikan. Menurut Madigan (2018), jumlah sel meningkat dan aktif melakukan replikasi DNA. Pada fasa ini populasi sudah mulai beradaptasi dengan medium dan dapat melakukan reproduksi melalui proses pembelahan sel (*binary fission*). Pada kurva ini fasa log dimulai pada jam ke-12 sampai jam ke-39. Fasa berikutnya yaitu fasa stasioner. Fasa ini ditandai dengan melambatnya metabolisme sel dan jumlah sel tetap. Penurunan pertumbuhan pada fasa ini disebabkan oleh kepadatan sel yang tinggi dan penurunan nutrisi. Pada kurva ini, fasa stasioner dimulai pada jam ke-39 sampai jam ke-54. Fasa terakhir yaitu fasa kematian yang ditandai adanya penurunan sel yang tidak mendapatkan nutrisi untuk melakukan pertumbuhan. Pada fasa ini, sel-sel mencapai titik dimana sel tidak mendapatkan nutrisi (Madigan, 2018). Pada kurva ini, fasa kematian dimulai dari jam ke-54 sampai jam ke-96. Kurva pertumbuhan *L. plantarum* ini digunakan sebagai dasar untuk pembuatan inokulum dan waktu lama fermentasi.

5.2 Optimasi Pengaruh Volume Inokulum Terhadap Kadar Tanin dalam Kubis Terfermentasi

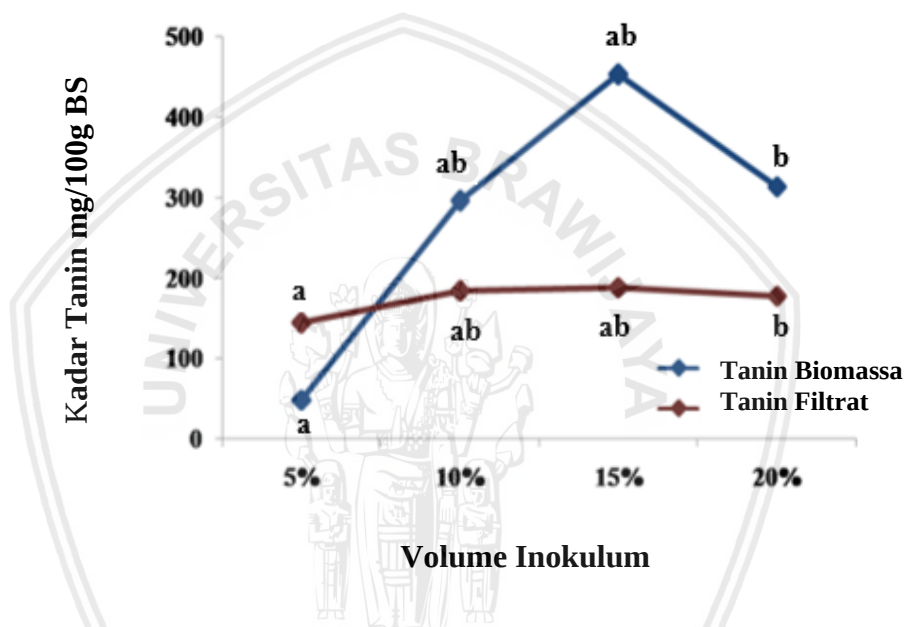
Pada penelitian ini, optimasi dilakukan untuk mengetahui adanya pengaruh volume inokulum terhadap kadar tanin hasil fermentasi. Pengukuran kadar tanin dilakukan pada biomassa dan filtrat untuk mengetahui kemungkinan kadar tanin yang lepas dari biomassa ke filtrat dalam media fermentasi.



Gambar 5.2 Gambaran pelepasan senyawa tanin dalam kubis ke media fermentasi hasil metabolisme *L. plantarum* dan air.

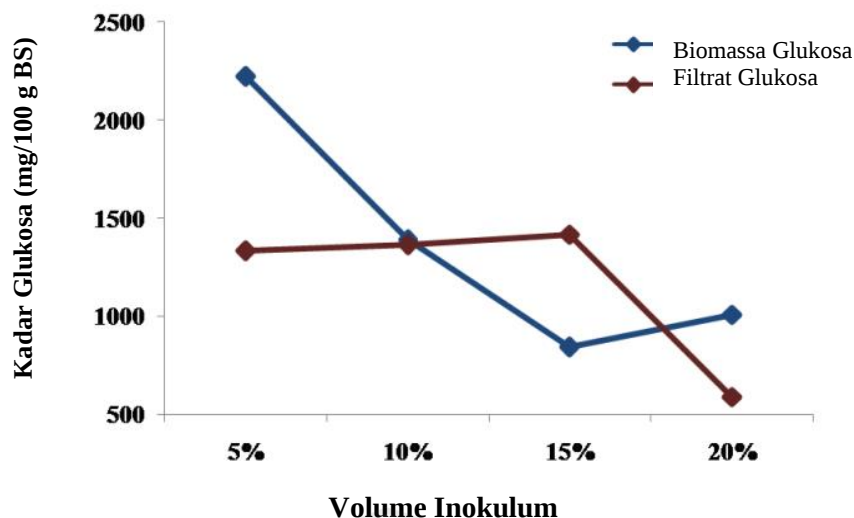
Pada **Gambar 5.3** menunjukkan bahwa perbedaan volume inokulum mempengaruhi aktivitas penurunan tanin baik pada biomassa dan filtrat. Senyawa tanin dapat dihidrolisis oleh enzim tanase yang berasal dari bakteri *L. plantarum*. Tanase merupakan enzim ekstraselluler yang dihasilkan oleh *L. plantarum* untuk menghidrolisis ikatan ester pada tannin terhidrolisa dengan menghasilkan asam galat dan glukosa. Pada penelitian ini, kadar tanin dalam bahan baku sebesar 290,876 mg/100 g berat segar. Penambahan 5% inokulum menyebabkan kadar tanin menurun. Hal ini disebabkan karena tingginya aktivitas enzim tanase dan semakin banyak asam galat yang dilepaskan dalam filtrat. Kemudian, terjadi peningkatan saat ditambahkan 10% dan 15% inokulum. Hal ini dikarenakan terjadinya biosintesis tanin oleh *L. plantarum* dengan menghasilkan pyrogallol didalam sitoplasma. Pyrogallol adalah suatu senyawa fenolik yang apabila diukur dengan penambahan Reagen Follin-Denis akan menghasilkan larutan berwarna biru keunguan. Selain itu, kemungkinan adanya asam organik yang dihasilkan dari metabolit *L. plantarum* dapat menghambat aktivitas katalitik tanase. Kemudian, terjadi penurunan kembali pada saat penambahan 20% inokulum. Penambahan volume inokulum optimum yaitu 5% dengan menghasilkan kadar tanin biomassa 33,6808 mg/100 g berat segar dan filtrat 122,307 mg/100 mL. Uji normalitas atau homogenitas menunjukkan bahwa nilai signifikansi pengaruh volume inokulum campuran terhadap kadar tanin biomassa dan filtrat $>0,05$, yang menunjukkan bahwa

sebaran data berdistribusi normal. Uji statistika menggunakan analisis ANOVA *One Way* menunjukkan bahwa *F* hitung lebih besar dari *F* tabel (2,80), yang mengindikasikan bahwa volume inokulum berpengaruh secara signifikan terhadap kadar tanin kubis. Hasil tersebut berlaku untuk pengukuran kadar tanin biomassa maupun filtrat. Uji Tukey dengan taraf kepercayaan 5% pada pengaruh volume inokulum terhadap kadar tanin biomassa menunjukkan bahwa penggunaan volume inokulum 5% tidak berbeda nyata dengan volume inokulum 10% dan 15%, sedangkan volume inokulum 5% juga tidak berbeda nyata dengan volume inokulum 20%. Oleh karena penggunaan volume inokulum 5% menghasilkan kadar tanin terendah, maka volume inokulum 5% dianggap sebagai hasil optimum untuk tahap optimasi selanjutnya.



Gambar 5.3 Pengaruh volume inokulum *L. plantarum* terhadap kadar tanin pada biomassa dan filtrat kubis yang difermentasi pada kondisi anaerobik selama 96 jam dengan suhu ruang. Keterangan : BS (berat segar)

Pada penelitian ini, dilakukan pula pengukuran kadar glukosa pada biomassa kubis maupun filtrat. Pengukuran kadar glukosa bertujuan untuk mengkonfirmasi adanya proses hidrolisis tanin oleh tanase yang menghasilkan asam galat dan glukosa.

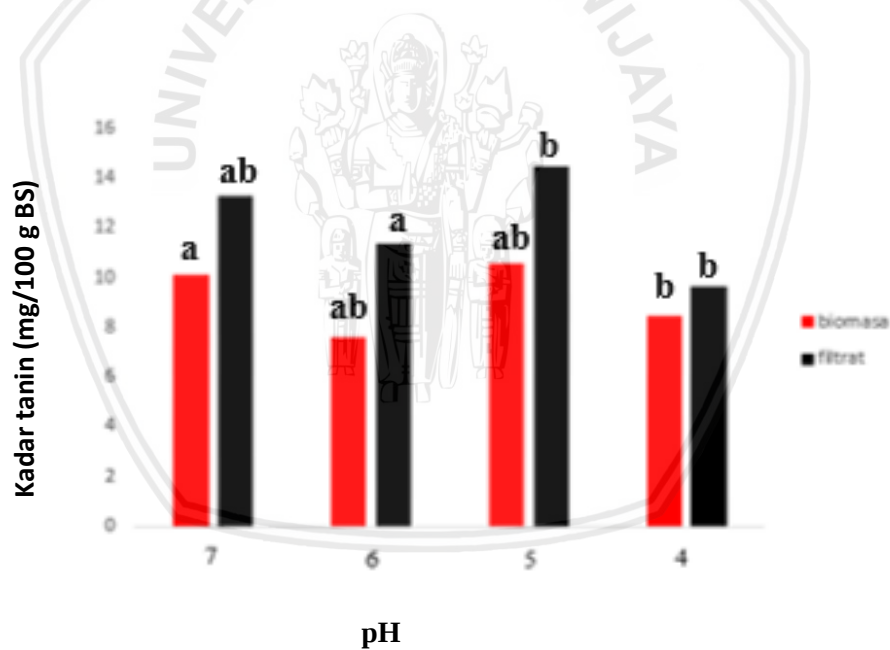


Gambar 5.4 Pengaruh volume inokulum *L. plantarum* terhadap kadar glukosa pada biomassa dan filtrat kubis yang difermentasi pada kondisi anaerobik selama 96 jam dengan suhu ruang. Keterangan: BS: berat segar

Berdasarkan hasil penelitian, tren kadar glukosa berbanding terbalik dengan tren kadar tanin, baik dalam biomassa dan filtrat. Hasil ini menunjukkan fungsi dari keberadaan enzim tanase dalam proses fermentasi yang mengarah pada hidrolisis tanin menjadi glukosa, sehingga menghasilkan interaksi yang berlawanan antara tanin dengan glukosa pada semua volume inokulum. Berdasarkan grafik diatas, penambahan volume inokulum di atas 5% dapat mengakibatkan penurunan aktivitas degradasi senyawa tanin. Penggunaan volume inokulum 20% menyebabkan kadar tanin meningkat kembali setelah kadar tanin mulai menurun pada volume inokulum 10% dan 15%. Hal tersebut menunjukkan bahwa peningkatan volume inokulum yang ditambahkan dalam media fermentasi mengakibatkan penurunan aktivitas *L. plantarum* untuk menghasilkan enzim tanase. Hal ini dikarenakan adanya peningkatan pertumbuhan bakteri sehingga berkompetisi untuk bertahan hidup. Keterbatasan ketersediaan nutrisi akibat peningkatan populasi menyebabkan kompetisi antar spesies untuk bertahan hidup. Beberapa strategi dilakukan oleh mikroorganisme untuk mendominasi satu sama lain yaitu dengan memproduksi antibiotik atau metabolit yang beracun bagi lawannya. Oleh karena itu, kemampuan bakteri dalam mendegradasi pembentukan tanin selama proses fermentasi, menyebabkan kadar tanin meningkat seiring dengan peningkatan volume inokulum yang digunakan.

5.3 Pengaruh pH Terhadap Kadar Tanin dalam Kubis Terfermentasi

pH merupakan salah satu faktor penting dalam proses fermentasi karena dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme (Norouzian, 2008). pH dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme dan mempengaruhi laju produksi. Penentuan pH optimum pada fermentasi dilakukan dengan menggunakan volume inokulum *L. plantarum* 5% (v/v). **Gambar 5.5** menunjukkan adanya pengaruh pH terhadap kadar tanin dalam kubis yang telah difermentasi. Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa nilai signifikansi, baik untuk pengaruh pH terhadap kadar tanin biomassa dan filtrat $>0,05$. Hal ini mengindikasikan bahwa sebaran data berdistribusi normal. Selain itu, hasil analisis statistik menggunakan ANOVA *One Way* menunjukkan bahwa pH berpengaruh nyata terhadap kadar tanin kubis. Hal ini dibuktikan dengan nilai F hitung yang lebih besar dengan F tabel (3,1). Walaupun uji Tukey 5% pada pengaruh pH terhadap kadar tanin biomassa menunjukkan bahwa pH 6 tidak berbeda nyata dengan pH 7 dan 5, kadar tanin terendah teramati pada perlakuan pH 6. Oleh karena itu, pH 6 dianggap sebagai pH optimum untuk degradasi senyawa tanin dalam kubis.



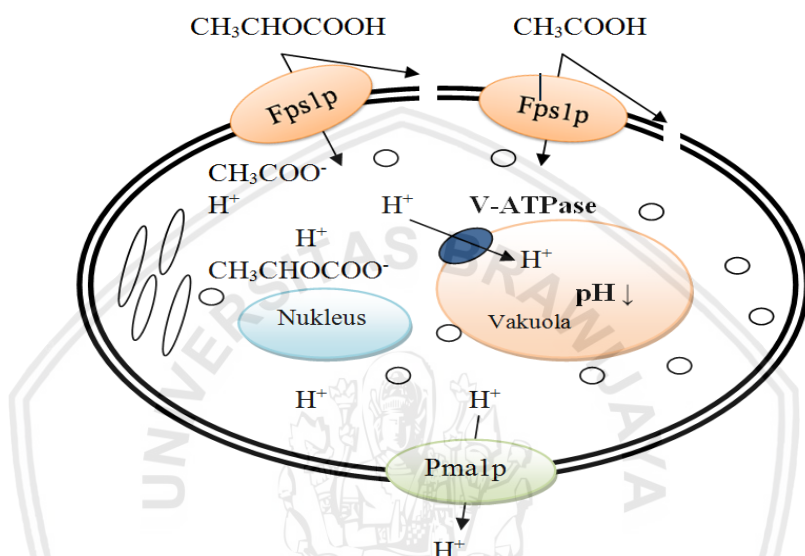
Gambar 5.5 Hubungan antara pH terhadap kadar tanin biomassa dan filtrat hasil fermentasi kubis dengan volume inokulum *L. plantarum* 5% (v/v)

Kadar tanin sampel lebih rendah dibandingkan dengan kadar tanin dalam kubis segar. Hal ini mengindikasikan bahwa terjadi degradasi tanin menjadi senyawa lain oleh aktivitas enzim tanase dari *L. plantarum*. Kadar tanin turun sekitar 11,49%. pH optimum untuk mendegradasi tanin dalam biomassa kubis menggunakan kultur *L. plantarum* adalah 6 dengan kadar tanin sebesar 72,028 mg/100 g berat segar kubis dan 78,796 mg/100 g pada filtrat. Hasil ini sama dengan dengan penelitian oleh Natarajan & Rajendran (2009) menunjukkan bahwa *L. plantarum* memiliki kondisi optimum untuk aktivitas tanase pada pH 6 (Natarajan & Rajendran, 2009). Aktivitas tanase dengan pH optimum 6 termasuk kedalam tanase ekstraseluler (TanALp). TanALp ini dapat mendegradasi kompleks asam tanat di luar sel. Penurunan pH juga dapat menurunkan aktivitas degradasi senyawa tanin. Pengaruh lingkungan pH pada medium fermentasi dapat menyebabkan perubahan konformasi dari sisi katalitik enzim. Hal ini dikarenakan residu dari sisi katalitik dapat terprotonasi atau perubahan muatan. Semakin asam maka semakin banyak ion H^+ yang dilepaskan sehingga mengubah residu-residu seperti gugus karboksilat dan gugus amin dari tanase. Laju reaksi dari katalisis tanase dapat mencapai kesetimbangan apabila terbentuk kondisi pH titik isoelektrik pada proses fermentasi. Ionisasi asam amino yang tidak sesuai akan mengubah ikatan ionik sehingga mengurangi pengikatan substrat pada sisi aktif enzim dan kestabilan aktivitas enzim (Madigan, 2018). Pada penelitian ini, fermentasi kubis yang dilakukan dengan menggunakan *L. plantarum* diketahui dapat mengubah glukosa membentuk produk asam dalam jumlah sedikit. (Lin et al., 2014). *L. plantarum* dapat menghasilkan asam laktat dan asam asetat sebagai produk utama metabolisme glukosa dan mensekresikannya ke dalam media fermentasi (Corsetti & Valmorri, 2011; Pieterse et al., 2005). *L. plantarum* lebih tahan terhadap asam laktat daripada banyak mikroorganisme lainnya, pertumbuhan mikroorganisme tersebut masih sangat terhambat oleh peningkatan konsentrasi asam organik yang tercapai selama fermentasi (Pieterse et al., 2005). Oleh karena itu, dapat dinyatakan bahwa adanya peningkatan asam organik dalam sistem fermentasi kemungkinan mampu menurunkan laju pertumbuhan mikroorganisme, khususnya *L. plantarum* sebagai penghasil tanase, sehingga degradasi senyawa tanin semakin menurun seiring dengan peningkatan keasaman lingkungan fermentasi.

5.4 Analisis Metabolit Sekunder Target Selama Proses Fermentasi

5.4.1 Identifikasi Asam Organik dalam Filtrat Hasil Fermentasi

Fermentasi kubis yang dilakukan dengan menggunakan *L. plantarum* dapat mengubah glukosa menjadi produk asam dalam jumlah sedikit (Lin et al., 2014). Pemberian stress asam (0,2 % v/v) dalam media kultur bakteri dapat menginduksi akumulasi pembentukan *unfolded protein* dalam retikulum endoplasma yang mengarah pada kematian sel secara terprogram (Kawazoe, et al., 2017).



Gambar 5.6 Mekanisme regulasi asam organik oleh mikroorganisme. Keterangan: Fps1p =kanal Fps1p ; Pma1p =kanal Pma1p , V-ATPase = *vacuolar proton-pumping ATPase enzyme* (Geng, et al., 2017).

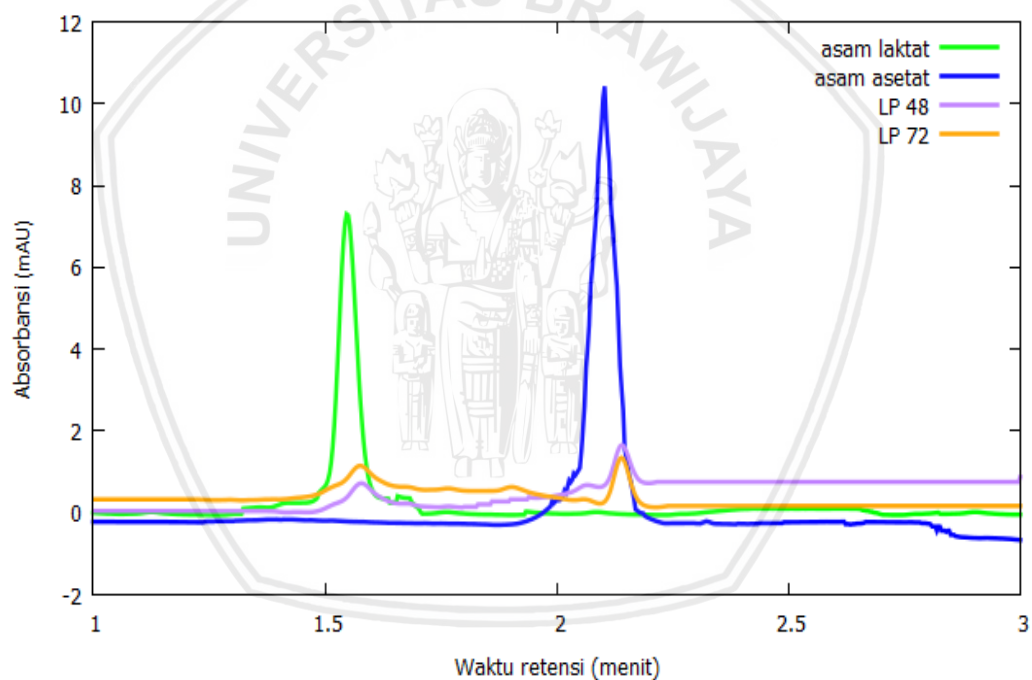
Efek penghambatan asam organik utamanya disebabkan oleh bentuk tak terdisosiasi asam organik (RCOOH) yang dapat melintasi membran sel mikroorganisme melalui proses difusi sederhana atau melalui saluran Fps1p . Setelah berada di sitoplasma, asam dapat berdisosiasi menjadi anion (RCOO^-) dan proton (H^+). Tidak seperti bentuk molekulnya (tak terdisosiasi), proton yang dihasilkan dapat meningkatkan keasaman sitoplasma sel. Selain itu, akumulasi anion dalam sitoplasma juga dapat mengganggu aktivitas NADH oksidase yang mengarah pada gangguan regenerasi kofaktor NAD^+ untuk proses metabolisme. Namun demikian, proton dan anion asam tersebut tidak dapat dikeluarkan melalui membran plasma dengan proses difusi sederhana karena muatan listriknya. Akibatnya, sel akan bekerja untuk memulihkan pH intraseluler dengan memompa proton keluar melalui kerja enzim bergantung ATP yaitu *plasma*

membrane proton-pumping ATPase (PM-H⁺-ATPase) dan *vacuolar proton-pumping ATPase* (V-H⁺-ATPase). Kedua enzim tersebut berfungsi mempertahankan pH sitoplasma dengan memompa proton keluar melalui saluran Pma1p. Sementara itu, anion dapat dikeluarkan dari sitoplasma melalui aktivitas *transporter ATP-binding cassette* (ABC). Penggunaan beberapa energi inilah mampu menurunkan pertumbuhan dan aktivitas sel selama proses fermentasi (Geng et al., 2017; Kawazoe et al., 2017; Mira et al., 2010; Pieterse et al., 2005). Oleh karena itu, dapat dinyatakan bahwa adanya peningkatan asam organik dalam sistem fermentasi kemungkinan mampu menurunkan laju pertumbuhan mikroorganisme, khususnya *L. plantarum* sebagai penghasil tanase, sehingga degradasi senyawa tanin semakin menurun seiring dengan peningkatan keasaman lingkungan fermentasi. Berdasarkan kurva pertumbuhan yang telah dilakukan, maka variasi inkubasi yang digunakan adalah jam ke-48 dan ke-72 dengan volume inokulum *L. plantarum* 5% (v/v) dan pH 6. Pada fasa stasioner, mikroorganisme mengalami penurunan kecepatan pertumbuhan dan metabolisme sel yang dikarenakan nutrisi mulai habis dan penumpukan senyawa metabolit yang bersifat toksik.

Tabel 5.2 Analisis kadar tanin, glukosa, dan pH pada filtrat hasil fermentasi kubis menggunakan volume inokulum 5% (v/v), pH 6, pada kondisi anaerobik dan suhu ruang jam ke-48 dan ke-72

	Sampel	
	Filtrat pada jam ke-48	Filtrat pada jam ke-72
pH	3,8± 0,02	3,6± 0,02
Kadar tanin biomassa (mg/100 g kubis)	73,789± 1,042	56,117± 2,242
Kadar tanin filtrat (mg/100 g kubis)	124,664± 1,821	1,988± 1,332
Kadar gula biomassa (mg/100 g kubis)	73,442± 2,041	86,760± 1,002
Kadar gula filtrat (mg/100 g kubis)	18,317± 2,011	114,846± 2,223
Total Asam (mL)	0,037 ± 0,01	0,047 ± 0,01

Kadar tanin dalam biomassa kubis maupun filtrat menurun dari jam ke 48 ke jam ke-72. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri aktif memproduksi enzim tanase hingga akhir fasa stasioner dan ditunjukkan dengan peningkatan kadar glukosa dari jam ke-48 menuju jam ke-72. *Lactobacillus plantarum* dapat mengkonversi gula heksosa dan pentosa menjadi asam laktat. Penurunan nilai pH dari rentang waktu fermentasi ke-48 menuju jam ke-72 diindikasikan adanya asam-asam organik, khususnya asam laktat dan asam asetat. *L. plantarum* dapat bertahan pada waktu inkubasi jam ke-72 dengan ditunjukkan adanya peningkatan kadar asam total. Kadar asam total menyatakan kadar asam yang dihasilkan tinggi dalam media fermentasi sehingga pH dalam medium fermentasi berubah menjadi lebih asam. Perubahan kondisi lingkungan fermentasi pada waktu inkubasi jam ke-72 lebih asam ditunjukkan dengan nilai pH yang lebih besar dibandingkan nilai pH di waktu inkubasi jam ke-48.

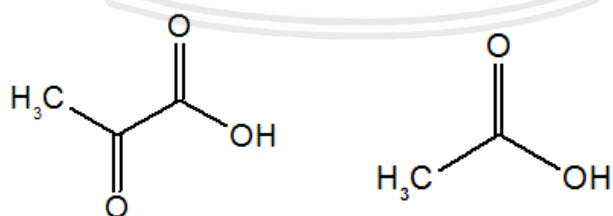


Gambar 5.7 Kromatogram asam organik pada filtrat hasil fermentasi kubis menggunakan volume inokulum *L. plantarum* 5% (v/v), pH 6 pada kondisi anaerobik dan suhu ruang jam ke-48 dan ke-72

Tabel 5.3 Identifikasi waktu retensi puncak asam asetat dan laktat menggunakan volume inokulum *L. plantarum* 5% (v/v), pH 6 pada suhu ruang jam ke- 48 dan 72

Sampel	Waktu Retensi (menit)	
	Asam asetat	Asam laktat
Standar	2,1033	1,5467
Jam ke 48	2,1400	1,5767
Jam ke 72	2,1400	1,5767

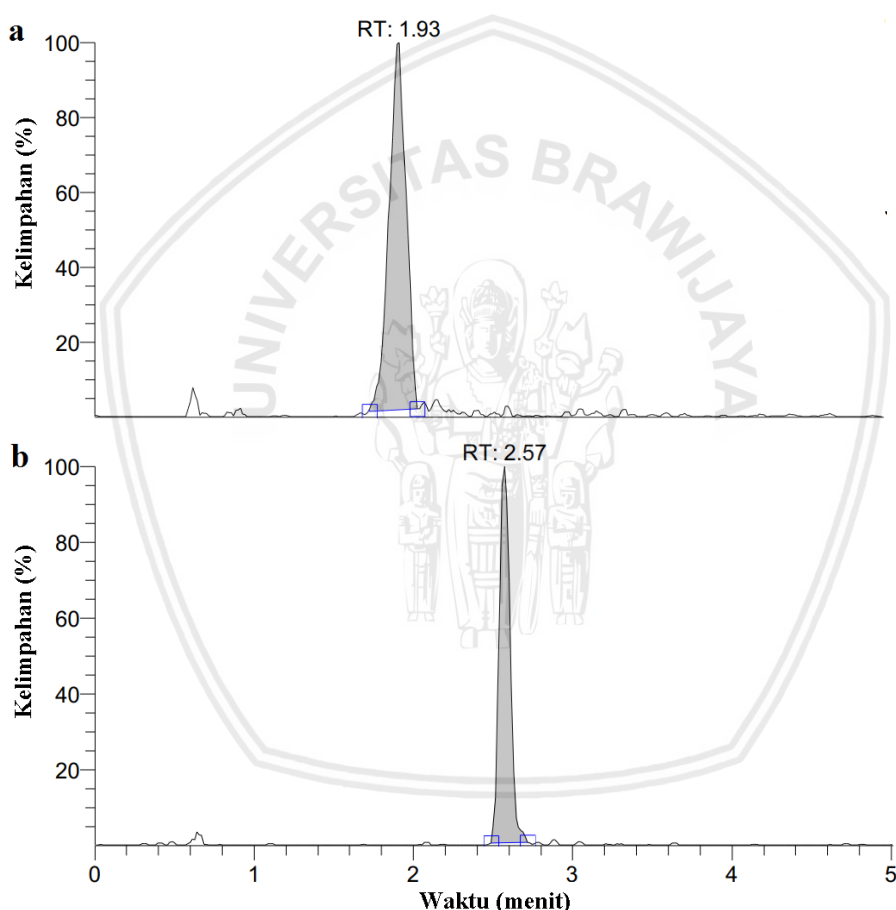
Pada penelitian ini, asam laktat dan asam asetat merupakan senyawa hidrofilik yang dapat diidentifikasi menggunakan HPLC. Fasa diam non polar C18 dan fasa gerak polar yang terdiri dari campuran KH_2PO_4 80% dan asetonitril 20%. Kedua senyawa tersebut dapat terelusi dengan cepat melalui kolom dan menuju detektor. Berdasarkan analisis kromatogram HPLC (**Gambar 5.8**), filtrat hasil fermentasi mengandung asam laktat dan asam asetat. Hal ini didasarkan pada kesesuaian puncak asam laktat dan asetat pada waktu retensi tertentu dalam kromatogram sampel jika dibandingkan dengan kromatogram standar. Identifikasi asam laktat dan asam asetat, baik pada filtrat hasil fermentasi yang diambil pada jam ke-48 dan ke-72 tercantum dalam **Tabel 5.3**. Puncak asam laktat memiliki waktu retensi lebih pendek dibandingkan puncak asam asetat. Asam laktat memiliki satu gugus karboksil dan satu gugus karbonil meningkatkan polaritas senyawa tersebut, sedangkan asam asetat hanya memiliki satu gugus karboksil. Oleh karena itu, asam laktat akan terelusi terlebih dahulu melalui kolom dan menuju detektor, sehingga puncak asam laktat memiliki waktu retensi yang lebih pendek jika dibandingkan dengan puncak asam asetat.



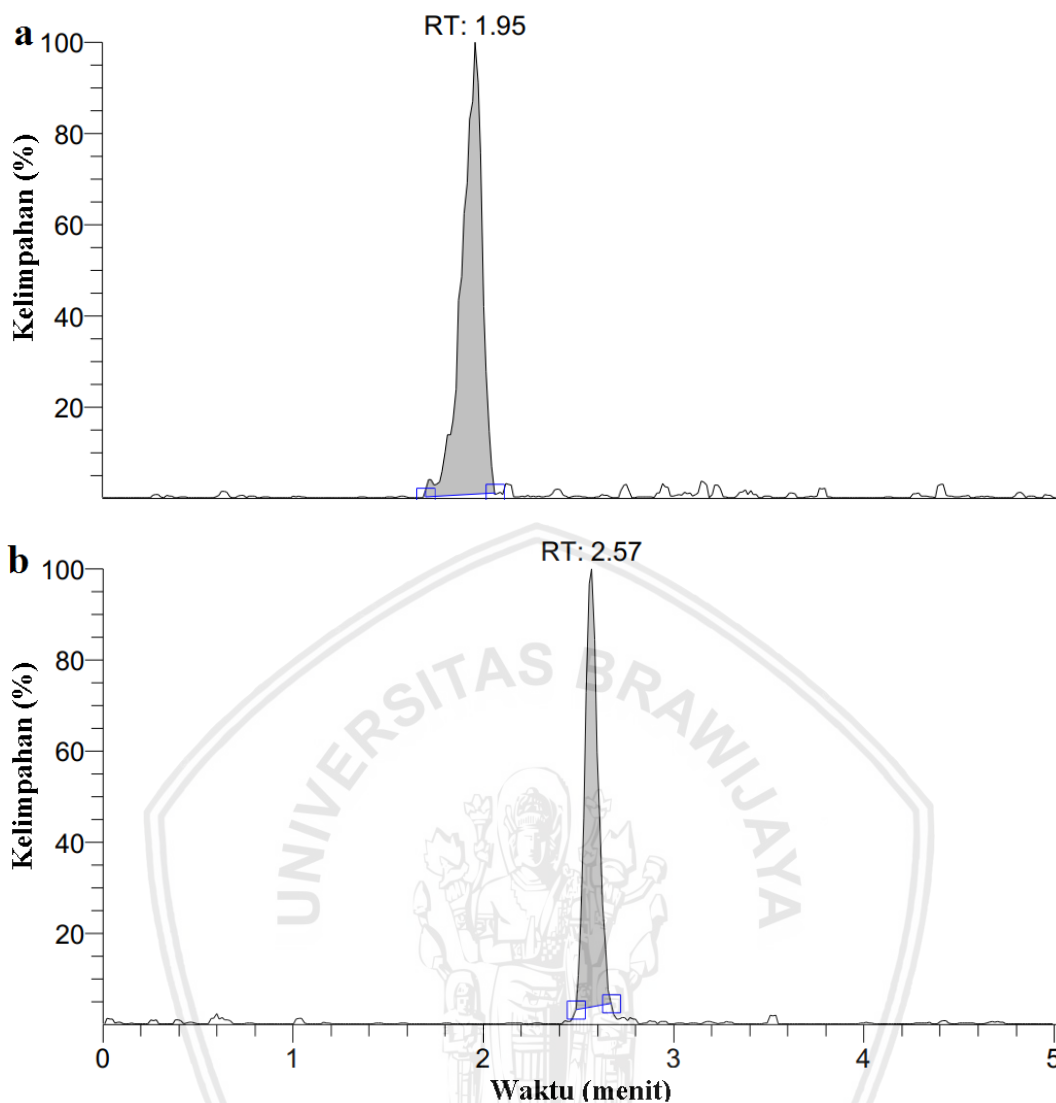
Gambar 5.8 Struktur senyawa (a) asam laktat dan (b) asam asetat (Pubchem)

5.4.2 Identifikasi Senyawa Golongan Isotiosianat Target

Pengaruh variasi waktu inkubasi pada fermentasi juga mempengaruhi senyawa metabolit dari tanaman kubis yaitu glukosinolat. Glukosinolat merupakan senyawa metabolit yang tidak aktif dalam tanaman kubis. Pada penelitian ini, dilakukan identifikasi senyawa isotiosianat dalam kubis segar dan kubis yang telah difermentasi. Senyawa isotiosianat yang ditargetkan adalah iberin dan sulforafan, yang masing-masing berasal dari glukorafanin dan glukoiiberin. Analisis senyawa isotiosianat target dilakukan dengan menggunakan instrumentasi LC-MS. Kedua senyawa tersebut dikonfirmasi berdasarkan perbandingan nilai m/z sampel dengan spektra MS pada literatur.



Gambar 5.9 Kromatogram LC-MS dari biomassa kubis terfermentasi menggunakan volume inokulum *L. plantarum* 5% (v/v), pH 3,6 pada suhu ruang jam ke-72 (a) kromatogram senyawa iberin dan (b) kromatogram senyawa sulforafan



Gambar 5.10 Kromatgram LC-MS dari kubis segar. (a) kromatogram senyawa iberin (b) kromatogram senyawa sulforafan.

Tabel 5.4 Identifikasi senyawa isotiosianat kubis segar dan kubis yang difermentasi (volume inokulum *L. plantarum* 5% (v/v), pH 3,6 lama fermentasi jam ke-72

Senyawa	Waktu Retensi (menit)		Ion molekuler m/z	Berat molekul (g/mol) (Pubchem)
	Sampel Kubis Segar	Sampel Kubis Terfermentasi		
Sulforafan	2,57	2,57	178	177,29
Iberin	1,95	1,93	164	163,25

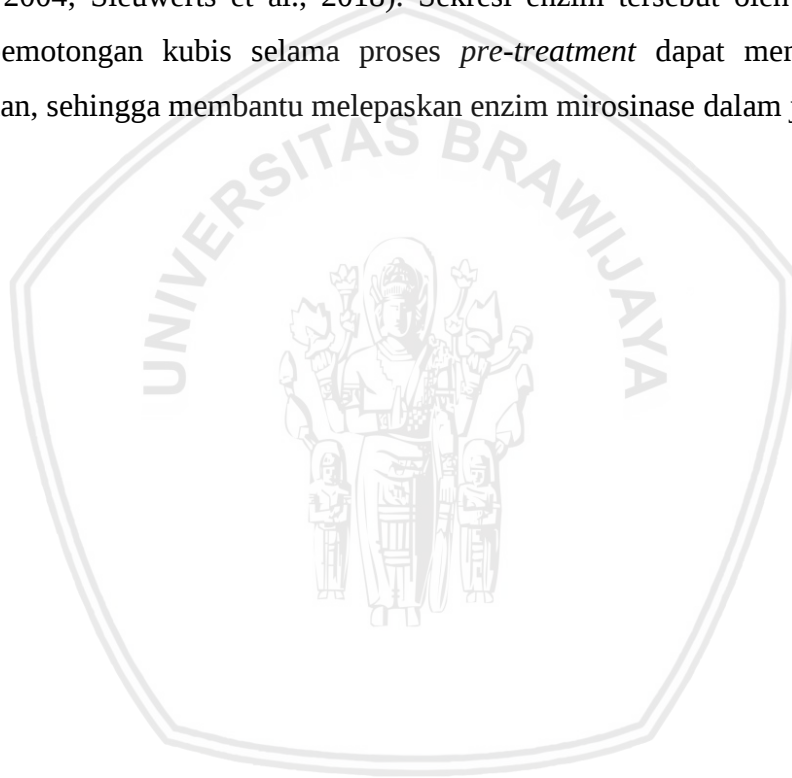
Berdasarkan Hasil kromatogram LC-MS tercantum dalam **Gambar 5.9.a**, dilakukan analisa kualitatif dengan pendekatan massa molekul ion target. Puncak senyawa dengan kelimpahan relatif 100% pada waktu retensi 1,93 menit\ sesuai dengan senyawa iberin, yang memiliki berat molekul 163,253 g/mol (Pubchem). **Gambar 5.9.b** menunjukkan puncak senyawa dengan kelimpahan 100% pada waktu retensi 2,57 menit. Puncak tersebut sesuai dengan nilai m/z dengan berat molekul sulforafan yaitu 177,29 g/mol (Pubchem). Keberadaan kedua senyawa tersebut mengindikasikan bahwa fermentasi pada kubis dapat mengaktivasi enzim mirosinase tanaman, yang selanjutnya mengarah pada hidrolisis glukosinolat menjadi senyawa isotiosianat yang ditargetkan. **Tabel 5.4** merangkum hasil dari analisis LC-MS. Profil LC-MS dari kubis segar telah menunjukkan adanya senyawa sulforafan dan iberin. Hal ini mengindikasikan bahwa dinding sel tanaman telah lisis bahkan sebelum adanya aktivitas dari mikroorganisme, yang menyebabkan pelepasan enzim untuk menghidrolisis senyawa glukosinolat menjadi senyawa isotiosianat target. Menurut Barba et al. (2016), gangguan fisik jaringan tanaman seperti memotong dapat menyebabkan enzim mirosinase aktif dan mendegradasi senyawa glukosinolat dalam tanaman *Brassicacea* (Barba et al., 2016). Oleh karena itu, adanya senyawa isotiosianat dalam kubis segar dapat dikarenakan adanya proses *pre-treatment* sebelum analisis LC-MS, seperti pemotongan dan penghalusan, yang menyebabkan enzim mirosinase dapat aktif untuk menghidrolisis senyawa glukosinolat target. Pada penelitian ini, dilakukan analisis kuantitatif pada salah satu senyawa isotiosianat target, yaitu sulforafan untuk membandingkan kadar isotiosianat pada kubis segardan kubis yang telah difermentasi.

Tabel 5.5 Kadar sulforafan dalam biomassa kubis volume inokulum *L. plantarum* 5% (v/v), pH3,6 lama fermentasi jam ke-72

	Bahan Baku (Kubis Segar)	Sampel (Kubis Terfermentasi)
Kadar Sulforafan ($\mu\text{g/g}$)	$0,539 \pm 24,06$	$0,348 \pm 19,04$

Berdasarkan hasil analisis kuantitatif diatas, kadar sulforafan kubis terfermentasi lebih kecil bila dibandingkan dengan kubis segar. Dalam hal ini terjadi beberapa kemungkinan yang menyebabkan kadar sulforafan dalam kubis terfermentasi lebih kecil dari kubis segar. Pertama, glukosinolat ditransformasikan menjadi nitril oleh enzim mirosinase pada pH rendah (3-5).

Berdasarkan Mullaney (2013) bahwa pada saat kondisi pH rendah, bakteri asam laktat dapat mengkonversi glukosinolat dalam jumlah sedikit menjadi nitril. Adanya hubungan antara aktivitas Epithiospecifier protein (ESP) dengan pembentukan sulforafan nitril dalam fermentasi kubis juga mempengaruhi proses degradasi glukosinolat dengan prekursor glukorafanin menjadi sulforafan nitril. Selama proses fermentasi kecepatan pertumbuhan juga dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi. Populasi dari *L. plantarum* tersebut bertambah sehingga mengganggu aktivitas untuk hidrolisis glukosinolat dalam jumlah yang lebih besar. Pada proses ini terjadi pemecahan dinding sel tanaman dengan bantuan mikroorganisme. *L. plantarum* yang diketahui memiliki enzim pemecah dinding sel (selulase, pektinase, dan β -glukosidase) (Kung et al., 2010; Matthews et al., 2004; Sieuwerts et al., 2018). Sekresi enzim tersebut oleh bakteri, bersama dengan proses pemotongan kubis selama proses *pre-treatment* dapat membantu memecah dinding sel tanaman, sehingga membantu melepaskan enzim mirosinase dalam jumlah sedikit.



BAB VI

PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Adapun kesimpulan yang diperoleh dari penelitian tentang fermentasi kubis menggunakan *L. plantarum* sebagai berikut :

1. Volume inokulum optimum untuk menurunkan kadar tanin kubis sebanyak 29,03% melalui proses fermentasi dengan *L. plantarum* adalah 5% (kadar tannin 48,0214 mg/100 g berat segar).
2. pH optimum untuk menurunkan kadar tanin sebanyak 11,49% dalam kubis melalui proses fermentasi dengan volume inokulum *L. plantarum* 5% (v/v) adalah 6 (kadar tannin 75,9378 mg/100 g berat segar).
3. Waktu inkubasi jam ke-72 lebih berpengaruh terhadap produksi metabolit sekunder. Kandungan biomassa kubis menunjukkan adanya senyawa isotiosianat yaitu iberin dan sulforafan. Jenis asam yang berhasil diidentifikasi dalam filtrat hasil fermentasi kubis adalah asam laktat dan asam asetat.

6.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya yaitu perlu identifikasi jenis asam-asam organik lainnya, seperti asam galat dengan metode spektrofotometri dan dilakukan kuantisasi asam.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, T. M. (2009). Industrial Fermentation Processes. *Encyclopedia of Microbiology*, 349–361. <https://doi.org/10.1016/b978-012373944-5.00369-2>
- Averesch, N. J. H., & Krömer, J. O. (2018). Metabolic Engineering of the Shikimate Pathway for Production of Aromatics and Derived Compounds—Present and Future Strain Construction Strategies. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6(32). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00032>
- Barba, F. J., Nikmaram, N., Roohinejad, S., Khelfa, A., Zhu, Z., & Koubaa, M. (2016). Bioavailability of Glucosinolates and Their Breakdown Products: Impact of Processing. *Frontiers in Nutrition*, 3(24), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnut.2016.00024>
- Batt, C. A. (2014). *Lactobacillus*: Introduction. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 2, 409–411. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00176-2>
- Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdolec, N. (2018). *Lactobacillus plantarum* with Functional Properties: An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods. *JBioMed Research International*, 2(9361614), 1–18. <https://doi.org/10.1155/2018/9361614>
- Beniwal, V., Kumar, R., Kumari, A., & Chhokar, V. (2014). Microbial Production of Tannase. *Microbes in the Service of Mankind*, 463–488. <https://doi.org/10.1145/634067.634234>
- Bruslind, L. (2019). Microbial Growth. *Open.Oregonstate.Edu*, Retrieved May, 6 2019, from library.open.oregonstate.edu/microbiology/chapter/microbial-growth/
- Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P., & Velasco, P. (2011). Phenolic Compounds in *Brassica* Vegetables. *Molecules*, 16 (1), 251–280. <https://doi.org/10.3390/molecules16010251>
- Chen, Y., Huang, Y., Bai, Y., Fu, C., Zhou, M., Gao, B., Wang, C., Li, D., Hu, Y., Xu, N. (2017). Effects of Mixed Cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* in Alcoholic Fermentation on the Physicochemical and Sensory Properties of Citrus Vinegar. *LWT - Food Science and Technology*, 84, 753–763. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.032>
- Corsetti, A., & Valmorri, S. (2011). Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus spp.*: *Lactobacillus plantarum*. In *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition*. Elsevier. Amsterdam. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00263-6>

- Daneshfar, A., Ghaziaskar, H. S., & Homayoun, N. (2008). Solubility of Gallic Acid in Methanol, Ethanol, Water, and Ethyl Acetate. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 53(3), 776–778. <https://doi.org/10.1021/je700633w>
- Di Stefano, V., Avellone, G., Bongiorno, D., Cunsolo, V., Muccilli, V., Sforza, S., Dossena, A., Drahos, L., Vékey, K. (2012). Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for Food Analysis. *Journal of Chromatography A*, 1259, 74–85. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.023>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Production Technique and Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356.
- Ernst, I. M. A., Wagner, A. E., Schuemann, C., Storm, N., Höppner, W., Döring, F., Stocker, A., Rimbach, G. (2011). Allyl-, Butyl- and Phenylethyl-Isothiocyanate Activate Nrf2 in Cultured Fibroblasts. *Pharmacological Research*, 63(3), 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.11.005>
- Fahey, J. W. (2015). Brassica: Characteristics and Properties. In *Encyclopedia of Food and Health* (3rd ed.). Elsevier. Amsterdam. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00083-0>
- Farag, M. A., & Motaal, A. A. (2010). Sulforaphane Composition, Cytotoxic and Antioxidant Activity of *Crucifer* Vegetables. *Journal of Advanced Research*, 1(1), 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.005>
- Fekadu Gemed, H. (2014). Antinutritional Factors in Plant Foods: Potential Health Benefits and Adverse Effects. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3(4), 284. <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20140304.18>
- Filannino, P., Cardinali, G., Rizzello, C. G., Buchin, S., De Angelis, M., Gobbetti, M., & Di Cagno, R. (2014). Metabolic Responses of *Lactobacillus plantarum* Strains during Fermentation and Storage of Vegetable and Fruit Juices. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(7), 2206–2215. <https://doi.org/10.1128/aem.03885-13>
- Geng, P., Zhang, L., & Shi, G. Y. (2017). Omics Analysis of Acetic Acid Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(5). <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2259-9>
- Guriya, R., Moon, A., & Talreja, K. (2015). Phytochemical Profiling and Characterization of

Bioactive Compounds from *Brassica oleracea*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7(4),825-831.

- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. (2010). Jungle. *National Review of Microbiology*, 8(1), 15–25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>. Bacterial
- Iori, R., Rollin, P., Streicher, H., Thiem, J., & Palmieri, S. (1996). The Myrosinase-Glucosinolate Interaction Mechanism Studied Using Some Synthetic Competitive Inhibitors. *FEBS Letters*, 385(1–2), 87–90. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00335-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00335-3)
- Ishida, M., Hara, M., Fukino, N., Kakizaki, T., & Morimitsu, Y. (2014). Glucosinolate Metabolism, Functionality and Breeding for the Improvement of *Brassicaceae* Vegetables. *Breeding Science*, 64(1), 48–59. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.64.48>
- Jadhav, U., Ezhilarasan, R., Vaughn, S. F., Berhow, M. A., & Mohanam, S. (2007). Iberin Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Neuroblastoma Cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 19(3), 353–361. <https://doi.org/10.3892/ijmm.19.3.353>
- Jiménez, N., Esteban-Torres, M., Mancheño, J. M., De las Rivas, B., & Muñoz, R. (2014). Tannin Degradation by a Novel Tannase Enzyme Present in Some *Lactobacillus plantarum* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(10), 2991–2997. <https://doi.org/10.1128/AEM.00324-14>
- Johnson, I. T. (2002). Glucosinolates: Bioavailability and Importance to Health. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 72(1), 26–31. <https://doi.org/10.1024/0300-9831.72.1.26>
- Kawazoe, N., Kimata, Y., & Izawa, S. (2017). Acetic acid Causes Endoplasmic Reticulum Stress And Induces The Unfolded Protein Response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, 8(1192), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01192>
- Krajka-Kuźniak, V., Paluszczak, J., Szaefer, H., & Baer-Dubowska, W. (2015). The Activation of the Nrf2/ARE Pathway in Hepg2 Hepatoma Cells by Phytochemicals and Subsequent Modulation of Phase II and Antioxidant Enzyme Expression. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 71(2), 227–238. <https://doi.org/10.1007/s13105-015-0401-4>
- Kung, L., Tung, R. S., Maciorowski, K. G., Buffum, K., Knutsen, K., & Aimutis, W. R. (2010). Effects of Plant Cell-Wall-Degrading Enzymes and Lactic Acid Bacteria on Silage Fermentation and Composition. *Journal of Dairy Science*, 74(12), 4284–4296. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(91\)78623-2](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(91)78623-2)

- Kupiec, T. (2004). Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 8(3), 223–227.
- Lee, S. G., Lee, K. W., Park, T. H., Park, J. Y., Han, N. S., & Kim, J. H. (2012). Proteomic Analysis of Proteins Increased or Reduced by Ethanol of *Lactobacillus plantarum* ST4 Isolated from Makgeolli, Traditional Korean Rice Wine. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(4), 516–525. <https://doi.org/10.4014/jmb.1109.09012>
- Liener, I. . (1998). *Plant Antinutritional Factors: Detoxification*. 4587–4593. Elsevier. Amsterdam.
- Lin, Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S., & Kong, H. (2014). Factors Affecting Ethanol Fermentation Using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass and Bioenergy*, 47, 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.019>
- Liu, X., Jia, B., Sun, X., Ai, J., Wang, L., Wang, C., Zhao, F., Zhan, J., Huang, W. (2015). Effect of Initial pH on Growth Characteristics and Fermentation Properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Food Science*, 80(4), M800–M808. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12813>
- Matejčková, Z., Liptáková, D., Spodniaková, S., & Valík, Ľ. (2016). Characterization of the Growth of *Lactobacillus plantarum* in Milk in Dependence on Temperature. *Acta Chimica Slovaca*, 9(2), 104–108. <https://doi.org/10.1515/acs-2016-0018>
- Matsuda, M., Hirose, Y., & Kanauchi, M. (2016). Purification and Characteristics of Tannase Produced by Lactic Acid Bacteria, *Lactobacillus plantarum* H78. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, (43), 258-266. <https://doi.org/10.1094/asbcj-2016-4298-01>
- Matthews, A., Grimaldi, A., Walker, M., Bartowsky, E., Grbin, P., & Jiranek, V. (2004). Lactic Acid Bacteria as a Potential Source of Enzymes for Use in Vinification. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 5715–5731. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5715-5731.2004>
- Mayorga-Gross, A. L., Quirós-Guerrero, L. M., Fourny, G., & Vaillant, F. (2016). An Untargeted Metabolomic Assessment Of Cocoa Beans during Fermentation. *Food Research International*, 89, 901–909. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.017>
- Mira, N. P., Palma, M., Guerreiro, J. F., & Sá-Correia, I. (2010). Genome-Wide Identification of *Saccharomyces cerevisiae* Genes Required for Tolerance To Acetic Acid. *Microbial Cell Factories*, 9, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-79>

- Miranda, B., Lawton, N. M., Tachibana, S. R., Swartz, N. A., & Hall, W. P. (2016). Titration and HPLC Characterization of Kombucha Fermentation: A Laboratory Experiment in Food Analysis. *Journal of Chemical Education*, 93(10), 1770–1775. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.6b00329>
- Mosha, T. C., Gaga, H. E., Pace, R. D., Laswai, H. S., & Mtebe, K. (1995). Effect of blanching on the Content of Antinutritional Factors in Selected Vegetables. *Plant Foods for Human Nutrition*, 47(4), 361–367. <https://doi.org/10.1007/BF01088275>
- Nair, R., Ghakker, N., & Sharma, A. (2015). Spectrophotometric Estimation of Tannins in Raw and Processed Form (*Paan Masala*) of Areca Nut. *International Journal of Education and Science Research Review*, (1), 51–56. Retrieved from www.ijesrr.org
- Natarajan, K., & Rajendran, A. (2009). Effect of Fermentation Parameters on Extra Cellular Tannase Production by *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407. *E-Journal of Chemistry*, 6(4), 979–984.
- Natesh N, H., SK, A., & L, A. (2018). An Overview of Nutritional and Anti Nutritional Factors in Green Leafy Vegetables. *Horticulture International Journal*, 1(2), 58–65. <https://doi.org/10.15406/hij.2017.01.00011>
- Norouzian, D. (2008). Effect of Different Factors on Fermentative Production of Enzymes by Fungi. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 2(1), 14–18.
- Nuobariene, L., Arneborg, N., & Hansen, Å. S. (2014). Phytase Active Yeasts Isolated From Bakery Sourdoughs. *Foodbalt*, 223–227.
- Oboh, G. (2006). Nutrient Enrichment Of Cassava Peels Using a Mixed Culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus spp* Solid Media Fermentation Techniques. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(1), 46–49. <https://doi.org/10.2225/vol9-issue1-fulltext-1>
- Ogbede, S. C., Saidu, A. N., Kabiru, A. Y., & Busari, M. B. (2015). Nutrient and Anti-Nutrient Compositions of *Brassica oleraceae var. capitata L.* *IOSR Journal Of Pharmacy*, 5(3), 2250–3013. Retrieved from <http://www.iosrphr.org/papers/v5i3/D053019025.pdf>
- Palani, K., Harbaum-Piayda, B., Meske, D., Keppler, J. K., Bockelmann, W., Heller, K. J., & Schwarz, K. (2016). Influence of Fermentation on Glucosinolates and Glucobrassicin Degradation Products in Sauerkraut. *Food Chemistry*, 190, 755–762. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.012>

- Pandey, S., & Garg, F. C. (2013). Preparation of Spiced Sauerkraut by Using Lactic Acid Bacteria and By Natural Fermentation. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 14(6), 2319–7064. Retrieved from www.ijsr.net
- Parasuraman, R., Balamurugan, S., Muralidharan, S., Jayaraj, K., Ijayan, V., & Anish, S. (2014). An Overview of Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy Instrumentation. *Pharmaceutical Methods*, 5(2), 47–55. <https://doi.org/10.5530/phm.2014.2.2>
- Park, S., Arasu, M. V., Jiang, N., Choi, S. H., Lim, Y. P., Park, J. T., Al-Dhabi, N.A., Kim, S. J. (2014). Metabolite Profiling of Phenolics, Anthocyanins and Flavonols in Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Industrial Crops and Products*, 60, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.037>
- Park, S., Valan Arasu, M., Lee, M. K., Chun, J. H., Seo, J. M., Lee, S. W., Al-Dhabi, N. A., Kim, S. J. (2014). Quantification of Glucosinolates, Anthocyanins, Free Amino Acids, and Vitamin C in Inbred Lines of Cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Food Chemistry*, 145, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.010>
- Peñas, E., Pihlava, J. M., Vidal-Valverde, C., & Frias, J. (2012). Influence of Fermentation Conditions of *Brassica oleracea* L. var. *capitata* on the Volatile Glucosinolate Hydrolysis Compounds of Sauerkrauts. *LWT - Food Science and Technology*, 48(1), 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.005>
- Pieterse, B., Leer, R. J., Schuren, F. H. J., & van der Werf, M. J. (2005). Unravelling the Multiple Effects of Lactic Acid Stress on *Lactobacillus plantarum* by Transcription Profiling. *Microbiology*, 151(12), 3881–3894. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28304-0>
- Polshettiwar, S. A., Ganjiwale, R. O., Wadher, S. J., & Yeole, P. G. (2007). Spectrophotometric Estimation of Total Tannins in Some Ayurvedic Eye Drops. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 574–576.
- Ponomarova, O., Gabrielli, N., Sévin, D. C., Müllleder, M., Zirngibl, K., Bulyha, K., Andrejev, S., Kafkia, E., Typas, A., Sauer, U., Raiser, M., Patil, K. R. (2017). Yeast Creates a Niche for Symbiotic Lactic Acid Bacteria through Nitrogen Overflow. *Cell Systems*, 5(4), 345–357.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.09.002>
- Radojicic, I., Glivetic T, Delonga K, & Vorkapic, J. (2008). Glucosinolates and Their Potential Role in Plant. *Periodicum Biologorum*, 110(4), 297–309. <https://doi.org/10.1021/ef990019r>
- Ren, B., Wu, M., Wang, Q., Peng, X., Wen, H., McKinstry, W. J., & Chen, Q. (2013). Crystal

Structure of Tannase from *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Molecular Biology*, 425(15), 2737–2751. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.04.032>

Renge, V. C., Khedkar, S. V., & Nandurkar, N. R. (2012). Enzyme Synthesis by Fermentation Method : A Review. *Scientific Reviews and Chemical Communications*, 2(4), 585–590.

Richardson, K. V. (2013). Evaluation of Three Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) Varieties Grown for The Fresh Market. *Gladstone Road Agriculture Centre Crops Research Report No. 15*, 15(15). Retrieved from <http://www.bahamas.gov>.

Rokayya, S., Li, C.-J., Zhao, Y., Li, Y., & Sun, C.-H. (2014). Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) Phytochemicals with Antioxidant and Anti-inflammatory Potential. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(11), 6657–6662. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.11.6657>

Salari, R., & Salari, R. (2017). Investigation of the Best *Saccharomyces cerevisiae* Growth Condition. *Electronic Physician*, 9(1), 3592–3597. <https://doi.org/10.19082/3592>

Septembre-Malaterre, A., Remize, F., & Poucheret, P. (2018). Fruits and Vegetables, as a Source of Nutritional Compounds and Phytochemicals: Changes in Bioactive Compounds during Lactic Fermentation. *Food Research International*, 104, 86–99. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.031>

Sieuwert, S., Bron, P. A., & Smid, E. J. (2018). Mutually Stimulating Interactions Between Lactic Acid Bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in Sourdough Fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 90, 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.022>

Sinha, K., & Khare, V. (2017). Review on : Antinutritional Factors in Vegetable Crops. *The Pharma Innovation Journal*, 6(12), 353–358.

Siti Hajar, M. A., Rahmath, A., Siti Azmah, J., Hartinie, M., Gansau, J. A., Ainol Azifa, M. F., & Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in Sustainable Bioethanol Production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2007). *Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition*. Thomson Brooks/Cole. Belmont.

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2014). *Fundamentals of Analytical Chemistry Ninth Edition*. Thomson Brooks/Cole. Belmont.

Stanbury. (2017). *Principles of Fermentation Technology: The Range of Fermentation Process*.

- Elsevier. Amsterdam. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099953-1/00001-6>
- Swaroopanand, S. S., Mahavidyalya, S., Bhilai, H., Agrawal, N., Minj, D. K., & Rani, K. (2015). Estimation of Total Carbohydrate Present In Dry Fruits. *IOSR Journal of Environmental Science*, 1(6), 24–27.
- Thammana, M. (2016). A Review on High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(2), 22–28.
- van Bokhorst-van de Veen, H., Abee, T., Tempelaars, M., Bron, P. A., Kleerebezem, M., & Marco, M. L. (2011). Short- and Long-Term Adaptation to Ethanol Stress and Its Cross-Protective Consequences in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15), 5247–5256. <https://doi.org/10.1128/aem.00515-11>
- Vig, A. P., Rampal, G., Thind, T. S., & Arora, S. (2009). Bio-protective Effects of Glucosinolates - A Review. *LWT - Food Science and Technology*, 42(10), 1561–1572. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.023>
- Walker, G. M., & Walker, R. S. K. (2018). Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations. *Advances in Applied Microbiology*, 105. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.05.003>
- Walker, G., & Stewart, G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*, 2(4), 30. <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>
- Zhou, B., Xiao, J. F., Tuli, L., & Ransom, H. W. (2012). LC-MS-Based Metabolomics. *Molecular BioSystems*, 8(2), 470–481. <https://doi.org/10.1039/c1mb05350g>
- Zhou, Y., Han, L. R., He, H. W., Sang, B., Yu, D. L., Feng, J. T., & Zhang, X. (2018). Effects of Agitation, Aeration and Temperature on Production of a Novel Glycoprotein gp-1 by *Streptomyces kanasensis* Zxo1 and Scale-Up Based on Volumetric Oxygen Transfer Coefficient. *Molecules*, 23(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules23010125>