

**Pengaruh Penambahan Garam NaCl dan Campuran
Mikroorganisme *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces
cerevisiae* terhadap Perubahan Kadar Oksalat dan Asam
Total pada Fermentasi Kubis (*Brassica oleraceae*)**

SKRIPSI

**Oleh :
RADHINAL ZIKRI FIRDAUS
155090207111006**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

Pengaruh Penambahan Garam NaCl dan Campuran Mikroorganisme *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae* terhadap Perubahan Kadar Oksalat dan Asam Total pada Fermentasi Kubis (*Brassica oleraceae*)

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana sains dalam bidang Kimia

Oleh :

RADHINAL ZIKRI FIRDAUS
155090207111006



JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Pengaruh Penambahan Garam NaCl dan Campuran Mikroorganisme *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae* terhadap Perubahan Kadar Oksalat dan Asam Total pada Fermentasi Kubis (*Brassica oleraceae*)

oleh :

RADHINAL ZIKRI FIRDAUS
155090207111006

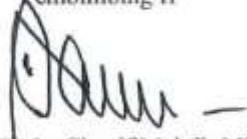
Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal **26 JUN 2019** dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Pembimbing I



Dr. Arie S. Hardyustutie, S.Si., M.Kes
NIP. 197203262002122001

Pembimbing II



Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS
NIP. 195204121980021001



Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya



Masrudi, S.Si., M.Si., Ph.D.
NIP.197310202002121001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Radhinal Zikri Firdaus
NIM : 155090207111006
Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul :

Pengaruh Penambahan Garam NaCl dan Campuran Mikroorganisme *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae* terhadap Perubahan Kadar Oksalat dan Asam Total pada Fermentasi Kubis (*Brassica oleraceae*)

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub diisi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Juni 2019
Yang menyatakan,



(Radhinal Zikri Firdaus)
NIM. 155090207111006

Pengaruh Penambahan Garam NaCl dan Campuran Mikroorganisme *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae* terhadap Perubahan Kadar Oksalat dan Asam Total pada Fermentasi Kubis (*Brassica oleraceae*)

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menurunkan kadar oksalat dan meningkatkan kadar asam total dengan proses fermentasi menggunakan mikroorganisme lokal (MOL), campuran (*A.aceti* dan *S.cerevisiae*) dan penambahan garam. Fermentasi dilakukan dalam sistem terendam dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 hari. Campuran menggunakan perbandingan 1:1 (v/v dalam 100 mL akuades). Tahapan dari penelitian ini meliputi: 1) fermentasi kubis menggunakan MOL dan campuran tanpa penambahan garam, 2) fermentasi kubis menggunakan MOL dan campuran dengan penambahan garam 0%-5% , pengukuran kadar asam total dan oksalat serta analisis data. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa fermentasi campuran (tanpa penambahan garam) mempercepat hidrolisis oksalat yaitu 0,067 mg/100g FW (Hari ke-4) dan kadar asam total tertinggi sebesar 0,41 % (Hari ke-3). Fermentasi MOL menghasilkan kadar oksalat 0,072 mg/100g FW (Hari ke-6) dan kadar asam total tertinggi sebesar 0,53% (Hari ke-7). Kondisi optimum penambahan garam pada fermentasi kubis dengan campuran (*A.aceti* dan *S.cerevisiae*) yaitu kadar oksalat 0,056 mg/100g FW (konsentrasi garam 3 % di hari ke- 4) dan kadar asam total tertinggi sebesar 0,357 % (knsentrasi garam 1 % di hari ke-4). Fermentasi MOL dengan penambahan garam dihasilkan kadar oksalat terendah sebesar 0,039 mg/100g FW (konsentrasi garam 3 % di hari ke-7) dan kadar asam total tertinggi sebesar 0,755 % (konsentrasi garam 1 % di hari ke-7). Berdasar-kan hasil uji statistik *One-Way* dan *Two-Way* ANOVA bahwa waktu fermentasi berpengaruh nyata pada seluruh perlakuan fermentasi dengan $P < 0.05$. Namun, penambahan garam tidak berbeda nyata pada kadar asam total dan kadar oksalat pada kedua perlakuan dengan nilai $P > 0.05$, kecuali kadar asam total fermentasi MOL dengan $P < 0.05$.

Kata kunci : Fermentasi, Mikroorganisme lokal, Acetobacter aceti, Saccharomyces cerevisiae, Kubis

Addition Effect of NaCl Salt and Mixture of *Acetobacter aceti* and *Saccharomyces cerevisiae* Microorganisms on Changing Oxalate and Total Acidity Levels in Fermented Cabbage (*Brassica oleraceae*)

ABSTRACT

This study aims to reduce oxalate levels and increase total acid levels by fermentation using local microorganisms (MOL), mixtures (*A.aceti* and *S.cerevisiae*) and addition of salt. Fermentation is carried out in a submerged system and incubated at room temperature for 10 days. The mixture uses a ratio of 1: 1 (v / v in 100 mL of distilled water). The stages of this study includes: 1) cabbage fermentation using MOL and mixtures without additional salt, 2) fermentation of cabbage using MOL and mixtures with 0% -5% salt addition and data analysis.. The results from this study indicate that mixed fermentation (without salt addition) accelerates oxalate hydrolysis, which is 0.067 mg / 100g FW (Day 4) and the highest total acid level is 0.41% (Day 3). MOL fermentation produces oxalate levels of 0.072 mg / 100g FW (Day 6) and the highest total acid content of 0.53% (Day 7). The optimum condition for adding salt to the cabbage fermentation mixture (*A.aceti* and *S.cerevisiae*) was oxalate content of 0.056 mg / 100 g FW (3% salt concentration on day 4) and the highest total acid content was 0.357% (1% salt concentration in day 4) MOL fermentation with the addition of salt produces the lowest oxalate level of 0.039 mg / 100g FW (3% salt concentration on day 7) and the highest total acid level of 0.755% (1% salt concentration on day 7). Based on the results of the One-Way and Two-Way ANOVA statistical tests, the fermentation time significantly affected all fermentation treatments with $P < 0.05$. However, the addition of salt did not differ significantly from the total acid levels and oxalate levels in the two treatments with a $P > 0.05$, except the total acid MOL fermentation rate with $P < 0.05$

Keywords : Fermentation, Local Microorganism, Acetobacter aceti, Saccharomyces cerevisiae, Cabbage

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah S.W.T berkat rahmat, hidayah, dan karunia-Nya sehingga skripsi yang berjudul **Pengaruh Penambahan Garam NaCl dan Campuran Mikroorganisme *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae* terhadap perubahan kadar oksalat dan Asam total pada Fermentasi Kubis (*Brassica oleraceae*)** dapat tersusun dan terselesaikan dengan baik. Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dan mendukung penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Ucapan terimakasih ditujukan kepada:

1. Ibu Dr. Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes selaku pembimbing I dan Bapak Prof. Chanif Mahdi, MS selaku pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan, saran, dan perhatian yang diberikan selama penyusunan skripsi ini.
2. Bapak Dr. Sasangka Prasetyawan, MS selaku dosen penguji seminar proposal dan kemajuan yang telah memberikan saran.
3. Bapak Masruri, S.Si, M.Si, Ph.D, selaku Ketua Jurusan Kimia dan segenap staf pengajar Jurusan Kimia atas semua bimbingan, bantuan dan ilmu yang telah diberikan.
4. Kedua orang tua penulis serta segenap keluarga besar atas segala dukungan dan doa yang diberikan dalam menyelesaikan skripsi ini.
5. Mbak Alfi dan Mbak Tinok yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian
6. Fidelia Berenice Prayugo yang telah menjadi rekan penelitian
7. Deni Aulia Hadi, Fahmi Firdaus A, Jagho Praisaka I, M. Yanuar, Nicko Rizqienggal yang telah memberi dukungan selama penelitian berlangsung
8. Teman-teman Kimia angkatan 2015 yang telah memberi dukungan doa selama proses penulisan skripsi.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran guna perbaikan dan penyempurnaan sehingga dapat bermanfaat bagi pihak yang membaca.

Malang, Juni 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Kubis.....	4
2.2 Fermentasi.....	6
2.3 Asam Fitat.....	7
2.4 Tanin.....	8
2.5 Asam Oksalat.....	9
2.6 Bakteri Asam Asetat: <i>Acetobacter sp</i>	11
2.7 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
BAB III METODE PENELITIAN	12
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	12
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	12
3.3 Tahapan Penelitian.....	12
3.4 Prosedur Penelitian	13
3.4.1 Preparasi Media Padat untuk Peremajaan <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i>	13
3.4.2 Prosedur Peremajaan Biakan Murni	13
3.4.3 Pembuatan inokulum <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i>	14
3.4.4 Proses fermentasi kubis tanpa penambahan garam pada	

Mikroorganisme lokal dan starter <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i>	14
3.4.5 Proses fermentasi kubis penambahan garam pada Mikro- Organisme lokal dan starter <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i>	15
3.4.6 Penukuran Kadar Oksalat	15
3.4.7 Pengukuran kadar Asam Total	16
3.4.8 Analisis Data.....	17
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	18
4.1 Pengaruh Waktu Fermentasi Terhadap Kadar Asam Total pada Fermentasi Mikroorganisme Lokal.....	18
4.2 Pengaruh Waktu Fermentasi terhadap Kadar Asam Total pada Fermentasi starter <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i>	20
4.3 Pengaruh Waktu Fermentasi terhadap Kadar Oksalat pada Fermentasi Mikroorganisme Lokal dan Fermentasi starter <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i>	22
4.4 Pengaruh Kadar Garam terhadap Asam Total dan Oksalat pada Fermentasi Mikroorganisme Lokal dan Fermentasi Starter <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i>	25
4.5 Pengaruh Kadar Garam terhadap Asam Total dan Oksalat pada Fermentasi Mikroorganisme Lokal dan Fermentasi Starter <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i>	28
BAB V PENUTUP	31
5.1 Kesimpulan	31
5.2 Saran	31
DAFTAR PUSTAKA	32
LAMPIRAN	37

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	: Struktur Asam Fitat	8
Gambar 2.2	: Struktur Asam Oksalat.....	9
Gambar 2.3	: Dissosiasi parsial asam Oksalat dalam air	10
Gambar 2.4	: Reaksi redoks antara kalium permanganate dan Asam oksalat	10
Gambar 4.1	: Pengaruh waktu fermentasi terhadap kadar asam total pada fermentasi dengan menggunakan mikroorganisme lokal	18
Gambar 4.2	: Pengaruh waktu terhadap penurunan kadar asam total pada fermentasi dengan menggunakan starter <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i>	20
Gambar 4.3	: Jalur metabolisme glukosa oleh <i>S.cerevisiae</i>	21
Gambar 4.4	: Pengaruh fermentasi dengan mikroorganisme lokal dan starter <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i> terhadap kadar oksalat	22
Gambar 4.5	: Mekanisme reaksi enzimatik hidrolisis Asam oksalat	24
Gambar 4.6	: Pengaruh garam terhadap kadar asam total dalam fermentasi mikroorganisme lokal pada waktu fermentasi optimum.....	25
Gambar 4.7	: Pengaruh garam terhadap kadar oksalat dalam fermentasi mikroorganisme lokal pada waktu fermentasi optimum.....	26
Gambar 4.8	: Pengaruh garam terhadap kadar asam total dalam fermentasi starter <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i> pada waktu fermentasi optimum	28
Gambar 4.9	: pengaruh garam terhadap kadar oksalat dalam fermentasi starter <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i> pada fermentasi optimum.....	29
Gambar E.1	: Kurva Standar Pertumbuhan <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i>	52

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	: Komposisi Senyawa dalam Kubis per 100g.....	5
Tabel 2.2	: Senyawa Antinutrisi dalam Kubis	6
Tabel D.1	: Hasil Analisis Statistik RAL Asam Total MOL....	44
Tabel D.2	: Hasil Analisis Statistik RAL Oksalat MOL	45
Tabel D.3	: Hasil Analisis Statistik RAL Asam Total Starter <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i>	46
Tabel D.4	: Hasil Analisis Statistik RAL Oksalat Starter <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i>	47
Tabel D.5.1	: Hasil Analisis Statistik RAK Asam Total Mikroorganisme Lokal dengan Waktu	48
Tabel D.5.2	: Hasil Analisis Statistik RAK Asam Total Mikroorganisme Lokal dengan garam.....	48
Tabel D.6.1	: Hasil Analisis Statistik RAK Oksalat Mikroorganisme Lokal dengan waktu.....	49
Tabel D.6.2	: Hasil Analisis Statistik RAK Oksalat Mikroorganisme Lokal dengan garam.....	49
Tabel D.7.1	: Hasil Analisis Statistik RAK Asam Total Starter <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i> dengan waktu	50
Tabel D.7.2	: Hasil Analisis Statistik RAK Asam Total Starter <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i> dengan garam.....	50
Tabel D.8.1	: Hasil Analisis Statistik RAK Oksalat Starter <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i> dengan Waktu	51
Tabel D.8.2	: Hasil Analisis Statistik RAK Oksalat Starter <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i> dengan garam.....	51
Tabel F.1	: Data Penelitian Asam total MOL	53
Tabel F.2	: Data Penelitian Oksalat MOL	53
Tabel F.3	: Data penelitian Asam total campuran <i>A.aceti</i> Dan <i>S.cerevisiae</i>	54
Tabel F.4	: Data penelitian Oksalat campuran <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i>	54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A Diagram Alir Penelitian	37
Lampiran B Diagram Alir Cara Kerja	38
Lampiran B.1 Pembuatan Media Padat <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i>	38
Lampiran B.2 Peremajaan Biakan Murni <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i>	38
Lampiran B.3 Pembuatan Inokulum <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i>	39
Lampiran B.4 Preparasi fermentasi Kubis.....	39
Lampiran B.5 Fermentasi Kubis dengan campuran <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i>	40
Lampiran B.6 Uji Kadar Oksalat.....	40
Lampiran B.7 Uji Kadar Asam Total	41
Lampiran C Perhitungan Pembuatan Larutan	
Lampiran C.1 Preparasi Larutan H ₂ SO ₄ 1 M	42
Lampiran C.2 preparasi Larutan KMnO ₄ 0.05 N	42
Lampiran C.3 Preparasi Larutan NaOH 0.1 M.....	43
Lampiran D Hasil Analisis Statistika	
Lampiran D.1 Rancang Acak Lengkap Asam Total Mikroorganisme Lokal.....	44
Lampiran D.2 Rancang Acak Lengkap Oksalat Mikroorganisme Lokal	45
Lampiran D.3 Rancang Acak Lengkap Asam Total Starter <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i>	46
Lampiran D.4 Rancang Acak Lengkap oksalat Starter <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i>	47

Lampiran D.5 Rancang Acak Kelompok Asam	
Total Mikroorganisme Lokal.....	48
Lampiran D.5.1 Waktu vs Kadar Asam total	48
Lampiran D.5.2 Garam vs Kadar Asam total	48
Lampiran D.6 Rancang Acak Kelompok Oksalat	
Mikroorganisme Lokal.....	49
Lampiran D.6.1 Waktu vs Kadar Oksalat.....	49
Lampiran D.6.2 Garam vs Kadar Oksalat	49
Lampiran D.7 Rancang Acak Kelompok Asam	
Total Starter <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i>	50
Lampiran D.7.1 Waktu vs Kadar Asam Total	50
Lampiran D.7.2 Garam vs Kadar Asam Total.....	50
Lampiran D.8 Rancang Acak Kelompok Oksalat	
Starter <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i>	51
Lampiran D.8.1 Waktu vs Kadar Oksalat.....	51
Lampiran D.8.2 Garam vs Kadar Oksalat	51
Lampiran E Kurva Standar Pertumbuhan <i>A.aceti</i> dan <i>S.cerevisiae</i>	52
Lampiran F Data Hasil penelitian Kadar Asam Total dan Kadar Oksalat.....	53

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia memiliki tanah yang subur dikarenakan kaya akan unsur hara. Selain itu, negara ini terletak di wilayah tropis yang memiliki curah hujan dan intensitas sinar matahari yang cukup tinggi sehingga menyebabkan tumbuhnya berbagai spesies tumbuhan, seperti sayur-sayuran. Hal ini menjadi salah satu penyebab Indonesia menjadi negara agraris yaitu sebagian masyarakat berprofesi sebagai petani. Salah satu jenis sayuran yang banyak ditanami oleh petani di Indonesia adalah kubis.

Salah satu sayuran yang sering tumbuh di wilayah pegunungan, mudah hilang kesegarannya dan biasanya terjual dalam kuantitas yang sedikit adalah kubis (*Brassica oleraceae L. var. capitata L*) [1]. Kubis memiliki banyak khasiat dikarenakan mengandung banyak zat mineral, protein, riboflavin, tiamin dan lain-lain. Namun, zat antinutrisi pada kubis juga cukup tinggi [1]. Salah satu kadar antinutrisi didalam kubis adalah oksalat yang dapat membentuk Kristal kalsium-oksalat sehingga dapat menyebabkan batu ginjal ataupun dapat menghambat penyerapan nutrisi yang masuk ke dalam tubuh. Pada umumnya, kubis yang sudah dibuang atau yang sudah layu akan mengalami proses fermentasi alami menghasilkan zat asam seperti asam asetat. Fermentasi merupakan proses katabolisme senyawa kimia sehingga menghasilkan energi. Fermentasi dibagi menjadi dua yaitu fermentasi mikroorganisme lokal (MOL) dan campuran mikroorganisme. Fermentasi MOL melibatkan bakteri *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, dan *Lactobacillus brevis* yang akan tumbuh dan berkembang apabila kubis mengalami pembusukkan dan kerusakan selama beberapa hari dengan menghasilkan zat asam melalui proses fermentasi. Fermentasi campuran mikroorganisme melibatkan penambahan mikroorganisme yang telah melalui proses peremajaan dilaboratorium [1].

Beberapa penelitian menjelaskan bahwa penambahan variasi garam NaCl yang tepat seperti 2%, 2,5% dan 3% pada fermentasi spontan kubis memberikan pengaruh pada peningkatan serat. Namun, terjadi penurunan pada kadar vitamin C dan asam total. Selain itu, dalam penelitian tersebut tidak memberikan pengaruh yang signifikan

terhadap kadar karbohidrat, protein dan lemak sedangkan pertumbuhan bakteri yang cenderung konstan [2]. Adapun penelitian yang dilakukan pada optimasi dua varietas kubis secara fermentasi spontan menjelaskan bahwa pemberian variasi kadar garam 1%, 1,5% dan 2% yang berbeda menghasilkan kadar asam total yang sangat rendah pada salah satu varietas[3].

Acetobacter aceti merupakan bakteri aerob penghasil asam cuka yang baik pada pH optimum yaitu pada pH 5-6. Salah satu literatur menyebutkan bahwa bakteri tersebut memiliki enzim oksalat-CoA transferase yang dapat mendegradasi oksalat menjadi asam asetat[4]. *S.cerevisiae* merupakan mikroorganisme untuk fermentasi alkohol, Namun, penelitian terbaru menyebutkan bahwa *S.cerevisiae* ini memiliki enzim oksalil-CoA sintase yang dapat mendegradasi oksalat menjadi karbon dioksida[5].

Berdasarkan beberapa penelitian tersebut, sampai saat ini belum ada penelitian membandingkan fermentasi kubis terendam (*submerged*) dengan perlakuan tanpa pemberian garam NaCl, pemberian variasi konsentrasi garam NaCl dan penambahan *starter* mikroorganisme dalam menjelaskan perubahan kadar oksalat dan asam total selama 10 hari. Oleh karena itu, kajian dari penelitian ini yaitu pengaruh penambahan garam dan tanpa garam terhadap kadar oksalat dan asam total pada fermentasi kubis dalam sistem terendam. Fermentasi kubis dengan penambahan garam yang tepat dengan mikroorganisme lokal maupun inokulum campuran *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae* diharapkan dapat menurunkan kadar oksalat serta menghasilkan asam total.

1.2 PERUMUSAN MASALAH

Perumusan masalah dalam penelitian ini meliputi:

1. Bagaimana pengaruh proses fermentasi kubis dengan mikroorganisme lokal dan starter campuran *S. cereviceae* dan *A. aceti* terhadap kadar oksalat dan asam total ?
2. Bagaimana pengaruh penambahan garam dapur (NaCl) 1%-5% terhadap kadar oksalat dan asam total pada fermentasi kubis dengan mikroorganisme lokal ?
3. Bagaimana pengaruh penambahan garam dapur (NaCl) 1%-5% terhadap kadar oksalat dan asam total pada fermentasi

kubis dengan inokulum campuran *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae* ?

1.3 BATASAN MASALAH

Batasan masalah dalam penelitian ini meliputi :

1. Kubis yang digunakan adalah kubis putih (*Brassica oleraceae* L. var. *capitata* L)
2. Starter yang digunakan adalah *A.aceti* dan *S.cerevisiae* dengan perbandingan (1:1) dengan volume inokulum campuran 15 % (v/v dalam 100 mL akuades)
3. Fermentasi dilakukan selama 10 hari dengan analisis kadar oksalat dan asam total tiap hari.
4. Temperatur selama proses fermentasi adalah temperatur ruang dan konstan.
5. pH media inokulum yang digunakan adalah 4

1.4 TUJUAN PENELITIAN

Tujuan dalam penelitian ini meliputi:

1. Mengetahui pengaruh proses fermentasi kubis dengan mikroorganisme lokal dan starter campuran terhadap kadar oksalat dan asam total
2. Mengetahui pengaruh penambahan garam dapur (NaCl) 0%-5% terhadap kadar oksalat dan asam total pada fermentasi kubis dengan mikroorganisme lokal
3. Mengetahui pengaruh penambahan garam dapur (NaCl) 0%-5% terhadap kadar oksalat dan asam total pada fermentasi kubis dengan inokulum campuran *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae*

1.5 MANFAAT PENELITIAN

Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat menjelaskan pengaruh proses fermentasi terhadap penurunan kadar fitat oksalat dan dapat meningkatkan nilai gizi kubis. Dari penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan dalam menjelaskan pengaruh penambahan garam NaCl pada fermentasi dengan mikroorganisme lokal dan starter campuran terhadap penurunan kadar oksalat dan peningkatan kadar asam total hasil fermentasi kubis, sebagai informasi tambahan bagi masyarakat yang ingin membuat *sauerkraut* dengan kondisi terbaik.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kubis

Nama Lokal	: Kubis
Kingdom	: Plantae
Orde	: <i>Brassicales</i>
Famili	: <i>Brassicaceae</i>
Genus	: <i>Brassica</i>
Spesies	: <i>Brassica oleraceae L</i>
Variasi	: <i>Brassica oleraceae L. var. capitata L</i> [6]

Kubis (dikenal sejak 2000-2500 SM) merupakan sayuran berbatang lunak yang termasuk kedalam famili *Brassicaceae* dan sangat dijunjung tinggi oleh bangsa Yunani kuno. Kubis sebagai sumber vitamin, protein, lemak rendah dan karbohidrat merupakan tanaman yang sangat bermanfaat bagi kesehatan tubuh walaupun sayuran ini mudah kehilangan kesegarannya [7].

Tanaman kubis ini merupakan sayuran dikotil yang tumbuh setiap satu tahun atau dua tahun. Bentuk kecambah tanaman ini sulit dibedakan. Namun, dapat dibedakan ketika sudah tumbuh besar. Kepala Kubis ini dideskripsikan sebagai tanaman tunas tunggal, berupa sekumpulan daun yang saling bertumpuk, memiliki ketinggian 40-60 cm dan batang tidak bercabang. Daun tumbuh secara memanjang dan telentang merupakan ciri pertama pertumbuhan kubis. Pertumbuhan daun berikutnya dilihat dari pertumbuhan fisik daun yaitu daun lebih pendek, lebar dan tegak serta mulai menumpuk daun yang lebih muda sehingga menyebabkan kepala kubis menjadi lebih keras (padat). Semakin padat kepala kubis tersebut, akan semakin matang dan kepala kubis akan pecah. Disaat yang bersamaan, batang kubis mengalami perpanjangan secara perlahan [8]. Menurut literature, kubis dapat digunakan sebagai obat antiinflamasi. Hal ini disebabkan kubis mengandung senyawa isotiosianat. Dalam mencegah inflamasi berkelanjutan, senyawa isotiosianat dapat menghambat laju inflamasi, menahan aktivitas enzim dan dapat mencegah perpindahan inhibitor [9]. Komposisi senyawa dan kandungan antinutrisi dalam kubis dapat dilihat dalam **Tabel 2.1** dan **Tabel 2.2**.

Tabel 2.1 Komposisi senyawa dalam kubis per 100 g [10]

Karbohidrat	5.8 g
- Gula	3.2 g
- Serat	2.5 g
Lemak	0.1 g
Protein	1.28 g
Tiamin (Vit.B1) 0.061 g	5%
Riboflavin (Vit.B2) 0.042 g	3%
Niacin (Vit.B3) 0.234g	2%
Asam Pantotenik(B5) 0.212 g	4%
Vitamin B6 0.124 g	10%
Folat (Vit.B9) 53 µg	13%
Vitamin C 36.6 mg	61%
Kalsium 40 mg	4%
Besi 0.47 mg	4%
Magnesium 12 mg	3%
Fosfor 26 mg	4%
Kalium 170 mg	4%
Seng 0.18 mg	2%

Tabel 2.2 Senyawa Antinutrisi dalam kubis [11]

Parameter	Composisi (mg/100g)
Tanin	2.84 ± 0.60
Fitat	22.00 ± 0.81
Sianida	15.74 ± 2.03
Oksalat	19.67 ± 0.88

2.2 Fermentasi

Fermentasi merupakan reaksi yang menggunakan senyawa pendonor dan akseptor elektron dalam menjalankan reaksi reduksi oksidasi (redoks) untuk menghasilkan energi [12]. Berdasarkan asal-muasal mikroorganismenya yang digunakan dalam fermentasi, fermentasi pangan dikelompokkan menjadi dua kelompok diantaranya fermentasi secara spontan dan fermentasi secara nonsponatan. Fermentasi mikroorganismenya lokal merupakan proses fermentasi pangan tanpa penambahan *starter* mikroorganismenya, makanan akan diubah menjadi produk yang sesuai secara aktif melalui proses fermentasi oleh mikroorganismenya lain. Mikroorganismenya yang aktif dalam fermentasi spontan ini pada umumnya memiliki jumlah dan variasi jenis yang beraneka-ragam. Adanya variasi mikroorganismenya yang beragam dan banyak menyebabkan hasil akhir yang didapat berbeda-beda dan mutu yang didapat tidak dapat diprediksikan [13].

Fermentasi campuran mikroorganismenya merupakan proses fermentasi makanan dengan penambahan mikroorganismenya *starter* yang akan tumbuh, berkembang dan aktif dalam mengubah makanan menjadi produk fermentasi yang sesuai [14]. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi jalannya proses fermentasi yaitu [15]:

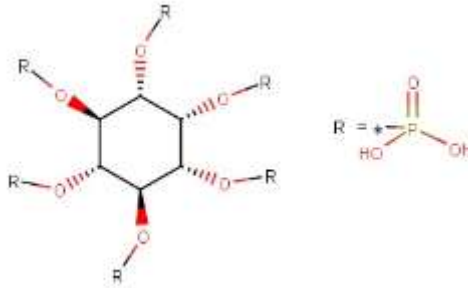
1. Asam

Dalam fermentasi makanan, zat asam berperan memberikan keawetan dan menyebabkan mikroba lipolitik dan proteolitik berkembang. Ketika fermentasi makanan berlangsung, keawetan asam akan menurun. Tingkat keasaman yang tinggi menyebabkan mikroba tertentu mati. Setelah hal tersebut terjadi, kapang yang lebih toleran terhadap asam akan tumbuh.

2. Alkohol
Jumlah gula dalam fermentasi mempengaruhi kadar alkohol hasil fermentasi.
3. Mikroba
Penambahan mikroba sering dilakukan pada saat fermentasi anggur, tempe, oncom. Penambahan mikroba ini berfungsi untuk menghasilkan produk fermentasi yang diinginkan
4. Suhu
Keadaan mikroba yang paling banyak sangat ditentukan oleh temperatur fermentasi
5. Oksigen
Pertumbuhan mikroba dapat diatur dengan pengaturan kadar oksigen yang sesuai selama proses fermentasi
6. Garam
Ketahanan mikroorganisme dalam garam dapat membedakan jenis mikroorganisme yang digunakan. Mikroorganisme *Halofilik obligat* dapat hidup dalam konsentrasi garam yang tinggi, sedangkan mikroorganisme *halofilik fakultatif* dapat hidup didalam garam dengan konsentrasi tinggi dan rendah [16].

2.3 Asam Fitat

Asam fitat memiliki nama kimia *myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate* dengan rumus kimia $C_6H_{18}O_{24}P_6$. Fosfor yang terdapat dalam asam fitat memiliki muatan yang tinggi . Hal ini dapat menyebabkan kation divalen, protein dan karbohidrat dapat diikat oleh asam fitat. *Phytate* merupakan garam dari asam fitat [17, 18]. Dalam senyawa asam fitat, lima gugus fosfat berikatan secara ekuator dan satu gugus fosfat berikatan secara aksial [19]. Pada pH rendah maupun tinggi, fitat dapat berikatan dengan protein membentuk kompleks *chelate* yang mengakibatkan perubahan struktur dari protein tersebut. Hal ini dapat mengakibatkan penurunan aktivitas enzim, kelarutan enzim dan tingkat pencernaan proteolitik [20]. Salah satu enzim yang mengalami penurunan aktivitasnya akibat asam fitat adalah enzim tripsin. Hal ini diakibatkan oleh asam fitat yang mengikat kofaktor enzim tersebut dan membentuk kompleks *chelate* [16] .



Gambar 2.1 Struktur asam fitat [21]

Asam fitat pada umumnya terkandung dalam tanaman biji seperti legume dan *oilseed plant*. Pada tanaman biji tersebut mengandung mineral-mineral yang berkhasiat untuk pertumbuhan tubuh dan menjaga kinerja tubuh. Namun, dikarenakan kadar asam fitat dalam tanaman biji tersebut cukup tinggi, nilai gizi biji-bijian tersebut menurun sehingga akan mengurangi jumlah mineral yang akan diserap tubuh [22]. Disisi lain, asam fitat memiliki beberapa manfaat, salah satunya mencegah terjadinya diabetes mellitus. Hal ini dikarenakan asam fitat dapat mengikat senyawa-senyawa karbohidrat [22].

2.4 Tanin

Pengelompokkan klasik Tanin dikelompokkan menjadi dua kelompok berdasar-kan struktur dan karakteristiknya. Tanin terfraksinasi merupakan tannin yang mudah dihidrolisis menggunakan enzim tanase atau air panas. Tanin ini disebut sebagai '*hydrosible tannins*' dan yang termasuk tannin ini adalah galotanin dan elagitanin. Adapun '*non-hydrosible*' tannin yang artinya tidak mudah untuk dilakukan proses hidrolisis pada senyawa ini contohnya oligmerik dan polimerik proantosianidin. Namun disisi lain, terdapat beberapa senyawa klasifikasi galotanin yang tidak dapat dihidrolisis dengan mudah. Hal ini dikarenakan ikatan C-C kopling yang lebih panjang antara residu polifenolik dan unit poliol [23]. Seiring berjalannya waktu, tannin dibagi lagi menjadi empat kelompok yaitu galotanin, kompleks tannin, elagitanin *condensed tannin* [24].

Gallotannin terdiri atas unit galliol yang saling terikat sehingga menghasilkan polimer galliol. Polimer gliol merupakan senyawa turunan dari glukosa. Gugus hidroksil pada galliol dapat terdistribusi menyeluruh atau sebagian.[23, 25, 26].

Ellagitannin memiliki subkelompok yang bernama *hexahydroxydiphenoy* (HHDP) yang dapat menjelaskan karakteristik unit dari seluruh galotanin. Pemanjangan senyawa HHDP yang dikarenakan oleh penambahan gugus galliol melalui C-C atau C-O dapat menambah variasi subkelompok HHDP tersebut.

Complex Tannin merupakan bentuk lain dari tannin yang memiliki struktur yang lebih kompleks dan khas dibanding tannin lainnya. Kompleks tannin dapat bersumber dari kulit kayu pohon kastanya (*Castanea crenata*) [24].

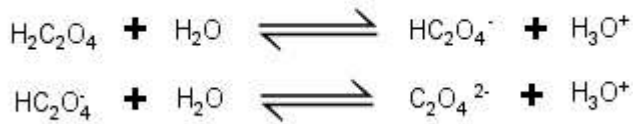
2.5 Asam Oksalat

Didalam tubuh manusia, oksalat merupakan produk samping liver dari proses metabolisme askorbat, glioksilat dan glisin. Produk hasil pemecahan utama dari beberapa asam amino adalah glioksilat yang kemudian dioksidasi menjadi oksalat oleh tiga enzim. Penelitian sebelumnya juga mengungkapkan bahwa sekitar 33% sampai 50 % oksalat bersumber dari pemecahan senyawa asam askorbat, glisin dan hanya 6% sampai 33% oksalat berasal dari metabolisme makanan yang dikonsumsi. Absorpsi oksalat dari makanan telah dibuktikan dengan kadar oksalat yang terdapat dalam urin. Hal ini sangat mungkin terjadi pada orang dengan risiko tinggi terkena batu ginjal. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi daya serap oksalat dalam tubuh yaitu jumlah oksalat yang mengikat ion kalsium dan magnesium, waktu penyerapan makanan oleh usus halus dan pengaruh genetik [27].



Gambar 2.2 Struktur Asam Oksalat

Asam Oksalat merupakan asam lemah yang larut sebagian dalam air dengan persamaan berikut [45]:



Gambar 2.3 Dissosiasi parsial asam oksalat dalam air

Salah satu cara menentukan kadar oksalat yaitu dengan cara titrasi permanganometri. Titrasi permanganometri melibatkan reaksi reduksi dan oksidasi. Kalium permanganate akan menjadi oksidator sedangkan asam oksalat sebagai reduktor. Reaksi redok antara kalium permanganate dengan asam oksalat sebagai berikut [45] :



Gambar 2.4 Reaksi Redoks antara Kalium permanganat dengan asam oksalat

Kadar asam oksalat dapat dihitung dengan persamaan berikut [46]:

$$[\text{Oksalat}] \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) = \frac{V \text{ KMnO}_4 \times \text{BE Ekivalen} \times f. p \times 100}{\text{Massa Sampel (mg)}}$$

Keterangan :

V KMnO₄ = Volume titrasi KMnO₄

BE Ekivalen = massa oksalat anhidrat yang beraksi dengan 1 mL KMnO₄ 0.01N; 0.45 mg

Fp = Faktor pengenceran (10)

2.6 Bakteri Asam Asetat: *Acetobacter sp*

Bakteri asam asetat dikategorikan sebagai bakteri gram negatif yang dapat dilihat menggunakan mikroskop yang memiliki ukuran panjang 0.8 mikrometer sampai 4.5 mikro mikrometer dan lebar 0.4 mikrometer sampai 1 mikrometer, memiliki pH optimum pada 5-6.5 tahan pada pH 3-4 [28]. Spesies dari *Acetobacter* dan *Gluconacetobacter* merupakan dua dari enam genus bakteri asam asetat yang tahan terhadap kadar asam asetat yang tinggi. Hal ini menjadi alasan bakteri-baketri tersebut digunakan dalam pembuatan cuka[29].

Disisi lain, *acetat overoxidation* dapat terjadi dikarenakan bakteri-bakteri tersebut dapat mengoksidasi asam asetat lebih lanjut (menghasilkan CO₂ dan H₂O) selain dari kemampuannya dapat mengoksidasi etanol menjadi asam asetat. Bakteri tersebut mengalami tiga fase pertumbuhan fase pertumbuhan yaitu fase pertumbuhan sempurna, fase berhenti tumbuh untuk sementara dan kemudian akan tumbuh lagi ketika seluruh asam asetat terakumulasi dari etanol [30–32]. Fenomena *acetate overoxidation* terjadi karena aktivitas enzim asetil-koenzim A sintase dan siklus enzim asam trikarboksilat [33].

2.7 *Saccharomyces cerevisiae*

Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) telah digunakan sejak zaman dulu untuk pembuatan roti, bir dan *wine* oleh penduduk Mesir, Yunani, Romawi dan Yahudi. [34] . *S.cerevisiae* merupakan mikroorganisme yan sering digunakan untuk penelitian dalm dunia industry. Mikroorganisme ini dapat memecah glukosa menjadi etanol dan sedikit asam asetat melalui jalur metabolisme glikolitik. Adanya etanol dan asam asetat hasil metabolisme glukosa dikarenakan mikroorganisme ini memiliki enzim etanol dehydrogenase dan aldehyd dehydrogenase. *Disisi* lain, menurut sebuah penelitian, *Saccharomyces cerevisiae* dapat mendegradasi salah satu antinutrisi yaitu oksalat. Hal ini disebabkan karena terdapat gen AAE3 yang mengkode pembentukan enzim oksalil-CoA sintase. Enzim tersebut dapat mendegradasi oksalat menjadi karbondioksida pada pH 7,5 sebagai pH optimumnya [35].

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Penelitian ini dilaksanakan dari tanggal 26 februari hingga 23 April 2019.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah gelas kimia, corong gelas, pengaduk gelas, spatula, tabung reaksi, pipet ukur, botol wadah gelas, *Erlenmeyer*, neraca analitik, botol akuades, pisau, *oven*, aluminium foil, kasa steril, buret, statif, *clamp*, labu takar, pemanas air, thermometer, mortar, seperangkat alat sentrifugasi, *laminar flow*, dan *magnetic stirrer*.

Bahan-bahan yang akan digunakan selama penelitian adalah kubis (*Brassica oleraceae L. var. capitata*), garam dapur NaCl, Natrium hidroksida (NaOH), Asam Asetat Glasial, akuades, *Potatoes Dextrose Agar* (PDA), *Nutrient Agar* (NA), asam sulfat 1 M, dan Kalium Permanganat 0.05 N. Mikroorganisme (*Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae*) yang digunakan diperoleh dari Fakultas Teknik Pertanian Universitas Brawijaya.

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan, antara lain :

1. Preparasi media padat untuk mikroorganisme
2. Proses peremajaan biakan murni *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae*
3. Pembuatan inokulum *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae*
4. Proses fermentasi kubis tanpa penambahan garam pada mikroorganisme lokal dan campuran *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae*
5. Proses fermentasi kubis dengan penambahan garam pada mikroorganisme lokal dan campuran *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae*
6. Pengukuran kadar oksalat

7. Pengukuran kadar asam total
8. Analisis data

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Preparasi Media Padat untuk Peremajaan *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae*

Terdapat dua media padat yang dibuat untuk peremajaan mikroorganisme tersebut yaitu media padat *Potatoes Dextrose Agar* (PDA) sebagai media peremajaan kultur *Saccharomyces cerevisiae* dan *Nutrient Agar* (NA) sebagai media peremajaan kultur *Acetobacter aceti*. Media padat PDA dan NA dibuat dengan menimbang massanya masing-masing sebesar 1.75 g dan 1 g dan dimasukkan ke wadah yang berbeda. Kemudian masing-masing ditambahkan 50 mL dalam gelas kimia. Larutan dihomogenkan dan dipanaskan hingga mendidih.

Selanjutnya, sebanyak 4 mL dari masing-masing larutan PDA dan NA dipindahkan ke dalam tabung kimia, ditutup dengan kapas steril dan kertas cokelat. Proses sterilisasi dilakukan dengan memasukkan tabung reaksi berisi larutan PDA kedalam *autoclave* dengan temperature 121 °C selama 15 menit pada tekanan 15 Psi dan setelah itu dibiarkan pada temperatur kamar dengan kemiringan tertentu sehingga diperoleh PDA dan NA steril.

3.4.2 Prosedur Peremajaan Biakan Murni

Peremajaan biakan murni *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae* dilakukan melalui prosedur yang sama yaitu secara aseptis didalam *laminar flow*. Api bunsen terlebih dahulu dilalui oleh tabung biakan murni masing-masing *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae*, jarum ose serta media padat dalam tabung. Dengan cara aseptis, masing-masing jarum ose digoreskan pada biakan murni dari tabung, kemudian jarum ose tersebut digoreskan ke media padat dari dua spora biakan murni, ditutup dengan kapas steril dan kertas cokelat. Berikutnya, biakan murni tersebut diinkubasi selama 3 hari pada temperature 30 °C.

3.4.3 Pembuatan inokulum *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae*

Pembuatan inokulum *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae* diawali dengan pembuatan media cair untuk masing-

masing mikroorganismenya. *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae* ditumbuhkan dalam media cair GYP (*Glucose Yeast Pepton*). Komposisi media cair GYP yaitu glukosa 10 g, 1,25 g ekstrak ragi, 1,25 g pepton untuk *Saccharomyces cerevisiae*. Pembuatan media cair untuk *Acetobacter aceti* dilakukan dengan menimbang 5 g glukosa, 2,5 g ekstrak ragi dan 5 g pepton. Semua bahan ditimbang menggunakan neraca analitik, diencerkan dengan akuades 250 mL dalam *Erlenmeyer* 250 mL. *Erlenmeyer* dihomogenkan, dilakukan pengaturan pH media cair menjadi pH 4 dengan menambah asam asetat glasial. Pengukuran pH menggunakan pH meter. Kemudian ditutup dengan kapas steril dan kertas coklat. Sterilisasi media cair dilakukan dalam *Autoclave* pada temperature 121 °C, 15 Psi selama 15 menit.

Setelah media cair GYP (*Glucose Yeast Pepton*) dibuat untuk pertumbuhan *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae*, dilakukan pembuatan inoculum (biakan aktif) untuk kedua mikroba tersebut secara aseptis. Spora biakan murni *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae* yang berusia 48 jam diambil sebanyak 5 ose dan dicelupkan ke dalam media cair. Setelah itu, pada temperature kamar, kedua biakan murni disuspensikan selama 17 jam.

3.4.4 Proses fermentasi kubis tanpa penambahan garam pada mikroorganismenya lokal dan campuran *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae*

Pembuatan fermentasi kubis mengacu pada salah satu penelitian fermentasi kubis dengan sedikit modifikasi [2]. Pada penelitian ini, fermentasi kubis dilakukan menggunakan mikroorganismenya lokal dan campuran *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae* dalam sistem terendam selama 10 hari serta suhu ruang. Kubis segar diiris daunnya, dicuci dengan air mengalir dan dibiarkan selama 2 jam. Pada fermentasi spontan, irisan kubis tersebut ditimbang hingga 100g. Kemudian, irisan kubis dimasukkan ke dalam botol selai steril hingga menyisakan sedikit bagian leher botol. Setelah itu, untuk fermentasi dengan mikroorganismenya lokal ditambahkan akuades steril sebanyak 100 mL serta ditutup rapat dan diinkubasi selama 10 hari pada suhu ruang. Pada fermentasi dengan dan campuran, ditambahkan inkulum campuran *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae* sebanyak 15 % (v/v dalam 100 mL akuades steril), ditutup hingga rapat dan

dikocok hingga homogen. Kemudian, diinkubasi selama 10 hari pada suhu ruang. Pengukuran kadar oksalat dan asam total dari hasil fermentasi dilakukan setiap hari pada biomassa (oksalat) dan filtrat (asam total).

3.4.5 Proses fermentasi kubis dengan penambahan garam pada mikroorganisme lokal dan campuran *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae*

Pada penelitian ini, fermentasi kubis dengan penambahan garam dilakukan menggunakan mikroorganisme lokal dan campuran *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae* dalam sistim terendam selama 10 hari serta suhu ruang. Kubis segar diiris daunnya, dicuci dengan air mengalir dan dibiarkan selama 2 jam. Pada fermentasi spontan, irisan kubis tersebut ditimbang hingga 100g. Kemudian, irisan kubis dimasukkan kedalam botol selai steril hingga menyisakan sedikit bagian leher botol. Setelah itu, untuk fermentasi dengan mikroorganisme lokal ditambahkan garam dengan variasi konsentrasi 1%, 2%, 3%, 4% dan 5% (b/b dalam 100 gram kubis) dan akuades steril sebanyak 100 mL serta ditutup rapat dan diinkubasi selama 10 hari pada suhu ruang. Pada fermentasi dengan dan campuran, ditambahkan garam dengan variasi konsentrasi 1%, 2%, 3%, 4% dan 5% (b/b dalam 100 gram kubis), inokulum campuran *Acetobacter aceti* dan *Saccharomyces cerevisiae* sebanyak 15 % (v/v dalam 100 mL akuades steril), ditutup hingga rapat dan dikocok hingga homogen. Kemudian, diinkubasi selama 10 hari pada suhu ruang. Pengukuran kadar oksalat dan asam total dari hasil fermentasi dilakukan setiap hari pada biomassa (oksalat) dan filtrat (asam total).

3.4.6 Pengukuran kadar oksalat

Pengukuran kadar oksalat dalam biomassa hasil fermentasi menggunakan metode titrasi permanganometri yang mengacu pada dewi, dkk [36]. Kubis hasil fermentasi diambil sebanyak 10 g dengan neraca analitik. Selanjutnya, dihaluskan dengan blender, ditambahkan dengan 50 mL akuades, dan dipanaskan selama selama 15 menit sambil diaduk menggunakan stirer. Kemudian, disaring dan filtrat yang dihasilkan dilakukan sentrifugasi agar didapat supernatant. Supernatan dipipet sebanyak 5 mL dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL. Stelah itu, ditambahkan 5 mL asam sulfat 1M,

diaduk hingga homogen dan dititrasi. Titrasi kubis fermentasi secara permanganometri menggunakan KMnO_4 0,05 N dilakukan sampai terbentuk warna merah muda yang bertahan selama 30 detik. Kemudian, volume titrasi dicatat dan digunakan untuk menghitung kadar oksalat. Rumus perhitungan kadar oksalat sebagai berikut [46]:

$$[\text{Oksalat}] \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) = \frac{V \text{ KMnO}_4 \times \text{BE Ekivalen} \times f. p \times 100}{\text{Massa Sampel (mg)}}$$

Keterangan :

$V \text{ KMnO}_4$ = Volume titrasi KMnO_4

BE Ekivalen = massa oksalat anhidrat yang beraksi dengan 1 mL KMnO_4 0.01N; 0.45 mg

Fp = Faktor pengenceran (10)

3.4.7 Pengukuran kadar asam total

Pengukuran kadar asam total dalam filtrat hasil fermentasi menggunakan metode titrasi asam basa mengacu pada Wulandari [47]. Supernatan dipipet sebanyak 10 mL dan diencerkan dalam labu takar 100 mL dengan penambahan akudes hingga tanda batas. Setelah itu, dipipet larutan sebanyak 10 mL dan dimasukkan kedalam erlenmeyer 250 mL, ditambahkan satu tetes indikator PP (*phenolphthalein*) 1% dan dititrasi dengan larutan NaOH 0.1 M hingga mencapai titik ekivalen yaitu terjadi perubahan warna larutan tertitrasi menjadi merah muda. Setelah itu, dicatat volume titrasi dan dilakukan perhitungan kadar asam total dalam % asetat sebagai berikut :

$$[\text{Asam Total}] (\%) = \frac{V \text{ NaOH} \times \text{Molar NaOH} \times f_p \times \text{Mr As. Asetat}}{\text{Volume sampel (mL)} \times 1000}$$

Keterangan :

Volum NaOH = Volume tirasi yang digunakan

Molar NaOH = 0.0883 Molar

Fp = Faktor pengenceran (10)

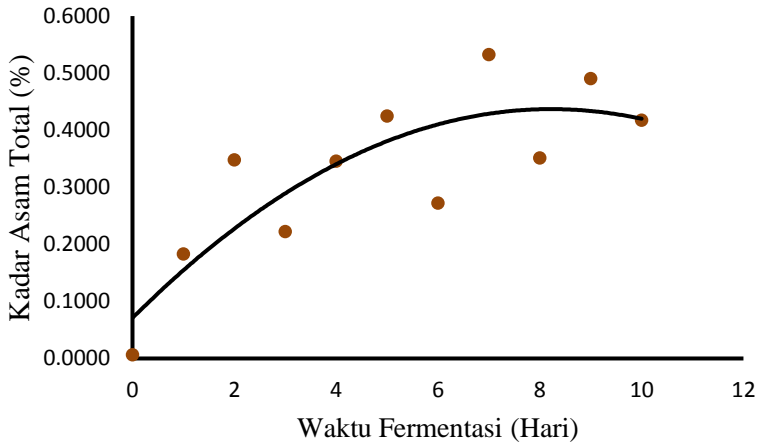
Mr As.asetat = 60 g/mol

3.4.8 Analisis data

Analisis data dilakukan dengan metode analisis variasi (ANOVA) Rancang Acak lengkap (RAL), Rancang Acak Kelompok dengan tingkat kepercayaan sebesar 95% dan dilanjutkan dengan uji Duncan.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Waktu Fermentasi terhadap Kadar Asam total pada Fermentasi Mikroorganisme Lokal (MOL)



Gambar 4.1 Pengaruh waktu fermentasi terhadap kadar asam total pada fermentasi dengan menggunakan mikroorganisme lokal

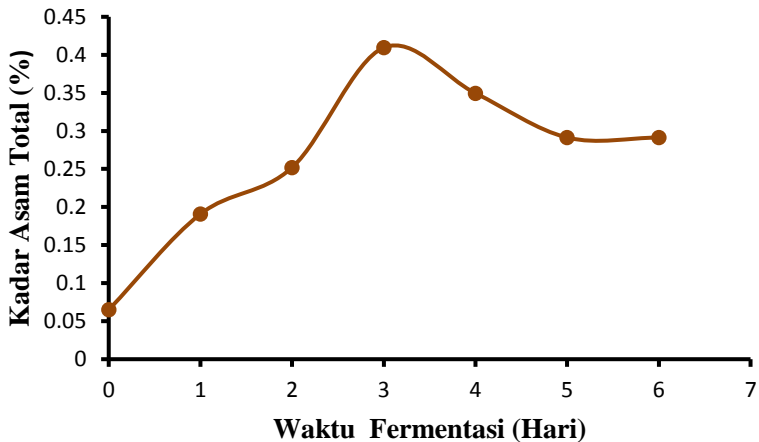
Pada penelitian ini dilakukan fermentasi terendam (penambahan akuades 100 mL) dengan menggunakan mikroorganisme lokal selama 10 hari untuk mengetahui pengaruh waktu fermentasi terhadap kadar asam total. Berdasarkan **Gambar 4.1**, pengaruh waktu fermentasi dengan menggunakan mikroorganisme lokal meningkatkan kadar asam total dalam filtrat. Peningkatan kadar asam total cenderung meningkat. Berdasarkan data tersebut, fermentasi hari 1-7 cenderung meningkat signifikan dan pada hari 8-10 cenderung konstan. Hal tersebut dibuktikan dari hasil uji *One Way ANOVA*, waktu fermentasi berpengaruh nyata terhadap peningkatan kadar asam total dengan nilai $P < 0.05$. Setelah dilakukan uji lanjutan Duncan (Lampiran D.1), didapat bahwa kadar asam total yang paling optimum terjadi pada hari ke-7. Pada waktu fermentasi hari ke 8-10, kadar asam total yang

dihasilkan tidak berbeda nyata sehingga dimungkinkan waktu terbaik untuk menghasilkan asam total adalah selama 7 hari.

Proses fermentasi terjadi dengan adanya berbagai jenis mikroorganisme yang berasal dari biomassa kubis. Mikroorganisme lokal yang terlibat dalam fermentasi berasal dari berbagai jenis bakteri seperti *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroide* dan lain-lain [38]. Aktivitas dari beberapa bakteri lokal yang terlibat dalam fermentasi dapat menghasilkan berbagai jenis senyawa asam organik. Asam organik yang umumnya terbentuk yaitu asam laktat. Asam-asam organik dihasilkan dari produk metabolisme bakteri dengan menggunakan sumber karbon yaitu glukosa. Pada penelitian ini, sumber glukosa dihasilkan dari pelepasan hidrolisis glukosinolat dan bahan baku kubis itu sendiri. Hidrolisis glukosinolat oleh *mirosinase* menghasilkan produk senyawa seperti isothiosianat, thiosianat, nitril dan melepaskan glukosa. *miyrosinase* merupakan enzim intraselluler yang akan aktif apabila terjadi pemecahan dinding sel jaringan. Pemecahan dinding sel ini dapat dilakukan dengan cara pemotongan. Pembentukan beberapa senyawa asam organik yang dihasilkan diperkuat oleh penelitian yang menjelaskan bahwa proses fermentasi dengan menggunakan mikroorganisme lokal kubis menghasilkan beberapa senyawa asam organik yaitu asam format, asam malat, asam suksinat, asam asetat dan sebagainya [39].

Peningkatan asam total yang cenderung fluktuatif ini dimungkinkan karena penggunaan mikroorganisme lokal akan menyebabkan persaingan yang cukup besar antar bakteri untuk mendapatkan nutrisi. Selain itu, senyawa organik yang dihasilkan dari aktivitas bakteri dapat menghambat aktivitas bakteri lain sehingga laju reaksi dari metabolisme bakteri tersebut menurun. Kemudian, kadar oksalat yang cenderung konstan setelah hari ke 7 dimungkinkan karena zat nutrisi dalam biomassa kubis telah habis terlebih dahulu sehingga menyebabkan penurunan kadar asam.

4.2 Pengaruh Waktu Fermentasi terhadap Kadar Asam Total pada Fermentasi Campuran *A.aceti* dan *S.serevisiae*

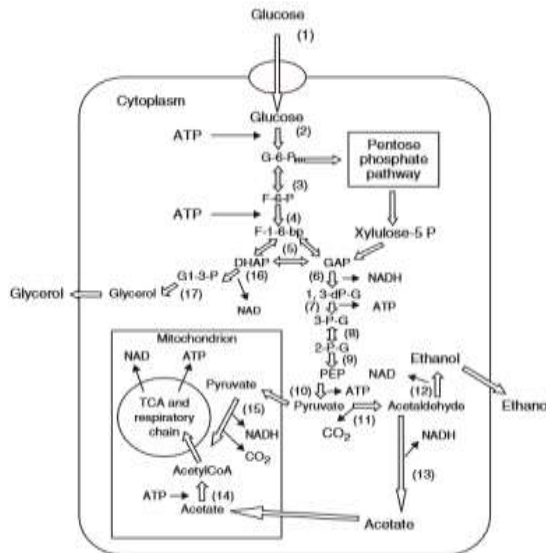


Gambar 4.2 Pengaruh waktu terhadap penurunan kadar asam total pada fermentasi dengan menggunakan starter campuran *A.aceti* dan *S.cerevisiae*

Pada **Gambar 4.2** menunjukkan pengaruh waktu fermentasi pada fermentasi stater meningkatkan kadar asam total. Kadar asam total meningkat hingga hari ke-3 dan menurun hingga hari ke-6. Peningkatan kadar asam total dimungkinkan karena pada hari ke-1 hingga ke-3 kedua mikroorganismenya tersebut memasuki fase logaritma dan fase stasioner. Berdasarkan uji *One Way* ANOVA, waktu fermentasi berpengaruh nyata terhadap kenaikan kadar asam total. Setelah dilakukan uji lanjutan Duncan dengan $P < 0.05$ (Lampiran D.3), pada hari ke-4 dan 6 tidak berbeda nyata terhadap kadar asam total. Oleh karena itu, kondisi optimum untuk waktu fermentasi terhadap kadar asam total yaitu hari ke-3 dikarenakan kadar asam total yang dihasilkan tinggi sebesar 0.41%.

Penurunan kadar asam total dimungkinkan karena kedua mikroba tersebut telah memasuki fase kematian. Laju pertumbuhan dari *Saccharomyces cerevisiae* dan *Acetobacter aceti* ditunjukkan pada (Lampiran E). Pada fase logaritma dan stasioner, kedua mikroorganismenya tersebut dapat tumbuh dengan baik dikarenakan sumber nutrisi alam media tercukupi. Fase kematian terjadi

disebabkan sumber nutrisi telah habis dan terbentuknya senyawa organik yang bersifat toksik sehingga tidak menguntungkan bagi mikroorganisme.

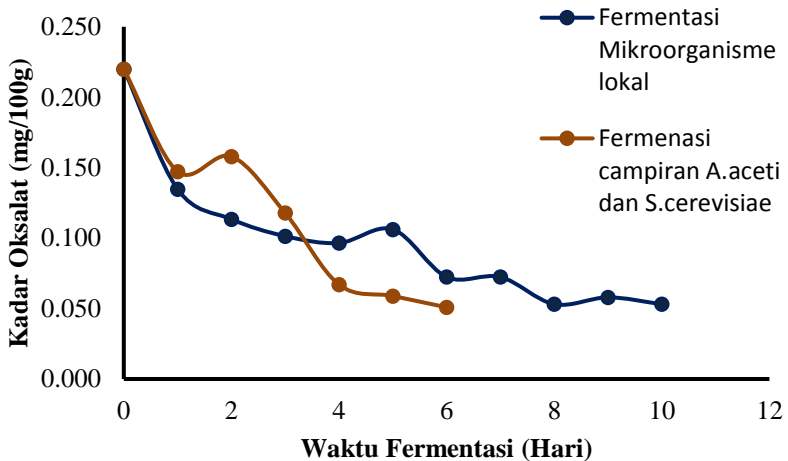


Gambar 4.3 Jalur Metabolisme Glukosa Oleh *Saccharomyces cerevisiae* [39].

Penggunaan dua mikroorganisme dimungkinkan terjadinya fermentasi alkohol dan fermentasi asam asetat. Metabolisme *S.cerevisiae* dapat menghasilkan etanol dengan mengoksidasi glukosa. Sumber glukosa berasal dari media fermentasi serta hasil hidrolisis tannin dan glukosinolat. *S.cerevisiae* diketahui dapat menghasilkan *tannase* sehingga dapat menghidrolisis tannin menjadi asam galat dan melepaskan glukosa. Penggunaan *A.ace* untuk mengoksidasi etanol yang merupakan produk utama *yeast* dengan menghasilkan asam asetat [34]. Namun, *S.cerevisiae* dapat menghasilkan asam asetat pada kondisi tertentu dikarenakan mikroorganisme tersebut memiliki enzim aldehyd dehydrogenase [39]. Metabolisme *S.cerevisiae* dapat ditunjukkan pada **Gambar 4.3**. Kadar asam total dengan menggunakan dua mikroorganisme yang spesifik ini diharapkan meningkat dibandingkan dengan fermentasi mikroorganisme lokal. Kadar asam total menggambarkan asam asetat dan asam laktat. Asam

laktat dapat dimungkinkan terbentuk karena pada penelitian ini metode fermentasi yang digunakan adalah fermentasi anaerobik fakultatif.

4.3 Pengaruh Fermentasi Menggunakan Mikroorganisme Lokal (MOL) dan Campuran *A.aceti* dan *S.serevisiae* terhadap Kadar Oksalat



Gambar 4.4 Pengaruh fermentasi dengan mikroorganisme lokal dan campuran *A.aceti* dan *S.cerevisiae* terhadap kadar oksalat

Pada **Gambar 4.4** menunjukkan waktu fermentasi dengan mikroorganisme lokal dan fermentasi penambahan starter campuran dapat menurunkan kadar oksalat dalam biomassa kubis. Berdasarkan data tersebut, waktu yang dibutuhkan dalam penurunan kadar oksalat dengan fermentasi campuran *A.aceti* dan *S.cerevisiae* cenderung lebih cepat dibandingkan dengan fermentasi mikroorganisme lokal. Kadar oksalat terendah pada fermentasi dengan mikroorganisme lokal ditunjukkan pada hari ke 8 sedangkan fermentasi campuran di hari ke-6. Selain itu, fermentasi mikroorganisme lokal menghasilkan kadar oksalat lebih besar dibandingkan dengan fermentasi campuran. Kadar oksalat terendah pada fermentasi mikroorganisme lokal yaitu 0.053

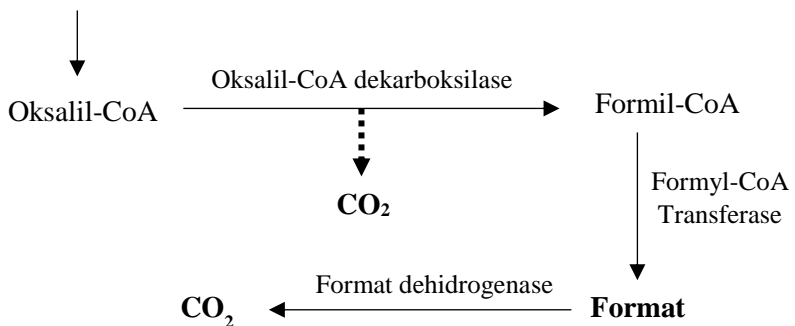
mg/100g sedangkan campuran 0.051 mg/100 g FW. Berdasarkan uji statistik *One-Way ANOVA*, waktu fermentasi berpengaruh nyata terhadap penurunan kadar oksalat dengan nilai $P < 0.05$. Namun, setelah dilakukan uji lanjutan Duncan (Lampiran D.2 dan D.4), pada fermentasi mikroorganisme lokal, kadar oksalat hari ke 6-10 tidak berbeda nyata. Pada fermentasi campuran starter, waktu fermentasi hari ke 4-6 tidak berbeda nyata terhadap kadar oksalat. Hal ini menunjukkan bahwa untuk waktu fermentasi optimum terhadap penurunan kadar oksalat pada fermentasi mikroorganisme lokal dan fermentasi starter campuran masing-masing pada hari ke 6 dan ke 4.

Senyawa oksalat dapat menghambat metabolisme dalam tubuh karena dapat membentuk senyawa kompleks dengan logam Ca^{2+} dan Mg^{2+} protein sehingga mengurangi penyerapan mineral dalam tubuh [40, 41]. Selain itu, kompleks oksalat dengan mineral dapat menjadikannya tidak larut dalam air. Salah satu metode untuk menghidrolisis oksalat adalah fermentasi. Proses hidrolisis menggunakan fermentasi didasarkan pada adanya enzim pemecah oksalat. Salah satu penelitian menjelaskan bahwa pada tumbuhan bit putih, kadar oksalat dapat diturunkan selama proses fermentasi berlangsung [37]. Pada penelitian ini dilakukan dua metode fermentasi yaitu fermentasi dengan mikroorganisme lokal dan fermentasi campuran *S.serevisiae* dan *A.aceti* untuk mengetahui efisiensi waktu fermentasi terhadap pembentukan asam total dan hidrolisis oksalat. Mikroorganisme lokal terdiri lebih dari 1 bakteri dan berbeda spesies. Mikroorganisme lokal yang umumnya dapat tumbuh yaitu bakteri asam laktat. Bakteri-bakteri ini seperti *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroide* dan lain-lain [1, 37]. Fermentasi dengan mikroorganisme lokal menurunkan kadar oksalat secara perlahan dan konstan hingga hari ke-10. Hal ini dimungkinkan karena banyaknya mikroorganisme dalam fermentasi mikroorganisme lokal mengakibatkan tingginya kompetisi antara satu sama lain. Kompetisi yang tinggi antara satu sama lain menyebabkan penurunan laju hidrolisis oksalat sehingga membutuhkan waktu yang sangat lama untuk mencapai kesetimbangan. Selain itu, fermentasi dengan mikroorganisme lokal tidak dapat diketahui mikroorganisme yang spesifik untuk menghasilkan enzim dalam hidrolisis oksalat. Penurunan yang terjadi dapat disebabkan karena pada saat fermentasi berlangsung, pH dalam lingkungan fermentasi dimungkinkan

menurun dibawah pH 6. Hal ini menyebabkan putusnya ikatan oksalat-logam sehingga menghasilkan ion oksalat yang larut dalam filtrat fermentasi. Hal ini diperkuat dari literature bahwa oksalat yang tak larut akan menjadi larut ketika pH dalam fermentasi menurun dan oksalat terlarut akan digunakan oleh beberapa bakteri sebagai sumber energi. Disisi lain, bakteri *L.plantarum* dimungkinkan tumbuh pada saat fermentasi mikroorganisme lokal berlangsung dapat menurunkan kadar oksalat dikarenakan memiliki enzim pendegradasi oksalat.

Pada fermentasi dengan campuran dapat menurunkan kadar oksalat dikarenakan kedua mikroorganisme ini diketahui spesifik menghasilkan kelompok enzim oksalat dehidrogenase. *S.cerevisiae* memiliki enzim oksalil-CoA dekarboksilase sedangkan *A.aceti* yaitu formyl-CoA transferase (oksalat CoA-transferase) [4, 5, 35]. Mekanisme metabolisme oksalat dapat dilihat pada **Gambar 4.5**. Enzim-enzim yang spesifik dapat meningkatkan laju hidrolisis oksalat sehingga kadar oksalat yang dihasilkan menurun secara signifikan. Penurunan oksalat yang secara signifikan ditunjukkan pada waktu fermentasi hari ke-2 sampai hari ke-4 dalam fermentasi campuran. Berdasar-kan data hasil pengukuran kadar oksalat menunjukkan bahwa penggunaan fermentasi campuran menurunkan kadar oksalat lebih cepat dibandingkan dengan fermentasi mikroorganisme lokal.

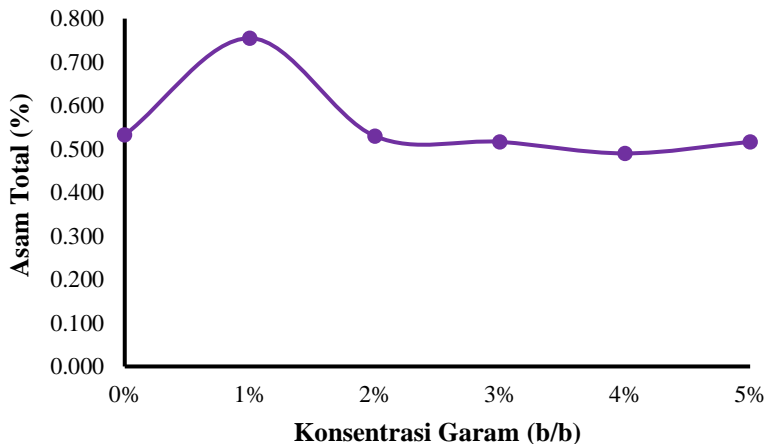
Asam oksalat



Gambar 4.5 Mekanisme reaksi enzimatik hidrolisis asam oksalat [4, 5, 35]

4.4 Pengaruh Konsentrasi Garam terhadap Kadar Asam Total dan Oksalat Pada Fermentasi Mikroorganisme Lokal (MOL)

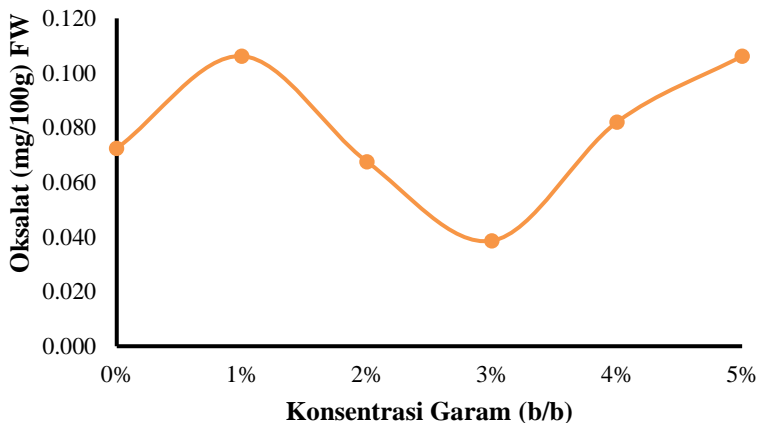
Penelitian ini menggunakan konsentrasi NaCl dengan variasi 1 %, 2 %, 3 %, 4 % dan 5 % (b/b). Pengaruh penambahan konsentrasi garam terhadap kadar asam total menggunakan fermentasi dengan mikroorganisme lokal ditunjukkan pada **Gambar 4.6** menunjukkan pemberian garam terhadap kadar asam total pada waktu fermentasi optimum. Berdasarkan gambar tersebut, terjadi peningkatan yang cukup signifikan pada pemberian garam 1% dengan kadar asam total sebesar 0.755%. Namun, pada pemberian NaCl 2%-5%, kadar asam total cenderung konstan. Berdasarkan uji *Two-Way* ANOVA(Lampiran D.5), penambahan kadar garam berpengaruh nyata terhadap kadar asam total dengan nilai $P < 0.05$. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan garam memungkinkan berpengaruh terhadap aktivitas mikroorganisme selama fermentasi berlangsung.



Gambar 4.6 Pengaruh konsentrasi garam terhadap kadar asam total dalam fermentasi mikroorganisme lokal pada waktu fermentasi optimum (hari ke-7)

Penambahan garam pada fermentasi kubis dapat mempercepat proses pemecahan dinding sel dengan melepaskan molekul air. Hal ini dikarenakan adanya tekanan osmosis. Tekanan osmosis terjadi antara

larutan garam yang akan masuk ke dalam sel kubis dengan senyawa kimia dalam kubis yang akan keluar. Senyawa kimia meliputi glukosa serta beberapa senyawa yang lainnya yang terkandung dalam kubis. Glukosa yang keluar dari sel-sel kubis akan dimanfaatkan oleh mikroorganisme lokal sebagai nutrisi dalam melakukan metabolisme. Metabolisme dari mikroorganisme akan menghasilkan beberapa asam organik seperti asam laktat secara anaerob [37]. Mikroorganisme lokal yang terlibat dalam fermentasi berasal dari berbagai jenis bakteri seperti *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroide* dan lain-lain [32]. Berdasar-kan **Gambar 4.6**, peningkatan kadar asam total pada penambahan konsentrasi garam 1 % hari ke-7 dimungkinkan karena adanya peningkatan jumlah mikroorganisme lokal. Hal ini diperkuat oleh literatur bahwa penambahan konsentrasi garam yang rendah dapat meningkatkan pertumbuhan mikroorganisme lokal asam laktat [42]. Namun, penambahan garam pada fermentasi dapat menghambat tumbuhnya mikroorganisme lain yang berperan dalam proses pembusukkan. Dengan kata lain, penambahan garam yang tepat dapat berfungsi sebagai pendukung pertumbuhan mikroorganisme lokal dan menghambat proses pembusukkan [43]



Gambar 4.7 Pengaruh konsentrasi garam terhadap kadar oksalat dalam fermentasi mikroorganisme lokal pada waktu fermentasi optimum (hari ke-7)

Fermentasi dengan mikroorganisme lokal juga dianalisis kadar oksalat dalam biomassa. Hal ini dikarenakan oksalat merupakan senyawa antinutrisi dalam kubis sehingga diharapkan fermentasi dengan mikroorganisme lokal dapat menurunkan kadar senyawa antinutrisi dalam kubis. Pengaruh penambahan konsentrasi garam terhadap kadar oksalat dalam fermentasi dengan mikroorganisme lokal ditunjukkan pada gambar dibawah. Kadar oksalat dalam bahan baku kubis yaitu 0,227 mg/100 FW.

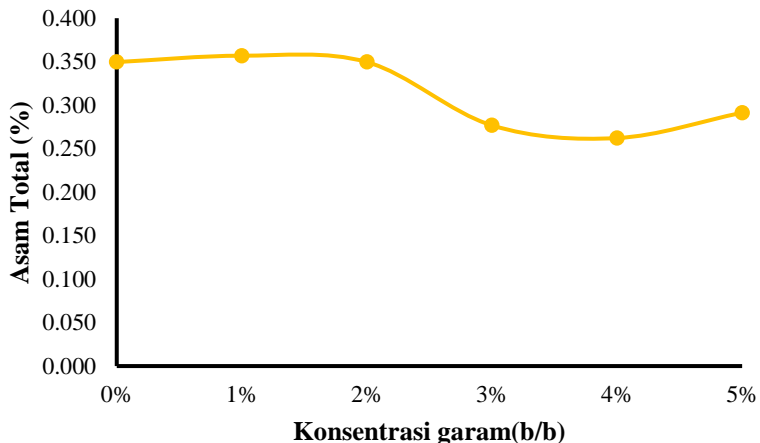
Pada **Gambar 4.7** menunjukkan pengaruh peningkatan konsentrasi garam terhadap kadar oksalat pada waktu fermentasi optimum. Konsentrasi larutan NaCl 1 %, 4% dan 5 % menunjukkan peningkatan kadar oksalat pada hari ke 7. Namun, pada konsentrasi garam 2 % dan 3% nilai kadar oksalat hari ke- 7 menurun yaitu 0.068 dan 0.039 mg/100 g FW. Penurunan nilai kadar oksalat dimungkinkan karena mikroorganisme yang terlibat fermentasi telah mengalami penurunan aktivitas dan pertumbuhan. Hal ini diperkuat oleh literature bahwa penambahan garam lebih besar dari 3,5% akan menghambat pertumbuhan mikroorganisme lokal penghasil. Oleh karena itu, garam yang optimum digunakan dalam menurunkan kadar oksalat fermentasi kubis yaitu pada kadar 2-3 %. Berdasar-kan uji *Two-Way* ANOVA (Lampiran D.6), pengaruh pemberian garam terhadap kadar oksalat tidak berpengaruh nyata dimana nilai $P > 0.05$.

Penambahan konsentrasi garam membantu pelepasan oksalat dari sel-sel kubis melalui proses osmosis dan dimetabolisme oleh mikroorganisme lokal. Penurunan kadar oksalat pada konsentrasi garam 2%-3% dimungkinkan karena kondisi tersebut menguntungkan aktivitas dan pertumbuhan mikroorganisme lokal sehingga oksalat dimetabolisme oleh mikroorganisme lokal menghasilkan asam organik seperti asam laktat dan asam asetat [3]. Selain itu, peningkatan kadar oksalat pada konsentrasi NaCl 4%-5% dimungkinkan karena adanya penghambatan dari pertumbuhan dan aktivitas mikroorganisme lokal sehingga metabolisme oksalat oleh mikroorganisme lokal terjadi penurunan[2]. Hasil uji *Two-Way* ANOVA yang tidak berbeda nyata dimungkinkan karena garam yang dilarutkan dalam air memungkinkan proses osmosis tidak maksimal sehingga tidak semua oksalat dalam sel-sel kubis keluar. Selain itu, adanya persaingan antar mikroorganisme lokal yang besar dalam memetabolisme oksalat sehingga menurunkan laju penurunan oksalat.

Hal ini menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi garam 1%-5% tidak mempengaruhi pertumbuhan dan aktivitas mikroorganisme lokal dalam metabolisme oksalat.

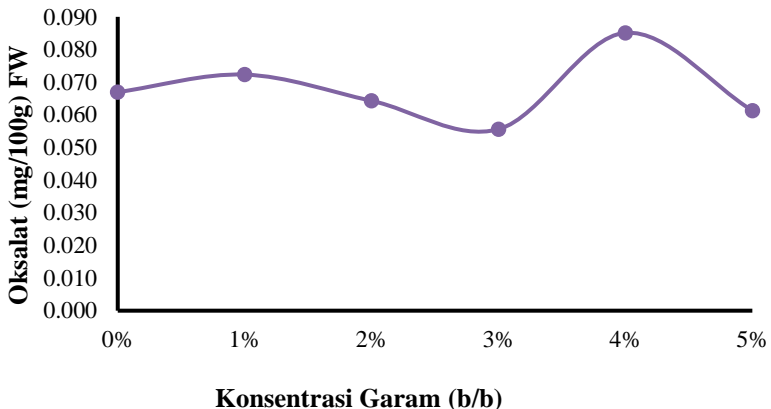
4.5 Pengaruh Konsentrasi Garam terhadap Kadar Asam Total dan Oksalat Pada Fermentasi Campuran *A.aceti* dan *S.cerevisiae*

Penelitian fermentasi campuran dengan penambahan konsentrasi garam yang bertujuan untuk menurunkan kadar oksalat serta meningkatkan kadar asam total dalam filtrat hasil fermentasi ditunjukkan pada **Gambar 4.8**. Berdasarkan data tersebut menunjukkan penambahan kadar garam terhadap kadar asam total pada waktu fermentasi optimum (hari ke-4). Penambahan konsentrasi garam NaCl 3% dan 4% cenderung menurunkan kadar asam total, tetapi kadar garam 1% dan 5% mengalami sedikit peningkatan. Kadar asam total terendah terjadi pada penambahan garam 2% sebesar 0.350%.



Gambar 4.8 Pengaruh konsentrasi garam terhadap kadar asam total dalam fermentasi campuran pada waktu fermentasi optimum (hari ke-4)

Berdasarkan uji statistika *Two-Way* ANOVA (Lampiran D.7), penambahan variasi kadar garam tidak berbeda nyata terhadap kadar asam total dengan diperoleh nilai $P > 0.05$. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi garam tidak mempengaruhi aktivitas dari mikroorganisme dalam menghasilkan asam. Pada fermentasi campuran menunjukkan kedua campuran *A. aceti* dan *S. cerevisiae* dapat tumbuh dengan baik dalam kondisi konsentrasi garam 1 % dan 2%. Namun, kondisi lingkungan fermentasi dengan konsentrasi 3 % hingga 5 % cenderung menghambat aktivitas dari mikroorganisme. Penggunaan kedua mikroorganisme tersebut yang cenderung menghasilkan asam yaitu *A. aceti*. Metabolisme dari bakteri ini menghasilkan asam asetat. Peran dari penambahan garam pada fermentasi dapat berfungsi menghambat pertumbuhan mikroorganisme gram negatif sedangkan dalam penelitian ini *A. aceti* merupakan bakteri gram negatif [44]. Penghambatan ini dikarenakan dinding sel pada bakteri gram negatif akan lebih mudah mengalami plasmolisis dibandingkan dengan bakteri gram positif. Dinding sel bakteri gram negatif memiliki struktur yang lebih tipis dengan 10 % peptidoglikan dan outer membran yang tersusun atas lipoprotein, polisakarida dan fosfolipid [44]. Penghambatan aktivitas kedua mikroorganisme (*A. aceti* dan *S. cerevisiae*) oleh konsentrasi garam 3 % hingga 5 % juga ditunjukkan pada kadar oksalat dalam biomassa.



Gambar 4.9 Pengaruh konsentrasi garam terhadap kadar oksalat dalam fermentasi campuran pada waktu fermentasi optimum (hari ke-4)

Pengaruh penambahan konsentrasi garam terhadap kadar oksalat dalam biomassa pada fermentasi campuran ditunjukkan pada **Gambar 4.9**. Berdasar-kan gambar tersebut diketahui bahwa penambahan garam 2%-3% dapat menurunkan kadar oksalat. Kadar oksalat pada garam 3% hari ke 4 sebesar 0,56 mg/100g FW. Namun, penambahan kadar garam 4%-5%, cenderung meningkatkan kadar oksalat. Berdasar-kan uji *Two-Way* ANOVA(Lampiran D.8), diketahui bahwa fermentasi campuran (*A.aceti* dan *S.cerevisiae*) dalam menurunkan kadar oksalat dalam biomassa kubis tidak berpengaruh dengan penambahan garam dengan nilai $P > 0.05$. Kadar oksalat dalam bahan baku kubis yaitu 0,227 mg/100 FW. Penambahan NaCl 2 % dan 3 % pada hari ke 4 dapat membantu mempercepat proses lisis dinding sel jaringan tanaman dengan mengeluarkan oksalat sehingga laju hidrolisisnya oleh starter campuran meningkat sedangkan konsentrasi garam 4% hingga 5 % cenderung menghambat laju hidrolisis oksalat. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan kadar garam yang tepat dapat membantu menurunkan kadar oksalat sebagai antinutrisi.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Fermentasi dengan mikroorganisme lokal dan campuran *A.aceti* dan *S.cerevisiae* mempengaruhi laju pembentukan asam dan hidrolisis oksalat yang dihasilkan dari aktivitas masing-masing mikroorganisme. Laju pembentukan asam dan hidrolisis oksalat lebih cepat pada fermentasi campuran dibandingkan dengan mikroorganisme lokal. Kondisi optimum kadar asam total yang dihasilkan oleh fermentasi campuran *A.aceti* dan *S.cerevisiae* pada hari ke-3, sedangkan mikroorganisme lokal hari ke-7. Kondisi optimum hidrolisis oksalat oleh fermentasi stater pada hari ke-4, sedangkan mikroorganisme lokal hari ke-6.
2. Penambahan garam dengan variasi konsentrasi pada fermentasi mikroorganisme lokal meningkatkan kadar asam dengan konsentrasi garam 1 % sedangkan kadar oksalat cenderung konstan. Kondisi optimum penambahan konsentrasi garam terhadap pembentukan asam total dengan konsentrasi garam 1 % di hari ke-7. Kondisi optimum kadar oksalat yaitu pada konsentrasi garam 3 % di hari ke-7.
3. Penambahan garam dengan variasi konsentrasi pada fermentasi campuran *A.aceti* dan *S.cerevisiae* meningkatkan kadar asam total dan menurunkan kadar oksalat dengan konsentrasi garam 1 % dan 2 %. Kondisi optimum penambahan konsentrasi garam terhadap pembentukan asam yaitu pada konsentrasi garam 2 % di hari ke-4. Kondisi optimum kadar oksalat yaitu pada konsentrasi garam 3 % di hari ke-4.

5.2 Saran

Pada penelitian selanjutnya diharapkan fermentasi kubis sebaiknya dilakukan variasi jumlah bakteri dan temperatur untuk mengoptimalkan hidrolisis oksalat dalam kubis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Aliya, H., Maslakah, N., Numrapi, T., Buana, A. P., & Hasri, Y. N. (2016). Pemanfaatan Asam Laktat Hasil Fermentasi Limbah Kubis Sebagai Pengawet Anggur Dan Stroberi. *Bioedukasi: Jurnal Pendidikan Biologi*, 8(2), 23. doi:10.20961/bioedukasi-uns.v9i1.3878
2. Astuti, B. C., & Syamsudin. (2014). Pengaruh Variasi Garam Terhadap Komposisi Kimia dan Aktivitas Antioksidan Kubis Putih (Brassicaceae oleracea). *Universitas Terbuka*, 56.
3. Cvetković, B., Pezo, L., Mandić, A., Novaković, A., Pestorić, M., Kevrešan, Ž., & Mastilović, J. (2014). CHEMOMETRIC APPROACH TO OPTIMIZATION OF WHITE CABBAGE FERMENTATION HEMOMETRIJSKI PRISTUP OPTIMIZACIJE PROCESA FERMENTACIJE BELOG KUPUSA. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 3.
4. Mullins, E. A., Starks, C. M., Francois, J. A., Sael, L., Kihara, D., & Kappock, T. J. (2012). Formyl-coenzyme A (CoA):oxalate CoA-transferase from the acidophile *Acetobacter aceti* has a distinctive electrostatic surface and inherent acid stability. *Protein Science*, 21(5), 686–696. doi:10.1002/pro.2054
5. Foster, J., & Nakata, P. A. (2014). An oxalyl-CoA synthetase is important for oxalate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 588(1), 160–166. doi:10.1016/j.febslet.2013.11.026
6. Prakash, S., & Hinata, K. (1980). Taxonomy, cytogenetics, and origin of crop brassicas, a review. *Opera Botanica*.
7. Cahyono, B. (1995). In *Cara meningkatkan budidaya kubis*. Yogyakarta: Pustaka Nusatama. Retrieved from <http://adl.aplik.or.id/default.aspx?tabID=61&src=k&id=460605>
8. Vincent E, R., & Yamaguchi. (1998). In *Sayuran dunia 2 : prinsip, produksi, dan gizi* (p. 292). Bandung: Penerbit ITB.
9. Fimognari, C., Turrini, E., Ferruzzi, L., Lenzi, M., & Hrelia, P. (2012). Natural isothiocyanates: Genotoxic potential versus chemoprevention. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 750(2), 107–131. doi:10.1016/j.mrrev.2011.12.001
10. Harjono, M. S. I. (1996). In *Melirik Bisnis Tani Kubis Bunga : Sayur Mewah Komoditi Primadona Kaum Elit*. Solo: CV.Aneka.

11. 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), 19–25.
12. Rachman, A. (1989). In *Pengantar Teknologi Fermentasi*. Bogor: Pusat Antar Universitas Pertanian Bogor.
13. Winarno, F. G., & Fardiaz, S. (1981). In *Biotransformasi dan biosintesa protein* (p. 92). Bandung: Angkasa.
14. Fardiaz, S. (1992). In *Mikrobiologi pangan 1* (pp. 299–307). Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
15. Fardiaz, S., & Fardiaz, D. (1980). In *Pengantar Teknologi Pangan*. Bandung: Angkasa.
16. Pelczar, M. J., & E.C.S. Chan. (1986). In *Dasar-Dasar Mikrobiologi* (1st ed.). Jakarta: Jakarta Universitas Indonesia (UI Press). Retrieved from <http://kin.perpusnas.go.id/DisplayData.aspx?pId=3231&pRegionCode=MANADO&pClientId=626>
17. Kerovuoto, J., Lappalainen, I., & Reinikainen, T. (2000). The Metal Dependence of Bacillus subtilis Phytase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268(2), 365–369. doi:10.1006/bbrc.2000.2131
18. Grafts, E., Empson, K. L., & Eaton, J. W. (1987). Phytic Acid. The Natural Antioxidant. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(24), 11647–11650.
19. Bohn, L., Meyer, A. S., & Rasmussen, Søren. K. (2008). Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 9(3), 165–191. doi:10.1631/jzus.B0710640
20. Shamsuddin, A. M. (2002). Anti-cancer function of phytic acid. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(7), 769–782. doi:10.1046/j.1365-2621.2002.00620.x
21. Kumar, V., Sinha, A. K., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2010). Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry*, 120(4), 945–959. doi:10.1016/j.foodchem.2009.11.052
22. Nissar, J., Ahad, T., Naik, H., & Hussain, S. (2017). A review phytic acid: As antinutrient or nutraceutical. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, (6), 7.

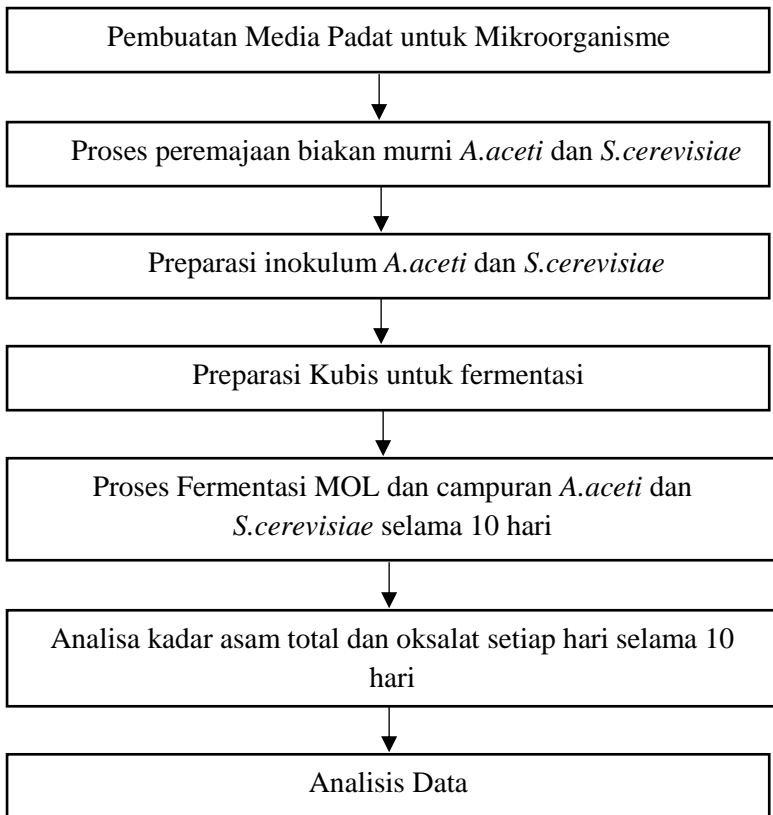
23. Khanbabaee, K., & van Ree, T. (2001). Tannins: Classification and Definition. *The Royal Society of Chemistry*, 9. doi:10.1039/b1010611
24. Sieniawska, E., & Baj, T. (2017). Tannins. In *Pharmacognosy* (pp. 199–232). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-802104-0.00010-X
25. Okuda, T., & Ito, H. (2011). Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants—Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules*, 16(3), 2191–2217. doi:10.3390/molecules16032191
26. Arapitsas, P. (2012). Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chemistry*, 135(3), 1708–1717. doi:10.1016/j.foodchem.2012.05.096
27. Food Group. (2002). In *Oxalate in human foods* (Vol. 27). Nutrition Society of New Zealand.
28. Guillamón, J. M., & Mas, A. (2009). Acetic acid bacteria. In K. H., U. G., & F. J. (Eds.), *In Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (2nd ed., pp. 31–46). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
29. Matsushita, K., Inoue, T., Adachi, O., & Toyama, H. (2005). Acetobacter aceti Possesses a Proton Motive Force-Dependent Efflux System for Acetic Acid. *Journal of Bacteriology*, 187(13), 4346–4352. doi:10.1128/JB.187.13.4346-4352.2005
30. Chinnawirotpisan, P., Theeragool, G., Limtong, S., Toyama, H., Adachi, O., & Matsushita, K. (2003). Quinoprotein Alcohol Dehydrogenase Is Involved in Catabolic Acetate Production, while NAD-Dependent Alcohol Dehydrogenase in Ethanol Assimilation in Acetobacter pasteurianus SKU1108. *J. BIOSCI. BIOENG.*, 96, 8.
31. Seiki, akihiko, Mariko, T., Matsushita, K., Hirohide, T., Gunjana, T., Napha, L., & Osao, A. (1997). Microbiological aspects of acetate oxidation by acetic acid bacteria, unfavorable phenomena in vinegar fermentation, 317–323. doi://doi.org/10.1271/bbb.61.317
32. Akihiko, S., Kazunobu, M., Seiki, T., Mariko, T., Hirohide, T., Gunjana, T., ... Osao, A. (1999). Enzyme Responsible for Acetate Oxidation by Acetic Acid Bacteria. *JSBA*, 2102–2109. doi:10.1271/bbb.63.2102

33. Trinh, T. N. N. (2015). *Culture of Acetobacter aceti TISTR 102 in Coconut Water and Banana Juice Medium for Starter Powder Preparation and Application in Coconut Vinegar Fermentation*. Prince of Songkla University.
34. Pelczar, M. J., & Chan, E. C. S. (2013). In *Dasar-dasar Mikrobiologi* (Vol. 1). Jakarta: UI Press.
35. Foster, J., Kim, H. U., Nakata, P. A., & Browse, J. (2012). A Previously Unknown Oxalyl-CoA Synthetase Is Important for Oxalate Catabolism in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(3), 1217–1229. doi:10.1105/tpc.112.096032
36. Dewi, S., & Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang. (2017). PENGURANGAN KADAR OKSALAT PADA UMBI TALAS DENGAN PENAMBAHAN ARANG AKTIF PADA METODE PENGUKUSAN. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 6(2). doi:10.17728/jatp.191
37. Wadamori, Y., Vanhanen, L., & Savage, G. (2014). Effect of Kimchi Fermentation on Oxalate Levels in Silver Beet (*Beta vulgaris* var. *cicla*). *Foods*, 3(2), 269–278. doi:10.3390/foods3020269
38. B, A., C.R, L., K.M, R., S.K., C., & A, M. (2015). Cruciferous Vegetables, Isothiosianants, and Prevention of Bladder Cancer. *Curr.Pharmacol*, 1, 272–282.
39. Thierie, J., & Penninckx, M. (2010). Crabtree Effect. In *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/9780470054581.eib243
40. Juharni, J. (2013). Pengaruh konsentrasi garam dan lama fermentasi terhadap kadar histamin pada ikan kembung perempuan (Rastrelinger nelectus). *Agrikan: Jurnal Ilmiah Agribisnis dan Perikanan*, 6(1), 73. doi:10.29239/j.agrikan.6.1.73-80
41. Azcarate-Peril, M. A., Bruno-Barcelona, J. M., Hassan, H. M., & Klaenhammer, T. R. (2006). Transcriptional and Functional Analysis of Oxalyl-Coenzyme A (CoA) Decarboxylase and Formyl-CoA Transferase Genes from *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1891–1899. doi:10.1128/AEM.72.3.1891-1899.2006

42. Lestari, C., & Suhaidi, I. (2017). PENGARUH KONSENTRASI LARUTAN GARAM DAN SUHU FERMENTASI TERHADAP MUTU KIMCHI LOBAK, (1), 8.
43. Swain, M. R., Anandharaj, M., Ray, R. C., & Parveen Rani, R. (2014). Fermented Fruits and Vegetables of Asia: A Potential Source of Probiotics. *Biotechnology Research International*, 2014, 1–19. doi:10.1155/2014/250424
44. Amalia, A., Dwiyantri, R. D., & Haitami, H. (2016). Daya Hambat NaCl terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Medical Laboratory Technology Journal*, 2(2), 42. doi:10.31964/mltj.v2i2.125
45. Andhika, F., & Sugiarto Djarot, R. (2016). Perbandingan Metode Analisis Permanganometri dan Serimetri dalam Penentuan Kadar Besi (II). *JURNAL SAINS DAN SENI ITS*, 5, C-10-C 13.
46. Williams, S. (1984). Official Methodes Of Analysis. In *Official Methodes Of Analysis* (14th ed.). Arlington, Virginis, USA: AOAC.
47. Wulandari, A. (2018). Pengaruh Lama Waktu Fermentasi Kombucha Teh Hijau Daun Jati (*Tectona grandis*) Terhadap Kadar Tanin Total dan Asam Total Tertitrasi (TAT). *PROGRAM STUDI PENDIDIKAN BIOLOGI JURUSAN PENDIDIKAN MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN UNIVERSITAS SANATA DHARMA YOGYAKARTA 2018*, 202.

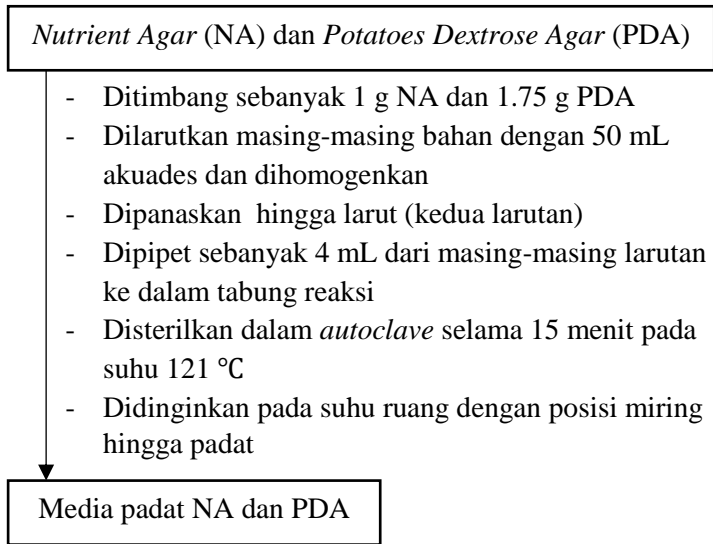
LAMPIRAN

LAMPIRAN A. Diagram Alir Penelitian

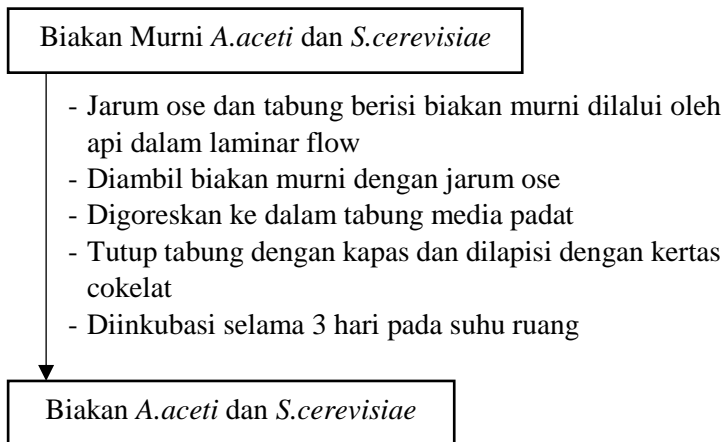


LAMPIRAN B. Diagram Alir Cara Kerja

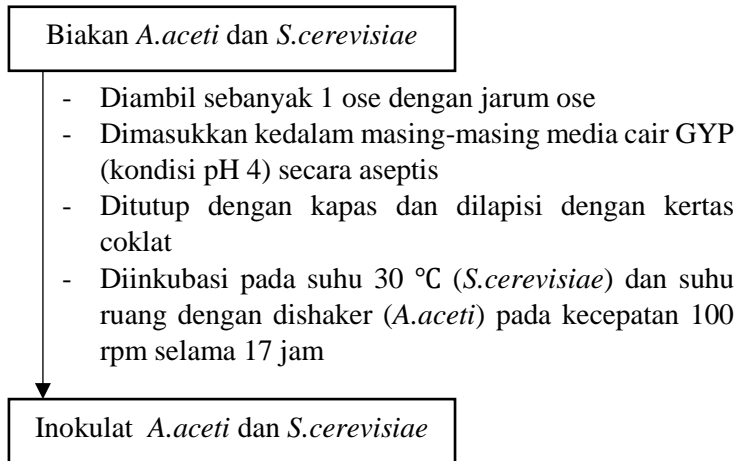
B.1. Pembuatan Media padat *A.aceti* dan *S.cerevisiae*



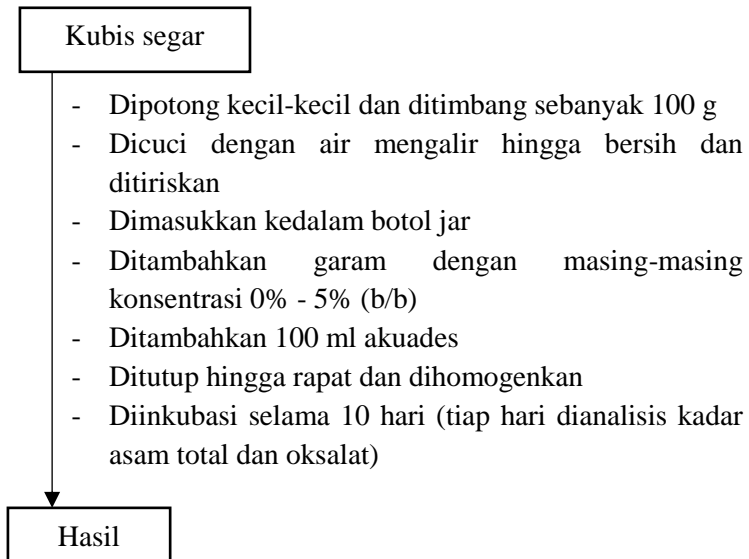
B.2 Peremajaan Biakan Murni *A.aceti* dan *S.cerevisiae*



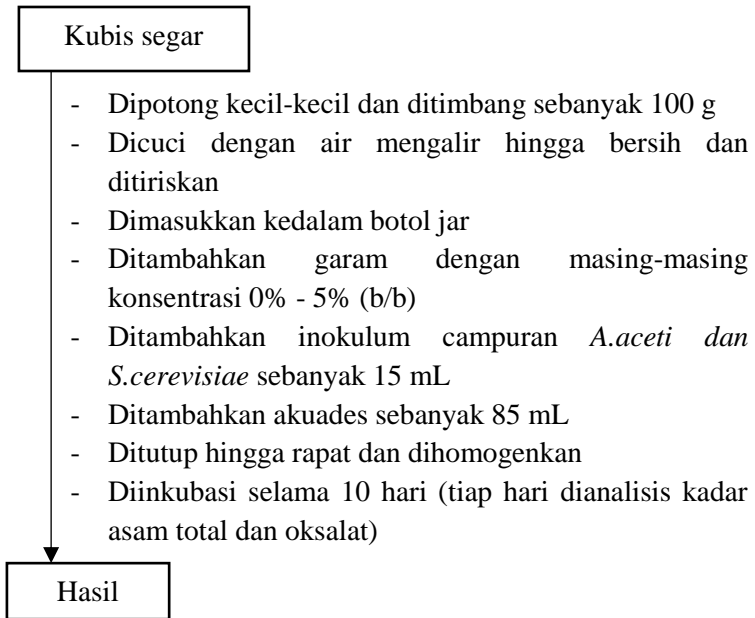
B.3. Pembuatan Inokulum *A.aceti* dan *S.cerevisiae*



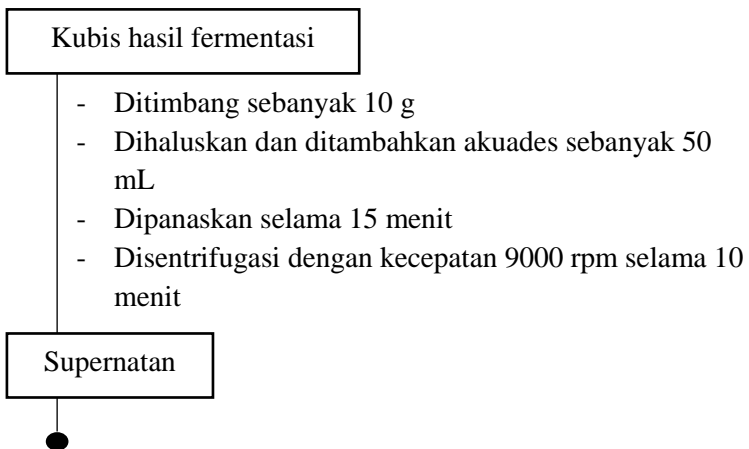
B.4 Fermentasi Kubis dengan MOL

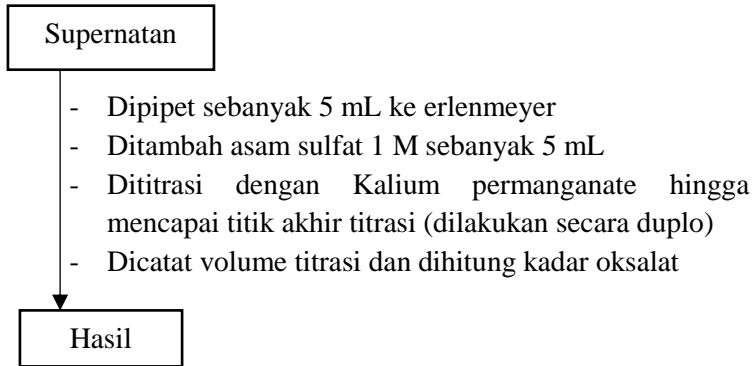


B.5 Fermentasi Kubis dengan campuran *A.aceti* dan *S.cerevisiae*

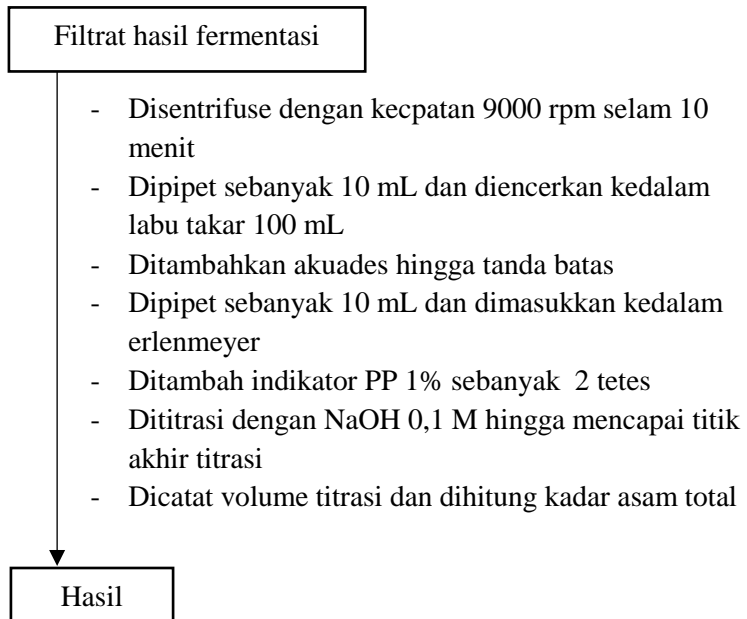


B.6 Analisa Kadar Oksalat





B.7 Analisa kadar asam total



LAMPIRAN C Perhitungan pembuatan larutan

C.1 Pembuatan larutan H₂SO₄ 1 M

$$\begin{aligned}[\text{Asam sulfat}] \text{ murni} &= \frac{\text{Massa jenis} \times \% \text{ as. sulfat} \times 1000}{\text{BM as. sulfat}} \\ &= \frac{1,8305 \times 96 \% \times 1000 \text{ mL/L}}{98 \text{ g/mol}} \\ &= 17,93 \text{ M} \\ &= 18 \text{ Molar}\end{aligned}$$

Larutan asam sulfat 1 Molar dibuat dengan cara pengenceran dengan akuades dan perhitungan sebagai berikut :

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

$$18 \text{ M} \times V_1 = 1 \text{ M} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{1 \text{ M} \times 100 \text{ mL}}{18 \text{ M}}$$

$$V_1 = 5,6 \text{ mL}$$

Maka, dipipet 5,6 mL asam sulfat pekat 18 M ke dalam labu takar 100 mL. Kemudian, ditambah akuades hingga tanda batas, ditutup dan dihomogenkan.

C.2 Preparasi Larutan KMnO₄ 0,05 N

Pembuatan larutan Kalium permanganat dibuat dengan cara berikut :

$$\begin{aligned}\text{Mr Kalium Permanganat} &= 159 \text{ g/mol} \\ \text{Berat Ekuivalen} &= 159 : 5 \\ &= 31,6 \text{ g/mol}\end{aligned}$$

Maka, massa yang dibutuhkan adalah :

$$\begin{aligned}\text{Massa} &= V \text{ labu takar} \times N \times \text{Berat Ekuivalen} \\ &= 100 \text{ mL} \times 0,2 \times 31,6 \\ &= 0,63 \text{ g}\end{aligned}$$

Dibutuhkan 0,63 g Kalium Permanganat. Kemudian diencerkan dengan akuades sampai tanda batas. Untuk didapatkan 0,05 N, dilakukan pengenceran didalam 100 mL labu takar dengan akuades dengan persamaan berikut :

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

$$0,2 \text{ M} \times V_1 = 0,05 \text{ M} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{0,05 \text{ M} \times 100 \text{ mL}}{0,2 \text{ M}}$$

$$V_1 = 25 \text{ mL}$$

Jadi, dipipet 25 mL ke dalam labu takar 100 mL. Kemudian, ditambah akuades hingga tanda batas, ditutup dan dihomogenkan.

C.3 Preparasi Larutan NaOH 0.1 M

Pembuatan larutan NaOH dilakukan dengan cara menimbang massa NaOH padatan dan setelah itu diencerkan dengan akuades dalam labu takar 100 mL.

$$\begin{aligned} \text{Mr NaOH} &= 40 \text{ g/mol} \\ \text{Molar} &= \frac{\text{mol NaOH}}{\text{volume}} \\ 0,1 \text{ M} &= \frac{\text{mol NaOH}}{0,1 \text{ L}} \\ \text{mol NaOH} &= 0,01 \text{ mol} \end{aligned}$$

Maka, massa NaOH yang dibutuhkan adalah :

$$\begin{aligned} \text{mol NaOH} &= \frac{\text{massa NaOH}}{\text{Mr NaOH}} \\ 0,01 \text{ mol} &= \frac{\text{Massa NaOH}}{40 \text{ g/mol}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa NaOH} &= 0,01 \text{ mol} \times 40 \text{ g/mol} \\ &= 0,4 \text{ g} \end{aligned}$$

Jadi, dibutuhkan 0.4 g NaOH padatan untuk membuat larutan NaOH 0.1 M

LAMPIRAN D Hasil Analisis Statistika

D.1 ANOVA Rancang Acak Lengkap(RAL) Asam Total Mikroorganisme lokal

Tabel D.1 Hasil Analisis Statistik RAL Asam Total MOL

ANOVA					
Asam_Total					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.764	10	.076	36.544	.000
Within Groups	.069	33	.002		
Total	.832	43			

		Asam_Total							
		Subset for alpha = 0.05							
Waktu_Fermentasi	N	1	2	3	4	5	6	7	
Tukey ^a	0	4	0.065250						
HSD ^a	1	4		0.182700					
	3	4		0.222300					
	5	4		0.272025	0.272025				
	4	4			0.345600	0.345600			
	2	4			0.348000	0.348000			
	6	4			0.350993	0.350993			
	10	4				0.417218	0.417218		
	5	4				0.424800	0.424800	0.424800	
	9	4					0.490065	0.490065	
	7	4						0.532350	
Sig.			1.000	0.216	0.372	0.368	0.486	0.067	
Duncan ^a	0	4	0.065250						
	1	4		0.182700					
	3	4		0.222300	0.222300				
	5	4			0.272025				
	4	4				0.345600			
	2	4				0.348000			
	6	4				0.350993			
	10	4					0.417218		
	5	4					0.424800	0.424800	
	9	4						0.490065	
7	4							0.532350	
Sig.			1.000	0.229	0.133	0.877	0.816	0.052	0.200

Pengaruh garam Ft 5% = 2.42; Pengaruh waktu Ft 5% = 2,31
 Pengaruh garam Ft 1% = 3.45; Pengaruh waktu Ft 1% = 3,15

D.2 ANOVA Rancang Acak Lengkap(RAL) Oksalat Mikroorganisme lokal

Tabel D.2 Hasil Analisis Statistik RAL Oksalat Mikroorganisme Lokal

ANOVA						
oksalat_spontan						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups		.091	10	.009	38.611	.000
Within Groups		.008	33	.000		
Total		.099	43			

oksalat_spontan						
Subset for alpha = 0.05						
Waktu_Fermentasi	N	1	2	3	4	5
Tukey	8	4 0.052900				
HSD ^a	10	4 0.052900				
	9	4 0.057700				
	6	4 0.072125	0.072125			
	7	4 0.072125	0.072125			
	4	4	0.096200	0.096200		
	3	4	0.101025	0.101025	0.101025	
	5	4	0.105850	0.105850	0.105850	
	2	4		0.113075	0.113075	
	1	4			0.134700	
	0	4				0.216478
	Sig.	0.787	0.108	0.889	0.109	1.000
Duncan ^a	8	4 0.052900				
	10	4 0.052900				
	9	4 0.057700				
	6	4 0.072125				
	7	4 0.072125				
	4	4	0.096200			
	3	4	0.101025			
	5	4	0.105850			
	2	4		0.113075	0.113075	
	1	4			0.134700	
	0	4				0.216478
	Sig.	0.122	0.165	0.055	1.000	

Pengaruh garam Ft 5% = 2.42; Pengaruh waktu Ft 5% = 2,31
 Pengaruh garam Ft 1% = 3.45; Pengaruh waktu Ft 1% = 3,15

D.3 ANOVA Rancang Acak (RAL) Asam Total starter campuran
Tabel D.3 Hasil Analisis Statistik RAL Asam Total *A.aceti* dan *S.cerevisiae*

ANOVA					
Asam_totalInnsptn					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.543	10	.054	38.770	.000
Within Groups	.046	33	.001		
Total	.589	43			

Asm_totalInnsptn									
Subset for alpha = 0.05									
Waktu_fermentasi	N	1	2	3	4	5	6	7	
Tukey	0	4	0.00653						
HSD*	1	4		0.19080					
	2	4		0.25200					
	5	4			0.29130	0.29130			
	8	4			0.29130	0.29130			
	9	4			0.31315	0.31315			
	9	4			0.34228	0.34228	0.34228		
	4	4				0.34956	0.34956		
	3	4					0.40950	0.40950	
	10	4						0.43695	
	7	4						0.47336	
	Sig.		1.000	0.455	0.057	0.525	0.325	0.073	0.395
Duncan*	0	4	0.00653						
	1	4		0.19080					
	2	4			0.25200				
	5	4			0.29130	0.29130			
	8	4			0.29130	0.29130			
	9	4				0.31315			
	9	4				0.34228			
	4	4				0.34956			
	3	4					0.40950		
	10	4					0.43695	0.43695	
	7	4						0.47336	
	Sig.		1.000	1.000	0.172	0.057	0.309	0.180	

Pengaruh garam Ft 5% = 2.42; Pengaruh waktu Ft 5% = 2,31
 Pengaruh garam Ft 1% = 3.45; Pengaruh waktu Ft 1% = 3,15

D.4 ANOVA Rancang Acak Lengkap(RAL) Oksalat fermentasi starter

Tabel D.4 Hasil Analisis Statistik Oksalat *A.aceti* dan *S.cerevisiae*

ANOVA					
Oksalat_nonsptn					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.109	10	.011	43.396	.000
Within Groups	.008	33	.000		
Total	.117	43			

Oksalat_nonsptn							
		Subset for alpha = 0.05					
Waktu_Fermentasi	N	1	2	3	4	5	6
Tukey	6	4	0.050873				
HSD ^a	8	4	0.058788				
	5	4	0.058905				
	4	4	0.066938				
	7	4	0.077648	0.077648			
	10	4	0.079668	0.079668	0.079668		
	9	4		0.114105	0.114105	0.114105	
	3	4			0.117810	0.117810	
	1	4				0.147263	0.147263
	2	4					0.157983
	0	4					
Sig.		0.305	0.080	0.056	0.149	0.996	1.000
Duncan ^a	6	4	0.050873				
	8	4	0.058788	0.058788			
	5	4	0.058905	0.058905			
	4	4	0.066938	0.066938			
	7	4		0.077648			
	10	4		0.079668			
	9	4			0.114105		
	3	4			0.117810		
	1	4				0.147263	
	2	4				0.157983	
0	4					0.216478	
Sig.		0.200	0.105	0.743	0.346	1.000	

Pengaruh garam Ft 5% = 2.42; Pengaruh waktu Ft 5% = 2,31

Pengaruh garam Ft 1% = 3.45; Pengaruh waktu Ft 1% = 3,15

D.5 ANOVA Rancang Acak Kelompok (RAK) Asam Total Fermentasi Mikroorganisme lokal

D.5.1 Waktu vs Kadar Asam Total

Tabel D.5.1 Analisis Statistik (RAK) Asam Total Mikroorganisme Lokal

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Asam_spntn					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.534 ^a	12	0.045	91.509	0
Intercept	6.531	1	6.531	13430.69	0
Waktu_fermentasi	0.531	9	0.059	121.333	0
Kelompok	0.003	3	0.001	2.035	0.133
Error	0.013	27	0		
Total	7.079	40			
Corrected Total	0.547	39			

a. R Squared = .976 (Adjusted R Squared = .965)

D.5.2 Garam vs Asam total

Tabel D.5.2 Analisis Statistik (RAK) Asam Total dengan penambahan garam pada fermentasi MOL

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Asam_totalspontan					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.817 ^a	14	0.058	14.579	0
Intercept	10.083	1	10.083	2518.401	0
Waktu_fermentasi	0.706	9	0.078	19.6	0
Garam	0.111	5	0.022	5.539	0
Error	0.18	45	0.004		
Total	11.08	60			
Corrected Total	0.997	59			

a. R Squared = .819 (Adjusted R Squared = .763)

Pengaruh garam Ft 5% = 2,42; Pengaruh waktu Ft 5% = 2,31
 Pengaruh garam Ft 1% = 3,45; Pengaruh waktu Ft 1% = 3,15

D.6 ANOVA Rancang Acak Kelompok Oksalat Fermentasi MOL

D.6.1 Waktu vs Oksalat

Tabel D.6.1 Analisis Statistik (RAK) Oksalat Mikroorganisme Lokal

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Oksalat_spontan					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.012 ^a	12	0.001	18.175	0
Intercept	0.305	1	0.305	5358.254	0
Ulangan	0	3	0	2.217	0.109
Waktu_Fermentasi	0.012	9	0.001	23.494	0
Error	0.002	27	5.70E-05		
Total	0.319	40			
Corrected Total	0.014	39			

a. R Squared = .890 (Adjusted R Squared = .841)

D.6.2 Garam vs Oksalat

Tabel D.6.2 Analisis Statistik (RAK) Oksalat dengan penambahan garam pada fermentasi MOL

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Oksalat_MOL					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.023 ^a	14	0.002	2.737	0.005
Intercept	0.454	1	0.454	751.961	0
Waktu_fermentasi	0.018	9	0.002	3.284	0.004
Garam	0.005	5	0.001	1.752	0.142
Error	0.027	45	0.001		
Total	0.504	60			
Corrected Total	0.05	59			

a. R Squared = .460 (Adjusted R Squared = .292)

Pengaruh garam Ft 5% = 2.42; Pengaruh waktu Ft 5% = 2,31

Pengaruh garam Ft 1% = 3.45; Pengaruh waktu Ft 1% = 3,15

D.7 ANOVA Rancang Acak Kelompok Asam Total pada Fermentasi Starter Campuran *A.aceti* dan *S.cerevisiae*

D.7.1 Waktu vs Asam Total

Tabel D.7.1 Hasil Analisis Statistik RAK Asam Total pada fermentasi Starter campuran *A.aceti* dan *S.cerevisiae*

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Asam_Total					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.205 ^a	12	0.017	48.839	0
Intercept	4.784	1	4.784	13645.36	0
Waktu_Fermentasi	0.205	9	0.023	65.013	0
Kelompok	0	3	0	0.318	0.812
Error	0.009	27	0		
Total	4.999	40			
Corrected Total	0.215	39			

a. R Squared = .956 (Adjusted R Squared = .936)

D.7.2 Garam vs Asam Total

Tabel D.7.2 Analisis Statistik (RAK) Asam Total dengan penambahan garam pada fermentasi Starter campuran *A.aceti* dan *S.cerevisiae*

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Asam_total					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.327 ^a	14	0.023	6.107	0
Intercept	7.179	1	7.179	1877.157	0
Waktu_Fermentasi	0.308	9	0.034	8.951	0
Kadar_Garam	0.019	5	0.004	0.989	0.435
Error	0.172	45	0.004		
Total	7.678	60			
Corrected Total	0.499	59			

a. R Squared = .655 (Adjusted R Squared = .548)

Pengaruh garam Ft 5% = 2.42; Pengaruh waktu Ft 5% = 2,31
 Pengaruh garam Ft 1% = 3.45; Pengaruh waktu Ft 1% = 3.15

D.8 ANOVA Rancang Acak Kelompok Oksalat pada Fermentasi Starter Campuran *A.aceti* dan *S.cerevisiae*

D.8.1 Waktu vs Oksalat

Tabel D.8.1 Hasil Analisis Statistik RAK Oksalat pada fermentasi Starter campuran *A.aceti* dan *S.cerevisiae*

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Oksalat_nonspontan					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.016 ^a	12	0.001	49.524	0
Intercept	0.264	1	0.264	10138.71	0
Waktu_Fermentasi	0.015	9	0.002	65.942	0
Ulangan	2.13E-05	3	7.11E-06	0.272	0.845
Error	0.001	27	2.61E-05		
Total	0.281	40			
Corrected Total	0.016	39			

a. R Squared = .957 (Adjusted R Squared = .937)

D.8.2 Garam vs Oksalat

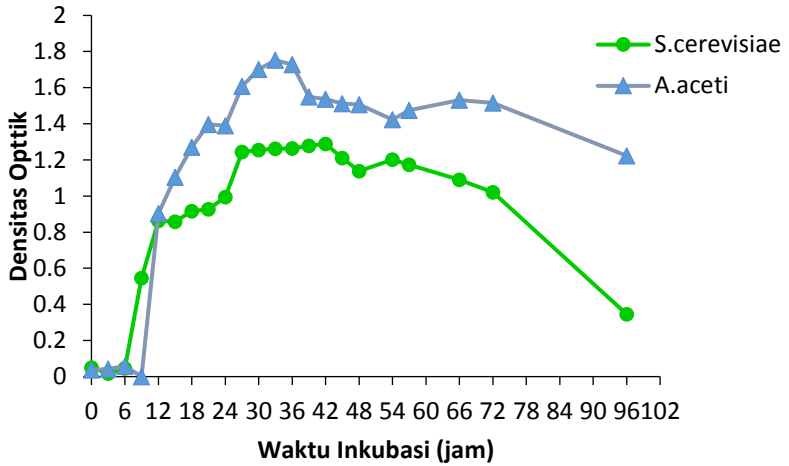
Tabel D.8.2 Analisis Statistik (RAK) Oksalat dengan penambahan garam pada fermentasi Starter campuran *A.aceti* dan *S.cerevisiae*

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Oksalat_nonspontan					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.026 ^a	14	0.002	5.828	0
Intercept	0.396	1	0.396	1230.804	0
Waktu_fermentasi	0.023	9	0.003	7.994	0
Garam	0.003	5	0.001	1.928	0.108
Error	0.014	45	0		
Total	0.436	60			
Corrected Total	0.041	59			

a. R Squared = .645 (Adjusted R Squared = .534)

Pengaruh garam Ft 5% = 2.42; Pengaruh waktu Ft 5% = 2,31
 Pengaruh garam Ft 1% = 3.45; Pengaruh waktu Ft 1% = 3,15

LAMPIRAN E Kurva Standar Pertumbuhan *A.aceti* dan *S.cerevisiae*



Gambar E.1 Kurva Baku Pertumbuhan *A.aceti* dan *S.cerevisiae*

LAMPIRAN F Data Hasil Penelitian Kadar Asam Total dan Kadar Oksalat

F.1 Data Hasil Penelitian Kadar Asam Total MOL

Tabel F.1 Data Kadar Asam Total MOL

Waktu Fermentasi	Kadar asam total(%)					
	Perlakuan					
	0%	1%	2%	3%	4%	5%
Hari 1	0.183	0.187	0.180	0.166	0.177	0.239
Hari 2	0.348	0.244	0.272	0.195	0.371	0.351
Hari 3	0.222	0.286	0.293	0.230	0.384	0.371
Hari 4	0.346	0.410	0.512	0.287	0.364	0.411
Hari 5	0.425	0.576	0.517	0.397	0.530	0.523
Hari 6	0.272	0.477	0.477	0.411	0.483	0.656
Hari 7	0.532	0.755	0.530	0.517	0.490	0.517
Hari 8	0.351	0.543	0.483	0.404	0.536	0.517
Hari 9	0.490	0.570	0.477	0.430	0.404	0.490
Hari 10	0.417	0.536	0.510	0.417	0.490	0.417

F.2 Data Hasil penelitian Kadar Oksalat MOL

Tabel F.2 Data Kadar Oksalat MOL

Waktu Fermentasi	Kadar Oksalat rata2					
	Perlakuan					
	0%	1%	2%	3%	4%	5%
Hari 1	0.135	0.101	0.101	0.222	0.125	0.101
Hari 2	0.113	0.087	0.106	0.077	0.087	0.135
Hari 3	0.101	0.087	0.072	0.072	0.072	0.125
Hari 4	0.097	0.106	0.082	0.048	0.087	0.140
Hari 5	0.106	0.068	0.058	0.048	0.092	0.077
Hari 6	0.072	0.068	0.072	0.053	0.072	0.072
Hari 7	0.072	0.106	0.068	0.039	0.082	0.106
Hari 8	0.053	0.077	0.077	0.077	0.097	0.082
Hari 9	0.058	0.087	0.068	0.068	0.077	0.140
Hari 10	0.053	0.092	0.072	0.068	0.087	0.072

F.3 Data Hasil Penelitian Kadar Asam Total Campuran *A.aceti* dan *S.cerevisiae*

Tabel F.3 Data Kadar Asam Total campuran *A.aceti* dan *S.cerevisiae*

Waktu Fermentasi	Kadar Asam total rata2					
	Perlakuan					
	0%	1%	2%	3%	4%	5%
Hari 1	0.191	0.294	0.239	0.269	0.204	0.124
Hari 2	0.252	0.354	0.315	0.269	0.226	0.182
Hari 3	0.410	0.307	0.315	0.269	0.204	0.269
Hari 4	0.350	0.357	0.350	0.277	0.262	0.291
Hari 5	0.291	0.379	0.364	0.291	0.357	0.393
Hari 6	0.291	0.328	0.306	0.444	0.430	0.415
Hari 7	0.473	0.539	0.612	0.485	0.333	0.456
Hari 8	0.313	0.335	0.408	0.495	0.377	0.464
Hari 9	0.328	0.335	0.350	0.371	0.312	0.384
Hari 10	0.437	0.393	0.379	0.320	0.413	0.500

F.4 Data Hasil Penelitian Kadar Oksalat Campuran *A.aceti* dan *S.cerevisiae*

Tabel F.4 Data Kadar Oksalat campuran *A.aceti* dan *S.cerevisiae*

Waktu Fermentasi	Kadar Oksalat rata2					
	Perlakuan					
	0%	1%	2%	3%	4%	5%
Hari 1	0.147	0.150	0.075	0.109	0.098	0.169
Hari 2	0.158	0.137	0.067	0.099	0.088	0.104
Hari 3	0.118	0.099	0.070	0.080	0.082	0.082
Hari 4	0.067	0.072	0.064	0.056	0.085	0.061
Hari 5	0.059	0.070	0.064	0.070	0.078	0.057
Hari 6	0.051	0.048	0.062	0.075	0.073	0.059
Hari 7	0.078	0.070	0.080	0.080	0.086	0.078
Hari 8	0.059	0.067	0.072	0.075	0.073	0.070
Hari 9	0.114	0.069	0.077	0.087	0.065	0.067
Hari 10	0.080	0.056	0.055	0.065	0.079	0.068