

## LEMBAR PENGESAHAN

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

Oleh:

**TINOK DWI ANANDA**

**176090200111004**

Telah dipertahankan di depan pengaji  
pada tanggal 2 Juli 2019

dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk memperoleh gelar

**Magister Sains dalam bidang Ilmu Kimia**

**Menyetujui,**

**Komisi Pembimbing**

**Ketua**

**Dr. Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes.**

**NIP. 19720326 200212 2 001**

**Anna Safitri, S.Si., M.Sc. Ph.D.**

**NIP. 19800813 200502 2 008**

**Mengetahui,**

**Ketua Program Studi S2 Kimia  
Fakutas MIPA Universitas Brawijaya**

**Dr. Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes.**

**NIP. 19720326 200212 2 001**

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

Nama Mahasiswa : Tinok Dwi Ananda

NIM : 176090200111004

Program Studi : Kimia

Bidang Minat : Biokimia

**KOMISI PEMBIMBING**

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

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

**TIM DOSEN PENGUJI**

Dosen Penguji 1 : Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS.

Dosen Penguji 2 : Masruri, S.Si., M.Si., Ph.D.

Tanggal Ujian : 2 Juli 2019

Saya, yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama

: Tinok Dwi Ananda

NIM

: 176090200111004

Program Studi

: Kimia

Bidang Minat

: Biokimia

Judul Tesis

: Fermentasi Pada Kubis Menggunakan Kultur Campuran

*Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae*

untuk Penurunan Zat Antinutrisi dan Identifikasi

Metabolit Sekunder

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan kesadaran.

Malang, 12 Juni 2019  
Mahasiswa,

Tinok Dwi Ananda  
NIM. 176090200111004



## **RINGKASAN**

Tinok Dwi Ananda, Program Pascasarjana Universitas Brawijaya. 2019.

# Fermentasi Pada Kubis Menggunakan Kultur Campuran *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae* untuk Penurunan Zat Antinutrisi dan Identifikasi Metabolit Sekunder. Ketua Komisi Pembimbing: Dr. Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes. Komisaris Pembimbing: Anna Safitri, S.Si., M.Sc. Ph.D.

Kubis (*Brassica oleracea var. capitata*) adalah salah satu jenis sayur yang paling banyak dikonsumsi di dunia. Namun, kubis mengandung zat antinutrisi pengganggu asupan protein yaitu tanin (290,88 mg/100 g kubis segar), yang dapat didegradasi oleh enzim tanase bakterial. Di sisi lain, kubis juga mengandung senyawa glukosinolat yang mampu terhidrolisis oleh enzim mirosinase tanaman untuk membentuk senyawa antikanker, yaitu isotiosianat. Enzim tersebut berada di dalam kompartemen sel tanaman dan dapat teraktivasi melalui perusakan dinding sel tanaman oleh mikroorganisme. Proses degradasi tanin dan glukosinolat akan melepaskan glukosa yang dapat dimetabolisme oleh mikroorganisme membentuk asam. Pada penelitian ini, dilakukan fermentasi pada kubis menggunakan *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae* untuk 1) menentukan kondisi optimum fermentasi, yaitu volume inokulum campuran dan pH awal media untuk menurunkan senyawa tanin dalam kubis 2) mengidentifikasi keberadaan asam laktat dan asam asetat dalam filtrat siswa fermentasi menggunakan HPLC dan 3) mengidentifikasi keberadaan senyawa isotiosianat target, yaitu iberin dan sulforafan menggunakan LCMS. Variasi volume inokulum campuran yang dipelajari ialah 5%, 10%, 15%, 20%, 25% (v/v), sedangkan variasi pH yang dikaji yaitu 4, 5, 6, dan 7. Fermentasi kubis dilakukan pada suhu ruang dalam kondisi anaerobik selama 4 hari. Tolak ukur kondisi optimum didasarkan pada kadar terendah tanin dalam kubis yang ditentukan secara spektrofotometri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa baik volume inokulum campuran dan pH berpengaruh nyata terhadap penurunan kadar senyawa tanin ( $P < 0,05$ ). Kondisi optimum untuk menurunkan senyawa tanin dalam kubis dengan teknik fermentasi terjadi pada saat penggunaan volume inokulum campuran *L. plantarum* – *S. cerevisiae* 5% dan pH 7. Fermentasi kubis pada kondisi tersebut dapat menurunkan kadar tanin dalam tanaman menjadi 54,061 mg/100 g berat segar kubis. Identifikasi jenis asam menunjukkan keberadaan senyawa asam laktat dan asam asetat dalam filtrat hasil fermentasi. Selain itu, senyawa isotiosianat target yang berhasil diidentifikasi dalam biomassa kubis terfermentasi adalah iberin dan sulforafan. Walaupun kubis segar telah mengandung kedua senyawa tersebut, tetapi kadar senyawa isotiosianat, yaitu sulforafan dalam kubis terfermentasi lebih besar (0,711  $\mu\text{g/g}$ ) dibandingkan dengan kadar sulforafan dalam kubis segar (0,539  $\mu\text{g/g}$ ).

## SUMMARY

Tinok Dwi Ananda. Postgraduate Program, Brawijaya University. 2019. **Cabbage Fermentation Using Mixed Cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* to Reduce Antinutritional Levels and Identify The Secondary Metabolites.** Chief of Advisory Committee: Dr. Arie Srihardyastuti, S.Si., M.Kes. Member of the Advisory Committee: Anna Safitri, S.Si., M.Sc., Ph.D.

Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) is one of the most widely consumed vegetables in the world. However, this vegetable contains anti-nutritional compound that disrupts protein bioavailability, called tannin (290.88 mg/100 g fresh weight), which can be degraded by bacterial tannase enzyme. On the other hand, cabbage also contains glucosinolate compounds which can be hydrolyzed by plant myrosinase enzyme, to form anticancer compound, called isothiocyanates. This enzyme is stored in plant cell compartments and can be activated through plant cell walls destruction by microorganisms. The degradation process of tannin and glucosinolate release glucose, which is further metabolized by microorganism to form acids. In this study, cabbage fermentation using *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* was conducted to 1) determine the optimum fermentation conditions, that are mixed inoculums volume and initial pH culture to reduce tannin level in cabbage 2) identify the presence of lactic acid and acetic acid in the filtrate of fermented cabbage using HPLC and 3) identify the targeted isothiocyanate compounds, iberin and sulphoraphane using LCMS. The variation of the mixed inoculums volume studied were 5%, 10%, 15%, 20%, 25% (v/v), while the variations of pH used were 4, 5, 6, and 7. The cabbage fermentation was carried out at room temperature in anaerobic condition for 4 days. The optimum fermentation conditions were based on the lowest levels of tannin in the fermented cabbage biomass, spectrophotometrically. The results showed that both the mixed inoculums volume and initial pH culture significantly affected the reduction of tannin levels in cabbage ( $P < 0.05$ ). The using of 5% mixed inoculums volume and pH 7 were found to be the best conditions for tannin degradation in cabbage, where remained tannin level in fermented cabbage biomass was 54.061 mg/100 g fresh weight. Acid identification showed the presence of lactic acid and acetic acid compounds in the filtrate of fermented cabbage. In addition, the identified of targeted isothiocyanate compounds in fermented cabbage biomass were iberin and sulphoraphane. Although these compounds had already identified in the fresh cabbage biomass, the level of isothiocyanate compounds, sulphoraphane in fermented cabbage were greater than that in fresh cabbage (0.711 µg/g vs 0.539 µg/g, respectively).

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, karunia, dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **“Fermentasi Pada Kubis Menggunakan Kultur Campuran *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae* untuk Penurunan Zat Antinutrisi dan Identifikasi Metabolit Sekunder”** sebagai salah satu persyaratan mendapatkan gelar Magister Sains dalam bidang Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

Dalam proses penulisan dan penyelesaian tesis ini, penulis banyak mendapatkan bantuan, dukungan, arahan, serta bimbingan dari berbagai pihak. Oleh sebab itu penulis ingin mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes. selaku dosen pembimbing I atas segala pengetahuan, bimbingan, pengarahan, waktu, dan dukungan selama penelitian dan penyusunan tesis;
2. Ibu Anna Safitri, S.Si., M.Sc. Ph.D. selaku dosen pembimbing II atas segala pengetahuan, bimbingan, pengarahan, dan dukungan selama penelitian dan penyusunan tesis;
3. Bapak Dr. Sasangka Prasetyawan, MS, Ibu Siti Mariyah Ulfa S.Si., M.Sc., Dr.Sc., Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS, Bapak Masruri, S.Si., M.Si., Ph.D. selaku dosen penguji atas segala pengetahuan, bimbingan, pengarahan, dukungan, waktu, dan bantuan selama penelitian dan penyusunan tesis;
4. Bapak Maryono selaku PLP Laboratorium Biokimia atas segala bantuan dan dukungan yang diberikan selama penulis melakukan penelitian;
5. Seluruh dosen yang telah memberikan ilmu dan bimbingan selama perkuliahan serta staf jurusan kimia atas bantuan proses administrasi selama ujian tesis;
6. Keluarga tercinta, Ibu Sutikah (Ibu), Bapak Kusnan (Bapak), Krisna Manggala Putra (Kakak), dan Ibu Kastin (Nenek) atas do'a, kasih sayang, cinta, dukungan serta bimbingan selama ini yang tiada hentinya;
7. Rekan S2 Kimia, terutama Mbak Aulin, Mbak Alfi, Afifah, Mbak Majida, Mbak Tri, Mbak Wiwi; adik-adik rekan kerja laboratorium; dan adik-adik kos

Ines dan Ainin atas doa, dukungan, dan bantuan kepada penulis selama penelitian.

Penulis menyadari bahwa tesis ini belumlah sempurna. Oleh karena itu, Penulis kritik dan saran yang membangun sangat dibutuhkan untuk perbaikan dan penyempurnaan tesis ini. Akhir kata, semoga tesis ini dapat bermanfaat dan menambah ilmu bagi seluruh pembaca.

Malang, 12 Juni 2019

Penulis



HALAMAN JUDUL .....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
IDENTITAS TIM PENGUJI.....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS .....	iv
RIWAYAT HIDUP .....	v
RINGKASAN.....	vi
SUMMARY .....	vii
KATA PENGANTAR .....	viii
DAFTAR ISI .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR TABEL .....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xviii
BAB I .....	1
PENDAHULUAN .....	1
1.1.    Latar Belakang .....	1
1.2.    Rumusan Masalah .....	4
1.3.    Batasan Masalah.....	4
1.4.    Tujuan Penelitian.....	5
1.5.    Manfaat Penelitian.....	5
BAB II.....	6
TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1.    Tanaman Kubis ( <i>Brassica oleracea var. capitata</i> ) .....	6
2.2.    Tanin .....	7
2.3.    Glukosinolat .....	10
2.4. <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	14
2.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	16
2.6.    Fermentasi .....	18
2.7.    Fermentasi Kultur Campuran dengan <i>Lactobacillus plantarum</i> dan <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	22
X.....	

2.8.	Spektronik 20 .....	23
2.9.	HPLC ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ) .....	25
2.10.	LCMS ( <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i> ) .....	26
<b>BAB III.....</b>	<b>KERANGKA KONSEPTUAL .....</b>	<b>28</b>
3.1.	Kerangka konsep .....	28
3.2.	Kerangka operasional .....	29
3.3.	Hipotesis Penelitian .....	30
<b>BAB IV.....</b>	<b>METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>31</b>
4.1.	Waktu dan Tempat Penelitian .....	31
4.2.	Alat dan Bahan Penelitian.....	31
4.2.2.	Alat Penelitian .....	31
4.2.3.	Bahan Penelitian .....	31
4.3.	Tahapan Penelitian .....	32
4.4.	Prosedur Penelitian.....	33
4.4.1.	Preparasi media padat <i>Lactobacillus plantarum</i> dan <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	33
4.4.2.	Peremajaan biakan murni <i>Lactobacillus plantarum</i> dan <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	33
4.4.3.	Pembuatan kurva pertumbuhan .....	34
4.4.4.	Fermentasi .....	35
4.4.5.	Penentuan kadar tanin .....	36
4.4.6.	Penentuan kadar glukosa.....	37
4.4.7.	Fermentasi pada kondisi optimum .....	38
4.4.8.	Penentuan pH pada filtrat hasil fermentasi .....	39
4.4.9.	Identifikasi asam laktat dan asam asetat menggunakan HPLC .....	39
4.4.10.	Identifikasi turunan glukosinolat menggunakan LCMS .....	40
4.4.11.	Analisis Data .....	41
<b>BAB V.....</b>	<b>HASIL PEMBAHASAN .....</b>	<b>42</b>
5.1.	Kurva Pertumbuhan <i>Lactobacillus plantarum</i> dan <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	42

5.2. Proses Fermentasi untuk Degradasi Senyawa Tanin dalam Kubis .....	43
5.2.1. Pengaruh Volume Inokulum Campuran Terhadap Kadar Tanin dalam Kubis Terfermentasi .....	44
5.2.2. Pengaruh pH Terhadap Kadar Tanin dalam Kubis Terfermentasi ..	49
5.3. Analisis Metabolit Sekunder Target Selama Proses Fermentasi .....	53
5.3.1. Identifikasi Asam Organik dalam Filtrat Hasil Fermentasi .....	53
5.3.2. Identifikasi Senyawa Golongan Isotiosianat Target dalam Kubis Hasil Fermentasi.....	56
BAB VI.....	61
PENUTUP.....	61
6.1. Kesimpulan .....	61
6.2. Saran .....	61
DAFTAR PUSTAKA .....	62
LAMPIRAN .....	71



<b>DAFTAR GAMBAR</b>	
<b>Gambar 2.1</b>	Tanaman Kubis ( <i>Brassica oleracea var. capitata</i> ) di daerah Poncokusumo ..... 6
<b>Gambar 2.2</b>	Struktur senyawa asam tanat (golongan tanin terhidrolisis) ..... 8
<b>Gambar 2.3</b>	Mekanisme reaksi hidrolisis tanin menjadi glukosa dan asam galat oleh tanase ..... 9
<b>Gambar 2.4</b>	Biosintesis senyawa glukosinolat dalam tanaman <i>Brassicaceae</i> ..... 11
<b>Gambar 2.5</b>	Mekanisme reaksi hidrolisis glukosinolat menjadi senyawa isotiosianat oleh enzim mirosinase tanaman ..... 12
<b>Gambar 2.6</b>	Degradasi glukosinolat oleh enzim mirosinase ..... 13
<b>Gambar 2.7</b>	Beberapa struktur glukosinolat dan turunan isotiosianat ..... 14
<b>Gambar 2.8</b>	Skema metabolisme <i>Lactobacillus plantarum</i> ..... 16
<b>Gambar 2.9</b>	Reaksi enzimatis dalam fermentasi oleh ragi ..... 18
<b>Gambar 2.10</b>	Sistem LC-MS ..... 27
<b>Gambar 5.1</b>	Kurva pertumbuhan <i>Lactobacillus plantarum</i> dan <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..... 42
<b>Gambar 5.2</b>	Gambaran pelepasan senyawa tanin dalam kubis ke media fermentasi yang mengandung etanol hasil metabolisme <i>L. plantarum</i> – <i>S. cerevisiae</i> dan air ..... 45
<b>Gambar 5.3</b>	Pengaruh volume inokulum campuran <i>L. plantarum</i> dan <i>S. cerevisiae</i> terhadap kadar tanin pada biomassa dan filtrat kubis yang difermentasi pada kondisi anaerobik selama 96 jam dengan suhu ruang ..... 46
<b>Gambar 5.4</b>	Pengaruh volume inokulum campuran <i>L. plantarum</i> dan <i>S. cerevisiae</i> terhadap kadar glukosa pada biomassa dan filtrat kubis yang difermentasi pada kondisi anaerobik selama 96 jam dengan suhu ruang ..... 47
<b>Gambar 5.5</b>	Jalur biosintesis galotanin (tanin terhidrolisis) secara umum ... 48
<b>Gambar 5.6</b>	Hubungan antara pH terhadap kadar tanin biomassa dan filtrat hasil fermentasi kubis pada kondisi anaerobik selama

<b>Gambar 5.7</b>	Mekanisme regulasi asam organik oleh mikroorganisme .....	52
<b>Gambar 5.8</b>	Kromatogram asam organik pada filtrat hasil fermentasi kubis menggunakan volume inokulum campuran <i>L. plantarum</i> – <i>S. cerevisiae</i> 5% (v/v), pH media awal 7 pada kondisi anaerobik dan suhu ruang selama 48 dan 72 jam .....	55
<b>Gambar 5.9</b>	Struktur senyawa (a) asam laktat dan (b) asam asetat .....	56
<b>Gambar 5.10</b>	Hasil LCMS dari biomassa kubis terfermentasi menggunakan volume inokulum campuran <i>L. plantarum</i> – <i>S. cerevisiae</i> 5% (v/v), pH media awal 7 pada kondisi anaerobik dan suhu ruang selama 72 jam (a) kromatogram senyawa iberin (b) kromatogram senyawa sulforafan .....	58
<b>Gambar 5.11</b>	Hasil LCMS dari kubis segar (a) kromatogram senyawa iberin (b) kromatogram senyawa sulforafan .....	59
<b>Gambar L4.1</b>	Kurva hubungan antara konsentrasi larutan tanin dengan absorbansi.....	80
<b>Gambar L4.2</b>	Kurva hubungan antara konsentrasi glukosa dengan absorbansi.....	80
<b>Gambar L4.3</b>	Kurva hubungan antara konsentrasi sulforafan dengan luas puncak kromatogram sulforafan .....	81
<b>Gambar L6. 1</b>	Biakan (a) <i>Lactobacillus plantarum</i> (b) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	93
<b>Gambar L6.2</b>	Proses fermentasi pada suhu ruang selama 4 hari secara anaerobik (a) Pengaruh volume inokulum campuran <i>L. plantarum</i> – <i>S. cerevisiae</i> (b) Pengaruh pH media awal terhadap kadar tanin kubis.....	94
<b>Gambar L6.3</b>	Ekstrak air tanin dari biomassa kubis terfermentasi.....	94
<b>Gambar L6.4</b>	Pengukuran kadar tanin menggunakan metode Folin Denis .....	94
<b>Gambar L6.5</b>	Pengukuran kadar glukosa pada ekstrak etanol kubis terfermentasi .....	95
<b>Gambar L6.6</b>	Hasil sentrifugasi filtrat hasil fermentasi untuk memisahkan	



sel (pelet) dan filtrat (supernatan) ..... 95

<b>DAFTAR TABEL</b>	
<b>Tabel 4.1</b>	Optimasi parameter massa iberin dan sulforafan ..... 40
<b>Tabel 5.1</b>	Lama setiap fasa pertumbuhan <i>Lactobacillus plantarum</i> dan <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..... 43
<b>Tabel 5.2</b>	Analisis kadar tanin, glukosa, dan pH pada filtrat hasil fermentasi kubis menggunakan volume inokulum campuran <i>L. plantarum</i> – <i>S. cerevisiae</i> 5% (v/v), pH media awal 7, pada kondisi anaerobik dan suhu ruang selama 48 dan 72 jam ..... 54
<b>Tabel 5.3</b>	Identifikasi waktu retensi puncak asam asetat dan laktat pada filtrat hasil fermentasi kubis menggunakan volume inokulum campuran <i>L. plantarum</i> – <i>S. cerevisiae</i> 5% (v/v), pH media awal 7, pada kondisi anaerobik dan suhu ruang selama 48 dan 72 ..... 55
<b>Tabel 5.4</b>	Identifikasi senyawa isotiosianat kubis segar dan kubis yang difermentasi (volume inokulum campuran <i>L. plantarum</i> – <i>S. cerevisiae</i> 5%, pH media awal 7, kondisi anaerobik, lama fermentasi 72 jam) ..... 58
<b>Tabel 5.5</b>	Kadar sulforafan kubis segar dan kubis terfermentasi (volume inokulum campuran <i>L. plantarum</i> – <i>S. cerevisiae</i> 5% (v/v), pH media awal 7, kondisi anaerobik, suhu ruang, lama fermentasi 72 jam) ..... 60
<b>Tabel L4.1</b>	Data densitas optik <i>L. plantarum</i> dan <i>S. cerevisiae</i> ..... 79
<b>Tabel L4.2</b>	Data absorbansi larutan standar tanin ..... 79
<b>Tabel L4.3</b>	Data absorbansi larutan standar glukosa ..... 80
<b>Tabel L4.4</b>	Data luas area puncak standar sulforafan ..... 81
<b>Tabel L4.5</b>	Data pengaruh volume inokulum campuran terhadap kadar tanin biomassa ..... 81
<b>Tabel L4.6</b>	Data pengaruh volume inokulum campuran terhadap kadar tanin filtrat ..... 82
<b>Tabel L4.7</b>	Data pengaruh volume inokulum campuran terhadap kadar glukosa biomassa ..... 84
<b>Tabel L4.8</b>	Data pengaruh volume inokulum campuran terhadap kadar glukosa filtrat ..... 85

<b>Tabel L4.9</b>	Data pengaruh pH media awal terhadap kadar tanin biomassaa.....	86
<b>Tabel L4.10</b>	Data pengaruh pH media awal terhadap kadar tanin filtrat .....	86
<b>Tabel L4.11</b>	Data pengaruh waktu inkubasi 48 jam terhadap kadar tanin biomassa.....	86
<b>Tabel L4.12</b>	Data pengaruh waktu inkubasi 72 jam terhadap kadar tanin filtrat.....	87
<b>Tabel L4.13</b>	Data pengaruh waktu inkubasi 48 jam terhadap kadar glukosa biomassa.....	87
<b>Tabel L4.14</b>	Data pengaruh waktu inkubasi 72 jam terhadap kadar glukosa filtrat.....	87
<b>Tabel L4.15</b>	Data volume $H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$ untuk standarisasi NaOH .....	87
<b>Tabel L4.16</b>	Volume NaOH untuk pengukuran pH filtrat pada jam ke 48 .....	88
<b>Tabel L4.17</b>	Volume NaOH untuk pengukuran pH filtrat pada jam ke 72 .....	88
<b>Tabel L4.18</b>	Data kadar sulforafan dalam kubis terfermentasi dan kubis segar .....	89

	<b>DAFTAR LAMPIRAN</b>	
<b>Lampiran 1</b>	<b>TAHAPAN PENELITIAN</b>	71
<b>Lampiran 2</b>	<b>PEMBUATAN REAGEN</b>	72
<b>Lampiran 2.1</b>	Pembuatan larutan $\text{Na}_2\text{CO}_3$ jenuh .....	72
<b>Lampiran 2.2</b>	Pembuatan 50 mL larutan stok asam tanat 0,1 g/mL .....	72
<b>Lampiran 2.3</b>	Pembuatan 100 mL larutan fenol 5 % (b/v) .....	72
<b>Lampiran 2.4</b>	Pembuatan 50 mL larutan stok glukosa 100 ppm .....	72
<b>Lampiran 2.5</b>	Pembuatan etanol 80% .....	72
<b>Lampiran 2.6</b>	Pembuatan $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,05 M .....	73
<b>Lampiran 2.7</b>	Pembuatan NaOH 0,1 M .....	73
<b>Lampiran 2.8</b>	Pembuatan $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 10 mM pH 2,4 .....	73
<b>Lampiran 3</b>	<b>DIAGRAM ALIR PENELITIAN</b>	74
<b>Lampiran 3.1</b>	Peremajaan isolat <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dan <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	74
<b>Lampiran 3.2</b>	Pembuatan kurva pertumbuhan <i>S. cerevisiae</i> dan <i>L. plantarum</i> .....	74
<b>Lampiran 3.3</b>	Preparasi kubis .....	75
<b>Lampiran 3.4</b>	Optimasi volume inokulum campuran selama fermentasi ....	75
<b>Lampiran 3.5</b>	Optimasi pH media awal selama fermentasi.....	76
<b>Lampiran 3.6</b>	Penentuan kadar tanin dalam sampel kubis terfermentasi....	76
<b>Lampiran 3.7</b>	Penentuan glukosa dalam kubis terfermentasi .....	77
<b>Lampiran 3.8</b>	Fermentasi pada kondisi optimum .....	77
<b>Lampiran 3.9</b>	Penentuan pH filtrat hasil fermentasi .....	78
<b>Lampiran 3.10</b>	Preparasi sampel filtrat hasil fermentasi untuk analisis HPLC .....	78
<b>Lampiran 4</b>	<b>DATA HASIL PENELITIAN DAN PERHITUNGAN</b>	79
<b>Lampiran 4.1</b>	Kurva pertumbuhan <i>L. plantarum</i> dan <i>S. cerevisiae</i> .....	79
<b>Lampiran 4.2</b>	Kurva baku tanin .....	79
<b>Lampiran 4.3</b>	Kurva baku glukosa .....	80
<b>Lampiran 4.4</b>	Kurva baku ESTD sulforafan.....	81
<b>Lampiran 4.5</b>	Data optimasi: pengaruh volume inokulum campuran terhadap kadar tanin biomassa dan filtrat .....	81

<b>Lampiran 4.6</b>	Data optimasi: pengaruh volume inokulum campuran terhadap kadar glukosa biomassa dan filtrat.....	84
<b>Lampiran 4.7</b>	Data optimasi: pengaruh pH media awal terhadap kadar tanin biomassa dan filtrat.....	86
<b>Lampiran 4.8</b>	Data optimasi: pengaruh waktu inkubasi 48 jam dan 72 jam terhadap kadar tanin biomassa dan filtrat .....	86
<b>Lampiran 4.9</b>	Data optimasi: pengaruh waktu inkubasi 48 jam dan 72 jam terhadap kadar glukosa biomassa dan filtrat .....	87
<b>Lampiran 4.10</b>	Data pengaruh waktu inkubasi 48 jam dan 72 jam terhadap pH filtrat.....	87
<b>Lampiran 4.11</b>	Data analisis kuantitatif sulforafan dalam sampel kubis terfermentasi dan kubis segar.....	89
<b>Lampiran 5</b>	<b>UJI STATISTIKA</b> .....	90
<b>Lampiran 5.1</b>	Pengaruh volume inokulum campuran terhadap kadar tanin biomassa.....	90
<b>Lampiran 5.2</b>	Pengaruh volume inokulum campuran terhadap kadar tanin filtrat .....	91
<b>Lampiran 5.3</b>	Pengaruh pH media awal terhadap kadar tanin biomassa .....	92
<b>Lampiran 5.4</b>	Pengaruh pH media terhadap kadar tanin filtrat .....	93
<b>Lampiran 6</b>	<b>DOKUMENTASI PENELITIAN</b> .....	94
<b>Lampiran 7</b>	<b>SURAT KETERANGAN DETEKSI PLAGIASI</b> .....	96
<b>Lampiran 8</b>	<b>SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN KUBIS</b> .....	97
<b>Lampiran 9</b>	<b>LETTER OF ACCEPTANCE PUBLIKASI JURNAL</b> .....	98





## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1. Latar Belakang**

Pada beberapa tahun terakhir, minat terhadap konsumsi sayur terus meningkat (Cartea, et al., 2011). Hal tersebut dikarenakan sayur mengandung karbohidrat, vitamin, serat, mineral, asam amino, dan senyawa bioaktif yang dapat bermanfaat bagi kesehatan (Fekadu Gemede, 2014; Sinha & Khare, 2017). Salah satu sayuran dengan tingkat konsumsi tinggi di dunia adalah kubis (*Brassica oleracea var capitata L.*). Tercatat bahwa setiap tahunnya, masing-masing orang di dunia mengkonsumsi kubis sebanyak 6,3 kg, baik dalam bentuk mentah, direbus, dalam bentuk jus, atau difermentasi (*sauerkraut*) (Fahey, 2015; Rokayya et al., 2014). Tingginya konsumsi kubis tidak lepas dari adanya nutrisi dalam tanaman tersebut. Kubis mengandung beberapa jenis vitamin (Vit, C, Vit, B1, Vit, B2, niasin, asam pantotenat, Vit, B6, folat Vit, A, Vit, E, Vit, K) dan mineral (kalsium, besi, magnesium, fosfor, kalium, natrium, seng, tembaga, mangan, selenium) (Fahey, 2015). Selain itu, kubis juga mengandung senyawa khas yang disebut glukosinolat (Ishida et al., 2014; Palani et al., 2016; Vig et al., 2009).

Glukosinolat merupakan senyawa metabolit sekunder dalam tanaman *Brassicaceae*, yang secara struktural terdiri dari  $\beta$ -tioglukosa, oksim sulfonasi, dan rantai samping yang berasal dari asam amino (Ishida et al., 2014). Senyawa glukosinolat yang berhasil diidentifikasi dalam kubis antara lain sinigrin, glukoiberin, glukobrasisin, glukonapin, glukorafanin, glukoiberverin, progoitrin, glukoerisin, glukoerisolin, glukotropaeolin, dan glukonasturtin (Palani et al., 2016; Vig et al., 2009). Senyawa glukosinolat dapat terhidrolisis dengan bantuan enzim mirosinase tanaman, yang hanya aktif oleh disrupti dinding sel tanaman untuk membentuk berbagai produk. Salah satu produk hidrolisisnya adalah golongan isotiosianat yang diketahui memiliki aktivitas biologis (Vig et al., 2009). Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa golongan senyawa isotiosianat mampu menghambat pertumbuhan sel kanker secara *in vitro*. Sulforafan dari glukorafanin memiliki aktivitas antikanker terhadap sel kanker paru-paru A-549 (Farag &

Motaal, 2010). Selain itu, iherin dari turunan glukoiberin mampu menginduksi apoptosis atau antiproliferasi sel neuroblastoma (Jadhav et al., 2007). Namun demikian, selain memiliki beberapa nutrisi yang dapat bermanfaat bagi tubuh, kubis juga mengandung zat antinutrisi seperti senyawa tanin. Penelitian oleh Ogbede et al. (2015) menunjukkan bahwa kubis mengandung tanin sebesar 2,3 mg/100 gram berat kering (Ogbede et al., 2015), sedangkan Mosha et al. (1995) juga mengidentifikasi adanya 1266 mg tanin tiap 100 gram berat segar kubis (Mosha et al., 1995). Sifat antinutrisi dari tanin berasal dari kemampuannya untuk membentuk kompleks dengan protein, sehingga mengganggu ketersediaan dan pemanfaatan protein dalam tubuh (Fekadu Gemede, 2014; Liener, 1998; Natesh N, SK, & L, 2018).

Salah satu cara untuk menurunkan kandungan zat antinutrisi tersebut, sekaligus mengubah nilai gizi suatu bahan pangan adalah melalui fermentasi. Fermentasi merupakan proses transformasi, modifikasi, atau pengolahan suatu makanan yang dapat menyebabkan perubahan nilai nutrisi, masa simpan, dan keamanan pangan (Septembre-Malaterre et al., 2018). Proses fermentasi dengan bantuan *Lactobacillus plantarum* telah terbukti mampu mendegradasi senyawa tanin melalui aktivitas enzim tanase seluler yang dihasilkan. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa fermentasi dengan *L. plantarum* pada media yang mengandung asam tanat 0,35% (b/v) pada suhu 30 °C, pH 6, kecepatan agitasi 125 rpm dapat menginduksi produksi enzim tanase dengan aktivitas enzim sebesar 9,29 U/mL (Natarajan & Rajendran, 2009). Penelitian lain oleh Matsuda et al. (2016) juga menunjukkan adanya aktivitas tanase sebesar 9,50 U/mL pada *L. plantarum* yang diisolasi dari serelia pada suhu 30 °C dan pH 7,5 (Matsuda et al., 2016). Proses fermentasi menggunakan bakteri asam laktat juga diketahui mampu menyebabkan gangguan dinding sel tanaman dan mengaktivasi enzim mirosinase, yang selanjutnya menyebabkan proses hidrolisis glukosinolat. Palani et al. (2016) menunjukkan bahwa fermentasi pada kubis selama 9 hari pada suhu 19-20 °C dengan bakteri asam laktat menyebabkan degradasi glukobrasisin menjadi askorbigen (Palani et al., 2016). Penelitian lain oleh

Peñas et al. (2012) berhasil mengidentifikasi turunan glukosinolat seperti iberin, iberin nitril, alil isotiosianat, dan sulforafan pada kubis putih kultivar Megaton yang difermentasi pada suhu 22-25 °C selama 7 hari menggunakan bakteri asam laktat *Lactobacillus* dan *Leuconostoc* (Peñas et al., 2012).

Saat ini, fermentasi dengan memanfaatkan bakteri asam laktat dan ragi secara bersama banyak dikembangkan pada berbagai bahan pangan. Selain telah mendapatkan status aman dari FAO (Behera et al., 2018; Nuobariene et al., 2014), kedua mikroorganisme tersebut dipercaya memiliki sistem mutualisme. Ragi dapat menyediakan asam amino untuk pertumbuhan bakteri asam laktat (Ponomarova et al., 2017), sedangkan produksi metabolismik oleh enzim dalam bakteri asam laktat juga dapat bermanfaat sebagai sumber energi bagi ragi (Sieuwerts et al., 2018). Beberapa penelitian telah menggunakan kultur campuran ragi dan bakteri asam laktat untuk meningkatkan kualitas produk fermentasi. Sebagai contoh, cuka lemon yang dihasilkan dari proses fermentasi menggunakan campuran *L. plantarum* dan *S. cerevisiae* (masing-masing 2% (v/v)) pada suhu 33 °C, pH 4, selama 5 hari memiliki kandungan antioksidan, asam amino, dan asam yang lebih tinggi dibandingkan dengan fermentasi menggunakan kultur tunggal (Chen et al., 2017). Selain itu, Oboh (2006) juga berhasil menurunkan kandungan zat antinutrisi (sianida dan asam fitat) dan meningkatkan protein pada kulit singkong yang diinokulasi dengan cairan yang mengandung campuran *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus coryneformis*, dan *S. cerevisiae* (2:1:1) selama 7 hari pada suhu 30 °C (Oboh, 2006). Berdasarkan uraian tersebut, fermentasi menggunakan ragi dan bakteri asam laktat secara bersama berpotensi untuk meningkatkan kualitas produk fermentasi. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan fermentasi pada kubis dengan menggunakan kultur campuran *Lactobacillus plantarum* - *Saccharomyces cerevisiae* untuk menurunkan zat antinutrisi tanin sekaligus menghidrolisis glukosinolat menjadi senyawa isotiosianat.

Perbedaan kondisi pertumbuhan yang dibutuhkan oleh kedua mikroorganisme tersebut tetap menjadi masalah yang perlu diselesaikan. Dengan demikian, selama proses fermentasi, dilakukan penentuan kondisi

optimum, khususnya volume inokulum campuran dan pH media awal. Tolak ukur kondisi optimum ditentukan berdasarkan penurunan kadar senyawa tanin. Selain itu, oleh karena *Lactobacillus plantarum* merupakan bakteri heterofermentatif (Batt, 2014) yang mampu memproduksi asam laktat dan asetat sekaligus, maka dilakukan pula identifikasi kedua senyawa tersebut dalam filtrat sisa fermentasi. Kemudian, untuk mengetahui kandungan nutrisi dalam kubis terfermentasi, dilakukan identifikasi golongan senyawa isotiosianat yaitu iberin dan sulforafan yang telah diketahui memiliki aktivitas antikanker. Penelitian ini diharapkan mampu memberikan gambaran mengenai potensi fermentasi kultur campuran untuk menghasilkan produk makanan dari kubis dengan nilai gizi yang lebih baik.

## 1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu:

1. Bagaimana pengaruh volume inokulum campuran *Lactobacillus plantarum* – *Saccharomyces cerevisiae* terhadap kadar senyawa tanin dalam kubis terfermentasi?
2. Bagaimana pengaruh pH media awal terhadap kadar senyawa tanin dalam kubis terfermentasi menggunakan kultur campuran?
3. Bagaimana pengaruh waktu fermentasi terhadap identifikasi jenis asam dalam filtrat hasil fermentasi menggunakan kultur campuran?
4. Bagaimana profil senyawa isotiosianat dalam kubis terfermentasi menggunakan kultur campuran?

## 1.3. Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini yaitu:

1. Sampel kubis berasal dari daerah Poncokusumo, Kabupaten Malang.
2. Proses fermentasi pada tanaman kubis (*Brassica oleracea var. capitata*) menggunakan kultur campuran *Lactobacillus plantarum* – *Saccharomyces cerevisiae* dilakukan selama 4 hari.
3. Kondisi optimum yang dipelajari meliputi:
  - Volume inokulum campuran (variasi volume inokulum: 5, 10, 15, 20, dan 25% (v/100 mL akuades)).

- pH media awal (variasi pH: 4, 5, 6, 7)

4. Zat antinutrisi yang dipantau selama fermentasi adalah senyawa tanin.

5. Senyawa golongan isotiosianat yang diidentifikasi meliputi sulforafan dan iberin.

#### **1.4. Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini yaitu:

1. Menentukan volume inokulum campuran *Lactobacillus plantarum* – *Saccharomyces cerevisiae* optimum untuk menurunkan kadar tanin dalam kubis terfermentasi.
2. Menentukan pH media awal yang optimum untuk menurunkan kadar tanin dalam kubis terfermentasi menggunakan kultur campuran.
3. Mengidentifikasi senyawa asam laktat dan asam asetat dalam filtrat hasil fermentasi menggunakan kultur campuran.
4. Mengidentifikasi adanya senyawa isotiosianat dalam kubis terfermentasi menggunakan kultur campuran.

#### **1.5. Manfaat Penelitian**

Manfaat penelitian ini yaitu menghasilkan produk olahan dari kubis dengan kandungan nutrisi yang baik melalui teknik fermentasi menggunakan kultur campuran *Lactobacillus plantarum* – *Saccharomyces cerevisiae*.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Tanaman Kubis (*Brassica oleracea var. capitata*)

Kubis (*Brassica oleracea var. capitata L*) tergolong dalam famili *Brassicaceae* (Richardson, 2013). Sekitar 6,3 kg sayuran *Brassica* dikonsumsi per orang setiap tahun (Rokayya et al., 2014). Kubis dapat dikonsumsi mentah atau diproses dalam berbagai cara, misalnya, direbus, difermentasi (*sauerkraut*), atau digunakan dalam salad yang disebut *coleslaw* (Fahey, 2015; Rokayya et al., 2014).



**Gambar 2.1** Tanaman Kubis (*Brassica oleracea var. capitata*) di daerah Poncokusumo

Kubis merupakan tanaman berbunga dikotil dan terdiri dari daun yang tersusun padat. Kubis tumbuh pada kondisi iklim sedang atau tropis. Sayuran tersebut dapat ditanam dalam berbagai jenis tanah, dengan penyemaian langsung atau ditumbuhkan dalam rumah kaca (Fahey, 2015; Richardson, 2013). Selain itu, sayuran *Brassica* adalah jenis sayuran yang dapat tumbuh dengan baik pada suhu 15–20 °C. Tanaman kubis yang sudah mengeras dapat mentolerir suhu serendah -4 °C. Di bawah irigasi (pasokan air cukup), tanaman kubis dapat dipanen dalam 13–17 minggu. Meskipun beberapa tanaman *Brassica* tidak perlu pendinginan setelah pemanenan, kubis yang disimpan dalam lemari es dapat bertahan hingga 6 bulan. Komposisi nutrien dalam 100 g kubis antara lain (Fahey, 2015; Park, Valan Arasu et al., 2014):

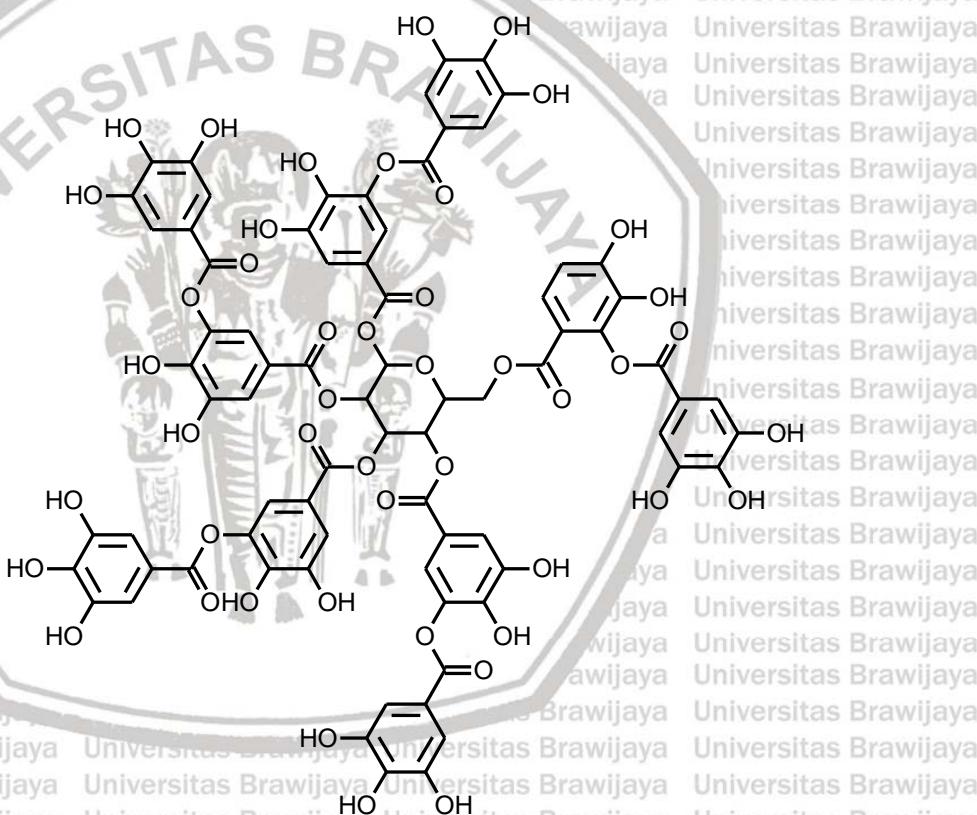
- Kandungan utama: air 92,18 g; energi 25 kkal; protein 1,28 g; lipid total 0,1 g; karbohidrat 5,80 g; serat 2,5 g; abu 0,64 g; gula total 3,2 g;
- Mineral: kalsium 40 mg; besi 0,47 mg; magnesium 12 mg; fosfor 26 mg; kalium 170 mg; natrium 18 mg; seng 0,18 mg; tembaga 0,19 mg; mangan 0,16 mg; selenium 0,3 mg;
- Vitamin: Vit. C 36,5 mg; Vit. B1 0,061 mg; Vit. B2 0,040 mg; niacin 0,234 mg; asam pantotenat 0,212 mg; Vit. B6 0,124 mg; folat 43 µg; Vit. A 98 IU; Vit. E 0,15 IU; Vit. K 76 µg;
- Lipid: lemak jenuh total 0,034 g; *monounsaturated* 0,012 g; *polyunsaturated* 0,08 g; β-karoten 42 µg; lutein 30 µg,
- Asam amino: Kubis mengandung 22 jenis asam amino, dengan kadar total berkisar antara 365,9 mg - 1089,1 mg/100 g kubis segar. Asam amino esensial yang terkandung dalam kubis antara lain (5,04–13,90 % total asam amino): arginin, histidin, isoleusin, leusin, lisin, metionin, fenilalanin, triptofan, dan valin. Asam amino lain yang terdeteksi adalah aspartat, glutamat, asparagin, serin, vitamin U, glutamin, glisin, treonin, alanin, GABA, tirosin, sistein, norvalin. Keseluruhan asam amino bebas tersebut berperan dalam menjaga kualitas dan rasa kubis, seperti rasa manis dari glisin dan alanin, rasa pahit dari valin dan leusin, dan rasa asam dari asam aspartat dan glutamat.

## 2.2.Tanin

Kubis mengandung beberapa zat antinutrisi. Zat antinutrisi adalah senyawa kimia yang secara alami berasal dari metabolisme dalam tanaman dan dapat memberikan efek merugikan bagi manusia (Fekadu Gemedé, 2014). Zat antinutrisi umumnya disintesis oleh tanaman untuk melindungi diri dari serangan mikroorganisme tertentu. Namun, zat tersebut dapat menurunkan ketersediaan nutrisi lain seperti protein, vitamin, dan mineral, sehingga mempengaruhi nilai gizi tanaman (Fekadu Gemedé, 2014; Sinha & Khare, 2017). Salah satu zat antinutrisi yang ditemukan dalam kubis adalah senyawa tanin (Mosha et al., 1995; Ogbode et al., 2015).

Tanin yang terkandung dalam sayuran merupakan senyawa polifenol dengan berat molekul yang relatif tinggi (hingga 20.000 Da) (Natesh N et al.,

2018) dan dapat menyebabkan rasa pahit dalam tanaman (Fekadu Gemede, 2014; Ogbede et al., 2015). Berdasarkan struktur dan sifatnya, tanin dalam tanaman dibagi menjadi dua kelompok, yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terkondensasi terbentuk dari kondensasi senyawa katetin dengan ikatan ganda seperti D-katekin, L-epikatekin, atau L-epigalokatekin. Jenis tanin terkondensasi banyak ditemukan dalam bagian kayu atau kulit kayu tanaman. Sementara itu, tanin terhidrolisis merupakan senyawa fenolik yang berikatan dengan glukosa atau galat, seperti asam tanat, metil galat, dan klororganat. Tanin terhidrolisis banyak ditemukan pada daun, buah, akar, dan biji (Beniwal et al., 2014; Matsuda et al., 2016).

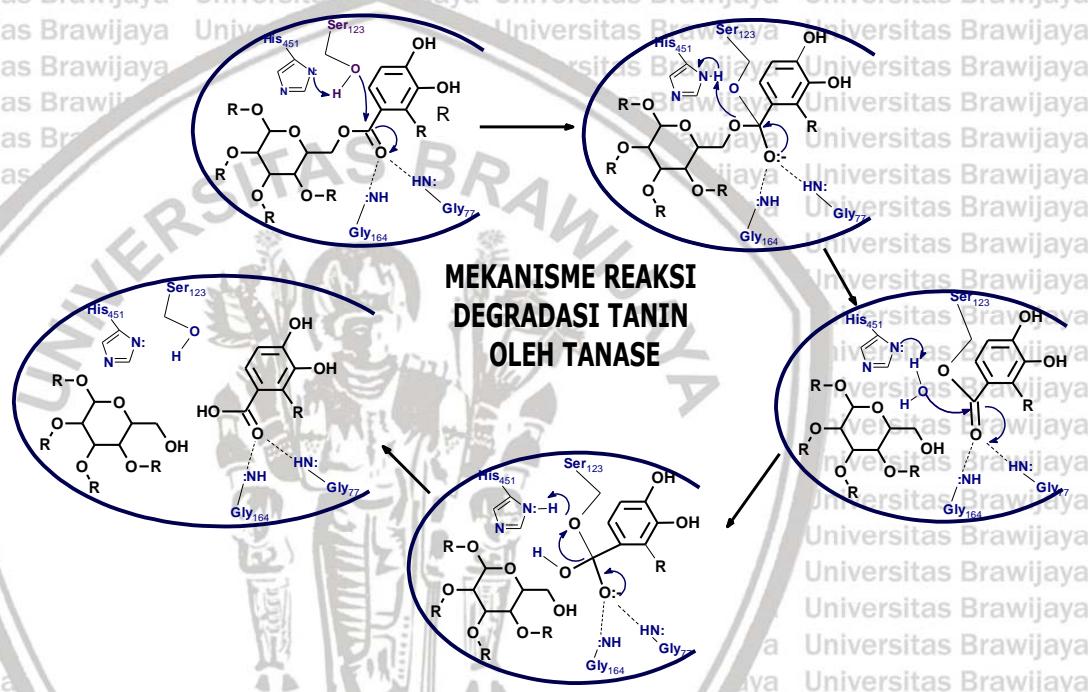


**Gambar 2.2** Struktur senyawa asam tanat (tanin terhidrolisis) (Beniwal et al., 2014)

Kandungan tanin dalam kubis diperkirakan sebesar 2,84 mg/100 g berat

kering (Ogbede et al., 2015). Namun, Mosha, et al. (1995), menunjukkan bahwa kubis mengandung jenis tanin terhidrolisis (galotanin) yaitu asam tanat sebesar 1266 mg/100 gram berat segar (Mosha et al., 1995). Tanin memiliki

efek antinutrisi dengan mengganggu asupan protein ke dalam tubuh (Liener, 1998). Tanin dapat membentuk kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen dan ikatan kovalen membentuk substrat yang tahan terhadap enzim pencernaan. Kedua, tanin dapat berikatan secara langsung dengan enzim pencernaan, seperti enzim tripsin, kemotripsin, amilase, dan lipase. Kedua hal tersebut menyebabkan protein tidak dapat diserap dengan baik, sehingga mengganggu ketersediaan dan pemanfaatan protein dalam tubuh (Fekadu Gemedee, 2014; Liener, 1998; Natesh Net al., 2018).



**Gambar 2.3** Mekanisme reaksi hidrolisis tanin menjadi glukosa dan asam galat oleh tanase (Ren et al., 2013)

Senyawa tanin dapat dihidrolisis oleh asam atau enzim tanase (E.C.3.1.1.20 tanin asil hidrolase). Enzim tersebut mengkatalisis pemecahan ester dalam tanin terhidrolisis, sehingga membebaskan glukosa dan asam galat (Beniwal et al., 2014; Jiménez et al., 2014; Natarajan & Rajendran, 2009).

Berdasarkan struktur kristalnya, mekanisme hidrolisis oleh enzim tanase pada substrat tanin ditunjukkan oleh **Gambar 2.3**. Ketika berikatan dengan substrat, gugus hidroksil dari Ser163 akan memulai serangan nukleofilik pada karbonil dari unit galloil. Serangan itu dibantu oleh His451 yang bertindak

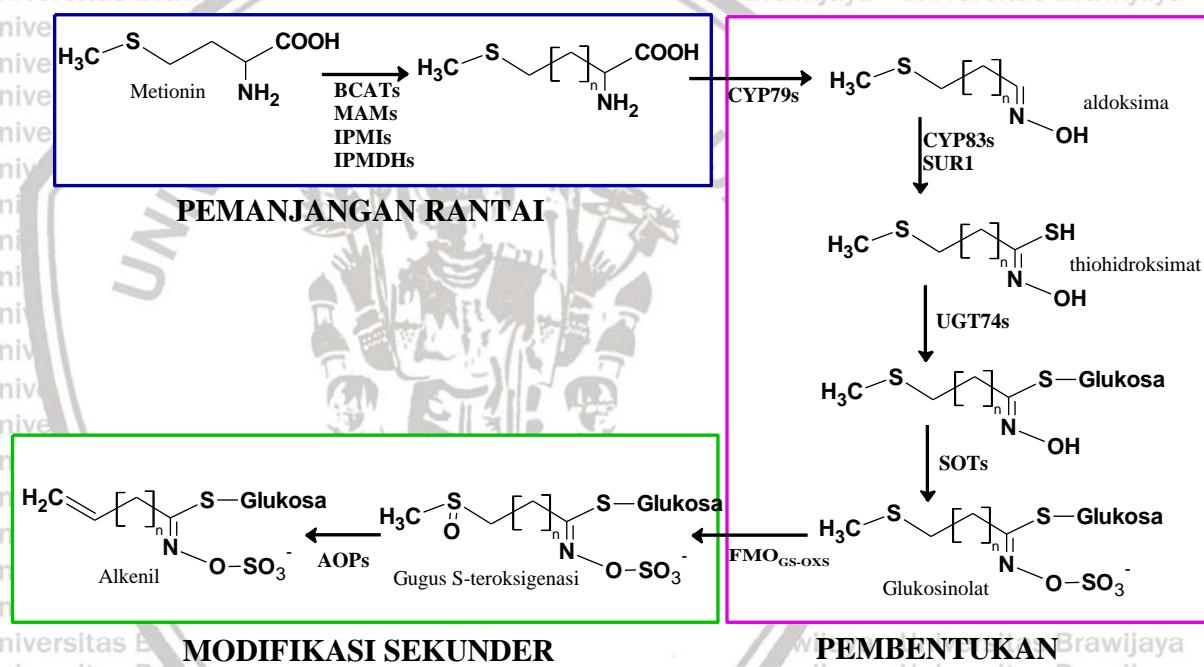
sebagai basa, sehingga terbentuk intermediet tetrahedral yang distabilkan oleh interaksi ikatan hidrogen dengan Gly77 dan Gly164 yang membentuk lubang oksianion. Selanjutnya, His451-H akan bertindak sebagai asam umum dan intermediet tetrahedral tersebut akan terdegradasi untuk menghasilkan produk alkohol dan intermediet asil-enzim. Molekul air kemudian teraktivasi oleh His451 untuk menyerang asil-enzim dan membentuk intermediet tetrahedral kedua, yang akan terdegradasi melepaskan asam galat dan meregenerasi enzim (Ren et al., 2013).

### 2.3. Glukosinolat

Glukosinolat merupakan golongan senyawa metabolit sekunder yang ditemukan di *Brassicaceae*, dan terdiri dari tiga bagian:  $\beta$ -tioglukosa, oksim sulfonasi, dan rantai samping yang berasal dari asam  $\alpha$ -amino (Ishida et al., 2014). Senyawa golongan glukosinolat dapat digolongkan menjadi tiga kelas berdasarkan struktur prekursor asam amino yang berbeda: glukosinolat alifatik (berasal dari alanin, leusin, isoleusin, valin, dan metionin), glukosinolat indol (berasal dari triptofan), dan glukosinolat aromatik (berasal dari fenilalanin atau tirosin) (Ishida et al., 2014; Radojcic et al., 2008). Komposisi dan isi glukosinolat dipengaruhi oleh kondisi genotip, iklim, dan budidaya termasuk pemupukan, waktu panen, dan letak tanaman (Ishida et al., 2014). Senyawa glukosinolat yang telah teridentifikasi dalam sayuran kubis antara lain (tiap 100 g berat segar kubis): sinigrin (60,38  $\mu\text{mol}$ ), glukoiberin (46,04  $\mu\text{mol}$ ), glukobrasisin (18,30  $\mu\text{mol}$ ), glukonapin (14,17  $\mu\text{mol}$ ), glukorafanin (7,57  $\mu\text{mol}$ ), glukoiberverin (2,11  $\mu\text{mol}$ ), progoitrin (1,23  $\mu\text{mol}$ ), dan senyawa lain dalam jumlah kecil yaitu glukoerisin, glukoerisolin, glukotropaeolin, glukonasturtin (Palani et al., 2016; Vig et al., 2009).

Jalur biosintesis glukosinolat terdiri dari tiga tahap: perpanjangan rantai asam amino, konversi gugus amino menjadi struktur glukosinolat inti, dan modifikasi rantai samping (**Gambar 2.4**). Proses pertama dari perpanjangan rantai adalah deaminasi asam amino seperti metionin menjadi asam okso oleh asam amino rantai cabang aminotransferase (BCAT), lalu diperpanjang dengan penambahan satu gugus metilena oleh aktivitas metilalkil malat sintase (MAM), isopropilmalat isomerase (IPMI), dan isopropilmalat dehidrogenase (IPDH).

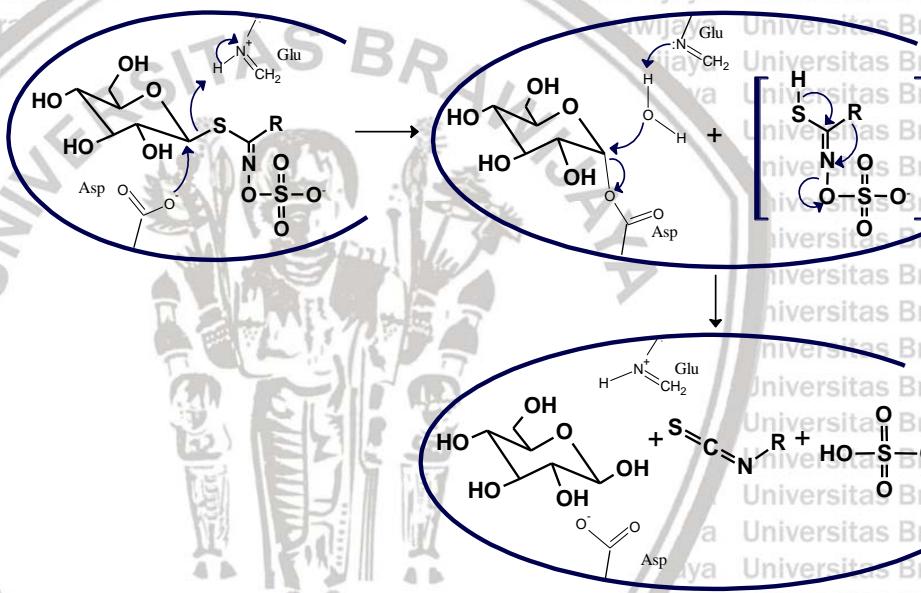
(IPMDH). Asam okso tersebut ditransformasikan ke asam amino yang sesuai oleh BCAT. Kemudian, asam amino mengalami proses pembentukan struktur inti glukosinolat. Asam amino diubah menjadi aldoksima oleh sitokrom P450 (CYP79s) yang kemudian dioksida menjadi bentuk yang diaktifkan oleh CYP83s. Bentuk aktif tersebut diubah menjadi tiohidroksimat melalui reaksi konjugasi glutathione dan liase C-S (SUR1). Tiohidroksimat diubah menjadi struktur glukosinolat oleh S-glukosiltransferase. Setelah pembentukan struktur glukosinolat, rantai samping dimodifikasi dengan berbagai cara seperti oksigenasi, hidrosilasi, alkenilasi, benzoilasi, dan metoksilasi (Ishida et al., 2014; Radojcic et al., 2008).



**Gambar 2.4** Biosintesis senyawa glukosinolat dalam tanaman *Brassicaceae* (Ishida et al., 2014)

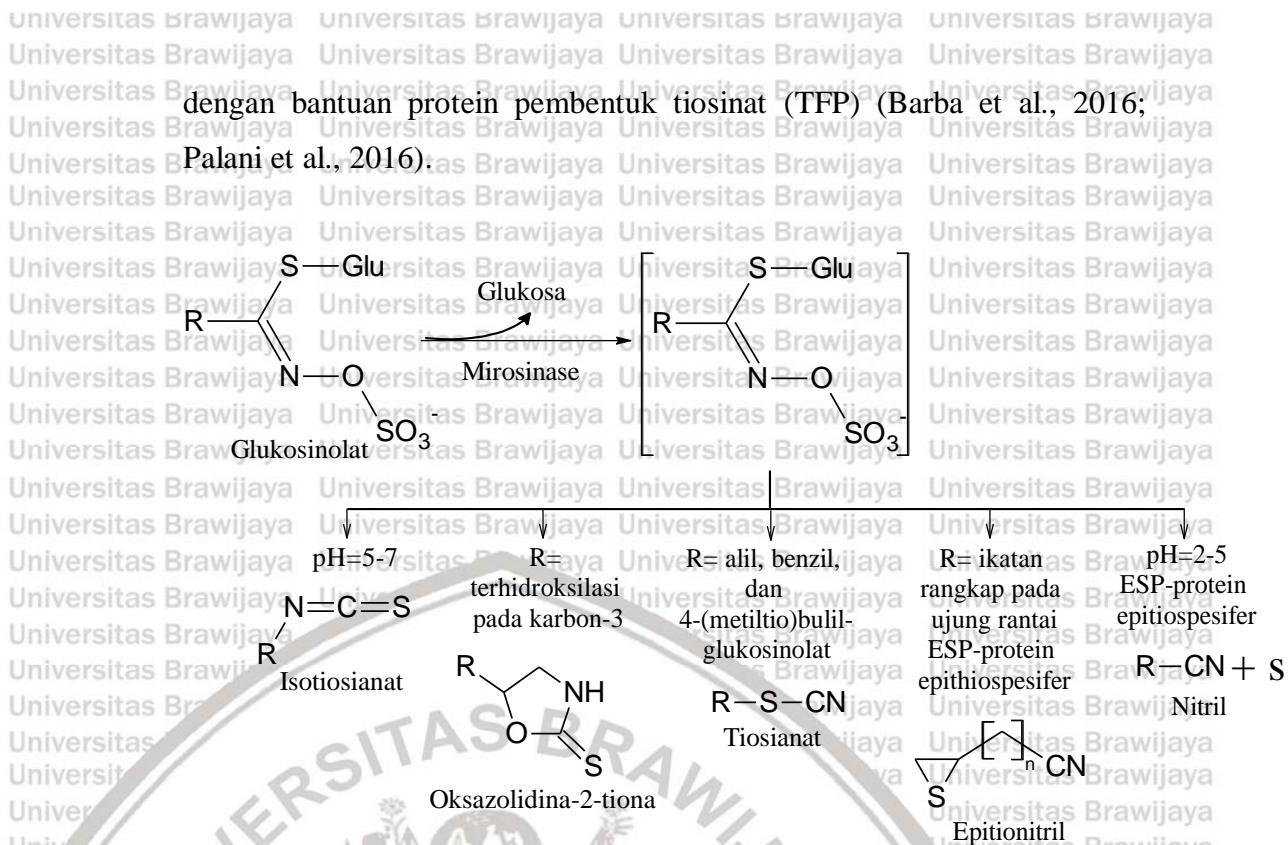
Glukosinolat sendiri bukan senyawa bioaktif. Namun, glukosinolat dapat diubah menjadi senyawa bioaktif oleh enzim mirosinase (tioglukosida glikohidrolase E.C.3.2.3.1) yang teraktivasi oleh disruptor atau gangguan sel-sel tanaman (Barba et al., 2016; Palani et al., 2016; Radojcic et al., 2008).

glukosinolat menjadi intermediet yang tidak stabil melalui penghilangan bagian glukosa, yang kemudian terdegradasi lebih lanjut membentuk berbagai produk, seperti isotiosianat, tiosianat, nitril, epitionitril (Palani et al., 2016). Secara umum, mekanisme hidrolisis glukosinolat oleh enzim mirosinase ditunjukkan oleh **Gambar 2.5**. Sisi aktif mirosinase mengandung asam dan gugus anionik nukleofilik, yang masing-masing diwakili oleh residu histidil dan gugus karboksilat (masing-masing berasal dari glutamil atau aspartil). Residu histidil memungkinkan transfer proton dari enzim ke substrat. Sementara itu, gugus karboksilat bertindak sebagai nukleofilik pada karbon anomerk dari heksosidik (Iori, et al., 1996).



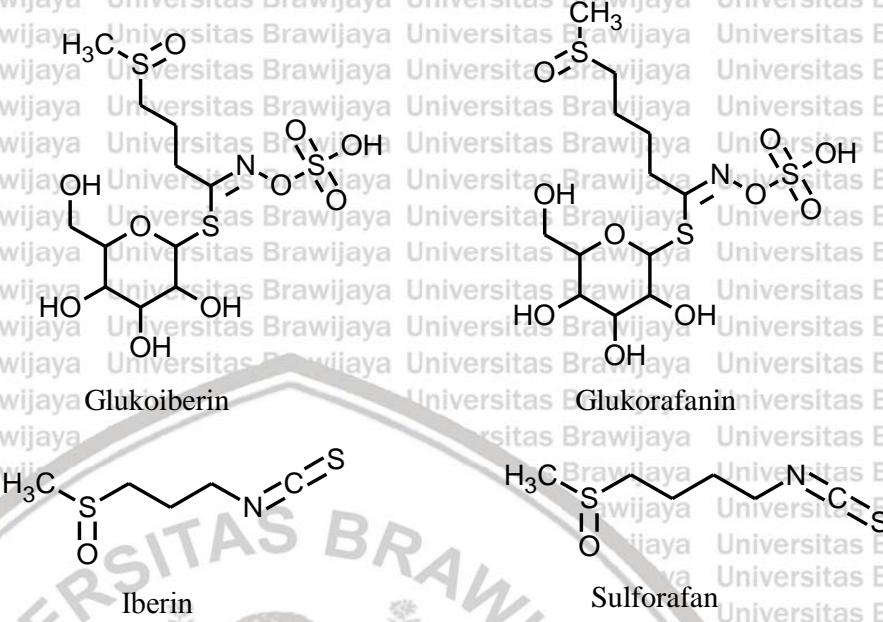
**Gambar 2.5** Mekanisme reaksi hidrolisis glukosinolat menjadi senyawa isotiosianat oleh enzim mirosinase (Iori et al., 1996)

Produk hidrolisis yang terbentuk tergantung pada struktur rantai samping dan kondisi fisiko-kimia media (Barba et al., 2016). Pada kondisi netral, glukosinolat dapat terhidrolisis menghasilkan isotiosianat. Pada pH asam dan dengan adanya ion  $\text{Fe}^{2+}$ , terjadi pembentukan nitril, sedangkan penambahan faktor protein seperti protein epitiospesifer (ESP) terbukti mampu mendegradasi glukosinolat menjadi epitionitril. Sementara itu, tiosianat terbentuk dari benzil-, alil-, dan 4-metilsulfinilbutil-glukosinolat



Gambar 2.6 Degradasi glukosinolat oleh enzim mirosinase (Radojcic et al., 2008)

Produk isotiosianat diketahui memiliki berbagai fungsi biologis, seperti antikanker (Vig et al., 2009). Sulforafan yang berasal dari glukorafanin memiliki aktivitas antikanker terhadap sel kanker paru-paru A-549 (Farag & Motaal, 2010). Iberin (diisolasi dari *Lesquerella fendleri*) yang merupakan turunan glukoiberin mampu menginduksi apoptosis dan antiproliferasi sel neuroblastoma (sel kanker saraf tepi) melalui penghambatan CDK 2, 4, 6 dan caspace 3,9 (Jadhav et al., 2007). Indol-3-karbinol dari glukobrasisin mampu menghambat aktivitas sel kanker hepatoseluler HepG2 melalui induksi enzim antioksidan seperti katalase (CAT), superoksida dismutase (SOD), glutathione reduktase (GR), glutathione peroksidase (GPx), dan enzim detoksifikasi fase II GST atau NQO1, baik pada tingkat mRNA maupun protein melalui persinyalan ARE/Nrf2/Keap 1 (Krajka-Kuźniak et al., 2015). Alilisotiosianat dan fenetilisotiosianat yang masing-masing berasal dari turunan sinigrin dan glukonasturtin memiliki aktivitas antikanker dengan cara menginduksi



**Gambar 2.7** Beberapa struktur glukosinolat dan turunan isotiosianat (Pubchem)

#### 2.4. *Lactobacillus plantarum*

*Lactobacillus plantarum* adalah kelompok bakteri Gram-positif dan bersifat anaerob fakultatif heterofermentatif (Batt, 2014; Behera et al., 2018; Matejčeková et al., 2016). Bakteri tersebut berbentuk batang lurus dengan ujung bulat, 0,9–1,2 x 3,0–8,0 mm, dan terdapat dalam bentuk tunggal, berpasangan, atau dalam rantai pendek (Corsetti & Valmorri, 2011). *L. plantarum* tidak membentuk spora, bersifat non-motil, mikroaerofilik, dan mesofilik (Corsetti & Valmorri, 2011; Matejčeková et al., 2016).

Pertumbuhan optimal *Lactobacillus* yaitu pada suhu 30–40 °C, terutama pada suhu 37 °C, tetapi bakteri tersebut dapat tumbuh pada kisaran suhu 5–53 °C.

*L. plantarum* memiliki pH pertumbuhan optimal 5,5–5,8, tetapi bakteri tersebut juga dapat tumbuh pada pH <5 (Batt, 2014). Berikut adalah taksonomi dari *Lactobacillus plantarum* (Behera et al., 2018):

Domain : *Bacteri*

Filum : *Firmicutes*

Kelas : *Bacilli*

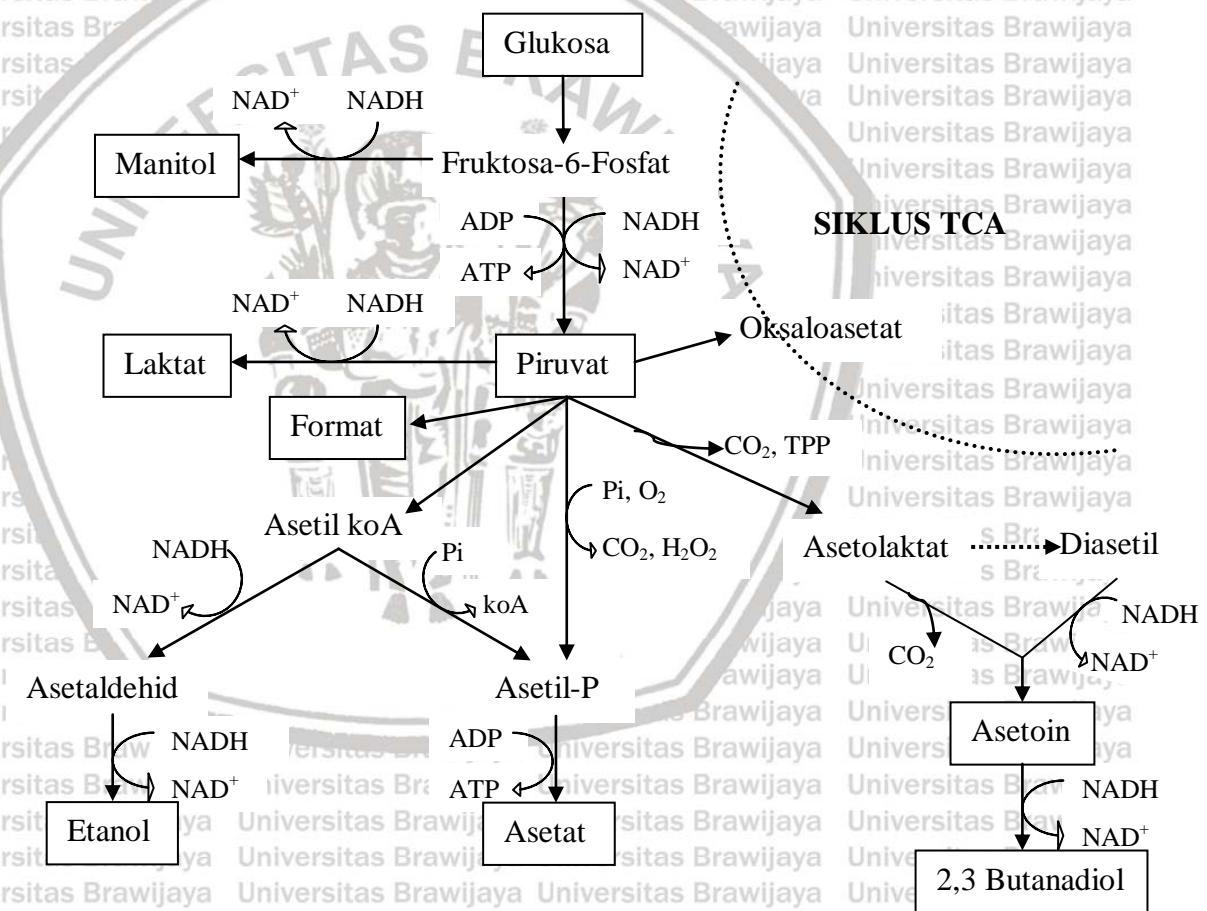
Ordo : *Lactobacillales*

Famili : *Lactobacillaceae*  
Genus : *Lactobacillus*  
Spesies : *Lactobacillus plantarum*

*Lactobacillus plantarum* adalah salah satu spesies bakteri asam laktat yang sering digunakan dalam fermentasi sayuran dan buah-buahan (Filannino et al., 2014), karena bakteri tersebut telah mendapatkan status *Generally Recognized as Safe* (GRAS) dan *Quantified Presumption of Safety* (QPS) oleh FAO dan WHO (Behera et al., 2018). *Lactobacillus plantarum* dapat mengkonversi gula heksosa dan pentosa menjadi asam laktat. Baik asam L- dan D-laktat diproduksi oleh laktat dehidrogenase bergantung NAD (LDH) dari amigdalina, arabinosa, selobiosa, fruktosa, galaktosa, glukosa, glukonat, laktosa, maltosa, manitol, manosa, melibiosa, rafinosa, ribosa, salisin, sorbitol, sukrosa, dan trehalosa. *L. plantarum* juga dapat menghasilkan berbagai produk sekunder lain dari piruvat, tergantung kondisi kultur. Sebagai contoh, dengan adanya oksigen, pH netral-basa, dan akseptor elektron eksternal (sitrat), glukosa dapat diubah menjadi asetat dan etanol melalui asetilfosfat. Selain itu, *L. plantarum* dapat menghasilkan diasetil, asetoin, dan 2,3-butanadiol dari metabolisme sitrat melalui asetolaktat. Melalui fermentasi malolaktat, *L. plantarum* mengubah asam malat menjadi asam laktat dan CO<sub>2</sub>, yang merupakan metabolisme penting dalam produksi beberapa jenis anggur (Corsetti & Valmorri, 2011).

*L. plantarum* diketahui memiliki enzim tanase. Beberapa penelitian telah berhasil memproduksi enzim tanase dari bakteri *L. plantarum* melalui proses fermentasi. Penelitian oleh Natarajan & Rajendran (2009) telah mempelajari kondisi optimum produksi enzim tanase ekstraseluler dengan cara menumbuhkan kultur *L. plantarum* pada media yang mengandung 0,35% asam tanat. Bakteri tersebut mampu memproduksi enzim tanase dengan suhu optimum 30 °C, pH 6, dan kecepatan agitasi optimum 125 rpm, serta memiliki aktivitas sebesar 9,29 U/mL (Natarajan & Rajendran, 2009). Penelitian lain oleh Matsuda et al. (2016) juga telah berhasil mengkarakterisasi enzim tanase yang dihasilkan dari strain *L. plantarum* H78 (dari serelia jelai) pada media yang mengandung 0,1% asam tanat. Enzim tanase yang dihasilkan dari proses

fermentasi tersebut memiliki massa molekul protein monomer sebesar 50–60 kDa, stabil pada pH 5–6 dan suhu 4–30 °C, dan aktivitasnya diinduksi dengan adanya ion magnesium, tetapi dihambat oleh ion tembaga, mangan, kalsium, besi, dan merkuri (Matsuda, et al., 2016). Selain itu, Jiménez et al. (2014) juga telah berhasil mengkarakterisasi enzim tanase dari *L. plantarum* ATCC 1497T. Enzim tanase yang berasal dari strain tersebut merupakan enzim ekstraseluler, dengan massa molekul protein 67 kDa, terdiri dari 626 asam amino, dan titik isoelektrik 9,94. Tingkat ekspresi enzim tanase pada bakteri tersebut tidak diinduksi oleh adanya substrat dan memiliki aktivitas spesifik dalam mendegradasi asam tanat sebesar 39 U/mg (Jiménez, et al., 2014).



**Gambar 2.8** Skema metabolisme *Lactobacillus plantarum* (Corsetti & Valmorri, 2011)

## 2.5. *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* merupakan ragi paling dominan dalam fermentasi alkohol (G. M. Walker & Walker, 2018). *S. cerevisiae* berbentuk

oval dengan diameter besar 5–10  $\mu\text{m}$  dan diameter kecil sekitar 5  $\mu\text{m}$ .

Berikut adalah taksonomi dari *S. cerevisiae* (ITIS Report for *S. cerevisiae*):

Kingdom : *Fungi*

Divisiya : *Ascomycotina*

Kelas : *Saccharomycetes*

Ordo : *Saccharomycetales*

Famili : *Saccharomycetaceae*

Genus : *Saccharomyces*

Spesies : *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* dapat tumbuh dengan baik pada pH 4–6,5. Suhu ideal untuk

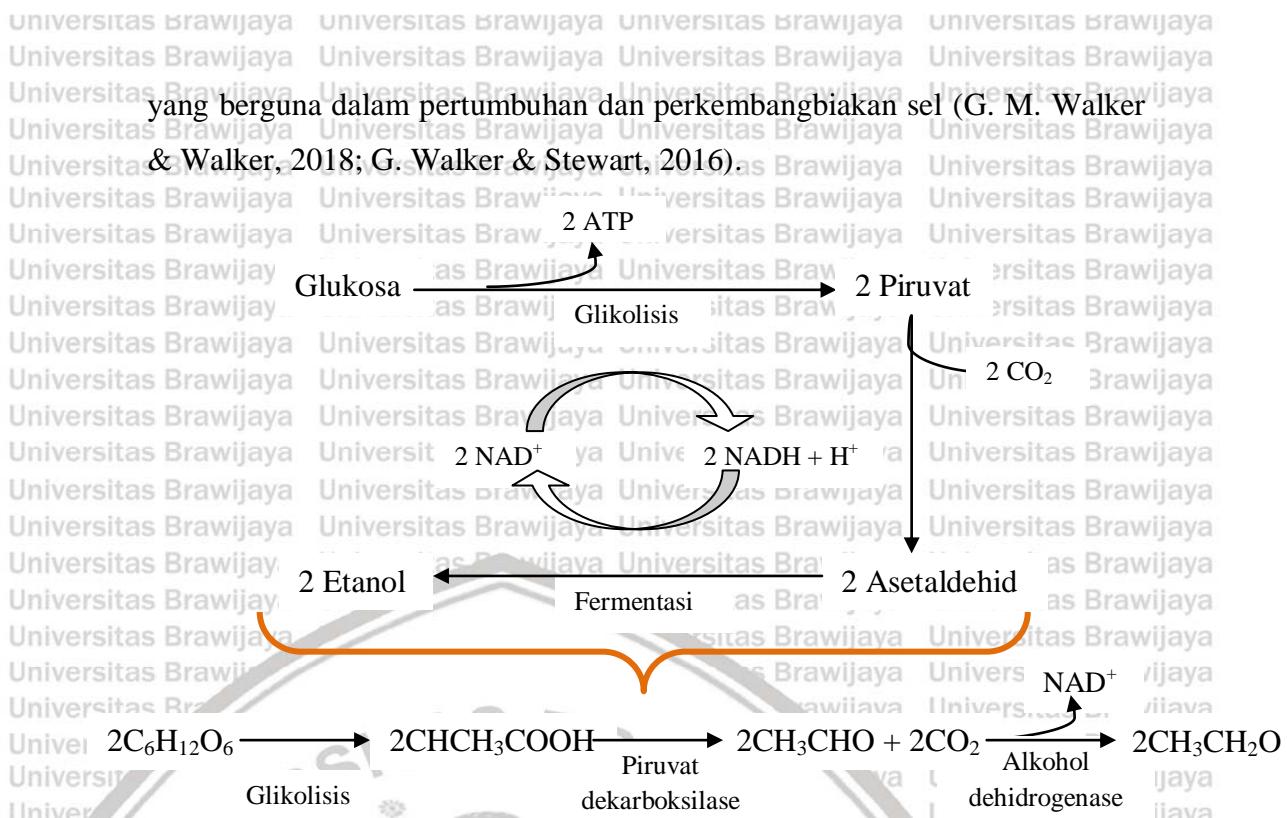
pertumbuhan ragi tersebut adalah 20–35 °C (Liu et al., 2015; Siti Hajar et al.,

2017; G. M. Walker & Walker, 2018). *S. cerevisiae* merupakan

mikroorganisme anaerob fakultatif, sehingga masih membutuhkan oksigen dalam jumlah sedikit sebagai faktor pertumbuhannya. Sel tersebut membutuhkan karbon, nitrogen, dan fosfor sebagai nutrisi pertumbuhannya.

Sumber karbon untuk pertumbuhan ragi dapat berupa glukosa, galaktosa, maltosa, sukrosa, dan fruktosa (G. Walker & Stewart, 2016). Sumber nitrogen umumnya dapat diperoleh dari amonia dan urea, sedangkan sumber fosfat dapat berasal dari dihidrogen fosfat (Salari & Salari, 2017).

Terdapat dua tahap utama fermentasi alkohol oleh *Saccharomyces cerevisiae*. Pada tahap pertama, gula akan diubah menjadi asam piruvat melalui jalur glikolisis. Reaksi ini berfungsi menyediakan energi bagi sel ragi (ATP) untuk metabolisme fermentasi berikutnya dan mereduksi  $\text{NAD}^+$  menjadi  $\text{NADH}$  yang dimanfaatkan sebagai energi untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan sel. Selanjutnya, piruvat yang dihasilkan akan diubah menjadi etanol dengan meregenerasi  $\text{NAD}^+$  kembali. Konversi asam piruvat menjadi etanol terbagi menjadi dua tahap besar. Mula-mula, asam piruvat akan didekarboksilasi menjadi asetaldehid oleh enzim piruvat dekarboksilase. Asetaldehid yang dihasilkan akan diubah menjadi etanol oleh enzim alkohol dehidrogenase. Pada dasarnya, tujuan utama fermentasi alkohol bagi ragi adalah untuk reproduksi sel. Namun, etanol akan diproduksi selama proses tersebut untuk mempertahankan keseimbangan redoks dan ketersediaan ATP,



**Gambar 2.9** Reaksi enzimatis dalam fermentasi oleh ragi (G. M. Walker & Walker, 2018)

## 2.6. Fermentasi

Fermentasi adalah metabolisme substrat (terutama senyawa organik) nonrespirasi oleh aktivitas enzim atau mikroorganisme yang dapat menyebabkan modifikasi atau perubahan komposisi biokimia bahan. Proses fermentasi banyak dikembangkan pada industri makanan karena mampu memperbaiki keamanan dan masa simpan bahan, memperbaiki nutrisi, dan memodifikasi organoleptik (rasa, tekstur, warna) (Behera et al., 2018; Septembre-Malaterre et al., 2018). Secara tradisional, fermentasi umumnya diawali dengan penambahan garam atau pengaturan kondisi anaerobik, yang bertujuan untuk mengganggu keseimbangan mikrobiota alami dalam substrat dan menyaring mikroflora tertentu yang tahan garam dan kondisi anaerobik (Septembre-Malaterre et al., 2018).

Metode fermentasi dapat dibagi menjadi dua, yaitu fermentasi terendam (SF) dan fermentasi padat (SSF). Pada fermentasi terendam, kultur mikroorganisme dilakukan dalam media cair. Metode tersebut melibatkan pertumbuhan mikroorganisme (bakteri dan jamur) dalam wadah tertutup yang

mengandung kaldu (*broth*) yang diperkaya nutrisi dan oksigen. Sementara itu, fermentasi padat (SSF) melibatkan penanaman mikroorganisme pada substrat padat (Renge et al., 2012). Secara umum, proses fermentasi terdiri dari (Stanbury, 2017):

1. Penentuan media yang digunakan dalam kultur organisme selama pengembangan inokulum dan produksi/ proses fermentasi
2. Sterilisasi media, tempat, dan alat-alat yang berkaitan
3. Produksi kultur murni, aktif dalam kuantitas yang memadai untuk tahap inokulasi
4. Pertumbuhan organisme dalam fermenter dengan kondisi optimum
5. Ekstraksi produk dan purifikasi
6. Penghilangan efluen yang diproduksi selama proses

Pertumbuhan mikroorganisme dan produksi metabolit selama proses fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu inokulum, komponen media, dan faktor fisik seperti suhu, pH, konsentrasi substrat (Norouzian, 2008; Lin et al., 2014; Zhou et al., 2018; Sariaslani, 2009):

- Inokulum

Inokulum sangat berpengaruh dalam proses fermentasi. Jumlah atau konsentrasi, tipe (spora atau vegetatif, terutama untuk golongan jamur), umur, dan viabilitas inokulum terutama dapat mempengaruhi produksi pellet. Penentuan ukuran atau jumlah inokulum selama proses fermentasi umumnya bertujuan untuk mencapai reproduksibilitas proses dan aktivitas inokulum, dan menurunkan fasa lag jika media yang digunakan untuk kultivasi dan fermentasi berbeda (Sariaslani, 2009).

- pH
- pH dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme, yang pada gilirannya mempengaruhi laju produksi (Norouzian, 2008). Selain itu, pH juga berperan dalam menentukan jalur fermentasi, sehingga mampu menentukan produk fermentasi atau menggeser biosintesis metabolit secara umum ketika produk target adalah asam organik (Lin et al., 2014; Norouzian, 2008). Hal ini dapat dilihat pada fermentasi etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae*. Pada pH yang lebih rendah dari 5, glukosa

dapat dikonversi menjadi etanol dan asam asetat sebagai produk utamanya.

Namun, pada pH di atas 5, glukosa dapat diubah menjadi etanol dan produk samping, terutama asam butirat (Lin et al., 2014).

- Komponen media

Setiap komponen dalam sistem kultur berpengaruh terhadap perkembangbiakan sel. Media yang dipilih harus memiliki efek yang baik pada pertumbuhan dan pembentukan produk. Beberapa hal yang perlu dipertimbangkan dalam optimasi media (Sariaslani, 2009; Norouzian, 2008):

- Rasio karbon:nitrogen (C:N). Rasio C:N penting karena dapat mempengaruhi hasil, efisiensi pertumbuhan sel, produksi metabolit, dan kandungan protein dalam mikroorganisme yang digunakan (Sariaslani, et. al., 2009). Sumber karbon berfungsi untuk menjaga dan mengembangkan keadaan dinamis sel (Norouzian, 2008), sedangkan nitrogen berperan penting dalam produksi metabolit, terutama pada jamur. Sumber nitrogen yang digunakan dalam fermentasi meliputi sumber anorganik (nitrit, nitrat, garam ammonium) atau organik (kasein, pepton, asam amino). Selain itu, molase, bubuk *whey*, bubuk kedelai, dan ekstrak ragi juga dapat digunakan karena bahan tersebut kaya akan nitrogen (Sariaslani, et. al., 2009).

- Sumber mineral. Mikroorganisme juga membutuhkan nutrien mikro seperti kalsium, kalium, magnesium, dan zinc. Kalsium memiliki efek dalam pertumbuhan jamur, yaitu (1) mengubah permeabilitas membran sel dengan mengatur gradien  $\text{Ca}^{2+}$  internal dan aktivitas enzim yang terlibat dalam ekspansi dinding sel, dan (2) menghambat sintesis biopolimer melalui gradien  $\text{Ca}^{2+}$  internal, mempengaruhi protein, dan kandungan gula. Magnesium dan kalium juga berperan penting, karena magnesium merupakan kofaktor dalam reaksi enzimatis dan menstabilisasi membran plasma, sedangkan kalium meregulasi potensial osmotik dan tekanan turgor sel. Zinc memainkan peran penting dalam metabolisme intermediat dan sintesis DNA, RNA, terutama dalam jamur *Agaricus*, *Volvariella*, dan *Psathyrella*. Namun,

beberapa ion logam juga bersifat toksik, seperti kobalt dan mangan.

Penting untuk diketahui bahwa kebutuhan nutrien mikro tergantung pada galur dan media yang digunakan (Sariaslani, 2009).

- **Suhu**

Suhu dapat mempengaruhi sensitivitas mikroorganisme terhadap konsentrasi produk, laju pertumbuhan sel, fungsi membran, laju fermentasi, dan lama fasa lag (Norouzian, 2008; Y. Zhou et al., 2018). Umumnya, suhu yang tinggi menghasilkan laju reaksi yang lebih cepat, dan mempercepat pertumbuhan atau sintesis produk. Namun, saat suhu melebihi suhu pertumbuhan optimum dari mikroorganisme, maka terjadi inaktivasi dan denaturasi enzim, sehingga dapat menyebabkan kematian mikroorganisme dan berdampak pada penurunan siklus fermentasi (Y. Zhou et al., 2018). Selain itu, suhu yang terlalu tinggi ( $>50^{\circ}\text{C}$ ), dapat menyebabkan perubahan aktivitas transpor sel, sehingga meningkatkan akumulasi produk berlebihan yang bersifat toksik bagi sel. Suhu yang lebih tinggi juga mampu mendenaturasi ribosom dan mengganggu fluiditas membran (Lin et al., 2014). Oleh karena itu, fermentasi harus dilakukan pada kondisi suhu yang sesuai.

- **Konsentrasi substrat**

Konsentrasi substrat yang tinggi dapat menghasilkan produk yang tinggi, tetapi membutuhkan waktu inkubasi yang lebih lama. Namun, konsentrasi substrat yang terlalu tinggi, sebagai contoh sekitar  $>300 \text{ kg/L}$  selama proses fermentasi etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* menggunakan subtrat gula, justru dapat menghambat proses fermentasi. Hal ini dikarenakan substrat yang tinggi menyebabkan produksi konsentrasi etanol yang sangat tinggi, sehingga membuat pH optimum berubah, dan mengarah pada penurunan aktivitas ragi (Lin et al., 2014).

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

- Metabolit primer – etanol, asam laktat, asam asetat, asam amino, protein, dan asam sitrat
- Seluruh produk sel – ragi roti dan ragi bir, kultur starter

- Metabolit sekunder – antibiotik, senyawa antitumor, senyawa antijamur, dan bioinsektisida
  - Senyawa penyimpanan energi – gliserol, polimer, minyak, dan polisakarida
  - Protein – enzim ekstraseluler dan intraseluler, protein sel tunggal, dan protein rekayasa genetika.
- Metabolit primer dan seluruh produk sel diproduksi selama fase pertumbuhan. Fasa produksi metabolit primer setara dengan fasa log, disebut sebagai trofofase. Produk lainnya, seperti metabolit sekunder dan senyawa penyimpanan energi, umumnya diproduksi setelah pertumbuhan kultur atau fasa stationer. Fasa tersebut juga dapat disebut sebagai idiofase. Sementara itu, beberapa produk lain seperti protein rekayasa genetika bergantung pada fungsi metabolismik seluler (Anderson, 2009; Stanbury, 2017).

## 2.7. Fermentasi Kultur Campuran dengan *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* banyak digunakan dalam fermentasi bahan pangan bersama dengan bakteri asam laktat. *S. cerevisiae* diketahui mampu mensekresikan faktor terlarut yaitu asam amino glutamin, treonin, fenilalanin, triptofan, dan serin yang dapat membantu meningkatkan pertumbuhan bakteri asam laktat *L. plantarum* (Ponomarova et al., 2017). Sementara itu, *L. plantarum* juga diketahui mampu menstimulasi pertumbuhan *S. cerevisiae*. Bakteri tersebut memiliki enzim pendegradasi laktosa yaitu  $\beta$ -galaktosidase yang tidak dimiliki oleh ragi. Galaktosa dan glukosa yang dihasilkan dari proses hidrolisis laktosa dapat digunakan sebagai sumber karbon bagi ragi. Selain itu, asam laktat yang diproduksi oleh *L. plantarum* juga diketahui meningkatkan aktivitas *S. cerevisiae*. Ketika ragi ditumbuhkan dalam media YPD selama 24 jam pada suhu 30 °C dan pH 6,5 dengan penambahan asam laktat 0,22%, terdapat peningkatan nilai pH menjadi 8 pada akhir proses fermentasi. Sementara itu, terdapat penurunan pH menjadi 6,1 ketika ragi ditumbuhkan dalam media serupa tanpa asam laktat. Hal ini mengindikasikan bahwa ragi mengkonsumsi asam laktat selama

pertumbuhannya (Sieuwerts et al., 2018). Beberapa penelitian juga telah menunjukkan manfaat fermentasi dengan kultur campuran *L. plantarum* – *S. cerevisiae* terhadap kualitas produknya. Cuka lemon yang dihasilkan dari proses fermentasi menggunakan campuran *L. plantarum* dan *S. cerevisiae* (masing-masing 2% (v/v)) pada suhu 33 °C, pH 4, selama 5 hari memiliki kandungan antioksidan, asam amino, dan asam yang lebih tinggi dibandingkan dengan fermentasi menggunakan kultur tunggal *S. cerevisiae* (Chen et al., 2017). Selain itu, Oboh (2016) juga berhasil menurunkan kandungan zat antinutrisi (sianida dan asam fitat) dan meningkatkan protein pada kulit singkong yang diinokulasi dengan cairan yang mengandung campuran *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus coryneformis*, dan *S. cerevisiae* (2:1:1) selama 7 hari pada suhu 30 °C (Oboh, 2006).

## 2.8. Spektronik 20

Spektronik 20 merupakan spektrofotometer paling sederhana dengan kisaran spektra 400-900 nm, akurasi panjang gelombang  $\pm$  2,5 nm, dan akurasi fotometrik  $\pm$  4%. Spektronik 20 menggunakan sumber cahaya filamen tungsten yang dioperasikan melalui suplai daya stabil yang memberikan radiasi intensitas konstan. Setelah difraksi dengan kisi refleksi sederhana, radiasi akan melewati kuvet berisi sampel atau referensi, yang akan diteruskan menuju detektor. Transmisi atau absorbansi akan tertera pada layar LED. Untuk memperoleh pembacaan % transmitansi suatu sampel, kuvet yang mengandung blanko (umumnya pelarut) dimasukkan ke dalam kompartemen sel terlebih dahulu dan ditekan tombol T 100%, sehingga sejumlah cahaya mencapai detektor. Proses ini disebut kalibrasi T 100%. Setelah itu, sampel yang akan diukur ditempatkan dalam kompartemen sel, dan persen transmitansi atau absorbansi dibaca langsung dari layar LED. Konsentrasi analit dalam suatu sampel secara linear terkait dengan absorbansi seperti yang diberikan oleh hukum Lambert-Beer (Skoog et al., 2007):

$$A = -\log \frac{T}{P_0} = \epsilon b c$$

Keterangan: A = absorbansi; T = transmitansi;  $P_0$  = cahaya sebelum melewati larutan; P = cahaya setelah melewati larutan;  $\epsilon$  = koefisien ekstingsi molar; b = tebal kuvet; c = konsentrasi larutan

Metode spektrofotometer dapat digunakan untuk analisis kuantitatif senyawa tanin. Kandungan tanin dalam tanaman dapat ditentukan secara spektrofotometri menggunakan metode Folin-Denis. Metode tersebut didasarkan pada oksidasi molekul yang mengandung gugus hidroksil. Senyawa tanin akan mereduksi asam fosfotungstomolibdat dalam larutan basa untuk menghasilkan larutan berwarna biru. Intensitas larutan tersebut akan setara dengan jumlah tanin dan dapat ditentukan dengan standar asam tanin (Polshettiwar et al., 2007). Beberapa penelitian telah mengaplikasikan metode Folin Denis untuk penentuan senyawa tanin. Penelitian oleh Guriya et al. (2015) telah menunjukkan penentuan tanin dalam ekstrak brokoli (*Brassica oleracea*) melalui pengukuran absorbansi larutan yang mengandung 50 $\mu$ L ekstrak + 7,5 mL akuades + 0,5 mL reagen Folin-Denis + 1 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pada panjang gelombang 700 nm (Guriya et al., 2015). Senyawa tanin yang berhasil dideteksi dengan analisis tersebut sebesar 1,84  $\mu$ g/mL. Selain itu, Nair (2015) juga telah menunjukkan bahwa terdapat 1,7% (b/b) senyawa tanin dalam tumbuhan pinang (*Pann Masala*) yang dianalisis dengan metode Folin Denis pada panjang gelombang 760 nm (Nair et al., 2015).

Metode spektrofotometer juga dapat digunakan untuk penentuan gula atau karbohidrat. Metode asam sulfat fenol merupakan salah satu metode sederhana, cepat, dan sensitif, dan memberikan reproduksibilitas tinggi untuk pengukuran gula secara spektrofotometri (Dubois et al., 1956). Prinsip dari metode sulfat fenol yaitu dalam media asam yang panas, glukosa akan didehidrasi menjadi hidroksi metil furfural, yang nantinya akan berwarna kuning kecoklatan dengan penambahan fenol dan memiliki absorbansi maksimum pada ~490 nm. Asam sulfat menyebabkan seluruh gula nonpereduksi dikonversi menjadi gula pereduksi, sehingga metode ini dapat menentukan gula total, termasuk mono-, di-, oligo- dan polisakarida yang ada di dalam makanan. Hasil pengukuran karbohidrat umumnya dinyatakan dalam bentuk karbohidrat tunggal, seperti glukosa. Metode sulfat fenol merupakan metode nonstokimetri, sehingga diperlukan preparasi kurva kalibrasi menggunakan serangkaian larutan standar dengan konsentrasi karbohidrat yang diketahui (Swaroopanand et al., 2015). Tata cara penentuan gula dengan

metode sulfat fenol yaitu 2 mL larutan ditambahkan 0,05 mL fenol 80%, dilanjutkan dengan penambahan 5 mL asam sulfat pekat dengan cepat (10–20 detik) yang diarahkan langsung pada permukaan cairan (bukan pada sisi tabung reaksi) untuk mendapatkan pencampuran ij yang baik. Tabung ijaya didiamkan 10 menit, dikocok, dan ditempatkan selama 10 hingga 20 menit dalam penangas air selama 25–30 menit sebelum pembacaan pada panjang ijaya gelombang 490 nm. Konsentrasi gula kemudian dapat ditentukan dengan mengacu pada kurva standar (Dubois et al., 1956). Metode sulfat fenol telah ijaya diaplikasikan untuk penentuan total gula (sebesar 1,85–4,2% (b/b) dalam Universitas Brawijaya filtrat sisa pembuatan *sauerkraut* (Pandey & Garg, 2013). Selain itu, metode ijaya tersebut juga telah digunakan untuk penentuan gula dalam buah-bahan kering, seperti kacang kenari, kelapa, almond, kacang, dan kacang mede yang ijaya memberikan hasil sekitar 10–30% (Swaroopanand et al., 2015).

## 2.9. HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

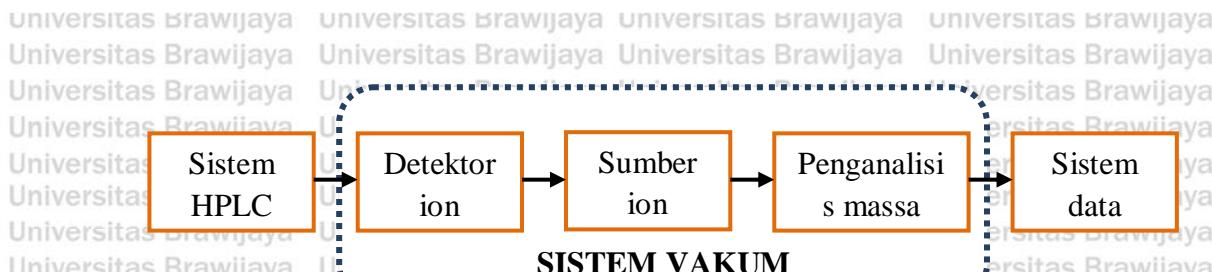
HPLC adalah teknik analisis yang digunakan untuk menentukan spesies ijaya dalam berbagai bahan organik, anorganik, dan biologis. Dalam kromatografi ijaya cair, fase gerak berupa pelarut cair yang mengandung sampel sebagai zat terlarut (Skoog et al., 2014). Pada HPLC, digunakan pompa untuk ijaya melewatkai cairan pelarut termasuk sampel menuju kolom berbahan ijaya adsorben padat. Interaksi dari masing-masing komponen sampel dengan ijaya kolom akan bervariasi, sehingga menyebabkan perbedaan laju aliran setiap ijaya komponen. Hal tersebut mengarah pada pemisahan komponen (Thammana, 2016).

Instrumentasi HPLC meliputi pompa, injektor, kolom, detektor dan ijaya integrator atau akuisisi, dan sistem tampilan. Proses kromatografi dimulai ijaya dengan menginjeksikan sampel ke dalam injektor di ujung kolom. Pemisahan ijaya komponen terjadi sejak analit dan fase gerak dipompa melalui kolom, dan ijaya mengarah pada detektor. Respon detektor terhadap masing-masing komponen ijaya ditampilkan pada perekam grafik atau layar komputer dan dikenal sebagai ijaya kromatogram. Untuk mengumpulkan, menyimpan dan menganalisis data ijaya kromatografi, digunakan integrator dan peralatan pengolahan data lainnya (Kupiec, 2004).

Teknik HPLC telah digunakan untuk analisis senyawa organik hasil proses fermentasi. Sebagai contoh Miranda et al. (2016) menggunakan teknik HPLC untuk menganalisis asam asetat dan kafein dalam teh kombucha fermentasi menggunakan metanol sebagai komponen organik dan 0,1% asam ortofosfat dalam akuades sebagai komponen cair dalam fasa gerak, yang dipantau masing-masing pada panjang gelombang 210 nm dan 273 nm. Pada penelitian itu pula, teknik HPLC juga dapat digunakan untuk mengkuantifikasi asam asetat secara lebih selektif dibanding dengan metode titrasi (Miranda et al., 2016). Penelitian lainnya juga berhasil memisahkan kandungan glukosinolat, yaitu sinigrin, glukobrasisin, glukoiberin, dan glukorafanin dalam *sauerkraut* menggunakan teknik HPLC. Pemisahan tersebut didasarkan pada perbedaan waktu retensi masing-masing senyawa dalam fasa gerak yang terdiri dari 0,05% TFA dalam akuades sebagai eluen A dan 100% asetonitril sebagai eluen B, pada panjang gelombang 217 nm (Palani et al., 2016).

## 2.10. LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*)

LCMS adalah penggabungan dari kromatografi cair dan spektrometri massa yang berfungsi untuk pemisahan dan deteksi suatu senyawa (Skoog et al., 2014; B. Zhou et al., 2012). Pada prinsipnya, sampel dipisahkan oleh kromatografi cair dan spesies sampel yang telah dipisahkan disemprotkan ke dalam sumber ion bertekanan atmosfer untuk mengubah sampel menjadi ion dalam fasa gas. Kemudian, penganalisis massa (*mass analyzer*) akan menyortir ion menurut rasio massa terhadap muatan dan detektor akan menghitung ion yang muncul sekaligus memperkuat sinyal yang dihasilkan dari setiap ion (Parasuraman et al., 2014). Hasil analisis LCMS berupa spektrum massa yaitu plot antara sinyal ion sebagai fungsi dari rasio massa terhadap muatan. Spektrum tersebut dapat digunakan untuk menentukan sifat orisotopik sampel, memberikan informasi mengenai massa partikel dan molekul, mengelusidasi struktur kimia molekul, dan analisis kuantitatif yang akurat (Parasuraman et al., 2014; Skoog et al., 2014).



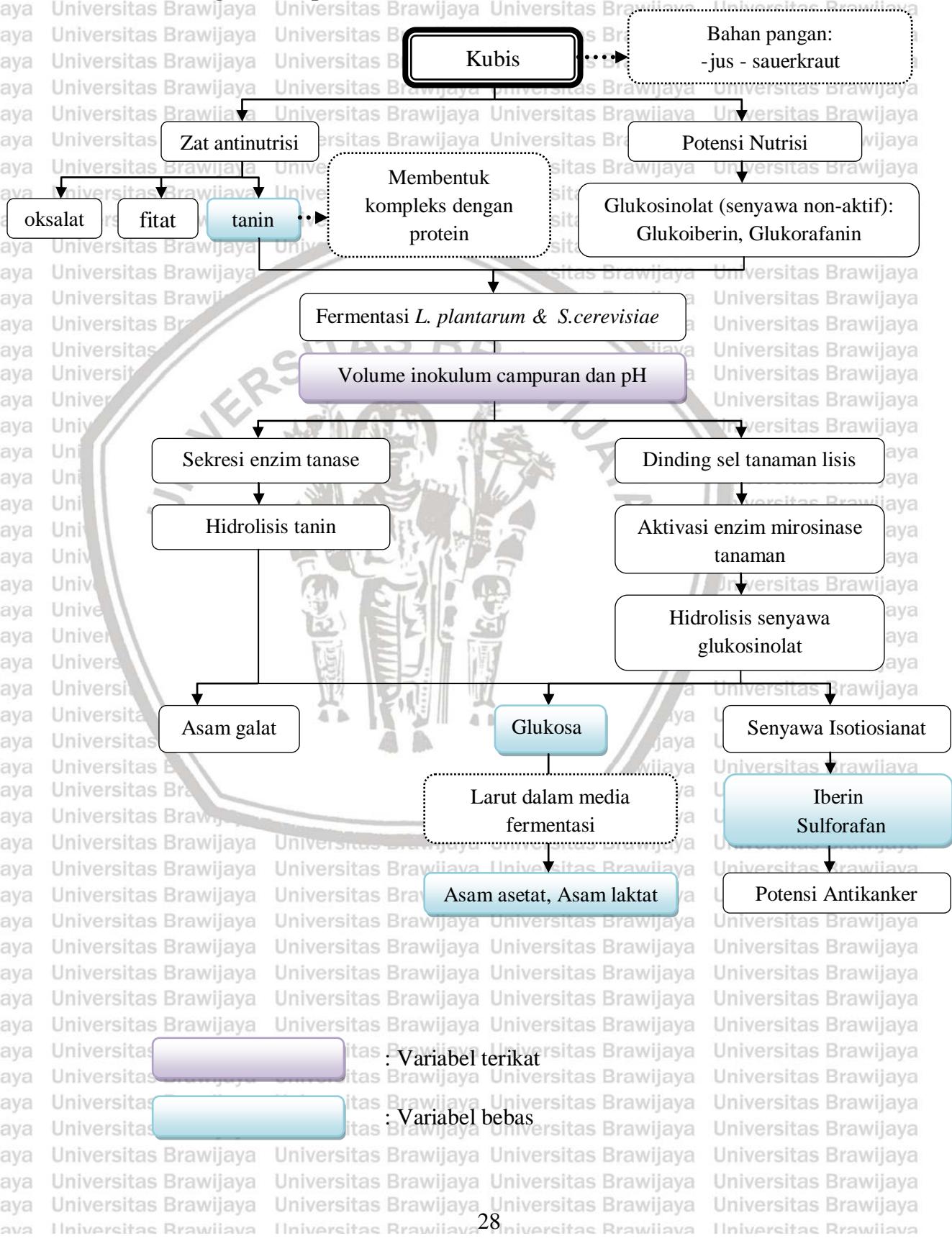
**Gambar 2.10** Sistem LC-MS (Skoog et al., 2014)

LC-ESI-MS (menggunakan sumber ionisasi *electrospray ionization*, ESI) dianggap sebagai metode pilihan terbaik untuk pembuatan profil metabolit dalam sampel biologis yang kompleks, karena kemampuan “*soft ionization*”nya, yang mampu menghasilkan sejumlah besar ion melalui pertukaran muatan dalam larutan dan membentuk ion molekul utuh yang membantu identifikasi awal. Sistem LC-ESI-MS dapat memisahkan senyawa semipolar seperti asam fenolik, flavonoid, steroid terglikosilasi, alkaloid, dan spesies terglikosilasi lainnya (B. Zhou et al., 2012).

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

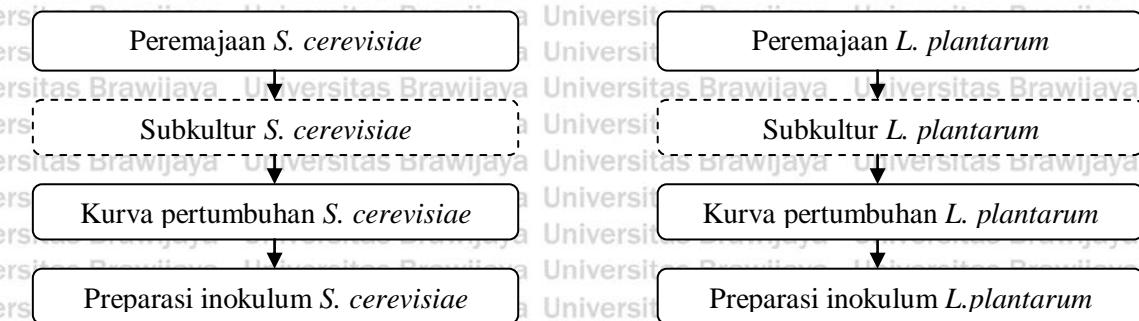
### 3.1. Kerangka konsep

## BAB III KERANGKA KONSEPTUAL

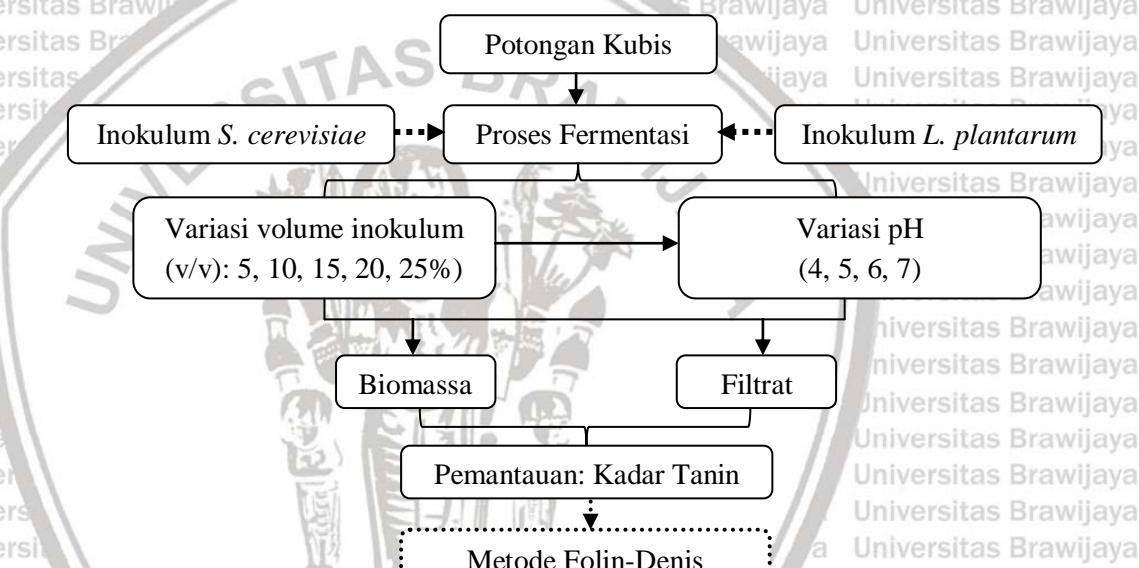


### 3.2. Kerangka operasional

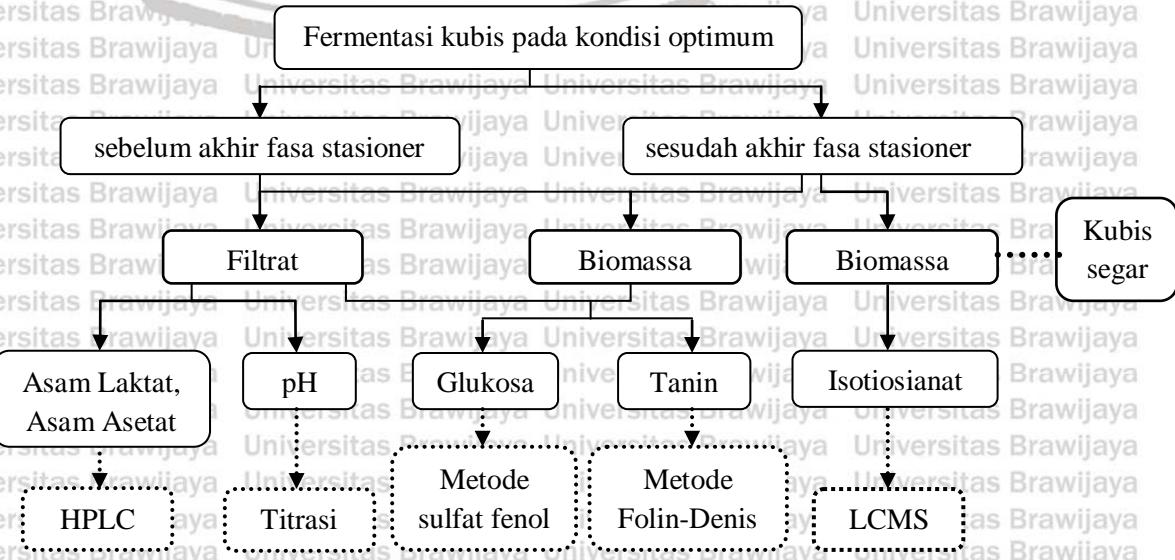
Tahap I: Preparasi mikroorganisme dan pembuatan kurva pertumbuhan



Tahap II: Optimasi kondisi fermentasi untuk menurunkan zat antinutrisi dalam kubis



Tahap III: Identifikasi kandungan nutrisi dalam filtrat dan biomassa kubis terfermentasi



### 3.3. Hipotesis Penelitian

Hipotesis dalam penelitian:

1. Variasi volume inokulum campuran *Lactobacillus plantarum* – *Saccharomyces cerevisiae* dan pH media awal berpengaruh terhadap kadar tanin dalam kubis terfermentasi.
2. Filtrat yang dihasilkan selama fermentasi memiliki kandungan glukosa yang dapat dimetabolisme oleh bakteri dan ragi untuk membentuk asam (asam laktat dan asam asetat).
3. Fermentasi menyebabkan hidrolisis senyawa golongan glukosinolat dalam kubis menjadi produk isotiosianat.



## **BAB IV** **METODOLOGI PENELITIAN**

### **4.1. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Januari 2019 – Maret 2019.

### **4.2. Alat dan Bahan Penelitian**

#### **4.2.2. Alat Penelitian**

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

#### **4.2.3. Bahan Penelitian**

Bahan baku yang digunakan berupa kubis segar dari daerah Poncokusumo, Kabupaten Malang dan isolat *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae* dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Teknologi Pangan, Universitas Brawijaya, Malang. Media yang digunakan untuk peremajaan dan pertumbuhan mikroorganisme antara lain PDA (Potato Dextrose Agar), MRSA (*Mann Rogosa Sharpe Agar*), GYP (*Glucose Yeast Extract Pepton*), dan MRSB (*de-Mann Rogosa Sharpe Broth*). Selain itu, bahan lain yang digunakan ialah ekstrak *yeast*, pepton, asam asetat ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), asam laktat ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ ), asam fosfat ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ),

glukosa ( $C_6H_{12}O_6$ ), asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) 95-98%, fenol ( $C_6H_6O$ ), asam tanat ( $C_{76}H_{52}O_{46}$ ), reagen Folin-Denis, natrium karbonat ( $Na_2CO_3$ ), natrium hidroksida ( $NaOH$ ), asam oksalat dihidrat ( $H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$ ), indikator penolptalein, asetonitril ( $CH_3CN$ ), monokalium fosfat ( $KH_2PO_4$ ), dan akuades.

### 4.3. Tahapan Penelitian

- Tahapan penelitian ini yaitu:
1. Preparasi mikroorganisme
    - Preparasi media padat *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae*
    - Peremajaan biakan murni *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae*
  2. Pembuatan kurva pertumbuhan
    - Pembuatan media cair *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae*
    - Pembuatan kurva pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae*
  3. Proses fermentasi
    - Preparasi kubis
    - Pembuatan inokulum *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae*
    - Pengaruh volume inokulum campuran *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae* terhadap kadar tanin dalam kubis terfermentasi
    - Pengaruh pH media awal terhadap kadar tanin dalam kubis terfermentasi
  4. Analisis kandungan nutrisi
    - Penentuan kadar tanin dan glukosa dalam biomassa dan filtrat
    - Penentuan pH dan identifikasi asam laktat dan asam asetat dalam filtrat hasil fermentasi kubis.

- Identifikasi produk hidrolisis glukosinolat, meliputi iberin dan sulforafan dalam biomassa kubis terfermentasi.

### 5. Analisis data

#### 4.4. Prosedur Penelitian

##### 4.4.1. Preparasi media padat *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae*

Media padat peremajaan biakan murni *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae* masing-masing ialah MRSA dan PDA. Pada preparasi media padat PDA, sebanyak 3,5 gram PDA ditimbang, ditambahkan dengan 100 mL akuades, dan didihkan. Kemudian, larutan dituangkan ke dalam 12 tabung reaksi, lalu ditutup dengan kapas dan *plastic wrap*. Setelah itu, larutan PDA dalam tabung reaksi tersebut disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 15 psi, selama 15 menit. Selanjutnya, larutan PDA steril didiamkan pada suhu ruang dengan posisi miring, sehingga diperoleh media agar miring untuk digunakan dalam peremajakan biakan murni ragi.

Sementara itu, pada preparasi media padat MRSA, sebanyak 6,82 gram MRSA ditimbang, dilarutkan dalam 100 mL akuades, dan didihkan. Larutan dituangkan ke dalam beberapa tabung reaksi, dan ditutup dengan kapas dan *plastic wrap*. Kemudian, larutan MRSA tersebut disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 15 psi, selama 15 menit. Larutan MRSA yang steril didiamkan pada suhu ruang dengan posisi miring agar diperoleh media agar miring untuk peremajakan biakan murni bakteri.

##### 4.4.2. Peremajaan biakan murni *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae*

Peremajaan biakan murni *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae* dilakukan secara aseptis pada *laminar air flow*. Pertama, jarum ose, mulut tabung reaksi yang berisi biakan murni ragi dan bakteri maupun media padat baru, dilewatkan pada nyala api bunsen untuk sterilisasi.

Isolat *Saccharomyces cerevisiae* diambil dengan menggunakan jarum ose, dan digoreskan secara zig-zag ke dalam tabung reaksi berisi media padat

PDA. Setelah itu, kedua tabung ditutup kembali dengan kapas steril dan *plastic wrap*. Selanjutnya, biakan ragi dalam media padat diinkubasi pada suhu 30 °C selama 48 jam (2 hari). Tahapan yang sama dilakukan untuk meremajakan biakan murni *Lactobacillus plantarum* ke dalam tabung reaksi berisi media padat MRSB.

#### **4.4.3. Pembuatan kurva pertumbuhan**

##### **4.4.3.1. Pembuatan media cair *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae***

Media pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* adalah MRSB, sedangkan media pertumbuhan untuk *Saccharomyces cerevisiae* adalah GYP. Pada pembuatan media GYP, mula-mula sebanyak 4 gram glukosa, 0,5 gram ekstrak *yeast*, dan 0,5 gram pepton dimasukkan ke dalam gelas kimia, dan dilarutkan dalam akuades secukupnya. Kemudian, larutan ditambahkan dengan akuades hingga volume 100 mL. Setelah itu, larutan tersebut disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 15 psi, selama 15 menit.

Sementara itu, pada pembuatan media MRSB, sebanyak 5,2 gram MRSB dilarutkan dalam 100 mL akuades dan dipanaskan hingga seluruh serbuk larut. Setelah itu, larutan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 15 psi, selama 15 menit.

##### **4.4.3.2. Pembuatan kurva pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae***

Pembuatan kurva pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae* dilakukan dengan menumbuhkan bakteri dan ragi pada media cair masing-masing, yaitu ialah MRSB dan GYP. Pada pembuatan kurva pertumbuhan ragi, sebanyak 2 mata ose subkultur *Saccharomyces cerevisiae* hasil peremajaan dari media padat, dimasukkan secara aseptis ke dalam tabung reaksi yang berisi 100 mL media cair baru steril, dan dikocok. Setelah itu, media cair berisi subkultur ragi diinkubasi pada suhu 30 °C. Sebanyak 3 mL sampel diambil setiap 3 jam untuk pengukuran densitas optik. Pengukuran

densitas optik dilakukan pada panjang gelombang 600 nm menggunakan spektronik 20. Selanjutnya, dibuat kurva yang menggambarkan hubungan waktu inkubasi dalam satuan jam (sumbu x) dengan densitas optik (sumbu y). Prosedur yang sama diulangi untuk menghasilkan kurva pertumbuhan *Lactobacillus plantarum*. Pengambilan sampel dilakukan hingga diperoleh fasa kematian sel ragi maupun bakteri.

#### **4.4.4. Fermentasi**

##### **4.4.4.1. Pembuatan inokulum *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae***

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

##### **4.4.4.2. Preparasi kubis**

Tanaman kubis (*Brassica oleracea var. capitata*) dipisahkan bagian dalam dan daun terluar. Setelah itu, kubis dipotong kecil menggunakan pisau. Setiap proses fermentasi dilakukan menggunakan 100 gram potongan kubis bersih. Potongan kubis dicuci hingga bersih menggunakan air mengalir dan didiamkan sebentar dalam suhu ruang sebelum digunakan.

##### **4.4.4.3. Pengaruh volume inokulum campuran *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae***

Potongan kubis sebanyak 100 gram bersih dimasukkan ke dalam 4 botol fermentasi hingga isi botol penuh. Kemudian, ke dalam botol

tersebut dimasukkan inokulum campuran *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae* dengan variasi volume inokulum campuran ialah 5, 10, 15, 20, 25 % (v/v dalam 100 mL akuades) (rasio volume bakteri dan ragi adalah 1:1). Setelah itu, botol ditutup rapat. Fermentasi dilakukan selama 4 hari pada suhu 25-27 °C (suhu ruang). Setelah 4 hari, dilakukan pengambilan sampel untuk menganalisis kadar tanin.

#### 4.4.4. Pengaruh pH media awal

Potongan kubis sebanyak 100 gram dimasukkan ke dalam 4 botol fermentasi hingga isi botol penuh. Kemudian, ke dalam masing-masing botol tersebut dimasukkan inokulum *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae* dengan volume inokulum campuran optimum yang memiliki variasi pH media cair awal yaitu 4, 5, 6, dan 7 (diatur dengan menambahkan asam glasial untuk kondisi asam dan NaOH 0,1 M untuk kondisi basa). Setelah itu, ke dalam botol fermentasi tersebut ditambahkan akuades steril hingga volume total inokulum 100 mL. Setelah itu, botol ditutup rapat. Fermentasi dilakukan selama 4 hari pada suhu 25-27 °C (suhu ruang). Setelah terhitung 4 hari, dilakukan pengambilan sampel untuk menganalisis kadar tanin.

#### 4.4.5. Penentuan kadar tanin

##### 4.4.5.1. Pembuatan kurva standar tanin

Larutan stok asam tanat (0,1 mg/mL) dibuat dengan melarutkan 5 mg asam tanat ke dalam 50 mL akuades. Kemudian, dilakukan pembuatan serangkaian larutan standar asam tanat dengan konsentrasi 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, dan 0,1 mg/mL. Setelah itu, sebanyak 400 µL larutan asam tanat dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 0,5 mL reagen Folin Denis dan 1 mL larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Larutan tersebut divortex dan diencerkan pada labu ukur 10 mL dengan akuades. Setelah itu, larutan didiamkan selama 30 menit, lalu dihitung absorbansinya menggunakan spektronik 20 pada panjang gelombang 760 nm. Hasil pengukuran diplotkan dalam suatu kurva yang menghubungkan konsentrasi asam

#### 4.4.5.2. Penentuan kadar tanin pada sampel

Senyawa tanin dalam sampel diekstrak menggunakan pelarut akuades.

Sebanyak 2,5 gram sampel kubis hasil fermentasi dihaluskan menggunakan mortar, dan dimasukkan dalam erlenmeyer 50 mL. Kemudian, ke dalam erlenmeyer tersebut ditambahkan 20 mL akuades dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 10 menit. Selanjutnya, larutan disaring menggunakan kertas saring halus. Filtrat hasil ekstraksi diencerkan pada labu ukur 25 mL menggunakan akuades.

Sebanyak 400  $\mu$ L ekstrak tanin dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian, ke dalam tabung reaksi tersebut ditambahkan 0,5 mL reagen Folin Denis dan 1 mL larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Larutan divortex dan diencerkan hingga 10 mL dengan akuades. Setelah didiamkan selama 30 menit, larutan dihitung absorbansinya menggunakan spektronik 20 pada panjang gelombang 760 nm. Hasil absorbansi dikonversi menjadi besaran konsentrasi (mg/mL) menggunakan persamaan pada kurva baku.

Penentuan kadar tanin dalam filtrat hasil fermentasi memiliki tahapan yang sama dengan penentuan tanin dalam biomassa. Namun, filtrat hasil fermentasi disentrifugasi terlebih dahulu pada kecepatan 9000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan sel (pellet) dan cairan (supernatan) sebelum analisis.

#### 4.4.6. Penentuan kadar glukosa

##### 4.4.6.1. Pembuatan kurva standar glukosa

Pembuatan kurva standar diawali dengan pembuatan larutan glukosa dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm. Sebanyak 1 mL larutan glukosa dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 1 mL larutan fenol 5%. Larutan tersebut divortex, ditambahkan larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  95–98% sebanyak 5 mL dengan cepat, dan didiamkan selama 10 menit. Selanjutnya larutan tersebut dimasukkan ke dalam penangas air dengan suhu 25–30 °C selama 15 menit. Kemudian, dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektronik 20 pada

panjang gelombang 485 nm. Setelah itu, dibuat kurva standar yang menghubungkan konsentrasi glukosa (sebagai sumbu x) dengan absorbansi (sebagai sumbu y) dan ditentukan persamaan regresi liniernya.

#### 4.4.6.2. Penentuan kadar glukosa dalam sampel

Glukosa dalam biomassa kubis segar (bahan baku) diekstraksi menggunakan pelarut etanol 80%. Sebanyak 0,1 gram kubis hasil fermentasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 5 mL etanol 80% dan ditutup rapat dengan penutup karet dan *plastic wrap*. Larutan dipanaskan dalam penangas air pada suhu 80 °C selama 1 jam. Setelah dinginkan dalam suhu ruang, diambil 1 mL ekstrak dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah itu, ditambahkan 1 mL larutan fenol 5%, divortex, dan ditambahkan larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 95–98% sebanyak 5 mL dengan cepat ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, larutan tersebut dimasukkan ke dalam penangas air dengan suhu 25–30 °C selama 15 menit. Kemudian, dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektronik 20 pada panjang gelombang 485 nm. Hasil pengukuran absorbansi dikonversi menjadi besaran konsentrasi glukosa dalam sampel menggunakan persamaan kurva standar.

Selain itu, filtrat sisa fermentasi diambil sebanyak 10 mL dan disentrifugasi selama 10 menit. Setelah itu, supernatan diambil 1 mL dan diencerkan ke dalam labu ukur 10 mL dengan penambahan akuades. Larutan tersebut diambil sebanyak 1 mL untuk penentuan kadar glukosa filtrat menggunakan metode sulfat fenol seperti yang dilakukan pada biomassa.

#### 4.4.7. Fermentasi pada kondisi optimum

Kubis sebanyak 100 gram yang telah dipotong dan dicuci bersih dimasukkan ke dalam beberapa botol fermentasi hingga isi botol penuh. Kemudian, ke dalam botol tersebut dimasukkan inokulum *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae* dengan volume inokulum campuran optimum dan dikondisikan pada pH optimum melalui penambahan asam asetat glasial atau NaOH 0,1 M. Setelah itu, botol ditutup rapat. Sampel biomassa diambil pada saat sebelum dan

sesudah akhir stasioner untuk analisis kadar tanin dan glukosa dengan metode ekstraksi dan pengukuran yang sama seperti sebelumnya. Selanjutnya, filtrat sisa fermentasi juga diambil pada saat sebelum dan sesudah akhir stasioner untuk analisis kadar tanin, glukosa, pH, dan analisis kualitatif asam laktat dan asetat. Selain itu, dilakukan pula pengambilan sampel biomassa pada akhir fasa stasioner ragi dan bakteri saja (didasarkan pada kurva pertumbuhan) untuk identifikasi senyawa isotiosianat dengan LCMS. Identifikasi senyawa isotiosianat juga dilakukan pada biomassa kubis segar sebagai pembanding hasil profil produk hidrolisis glukosinolat yang dihasilkan.

#### 4.4.8. Penentuan pH pada filtrat hasil fermentasi

Filtrat hasil fermentasi disentrifugasi pada kecepatan 9000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya, sebanyak 1 mL supernatan diambil dan diletakkan pada labu erlenmeyyer. Setelah itu, larutan ditambahkan akuades hingga 10 mL dan indikator pp 3 tetes. Larutan dititrasi dengan NaOH 1 M hingga terjadi perubahan warna dari tidak berwarna menjadi merah muda.

#### 4.4.9. Identifikasi asam laktat dan asam asetat menggunakan HPLC

Identifikasi asam organik dalam filtrat hasil fermentasi ditentukan menggunakan HPLC. Filtrat hasil fermentasi disentrifugasi pada kecepatan 9000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya, sebanyak 10 mL supernatan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2,5 gram NaCl. Campuran divorteks hingga seluruh NaCl larut. Setelah itu, larutan ditambahkan dengan 1 mL dietil eter dan divorteks selama 5 menit. Kemudian, larutan disentrifugasi pada kecepatan 9000 rpm selama 15 menit. Fasa organik (atas) dipisahkan dan ditambahkan dengan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  untuk menghilangkan kelebihan air. Setelah itu, larutan disaring menggunakan *filter paper*  $0,22 \mu\text{m}$  dan siap dianalisis menggunakan HPLC.

Analisis sampel dilakukan menggunakan UHPLC (The Dionex Ultimate 3000 System, Thermo Scientific) yang terdiri dari solvent rack (SRD-3600), dual pump (DGP-3600A), autosampler (Well Plate Sampler, WPS-3000SL), column compartment (TCC 3200 2x2P-10P), UV detector

(Variable Wavelength Detector, VWD-3400), dan kolom C18. Fasa gerak untuk penentuan senyawa menggunakan dua pelarut dengan mode isokratik: fase gerak A terdiri dari 80% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM pH 2,4 yang disesuaikan dengan penambahan asam fosfat, fase B terdiri dari 20% asetonitril. Kecepatan fasa gerak 1,5 mL/menit, waktu *running* 5 menit, suhu 30 °C, volume injeksi 15 µL, dan panjang gelombang 210 nm.

#### 4.4.10. Identifikasi turunan glukosinolat menggunakan LCMS

Identifikasi turunan glukosinolat iberin dan sulforafan baik pada kubis mentah maupun kubis fermentasi dilakukan menggunakan LCMS.

##### 4.4.10.1. Preparasi Sampel, Analisis Kualitatif Iberin dan Sulforafan, dan Analisis Kuantitatif Senyawa Sulforafan

Sebanyak 2 gram sampel kubis (baik kubis segar maupun kubis fermentasi) dihaluskan menggunakan mortar dan alu. Setelah itu, sampel diekstrak menggunakan pelarut diklorometana (3 x 10 mL) dan ditambahkan 2,5 gram Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Setelah itu, larutan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 30 °C selama 10 menit. Larutan ekstrak dilarutkan dalam asetonitril secukupnya dan disaring menggunakan *filter paper* 0,22 µm. Sampel diletakkan dalam botol vial dan siap dianalisis.

Analisis kualitatif senyawa target iberin dan sulforafan didasarkan dengan metode SRM (*Selected Reaction Monitoring*) diatur pada **Tabel 4.1**.

**Tabel 4.1:** Optimasi parameter massa iberin dan sulforafan

<b>Komponen</b>	<b>Parent mass (m/z)</b>	<b>Product mass (m/z)</b>		<b>CE (V)</b>
		Confirm 1	Confirm 2	

Analisis kuantitatif senyawa sulforafan, baik pada kubis segar maupun kubis fermentasi dilakukan menggunakan kurva standar senyawa sulforafan. Pada pembuatan kurva standar sulforafan, dibuat serangkaian larutan standar sulforafan dengan kadar 63, 125, 250, 500, dan 1000

ng/mL. Setelah disaring menggunakan filter paper 0,22 µm, larutan diinjeksikan ke dalam instrumen. Setelah itu, dilakukan pembuatan kurva kalibrasi yang menghubungkan kadar sulforafan (sumbu x) dengan luas area kromatogram (sumbu y) dan ditentukan persamaan regresi liniernya.

#### 4.4.10.2. Spesifikasi Instrumen LCMS

Analisis sampel dilakukan dengan sistem UHPLC ACCELLA tipe 1250 (Thermo Scientific) dengan spektrofotometer massa TSQ QUANTUM ACCESS MAX, UHPLC ACCELLA tipe 1250 terdiri dari *vacuum degasser*, pompa kuartener, auto sampler termostatik yang dikendalikan oleh komputer pribadi melalui program X-Calibur 2.1. Kolom yang digunakan adalah kolom Hypersil Gold (50 mm x 2,1 mm x 1,9 µm). Fase gerak untuk penentuan senyawa menggunakan dua pelarut: Fase gerak A terdiri dari 0,1% asam format dalam aquabidest, fase B terdiri dari 0,1% asam format dalam asetonitril. Sebuah gradient linier dengan kecepatan 300 µL/menit, dengan pengaturan fasa gerak sebagai berikut: kolom dikendalikan pada 30 °C, dan kompartemen auto sampler ditetapkan pada 16 °C.

Sumber ionisasi dalam sistem MS yang digunakan dalam sistem MS adalah sumber ionisasi elektrospray (ESI) yang dioperasikan dalam mode deteksi ion positif. Kondisi ESI yang digunakan untuk mode deteksi ion positif (dikendalikan oleh Software TSQ Tune): tegangan semprotan 3 kV; suhu penguapan 300 °C; suhu kapiler 300 °C; nitrogen sebagai *sheath gas pressure* 40 psi, dan argon sebagai *Aux gas pressure* 10 psi.

#### 4.4.11. Analisis Data

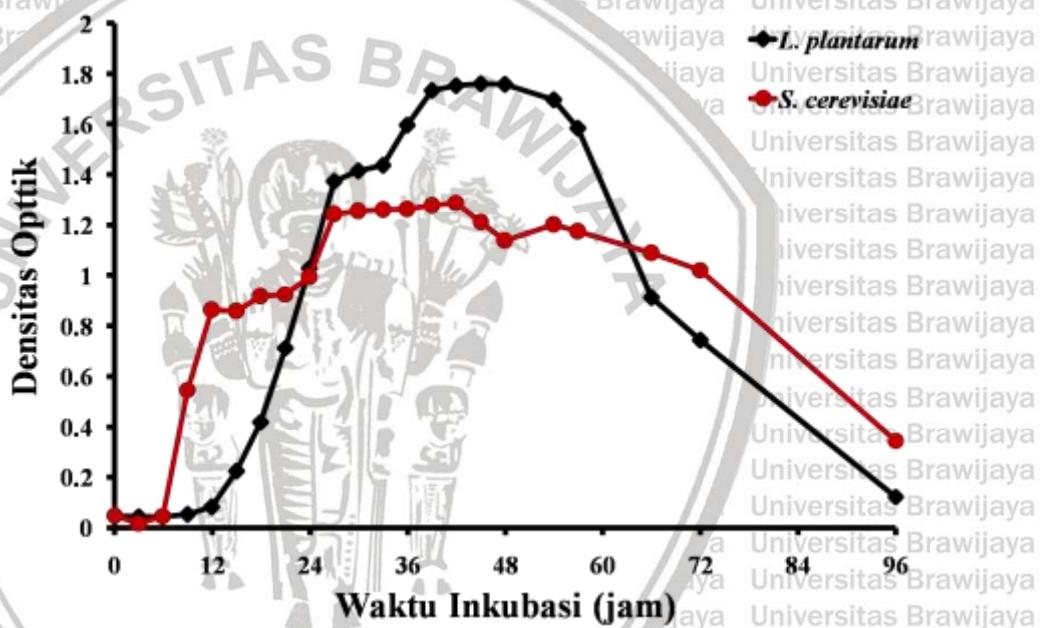
Data yang diperoleh dianalisis dengan *One Way* Analisis Varian (ANOVA) menggunakan SPSS 18 untuk menguji adanya pengaruh varian volume inokulum campuran *Lactobacillus plantarum* – *Saccharomyces cerevisiae*, dan pH media awal terhadap penurunan tanin dalam kubis fermentasi. Apabila terdapat adanya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

## BAB V

# HASIL PEMBAHASAN

## 5.1.Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae*

Pembuatan kurva pertumbuhan merupakan tahap dasar untuk mengetahui fasa hidup mikroorganisme. Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan dengan mengamati peningkatan jumlah sel dalam media cair tertentu sebagai fungsi terhadap waktu. Pengamatan jumlah sel didasarkan pada pengukuran kekeruhan media cair (menandakan tumbuhnya sel) dengan menggunakan spektrofotometer.



**Gambar 5.1** Kurva pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae*

Menurut Bruslind (2019), jumlah sel, panjang setiap fasa, kecepatan pertumbuhan, dan jumlah keseluruhan waktu akan bervariasi untuk setiap mikroorganisme. Namun, pertumbuhan mikroorganisme selalu memiliki empat fasa yang sama, yaitu fasa lag, fasa log, fasa stasioner, dan fasa kematian. Fase lag mengacu pada fasa adaptasi sel terhadap kondisi kultur yang baru, sehingga pertumbuhannya sangat lambat. Pada fasa tersebut, sel-sel secara aktif melakukan metabolisme atau memproduksi nutrisi penting untuk memulai pertumbuhan aktif. Selanjutnya, sel aktif mulai melakukan replikasi

DNA, membelah, dan tumbuh dengan sangat cepat. Fasa tersebut dikenal dengan fasa log atau fasa eksponensial. Pada periode ini, sel dianggap dalam kondisi paling sehat dan seragam, sehingga sebagian besar eksperimen menggunakan sel dari fasa tersebut. Fasa berikutnya disebut sebagai fasa stasioner, yaitu ketika metabolisme sel melambat dan jumlah sel tetap. Penurunan tingkat pertumbuhan tersebut dapat disebabkan oleh kepadatan sel yang tinggi diiringi dengan penurunan nutrisi atau akumulasi produk-produk metabolisme beracun. Fasa terakhir merupakan fasa kematian sel yang ditunjukkan dengan penurunan sel secara tajam. Pada fasa ini, sel-sel mencapai titik dimana sel tidak mendapatkan nutrisi (Bruslind, 2019).

**Tabel 5.1** Lama setiap fasa pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae*

	Lama fasa pertumbuhan (jam)	
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Fasa lag	0 - 12	0 - 6
Fasa log	12 - 39	6 - 27
Fasa stationer	39 - 54	27 - 66
Fasa kematian	54 - 96	66 - 96

Pada penelitian ini, kurva pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae* ditunjukkan oleh **Gambar 5.1**. Selain itu, lama masing-masing fasa hidup sel ditunjukkan dalam **Tabel 5.1**. Kurva pertumbuhan bakteri dan ragi tersebut digunakan sebagai acuan untuk pembuatan inokulum *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae* dan menentukan lama waktu fermentasi untuk menurunkan kadar antinutrisi dalam kubis.

## 5.2. Proses Fermentasi untuk Degradasi Senyawa Tanin dalam Kubis

Tanin merupakan senyawa yang disintesis oleh tanaman untuk melindungi diri dari serangan mikroorganisme lain (Fekadu Gemedé, 2014; Sinha & Khare, 2017). Namun demikian, tanin juga memiliki efek negatif bagi manusia

ketika ikut terkonsumsi bersama sayur. Senyawa tersebut dapat mengganggu asupan protein tubuh, baik dengan membentuk kompleks tanin-protein yang tidak dapat terabsorpsi maupun berikatan langsung dengan enzim pencernaan, seperti lipase, amilase, tripsin, dan kemotripsin (Fekadu Gemedé, 2014; Liener, 1998; Natesh N et al., 2018).

Kubis merupakan salah satu tanaman dengan kandungan tanin yang cukup tinggi. Tanaman tersebut mengandung 1266 mg asam tanat/100 g berat segar (Mosha et al., 1995). Senyawa tanin dapat dihidrolisis oleh enzim tanase, yang dapat berasal dari bakteri *Lactobacillus plantarum* (Natarajan & Rajendran, 2009; Matsuda et al., 2016).

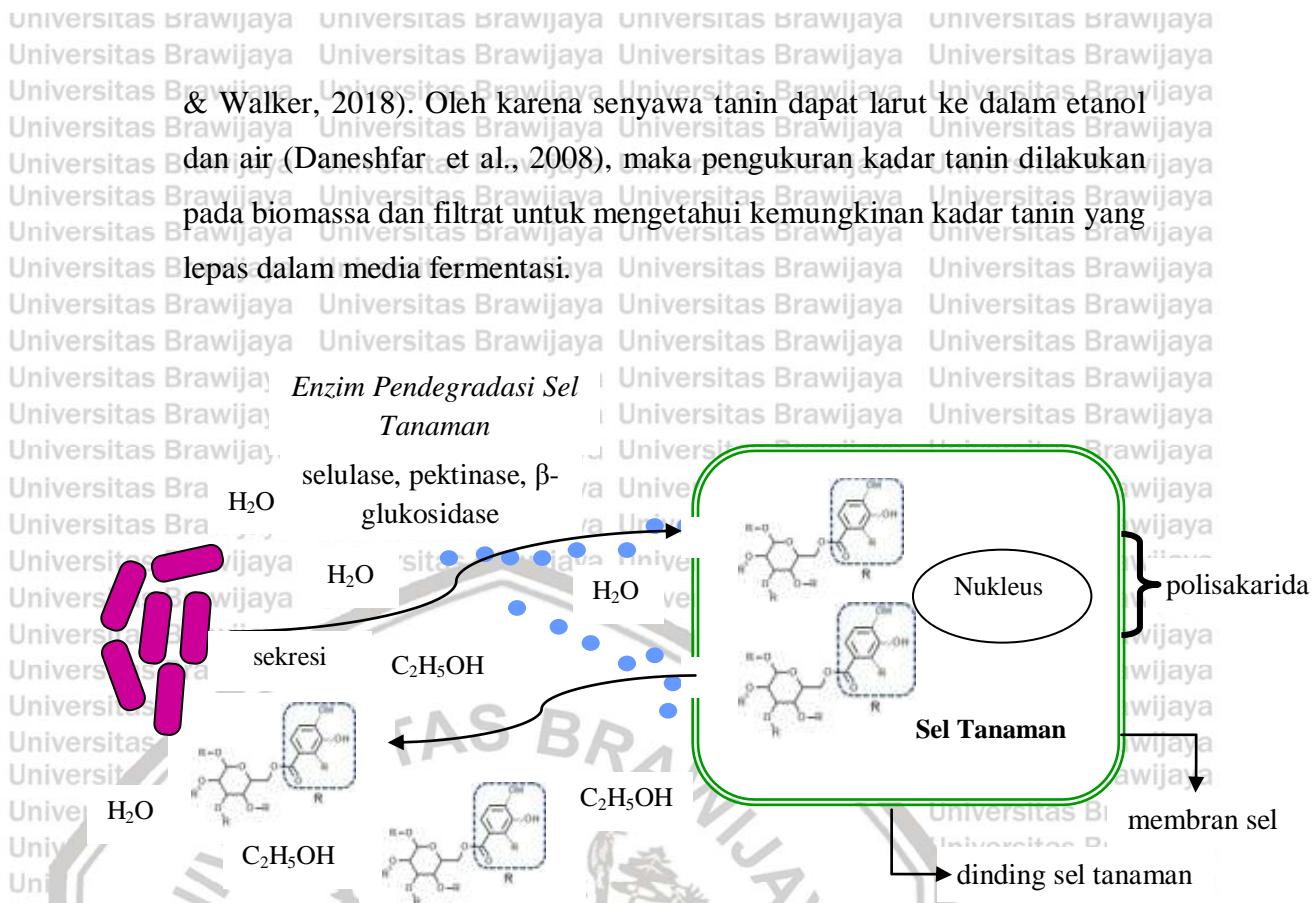
Pada penelitian ini dilakukan fermentasi menggunakan *L. plantarum* dan *S. cerevisiae* untuk mendegradasi tanin dalam kubis. Penggunaan bakteri asam laktat dan ragi secara bersama disebabkan kedua jenis mikroorganisme tersebut diketahui memiliki interaksi mutualisme yang bermanfaat untuk menstimulasi pertumbuhan masing-masing.

*S. cerevisiae* diketahui mampu mensekresikan asam amino glutamin, treonin, fenilalanin, triptofan, dan serin yang dapat membantu meningkatkan pertumbuhan bakteri asam laktat *L. plantarum* (Ponomarova et al., 2017).

Sementara itu, *L. plantarum* memiliki enzim pendegradasi laktosa ( $\beta$ -galaktosidase) yang tidak dimiliki oleh ragi. Glukosa dan galaktosa yang dihasilkan dari proses tersebut dapat membantu kebutuhan sumber karbon bagi ragi (Sieuwerts et al., 2018). Oleh karena fermentasi dilakukan menggunakan dua mikroorganisme yang berbeda, maka beberapa faktor-faktor fermentasi, seperti volume inokulum campuran dan pH media awal dapat mempengaruhi aktivitas bakteri dan ragi yang digunakan selama degradasi senyawa tanin dalam kubis.

### 5.2.1. Pengaruh Volume Inokulum Campuran Terhadap Kadar Tanin dalam Kubis Terfermentasi

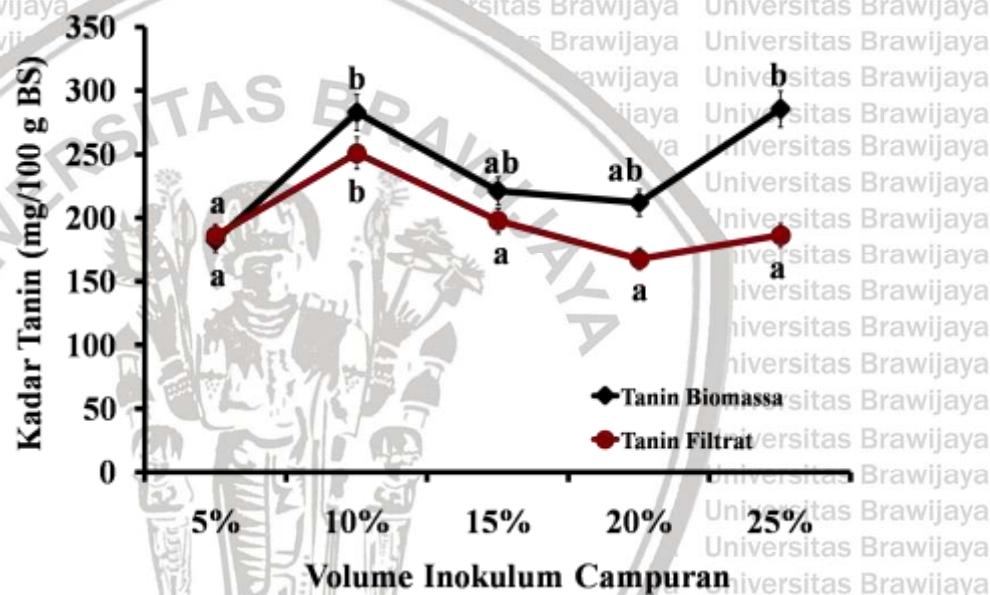
Pada penelitian ini, fermentasi dilakukan menggunakan kultur campuran *L. plantarum* dan *S. cerevisiae*, sehingga volume inokulum campuran dapat mempengaruhi pertumbuhan dan aktivitas kedua mikroorganisme tersebut selama proses fermentasi. Selama proses fermentasi, *L. plantarum* dan *S. cerevisiae* diketahui dapat memproduksi etanol dalam media fermentasi (Corsetti & Valmorri, 2011; G. M. Walker



**Gambar 5.2** Gambaran pelepasan senyawa tanin dalam kubis ke media fermentasi yang mengandung etanol hasil metabolisme *L. plantarum* – *S. cerevisiae* dan air

**Gambar 5.3** menunjukkan bahwa perbedaan volume inokulum mempengaruhi aktivitas penurunan tanin. Baik pada biomassa dan filtrat, kadar tanin menurun pada saat ditambahkan 5% inokulum, lalu meningkat pada saat ditambahkan 10% inokulum. Kemudian, kadar tanin kembali menurun pada saat ditambahkan 15% dan 20% inokulum, dan menurun kembali pada saat penambahan 25% inokulum. Uji normalitas atau homogenitas menunjukkan bahwa nilai signifikansi pengaruh volume inokulum campuran terhadap kadar tanin biomassa dan filtrat  $>0,05$ , yang menunjukkan bahwa sebaran data berdistribusi normal. Uji statistika menggunakan analisis ANOVA One Way menunjukkan bahwa F hitung lebih besar dari F tabel (2,76), yang mengindikasikan bahwa volume inokulum campuran berpengaruh secara signifikan terhadap kadar tanin kubis. Hasil tersebut berlaku baik untuk pengukuran kadar tanin biomassa maupun filtrat. Sementara itu, uji Tukey dengan taraf kepercayaan 5%

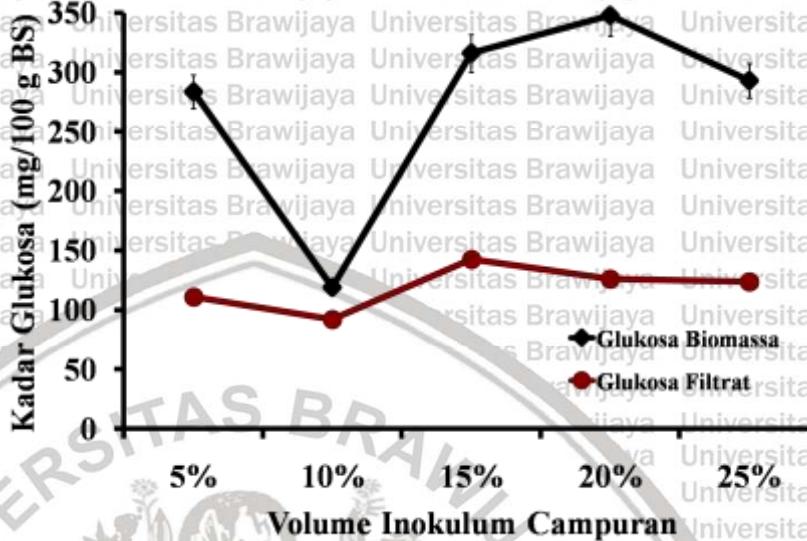
pada pengaruh volume inokulum campuran terhadap kadar tanin biomassa menunjukkan bahwa penggunaan volume inokulum 5% tidak berbeda nyata dengan volume inokulum 15% dan 20%, sedangkan volume inokulum 10% juga tidak berbeda nyata dengan volume inokulum 15%, 20%, dan 25%. Namun demikian, oleh karena penggunaan volume inokulum 5% menghasilkan kadar tanin terendah, maka volume inokulum campuran sebesar 5% dianggap sebagai hasil optimum untuk proses optimasi selanjutnya (kadar tanin tersisa 182,362 mg dari 290,877 mg tiap 100 g dalam kubis segar).



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

Oleh karena tren kadar tanin terlihat fluktuatif, maka pada penelitian ini dilakukan pula pengukuran kadar glukosa, baik pada biomassa kubis maupun filtrat. Pengukuran kadar glukosa didasarkan pada fakta bahwa hidrolisis tanin oleh tanase dapat melepaskan asam galat dan glukosa sesuai mekanisme reaksi yang ditunjukkan oleh **Gambar 2.4** (Jiménez et al., 2014; Ren et al., 2013). Berdasarkan hasil penelitian, tren kadar glukosa berbanding terbalik dengan tren kadar tanin, baik dalam biomassa dan filtrat. Temuan ini menunjukkan adanya keberadaan enzim

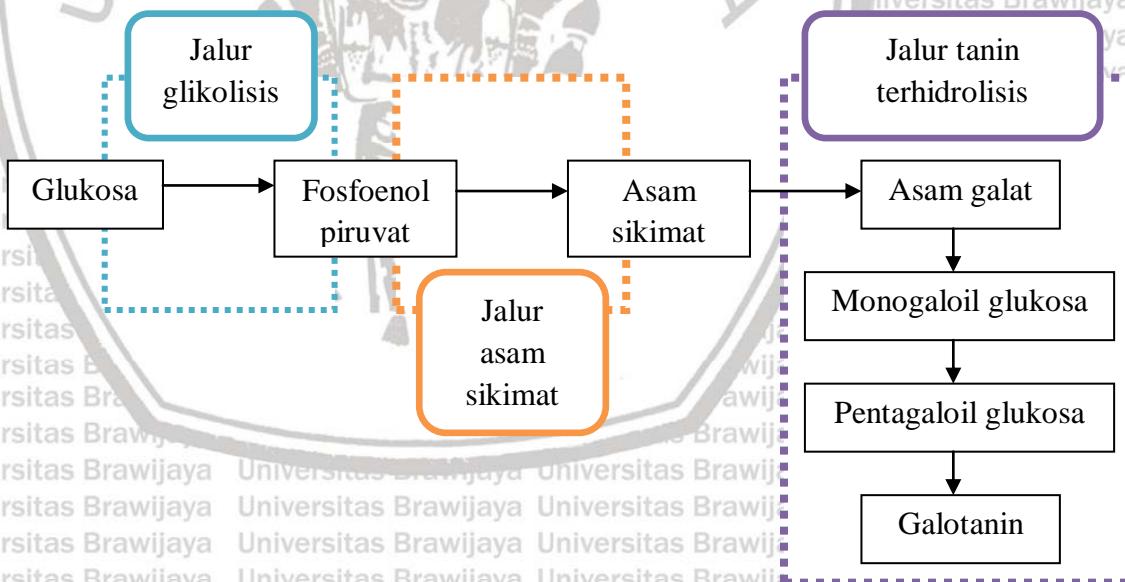
tanase dalam sistem fermentasi yang mengarah pada hidrolisis tanin menjadi glukosa, dan menghasilkan hubungan berlawanan antara tanin dengan glukosa pada semua kisaran inokulum.



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

Secara umum, penambahan volume inokulum di atas 5% dapat menurunkan aktivitas degradasi senyawa tanin. Bahkan, penggunaan volume inokulum 25% menyebabkan kadar tanin meningkat kembali setelah kadar tanin mulai menurun pada volume inokulum 15% dan 20%. Hal tersebut menunjukkan bahwa peningkatan volume inokulum yang ditambahkan dalam media fermentasi justru mengakibatkan penurunan aktivitas bakteri untuk menghasilkan enzim tanase. Beberapa spesies mikroorganisme dapat hidup berdampingan secara stabil pada konsentrasi nutrisi tertentu. Namun, keterbatasan ketersediaan nutrisi akibat peningkatan populasi atau pertumbuhan mikroorganisme selanjutnya menyebabkan kompetisi antar spesies untuk bertahan hidup. Beberapa strategi mikroorganisme untuk mendominasi satu sama lain yaitu dengan memproduksi antibiotik atau metabolit yang beracun bagi lawannya (Hibbing et al., 2010).

Pada penelitian ini, adanya etanol hasil metabolisme *S. cerevisiae* dapat dianggap sebagai metabolit yang memicu penurunan aktivitas bakteri asam laktat. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa peningkatan etanol dalam sistem fermentasi dapat menurunkan pertumbuhan *L. plantarum*. Lee, et al. (2012) menunjukkan bahwa jumlah sel *L. plantarum* mengalami penurunan ketika ditumbuhkan dalam media mengandung 5% etanol ( $OD_{600}=1,6$ ) menjadi 8% etanol ( $OD_{600}=1,2$ ). Bahkan, bakteri tersebut tidak dapat tumbuh dengan baik dalam media mengandung 10% etanol (Lee et al., 2012). Penelitian lainnya juga melaporkan bahwa *L. plantarum* memiliki laju pertumbuhan 5 kali lebih rendah ketika ditumbuhkan dalam media cair MRS yang diperkaya dengan 8% etanol (v/v) dibandingkan dengan media cair MRS tanpa etanol (van Bokhorst-van de Veen et al., 2011). Oleh karena itu, dapat dinyatakan bahwa etanol dalam media fermentasi mampu menurunkan aktivitas *L. plantarum*, sehingga berdampak pada penurunan produksi tanase.



**Gambar 5.5** Jalur biosintesis galotanin (tanin terhidrolisis) secara umum (Natural Chemistry)

Namun demikian, penjumlahan antara kadar tanin biomassa dan filtrat menghasilkan nilai melebihi kadar tanin kubis segar (290,88 mg/100 g kubis). Hal tersebut teramat pada semua kisaran volume inokulum yang

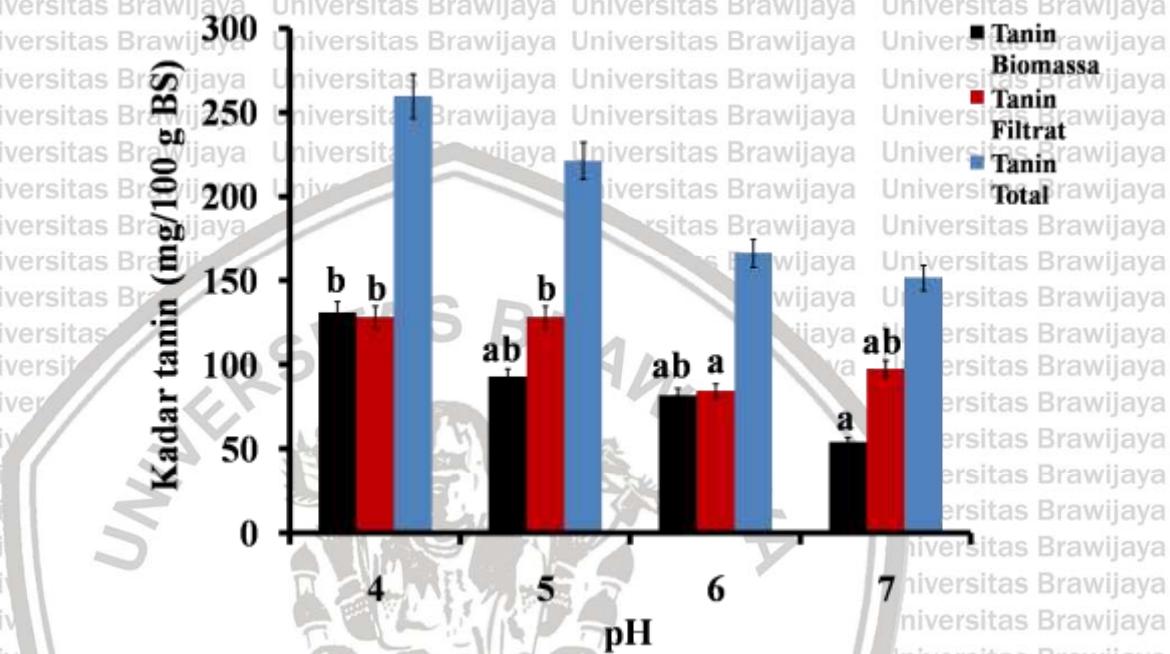
digunakan. Telah disebutkan bahwa keadaan kompetisi antara mikroorganisme yang digunakan memicu setiap sel memproduksi metabolit sekunder untuk bertahan hidup (Hibbing et al., 2010). Tanin merupakan senyawa metabolit sekunder yang dapat disintesis oleh mikroorganisme melalui jalur sikimat (**Gambar 5.5**). *S. cerevisiae* diketahui memiliki enzim DHAP sintase yang dapat mengkatalisis aktivasi jalur asam sikimat selama metabolisme (Averesch and Krömer, 2018; Natural Chemistry). Oleh karena itu, kemampuan ragi untuk memulai jalur asam sikimat dapat memungkinkan pembentukan tanin selama proses fermentasi, sehingga menyebabkan kadar tanin justru meningkat seiring dengan peningkatan volume inokulum campuran yang digunakan.

### 5.2.2. Pengaruh pH Terhadap Kadar Tanin dalam Kubis Terfermentasi

pH dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme, yang pada gilirannya mempengaruhi laju produksi (Norouzian, 2008). *S. cerevisiae* diketahui memiliki pH pertumbuhan optimum pada kisaran 4–6,5 (G. Walker & Stewart, 2016), sedangkan *L. plantarum* memiliki pH optimum pada rentang 5,5–5,8 (Batt, 2014). Namun, beberapa penelitian juga telah menunjukkan bahwa pH optimum untuk produksi dan aktivitas tanase oleh *L. plantarum* cukup bervariasi, yaitu pada kisaran 6–8 (Matsuda Hirose, & Kanauchi, 2016; Natarajan & Rajendran, 2009). Oleh karena itu, penting untuk mempelajari pengaruh variasi pH media awal terhadap aktivitas kedua bakteri dalam mendegradasi senyawa tanin dalam kubis. Penentuan pH media awal optimum dilakukan dengan menggunakan volume inokulum campuran *L. plantarum* – *S. cerevisiae* sebesar 5% (v/v).

**Gambar 5.6** merepresentasikan pengaruh pH media awal *L. plantarum* dan *S. cerevisiae* terhadap kadar tanin dalam kubis terfermentasi. Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa nilai signifikansi, baik untuk pengaruh pH terhadap kadar tanin biomassa dan filtrat  $>0,05$ .

Hal ini mengindikasikan bahwa sebaran data berdistribusi normal. Selain itu, hasil analisis statistik menggunakan ANOVA One Way menunjukkan bahwa pH berpengaruh nyata terhadap kadar tanin kubis. Hal ini dibuktikan dengan nilai F hitung yang lebih besar dengan F tabel (3,1).



**Gambar 5.6** Hubungan antara pH terhadap kadar tanin biomassa dan filtrat hasil fermentasi kubis pada kondisi anaerobik selama 96 jam dengan suhu ruang dan volume inokulum campuran *L. plantarum – S. cerevisiae* sebesar 5% (v/v)

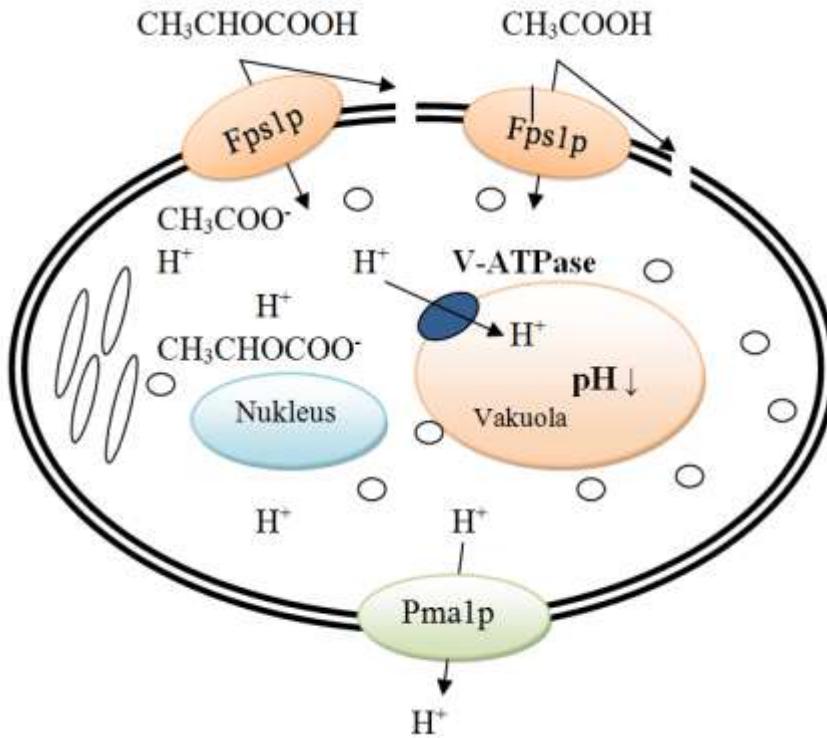
Berdasarkan **Gambar 5.6**, kadar tanin dalam biomass kubis menurun seiring dengan peningkatan nilai pH. Walaupun profil kadar tanin dalam filtrat terlihat fluktuatif, kadar tanin total (biomassa + filtrat) tetap lebih rendah dibandingkan dengan kadar tanin dalam kubis segar, yang mengindikasikan tanin terdegradasi menjadi senyawa lain oleh aktivitas enzim tanase bakteri. pH optimum untuk mendegradasi tanin dalam kubis menggunakan kultur campuran *L. plantarum* dan *S. cerevisiae* adalah 7 (kadar tanin sisa dalam kubis sebesar 54,061 mg/100 g berat segar kubis). Hasil tersebut sedikit berbeda dengan penelitian sebelumnya.

Penelitian oleh Natarajan & Rajendran (2009) menunjukkan bahwa *L. plantarum* memiliki kondisi optimum aktivitas tanase pada pH 6

(Natarajan & Rajendran, 2009). Demikian pula, Matsuda et al. (2016) menunjukkan bahwa pH optimum dari enzim tanase yang diisolasi dari *L. plantarum* sebesar 8 (Matsuda et al., 2016). Berdasarkan penelitian oleh Jiménez et al. (2014), *L. plantarum* memiliki 2 tipe enzim tanase, yaitu TanALp (tanase ekstraseluler) dengan pH optimum 6 dan TanBLp (tanase intraseluler) dengan pH optimum 7–8. TanALp dapat mendegradasi kompleks asam tanat di luar sel. Hasil degradasi tanin dengan bentuk yang kurang kompleks tersebut dapat menginduksi ekspresi gen *tanBLp* untuk membentuk protein TanBLp, sekaligus mendorong masuknya produk tersebut menuju sitoplasma sel untuk didegradasi lebih lanjut menjadi glukosa dan asam galat (Jiménez et al., 2014). Oleh karena itu, dapat diindikasikan bahwa keragaman nilai pH aktivitas tanase *L. plantarum* dalam beberapa penelitian dapat disebabkan oleh adanya dua jenis tanase pada bakteri tersebut.

Telah disebutkan bahwa penurunan nilai pH juga menurunkan aktivitas degradasi senyawa tanin. Pada penelitian ini, fermentasi kubis dilakukan dengan menggunakan dua mikroorganisme sekaligus yaitu *L. plantarum* dan *S. cerevisiae*. *S. cerevisiae* diketahui dapat mengubah glukosa membentuk produk asam, khususnya asam asetat, walaupun dalam jumlah sedikit (Lin et al., 2014). Di sisi lain, *L. plantarum* dapat menghasilkan asam laktat dan asam asetat sebagai produk utama metabolisme glukosa dan mensekresikannya ke dalam media fermentasi (Corsetti & Valmorri, 2011; Pieterse et al., 2005). Peningkatan asam-asam organik hasil metabolisme bakteri dan ragi selama fermentasi diketahui juga memiliki efek penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri sendiri. Meskipun *L. plantarum* lebih tahan terhadap asam laktat daripada banyak mikroorganisme lainnya, pertumbuhan mikroorganisme tersebut masih sangat terhambat oleh peningkatan konsentrasi asam organik yang tercapai selama fermentasi (Pieterse et al., 2005). Selain itu, peningkatan keasaman juga mampu menghambat pertumbuhan *S. cerevisiae*. Pemberian stress asam (0,2 % v/v) dalam media kultur ragi dapat menginduksi akumulasi

pembentukan *unfolded protein* dalam retikulum endoplasma yang mengarah pada kematian sel secara terprogram (Kawazoe, et al., 2017).



**Gambar 5.7** Mekanisme regulasi asam organik oleh mikroorganisme.  
Keterangan: Fps1p=kanal Fps1p; Pmalp=kanal Pmalp; V-ATPase=*vacuolar proton-pumping ATPase enzyme* (Geng, et al., 2017)

Efek penghambatan asam organik utamanya disebabkan oleh bentuk tak terdisosiasi asam organik ( $\text{RCOOH}$ ) yang dapat melintasi membran sel mikroorganisme melalui proses difusi sederhana atau melalui saluran Fps1p. Setelah berada di sitoplasma, asam dapat berdisosiasi menjadi anion ( $\text{RCOO}^-$ ) dan proton ( $\text{H}^+$ ). Tidak seperti bentuk molekulnya (tak terdisosiasi), proton yang dihasilkan dapat meningkatkan keasaman sitoplasma sel. Selain itu, akumulasi anion dalam sitoplasma juga dapat mengganggu aktivitas NADH oksidase yang mengarah pada gangguan regenerasi kofaktor  $\text{NAD}^+$  untuk proses metabolisme. Namun demikian, proton dan anion asam tersebut tidak dapat dikeluarkan melalui membran plasma dengan proses difusi sederhana karena muatan listriknya.

Akibatnya, sel akan bekerja untuk memulihkan pH intraseluler dengan

memompa proton keluar melalui kerja enzim bergantung ATP yaitu *plasma membrane proton-pumping ATPase* (PM-H<sup>+</sup>-ATPase) dan *vacuolar proton-pumping ATPase* (V-H<sup>+</sup>-ATPase). Kedua enzim tersebut berfungsi mempertahankan pH sitoplasma dengan memompa proton keluar melalui saluran Pma1p. Sementara itu, anion dapat dikeluarkan dari sitoplasma melalui aktivitas *transporter ATP-binding cassette* (ABC). Penggunaan beberapa energi inilah mampu menurunkan pertumbuhan dan aktivitas sel selama proses fermentasi (Geng et al., 2017; Kawazoe et al., 2017; Mira et al., 2010; Pieterse et al., 2005). Oleh karena itu, dapat dinyatakan bahwa adanya peningkatan asam organik dalam sistem fermentasi kemungkinan mampu menurunkan laju pertumbuhan mikroorganisme, khususnya *L. plantarum* sebagai penghasil tanase, sehingga degradasi senyawa tanin semakin menurun seiring dengan peningkatan keasaman lingkungan fermentasi.

### 5.3. Analisis Metabolit Sekunder Target Selama Proses Fermentasi

#### 5.3.1. Identifikasi Asam Organik dalam Filtrat Hasil Fermentasi

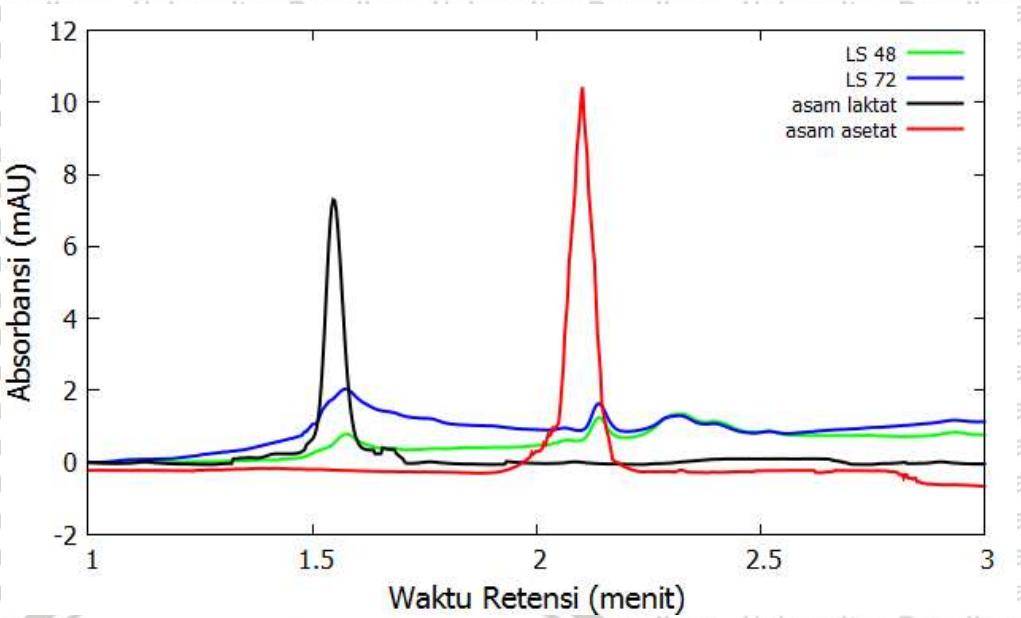
Pada penelitian ini, dilakukan pula pengukuran kadar tanin dan glukosa pada sampel yang diinkubasi selama 48 jam dan 72 jam menggunakan volume inokulum campuran *L. plantarum* – *S. cerevisiae* 5% (v/v) dan pH media awal 7. Pemilihan waktu inkubasi tersebut didasarkan pada kurva pertumbuhan mikroorganisme. Pada jam ke 48 dan 72, baik ragi maupun bakteri berada dalam fasa stasioner dan akhir fasa stasioner. Pada fasa stasioner, terjadi keterbatasan nutrisi dalam media kultur karena peningkatan populasi sel. Hal ini akan menyebabkan penurunan aktivitas mikroorganisme (Bruslind, 2019). Oleh karena itu, dilakukan pengukuran kadar tanin dan glukosa pada rentang waktu tersebut untuk membandingkan bagaimana aktivitas sel-sel dalam mendegradasi senyawa tanin.

Berdasarkan **Tabel 5.2**, kadar tanin kubis, baik dalam biomassa kubis maupun filtrat menurun dari jam ke 48 ke jam 72. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri masih aktif memproduksi enzim tanase hingga akhir fasa

stasioner bakteri. Aktivitas degradasi tanin oleh enzim tanase tersebut juga dikonfirmasi dengan peningkatan kadar glukosa dari jam 48 menuju jam 72. Sementara itu, pH filtrat menurun dari jam ke 48 ke 72. Menurut Lin et al. (2014), penurunan pH dalam media kultur fermentasi menunjukkan adanya akumulasi etanol dan produk samping, seperti asam yang dapat menggeser nilai pH selama metabolisme gula oleh mikroorganisme yang digunakan (Lin et al., 2014). *L. plantarum* merupakan bakteri heterofermentatif, sehingga dapat menghasilkan berbagai macam asam. *L. plantarum* dapat mengkonversi gula menjadi asam laktat dalam kondisi anaerobik. Selain itu, pada pH netral-basa, bakteri tersebut juga dapat menghasilkan asam asetat melalui jalur asetilfosfat (Corsetti & Valmorri, 2011). Selain itu, *S. cerevisiae* juga mampu menghasilkan asam asetat sebagai produk samping pembentukan etanol. Fermentasi menggunakan *S.cerevisiae* pada pH 6 dan suhu 30 °C selama 72 jam dengan kadar substrat glukosa 40 kg/m<sup>3</sup> mampu menghasilkan asam asetat sebanyak 9% (Lin et al., 2014). Oleh karena itu, dapat dinyatakan bahwa penurunan nilai pH dari jam fermentasi ke 48 menuju jam ke 72 diakibatkan adanya akumulasi asam, khususnya asam laktat dan asam asetat sebagai produk samping metabolisme mikroorganisme yang digunakan.

**Tabel 5.2** Analisis kadar tanin, glukosa, dan pH pada filtrat hasil fermentasi kubis menggunakan volume inokulum campuran *L. plantarum* – *S. cerevisiae* 5% (v/v), pH media awal 7, pada kondisi anaerobik dan suhu ruang selama 48 dan 72 jam

	Sampel	
	Filtrat pada jam ke 48	Filtrat pada jam ke 72
pH	1,45 ± 0,03	1,34 ± 0,03
Kadar tanin biomassa (mg/100 g kubis)	72,981 ± 1,022	57,027 ± 2,261
Kadar tanin filtrat (mg/100 g kubis)	124,781 ± 1,824	81,998 ± 1,425
Kadar gula biomassa (mg/100 g kubis)	72,556 ± 2,501	87,950 ± 1,000
Kadar gula filtrat (mg/100 g kubis)	19,289 ± 3,008	113,956 ± 2,331



**Gambar 5.8** Kromatogram asam organik pada filtrat hasil fermentasi kubis menggunakan volume inokulum campuran *L. plantarum* – *S. cerevisiae* 5% (v/v), pH media awal 7 pada kondisi anaerobik dan suhu ruang selama 48 dan 72 jam. LS 48: sampel pada 48 jam fermentasi; LS 72: sampel pada 72 jam fermentasi

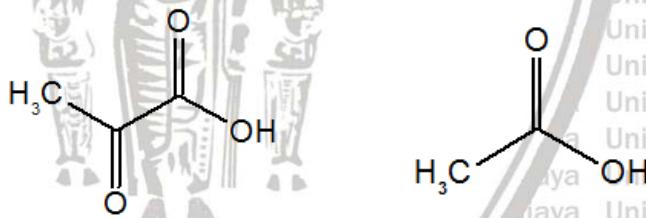
**Tabel 5.3** Identifikasi waktu retensi puncak asam asetat dan laktat pada filtrat hasil fermentasi kubis menggunakan volume inokulum campuran *L. plantarum* – *S.cerevisiae* 5% (v/v), pH media awal 7 pada kondisi anaerobik dan suhu ruang selama 48 dan 72 jam

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

Keberadaan asam laktat dan asetat tersebut selanjutnya diidentifikasi menggunakan HPLC. Berdasarkan analisis kromatogram HPLC (**Gambar**

5.8), filtrat hasil fermentasi diketahui mengandung asam laktat dan asam asetat. Hal ini didasarkan pada kesesuaian puncak asam laktat dan asetat pada waktu retensi tertentu dalam kromatogram sampel ketika dibandingkan dengan kromatogram standar. Identifikasi asam laktat dan

asam asetat, baik pada filtrat hasil fermentasi yang diambil pada jam ke 48 dan 72 tercantum dalam **Tabel 5.3**. Pada penelitian ini, asam laktat dan asam asetat merupakan senyawa hidrofilik, sehingga identifikasi jenis asam dalam filtrat sisa fermentasi menggunakan HPLC dilakukan dengan fasa diam non polar C18 dan fasa gerak polar yang terdiri dari campuran  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  80% dan asetonitril 20%. Dengan demikian, kedua senyawa tersebut dapat cepat terelusi melalui kolom dan menuju detektor. Puncak asam laktat memiliki waktu retensi lebih pendek dibandingkan puncak asam asetat. Asam laktat memiliki satu gugus karboksil dan satu gugus karbonil, sedangkan asam asetat hanya memiliki satu gugus karboksil (**Gambar 5.9**). Berdasarkan strukturnya tersebut, adanya satu gugus karbonil pada asam laktat meningkatkan polaritas senyawa tersebut. Hal tersebut mengakibatkan asam laktat dapat lebih larut dalam fasa gerak polar yang digunakan apabila dibandingkan dengan senyawa asam asetat. Oleh karena itu, asam laktat akan terelusi terlebih dahulu melalui kolom dan menuju detektor, sehingga puncak asam laktat memiliki waktu retensi yang lebih pendek jika dibandingkan dengan puncak asam asetat.



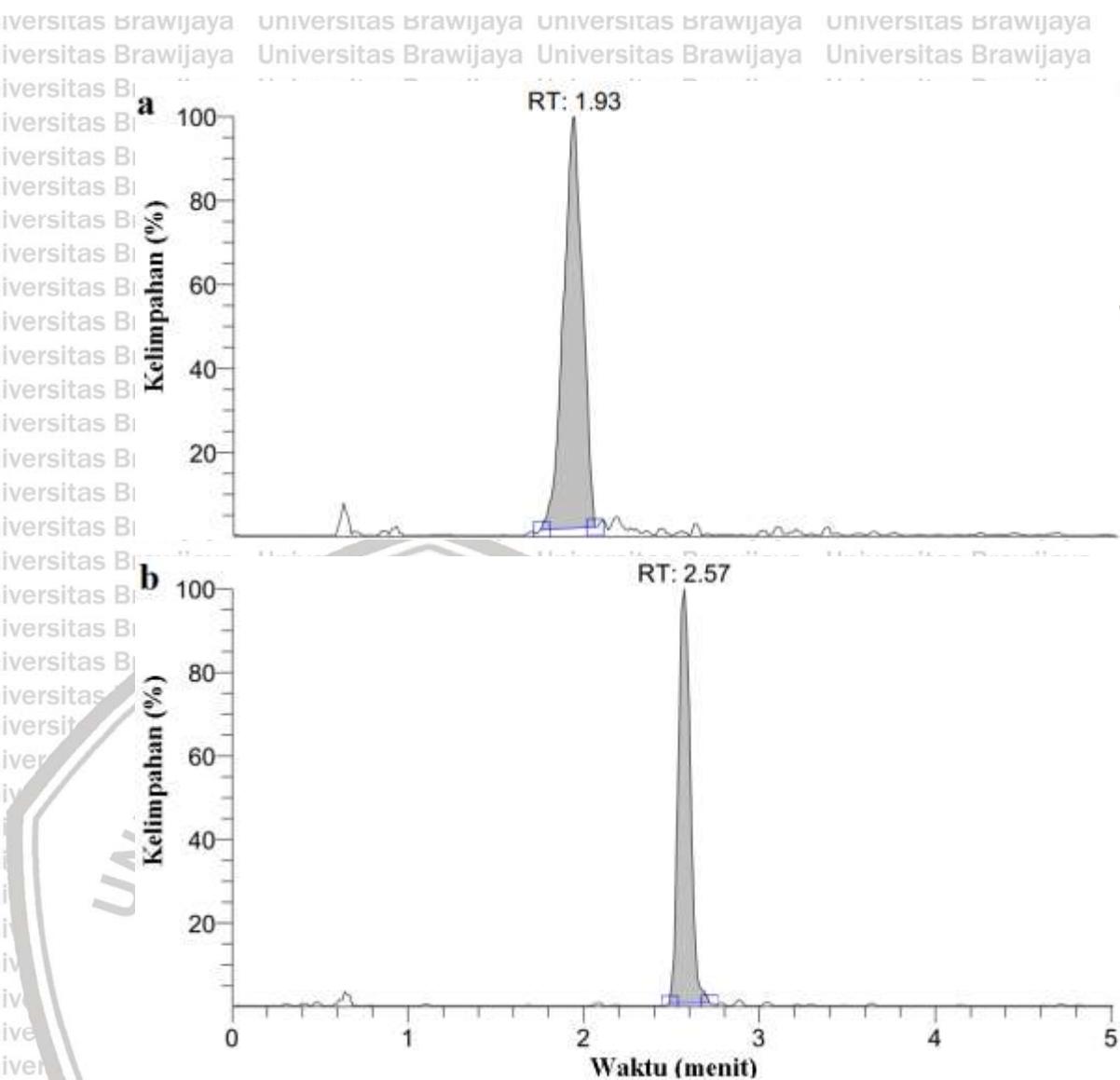
**Gambar 5.9** Struktur senyawa (a) asam laktat dan (b) asam asetat (Pubchem)

### 5.3.2. Identifikasi Senyawa Golongan Isotiosianat Target dalam Kubis Hasil Fermentasi

Kubis mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu glukosinolat. Glukosinolat diketahui belum memiliki aktivitas biologis. Namun, senyawa turunannya, yaitu isotiosianat telah dilaporkan sebagai agen antikanker dan antioksidan dalam beberapa penelitian (Vig et al., 2009). Glukosinolat dapat dihidrolisis menjadi senyawa isotiosianat oleh enzim mirosinase tanaman yang hanya aktif oleh perusakan dinding sel

tanaman. Perusakan dinding sel tanaman dapat melepaskan enzim mirosinase dan glukosinolat yang berada dalam kompartemen sel berbeda dalam tanaman, yang selanjutnya memicu proses hidrolisis senyawa tersebut (Barba et al., 2016; Palani et al., 2016; Radojcic et al., 2008). Pada penelitian kali ini, proses penggunaan gula dalam kubis sebagai sumber energi maupun degradasi tanin dalam kubis oleh bakteri tentunya juga mampu menyebabkan perusakan dinding sel tanaman. Hal tersebut dapat mengarah pada aktivasi mirosinase dan pelepasan senyawa glukosinolat dari kompartemen sel tanaman, yang akhirnya mengarah pada proses pembentukan isotiosianat. Dengan demikian, pada penelitian ini, dilakukan identifikasi senyawa isotiosianat dalam kubis terfermentasi dan kubis segar (sebagai pembanding). Senyawa isotiosianat yang ditargetkan adalah iberin dan sulforafan, yang masing-masing berasal dari glukorafanin dan glukoiberin. Penentuan identifikasi kedua senyawa target didasarkan pada kemampuan senyawa tersebut dalam menghambat perkembangan kanker secara *in vitro* dan *in vivo* pada beberapa penelitian (Farag & Motaal, 2010; Jadhav et al., 2007).

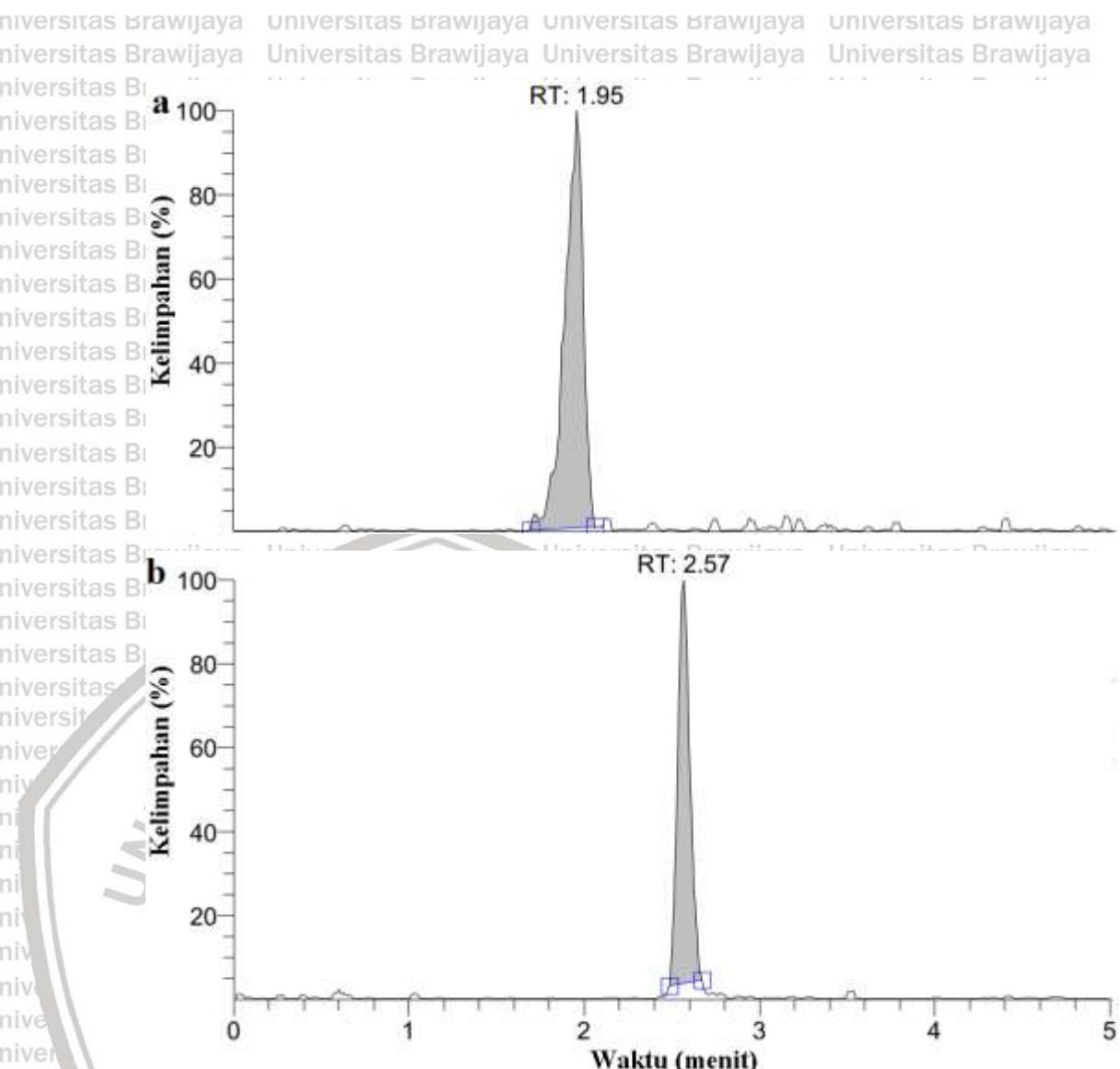
Analisis senyawa isotiosianat target dilakukan menggunakan LCMS. Keberadaan kedua senyawa tersebut dikonfirmasi berdasarkan perbandingan nilai *m/z* sampel dengan spektra MS literatur. Hasil kromatogram LCMS tercantum dalam **Gambar 5.10**. **Gambar 5.10 a** menunjukkan fragmen dengan *m/z* 164 dengan kelimpahan relatif 100% pada waktu retensi 1,93 menit. Fragmen tersebut sesuai dengan senyawa iberin, yang memiliki berat molekul 163,253 g/mol (Pubchem). Sementara itu, **Gambar 5.10 b** menunjukkan adanya fragmen dengan kelimpahan 100% pada waktu retensi 2,57 yang memiliki *m/z* 178. Nilai *m/z* tersebut sesuai dengan berat molekul sulforafan yaitu 177,29 g/mol (Pubchem). Keberadaan kedua senyawa tersebut mengindikasikan bahwa fermentasi pada kubis dapat mengaktifkan enzim mirosinase tanaman, yang selanjutnya mengarah pada hidrolisis glukosinolat menjadi senyawa isotiosianat yang ditargetkan. **Tabel 5.4** merangkum hasil dari analisis LCMS.



**Gambar 5.10** Hasil LCMS dari biomassa kubis terfermentasi menggunakan volume inokulum campuran *L. plantarum* – *S. cerevisiae* 5% (v/v), pH media awal 7 pada kondisi anaerobik dan suhu ruang selama 72 jam **(a)** kromatogram senyawa iberin **(b)** kromatogram senyawa sulforafan

**Tabel 5.4** Identifikasi senyawa isotiosianat kubis segar dan kubis yang difermentasi (volume inokulum campuran *L. plantarum* – *S. cerevisiae* 5% (v/v), pH media awal 7, kondisi anaerobik, suhu ruang, lama fermentasi 72 jam)

Senyawa	Waktu Retensi (menit)		Berat molekul (g/mol) (Pubchem)
	Sampel Kubis Segar	Sampel Kubis Terfermentasi	
Iberin	1,95	1,93	164
Sulforafan	2,57	2,57	178



**Gambar 5.11** Hasil LCMS dari kubis segar (a) kromatogram senyawa iberin (b) kromatogram senyawa sulforafan

Namun demikian, profil LCMS dari kubis segar telah menunjukkan keberadaan senyawa iberin dan sulforafan (**Gambar 5.11**). Hal ini mengindikasikan bahwa dinding sel tanaman telah lisis bahkan sebelum adanya aktivitas dari mikroorganisme, yang menyebabkan pelepasan enzim untuk menghidrolisis senyawa glukosinolat menjadi senyawa isotiosianat target. Menurut Barba et al. (2016), gangguan fisik jaringan tanaman selama proses pengolahan makanan, seperti memotong dapat menyebabkan enzim myrosinase aktif dan mendegradasi senyawa glukosinolat dalam tanaman *Brassicaceae* (Barba et al., 2016). Oleh karena itu, adanya senyawa isotiosianat dalam kubis segar dapat dikarenakan

adanya proses *pre-treatment* sebelum analisis LCMS, seperti pemotongan dan penghalusan, yang menyebabkan enzim mirosinase dapat aktif untuk menghidrolisis senyawa glukosinolat target. Namun demikian, dalam prakteknya, proses pengolahan makanan tersebut hanya menyebabkan hidrolisis glukosinolat dalam jumlah kecil atau terbatas (Johnson, 2002). Dengan demikian, pada penelitian ini, dilakukan analisis kuantitatif pada salah satu senyawa isotiosianat target, yaitu sulforafan untuk membandingkan kadar isotiosianat pada kubis segar (dinding sel tanaman rusak akibat gangguan fisik/ pemotongan) dan kubis terfermentasi (dinding sel tanaman rusak akibat gangguan fisik sekaligus mikroorganisme).

**Tabel 5.5** Kadar sulforafan kubis segar dan kubis terfermentasi (volume inokulum campuran *L. plantarum* – *S. cerevisiae* 5% (v/v), pH media awal 7, kondisi anaerobik, lama fermentasi 72 jam)

	Bahan Baku (Kubis Segar)	Sampel (Kubis Terfermentasi)
Kadar Sulforafan ( $\mu\text{g/g}$ )	$0,539 \pm 24,06$	$0,711 \pm 19,04$

Berdasarkan hasil analisis kuantitatif, kadar sulforafan kubis terfermentasi lebih besar bila dibandingkan dengan kubis segar (**Tabel 5.5**). Peningkatan kadar sulforafan dalam kubis terfermentasi dapat disebabkan adanya bantuan mikroorganisme dalam memecah dinding sel tanaman. Bakteri asam laktat, diketahui memiliki enzim pemecah dinding sel (selulase, pektinase, dan  $\beta$ -glukosidase) (Kung et al., 2010; Matthews et al., 2004; Sieuwerts et al., 2018). Sekresi enzim tersebut oleh bakteri, bersama dengan proses pemotongan kubis selama proses *pre-treatment* dapat membantu memecah dinding sel tanaman, sehingga membantu melepaskan enzim mirosinase dengan jumlah yang lebih besar. Hal tersebut akan mengarah pada peningkatan jumlah senyawa glukosinolat yang dapat dihidrolisis selama proses fermentasi.

## 6.1.Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian mengenai menggunakan kultur campuran *L. plantarum* – *S. cerevisiae* antara lain:

1. Volume inokulum campuran optimum untuk menurunkan kadar tanin kubis melalui proses fermentasi dengan *L. plantarum* – *S. cerevisiae* adalah 5% (kadar tanin 182,362 mg/100 g berat segar).
2. pH media awal optimum untuk menurunkan kadar tanin dalam kubis melalui proses fermentasi dengan volume inokulum campuran *L. plantarum* – *S. cerevisiae* 5% (v/v) adalah 7 (kadar tanin 54,061 mg/100 g berat segar).
3. Jenis asam yang berhasil diidentifikasi dalam filtrat hasil fermentasi kubis adalah asam laktat dan asam asetat.
4. Senyawa isotiosianat yang berhasil diidentifikasi dalam biomassa kubis terfermentasi adalah iberin dan sulforafan. Walaupun biomassa kubis segar juga telah mengandung kedua senyawa tersebut, tetapi kadar senyawa isotiosianat, yaitu sulforafan dalam kubis terfermentasi lebih besar (0,711 µg/g) dibandingkan kadar sulforafan dalam kubis segar (0,539 µg/g).

## 6.2.Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya yaitu perlu identifikasi jenis asam lainnya dan kuantisasi asam maupun etanol selama proses fermentasi kubis.

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

- and Sensory Properties of Citrus Vinegar. *LWT - Food Science and Technology*, 84, 753–763. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.032>
- Corsetti, A., & Valmorri, S. (2011). Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus spp.*: *Lactobacillus plantarum*. In *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition*. Elsevier. Amsterdam. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.000263-6>,
- Daneshfar, A., Ghaziaskar, H. S., & Homayoun, N. (2008). Solubility of Gallic Acid in Methanol, Ethanol, Water, and Ethyl Acetate. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 53(3), 776–778. <https://doi.org/10.1021/je700633w>
- Di Stefano, V., Avellone, G., Bongiorno, D., Cunsolo, V., Muccilli, V., Sforza, S., Dossena, A., Drahos, L., Vékey, K. (2012). Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for Food Analysis. *Journal of Chromatography A*, 1259, 74–85. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.023>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Production Technique and Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356.
- Ernst, I. M. A., Wagner, A. E., Schuemann, C., Storm, N., Höppner, W., Döring, F., Stocker, A., Rimbach, G. (2011). Allyl-, Butyl- and Phenylethyl-Isothiocyanate Activate Nrf2 in Cultured Fibroblasts. *Pharmacological Research*, 63(3), 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.11.005>
- Fahay, J. W. (2015). Brassica: Characteristics and Properties. In *Encyclopedia of Food and Health* (3rd ed.). Elsevier. Amsterdam. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00083-0>
- Farag, M. A., & Motaal, A. A. (2010). Sulforaphane Composition, Cytotoxic and Antioxidant Activity of Crucifer Vegetables. *Journal of Advanced Research*, 1(1), 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.005>
- Fekadu Gemede, H. (2014). Antinutritional Factors in Plant Foods: Potential Health Benefits and Adverse Effects. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3(4), 284. <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20140304.18>
- Filannino, P., Cardinali, G., Rizzello, C. G., Buchin, S., De Angelis, M., Gobbetti, M., & Di Cagno, R. (2014). Metabolic Responses of *Lactobacillus*

- Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya  
Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya  
Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya  
*plantarum* Strains during Fermentation and Storage of Vegetable and Fruit  
Juices. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(7), 2206–2215.  
<https://doi.org/10.1128/aem.03885-13>
- Geng, P., Zhang, L., & Shi, G. Y. (2017). Omics Analysis of Acetic Acid Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(5). <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2259-9>
- Guriya, R., Moon, A., & Talreja, K. (2015). Phytochemical Profiling and Characterization of Bioactive Compounds from *Brassica oleracea*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7(4), 825–831.
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. (2010). Jungle National Review of Microbiology, 8(1), 15–25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>.
- Iori, R., Rollin, P., Streicher, H., Thiem, J., & Palmieri, S. (1996). The Myrosinase-Glucosinolate Interaction Mechanism Studied Using Some Synthetic Competitive Inhibitors. *FEBS Letters*, 385(1–2), 87–90. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00335-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00335-3)
- Ishida, M., Hara, M., Fukino, N., Kakizaki, T., & Morimitsu, Y. (2014). Glucosinolate Metabolism, Functionality and Breeding for the Improvement of *Brassicaceae* Vegetables. *Breeding Science*, 64(1), 48–59. <https://doi.org/10.1270/jbsbs.64.48>
- Jadhav, U., Ezhilarasan, R., Vaughn, S. F., Berhow, M. A., & Mohanam, S. (2007). Iberin Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Neuroblastoma Cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 19(3), 353–361. <https://doi.org/10.3892/ijmm.19.3.353>
- Jiménez, N., Esteban-Torres, M., Mancheño, J. M., De las Rivas, B., & Muñoz, R. (2014). Tannin Degradation by a Novel Tannase Enzyme Present in Some *Lactobacillus plantarum* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(10), 2991–2997. <https://doi.org/10.1128/AEM.00324-14>
- Johnson, I. T. (2002). Glucosinolates: Bioavailability and Importance to Health. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 72(1), 26–31. <https://doi.org/10.1024/0300-9831.72.1.26>

- Kawazoe, N., Kimata, Y., & Izawa, S. (2017). Acetic acid Causes Endoplasmic Reticulum Stress And Induces The Unfolded Protein Response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, 8(1192), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01192>
- Krajka-Kužniak, V., Paluszczak, J., Szafer, H., & Baer-Dubowska, W. (2015). The Activation of the Nrf2/ARE Pathway in Hepg2 Hepatoma Cells by Phytochemicals and Subsequent Modulation of Phase II and Antioxidant Enzyme Expression. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 71(2), 227–238. <https://doi.org/10.1007/s13105-015-0401-4>
- Kung, L., Tung, R. S., Maciorowski, K. G., Buffum, K., Knutson, K., & Aimutis, W. R. (2010). Effects of Plant Cell-Wall-Degrading Enzymes and Lactic Acid Bacteria on Silage Fermentation and Composition. *Journal of Dairy Science*, 74(12), 4284–4296. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(91\)78623-2](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(91)78623-2)
- Kupiec, T. (2004). Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 8(3), 223–227.
- Lee, S. G., Lee, K. W., Park, T. H., Park, J. Y., Han, N. S., & Kim, J. H. (2012). Proteomic Analysis of Proteins Increased or Reduced by Ethanol of *Lactobacillus plantarum* ST4 Isolated from Makgeolli, Traditional Korean Rice Wine. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(4), 516–525. <https://doi.org/10.4014/jmb.1109.09012>
- Liener, I. . (1998). *Plant Antinutritional Factors: Detoxification*. 4587–4593. Elsevier. Amsterdam.
- Lin, Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S., & Kong, H. (2014). Factors Affecting Ethanol Fermentation Using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass and Bioenergy*, 47, 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.019>
- Liu, X., Jia, B., Sun, X., Ai, J., Wang, L., Wang, C., Zhao, F., Zhan, J., Huang, W. (2015). Effect of Initial pH on Growth Characteristics and Fermentation Properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Food Science*, 80(4), M800–M808. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12813>

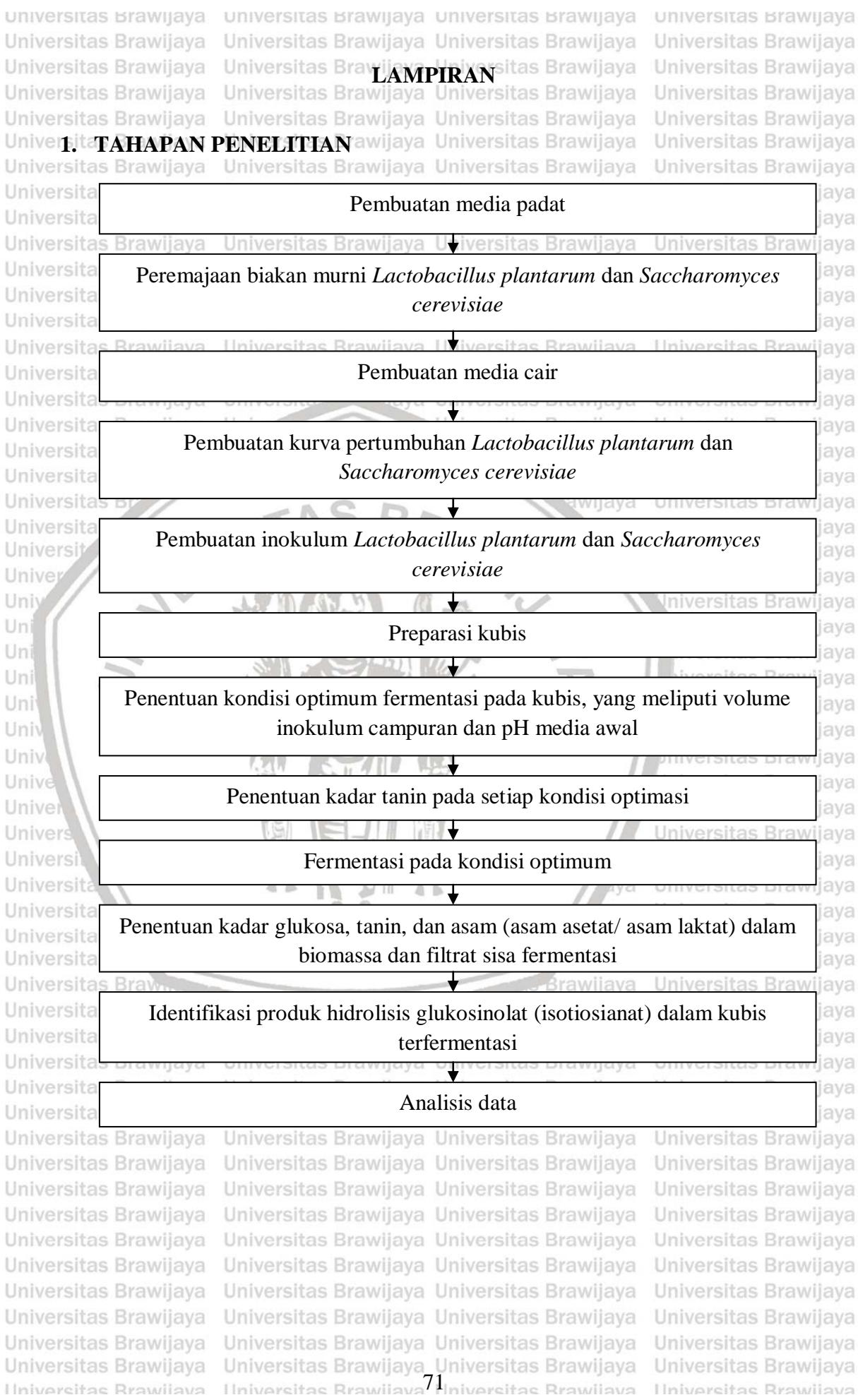
- Matejčeková, Z., Liptáková, D., Spodniaková, S., & Valík, L. (2016). Characterization of the Growth of *Lactobacillus plantarum* in Milk in Dependence on Temperature. *Acta Chimica Slovaca*, 9(2), 104–108. <https://doi.org/10.1515/acs-2016-0018>
- Matsuda, M., Hirose, Y., & Kanauchi, M. (2016). Purification and Characteristics of Tannase Produced by Lactic Acid Bacteria, *Lactobacillus plantarum* H78. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, (43), 258-266. <https://doi.org/10.1094/asbcj-2016-4298-01>
- Matthews, A., Grimaldi, A., Walker, M., Bartowsky, E., Grbin, P., & Jiranek, V. (2004). Lactic Acid Bacteria as a Potential Source of Enzymes for Use in Vinification. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 5715–5731. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5715-5731.2004>
- Mayorga-Gross, A. L., Quirós-Guerrero, L. M., Fourny, G., & Vaillant, F. (2016). An Untargeted Metabolomic Assessment Of Cocoa Beans during Fermentation. *Food Research International*, 89, 901–909. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.017>
- Mira, N. P., Palma, M., Guerreiro, J. F., & Sá-Correia, I. (2010). Genome-Wide Identification of *Saccharomyces cerevisiae* Genes Required for Tolerance To Acetic Acid. *Microbial Cell Factories*, 9, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-79>
- Miranda, B., Lawton, N. M., Tachibana, S. R., Swartz, N. A., & Hall, W. P. (2016). Titration and HPLC Characterization of Kombucha Fermentation: A Laboratory Experiment in Food Analysis. *Journal of Chemical Education*, 93(10), 1770–1775. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.6b00329>
- Mosha, T. C., Gaga, H. E., Pace, R. D., Laswai, H. S., & Mtebe, K. (1995). Effect of blanching on the Content of Antinutritional Factors in Selected Vegetables. *Plant Foods for Human Nutrition*, 47(4), 361–367. <https://doi.org/10.1007/BF01088275>
- Nair, R., Ghakker, N., & Sharma, A. (2015). Spectrophotometric Estimation of Tannins in Raw and Processed Form (*Paan Masala*) of Areca Nut. *International Journal of Education and Science Research Review*, (1), 51–56. Retrieved from www.ijesrr.org

- Natarajan, K., & Rajendran, A. (2009). Effect of Fermentation Parameters on Extra Cellular Tannase Production by *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407. *E-Journal of Chemistry*, 6(4), 979–984.
- Natesh N, H., SK, A., & L, A. (2018). An Overview of Nutritional and Anti Nutritional Factors in Green Leafy Vegetables. *Horticulture International Journal*, 1(2), 58–65. <https://doi.org/10.15406/hij.2017.01.00011>
- Norouzian, D. (2008). Effect of Different Factors on Fermentative Production of Enzymes by Fungi. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 2(1), 14–18.
- Nuobariene, L., Arneborg, N., & Hansen, Å. S. (2014). Phytase Active Yeasts Isolated From Bakery Sourdoughs. *Foodbalt*, 223–227.
- Oboh, G. (2006). Nutrient Enrichment Of Cassava Peels Using a Mixed Culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus spp* Solid Media Fermentation Techniques. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(1), 46–49. <https://doi.org/10.2225/vol9-issue1-fulltext-1>
- Ogbede, S. C., Saidu, A. N., Kabiru, A. Y., & Busari, M. B. (2015). Nutrient and Anti-Nutrient Compositions of *Brassica oleracea* var. *capitata* L. *IOSR Journal Of Pharmacy*, 5(3), 2250–3013. Retrieved from <http://www.iosrphr.org/papers/v5i3/D053019025.pdf>
- Palani, K., Harbaum-Piayda, B., Meske, D., Keppler, J. K., Bockelmann, W., Heller, K. J., & Schwarz, K. (2016). Influence of Fermentation on Glucosinolates and Glucobrassicin Degradation Products in Sauerkraut. *Food Chemistry*, 190, 755–762. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.012>
- Pandey, S., & Garg, F. C. (2013). Preparation of Spiced Sauerkraut by Using Lactic Acid Bacteria and By Natural Fermentation. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 14(6), 2319–7064. Retrieved from [www.ijsr.net](http://www.ijsr.net)
- Parasuraman, R., Balamurugan, S., Muralidharan, S., Jayaraj, K., Ijayan, V., & Anish, S. (2014). An Overview of Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy Instrumentation. *Pharmaceutical Methods*, 5(2), 47–55. <https://doi.org/10.5530/phm.2014.2.2>
- Park, S., Arasu, M. V., Jiang, N., Choi, S. H., Lim, Y. P., Park, J. T., Al-Dhabi,

- N.A., Kim, S. J. (2014). Metabolite Profiling of Phenolics, Anthocyanins and Flavonols in Cabbage (*Brassica oleracea var. capitata*). *Industrial Crops and Products*, 60, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.037>
- Park, S., Valan Arasu, M., Lee, M. K., Chun, J. H., Seo, J. M., Lee, S. W., Al-Dhabi, N. A., Kim, S. J. (2014). Quantification of Glucosinolates, Anthocyanins, Free Amino Acids, and Vitamin C in Inbred Lines of Cabbage (*Brassica oleracea L.*). *Food Chemistry*, 145, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.010>
- Peñas, E., Pihlava, J. M., Vidal-Valverde, C., & Frias, J. (2012). Influence of Fermentation Conditions of *Brassica oleracea L. var. capitata* on the Volatile Glucosinolate Hydrolysis Compounds of Sauerkrauts. *LWT - Food Science and Technology*, 48(1), 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.005>
- Pieterse, B., Leer, R. J., Schuren, F. H. J., & van der Werf, M. J. (2005). Unravelling the Multiple Effects of Lactic Acid Stress on *Lactobacillus plantarum* by Transcription Profiling. *Microbiology*, 151(12), 3881–3894. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28304-0>
- Polshettiwar, S. A., Ganjiwale, R. O., Wadher, S. J., & Yeole, P. G. (2007). Spectrophotometric Estimation of Total Tannins in Some Ayurvedic Eye Drops. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 574–576.
- Ponomarova, O., Gabrielli, N., Sévin, D. C., Mülleder, M., Zirngibl, K., Bulyha, K., Andrejev, S., Kafkia, E., Typas, A., Sauer, U., Raiser, M., Patil, K. R. (2017). Yeast Creates a Niche for Symbiotic Lactic Acid Bacteria through Nitrogen Overflow. *Cell Systems*, 5(4), 345–357.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.09.002>
- Radojcic, I., Glivetic T, Delonga K, & Vorkapic, J. (2008). Glucosinolates and Their Potential Role in Plant. *Periodicum Biologorum*, 110(4), 297–309. <https://doi.org/10.1021/ef990019r>
- Ren, B., Wu, M., Wang, Q., Peng, X., Wen, H., McKinstry, W. J., & Chen, Q. (2013). Crystal Structure of Tannase from *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Molecular Biology*, 425(15), 2737–2751. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.04.032>

- Renge, V. C., Khedkar, S. V, & Nandurkar, N. R. (2012). Enzyme Synthesis by Fermentation Method: A Review. *Scientific Reviews and Chemical Communications*, 2(4), 585–590.
- Richardson, K. V. (2013). Evaluation of Three Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) Varieties Grown for The Fresh Market. *Gladstone Road Agriculture Centre Crops Research Report No. 15*, 15(15). Retrieved from <http://www.bahamas.gov>.
- Rokayya, S., Li, C.-J., Zhao, Y., Li, Y., & Sun, C.-H. (2014). Cabbages (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) Phytochemicals with Antioxidant and Anti-inflammatory Potential. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(11), 6657–6662. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.11.6657>
- Salari, R., & Salari, R. (2017). Investigation of the Best *Saccharomyces cerevisiae* Growth Condition. *Electronic Physician*, 9(1), 3592–3597. <https://doi.org/10.19082/3592>
- Septembre-Malaterre, A., Remize, F., & Poucheret, P. (2018). Fruits and Vegetables, as a Source of Nutritional Compounds and Phytochemicals: Changes in Bioactive Compounds during Lactic Fermentation. *Food Research International*, 104, 86–99. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.031>
- Sieuwerts, S., Bron, P. A., & Smid, E. J. (2018). Mutually Stimulating Interactions Between Lactic Acid Bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in Sourdough Fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 90, 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.022>
- Sinha, K., & Khare, V. (2017). Review on : Antinutritional Factors in Vegetable Crops. *The Pharma Innovation Journal*, 6(12), 353–358.
- Siti Hajar, M. A., Rahmath, A., Siti Azmah, J., Hartinie, M., Gansau, J. A., Ainol Azifa, M. F., & Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in Sustainable Bioethanol Production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2007). *Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition*. Thomson Brooks/Cole. Belmont.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2014). *Fundamentals of Instrumental Analysis*. Belmont, CA: Cengage Learning.

- universitas brawijaya    universitas brawijaya    universitas brawijaya    universitas brawijaya    universitas brawijaya  
Universitas Brawijaya    Universitas Brawijaya    Universitas Brawijaya    Universitas Brawijaya    Universitas Brawijaya  
Universitas Brawijaya    Universitas Brawijaya    Universitas Brawijaya    Universitas Brawijaya    Universitas Brawijaya  
Stanbury. (2017). *Principles of Fermentation Technology: The Range of Fermentation Procces*. Elsevier. Amsterdam. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099953-1/00001-6>
- Swaroopanand, S. S., Mahavidyalya, S., Bhilai, H., Agrawal, N., Minj, D. K., & Rani, K. (2015). Estimation of Total Carbohydrate Present In Dry Fruits. *IOSR Journal of Environmental Science*, 1(6), 24–27.
- Thammana, M. (2016). A Review on High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(2), 22–28.
- van Bokhorst-van de Veen, H., Abee, T., Tempelaars, M., Bron, P. A., Kleerebezem, M., & Marco, M. L. (2011). Short- and Long-Term Adaptation to Ethanol Stress and Its Cross-Protective Consequences in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15), 5247–5256. <https://doi.org/10.1128/aem.00515-11>
- Vig, A. P., Rampal, G., Thind, T. S., & Arora, S. (2009). Bio-protective Effects of Glucosinolates - A Review. *LWT - Food Science and Technology*, 42(10), 1561–1572. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.023>
- Walker, G. M., & Walker, R. S. K. (2018). Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations. *Advances in Applied Microbiology*, 105. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.05.003>
- Walker, G., & Stewart, G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*, 2(4), 30. <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>
- Zhou, B., Xiao, J. F., Tuli, L., & Ressom, H. W. (2012). LC-MS-Based Metabolomics. *Molecular BioSystems*, 8(2), 470–481. <https://doi.org/10.1039/c1mb05350g>
- Zhou, Y., Han, L. R., He, H. W., Sang, B., Yu, D. L., Feng, J. T., & Zhang, X. (2018). Effects of Agitation, Aeration and Temperature on Production of a Novel Glycoprotein gp-1 by *Streptomyces kanasenisi* Zx01 and Scale-Up Based on Volumetric Oxygen Transfer Coefficient. *Molecules*, 23(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules23010125>



## 2. PEMBUATAN REAGEN

### 2.1.Pembuatan Larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> jenuh

Preparasi larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> jenuh untuk penentuan tanin dibuat dengan cara melarutkan 35 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ke dalam 100 mL akuades pada suhu 70-80 °C.

Setelah itu, larutan didiamkan selama semalam.

### 2.2.Pembuatan 50 mL larutan stok asam tanat 0,1 mg/mL

Preparasi larutan stok asam tanat 0,1 mg/mL dibuat dengan cara melarutkan 5 mg asam tanat menggunakan akuades secukupnya di dalam gelas kimia. Setelah itu, larutan diencerkan menggunakan akuades dalam labu ukur 50 mL akuades.

### 2.3.Pembuatan 100 mL larutan fenol 5 % (b/v)

Pembuatan larutan fenol 5% untuk penentuan glukosa dilakukan dengan cara melarutkan 5 g kristal fenol menggunakan akuades secukupnya dalam gelas kimia. Setelah itu, larutan tersebut diencerkan pada labu ukur 100 mL melalui penambahan akuades hingga tanda batas.

### 2.4.Pembuatan 50 mL larutan stok glukosa 100 ppm

$$100 \text{ ppm} = 100 \frac{\text{mg}}{\text{L}} = 10 \frac{\text{mg}}{100 \text{ mL}} = 5 \frac{\text{mg}}{50 \text{ mL}}$$

Sebanyak 5 mg padatan glukosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) ditimbang dan dilarutkan dengan akuades dalam gelas kimia. Setelah itu, larutan diencerkan dalam labu ukur 50 mL melalui penambahan akuades hingga tanda batas.

### 2.5.Pembuatan etanol 80%

$$M_1 V_1 = M_2 V_2$$

$$V_1 = \frac{80\% \times 100 \text{ mL}}{99,9\%}$$

$$V_1 = 80 \text{ mL}$$

Sebanyak 80 mL etanol 99,9% dimasukkan ke dalam 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas.

## 2.6.Pembuatan C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,05 M

$$\text{Mr C}_2\text{H}_2\text{O}_4,2\text{H}_2\text{O} = 126,065 \text{ mg/mmol}$$

$$[\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4,2\text{H}_2\text{O}] = 0,05 \text{ M}$$

$$\text{massa C}_2\text{H}_2\text{O}_4,2\text{H}_2\text{O} = 0,05 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}} \times 50 \text{ mL} \times 126,065 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}}$$

$$= 630 \text{ mg}$$

$$= 0,63 \text{ gram}$$

Sebanyak 0,63 gram serbuk asam oksalat dihidrat (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O)

ditimbang dan dilarutkan dengan akuades dalam gelas kimia. Setelah itu, larutan diencerkan dalam labu ukur 50 mL melalui penambahan akuades hingga tanda batas.

## 2.7.Pembuatan NaOH 0,1 M

$$\text{Mr NaOH} = 40 \text{ mg/mmol}$$

$$[\text{NaOH}] = 0,1 \text{ M}$$

$$\text{massa NaOH} = 0,1 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}} \times 50 \text{ mL} \times 40 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}}$$

$$= 200 \text{ mg}$$

$$= 0,2 \text{ gram}$$

Sebanyak 0,2 gram padatan natrium hidroksida (NaOH) ditimbang dan dilarutkan dengan akuades dalam gelas kimia. Setelah itu, larutan diencerkan dalam labu ukur 50 mL dengan penambahan akuades hingga tanda batas.

## 2.8.Pembuatan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM pH 2,4

$$\text{Mr KH}_2\text{PO}_4 = 136 \text{ mg/mmol}$$

$$[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 10 \text{ mM} = 10^{-2} \text{ M} = 10^{-2} \text{ mmol/mL}$$

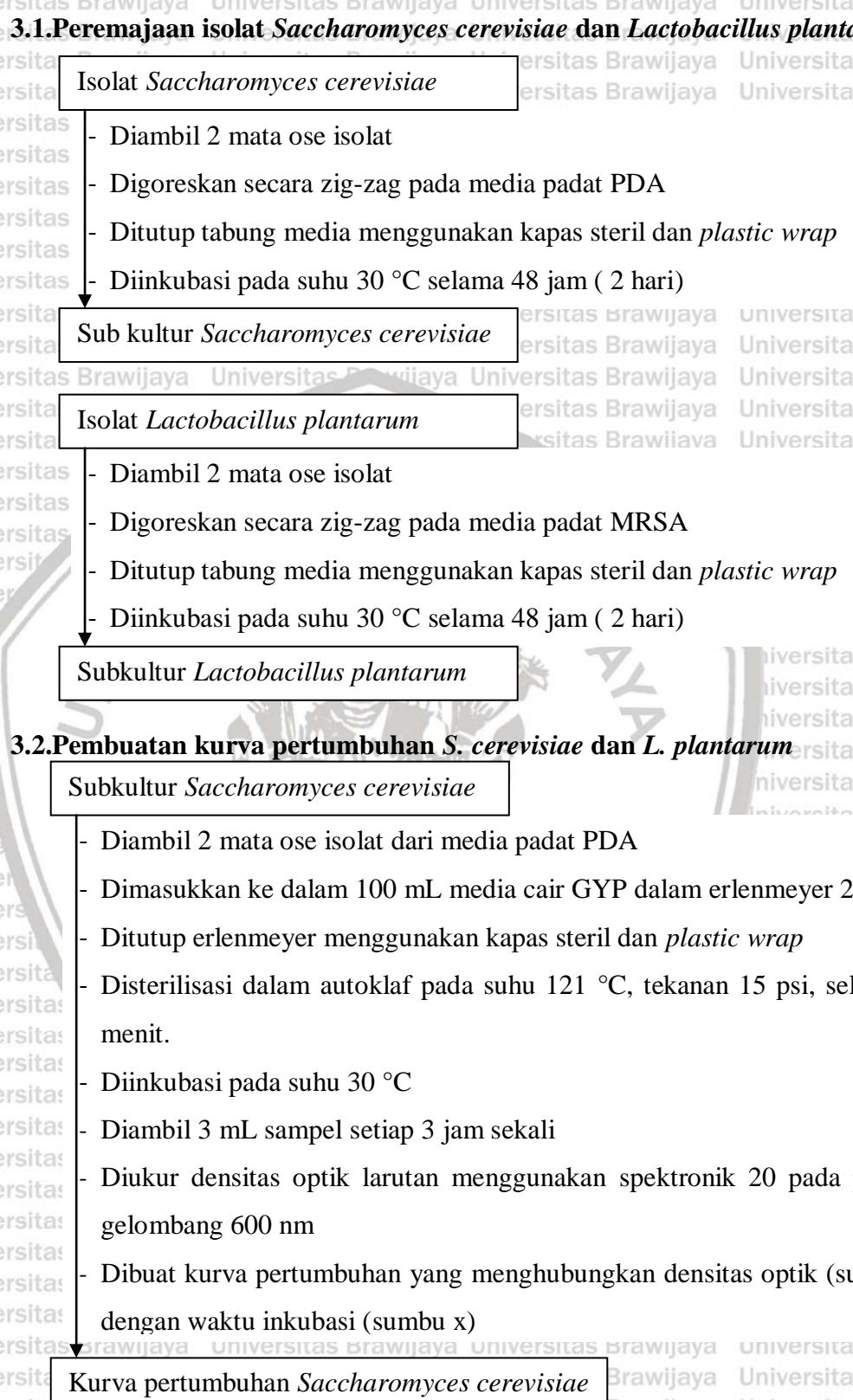
$$\text{massa KH}_2\text{PO}_4 = 10^{-2} \frac{\text{mmol}}{\text{mL}} \times 100 \text{ mL} \times 136 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}}$$

$$= 136 \text{ mg}$$

$$= 0,136 \text{ gram}$$

Sebanyak 0,136 gram padatan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ditimbang dan dilarutkan dengan 80 mL akuades dalam gelas kimia. Setelah itu, larutan ditambahkan asam fosfat hingga pH larutan menjadi 2,4. Kemudian, larutan diencerkan dalam labu ukur 100 mL dengan penambahan akuades hingga tanda batas.

### 3. DIAGRAM ALIR PENELITIAN



**Subkultur *Lactobacillus plantarum***

- Diambil 2 mata ose isolat dari media padat MRSA
- Dimasukkan ke dalam 100 mL media cair MRSB dalam erlenmeyer 250 mL
- Ditutup erlenmeyer menggunakan kapas steril dan *plastic wrap*
- Disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 15 psi, selama 15 menit.
- Diinkubasi pada suhu 30 °C
- Diambil 3 mL sampel setiap 3 jam sekali
- Diukur densitas optik larutan menggunakan pada panjang gelombang 600 nm
- Dibuat kurva pertumbuhan yang menghubungkan densitas optik (sumbu y) dengan waktu inkubasi (sumbu x)

**Kurva pertumbuhan *L. plantarum*****3.3.Preparasi kubis****Daun Kubis**

- Dipotong kecil-kecil menggunakan pisau
- Ditimbang sebanyak 100 gram
- Dicuci menggunakan air mengalir hingga bersih
- Dikeringkan selama 5 menit pada suhu ruang

**Potongan kubis untuk fermentasi****3.4.Optimasi volume inokulum campuran selama fermentasi****100 gram potongan kubis bersih**

- Dimasukkan ke dalam botol fermentasi steril hingga isi botol penuh.
- Dimasukkan inokulum campuran *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae* dengan variasi sebagai berikut (% v/v akuades): 5, 10, 15, 20, 25 % (rasio volume 1:1)
- Ditambahkan akuades steril hingga volume total 100 mL
- Ditutup rapat.
- Dibiarkan selama 4 hari (didasarkan pada fasa kematian bakteri dan ragi) pada suhu ruang 25–27 °C

**Kubis terfermentasi**

### 3.5.Optimasi pH selama fermentasi

100 gram potongan kubis

- Dimasukkan ke dalam botol fermentasi hingga isi botol penuh.
- Dimasukkan inokulum *Lactobacillus plantarum* dan *Saccharomyces cerevisiae* dengan volume inokulum campuran optimum yang memiliki variasi pH media yaitu 4, 5, 6, dan 7
- Ditutup rapat.
- Dibiarkan selama 4 hari (didasarkan pada kurva pertumbuhan bakteri dan ragi pada suhu ruang 25-27 °C)

Kubis terfermentasi

### 3.6.Penentuan kadar tanin dalam sampel kubis terfermentasi

Sampel kubis terfermentasi

- Diambil sebanyak 2,5 gram dan dihaluskan menggunakan alu dan mortar
- Dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 20 mL akuades
- Diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 10 menit.
- Disaring menggunakan kertas saring halus.

Filtrat

Residu

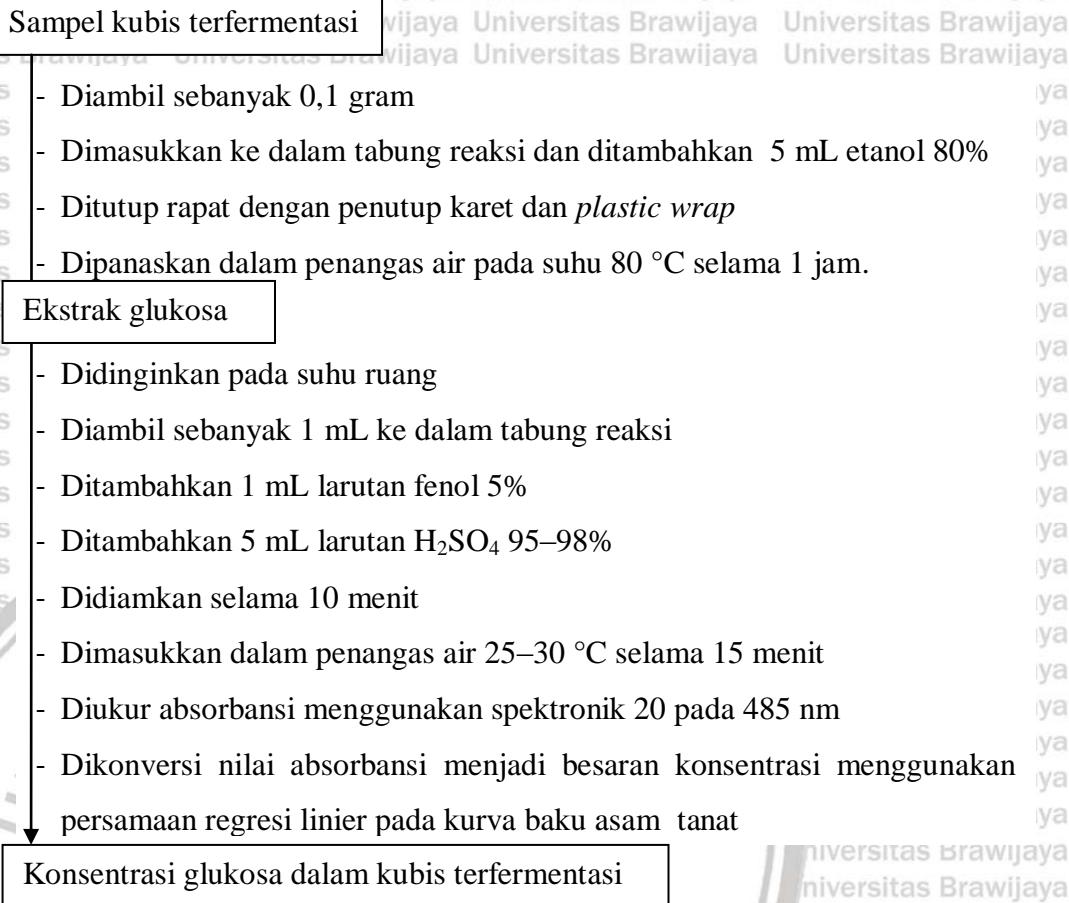
- Diencerkan dalam labu ukur 25 mL dengan penambahan akuades

Ekstrak tanin

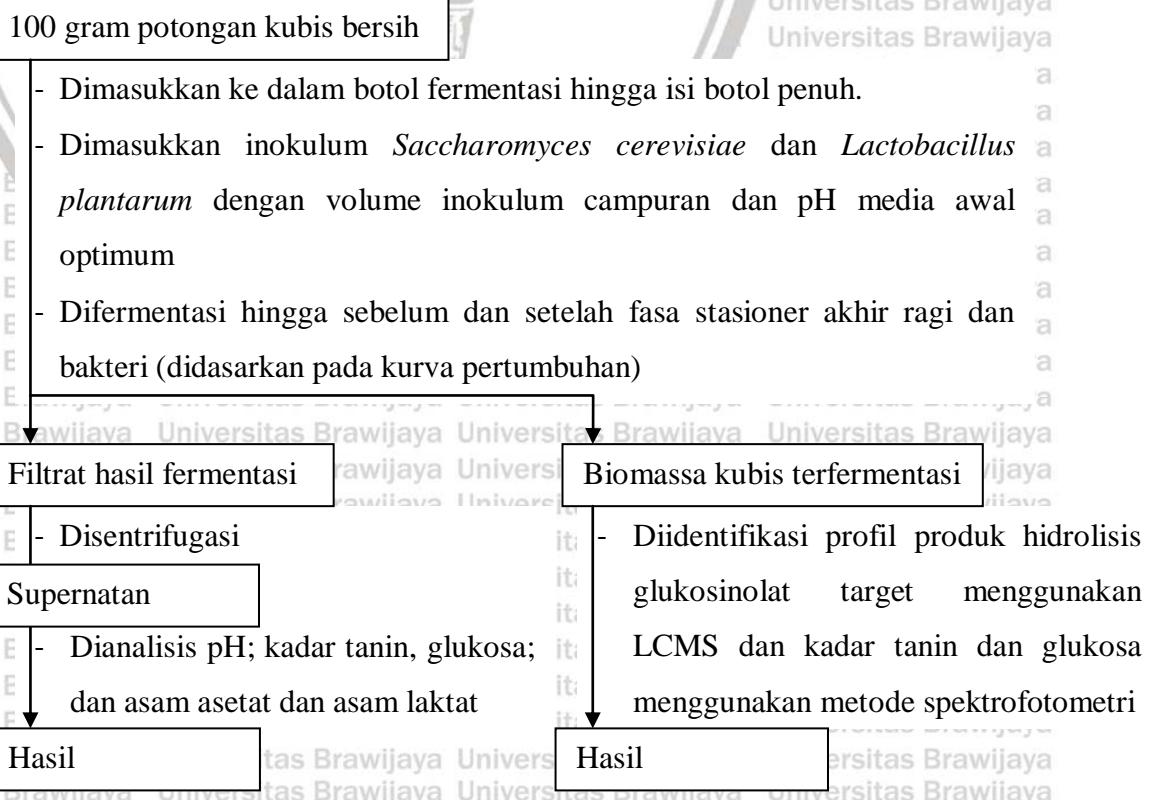
- Diambil sebanyak 400  $\mu$ L ekstrak tanin dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- Ditambahkan 0,5 mL reagen Folin Denis dan 1 mL larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.
- Divorteks
- Diencerkan dalam labu ukur 10 mL dengan akuades
- Didiamkan selama 30 menit
- Dihitung absorbansinya menggunakan spektronik 20 pada panjang gelombang 760 nm
- Dikonversi nilai absorbansi menjadi besaran konsentrasi menggunakan kurva regresi linier pada kurva baku asam tanat

Konsentrasi tanin dalam kubis terfermentasi

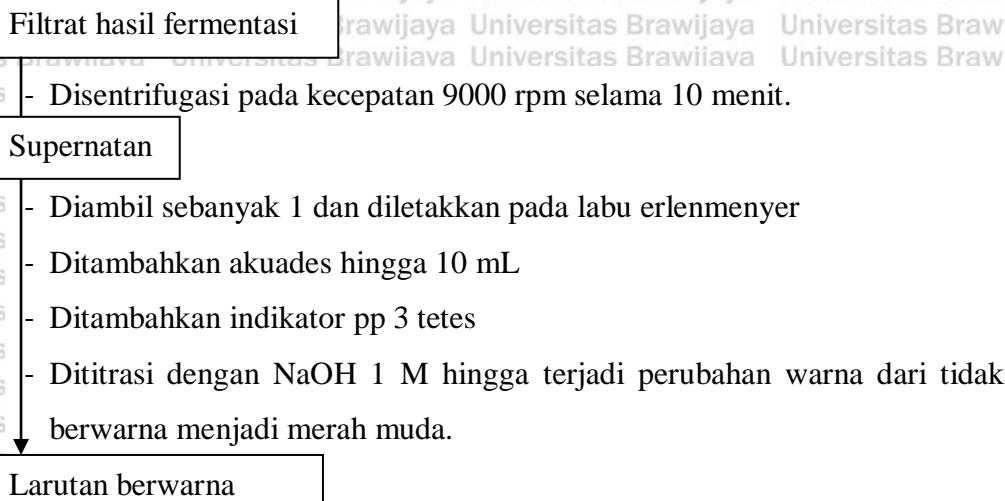
### 3.7.Penentuan glukosa dalam kubis terfermentasi



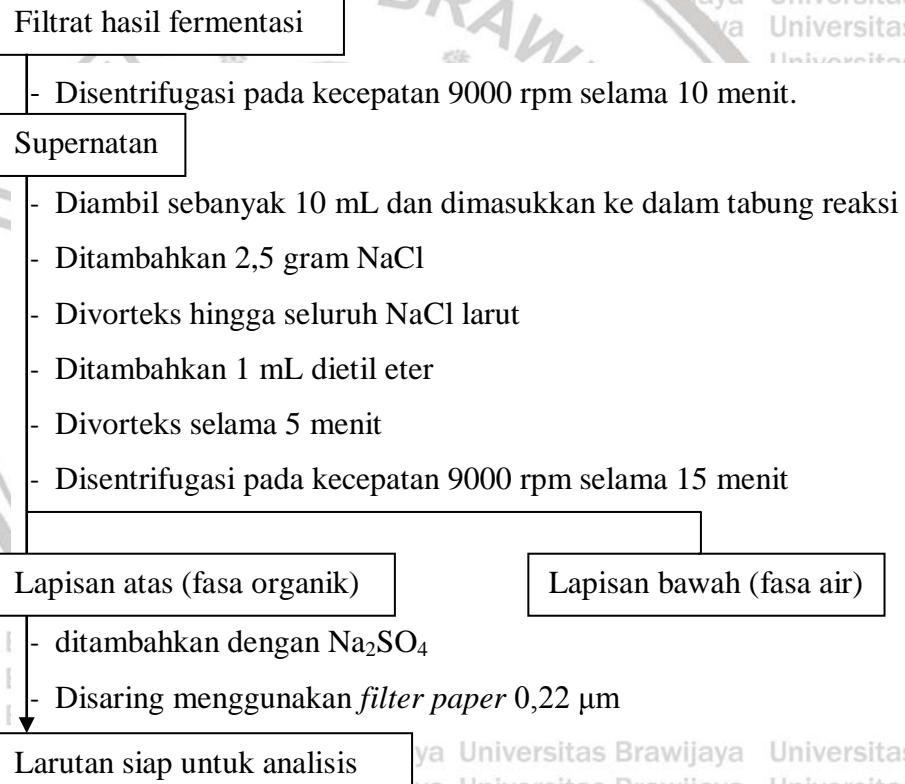
### 3.8.Fermentasi pada kondisi optimum



### 3.9. Penentuan pH filtrate hasil fermentasi



### 3.10. Persiapan sampel filtrat hasil fermentasi untuk analisis HPLC



#### 4. DATA HASIL PENELITIAN DAN PERHITUNGAN

##### 4.1.Kurva pertumbuhan *L. plantarum* dan *S. cerevisiae*

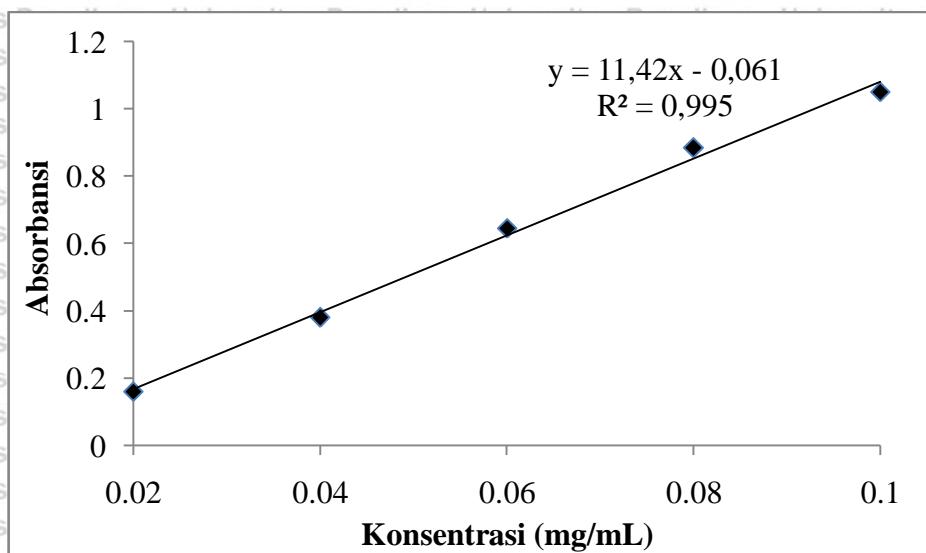
**Tabel L4.1.** Data densitas optik *L.plantarum* dan *S.cerevisiae*

Waktu (jam)	Densitas optik <i>L. plantarum</i>			Densitas optik <i>S. cerevisiae</i>		
	Ulangan 1	Ulangan 2	Rerata	Ulangan 1	Ulangan 2	Rerata
0	0,047	0,048	0,0475	0,052	0,046	0,049
3	0,042	0,042	0,042	0,017	0,017	0,017
6	0,043	0,043	0,043	0,046	0,046	0,046
9	0,052	0,053	0,0525	0,549	0,544	0,5465
12	0,081	0,081	0,081	0,863	0,863	0,863
15	0,225	0,223	0,224	0,856	0,861	0,8585
18	0,42	0,417	0,4185	0,91	0,924	0,917
21	0,712	0,714	0,713	0,928	0,924	0,926
24	1,029	1,026	1,0275	0,993	0,994	0,9935
27	1,372	1,373	1,3725	1,243	1,245	1,244
30	1,415	1,414	1,4145	1,255	1,255	1,255
33	1,436	1,439	1,4375	1,26	1,262	1,261
36	1,594	1,598	1,596	1,264	1,264	1,264
39	1,734	1,734	1,734	1,276	1,278	1,277
42	1,751	1,754	1,7525	1,292	1,286	1,289
45	1,761	1,761	1,761	1,211	1,211	1,211
48	1,757	1,758	1,7575	1,139	1,137	1,138
54	1,695	1,698	1,6965	1,202	1,202	1,202
57	1,586	1,582	1,584	1,173	1,175	1,174
66	0,913	0,913	0,913	1,089	1,09	1,0895
72	0,744	0,744	0,744	1,02	1,023	1,0215
96	0,122	0,122	0,122	0,345	0,345	0,345

##### 4.2.Kurva baku tanin

**Tabel L4.2.** Data absorbansi larutan standar tanin

Konsentrasi Tanin (mg/mL)	Absorbansi
0,02	0,161
0,04	0,38
0,06	0,645
0,08	0,884
0,1	1,051

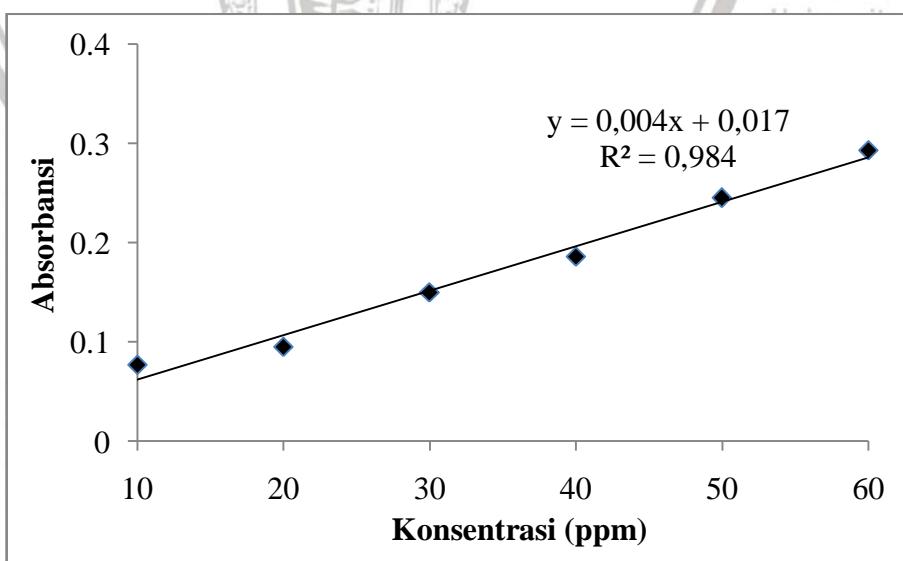


**Gambar L4.1** Kurva hubungan antara konsentrasi larutan tanin dengan absorbansi

#### 4.3.Kurva baku glukosa

**Tabel L4.3.** Data absorbansi larutan standar glukosa

Kadar glukosa (ppm)	Absorbansi
10	0,077
20	0,095
30	0,150
40	0,186
50	0,245
60	0,293

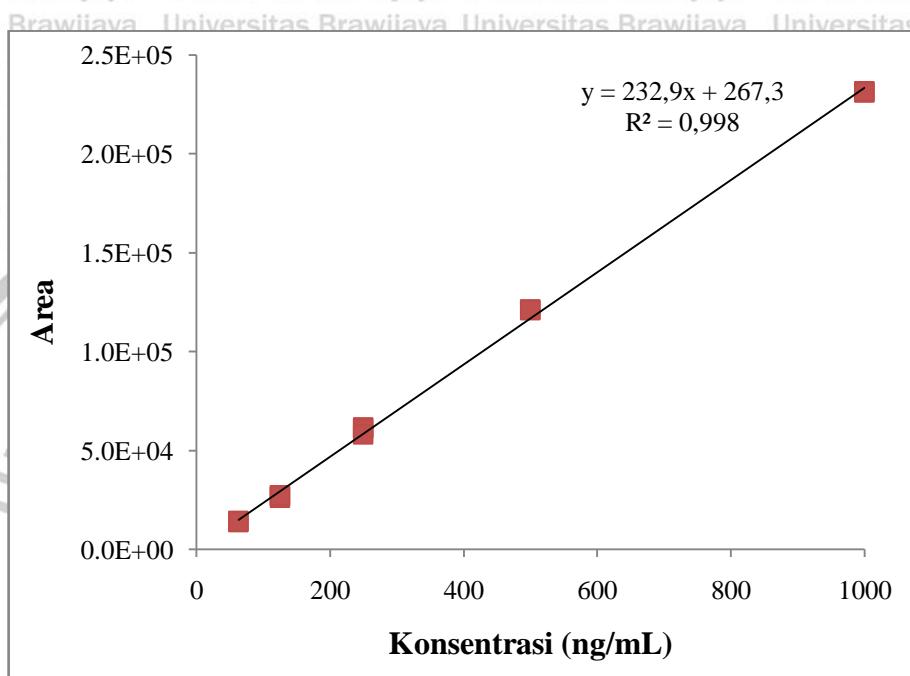


**Gambar L4.2** Kurva hubungan antara konsentrasi glukosa dengan absorbansi

#### 4.4.Kurva baku ESTD sulforafan

**Tabel L4.4.** Data luas area puncak standar sulforafan

Konsentrasi Sulforafan (ng/mL) Luas area puncak



**Gambar L4.3** Kurva hubungan antara konsentrasi sulforafan dengan luas area puncak MS sulforafan

#### 4.5.Data optimasi: pengaruh volume inokulum campuran terhadap kadar tanin biomassa dan filtrat

**Tabel L4.5** Data pengaruh volume inokulum campuran terhadap kadar tanin biomassa

Volume inokulum (v/v)	Universitas Brawijaya	Kadar Tanin Biomassa (mg/100 g kubis segar)					
Universitas Brawijaya	Rerata						
5%	185,595	187,659	179,130	180,937	171,305	189,548	182,362
10%	228,288	415,472	368,001	150,467	266,796	268,792	282,969
15%	306,272	210,478	312,128	172,718	135,689	188,595	220,980
20%	249,683	261,828	208,487	161,744	192,104	196,871	211,786
25%	308,043	288,643	282,264	277,489	267,922	288,361	285,454



**Perhitungan:**

Kadar tanin ekstrak dalam 400  $\mu\text{L}$  sampel yang diukur (mg/mL)  
 $(\text{absorbansi}-0,0061)/11,42 = \dots\text{mg/mL}$

Kadar tanin ekstrak dalam 1 mL sampel sebelum diencerkan (mg/mL) =

$$\frac{\text{Kadar tanin } \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \times \text{fp (250)}}{0,4 \text{ mL}} \times 1 \text{ mL} = \dots\text{mg/mL}$$

Massa tanin dalam 1 mL sampel = ...mg

$$\text{Kadar tanin (mg/g)} = \frac{\text{Kadar tanin (mg)}}{\text{g sampel}}$$

$$\text{Kadar tanin (mg/100 g)} = \text{kadar tanin } \left( \frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) \times \frac{100 \text{ g}}{1 \text{ g}}$$

Contoh perhitungan kadar tanin ulangan 1 pada penggunaan volume inokulum 5%:

$$\begin{aligned} \text{Diketahui: Massa sampel yang diambil} &= 2,5065 \text{ g} \\ \text{Absorbansi} &= 0,146 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar tanin ekstrak dalam } 400 \mu\text{L (mg/mL)} &= (0,146-0,0061)/11,42 \\ &= 0,00744 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar tanin ekstrak tiap mL (mg/mL)} &= \frac{0,00744 \text{ mg}}{0,4 \text{ mL}} \times 1 \text{ mL} \\ &= 4,6519 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

Massa tanin dalam 1 mL sampel

$$\begin{aligned} \text{Kadar tanin (mg/g sampel)} &= \frac{4,6519 \text{ mg}}{2,5065 \text{ g}} \\ &= 1,8559 \text{ mg/g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar tanin (mg/100 g sampel)} &= \text{kadar tanin } \left( \frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) \times \frac{100 \text{ g}}{1 \text{ g}} \\ &= 1,8559 \text{ mg/g} \times 100 \text{ g/1g} \\ &= 185,59 \text{ mg/100 g} \end{aligned}$$

**Tabel L4.6** Data pengaruh volume inokulum terhadap kadar tanin filtrat

Volume inokulum (v/v)	Kadar tanin filtrat (mg/100 g)						Rerata
	1	2	3	4	5	6	
5%	183,467	171,339	194,235	194,562	203,312	167,029	185,657
10%	276,474	257,925	218,749	248,597	257,492	246,492	250,955
15%	195,815	168,729	184,071	209,872	252,854	174,738	197,680
20%	112,978	152,892	184,157	180,739	211,134	164,228	167,688
25%	184,278	161,387	204,945	182,647	222,3900	161,473	186,187

**Perhitungan kadar tanin filtrat setelah fermentasi:**

Kadar tanin ekstrak dalam 400  $\mu\text{L}$  sampel yang diukur (mg/mL)  
 $(\text{absorbansi}-0,0061)/11,42 = \dots\text{mg/mL}$

Kadar tanin ekstrak dalam 1 mL sampel sebelum diencerkan (mg/mL) =

$$\frac{\text{Kadar tanin } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) \times \text{fp (10)}}{0,4 \text{ mL}} \times 1 \text{ mL} = \dots\text{mg/mL}$$

Kadar tanin ekstrak (mg/100 mL)

Kadar tanin ekstrak (mg/100 g)

**Perhitungan kadar tanin inokulum:**

Kadar tanin dalam 400  $\mu\text{L}$  inokulum yang diukur (mg/mL)  
 $(\text{absorbansi}-0,0061)/11,42 = \dots\text{mg/mL}$

Kadar tanin dalam 1 mL inokulum sebelum diencerkan (mg/mL)

$$\frac{\text{Kadar tanin } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) \times \text{fp (10)}}{0,4 \text{ mL}} \times 1 \text{ mL} = \dots\text{mg/mL}$$

Kadar tanin inokulum (mg/100 mL)

Kadar tanin inokulum (mg/100 g)

Kadar tanin filtrat = kadar tanin filtrat setelah fermentasi-kadar tanin inokulum

Contoh perhitungan kadar tanin ulangan 1 pada volume inokulum 5%:

Diketahui: Absorbansi filtrat setelah fermentasi = 0,909

Absorbansi filtrat inokulum = 0,159

**Perhitungan kadar tanin filtrat setelah fermentasi:**

Kadar tanin ekstrak dalam 400  $\mu\text{L}$  (mg/mL) =  $(0,909-0,0061)/11,42$

$$= 0,074245 \text{ mg/mL}$$

Kadar tanin ekstrak dalam 1 mL (mg) =  $\frac{0,074245 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 10}{0,4 \text{ mL}} \times 1 \text{ mL}$

$$= 1,856120 \text{ mg/mL}$$

Kadar tanin ekstrak (mg/100 mL) =  $1,856120 \text{ mg/mL} \times 100 \text{ mL}$

$$= 185,612 \text{ mg/100 mL}$$

Kadar tanin ekstrak (mg/100 g) =  $185,612 \text{ mg/100 mL} \times \frac{1 \text{ mL}}{1 \text{ g}}$

$$= 185,612 \text{ mg/100 g}$$

**Perhitungan kadar tanin filtrat setelah fermentasi:**

Kadar tanin ekstrak sebanyak  $400 \mu\text{L}$  ( $\text{mg/mL}$ ) =  $(0,159-0,0061)/11,42$   
 $= 0,000858 \text{ mg/mL}$

Kadar tanin ekstrak tiap  $\text{mL}$  ( $\text{mg}$ ) =  $\frac{0,000858 \text{ mg/mL} \times 10}{0,4 \text{ mL}} \times 1 \text{ mL}$   
 $= 0,02145 \text{ mg/mL}$

Kadar tanin ( $\text{mg/g sampel}$ ) =  $0,02145 \text{ mg/mL} \times 100 \text{ mL}$   
 $= 2,145 \text{ mg}/100 \text{ mL}$

Kadar tanin ( $\text{mg}/100 \text{ g sampel}$ ) =  $2,145 \text{ mg}/100 \text{ mL} \times \frac{1 \text{ mL}}{1 \text{ g}}$   
 $= 2,145 \text{ mg}/100 \text{ g}$

Kadar tanin filtrat = kadar tanin filtrat setelah fermentasi - kadar tanin inokulum  
 $= 185,612 \text{ mg}/100 \text{ g} - 2,145 \text{ mg}/100 \text{ g}$   
 $= 183,467 \text{ mg}/100 \text{ g}$

#### 4.6. Data optimasi: pengaruh volume inokulum campuran terhadap kadar glukosa biomassa dan filtrat

**Tabel L4.7** Data pengaruh volume inokulum campuran terhadap kadar glukosa biomassa

Volume Inokulum (v/v)	Kadar glukosa biomassa (mg/100 g kubis)						Rerata
	1	2	3	4	5	6	
5%	279,758	266,077	286,678	282,245	319,688	264,861	283,218
10%	130,504	105,835	109,384	131,765	121,377	113,934	118,800
15%	279,246	298,284	250,443	352,628	381,249	333,228	315,846
20%	305,439	290,847	312,723	404,813	395,935	377,223	347,830
25%	301,232	301,462	303,336	288,993	280,239	282,625	292,981

#### Perhitungan:

Kadar glukosa ekstrak dalam  $1 \text{ mL}$  sampel yang diukur ( $\text{mg/L}$ )/ppm

$$= (\text{absorbansi}-0,0177)/0,0045 \text{ mg/L}$$

Kadar glukosa ekstrak dalam  $1 \text{ mL}$  sampel sebelum diencerkan ( $\text{mg/mL}$ ) =

$$\text{Kadar glukosa } \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \times \text{fp (5)} \\ = \frac{\text{Kadar glukosa } \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \times \text{fp (5)}}{1 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times 1 \text{ mL} = \dots \text{mg/mL}$$

Massa glukosa dalam  $1 \text{ mL}$  sampel = .....mg

$$\text{Kadar glukosa (mg/g)} = \frac{\text{Kadar glukosa (mg)}}{\text{g sampel}}$$

$$\text{Kadar glukosa (mg/100 g)} = \text{kadar glukosa } \left( \frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) \times \frac{100 \text{ g}}{1 \text{ g}}$$

Contoh perhitungan kadar glukosa ulangan 1 pada penggunaan volume inokulum 5%:

Diketahui: Massa sampel yang diambil = 0,1054 g

Absorbansi = 0,283

Kadar glukosa ekstrak dalam 1 mL (mg/L) = (0,283-0,0177)/0,0045

$$= 58,95556 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Kadar glukosa ekstrak tiap mL (mg/mL)} = \frac{58,95556 \text{ mg}}{1 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times 1 \text{ mL}$$

$$= 0,29478 \text{ mg/mL}$$

Massa glukosa dalam 1 mL sampel

Kadar glukosa (mg/g sampel)

Kadar glukosa (mg/100 g sampel)

$$= \frac{0,29478 \text{ mg}}{0,1054 \text{ g}}$$

$$= 2,79758 \text{ mg/g}$$

$$= \text{kadar glukosa} \left( \frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) \times \frac{100 \text{ g}}{1 \text{ g}}$$

$$= 2,79758 \text{ mg/g} \times 100 \text{ g/1g}$$

$$= 279,758 \text{ mg/100 g}$$

**Tabel L4.8** Data pengaruh volume inokulum campuran terhadap kadar glukosa filtrat

Volume Inokulum (v/v)	Kadar glukosa filtrat (mg/100 g kubis)						Rerata
	1	2	3	4	5	6	
5%	112,345	110,834	113,137	113,208	116,727	99,486	110,956
10%	94,239	84,891	88,684	99,293	92,634	91,321	91,844
15%	112,455	123,389	98,234	187,293	190,244	143,448	142,511
20%	118,685	101,348	119,510	124,398	160,079	132,384	126,067
25%	116,238	117,845	124,507	129,484	135,495	119,495	123,844

#### Perhitungan:

Kadar glukosa ekstrak dalam 1 mL sampel yang diukur (mg/L)

$$(\text{absorbansi}-0,0177)/0,0045 = \dots \text{mg/L}$$

Kadar glukosa ekstrak dalam 1 mL sampel sebelum diencerkan (mg/mL)=

$$\text{Kadar glukosa} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \times \text{fp} (10) \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times 1 \text{ mL} = \dots \text{mg/mL}$$

Kadar glukosa ekstrak (mg/100 mL) = Kadar glukosa ekstrak  $\left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \times \frac{100 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}$

Kadar glukosa ekstrak (mg/100 g) = Kadar glukosa ekstrak  $\left( \frac{\text{mg}}{100 \text{ mL}} \right) \times \frac{1 \text{ mL}}{1 \text{ g}}$

Contoh perhitungan kadar glukosa ulangan 1 pada volume inokulum 5%:

Diketahui: Absorbansi filtrat setelah fermentasi = 0,523

Kadar glukosa ekstrak dalam 1mL yang diukur (mg/L) =  $(0,523 - 0,0177)/0,0045$

$$= 112,34445 \text{ mg/L}$$

Kadar glukosa ekstrak dalam 1 mL (mg/mL) =  $\frac{112,34445 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 10}{1 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times 1 \text{ mL}$

$$= 1,12345 \text{ mg/mL}$$

Kadar glukosa ekstrak (mg/100 mL) =  $1,12345 \text{ mg/mL} \times 100 \text{ mL}$

$$= 112,345 \text{ mg/100 mL}$$

Kadar glukosa ekstrak (mg/100 g) =  $112,345 \text{ mg/100 mL} \times \frac{1 \text{ mL}}{1 \text{ g}}$

$$= 112,345 \text{ mg/100 g}$$

#### 4.7. Data optimasi: pengaruh pH media awal terhadap kadar tanin biomass dan filtrat

**Tabel L4.9** Data pengaruh pH media awal terhadap kadar tanin biomass

pH	Kadar tanin biomass (mg/100 g)						Rerata
	1	2	3	4	5	6	
7	26,206	41,493	91,749	56,797	51,039	57,081	54,061
6	85,189	102,664	63,457	76,586	76,204	87,743	81,974
5	115,946	98,444	74,300	93,107	83,041	92,760	92,933
4	267,043	200,548	80,979	65,659	111,633	62,109	131,328

**Tabel L4.10** Data pengaruh pH media awal terhadap kadar tanin filtrat

pH	Kadar tanin filtrat (mg/100 g)						Rerata
	1	2	3	4	5	6	
7	86,214	106,552	92,518	88,278	98,893	114,672	97,855
6	78,796	93,144	84,202	83,534	94,409	72,923	84,501
5	89,323	133,236	117,778	146,782	139,839	144,060	128,503
4	89,978	178,921	115,661	168,117	108,538	109,802	128,503

#### 4.8. Data optimasi: pengaruh waktu inkubasi 48 jam dan 72 jam terhadap kadar tanin biomass dan filtrat

**Tabel L4.11** Data pengaruh waktu inkubasi 48 jam terhadap kadar tanin biomass

Waktu (Jam)	Kadar tanin biomassa (mg/100 g)								Rerata
	1	2	3	4	5	6	7	8	
48	72,292	73,107	72,632	72,893	72,289	73,237	75,298	72,102	72,981
72	55,439	56,729	54,239	59,232	54,222	57,723	58,384	60,245	57,027

**Tabel L4.12** Data pengaruh waktu inkubasi 72 jam terhadap kadar tanin filtrat

Waktu (Jam)	Kadar tanin filtrat (mg/100 g)								Rerata
	1	2	3	4	5	6	7	8	
48	125,67	124,721	124,384	126,824	125,237	126,255	120,834	124,324	124,781
72	82,579	81,282	82,234	81,712	80,627	80,301	81,238	78,012	80,998

#### **4.9. Data optimasi: pengaruh waktu inkubasi 48 jam dan 72 jam terhadap kadar glukosa biomassa dan filtrat**

**Tabel L4.13** Data pengaruh waktu inkubasi 48 jam terhadap kadar glukosa biomassa

Waktu (jam)	Kadar glukosa biomassa (mg/100 g kubis)								Rerata
	1	2	3	4	5	6	7	8	
48	70,228	70,395	74,245	76,237	75,150	73,480	70,434	70,276	72,556
72	86,838	87,898	89,330	87,824	88,624	87,787	86,387	88,911	87,950

**Tabel L4.14** Data pengaruh waktu inkubasi 72 jam terhadap kadar glukosa filtrat

Waktu (jam)	Kadar glukosa filtrat (mg/100 g)							Rerata	
	1	2	3	4	5	6	7		
48	22,902	17,439	17,314	16,982	15,545	18,923	21,733	23,472	19,289
72	113,824	109,827	111,650	116,780	113,349	116,235	114,993	114,987	113,956

#### 4.10. Data pengaruh waktu inkubasi 48 jam dan 72 jam terhadap pH filtrat

## Pembakuan NaOH

**Tabel L4.15** Data volume  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  untuk standarisasi NaOH

Volume NaOH (mL)	Volume $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mL)	Volume rata-rata $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mL)
5	10,3	10,35
		10,325

### **Perhitungan:**

Larutan  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  = 0,05 M

Massa  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \equiv 315 \text{ mg}$

as Brawijaya Universitas Brawijaya

$$\text{Mol H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = \frac{\text{mass (g)}}{\text{Mr asam oksalat } (\frac{\text{mg}}{\text{mmol}})}$$

(dalam 50 mL) =  $\frac{315 \text{ mg}}{126 \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}$

$$\begin{aligned}
 & [H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O] = \frac{\text{mol asam oksalat (mmol)}}{\text{Volume (mL)}} \\
 & (\text{dalam } 50 \text{ mL}) = \frac{2,5 \text{ mmol}}{50 \text{ mL}} \\
 & = 0,05 \text{ M} \\
 \\
 & \text{Reaksi asam oksalat dengan NaOH:} \\
 & H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O + 2NaOH \rightarrow Na_2C_2O_4 + 4 H_2O \\
 \\
 & \text{Mol } H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O = \frac{10}{50} \times \text{mol oksalat dalam } 50 \text{ mL} \\
 & (\text{dalam } 10 \text{ mL}) = \frac{10}{50} \times 2,5 \text{ mmol} \\
 & = 0,05 \text{ mmol} \\
 \\
 & [NaOH] = \frac{2 \times \text{mol asam oksalat dalam } 10 \text{ mL}}{V \text{ NaOH}} \\
 & = \frac{2 \times 0,25 \text{ mmol}}{10,325 \text{ mL}} \\
 & = 0,968 \text{ M}
 \end{aligned}$$

### Uji Keasaman pada waktu inkubasi 48

**Tabel L4.16** Volume NaOH untuk pengukuran pH filtrat pada jam ke 48

Volume NaOH (mL)								
1	2	3	4	5	6	7	8	Rerata
0,4	0,35	0,4	0,35	0,35	0,4	0,4	0,35	0,375

### Uji Keasaman pada waktu inkubasi 72

**Tabel L4.17** Volume NaOH untuk pengukuran pH filtrat pada jam ke 72

Volume NaOH (mL)								
1	2	3	4	5	6	7	8	Rerata
0,45	0,5	0,5	0,5	0,35	0,6	0,45	0,45	0,475

### Perhitungan:

$$\text{Volume NaOH rata-rata} = \frac{\sum \text{Volume NaOH}}{\text{Ulangan}}$$

$$\text{mmol NaOH} = \text{Volume NaOH} \times [\text{NaOH}]$$

$$\text{Ekivalen mmol NaOH} = \text{Ekivalen mmol H}^+$$

$$[\text{H}^+] = \frac{\text{mmol H}^+}{\text{mL sampel yang diambil}}$$

pH =  $-\log [H^+]$

Contoh perhitungan pH filtrat pada waktu inkubasi 48 jam

$$\text{Volume NaOH rata-rata} = \frac{3 \text{ mL}}{8} = 0,375 \text{ mL}$$

$$\text{mmol NaOH} = 0,375 \text{ mL} \times 0,0976 \text{ mmol/mL} = 0,0367 \text{ mmol}$$

$$\text{Ekivalen mmol NaOH} = \text{Ekivalen mmol H}^+ = 0,0367 \text{ mmol}$$

$$[H^+] = \frac{0,0367 \text{ mmol}}{1 \text{ mL}} = 0,0367 \text{ M}$$

$$\text{pH} = -\log [0,0367] = 1,436$$

#### 4.11. Data analisis kuantitatif sulforafan dalam sampel kubis terfermentasi dan kubis segar

**Tabel L4.18** Data kadar sulforafan dalam kubis terfermentasi dan kubis segar

Sampel	Kadar sulforafan biomassa ( $\mu\text{g/g}$ kubis)			Rerata
	1	2	3	
Kubis terfermentasi	0,545	0,561	0,513	0,539
Kubis segar	0,732	0,707	0,694	0,711

#### Perhitungan:

Kadar sulforafan dalam sampel yang diukur ( $\text{ng/mL}$ ) =

$$(luas area-267,31)/262,92 = \dots \text{ng/mL}$$

$$\text{Massa sulforafan dalam sampel} = \text{Kadar sulforafan} \left( \frac{\text{ng}}{\text{mL}} \right) \times \text{fp (10 mL)}$$

$$= \dots \text{ng}$$

$$\text{Kadar sulforafan/gram sampel (ng/g)} = \frac{\text{Kadar sulforafan (ng)}}{\text{g sampel}}$$

Contoh perhitungan kadar sulforafan pada kubis terfermentasi ulangan 1:

Diketahui: Massa sampel yang diambil = 2,0652 g

Luas area = 35,467

Kadar sulforafan dalam sampel yang diukur ( $\text{ng/mL}$ ) =

$$(35,467-267,31)/262,92 = 151,124 \text{ ng/mL}$$

$$\text{Massa sulforafan dalam sampel} = 151,124 \text{ ng/mL} \times 10 \text{ mL}$$

$$= 1511,24 \text{ ng}$$

$$\text{Kadar sulforafan/gram sampel (ng/g)} = \frac{1511,24 \text{ ng}}{2,0652} = 731,76 \text{ ng/g}$$

$$= 0,732 \mu\text{g/g}$$

## 5. UJI STATISTIKA

### 5.1. Pengaruh volume inokulum campuran terhadap kadar tanin biomassa

#### Uji Normalitas

**Tests of Normality**

	Volume_Ino	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Inokulum	Statistic	df	Sig,	Statistic	df	Sig,
Kadar_Tanin	5	,185	6	,200*	,939	6	,655
Tanin	10	,226	6	,200*	,961	6	,827
	15	,224	6	,200*	,887	6	,303
	20	,202	6	,200*	,941	6	,668
	25	,240	6	,200*	,954	6	,774

\*, This is a lower bound of the true significance,

a, Lilliefors Significance Correction

#### Uji ANOVA

**ANOVA**

Kadar_Tanin	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	50029,021	4	12507,255	3,892	,014
Within Groups	80342,432	25	3213,697		
Total	130371,453	29			

#### Uji Tukey

**Kadar\_Tanin**

Volume_Inokulum	N	Subset for alpha = 0,05		Notification
		1	2	
5	6	182,36233		a
20	6	211,78617	211,78617	ab
15	6	220,98000	220,98000	ab
10	6		282,96933	b
25	6		285,45367	b
Sig,		,762	,194	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed,  
a, Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000,

## **5.2.Pengaruh volume inokulum campuran terhadap kadar tanin filtrat**

## **Uji Normalitas**

## Tests of Normality

Volume_Ino	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	kulum	Statistic	df	Sig,	Statistic	df
Kadar_5	,185	6	,200*	,939	6	,655
Tanin10	,226	6	,200*	,961	6	,827
15	,224	6	,200*	,887	6	,303
20	,202	6	,200*	,941	6	,668
25	,240	6	,200*	,954	6	,774

<sup>a</sup>, This is a lower bound of the true significance,

a, Lilliefors Significance Correction

## Uji ANOVA

## ANOVA

Kadar_Tanin					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig,
Between Groups	24086,150	4	6021,537	9,391	,000
Within Groups	16030,322	25	641,213		
Total	40116,471	29			

Uji Tukey

Kadar Tanin

		Subset for alpha = 0,05		Notification
Volume_Inokulum	N	1	2	
20	6	167,68800		a
5	6	185,65733		a
25	6	186,18667		a
15	6	197,67983		a
10	6		250,95483	b
Sig,		,272	1,000	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a, Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000,

### 5.3.Pengaruh pH media awal terhadap kadar tanin biomassa

#### Uji Normalitas

#### Tests of Normality

Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig,	Statistic	df	Sig,
Kadar_4	,259	6	,200*	,843	6	,138	
Tanin_5	,182	6	,200*	,964	6	,852	
6	,165	6	,200*	,973	6	,911	
7	,278	6	,161	,929	6	,574	

\*. This is a lower bound of the true significance,

a, Lilliefors Significance Correction

#### Uji ANOVA

#### ANOVA

| Universitas Brawijaya |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Kadar_Tanin           |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| Universitas Brawijaya | Sum of Squares        | df                    | Mean Square           | F                     | Sig,                  |                       |                       |
| Between Groups        | 18435,957             | 3                     | 6145,319              | 3,112                 | ,049                  |                       |                       |
| Within Groups         | 39498,713             | 20                    | 1974,936              |                       |                       |                       |                       |
| Total                 | 57934,671             | 23                    |                       |                       |                       |                       |                       |

#### Uji Tukey

#### Kadar\_Tanin

Tukey HSD <sup>a</sup>		Subset for alpha = 0,05		Notification
pH	N	1	2	
Universitas Brawijaya	6	54,06083		a
Universitas Brawijaya	6	81,97390	81,97390	ab
Universitas Brawijaya	6	92,93307	92,93307	ab
Universitas Brawijaya	6		131,32840	b
Universitas Brawijaya		,448	,250	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed,

a, Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000,

## 5.4 Pengaruh pH media awal terhadap kadar tanin filtrat

### Uji Normalitas

Tests of Normality

	Universitas Brawijaya	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		pH	Statistic	df	Sig,	Statistic	df
Universitas Brawijaya	Kadar_4	,259		6	,200*	,843	6
Universitas Brawijaya	Tanin_5	,182		6	,200*	,964	6
Universitas Brawijaya		,165		6	,200*	,973	6
Universitas Brawijaya		,278		6	,161	,929	6

\*. This is a lower bound of the true significance.

a, Lilliefors Significance Correction

### Uji ANOVA

ANOVA

Kadar_Tanin		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig,
Between Groups		8893,855	3	2964,618	6,025	,004
Within Groups		9841,545	20	492,077		
Total		18735,400	23			

### Uji Tukey

Kadar\_Tanin

Tukey HSD <sup>a</sup>		Subset for alpha = 0,05		Notification
pH	N	1	2	
6	6	84,50133		a
7	6	97,85450	97,85450	ab
4	6		128,50283	b
5	6		128,50300	b
Sig,		,727	,111	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed,

a, Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000,

## 6. DOKUMENTASI PENELITIAN



**Gambar L6.1** Biakan (a) *Lactobacillus plantarum* (b) *Saccharomyces cerevisiae*



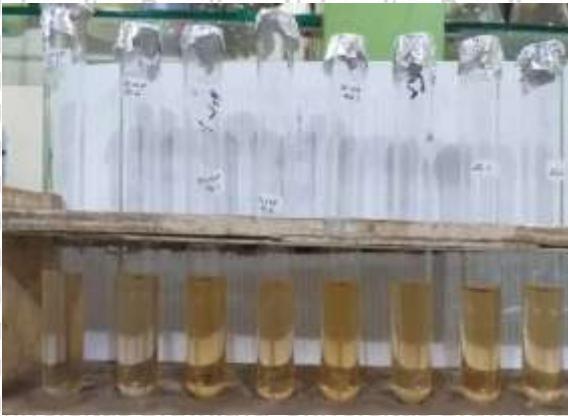
**Gambar L6.2** Proses fermentasi pada suhu ruang selama 4 hari secara anaerobik  
 (a) Pengaruh volume inokulum campuran *L. plantarum* – *S. cerevisiae* (b) Pengaruh pH media awal terhadap kadar tanin kubis



**Gambar L6.3** Ekstrak air tanin dari biomassa kubis terfermentasi



**Gambar L6.4** Pengukuran kadar tanin menggunakan metode Folin Denis.  
 Larutan kuning = ekstrak + reagen Folin Denis. Larutan biru = ekstrak + reagen Folin Denis + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>



**Gambar L6.5** Pengukuran kadar glukosa pada ekstrak etanol kubis terfermentasi



**Gambar L6.6** Hasil sentrifugasi filtrat hasil fermentasi untuk memisahkan sel (pelet) dan filtrat (supernatan)

## 7. SURAT KETERANGAN DETEKSI PLAGIASI



## **8. SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN KUBIS**



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA FAKULTAS MIPA  
**JURUSAN BIOLOGI**

Jl. Veteran, Malang 65148, Jawa Timur, Indonesia, Telp-fax : +62-341-575841  
<http://biologi.uh.ac.id>

## **SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI**

No. 0241/UN10.F09.42/03/2019

Kepala Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, menerangkan bahwa spesimen yang dibawa oleh:

Nama : Aulin Risyda Fahmia (NIM 176090200111001)  
Tinoq Dwि Ananda (NIM 176090200111004)  
Alfi Salamah (NIM 176090200111007)

instansi : Jurusan Ilmu Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya

Berdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi pada Flora of Java (Backer dan Van den Brink, 1968), volume I, halaman 186 dan Flora of Java (Backer dan Van den Brink, 1968), volume III, halaman 643, didentifikasi sebagai:

**Familia** : Brassicaceae  
**Genus** : *Brassica*  
**Species** : *Brassica oleracea* L.  
**Nama lokal** : Kubis

Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

Malang, 4 Januari 2019  
FAKULTAS KEDILAKUAN JURUSAN STOK  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
Laboratorium  
LABORATORIUM  
TEKNOLOGI TUMBUHAN  
Dr. Jati Batoro, M.Si  
NIP. 195704251986011001



## 9. LETTER OF ACCEPTANCE PUBLIKASI JURNAL

The 9<sup>th</sup> Annual Basic Science International Conference 2019  
"Recent Advances in Basic Sciences Toward 4.0 Industrial Revolution"  
Secretariat: Chemistry Dept. Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Brawijaya University  
Jl. Veteran, Malang, East Java, Indonesia 65145, Phone +62 341 575835  
Website: <http://basic.ub.ac.id>, e-mail: basic@ub.ac.id



### LETTER OF ACCEPTANCE

Malang, 1 April 2019

Dear Tinok Dwi Ananda  
Universitas Brawijaya

Congratulation,

On behalf of the BaSIC 2019 scientific committee, we are pleased to inform you that your submitted full-paper entitled

**"Effect of Mixed Inoculum Volume and pH on Anti Nutritional Level in Cabbage Fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum*"**  
Paper ID: 143

is accepted to be published in the IOP Conference Series: Materials Science and Engineering.

The process of publication should take about 4-6 weeks.

Should you need further assistance, please feel free to contact the secretariat by sending your email to [basic@ub.ac.id](mailto:basic@ub.ac.id)

Sincerely yours  
BaSIC 2019 Chair



Anna Safitri, Ph.D