

**UJI EFEKTIVITAS PEMANFAATAN LIMBAH KULIT NANGKA
(*Artocarpus heterophyllus*) SEBAGAI BAHAN SUBSTRAT
PADA FERMENTASI ASAM LAKTAT OLEH
Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus***

SKRIPSI



**UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A**

Disusun Oleh:

**NADIA CHOIRUM MASNIAH
NIM: H71217054**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL
SURABAYA
2021**

PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Nadia Choirum Masniah

NIM : H71217054

Program Studi : Biologi

Angkatan : 2017

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul: “UJI EFEKTIVITAS PEMANFAATAN LIMBAH KULIT NANGKA (*Artocarpus heterophyllus*) SEBAGAI BAHAN SUBSTRAT PADA FERMENTASI ASAM LAKTAT OLEH *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*”. Apabila suatu saat nanti terbukti saya melakukan tindakan plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian pernyataan keaslian ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 06 Januari 2021

Yang menyatakan,



Nadia Choirum Masniah

NIM. H71217054

LEMBAR PERSETUJUAN PEMBIMBING

Skripsi Oleh:

Nama : Nadia Choirum Masniah

NIM : H71217054

Judul : Uji Efektivitas Pemanfaatan Limbah Kulit Nangka (*Artocarpus heterophyllus*) Sebagai Bahan Substrat Pada Fermentasi Asam Laktat Oleh *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Telah diperiksa dan disetujui untuk diujikan.

Surabaya, 04 Januari 2021

Dosen Pembimbing I



M. S. Bakhul Munir, M.Kes
NIP. 198107252014031002

Dosen Pembimbing II



Hanik Faizah, M.Si
NUP. 201409019

PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI

Skripsi Nadia Choirum Masniah ini telah dipertahankan
di depan tim penguji skripsi
di Surabaya, 06 Januari 2021

Mengesahkan,
Dewan Penguji

Penguji I



Misbakhul Munir, M.Kes
NIP. 198107252014031002

Penguji II



Hanik Faizah, M.Si
NUP. 201409019

Penguji III



Estri Kusumawati, M.Kes
NIP. 198708042014032003

Penguji IV



Drs. Abdul Manan, M.Pd.I
NIP. 197006101998031002

Mengetahui,
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Sunan Ampel Surabaya




Dr. Evi Fatimatur Rusydiyah, M.Ag
NIP. 197312272005012003



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA
PERPUSTAKAAN

Jl. Jend. A. Yani 117 Surabaya 60237 Telp. 031-8431972 Fax.031-8413300
E-Mail: perpus@uinsby.ac.id

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika UIN Sunan Ampel Surabaya, yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : Nadia Choirum Masniah
NIM : H71217054
Fakultas/Jurusan : SAINS DAN TEKNOLOGI/BIOLOGI
E-mail address : choirumnadia@gmail.com

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif atas karya ilmiah :

Skripsi Tesis Desertasi Lain-lain (.....)
yang berjudul :

UJI EFEKTIVITAS PEMANFAATAN LIMBAH KULIT NANGKA (*Artocarpus heterophyllus*)
SEBAGAI BAHAN SUBSTRAT PADA FERMENTASI ASAM LAKTAT OLEH *Lactobacillus*
delbrueckii subsp. *bulgaricus*

beserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya berhak menyimpan, mengalih-media/format-kan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (database), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di Internet atau media lain secara **fulltext** untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan atau penerbit yang bersangkutan.

Saya bersedia untuk menanggung secara pribadi, tanpa melibatkan pihak Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah saya ini.

Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 06 Januari 2021

Penulis

(Nadia Choirum Masniah)

laktat di alam mempunyai dua bentuk isomer optikal yakni D(-) *lactic acid* yang umumnya lebih dihindari penggunaannya karena dapat bersifat racun bagi tubuh manusia dan L(+) *lactic acid* yang lebih banyak digunakan karena pada tubuh manusia hanya menghasilkan enzim *L-lactate dehydrogenase* yang dapat melakukan metabolisme terhadap L(+) *lactic acid* sehingga tidak akan berbahaya bagi tubuh (Manfaati, 2010).

Asam laktat pada dasarnya dapat dihasilkan dengan menggunakan teknologi fermentasi maupun melalui sintesis kimiawi. Setiap tahunnya, asam laktat mampu diproduksi hingga mencapai 80.000 ton secara global dengan 90% diantaranya dihasilkan dari proses fermentasi karbohidrat, sedangkan sisanya berasal dari hasil sintesis kimiawi melalui hidrolisis laktonitril (Hofvendahl & Hahn-Hagerdal, 2000). Produksi asam laktat secara sintesis kimiawi akan menghasilkan produk asam laktat dalam bentuk konfigurasi D-L, bahan baku cenderung tidak dapat diperbarui, melibatkan senyawa kimia yang dapat bersifat beracun seperti hidrogen sianida, prosesnya harus dilakukan dalam temperatur dan tekanan tinggi; sedangkan asam laktat dari proses fermentasi hanya akan menghasilkan satu jenis isomer berupa L(+) atau D(-) asam laktat, tingkat kemurnian tinggi, bahan baku yang digunakan dapat diperbarui, dan prosesnya dapat dilakukan dalam kondisi sedang sehingga penggunaan energi lebih hemat. Hal tersebut menyebabkan metode sintesis kimiawi jarang digunakan oleh industri dalam memproduksi asam laktat dan lebih memilih menggunakan metode fermentasi (Hidayat, 2006).

Proses produksi asam laktat dengan cara fermentasi membutuhkan mikroorganisme untuk dapat menghasilkan L-asam laktat, dimana asam laktat

dalam bentuk L(+) sangat dibutuhkan oleh industri terutama dalam penggunaannya pada industri makanan dan industri farmasi (Tsai and Moon, 1998). Jenis mikroorganisme yang umum digunakan berasal dari bakteri asam laktat (BAL) yang diketahui mampu mengkonversi gula menjadi beberapa produk terutama dalam bentuk asam laktat, seperti *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, dan *Pediococcus* (Pujasari, 2019).

Lactobacillus delbreuckii subsp. *bulgaricus* termasuk bakteri asam laktat homofermentatif yang dapat memproduksi sejumlah besar asam laktat dalam bentuk L(+) *lactid acid* (Manfaati, 2010). Bakteri ini diketahui dapat menghasilkan asam laktat paling tinggi dengan menggunakan substrat yang mempunyai kandungan senyawa gula berupa glukosa, fruktosa, laktosa, maltosa, dan sukrosa sehingga cocok digunakan pada fermentasi asam laktat mengingat kemampuannya yang tinggi dalam menyerap zat gula reduksi kompleks suatu substrat (Martinez *et al.*, 2013).

Beberapa penelitian sebelumnya membuktikan bahwa bakteri *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* memiliki potensi dalam menghasilkan asam laktat. Penelitian John *et al.* (2006) menggunakan bakteri *L. delbrueckii* mampu menghasilkan kadar asam laktat sebesar 249 mg/gds dengan ampas tebu dan ampas singkong sebagai substrat; penelitian Ghasemi *et al.* (2009) menggunakan *L. bulgaricus* mampu menghasilkan 20,8 g/L asam laktat dengan substrat berupa 80% whey; dan penelitian Nurjannah dkk. (2017) menggunakan bakteri *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mampu menghasilkan 28 g/L asam laktat dengan sumber karbon berupa 0.5% tetes tebu.

Keberhasilan dalam proses fermentasi asam laktat selain dipengaruhi jenis bakteri juga dapat dipengaruhi oleh metode yang digunakan, sehingga penggunaan metode yang tepat sangat dibutuhkan untuk memaksimalkan hasil fermentasi. Pembuatan asam laktat pada dasarnya dapat dilakukan dengan cara fermentasi substrat padat (*solid state fermentation*). Akan tetapi teknik fermentasi ini tidak dapat digunakan dalam proses fermentasi yang melibatkan organisme dengan kebutuhan a_w (aktivitas air) tinggi seperti bakteri karena kadar air yang digunakan dalam proses fermentasinya cukup rendah (Subramaniyam dan Vimala, 2012).

Fermentasi asam laktat melalui fermentasi substrat cair (*submerged fermentation*) dinilai lebih menguntungkan karena proses pemurnian produk serta pengaturan komposisi dan konsentrasi medium lebih mudah, dapat tersebar secara merata oksigen, pH, maupun nutrisi selama fermentasi karena adanya proses agitasi (Pangesti dkk., 2012). Penelitian mengenai penggunaan metode substrat cair dalam fermentasi asam laktat telah dilakukan oleh Pratama dkk. (2013) yang menghasilkan asam laktat lebih tinggi (0,895%) jika dibandingkan dengan menggunakan fermentasi substrat padat (0,329%) yang mengindikasikan bahwa fermentasi asam laktat lebih menguntungkan dilakukan dengan metode SmF.

Produksi asam laktat melalui fermentasi dengan menggunakan mikroorganisme pada dasarnya juga mempunyai kelemahan, yakni akan membutuhkan media pertumbuhan bakteri yang secara umum memerlukan biaya tinggi. Oleh karena itu, saat ini banyak dikembangkan dalam penelitian mengenai sumber media yang dapat dimanfaatkan dalam produksi asam laktat

secara fermentasi untuk menekan biaya produksi sekaligus menambah efisiensi proses fermentasi asam laktat sehingga dapat diproduksi dalam skala besar, salah satunya dengan memanfaatkan limbah agroindustri (Nurdyansyah dan Hasbullah, 2018).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa limbah agroindustri seperti singkong, tepung tapioka dan limbah cair tahu, ampas pati aren, serta karbon tetes tebu dapat digunakan sebagai substrat dalam produksi asam laktat (Hidayat, 2006; Manfaati, 2010; Purnavita dkk., 2014; Nurjannah dkk., 2017). Pemanfaatan limbah agroindustri lainnya dalam bentuk kulit buah sebagai substrat dalam fermentasi asam laktat juga telah dilakukan oleh Nurdyansyah dan Hasbullah (2018) dengan memanfaatkan tepung kulit pisang menggunakan *L. casei* yang menghasilkan kadar asam laktat terbesar pada konsentrasi 4.31% yaitu 7.06 g/L dan Febriningrum (2013) dengan memanfaatkan kulit nanas menggunakan *L. plantarum* yang menghasilkan kadar asam laktat sebesar 1.620%.

Salah satu limbah agroindustri yang jumlahnya melimpah dan keberadaannya mudah dijumpai adalah kulit nangka. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik (2019) pada tahun 2018 menunjukkan bahwa produksi buah nangka di Indonesia mencapai 775.480 ton. Hal ini akan berpotensi menghasilkan banyaknya kulit nangka sebagai limbah agroindustri seiring dengan jumlah produksi buah nangka, yakni sekitar 65-80%. Saat ini limbah kulit nangka hanya dibuang dan kurang dimanfaatkan oleh masyarakat sehingga dapat menimbulkan permasalahan lingkungan yakni penumpukan limbah organik berupa kulit nangka yang akan mengalami pembusukan dalam

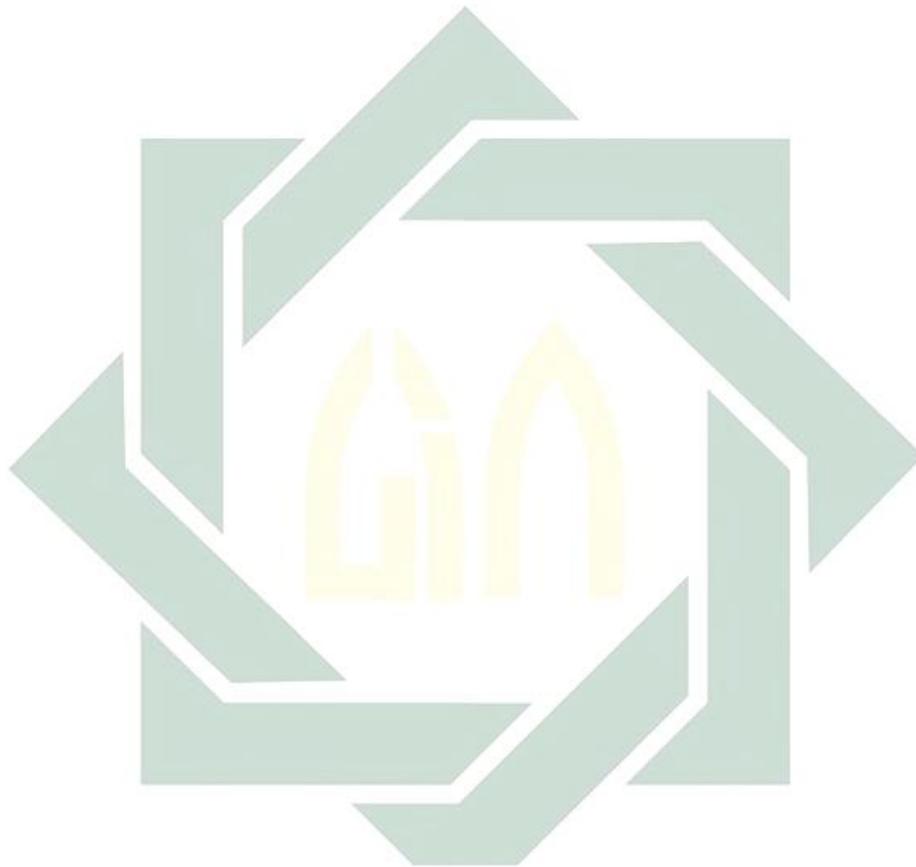
Limbah kulit nangka memiliki kandungan karbohidrat sebesar 15,87% yang meliputi gula reduksi, serat, pektin, dan pati (Karim, 2013). Menurut Saxena *et al.* (2011) pada kulit nangka mengandung gula reduksi yakni berupa 6.6% fruktosa, 8.7% sukrosa, dan 4.9% glukosa yang dapat dijadikan sebagai pengganti nutrisi dalam media sintesis yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroorganisme, sehingga memiliki komposisi nutrisi yang cukup untuk mendukung proses fermentasi asam laktat. Hal ini didasari oleh pernyataan Buckle *et al.* (1987) bahwa proses fermentasi asam laktat dapat berlangsung jika substrat mengandung zat gula sebesar 4-20% (%b/v).

Hingga saat ini belum ditemukan adanya penelitian mengenai pemanfaatan limbah kulit nangka sebagai bahan substrat untuk produksi asam laktat secara fermentasi. Oleh karena itu, perlu dilakukan sebuah penelitian pendahuluan mengenai fermentasi asam laktat menggunakan kulit nangka. Berdasarkan latar belakang di atas, maka peneliti tertarik untuk melakukan penelitian dengan judul Uji Efektivitas Pemanfaatan Limbah Kulit Nangka (*Artocarpus heterophyllus*) Sebagai Bahan Substrat Pada Fermentasi Asam Laktat Oleh *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

1.2 Rumusan Masalah

- a. Bagaimana pemanfaatan limbah kulit nangka sebagai substrat pada fermentasi asam laktat oleh *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dengan metode substrat cair?
- b. Bagaimana pengaruh variasi konsentrasi substrat kulit nangka pada fermentasi asam laktat oleh *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dengan

- | | | | |
|----|--|------|--|
| 5. | Ikha Agustina Setyowulan, Enny Purwati Nurlaili, Fafa Nurdyansyah, dan Umar Hafidz Asy'ari Hasbullah | 2018 | Produksi asam laktat menggunakan bakteri <i>L. acidophilus</i> dengan substrat 3%, 5%, 7% kulit pisang. Hasil kadar asam laktat terbesar pada konsentrasi 5% yaitu sebesar 0.64%. |
| 6. | Tryadi Pradipta, Komang Ayu Nocianitri, I Dewa Gede Mayun Permana | 2020 | Produksi total asam menggunakan bakteri <i>Lactobacillus</i> sp. dengan substrat minuman sari buah sirsak dan 0%, 3%, 6%, 12% sukrosa. Hasil total asam tertinggi pada konsentrasi 6% yaitu sebesar 1.57%. |
-



fermentasi terbagi menjadi dua, yakni fermentasi substrat cair (*submerged fermentation*) dan fermentasi substrat padat (*solid state fermentation*). Salah satu teknik fermentasi yang banyak digunakan penerapannya dalam teknologi fermentasi adalah fermentasi substrat cair dengan melibatkan mikroorganisme yang ditumbuhkan dalam substrat terlarut dalam fase cair (Amelia, 2012).

Teknik fermentasi cair ini lebih cocok jika digunakan dalam proses fermentasi yang melibatkan organisme dengan kebutuhan a_w (aktivitas air) seperti bakteri karena kadar air yang digunakan dalam proses fermentasinya cukup besar dan memiliki tingkat kelembaban yang tinggi. Beberapa jenis substrat yang umum digunakan dalam fermentasi substrat cair diantaranya gula larut, molase, jus buah atau sayuran, air limbah, dan limbah hasil pertanian (Subramaniyam dan Vimala, 2012).

Keuntungan dalam penggunaan SmF adalah proses pemurnian produk serta pengaturan komposisi dan konsentrasi medium lebih mudah, meningkatkan kontak mikroba terhadap substrat, proses fermentasi lebih cepat dan seragam, dapat tersebar secara merata oksigen, pH, maupun nutrisi selama fermentasi karena adanya proses agitasi sehingga dapat menyediakan kondisi yang optimum untuk pertumbuhan mikroba (Pangesti dkk., 2012). Selain itu pada fermentasi cair akan menggunakan inokulum dalam jumlah yang lebih sedikit serta penanganan suhu dan kelembaban selama proses fermentasi berlangsung lebih mudah dikontrol (Amelia, 2012).

Teknik fermentasi cair ini umumnya telah diterapkan pada berbagai proses pembuatan produk yang berasal dari hasil metabolisme diantaranya produksi antibiotik, etanol, sel tunggal, kultur starter, pelarut organik, glukosa

mengeluarkan cairan kultur dalam fermentor sehingga mengalami kenaikan volume pada kultur.

2.4 Asam Laktat

Asam laktat merupakan asam organik multifungsi hasil metabolit sekunder yang pertama kali ditemukan oleh C.W. Scheele pada tahun 1780 dalam asam susu. Pemanfaatan asam laktat banyak dibutuhkan dalam berbagai bidang industri karena mempunyai rasa dan bau yang tidak tajam serta tingkat keasaman yang lebih ringan daripada bahan pengasam lainnya, sehingga diakui menjadi bahan pengawet yang aman dan tidak berbahaya (GRAS, *generally regarded as safe*) (Martinez *et al.*, 2013).

Asam laktat diproduksi dalam berbagai jenis kualitas yang meliputi *food*, *technical*, dan *pharmaceutical grades* dengan tingkat konsentrasi antara 50% hingga 88%. Sebagian besar asam laktat banyak dimanfaatkan dalam industri makanan, diantaranya sebagai bahan pengasam, pengemulsi, penyedap, pengawet, dan penyangga pH atau penghambat pembusukan bakteri. Asam laktat yang digunakan dalam pengolahan bahan pangan tidak akan memberikan pengaruh terhadap rasa asli makanan yang dihasilkan, sehingga banyak dipilih jika dibandingkan dengan perisa asam lainnya (Manfaati, 2010).

Pemanfaatan asam laktat dari jenis *technical grades* diantaranya sebagai pengontrol pH dalam tahap pelapisan film, bahan penyusun *plasticizers* dalam produksi polyester dan resin phenol-formaldehid, bahan pengganti asam sulfat dan asam formiat dalam industri penyamakan kulit. Asam laktat dalam bentuk garam kalsium dapat digunakan sebagai zat

tubuh (Hofvendahl & Hanh-Hagerdal, 2000; Manfaati, 2010). Asam laktat pada dasarnya dapat membentuk kristal bening *monoclinic* apabila mempunyai tingkat kemurnian yang tinggi, termasuk jenis asam lemah dengan volatilitas rendah, tidak dapat terlarut dalam kloroform melainkan terlarut dalam air, alkohol, dan eter serta dapat bereaksi dengan berbagai jenis reaksi kimia (Manfaati, 2010).

Asam laktat dapat dihasilkan dengan menggunakan dua metode, yakni sintetis kimiawi maupun melalui fermentasi karbohidrat. Pembuatan asam laktat dengan cara sintetis kimiawi menggunakan *lactonitrile* sebagai bahan baku yang diperoleh dari hasil pencampuran antara *hydrogen cyanide* dan *acetaldehyde*. Beberapa metode yang digunakan untuk memproduksi asam laktat dalam sintetis kimiawi diantaranya oksidasi *propylene glycol*, penguraian gula dengan katalis, hidrolisis *chloropropionic acid*, serta pencampuran antara *acetaldehyde*, *carbon monoxide* dan air dengan tekanan dan suhu tinggi (Narayanan, 2004).

Produksi asam laktat dengan proses fermentasi membutuhkan gula atau amilum sebagai bahan baku yang melibatkan mikroorganisme seperti bakteri dan jamur di dalamnya. Kemampuan mikroorganisme yang dipilih dalam produksi asam laktat yakni mampu memfermentasi bahan baku dengan cepat, kadar asam laktat yang dihasilkan tinggi baik dalam keadaan pH rendah dan suhu yang tinggi, serta massa dan produk samping lain yang dihasilkan dalam jumlah kecil (Manfaati, 2010).

Asam laktat yang dihasilkan dari proses fermentasi mempunyai keunggulan jika dibandingkan dengan hasil dari sintetis kimiawi, yakni

Bakteri *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ditemukan pertama kali pada tahun 1905 oleh seorang doktor bernama Stamen Grigoroy dari Bulgaria. Pada awalnya bakteri ini lebih dikenal dengan dengan nama *L. bulgaricus*, namun kemudian bakteri ini mengalami perubahan nama berdasarkan taksonominya menjadi *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Hofvendahl & Hahn-Hagerdal, 2000; Purwadi, 2019). Bakteri ini termasuk bakteri nonpatogen yang bisa tumbuh secara optimum pada rentang suhu 30-40°C, dapat memproduksi senyawa bakteriosin sehingga mampu mencegah pertumbuhan bakteri lain karena sifatnya yang bakterisidal, serta dapat menurunkan pH media tumbuh (Anggraini, 2012). Adapun klasifikasi bakteri *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* menurut Felis dan Dellaglio (2007) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria
Phylum : Firmicutes
Class : Bacilli
Order : Lactobacillales
Family : Lactobacillaceae
Genus : *Lactobacillus*
Species : *Lactobacillus delbrueckii*
Subspecies : *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* bersifat toleran terhadap asam yang dapat tumbuh secara efektif meskipun pada pH rendah (5.4-4.6), katalase negatif dan metabolisme utamanya dilakukan secara fermentasi dengan menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir (Felis dan Dellaglio, 2007). Selain itu *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* termasuk bakteri yang bersifat

nonpatogen, gram positif, berbentuk batang, tidak motil dan tidak membentuk spora. Umumnya bakteri ini banyak diaplikasikan sebagai starter dalam pembuatan yogurt, susu fermentasi, dan keju pada industri susu (Anggraini, 2012).

Bakteri *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dalam pertumbuhannya membutuhkan nutrisi kompleks yang akan dimanfaatkan dalam proses metabolismenya termasuk untuk memfermentasi berbagai jenis gula seperti laktosa. Bakteri ini juga termasuk dalam flora usus yang bisa dijumpai bersimbiosis di dalam vagina dan sistem pencernaan. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dapat menghasilkan asam laktat dalam susu dengan mengubah kandungan laktosa di dalamnya dan diketahui mampu bertahan hidup dalam suhu pasteurisasi (63-75°C) atau bersifat termotoleran (Fatmala, 2019).

Fase pertumbuhan dari bakteri *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* yakni pada 0-2 jam berada pada fase adaptasi (*lag phase*), pada 2-14 jam menempati fase eksponensial dan pada 14 jam sudah mulai mencapai fase stasioner hingga pada 16 jam inkubasi mencapai jumlah total sebanyak $4,9 \times 10^9$ sel bakteri. Bakteri ini menjadi bakteri probiotik karena mempunyai enzim yang dapat mencegah terjadinya intoleransi pada laktosa sehingga mampu menormalkan komposisi bakteri dalam saluran pencernaan sekaligus peningkatan sistem imun tubuh (Fatmala, 2019).

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* termasuk bakteri asam laktat homofermentatif yang dapat memproduksi sejumlah besar asam laktat dalam bentuk L(+) *lactid acid* (Manfaati, 2010). Bakteri ini diketahui dapat menghasilkan asam laktat paling tinggi dengan menggunakan substrat yang

nangka dioven pada temperatur 70°C selama 48 jam dengan tujuan untuk mengurangi kadar air yang terkandung di dalamnya. Kulit nangka yang telah kering selanjutnya dihancurkan menggunakan blender dan disaring dengan ayakan berukuran 60 mesh kemudian disimpan dalam plastik pada suhu ruang (Setyowulan dkk., 2018).

3.5.3 Hidrolisis Tepung Kulit Nangka

Proses hidrolisis dilakukan dengan menimbang tepung kulit nangka sesuai dengan perlakuan yakni sebanyak 3 gram, 5 gram, 7 gram, 9 gram, dan 11 gram. Selanjutnya masing-masing ditambahkan sebanyak 100 ml aquades dan dihomogenisasi menggunakan *magnetic stirrer* suhu 70°C dengan kecepatan 4 selama 15 menit. Larutan yang diperoleh difiltrasi menggunakan kertas saring, kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada tekanan 1 atm suhu 121°C selama 15 menit (Setyowulan dkk., 2018).

3.5.4 Pembuatan Media MRSB (*de Mann Rogose Sharpe Broth*)

Media yang digunakan untuk peremajaan bakteri adalah media MRS *broth* yang dibuat dengan cara menimbang MRS *broth* sebanyak 5,22 gram kemudian dilarutkan dalam 100 mL aquades. Campuran dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga mendidih sambil diaduk agar mudah terlarut. Larutan dimasukkan sebanyak 10 ml ke dalam 5 buah tabung reaksi, kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada tekanan 1 atm suhu 121°C selama 15 menit (Febriningrum, 2013).

3.5.5 Pembuatan Media MRSA (*de Mann Rogose Sharpe Agar*)

Media yang digunakan untuk perhitungan total BAL adalah media MRS *agar* yang dibuat dengan cara menimbang MRS *agar* yang dibuat dengan menimbang 2,75 gram kemudian dilarutkan dalam 50 mL aquades. Campuran dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga mendidih sambil diaduk agar mudah terlarut, kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada tekanan 1 atm suhu 121°C selama 15 menit (Setyowulan dkk., 2018).

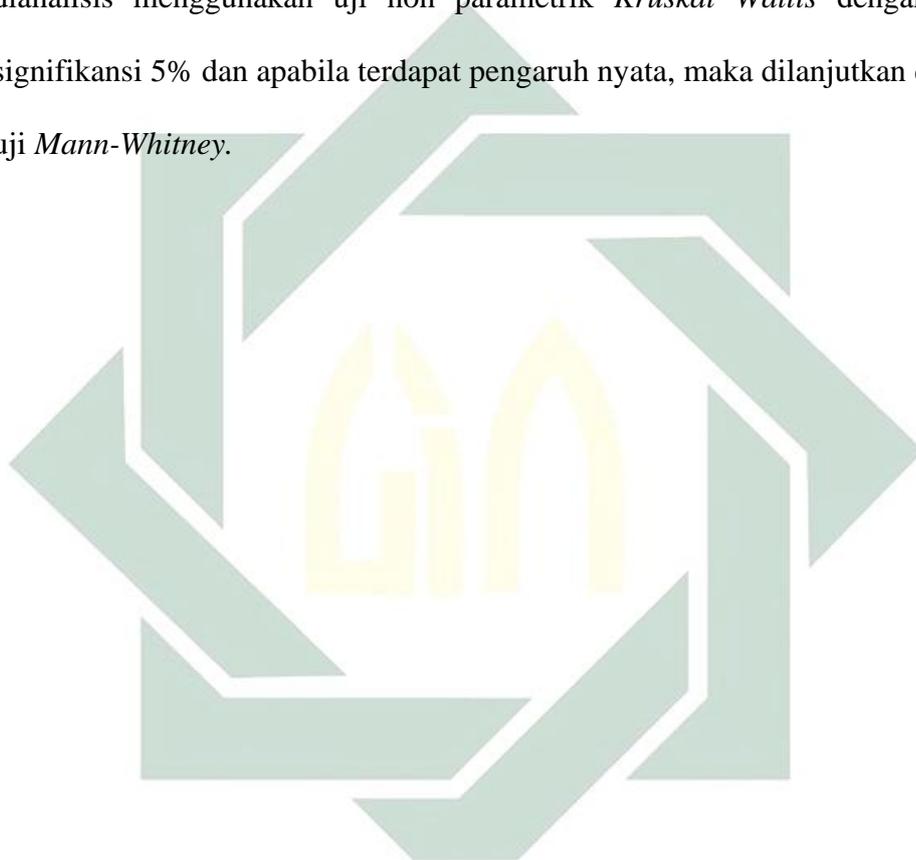
3.5.6 Peremajaan Bakteri *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

Isolat bakteri *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* pada media agar miring diambil sebanyak 2 jarum ose kemudian dikultur dengan dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi berisi media MRS broth, disimpan di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Pertumbuhan bakteri akan ditandai dengan kekeruhan pada media disertai terbentuknya endapan berwarna putih di dasar tabung. Tujuan dari dilakukannya peremajaan isolat bakteri adalah untuk mempertahankan karakteristik bakteri dari kultur murni sehingga bakteri tetap dalam keadaan segar saat digunakan (Manalu, 2017).

3.5.7 Fermentasi Asam Laktat

Laktosa sebanyak 4 gram yang telah dilarutkan dalam 100 ml aquades dan filtrat tepung kulit nangka hasil hidrolisis masing-masing dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer dan ditambahkan nutrisi dengan komposisi tiap 100 mL terdiri atas 0,03 gram KH_2PO_4 ; 0,004 gram $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,135 gram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,025 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

dianalisis secara statistik menggunakan *Analysis of variance* (ANOVA) pada SPSS dengan melakukan uji normalitas terlebih dahulu menggunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui normalitas distribusi data dan dilanjutkan dengan uji homogenitas menggunakan uji *Levene test* untuk mengetahui bahwa seluruh data homogen. Data hasil pengukuran kadar asam laktat dianalisis menggunakan uji non parametrik *Kruskal Wallis* dengan taraf signifikansi 5% dan apabila terdapat pengaruh nyata, maka dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.



Penggunaan metode substrat cair dalam penelitian ini dinilai telah mendukung berlangsungnya proses fermentasi yang ditandai dengan dihasilkannya kadar asam laktat sebagai indikator utama dalam keberhasilan proses fermentasi (Desniar dkk., 2012). Fermentasi dengan menggunakan metode substrat cair ini memungkinkan bakteri *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* untuk tumbuh secara optimum sehingga dapat menghasilkan kadar asam laktat karena tercukupinya kadar air yang dibutuhkan oleh bakteri untuk melakukan proses metabolisme selama proses fermentasi berlangsung.

Hal tersebut didukung oleh pernyataan Subramaniam dan Vimala (2012) yang mengungkapkan bahwa teknik fermentasi cair ini lebih cocok jika digunakan dalam proses fermentasi yang melibatkan organisme dengan kebutuhan a_w (aktivitas air) seperti bakteri karena kadar air yang digunakan dalam proses fermentasinya cukup besar dan memiliki tingkat kelembaban yang tinggi. Selain itu dengan menggunakan metode substrat cair ini proses fermentasi akan lebih cepat dan seragam, mampu meningkatkan kontak mikroba terhadap substrat, dan dapat tersebar secara merata oksigen, pH, maupun nutrisi selama fermentasi karena adanya proses agitasi sehingga dapat menyediakan kondisi yang optimum untuk pertumbuhan mikroba (Pangesti dkk., 2012).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan P3 dengan menggunakan 5% substrat kulit nangka merupakan konsentrasi paling optimal yang dapat menghasilkan sejumlah kadar asam laktat, total BAL, dan nilai OD tertinggi berturut-turut sebesar 1.33%, 2.8×10^9 CFU/ml, dan 1.272. Konsentrasi yang kurang optimal terletak pada perlakuan P1, yang

P3 (5% substrat kulit nangka) yakni sebesar 1.33%, sedangkan penggunaan konsentrasi substrat kulit nangka yang lebih tinggi menunjukkan penurunan terhadap kadar asam laktat yang dihasilkan.

Hasil yang didapatkan dalam penelitian ini searah dengan penelitian Setyowulan dkk. (2018) pada fermentasi asam laktat dengan menggunakan metode substrat cair yang menunjukkan bahwa penggunaan konsentrasi substrat kulit pisang sebesar 3% dan 5% menghasilkan nilai TAT tertinggi berturut-turut sebesar 0.65% dan 0.64%, sedangkan penggunaan konsentrasi substrat kulit pisang 7% menghasilkan nilai TAT terendah sebesar 0.56%. Hal tersebut dapat disebabkan karena konsentrasi substrat yang terlalu tinggi akan memicu terjadinya dehidrasi sel bakteri sehingga terhambatnya pertumbuhan bakteri dan mengakibatkan total asam yang diproduksi selama proses fermentasi menjadi rendah (Setyowulan, 2018).

Pernyataan tersebut didukung oleh Wulandari dan Herdyastuti (2013) yang mengungkapkan bahwa jumlah konsentrasi substrat yang sedikit akan menyebabkan rendahnya pertumbuhan bakteri karena kurangnya nutrisi yang dapat digunakan oleh bakteri untuk mempertahankan pertumbuhannya secara optimal. Akan tetapi penggunaan konsentrasi substrat yang terlalu tinggi juga akan menghambat pertumbuhan bakteri dan mengakibatkan terjadinya substrat inhibisi yang akan berubah menjadi racun bagi proses pertumbuhan bakteri.

Hasil kadar asam laktat dalam penelitian ini yang berkisar antara 0.59-1.33% telah memenuhi Standar Nasional Indonesia (1992) untuk produksi asam laktat secara fermentasi yakni pada rentang 0.5%-2%. Perolehan kadar asam laktat tersebut menunjukkan hasil yang lebih besar apabila dibandingkan dengan hasil penelitian sebelumnya yang melakukan fermentasi asam laktat menggunakan bakteri *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dengan metode substrat cair.

Penelitian Jannah dkk. (2014) menggunakan bakteri *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* yang dikombinasikan dengan bakteri *Streptococcus thermophilus* dalam media *yogurt drink* dengan penambahan ekstrak buah belimbing menghasilkan kadar asam laktat sebesar 0.935-1.015%. Sedangkan penelitian Nurjannah dkk. (2017) hanya menghasilkan kadar asam laktat sebesar 0.10-0.82% dalam media MRS dengan penambahan 0.5% tetes tebu menggunakan bakteri *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Perbedaan hasil kadar asam laktat dalam penelitian ini dengan penelitian sebelumnya dapat dikarenakan adanya perbedaan lama waktu fermentasi, jenis, dan konsentrasi substrat yang digunakan (Pujasari, 2019).

Perbedaan komposisi media fermentasi yang digunakan juga dapat mempengaruhi hasil optimal pada masing-masing substrat. Penambahan nutrisi pada media fermentasi berupa garam-garam mineral dalam penelitian ini seperti Mg, K, dan Zn yang berperan sebagai kofaktor dan NH_4 sebagai sumber nitrogen (Hidayat, 2006) mempengaruhi pertumbuhan dan kinerja sel mikroba serta kadar asam

laktat yang dihasilkan, dimana semakin lengkap nutrisi yang terkandung maka sel mikroba akan dapat tumbuh dengan optimum sehingga mampu memproduksi kadar asam laktat yang tinggi (Nurjannah dkk., 2017).

Penggunaan kulit nangka sebagai substrat yang mengandung gula reduksi berupa 6.6% fruktosa, 8.7% sukrosa, dan 4.9% glukosa (Saxena *et al.*, 2011) menjadikan nutrisi yang dapat digunakan oleh mikroba semakin kompleks dibandingkan hanya dengan menggunakan media laktosa. Hal ini didukung oleh Jannah dkk. (2014) yang menyatakan bahwa semakin banyak kandungan sumber gula dalam media fermentasi yang dapat dimetabolisir oleh mikroba maka asam-asam organik yang dihasilkan juga akan semakin banyak.

Hasil yang didapatkan dalam penelitian ini searah dengan penelitian Li *et al.* (2010) yang menunjukkan bahwa 25 g/L hidrolisat dedak gandum dikombinasikan dengan 30 g/L *corn steep liquor* menghasilkan kadar asam laktat lebih tinggi (3.75 g/L) jika dibandingkan dengan kadar asam laktat yang dihasilkan menggunakan 15 g/L *yeast extract* (2.46 g/L) sebagai kontrol. Kombinasi dari kedua sumber nutrisi tersebut memiliki efek komplementer pada produksi asam laktat yang dibandingkan dengan hanya menggunakan satu sumber nutrisi, dua atau lebih banyak sumber nutrisi akan lebih efisien untuk produksi asam laktat karena setiap nutrisi dapat saling melengkapi (Li *et al.*, 2010).

Proses hidrolisis terhadap kulit nangka yang dilakukan dalam penelitian ini memungkinkan bakteri dapat menyerap nutrisi dalam substrat kulit nangka secara mudah untuk dijadikan sebagai sumber karbon dalam pertumbuhannya. Proses pemanasan yang dilakukan dimaksudkan agar mempercepat terjadinya hidrolisis, dimana semakin lama waktu pemanasan maka semakin banyak pula pati yang akan terhidrolisis menjadi monosakaridanya yaitu dalam bentuk glukosa (Barokah dan Abtokhi, 2013).

Hal tersebut didukung oleh penelitian Li *et al.* (2010) yang membandingkan penggunaan dedak gandum tanpa hidrolisis dan dedak gandum yang dihidrolisis sebagai substrat fermentasi asam laktat. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa hidrolisat dedak gandum memiliki kandungan asam amino lebih tinggi dengan rantai peptida yang lebih pendek, sebaliknya dedak gandum tanpa hidrolisis memiliki rantai peptida yang lebih panjang sehingga memiliki potensi kerugian apabila digunakan sebagai substrat dalam fermentasi asam laktat yakni adanya sejumlah besar kotoran yang tersisa selama fermentasi berupa kadar abu yang dapat mempengaruhi tingkat kemurnian asam laktat.

Hasil fermentasi asam laktat dalam penelitian ini ditunjukkan dengan terbentuknya total asam melalui metode titrasi yang dinyatakan dalam persentase kadar asam laktat. Prinsip dari metode titrasi adalah mengukur titik ekuivalen nilai pH, dimana asam yang terbentuk akan dinetralkan dengan NaOH sebagai peniternya. Oleh karena itu

konsentrasi asam laktat yang sebenarnya tidak dapat diketahui sehingga memerlukan analisis lain yang lebih spesifik seperti KCKT (Nurjannah dkk., 2017).

Asam laktat adalah produk utama yang dihasilkan pada proses fermentasi karbohidrat oleh bakteri asam laktat (Dalie *et al.*, 2010). Pada penelitian ini menggunakan bakteri *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* yang merupakan jenis bakteri asam laktat homofermentatif, dimana fermentasi dengan menggunakan bakteri homofermentatif hanya akan menghasilkan asam laktat sebagai produk utama dari proses metabolisme yang dilakukan (Pujasari, 2019).

Mekanisme pembentukan asam laktat dalam proses fermentasi ini terjadi melalui reaksi anaerob atau disebut juga sebagai alur *Embden-Meyerhof* karena melibatkan jenis bakteri homofermentatif dengan prinsip utama berupa pemecahan karbohidrat menjadi bentuk monosakarida yang selanjutnya akan diubah menjadi asam laktat dengan bantuan enzim yang dihasilkan oleh bakteri *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Proses fermentasi ini akan menghasilkan produk yang sebagian besar berupa asam laktat (95%) sebagai produk utama (Ferdaus dkk., 2008).

Hasil penelitian yang diperoleh dalam penelitian ini dapat diketahui bahwa penggunaan limbah kulit nangka terbukti dapat dimanfaatkan sebagai substrat dalam fermentasi asam laktat. Hal ini menunjukkan bahwa setiap apa yang diciptakan pasti mempunyai

Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Nurjannah dkk. (2017) yang menunjukkan bahwa pada media MRS cair dengan penambahan 0.5% tetes tebu pertumbuhan biomassa sel bakteri *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* yang dinyatakan dalam nilai OD lebih tinggi hingga mencapai sebesar 0.37 apabila dibandingkan pada media MRS cair tanpa penambahan nutrisi sebagai kontrol dengan nilai OD yang hanya mencapai sebesar 0.19.

Menurut Kumalasari dkk. (2012) sel bakteri asam laktat secara eksponensial mampu tumbuh dan membelah diri hingga mencapai jumlah maksimum yang bergantung pada kondisi lingkungan dan sedikit banyaknya jumlah nutrisi di dalam media. Pada penelitian ini adanya penambahan garam-garam mineral diduga berperan sebagai nutrisi tambahan yang menjadikan nutrisi dalam substrat kulit nangka semakin kompleks untuk dapat digunakan sebagai sumber energi dalam pertumbuhan dan pembelahan sel bakteri.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa nilai OD semakin meningkat seiring dengan banyaknya jumlah total BAL. Hal ini sesuai dengan pernyataan Setiarto dkk. (2017) bahwa semakin tinggi nilai OD menunjukkan semakin tinggi pula jumlah sel bakteri dalam suatu larutan. Selain itu, total BAL juga akan berbanding lurus dengan kadar asam laktat yang dihasilkan selama proses fermentasi.

Perlakuan P3 yang menggunakan 5% substrat kulit nangka merupakan konsentrasi paling optimal dalam penelitian ini karena menghasilkan total BAL dan nilai OD tertinggi berturut-turut sebesar

2.8×10^9 CFU/ml dan 1.272 dengan kadar asam laktat yang tinggi, sedangkan perlakuan P1 yang menggunakan 4% laktosa sebagai kontrol kurang optimal karena menghasilkan total BAL dan nilai OD yang rendah berturut-turut sebesar 7.6×10^8 CFU/ml dan 1.089 dengan kadar asam laktat terendah.

Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Nurjannah dkk. (2017) yang menyatakan bahwa semakin tinggi total BAL yang tumbuh maka kadar asam laktat semakin tinggi. Hal ini juga diperkuat oleh pernyataan Zaini (2016) yang mengungkapkan bahwa semakin tinggi kadar asam laktat maka jumlah mikroba yang didapatkan juga akan semakin tinggi, karena asam laktat yang terbentuk merupakan hasil dari aktivitas metabolisme mikroba dalam substrat.

Aktivitas mikroba selama proses fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya kondisi suhu, pH, kandungan oksigen, agitasi, dan nutrisi dalam substrat (Hidayat, 2006). Kondisi suhu yang sesuai selama proses fermentasi akan mendukung bakteri untuk dapat melakukan metabolisme. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini merupakan jenis mikroba mesofil yakni dapat beraktivitas secara optimum pada suhu berkisar $30-40^\circ\text{C}$ (Ferdaus dkk., 2008).

Faktor pH juga sangat berperan penting dalam menentukan keberhasilan mikroba dalam menghasilkan asam laktat selama fermentasi. Bakteri *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* akan semakin aktif apabila berada pada pH yang rendah, sehingga akan menghasilkan asam organik terutama dalam bentuk asam laktat dalam

jumlah yang banyak. Adapun sebaliknya bakteri ini menjadi kurang aktif apabila berada pada kondisi pH yang netral dan toleran terhadap asam (Machmud dkk., 2013).

Upaya untuk mempertahankan ketersediaan oksigen dan agitasi yang cukup bagi mikroba dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan *shaker* pada kecepatan 150 rpm, hal ini dapat dikarenakan dengan kecepatan tersebut bakteri *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mempunyai pertumbuhan yang optimum selama proses fermentasi berlangsung (Nurjannah dkk., 2017).

4.3 Konsentrasi optimal substrat kulit nangka

Penentuan konsentrasi substrat kulit nangka yang paling optimal pada fermentasi asam laktat oleh bakteri *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dengan metode substrat cair dalam penelitian ini dapat dilihat berdasarkan dari nilai kadar asam laktat yang tertinggi. Hal ini dilakukan untuk mengetahui banyaknya konsentrasi substrat yang dibutuhkan oleh bakteri *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* agar dapat menghasilkan kadar asam laktat dalam jumlah besar (Rafsen, 2018). Adapun hasil perolehan rata-rata kadar asam laktat dapat dilihat pada grafik dalam gambar 4.1.

Hasil pengukuran kadar asam laktat menunjukkan bahwa konsentrasi substrat kulit nangka 5% memberikan hasil paling optimal apabila dibandingkan dengan konsentrasi substrat kulit nangka 3%, 7%, 9%, dan 11%. Berdasarkan gambar 4.1 dapat diketahui bahwa kadar asam laktat tertinggi terdapat pada perlakuan P3 yang menggunakan 5% substrat kulit nangka yakni sebesar 1.33%. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi substrat kulit nangka

