

POTENSI MINUMAN SARI KULIT SINGKONG FERMENTASI DENGAN KULTUR STARTER *Lactobacillus plantarum* B1765 SEBAGAI ANTIOKSIDAN

POTENTIAL OF FERMENTED CASSAVA PEEL EXTRACT DRINK WITH *Lactobacillus plantarum* B1765 CULTURE STARTER AS ANTIOXIDANT

Istamanul Khoiriyah dan Prima Retno Wikandari*

Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences

Universitas Negeri Surabaya

Jl. Ketintang, Surabaya (60231), Telp. 031-8298761

* Corresponding author, email: primaretno@unesa.ac.id

Abstrak. Kulit singkong merupakan sumber fenolik yang berperan sebagai antioksidan. Namun, keberadaan fenolik di alam dalam bentuk terikat membatasi potensinya sebagai antioksidan. Salah satu metode untuk mengoptimalkan aktivitas antioksidan adalah fermentasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengaji pertumbuhan bakteri asam laktat (BAL), pH, total asam tertitrasi (TAT), total fenolik, dan aktivitas antioksidan minuman fermentasi sari kulit singkong dengan kultur starter *Lactobacillus plantarum* B1765 yang difermentasi selama 0, 12, 24, 36, 48, dan 60 jam pada suhu 37°C. Penentuan total BAL dengan metode Total Plate Count, pH dilakukan dengan pH meter, TAT dengan titrasi asam-basa, total fenolik dengan metode Folin-Ciocalteu, dan aktivitas antioksidan dengan metode penghambatan radikal DPPH. Hasil penelitian menunjukkan bahwa lama fermentasi berpengaruh terhadap peningkatan Total BAL, TAT, total fenolik, aktivitas antioksidan, serta penurunan pH minuman fermentasi sari kulit singkong. Total BAL meningkat optimal mencapai 4.91×10^7 CFU/mL pada 48 jam fermentasi, sedangkan penurunan pH dan peningkatan TAT, total fenolik, dan aktivitas antioksidan terus terjadi hingga waktu fermentasi 60 jam, dengan pH 3.52, TAT 0.247%, total fenolik 115.948 mg GAE/g, dan aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} 64.392 ppm yang termasuk antioksidan kuat. Produk yang dihasilkan telah memenuhi standar sebagai minuman fermentasi, sehingga berpotensi untuk dikembangkan sebagai minuman fungsional sumber antioksidan.

Kata kunci : kulit singkong, fermentasi, *Lactobacillus plantarum* B1765, aktivitas antioksidan

Abstract. Cassava peel is a source of phenolic that function as antioxidants. However, phenolic in nature is in the bound-shaped limits its potential as an antioxidant. A method to optimize antioxidant activity is fermentation. This research studied the growth of lactic acid bacteria (LAB), pH, total titratable acid (TTA), total phenolic content (TPC), and antioxidant activity of cassava peel extract drink with *Lactobacillus plantarum* B1765 as culture starter that fermented in 0, 12, 24, 36, 48, and 60 hours at 37°C. Total LAB was determined using Total Plate Count, pH determination using pH meter, TTA using acid-base titration, TPC using Folin-Ciocalteu method, and antioxidant activity using DPPH radical scavenging method. These results showed that the length of fermentation affected increasing the total LAB, TTA, TPC, antioxidant activity, and decreasing of pH Total BAL increased optimally reached 4.91×10^7 CFU/mL at 48 hours, while pH decreased, TTA, TPC, and antioxidant increased still occur up to 60 hours, with pH 3.52, TTA 0.247%, TPC 115.948 mg GAE/g, and IC_{50} value 64.392 ppm which categorized as strong antioxidants. The resulting product has met the standards of fermentation beverage, so it could be developed as a potentially functional beverage as antioxidant agent.

Key words: cassava peel, fermentation, *Lactobacillus plantarum* B1765, antioxidant activity

PENDAHULUAN

Singkong (*Manihot esculenta*) merupakan salah satu komoditas pertanian yang potensial di Indonesia. Jumlah penggunaan rata-rata singkong di Indonesia pada tahun 2018-2023 mencapai 23.159.311 ton [1]. Dari proses pengolahan singkong, dihasilkan kulit singkong dengan persentase kurang lebih sebesar 20% dari satu buah umbinya. Kulit singkong dianggap sebagai limbah dan hanya dimanfaatkan sebagai pakan ternak ataupun dibuang. Namun telah diketahui kulit singkong mengandung beberapa zat aktif, seperti fenolik, flavonoid, dan tanin [2]. Di antara senyawa tersebut, senyawa fenolik diketahui merupakan konstituen utama yang berperan terhadap aktivitas antioksidan [3].

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat proses oksidasi. Antioksidan berperan dalam mengurangi resiko penyakit degeneratif akibat radikal bebas, seperti kerusakan jaringan paru-paru, sistem kardiovaskular, ginjal, hati, bagian gastrointestinal, darah, mata, kulit, otak, dan proses penuaan dini [4]. Beberapa penelitian telah menemukan adanya korelasi antara peningkatan total fenolik dengan aktivitas antioksidan pada kulit singkong. Ekstrak metanol kulit singkong daging kuning mempunyai total fenolik (676.0 mg GAE/100 g) yang lebih tinggi dibandingkan daging putih (253.4 mg GAE/100 g) [5]. Sedangkan [2] telah meneliti total fenolik ekstrak etanol kulit singkong daging putih (48.87 mg GAE/kg) yang lebih tinggi dari daging kuning (56.43 mg GAE/kg). Kulit singkong daging kuning diketahui mempunyai aktivitas penghambatan radikal DDPH sebesar 89.6%, sedangkan daging putih mempunyai antioksidan sebesar 85.6% [2].

Permasalahan yang terjadi adalah senyawa fenolik secara alami berikatan dengan gula sederhana dalam bentuk glikosida [6]. Fenolik dalam bentuk glikosida memiliki aktivitas antioksidan yang kurang optimal dibandingkan dengan fenolik bebas, dikarenakan fenolik glikosida lebih stabil dan tidak reaktif sehingga lebih sukar berikatan dengan radikal bebas [7]. Oleh karena itu, perlu dilakukan degradasi pada fenolik glikosida menjadi fenolik bebas agar aktivitas antioksidannya dapat ditingkatkan. Salah satu cara peningkatan fenolik bebas adalah dengan proses fermentasi.

Peningkatan total fenolik setelah proses fermentasi terjadi karena peran enzim β -

glukosidase yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat (BAL), seperti *L. plantarum* dan *L. acidophilus*. Enzim tersebut mampu menghidrolisis ikatan fenolik-glikosida menjadi fenolik bebas, sehingga dapat meningkatkan aktivitas antioksidan [8,9]. Hasil penelitian menunjukkan terjadi peningkatan fenolik sebesar 10,23 mg GAE/L dan peningkatan aktivitas antioksidan sebesar 6,53% setelah 48 jam pada fermentasi jus buah jambu mete menggunakan spesies *L. plantarum* [10], sedangkan [11] menemukan terjadi peningkatan total fenolik sebesar 0,0153 mg GAE/g dan peningkatan aktivitas antioksidan sebesar 5,1% setelah 48 jam pada fermentasi kulit buah huyou (buah sitrus dari China) dengan spesies BAL *L. plantarum* dan *L. acidophilus*.

Ikatan fenolik glikosidik juga dapat didegradasi oleh pH rendah. pH rendah berkorelasi dengan peningkatan total fenolik dan aktivitas antioksidan, yang disebabkan adanya degradasi ikatan glikosida, di mana senyawa fenolik terikat [12,13,14]. Fermentasi diketahui dapat menurunkan pH substrat, sehingga diharapkan dapat mendegradasi ikatan fenolik-glikosida untuk membebaskan fenolik terikat dan meningkatkan aktivitas antioksidan. Turunnya pH produk disebabkan semakin lama waktu fermentasi, semakin meningkat jumlah BAL yang akan mendegradasi pati menjadi glukosa, untuk dimetabolisme lebih lanjut menghasilkan asam laktat, sehingga tingkat keasaman substrat semakin meningkat [15].

Pada penelitian ini, dibuat minuman fermentasi sari kulit singkong. Minuman ini diharapkan berpotensi untuk dikembangkan sebagai minuman fungsional sumber antioksidan. Selama ini, penelitian terkait pemanfaatan kulit singkong sebagai minuman fungsional belum pernah dilakukan, padahal diketahui kulit singkong adalah sumber fenolik yang berpotensi sebagai antioksidan. Namun adanya senyawa fenolik yang pada umumnya masih terikat dalam bentuk fenolik-glikosida menyebabkan aktivitas antioksidan belum maksimal sehingga diperlukan proses fermentasi untuk meningkatkan fenolik bebas dan meningkatkan aktivitas antioksidan.

Fermentasi minuman sari kulit singkong pada penelitian ini dilakukan dengan kultur starter *L. plantarum* B1765 selama 0, 12, 24, 36, 48, dan 60 jam. *L. plantarum* B1765 diketahui mampu menghasilkan aktivitas enzim β -glukosidase sebesar 0,868 U/mL [16]. Selain itu, *L. plantarum*

B1765 juga telah dibuktikan mampu meningkatkan aktivitas antioksidan dari substrat yang mengandung senyawa fenolik-glikosida, seperti pada bawang putih tunggal [17] dan ekstrak bengkuang [18]. Dengan demikian, pada penelitian ini akan dikaji pengaruh fermentasi minuman sari kulit singkong dengan kultur starter BAL *L. plantarum* B1765 terhadap total BAL, pH, TAT, total fenolik, dan aktivitas antioksidan. Pengujian-pengujian tersebut dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui potensi kulit singkong sebagai minuman fungsional yang berkhasiat sebagai antioksidan.

METODE PENELITIAN

Bahan

Beberapa bahan yang digunakan pada penelitian ini: *L. plantarum* B1765 yang merupakan koleksi pribadi hasil isolasi dari olahan ikan fermentasi (bekasam) [19], MRS Broth (Merck), aquades, gula pasir, serbuk agar white plain (Satelit), alkohol 70% (Onemed), NaCl (Pudak), CaCO_3 , Na_2CO_3 (Pudak), asam galat (Sigma-Aldrich), indikator phenolphthalein, metanol (Merck), NaOH (Merck), reagen Folin-Ciocalteu (Merck), DPPH (Merck), dan kulit singkong dari proses pengolahan singkong di industri rumah tangga tape singkong di Desa Melirang, Gresik, Jawa Timur, Indonesia.

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah: peralatan gelas, neraca analitik (Denver Instrument), *laminar air flow* (Thermo Scientific 1300 Series A2), pembakar spiritus, korek api, mikropipet dan *blue tip* (Eppendorf), buret, statif, erlenmeyer, labu ukur, *autoclave* (Hirayama HVE-50), inkubator (Memmert), sentrifugator (Eppendorf), *rotary evaporator* (Buchi), botol semprot, pisau, talenan, botol kaca steril, pH meter (Eutech), dan pipet tetes.

Prosedur Penelitian

Persiapan Kultur Starter

Stok *L. plantarum* B1765 sebanyak 1 mL diinokulasi ke dalam 9 mL MRS Broth yang sudah disterilkan, dan diinkubasi selama 20 jam pada suhu 37°C. Kultur yang berhasil tumbuh dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 5 menit. Supernatan yang dihasilkan didekantasi, dan pelet disuspensi ke dalam larutan steril NaCl 0,85%. Kemudian

dilakukan sentrifugasi kembali untuk memisahkan MRS broth. Pelet yang dihasilkan disuspensi kembali ke dalam larutan steril NaCl 0,85% dan divortex untuk digunakan sebagai kultur starter [20].

Pembuatan Minuman Fermentasi Sari Kulit Singkong

Pembuatan minuman fermentasi sari kulit singkong pada penelitian ini dilakukan dengan mengikuti metode yang digunakan [21] yang telah dimodifikasi. Kulit singkong bagian dalam yang berwarna putih dicuci dengan air mengalir dan direndam selama 24 jam. Selanjutnya, sebanyak 400 gram kulit singkong dipotong kecil-kecil dan dilakukan *blanching* dengan aquades pada suhu $\pm 85^\circ\text{C}$ selama 30 menit. Kulit singkong ditiriskan, dan diblender bersama aquades dengan perbandingan 1:4 (v/v) hingga halus. Kulit singkong halus kemudian dishaker pada 150 rpm selama 1 jam, lalu disaring. Filtrat ekstrak kulit singkong ditambahkan gula sebanyak 10% (w/v), kemudian dibagi sebanyak ± 250 mL ke dalam masing-masing wadah steril yang telah diberi label, dan dipasteurisasi pada suhu 85 °C selama 15 menit. Sari kulit singkong kemudian didiamkan hingga mencapai suhu ruang, dan ditambahkan *L. plantarum* B1765 sebanyak 5% (v/v), kemudian diinkubasi selama 0, 12, 24, 36, 48, dan 60 jam pada suhu 37 °C.

Penentuan Total Bakteri Asam Laktat (BAL)

Penentuan total BAL dilakukan dengan metode *Total Plate Count*. Sampel minuman sari kulit singkong fermentasi diencerkan dengan NaCl 0,85% pada nilai pengenceran 10^{-4} – 10^{-8} . Hasil pengenceran dimasukkan sebanyak 1 mL (1000 μL) ke dalam cawan petri dengan bantuan mikropipet. Selanjutnya media agar MRS yang telah ditambah dengan 1% CaCO_3 dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak ± 15 mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Total BAL yang terhitung merupakan koloni bakteri yang menghasilkan zona bening di sekitarnya, yang dinyatakan dalam log CFU/mL [22].

Pengukuran pH dan Total Asam Titrasi

Penentuan nilai pH dilakukan dengan ± 20 mL sampel yang ditempatkan di gelas beaker dan diukur pH-nya dengan pH meter yang telah dikalibrasi. Penentuan TAT dilakukan dengan metode titrasi asam-basa, dan dinyatakan sebagai presentasi asam laktat. Sampel minuman

fermentasi sari kulit singkong diencerkan pada nilai pengenceran 10 kali, dan diambil sebanyak 20 mL untuk dititrasi dengan NaOH 0,1 N dengan bantuan indikator fenolftalein (pp), hingga terjadi perubahan menjadi warna merah muda [23].

Pengukuran Kadar Total Fenolik

Pengukuran kadar total fenolik ditentukan menggunakan metode Folin-Ciocalteu, yang didasarkan pada kurva absorbansi dari larutan asam galat. Preparasi sampel dilakukan dengan melarutkan 10 mg konsentrat sampel minuman fermentasi sari kulit singkong dalam 10 mL metanol. Selanjutnya ke dalam 0,5 mL ekstrak sampel dalam metanol tersebut ditambahkan 2,5 mL reagen Folin-Ciocalteu 10%, divortex, dan didiamkan selama 4-8 menit. Selanjutnya ditambahkan 2 mL larutan Na_2CO_3 7,5%, divortex, dan diinkubasi dalam ruang gelap pada suhu ruang selama 30 menit. Prosedur yang sama dilakukan untuk asam galat dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum (747 nm). Kurva regresi absorbansi larutan standar digunakan untuk menentukan konsentrasi total fenolik dalam sampel, yang dinyatakan dalam mg/g ekuivalen asam galat (mg GAE/g) [5].

Penentuan Aktivitas Antioksidan

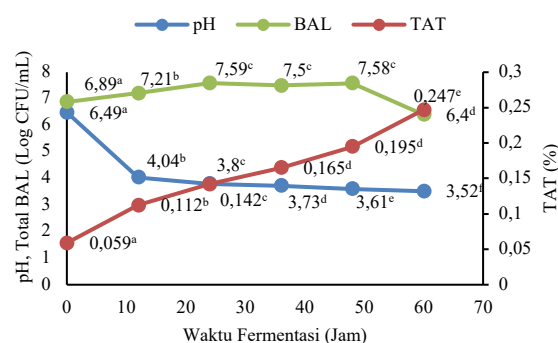
Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode penangkalan radikal bebas DPPH. Sebanyak 10 mg konsentrat minuman fermentasi sari kulit singkong dilarutkan dalam 10 mL metanol, kemudian diencerkan menjadi beberapa konsentrasi, yaitu 20, 40, 80, 160, dan 320 ppm. Sebanyak 2 mL dari tiap seri konsentrat larutan sampel ditambahkan 1 mL larutan DPPH 40 ppm, divortex, dan diinkubasi selama 30 menit di ruangan gelap. Absorbansi larutan sampel diukur pada panjang gelombang maksimum (516 nm). Selanjutnya, nilai IC_{50} dapat dihitung dengan membuat kurva regresi dari persentase inhibisi DPPH dari beberapa konsentrasi sampel yang telah ditetapkan [24].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Total BAL, pH, dan TAT

Data pengujian Total BAL, pH dan TAT dimaksudkan untuk dapat mengetahui karakteristik mutu produk minuman fermentasi sari kulit singkong. Hasil analisis data total BAL,

pH, dan TAT ditampilkan pada Gambar 1. Berdasarkan hasil uji ANOVA, lama waktu fermentasi memberikan pengaruh nyata terhadap nilai pH dan total BAL minuman fermentasi sari kulit singkong. Uji lanjutan *Post Hoc* LSD pada nilai pH menunjukkan perbedaan yang signifikan pada lama fermentasi 0-60 jam. Uji lanjutan *Post Hoc* LSD pada total BAL menunjukkan perbedaan yang signifikan pada lama fermentasi 0, 12, 24, dan 60 jam, namun tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan pada rentang lama fermentasi 24-48 jam. Data TAT yang diperoleh merupakan data yang tidak berdistribusi normal dan homogen, sehingga dilakukan analisis statistik berupa uji Kruskal Wallis dengan uji lanjutan Mann-Whitney. Hasil uji Kruskal Wallis ($p < 0,05$) menunjukkan bahwa lama waktu fermentasi memberikan pengaruh nyata terhadap nilai TAT. Uji lanjutan Mann-Whitney ($p < 0,05$) menunjukkan perbedaan yang signifikan pada lama fermentasi 0, 12, 24, 36, dan 60 jam, namun tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan pada waktu fermentasi 36-48 jam.



Gambar 1. Total BAL, pH, dan TAT selama waktu fermentasi minuman sari kulit singkong

Ket: Huruf berbeda di belakang angka menunjukkan beda nyata ($p < 0.05$)

Gambar 1 menyajikan keterkaitan antara total BAL, pH, dan TAT. Dari Gambar 1 dapat diketahui bahwa terjadi peningkatan total BAL yang diikuti oleh penurunan nilai pH dan peningkatan TAT. Peningkatan total BAL pada rentang waktu fermentasi 0-24 jam, yaitu meningkat dari 7.89×10^6 CFU/mL (6.89 log CFU/mL) menjadi 4.34×10^7 CFU/mL (7.59 log CFU/mL). Pada waktu tersebut merupakan fase eksponensial di mana terjadi peningkatan total BAL sebanyak 1 log cycle. Peningkatan total BAL yang cukup pesat pada fase ini terjadi karena

keberadaan nutrisi yang masih melimpah sehingga dapat digunakan bakteri pada proses metabolismenya untuk memperbanyak diri. Peningkatan total BAL pada penelitian ini didukung oleh penelitian terdahulu yang menggunakan BAL *L. plantarum* B1765 sebagai kultur starter. Dari penelitian [25], terjadi peningkatan total BAL sebanyak 1 log *cycle* pada fermentasi ekstrak tomat selama 24 jam, sedangkan [26] menyatakan terjadi peningkatan total BAL sebanyak 2 log *cycle* pada fermentasi ekstrak ubi jalar ungu selama 12 jam, serta dari penelitian [18], terjadi peningkatan 4 log *cycle* pada fermentasi ekstrak bengkuang selama 12 jam. Peningkatan total BAL pada penelitian ini tidak sebanyak peningkatan total BAL yang terjadi pada fermentasi sari ubi jalar ungu dan ekstrak bengkuang, dikarenakan kandungan nutrisi berupa pati atau polisakarida lainnya yang ada di dalam substrat kulit singkong lebih rendah dibandingkan pada dan ubi jalar ungu dan bengkuang, sehingga kurang untuk pertumbuhan *L. plantarum* B1765.

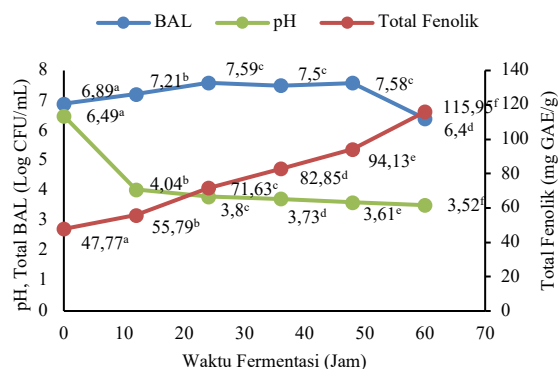
Setelah terjadi peningkatan total BAL pada fase eksponensial, total BAL selanjutnya cenderung tidak mengalami perubahan pada rentang lama fermentasi 24-48 jam. Pada fase tersebut merupakan fase stasioner, di mana produksi dan kematian bakteri mencapai titik keseimbangan. Fase pertumbuhan bakteri yang terakhir merupakan fase kematian, di mana di fase ini nutrisi yang dibutuhkan bakteri untuk tetap hidup habis, sehingga bakteri mengalami penurunan dan kematian drastis [27]. Fase kematian pada penelitian ini terjadi pada waktu fermentasi 60 jam yang ditandai dengan penurunan total BAL sebanyak 1 log *cycle*, dari 4.91×10^7 CFU/mL (7.58 log CFU/mL) pada waktu fermentasi 48 jam menjadi 2.68×10^6 CFU/mL (6.4 log CFU/mL) pada waktu fermentasi 60 jam.

Kenaikan total BAL yang terjadi berkaitan dengan kenaikan kadar TAT dan penurunan pH. Pada penelitian ini, peningkatan kadar TAT terjadi dari 0.059% hingga 0.247% seiring lamanya waktu fermentasi. Peningkatan kadar TAT tersebut berbanding terbalik dengan nilai pH yang semakin menurun dari 6.49 pada 0 jam hingga 3.52 pada 60 jam. Peningkatan TAT dan penurunan pH tersebut berhubungan dengan metabolisme yang dialami BAL *L. plantarum* B1765. *L. plantarum* B1765 merupakan BAL fakultatif heterofermentatif, di mana pada proses metabolismenya dapat menghasilkan asam laktat dan asam organik lainnya [28]. Selama fase

eksponensial pertumbuhan bakteri, terjadi perombakan nutrisi berupa pati atau polisakarida lainnya menjadi glukosa oleh enzim α -amilase yang dihasilkan oleh BAL *L. plantarum* [29]. Glukosa tersebut selanjutnya digunakan pada proses metabolisme bakteri melalui jalur glikolisis menghasilkan asam laktat dan asam organik lainnya, sehingga pada fase ini pula terjadi penurunan pH yang cukup drastis. Jika dibandingkan dengan standar yang digunakan untuk minuman fermentasi yang tercantum pada SNI [30], total BAL pada penelitian ini mencapai 4.91×10^7 CFU/mL pada waktu fermentasi 48 jam, yang telah melampaui standar dengan nilai minimum 1×10^6 CFU/mL. Begitu pula kadar TAT pada penelitian ini dengan nilai tertinggi 0.247% pada waktu fermentasi 60 jam yang sudah mencapai kisaran standar yang berlaku, yaitu 0.2-0.9%.

Total Fenolik

Penentuan kadar total fenolik dimaksudkan untuk mengetahui kadar fenolik bebas yang dihasilkan selama proses fermentasi. Berdasarkan hasil uji ANOVA, lama waktu fermentasi memberikan pengaruh nyata terhadap kandungan total fenolik pada sampel minuman sari kulit singkong fermentasi. Uji lanjutan *Post Hoc* LSD yang dilakukan menunjukkan perbedaan yang signifikan pada lama fermentasi 0-60 jam.



Gambar 2. Total BAL, pH, dan total fenolik selama waktu fermentasi minuman sari kulit singkong

Ket: Huruf berbeda di belakang angka menunjukkan beda nyata ($p < 0.05$)

Gambar 2 menyajikan keterkaitan antara total BAL, pH, dan total total fenolik selama fermentasi sampel minuman sari kulit singkong. Terjadi peningkatan total BAL diikuti dengan

penurunan pH dan peningkatan total fenolik selama proses fermentasi. Pada fase eksponensial terjadi peningkatan total BAL, penurunan pH, dan peningkatan total fenolik. Peningkatan total fenolik terjadi dari 47.77 mg GAE/g pada 0 jam hingga mencapai nilai 71.63 mg GAE/g pada 24 jam fermentasi yang merupakan puncak eksponensial. Pada fase eksponensial pertumbuhan bakteri, terjadi produksi enzim α -amilase oleh BAL yang mampu merombak pati menjadi glukosa [29]. Total BAL yang meningkat pesat pada fase ini mampu mendegradasi pati menjadi glukosa, untuk dimetabolisme lebih lanjut menghasilkan asam laktat dan asam organik lainnya, sehingga tingkat keasaman substrat semakin meningkat [15]. pH yang rendah diketahui mampu mendegradasi ikatan fenolik-glikosida menghasilkan molekul gula bebas dan fenolik aglikon, sehingga menambah keberadaan fenolik bebas yang ada dalam sampel [31]. [6] menyatakan bahwa senyawa fenolik pada tanaman secara alami berikatan dengan gula sederhana dalam bentuk glikosida. Dalam kulit singkong, senyawa fenolik glikosida yang telah diketahui, seperti 1-O-dihidrokafeoil gliserol, asam ferulat glukosida, dan asam klorogenat [32]. Penurunan pH produk menyebabkan terjadinya degradasi ikatan fenolik-glikosida pada minuman sari kulit singkong menjadi fenolik bebas pada fase eksponensial ini.

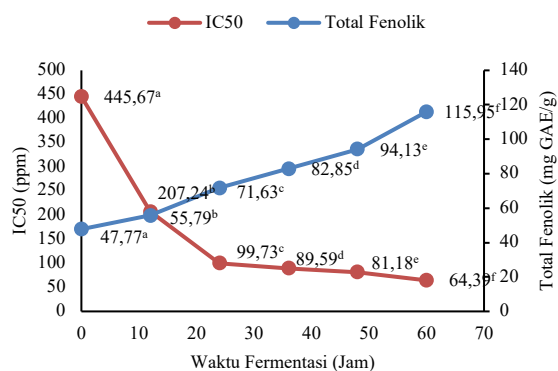
Dari Gambar 2 dapat dilihat bahwa peningkatan fenolik masih tetap terjadi pada fase stationer. Peningkatan total fenolik terjadi dari 71.63 mg GAE/g pada 24 jam hingga mencapai nilai 94.13 mg GAE/g pada 48 jam fermentasi. Pada fase stationer ini, pelepasan fenolik bebas terjadi karena peran enzim β -glukosidase yang mampu menghidrolisis ikatan fenolik-glikosida menjadi fenolik bebas [8,9]. Diketahui enzim β -glukosidase dapat diproduksi oleh sejumlah BAL secara maksimal di fase stationer [33]. BAL *L. plantarum* B1765 telah dibuktikan mampu menghasilkan aktivitas enzim β -glukosidase [16]. Pada fase ini, walaupun BAL telah mengalami fase stationer namun pH masih tetap menurun, sehingga diduga juga tetap berperan dalam meningkatkan jumlah fenolik bebas pada fase stationer ini. Sementara pada fase kematian, peningkatan total fenolik masih terjadi, dikarenakan substrat yang memiliki pH rendah dan enzim β -glukosidase yang masih bekerja meskipun total BAL sudah mengalami penurunan. Peningkatan total fenolik terjadi dari awal hingga

akhir proses fermentasi, dengan total fenolik tertinggi dicapai di akhir fermentasi yaitu pada waktu 60 jam, dengan total fenolik mencapai 115.95 mg GAE/g.

Peningkatan total fenolik pada penelitian ini didukung penelitian-penelitian yang telah dilakukan sebelumnya. Dari penelitian [10], terjadi peningkatan total fenolik pada jus buah jambu mete sebanyak 10.23 mg GAE/L setelah 48 jam fermentasi menggunakan BAL *L. plantarum*, dari penelitian [11], terjadi peningkatan total fenolik pada kulit buah huyou sebanyak 0.0153 mg GAE/g setelah 48 jam fermentasi menggunakan BAL *L. plantarum* dan *L. acidophilus*, serta dari penelitian [18], terjadi peningkatan total fenolik pada ekstrak bengkuang sebanyak 23.09 mg GAE/g setelah 36 jam fermentasi menggunakan BAL *L. plantarum* B1765. Peningkatan total fenolik pada penelitian ini mencapai 35.08 mg GAE/g setelah 36 jam fermentasi, lebih tinggi dibandingkan fermentasi ekstrak bengkuang oleh [18] dengan waktu fermentasi, jenis, dan konsentrasi BAL yang sama. Perbedaan peningkatan total fenolik ini dikarenakan kadar fenolik pada minuman sari kulit singkong di awal fermentasi yaitu sebesar 47.77 mg GAE/g, lebih tinggi dibandingkan kadar fenolik ekstrak bengkuang di awal fermentasi yang sebesar 17.17 mg GAE/g. Dengan demikian, peningkatan kadar total fenolik yang lebih tinggi pada penelitian ini diduga karena kandungan senyawa fenolik pada kulit singkong yang lebih tinggi sehingga lebih banyak senyawa fenolik yang dapat dibebaskan.

Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan pada penelitian ini dinyatakan dalam IC_{50} yang menyatakan konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat aktivitas radikal bebas DPPH sebesar 50%. Berdasarkan hasil uji ANOVA, lama waktu fermentasi minuman sari kulit singkong memberikan pengaruh nyata terhadap nilai IC_{50} . Uji lanjutan *Post Hoc* LSD yang dilakukan menunjukkan perbedaan yang signifikan pada lama fermentasi 0-60 jam.



Gambar 2. Nilai IC₅₀ dan total fenolik selama waktu fermentasi minuman sari kulit singkong

Ket: Huruf berbeda di belakang angka menunjukkan beda nyata ($p < 0.05$)

Gambar 3 menjelaskan keterkaitan antara total fenolik dan aktivitas antioksidan selama fermentasi sampel minuman sari kulit singkong. Peningkatan total fenolik sejalan dengan peningkatan aktivitas antioksidan seiring bertambahnya waktu fermentasi, yang ditandai dengan semakin menurunnya nilai IC₅₀. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin tinggi aktivitas antioksidan [34]. Pada penelitian ini, waktu fermentasi 0 jam memiliki aktivitas antioksidan terkecil dengan nilai IC₅₀ sebesar 445.67 ppm, dan terus mengalami kenaikan hingga waktu fermentasi 60 jam yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dengan nilai IC₅₀ sebesar 64.39 ppm.

Peningkatan antioksidan berkorelasi dengan peningkatan total fenolik selama proses fermentasi, dikarenakan senyawa fenolik yang merupakan konstituen utama yang berperan terhadap aktivitas antioksidan [3]. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa proses fermentasi dapat meningkatkan total fenolik yang sejalan dengan peningkatan aktivitas antioksidannya. Dari penelitian [10], terjadi kenaikan total fenolik sebesar 10.23 mg GAE/L diikuti peningkatan persentase inhibisi DPPH sebanyak 6.53% pada jus buah jambu mete setelah fermentasi dengan BAL *L. plantarum* selama 48 jam. Dari penelitian [11], terjadi kenaikan total fenolik sebesar 0.0153 mg GAE/g diikuti peningkatan persentase inhibisi DPPH sebesar 5.1% pada kulit buah huyou setelah fermentasi selama 48 jam menggunakan BAL *L. plantarum* dan *L. acidophilus*. Dari penelitian [18], terjadi kenaikan total fenolik sebesar 23.09 mg GAE/g

yang diikuti peningkatan aktivitas antioksidan dengan menurunnya nilai IC₅₀ sebanyak 59.24 ppm pada ekstrak bengkuang setelah fermentasi dengan *L. plantarum* B1765 selama 36 jam.

Dari penelitian ini, didapatkan peningkatan aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 445.67 ppm pada waktu fermentasi 0 jam yang merupakan antioksidan sangat lemah, meningkat sebanyak 381.28 ppm, menjadi 64.39 ppm pada waktu fermentasi 60 jam dengan kategori sebagai antioksidan kuat. Suatu senyawa dapat dikategorikan sebagai antioksidan sangat kuat (IC₅₀ < 50 ppm), antioksidan kuat (IC₅₀ sebesar 50-100 ppm), antioksidan sedang (IC₅₀ sebesar 100-150 ppm), antioksidan lemah (IC₅₀ sebesar 150-200 ppm), dan antioksidan sangat lemah (IC₅₀ > 200 ppm) [34].

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa lama fermentasi mempengaruhi peningkatan Total BAL, TAT, total fenolik, aktivitas antioksidan, serta penurunan pH minuman fermentasi sari kulit singkong. Total BAL meningkat optimal mencapai 4.91×10^7 CFU/mL pada 48 jam fermentasi, sedangkan penurunan pH dan peningkatan TAT, total fenolik, dan aktivitas antioksidan maksimum tercapai hingga fermentasi 60 jam, dengan pH terendah mencapai 3.52, TAT 0.247%, total fenolik 115.948 mg GAE/g, dan nilai IC₅₀ 64.392 ppm yang termasuk antioksidan kuat. Lama fermentasi terbaik dari hasil penelitian ini adalah 60 jam, yang menghasilkan minuman fermentasi sari kulit singkong dengan aktivitas antioksidan terbaik dan telah memenuhi Standar Nasional Indonesia sebagai minuman fermentasi, sehingga berpotensi untuk dikembangkan sebagai minuman fungsional sumber antioksidan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis berterimakasih kepada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Surabaya, atas dukungannya dalam keberlangsungan penelitian ini. Penulis juga berterimakasih kepada tim penelitian Pangan Fungsional Program Studi S1 Kimia Universitas Negeri Surabaya atas masukan dan kontribusinya dalam kegiatan di laboratorium dan analisis data.

DAFTAR PUSTAKA

1. Pusdatin. 2020. *Outlook Ubi Kayu: Komoditas Pertanian Subsektor Tanaman Pangan*. Jakarta: Pusdatin Sekretariat Jenderal Kementerian Pertanian.
2. Gagola, C., Suryanto, E., Wewengkang, D. 2014. Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Fenolik Cortex Umbi Ubi Kayu (*Manihot esculenta*) Daging Putih dan Daging Kuning yang diambil dari Kota Melonguane Kabupaten Kepulauan Talaud. *Pharmakon Jurnal Ilmiah Farmasi*, 3(2), 127-133.
3. Yi, B., Hu, L., Mei, W., Zhou, K., Wang, H., Luo, Y., Wei, X., Dai, H. 2011. Antioxidant Phenolic Compounds of Cassava (*Manihot esculenta*) from Hainan. *Mollucules*, 16(12), 10157-10167.
4. Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., Abete, P. 2018. Oxidative Stress, Aging, and Diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13, 757-772.
5. Ekeledo, E., Latif, S., Abass, A., Müller, J. 2021. Antioxidant Potential of Extracts from Peels and Stems of Yellow-fleshed and White Cassava Varieties. *International Journal of Food Science and Technology*, 56(3), 1333-1342.
6. Johnson, J. B., Mani, J. S., Broszczak, D., Prasad, S. S., Ekanayake, C. P., Strappe, P. P., Naiker, M. 2021. Hitting the Sweet Spot: A Systematic Review of the Bioactivity and Health Benefits of Phenolic Glycosides from Medicinally Used Plants. *Phytotherapy Research: PTR*, 35(7), 3484-3508.
7. Khoo, H., Azlan, A., Tang, S., Lim, T. 2017. Anthocyanidins and Anthocyanins: Colored Pigments as Food, Pharmaceutical Ingredients, and The Potential Health Benefits. *Food Nutr Res.*, 61(1).
8. Nisa, K., Rosyida, V. T., Nurhayati, S., Indrianingsih, A. W., Darsih, C., Apriyana, W. 2019. Total Phenolic Contents and Antioxidant Activity of Rice Bran Fermented with Lactic Acid Bacteria. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 251(1).
9. Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y. C., Choi, I., Kim, G. B. 2014. Effect of Fermentation on the Antioxidant Activity in Plant-based Foods. *Food Chemistry*, 346-356.
10. Kaprasob, R., Kerdchoechueno, O., Laohakunjit, N., Sarkar, D. 2017. Fermentation-based Biotransformation of Bioactive Phenolics and Volatile Compounds from Cashew Apple Juice by Select Lactic Acid Bacteria. *Process Biochemistry*, 1-9.
11. He, Y., Zhu, Y., Lv, J., Gu, Y., Wang, T., Chen, J. 2023. Effects of Lactic Acid Bacteria Fermentation on the Bioactive Composition, Volatile Compounds and Antioxidant Activity of Huyou (*Citrus aurantium* 'Changshan-Huyou') Peel and Pomace. *Food Quality and Safety*, 7, 1-13.
12. Nguyen, T., Nandasiri, R., Fadairo, O., Eskin, M. 2023. The Effect of pH on the Phenolic Content and Antioxidant Properties of Three Different Mustard Extracts. *Journal of Food Science*, 88(7), 2882-2901.
13. Chen, Y. T., Kao, W. T., Lin, K. W. 2008. Effects of pH on the Total Phenolic Compound, Antioxidative Ability and the Stability of Dioscorin of Various Yam Cultivars. *Food Chemistry*, 107(1), 250-257.
14. Kim, K. H., Tsao, R., Yang, R., Cui, S. 2006. Phenolic Acid Profiles and Antioxidant Activities of Wheat Bran Extracts and the Effect of Hydrolysis Conditions. *Food Chemistry*, 95(3), 466-473.
15. Fu, Y., Sun, X., Zhu, H., Jiang, R., Luo, X., Yin, L. 2018. An Optimized Fed-batch Culture Strategy Integrated with A One-step Fermentation Improves L-lactic Acid Production by *Rhizopus oryzae*. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 34(6), 74.
16. Huda, M., dan Wikandari, P. R. 2016. Penentuan Aktivitas β -Glukosidase pada Fermentasi Sari Kedelai dengan Kultur Starter *Lactobacillus plantarum* B1765. *UNESA Journal of Chemistry*, 5(2), 83-88.
17. Wikandari, P. R., Yuanita, L., Herdyastuti, N., Bimo, H. J., Juniariani, R. E., Cahyaningtyas, F. D. 2020. Antioxidant Properties of Single Garlic (*Allium sativum*) Pickle. *Digital Press Life Sciences*, 2, 00006.
18. Aji, A. P., dan Wikandari, P. R.. 2024. Antioxidant Potential of Jicama (*Pachyrhizus erosus*) Extract Fermented by *Lactobacillus plantarum* B1765. *Jurnal Pijar MIPA*, 19(1), 162-167.
19. Wikandari, P. R., Suparmo, Marsono, Y., Rahayu, E. S. 2012. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Proteolitik pada Bekasam. *Jurnal Natur Indonesia*, 12(2), 120-125.

20. Montijo-Prieto, S. D., Razola-Diaz, M. C., Barbieri, F., Tabaneli, G., Gardini, F., Jimenez-Valera, M., Ruiz-Bravo, A., Verardo, V., Gomez-Caravaca, A. M. 2023. Impact of Lactic Acid Bacteria Fermentation on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Avocado Leaf Extraxts. *Antioxidants*, 12(2), 1-17.
21. Wijayanti, A. A., dan Wikandari, P. R. 2023. Potency of Fermented Jicama Extract Cultured with *Lactobacillus plantarum* B1765 for Producing Short Chain Fatty Acid. *Jurnal Pijar MIPA*, 18(5), 822-828.
22. Mailoa, M., Tapotubun, A., Matruty, T. 2017. Analysis Total Plate Count (TPC) on Fresh Steak Tuna Applications Edible Coating *Caulerpa sp* during Stored at Chiling Temperature. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 89(1).
23. AOAC. 2005. *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists*. Virginia: Association of Analytical Chemists.
24. Suwarni, E., dan Cahyadi, K. D. 2016. Aktivitas Antiradikal Bebas Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang (*Etlingera elatior*) dengan Metode DPPH. *Jurnal Ilmiah Medicamento*, 2(2), 39-46.
25. Febriana, E., dan Wikandari, P. R. 2022. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Karakteristik Minuman Probiotik Sari Tomat dengan Kultur Starter *L. plantarum* B1765. *UNESA Journal of Chemistry*, 11(2), 123-135.
26. Junaidi, A., dan Wikandari, P. R. 2020. Pengaruh Lama Fermentasi Ekstrak Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas*) dengan *Lactobacillus plantarum* B1765 terhadap Mutu Minuman Fermentasi. *UNESA Journal of Chemistry*, 9(1), 77-82.
27. Pelczar, M. J., dan Chan, E. C. S. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press.
28. Suryono, I. A., dan Wikandari, P. R. 2019. Profil Produksi Short Chain Fatty Acids dan Asam Laktat dari Fermentasi Yakon (*Smallanthus sonchifollius*) dengan Bakteri Kultur Starter *Lactobacillus plantarum* B1765. *UNESA Journal of Chemistry*, 8(2), 92-97.
29. Hattingh, M., Alexander, A., Meijering, I., Van Reenen, C., Dicks, L. 2015. Amylolytic Strains of *Lactobacillus plantarum* Isolated from Barley. *African Journal of Biotechnology*, 14(4), 310-318.
30. BSN. 2009. *Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Minuman Susu Fermentasi Berperisa No. 7552:2009*. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
31. Tsao, R. 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.
32. Rodrigues, C. G., Silva, V. D. M., Loyola, A., Silva, M., Augusti, R., Melo, J., Carlos, L., Fante, C. 2022. Characterization and Identification of Bioactive Coumpounds in Agro-Food Waste Flours. *Quimica Nova*, 45(4), 403-409.
33. Sohail, M., Siddiqi, R., Ahmad, A., Khan, S. A. 2009. Cellulase Production from *Aspergillus niger* MS82: Effect of Temperature and pH. *New Biotechnology*, 25(6), 437-441.
34. Badarinath, A., Rao, K., Chetty, C. S., Ramkanth, S., Rajan, T., Gnanaprakash, K. 2010. A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations, and Considerations. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), 1276-1285.