



**EKSTRAKSI DAN KARAKTERISASI LUNATIN DARI KORO KRATOK**  
*(Phaseolus lunatus L.)*

**SKRIPSI**

Oleh

**Aisyah Fridannisa**  
**NIM 161710101128**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN**  
**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN**  
**UNIVERSITAS JEMBER**  
**2020**



**EKSTRAKSI DAN KARAKTERISASI LUNATIN DARI KORO KRATOK**  
*(Phaseolus lunatus L.)*

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Teknologi Hasil Pertanian (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Teknologi Pertanian

Oleh

**Aisyah Fridannisa**  
**NIM 161710101128**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN**  
**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN**  
**UNIVERSITAS JEMBER**  
**2020**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini penulis persembahkan untuk:

1. Allah SWT. yang selalu memberikan rahmat, hidayah, serta kekuatan dalam setiap langkah yang penulis tempuh, terutama dalam proses pelaksanaan penelitian skripsi hingga selesai;
2. Ayahanda Ujang Komarudin dan Ibunda Elis Miliarsih yang selalu dengan sabar membimbing dan mengarahkan untuk menjadi pribadi yang lebih baik dalam menjalani kehidupan, selalu mendoakan dalam setiap sujudnya, dan selalu memberikan kasih sayang yang tiada henti serta pengorbanan yang besar selama ini;
3. Saudara penulis, Muhammad Fajruramdhan, yang secara tidak langsung selalu memberikan motivasi supaya penulis dapat menjadi sosok kakak yang baik dan dapat diteladani;
4. Guru-guru penulis dari TK Aisyiyah Jepara, Sekolah Indonesia Bangkok, SD Muhammadiyah Jepara, SMP PKPU Aceh Besar, SMA Modal Bangsa Aceh, seluruh dosen dari Fakultas Teknologi Pangan Universitas Mataram dan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember, serta seluruh *sensei* dari *Prefectural University of Hiroshima* yang telah memberikan ilmu serta membimbing dengan penuh kesabaran dan keikhlasan;
5. Seluruh saudara seperjuangan dan seangkatan, serta teman-teman lain yang selalu membantu dalam proses penyelesaian tugas akhir ini;
6. Almamater tercinta, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

**MOTTO**

“Nothing is impossible; the word itself says ‘I’m possible’.”

(Audrey Hepburn)

“You are a masterpiece. You are perfect the way you are.”

(Im Nayeon - One in a Million)

“I am eccentric and I’m fine with being different. I’ll pass on being average, just let me be myself. I refuse to change my color to suit everyone like a chameleon.”

(Keyakizaka46 - Eccentric)

“There's always gonna be another mountain. I'm always gonna make it move. Always gonna be an uphill battle. Sometimes I'm gonna have to lose. Ain't about how fast I get there. Ain't about what's waiting on the other side. It's the climb.”

(Miley Cyrus - The Climb)

“Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain). Dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap.” (QS. Al-Insyirah: 6-8)

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Aisyah Fridannisa

NIM : 161710101128

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Ekstraksi dan Karakterisasi Lunatin dari Koro Kratok (*Phaseolus lunatus* L.)” adalah hasil karya sendiri, terkecuali pada pengutipan substansi yang disebutkan sumbernya, belum pernah diajukan kepada institusi manapun, dan bukan merupakan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isi laporan ini sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 27 Desember 2019

Yang menyatakan,

Aisyah Fridannisa  
NIM 161710101128

**SKRIPSI**

**EKSTRAKSI DAN KARAKTERISASI LUNATIN DARI KORO KRATOK  
(*Phaseolus lunatus* L.)**

Oleh

Aisyah Fridannisa  
NIM 161710101128

Dosen Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Ahmad Nafi', S.TP., M.P.

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Maria Belgis, S.TP., M.P.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul "Ekstraksi dan Karakterisasi Lunatin dari Koro Kratok (*Phaseolus lunatus* L.)" karya Aisyah Fridannisa telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember pada:

hari/tanggal : Jum'at, 10 Januari 2020

tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

Ahmad Nafi, S.TP., M.P.  
NIP. 19780403 200312 1 003

Dr. Maria Belgis, S.TP., M.P.  
NIDN. 0027127806

Tim Penguji:

Ketua

Anggota

Dr. Ir. Sih Yuwanti, M.P.  
NIP. 19650708 199403 2 002

Ardivan Dwi Masahid, S.TP., M.P.  
NIP. 19850329 201903 1 011

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Teknologi Pertanian  
Universitas Jember

Dr. Siswovo Soekarno, S.TP., M.Eng.  
NIP. 19680923 199403 1 009

## RINGKASAN

**Ekstraksi dan Karakterisasi Lunatin dari Koro Kratok (*Phaseolus lunatus* L.);** Aisyah Fridannisa, 161710101128; 2019, 62 halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian; Universitas Jember.

Koro kratok (*Phaseolus lunatus* L.) merupakan salah satu tanaman berjenis kacang-kacangan yang memiliki nilai gizi yang cukup tinggi terutama pada kandungan protein (19,93-21,40%) dan serat (4,20-5,50%), serta rendah lemak (0,99-1,21%). Koro kratok juga mengandung lektin bernama lunatin yang merupakan zat antigizi, tetapi juga memiliki sifat fungsional sebagai antioksidan, antifungi, dan antiproliferatif. Kandungan zat antigizi pada koro kratok, termasuk lunatin, dapat dipengaruhi oleh proses pengolahan seperti perendaman, penggunaan suhu tinggi, dan fermentasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perbedaan olahan bahan baku berupa biji koro kratok kering yang dihancurkan, tepung koro kratok, dan *Modified Legume Flour* (MOLEF) koro kratok serta suhu ekstraksi (27°C, 40°C, dan 50°C) terhadap ekstrak lunatin yang diperoleh.

Penelitian ini diawali dengan mengolah koro kratok menjadi biji koro kratok kering yang dihancurkan, tepung koro kratok, dan MOLEF koro kratok. MOLEF koro kratok dihasilkan dari fermentasi koro kratok menggunakan bakteri *Lactobacillus plantarum*. Sebelum diekstraksi, terlebih dahulu dilakukan uji total kandungan protein pada masing-masing olahan bahan baku. Kemudian dilakukan ekstraksi menggunakan kombinasi tiga jenis variasi suhu ekstraksi yaitu 27°C, 40°C, dan 50°C terhadap ketiga jenis olahan bahan baku. Ekstrak protein yang dihasilkan kemudian dianalisis sifat fisik berupa berat molekul yang terkandung pada masing-masing sampel; serta sifat fungsional yang meliputi aktivitas antioksidan dan aktivitas antifungi. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua faktor (olahan bahan baku dan suhu ekstraksi). Data yang telah diperoleh diolah menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA), uji lanjut *Tukey*, dan uji *t* parsial untuk mengetahui secara spesifik perlakuan yang



memberikan perbedaan nyata. Hasil keseluruhan disajikan dalam bentuk tabel, grafik, dan histogram, kemudian data tersebut dianalisa secara deskriptif serta dikomparasi dengan studi literatur.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa total protein dalam biji koro kratok kering yang dihancurkan (23,18%) dan tepung koro kratok (24,20%) secara spesifik lebih tinggi daripada MOLEF koro kratok (17,12%); berat molekul lunatin yang terdeteksi sesuai dengan literatur adalah 30,25 kDa, dengan lebih banyak pita protein yang terdeteksi pada biji koro kratok kering yang dihancurkan daripada tepung dan MOLEF koro kratok; aktivitas antioksidan tertinggi dimiliki oleh ekstrak lunatin dari sampel A1B3 (biji koro kratok kering yang dihancurkan, ekstraksi 50°C) yaitu sebesar 83,58% dan aktivitas terendah dimiliki oleh ekstrak lunatin dari sampel A3B2 (MOLEF koro kratok, ekstraksi 40°C) yaitu sebesar 45,97%; variasi suhu secara umum tidak mempengaruhi perbedaan pita protein yang dapat terdeteksi dan aktivitas antioksidan; serta seluruh sampel ekstrak lunatin tidak menunjukkan aktivitas antifungi terhadap *Aspergillus niger*, hanya membentuk zona bening di sekitar kertas cakram.

## SUMMARY

**Extraction and Characterization of Lunatin from Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.);** Aisyah Fridannisa, 161710101128; 2019, 62 pages; Department of Agricultural Product Technology, Faculty of Agricultural Technology; University of Jember.

Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is one kind of legume with high nutrients such as protein (19.93-21.40%), fiber (4.20-5.50%), and low in fat (0.99-1.21%). Beside that, lima bean also contains lectin called lunatin. Despite its antinutrient property, lunatin also holds its functional properties such as antioxidant, antifungal, and antiproliferative. Antinutrient substances of lima bean, including lunatin, can be reduced by processing method such as soaking, the use of high temperature, and fermentation. This study aimed to determine the effect of three different processed materials which are dried crushed lima bean, lima bean flour, and lima bean Modified Legume Flour (MOLEF) combined with three states of extraction temperature (27°C, 40°C, and 50°C) on the lunatin extracts that were obtained.

This research was begun with the processing of lima bean into dried crushed lima bean, lima bean flour, and lima bean MOLEF. Lima bean MOLEF was processed by fermenting lima bean with *Lactobacillus plantarum*. Before the extraction process was held, the total protein contents the three different processed materials were being examined first. Then, the extraction was processed with the combination of three different states of extraction temperature (27°C, 40°C, and 50°C) on the three different processed materials. The protein extracts that were obtained after were analyzed respectively for its physical property (molecular weight), as well as its functional properties (antioxidant activity and antifungal activity). This research used Completely Randomized Design (CRD) with two factors (processed materials and extraction temperatures). The resulted data were statistically assayed by analysis of varian (ANOVA), Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) test, and partial t-test. The final data were provided

as tables, charts, and histograms, then analyzed descriptively, also compared to the previous literature studies.

The results showed that the total protein content on dried crude lima bean (23.18%) and lima bean flour (24.20%) specifically higher than lima bean MOLEF (17.12%); molecular weight of lunatin was likelihood 30.25 kDa (according to previous literature), with more protein nodes detected on dried crude lima bean than lima bean flour and MOLEF; the highest antioxidant activity was obtained by A1B3 lunatin extract (dried crushed lima bean with 50°C extraction temperature) with 83,58%, while the lowest antioxidant activity was obtained by A3B2 lunatin extract (lima bean MOLEF with 40°C extraction temperature) with 45,97%; the variation of extraction temperature did not specifically affected the protein nodes that detected and the antioxidant activity; lastly, all the lunatin extract samples did not evidence the antifungal activity on *Aspergillus niger*, just merely showed vague clear zone around the paper discs.

## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya yang telah memberikan kesehatan serta kekuatan baik lahir maupun batin sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul “Ekstraksi dan Karakterisasi Lunatin dari Koro Kratok (*Phaseolus lunatus* L.)” ini dengan baik. Tugas akhir ini disusun guna memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Pendidikan Strata Satu (S1) di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.

Penyusunan tugas akhir ini tidak lepas dari pengarahannya, bimbingan, dukungan, serta bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Siswoyo Soekarno, S.TP., M. Eng. selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember;
2. Dr. Ir. Jayus selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember;
3. Ahmad Nafi', S.TP., M.P. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dr. Maria Belgis, S.TP., M.P. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang selama ini telah dengan sabar, tulus, serta ikhlas meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran dalam memberikan masukan serta bimbingan demi kemajuan dan penyelesaian tugas akhir ini;
4. Dr. Ir. Sih Yuwanti, M.P. selaku Penguji Utama dan Ardiyan Dwi Masahid, S.TP., M.P. selaku Penguji Anggota. Terima kasih atas masukan serta kesediaannya sebagai penguji;
5. Segenap dosen, teknisi laboratorium, serta karyawan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember yang telah banyak membantu dalam proses penyelesaian tugas akhir ini;
6. Yoshino Tomoyuki-*sensei*, segenap *sensei* dan staf di *Prefectural University of Hiroshima*, teman-teman di *Food Microscopic Analysis Laboratory*, serta dosen-dosen dan teman-teman di Togo-cho yang selalu membimbing dan membantu proses penelitian tugas akhir ini;

7. Kedua orang tua, Ayahanda Ujang Komarudin dan Ibunda Elis Miliarsih, serta adik tersayang Muhammad Fajruramdhan yang selalu memberikan doa, semangat, motivasi, dan dukungan selama ini;
8. Teman-teman THP-A 2014 tercinta yang telah menerima penulis dengan hangat dan banyak membantu selama proses adaptasi pasca-transfer serta banyak memberikan masukan dalam penyusunan tugas akhir ini; serta adik-adik THP-C 2015 dan THP-C 2016 yang juga banyak membantu selama proses penyetaraan mata kuliah;
9. Teman-teman “*For Better Future*”, Adellia Sonia B. dan Ambar Sukma S., yang telah banyak bertukar pikiran, memberikan masukan dan semangat; serta Milanda Aisyah R., yang telah bersama-sama memperjuangkan penelitian ke PUH dan menjadi *circle* terdekat selama tinggal di Shobara;
10. Sahabat penulis, Laelatuzzahro, yang selalu bersedia mendengarkan keluh kesah apapun, selalu berbagi cerita, dan selalu ada; serta teman-teman “maya tapi nyata” yang selalu berbagi keceriaan dan mood baik;
11. Berbagai pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu oleh penulis karena telah banyak memberikan bantuan serta dukungan selama penelitian maupun penulisan tugas akhir ini sehingga dapat terselesaikan dengan baik.

Penulis menyadari bahwa karya ini masih jauh dari kata sempurna sehingga perlu adanya kritik dan saran yang bersifat membangun agar menjadi lebih baik. Penulis berharap semoga tugas akhir ini dapat bermanfaat dan menambah wawasan bagi pembaca sekalian.

Jember, 27 Desember 2019

Penulis

**DAFTAR ISI**

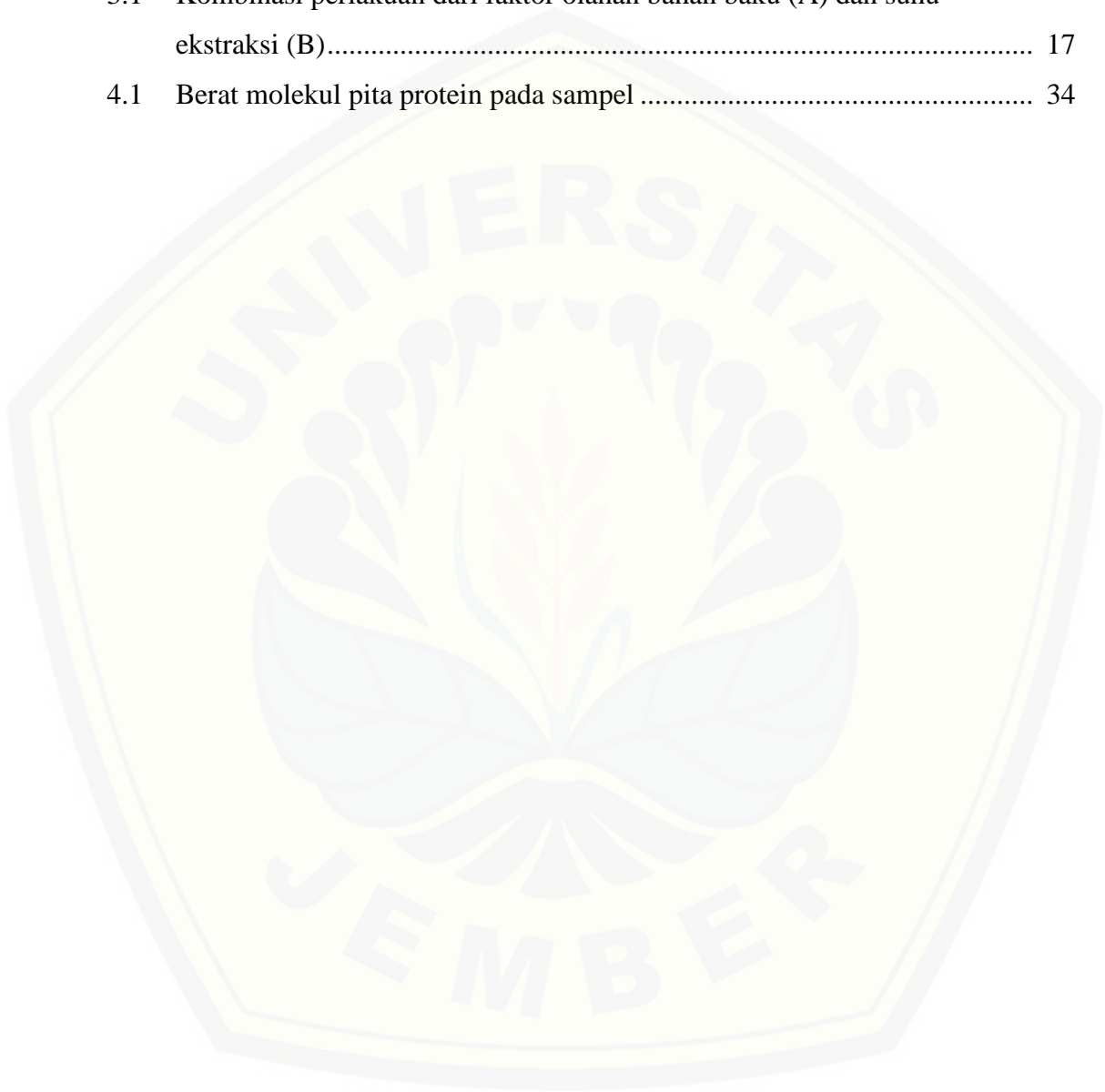
Halaman

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN MOTTO .....</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN.....</b>	<b>v</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBING .....</b>	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	<b>vii</b>
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>viii</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>x</b>
<b>PRAKATA .....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xvii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xviii</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1 Koro Kratok ( <i>Phaseolus lunatus</i> L.).....	5
2.2 Kandungan Senyawa Gizi Koro Kratok .....	6
2.3 Kandungan Senyawa Antigi Koro Kratok.....	7
2.4 Lunatin.....	8
2.5 Modifikasi Koro Kratok dengan Fermentasi.....	10
2.6 Ekstraksi Lunatin.....	12
2.7 <i>Aspergillus niger</i> .....	13
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>15</b>
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	15
3.2 Bahan dan Alat Penelitian .....	15
3.2.1 Bahan Penelitian .....	15
3.2.2 Alat Penelitian .....	15
3.3 Rancangan Penelitian .....	16
3.4 Rancangan Percobaan.....	17
3.5 Pelaksanaan Penelitian .....	18

3.5.1	Penyiapan Biji Koro Kratok Kering yang dihancurkan.....	18
3.5.2	Pembuatan Tepung Koro Kratok.....	18
3.5.3	Pembuatan MOLEF Koro Kratok.....	19
3.5.4	Ekstraksi Lunatin.....	25
3.6	Parameter Pengamatan.....	25
3.7	Prosedur Analisis.....	27
3.7.1	Total Protein dalam Olahan Bahan Baku.....	27
3.7.2	Berat Molekul Pita Protein.....	27
3.7.3	Aktivitas Antioksidan dengan Penangkapan Radikal DPPH.....	28
3.7.4	Aktivitas Antifungi.....	29
3.8	Analisis Data.....	29
<b>BAB 4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>30</b>
4.1	Total Protein dalam Olahan Bahan Baku.....	30
4.2	Berat Molekul Pita Protein.....	32
4.3	Aktivitas Antioksidan dengan Penangkapan Radikal DPPH.....	36
4.4	Aktivitas Antifungi.....	39
<b>BAB 5.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>42</b>
5.1	Kesimpulan.....	42
5.2	Saran.....	42
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>		<b>43</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
3.1 Kombinasi perlakuan dari faktor olahan bahan baku (A) dan suhu ekstraksi (B).....	17
4.1 Berat molekul pita protein pada sampel .....	34





DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Biji koro kratok .....	6
2.2 Struktur mikroskopis <i>Aspergillus niger</i> .....	14
3.1 Diagram alir rancangan penelitian.....	17
3.2 Diagram alir penyiapan biji koro kratok ( <i>Phaseolus lunatus</i> L.) kering yang dihancurkan.....	18
3.3 Diagram alir pembuatan tepung koro kratok .....	20
3.4 Diagram alir pembuatan <i>Modified Legume Flour</i> (MOLEF) koro kratok dengan fermentasi spontan .....	21
3.5 Diagram alir penyiapan kultur kerja <i>Modified Legume Flour</i> (MOLEF) koro kratok.....	23
3.6 Diagram alir produksi <i>Modified Legume Flour</i> (MOLEF) koro kratok secara fermentasi terkendali .....	24
3.7 Diagram alir ekstraksi lunatin.....	26
4.1 Total protein biji kering yang dihancurkan, tepung, dan MOLEF koro kratok .....	30
4.2 Hasil elektroforesis sampel.....	33
4.3 Kurva regresi linier gel .....	34
4.4 Persentase penghambatan DPPH.....	37
4.5 Hasil pengujian aktivitas antifungi terhadap <i>Aspergillus niger</i> .....	41

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
A. Data Hasil Pengukuran Total Protein dalam Olahan Bahan Baku .....	50
A1. Total Protein dalam Koro Kratok.....	50
A2. Data Sidik Ragam Total Protein dalam Olahan Bahan Baku .....	50
A3. Data Uji Beda Nyata Total Protein dalam Olahan Bahan Baku .....	50
B. Data Hasil Pengukuran Berat Molekul .....	52
B1. Kurva Standart Gel Optimasi .....	52
B2. Berat molekul pita protein pada sampel .....	52
B3. Contoh perhitungan berat molekul .....	53
C. Data Hasil Perhitungan Aktivitas Antioksidan .....	54
C1. Aktivitas Antioksidan Koro Kratok .....	54
C2. Data Sidik Ragam Pengaruh Kombinasi Perlakuan.....	54
C3. Data Uji Beda Nyata Pengaruh Kombinasi Perlakuan.....	55
C4. Data Sidik Ragam Perhitungan Aktivitas Antioksidan .....	55
C5. Data Uji Beda Nyata Perhitungan Aktivitas Antioksidan .....	56
D. Dokumentasi Kegiatan Penelitian.....	59

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Koro kratok (*Phaseolus lunatus* L.) merupakan salah satu tanaman kacang-kacangan yang memiliki kandungan protein dan serat yang tinggi serta rendah lemak. Tanaman koro-koroan memiliki produktivitas yang tinggi, yaitu pada lahan kering sekitar yaitu 800-900 kg/ha dan pada lahan yang diberi pengairan yaitu sekitar 1700 kg/ha, serta mudah dibudidayakan (Suhardi, 1989). Selain itu, koro kratok juga memiliki nilai gizi yang cukup tinggi, yaitu karbohidrat sekitar 60,55-74,62%, protein sekitar 19,93-21,40%, lemak sekitar 0,99-1,21%, serat sekitar 4,20-5,50%, kadar air sekitar 11,58-13,83%, serta kadar abu sekitar 3,46-3,61% dari berat kering (Diniyah dkk., 2013).

Koro kratok dapat dimodifikasi menjadi tepung kaya protein (*protein rich flour*) dan *Modified Legume Flour* (MOLEF). Produksi MOLEF koro kratok secara fermentasi terkendali dilakukan menggunakan kultur bakteri asam laktat (BAL) yaitu *L. plantarum* (Nafi' dkk., 2016). Aplikasi tepung dan MOLEF koro kratok telah dilakukan pada beberapa produk makanan seperti substitusi tepung terigu dalam tepung bumbu, mi basah dan mi instan, campuran nugget jamur merang, serta *Texturized Vegetable Protein* (TVP) untuk bahan baku pembuatan daging analog seperti sosis, nugget dan bakso, produk *brownies*, serta *flakes* ubi jalar.

Meskipun begitu, koro kratok masih kurang dikenal dan belum banyak dimanfaatkan oleh masyarakat secara umum karena adanya faktor antigizi. Koro kratok mengandung senyawa toksik atau zat antigizi seperti asam sianida (HCN) yang cukup tinggi yaitu sekitar 14,96-26,22 mg/g serta asam fitat sekitar 8,76-19,75 mg/g (Diniyah dkk., 2013). Koro kratok juga mengandung lektin yang bernama lunatin. Lektin merupakan protein pengikat karbohidrat yang memiliki sifat hemaglutinasi. Penelitian menunjukkan bahwa efek toksik lektin pada mamalia berkaitan dengan proses pencernaan serta proses penyerapan gizi yang tidak normal pada saluran pencernaan (Putzai dkk., 1979; King dkk., 1982).

Kandungan zat antigizi pada koro kratok, termasuk lunatin, dapat dipengaruhi oleh proses pengolahan. Asam sianida dan asam fitat dapat dihilangkan menggunakan proses pengolahan yang tepat, salah satunya adalah dengan cara perendaman (Diniyah dkk., 2015). Semakin lama perendaman, maka semakin banyak pula zat antigizi yang dapat dihilangkan (Sri dkk., 2008). Adeparusi (2001) dalam penelitiannya menunjukkan bahwa lektin dari koro kratok dapat berkurang setelah melalui proses pengolahan, baik dengan cara perendaman, autoklaf, maupun pemanggangan. Menurut Huismann (1991), perlakuan panas adalah metode yang sering digunakan untuk mengurangi kandungan lektin. Fermentasi koro-koroan atau biji-bijian, baik secara alami (spontan) maupun menggunakan kultur murni seperti bakteri asam laktat (BAL), juga mampu menurunkan kandungan senyawa antigizi serta meningkatkan protein terlarut (Antony dan Chandra, 1998).

Lunatin pada satu sisi memang merupakan zat antigizi, namun di sisi lain juga memiliki sifat fungsional. Secara umum, lektin diketahui dapat menggumpalkan sel berbahaya dan menstimulasi mitosis pada limfosit (Sharon dan Lis, 1972). Galbraith dan Goldstein (1972) dalam penelitiannya telah membuktikan bahwa lunatin berpotensi dalam identifikasi sel darah merah golongan darah A karena kemampuan aglutinasinya hanya memiliki efek yang kuat pada golongan darah tersebut. Penelitian oleh Wu dkk. (2016) telah menunjukkan kemampuan lunatin sebagai antifungi terhadap *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium soloni*, *Fusarium oxysporum* dan *Botrytis cinerea*; serta kemampuan antiproliferasi terhadap sel tumor HepG2, HeLa, dan K562. e Lacerda dkk. (2017) juga telah membuktikan bahwa lunatin memiliki aktivitas antioksidan, antitumor, dan gastroprotektif.

Penelitian ini menggunakan koro kratok yang telah diolah menjadi biji kering yang dihancurkan, tepung, serta MOLEF. Lunatin dari ketiga hasil olahan bahan baku ini dapat diperoleh menggunakan berbagai macam cara, salah satunya melalui ekstraksi menggunakan pelarut. Suhu yang digunakan saat proses ekstraksi dapat mempengaruhi total protein, termasuk lunatin, yang berhasil diperoleh dari bahan-bahan tersebut. Penelitian mengenai karakteristik lunatin

yang diekstrak dari tiga olahan bahan baku yang berbeda (biji kering yang dihancurkan, tepung serta MOLEF koro kratok) pada beberapa suhu ekstraksi yang berbeda belum pernah dilaporkan sebelumnya. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai karakterterisasi lunatin yang diekstrak dari tiga olahan bahan baku meliputi biji kering yang dihancurkan, tepung, serta MOLEF, dengan menggunakan tiga variasi suhu ekstraksi yang berbeda (27°C, 40°C, dan 50°C) untuk mengetahui pengaruh olahan bahan baku serta suhu terhadap hasil ekstraks lunatin yang diperoleh.

### **1.2 Rumusan Masalah**

Lunatin merupakan zat gizi dalam koro kratok yang juga memiliki sifat fungsional, antara lain sebagai antioksidan, antifungi, antiproliferasi, dan gastroprotektif. Koro kratok dapat diolah menjadi biji kering yang dihancurkan, tepung, serta MOLEF koro kratok. Pengolahan tersebut dapat mempengaruhi total protein, termasuk lunatin. Penggunaan suhu tinggi saat proses ekstraksi juga dapat mempengaruhi kandungan lunatin, yang kemudian dapat berpengaruh juga terhadap karakteristik fungsionalnya. Oleh karena itu, perlu dikaji perbedaan karakteristik lunatin dari biji koro kratok yang dihancurkan, tepung koro kratok, dan MOLEF koro kratok yang diekstrak menggunakan tiga jenis variasi suhu yang berbeda.

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini memiliki beberapa tujuan antara lain sebagai berikut:

1. Mengetahui karakteristik kimia berupa total protein dari tiga jenis olahan koro kratok; serta karakteristik fisik berupa berat molekul pita protein lunatin dari ketiga olahan yang diekstrak menggunakan tiga suhu yang berbeda.
2. Mengetahui karakteristik fungsional lunatin dari ketiga olahan koro kratok yang diekstrak menggunakan tiga suhu berbeda, meliputi aktivitas antioksidan dan aktivitas antifungi.

#### 1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan beberapa manfaat antara lain sebagai berikut:

1. Meningkatkan potensi bahan pangan lokal khususnya koro kratok,
2. Menghasilkan hasil penelitian terkait lunatin dari koro kratok yang memiliki kandungan protein yang relatif tinggi serta memiliki potensi sebagai antioksidan dan antifungi.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Koro Kratok (*Phaseolus lunatus* L.)

Koro kratok (*Phaseolus lunatus* L.) merupakan tanaman biji-bijian yang pertama kali ditemukan di Amerika Tengah (Meksiko dan Guatemala) dengan biji yang berukuran kecil, sementara di Amerika Selatan (Peru), bijinya berukuran sedikit lebih besar. Berdasarkan karakteristik daerah asalnya tersebut, koro kratok dibedakan menjadi dua jenis yaitu *Mesoamerican* (Meksiko dan Guatemala) dan *Andean* (Amerika Selatan). Setelah koro kratok tersebar di Amerika, kemudian berlanjut ke Eropa dan Asia. Pada wilayah Asia, koro kratok pertama kali ditemukan di Filipina, kemudian berkembang pesat di Myanmar dan terus menyebar sampai ke Jawa (PROSEA, 1989). Koro kratok di Indonesia sering dikenal dengan kacang lima, kacang mentega, koro glinding atau kekara (Purwanti dan Prihata, 2017). Adapun klasifikasi koro kratok adalah sebagai berikut:

Divisi : *Magnoliophyta*  
Kelas : *Magnoliopsida*  
Bangsa : *Rosales*  
Suku : *Caesalpiniaceae*  
Marga : *Phaseolus*  
Jenis : *Phaseolus lunatus* L.

Koro kratok memiliki tiga tipe biji yaitu *Potato* (biji kecil berbentuk bulat) dengan berat sekitar 35,5 g/100 biji, panjang 9 mm, lebar 8 mm; *Sieva* (biji berbentuk ginjal berukuran medium) dengan berat sekitar 30-45,3 g/100 biji, panjang 12 mm, lebar 9-10 mm; serta *Inca* (biji berbentuk bulat dan berukuran besar) dengan berat sekitar 100-110 g/100 biji, panjang 25 mm, lebar 14 mm. Secara umum, sekitar 70% jenis koro kratok memiliki biji berbentuk ginjal dan 30% lainnya berbentuk lonjong serta bulat (Purwanti dan Prihata, 2017). Penelitian ini menggunakan koro kratok dengan tipe biji *Sieva*. Biji koro kratok dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Biji koro kratok (Dokumen Pribadi)

Koro kratok merupakan tanaman yang berperan penting dalam mengatasi lahan kritis karena dapat tumbuh secara produktif di daerah yang memiliki tanah kurang subur. Pemanfaatan tanaman ini sebagian besar untuk makanan ternak, namun sebagian masyarakat telah memanfaatkannya untuk tempe (Kanetro dan Hastuti, 2006). Koro kratok dalam tahap penelitian telah dimodifikasi menjadi tepung kaya protein (*protein rich flour*) (Nafi' dkk., 2006) dan *Modified Legume Flour* (MOLEF) (Nafi' dkk., 2015). Aplikasi tepung dan MOLEF koro kratok telah dilakukan pada beberapa produk makanan seperti tepung bumbu, mi basah, dan mi instan, *nugget* jamur merang, serta *Texturized Vegetable Protein* (TVP) untuk bahan baku pembuatan daging analog seperti sosis, *nugget*, bakso, *flakes* ubi jalar, serta produk *brownies*.

## 2.2 Kandungan Senyawa Gizi Koro Kratok

Koro kratok (*Phaseolus lunatus* L.) memiliki potensi sangat besar untuk diolah menjadi produk pangan apabila ditinjau dari segi gizi dan syarat tumbuhnya (Nafi' dkk., 2015). Koro kratok memiliki semua unsur gizi dengan nilai gizi yang cukup tinggi yaitu karbohidrat sekitar 60,55-74,62%, protein sekitar 19,93-21,40%, lemak sekitar 0,99-1,21%, serat sekitar 4,20-5,50%, kadar air sekitar 11,58-13,83%, serta kadar abu sekitar 3,46-3,61% dari berat kering (Diniyah dkk., 2013). Koro-koroan juga mengandung vitamin B1 dan B2 (Nafi' dkk., 2006).

Kandungan protein yang dapat dimakan untuk setiap 100 g bagian antara lain yaitu pada polong muda sekitar 1,3 g, biji muda sekitar 8,4 g, dan daun segar



sekitar 0,6 g (Nafi' dkk., 2015). Kandungan protein yang tinggi menjadikan koro-koroan termasuk koro kratok memiliki potensi yang tinggi sebagai alternatif pengganti protein hewani (Nafi' dkk., 2006). Selain berpotensi sebagai pengganti protein hewani, koro kratok juga merupakan bahan hasil pertanian lokal yang memiliki sifat mampu mensubstitusi peranan terigu (Giyarto dkk., 2016). Protein koro-koroan dapat dipertimbangkan sebagai sumber protein untuk bahan pangan dikarenakan memiliki keseimbangan asam amino yang baik serta memiliki bio-availabilitas yang tinggi pula (Newman dkk., 1987; Friedman, 1996).

### 2.3 Kandungan Senyawa Antigi Koro Kratok

Biji koro-koroan secara umum mengandung beberapa senyawa antigi. Senyawa antigi tersebut antara lain asam sianida (HCN), asam fitat, antitripsin (*trypsin inhibitor*), tanin, serta lektin yang salah satunya berupa Lunatin. Kandungan asam sianida pada koro kratok cukup tinggi yaitu sekitar 14,96-26,22 mg/g, asam fitat berkisar antara 8,76-19,75 mg/g, antitripsin sekitar 73,7 TIU/mg protein, tanin sebanyak 0,64g/100 g, serta lektin sebanyak 4 HU/mg N (Adeparusi, 2001; Diniyah dkk., 2013).

Asam sianida merupakan racun yang bereaksi cepat, berbentuk gas tak berbau dan tak berwarna serta sangat berbahaya jika dikonsumsi secara berlebihan (Diniyah dkk., 2013, Arianto dkk., 2014). Asam sianida dalam tanaman sebagian besar terikat dengan senyawa sakarida, baik berupa monosakarida maupun polisakarida berbentuk glukosida sianogenik (Montgomery, 1980). Glukosida sianogenik pada koro kratok bernama linamarin, yang jika mengalami sianogenesis akan terurai menjadi asam sianida dan komponen karbonil (Frehner dan Conn, 1987). Proses pengolahan yang tepat dapat menurunkan kadar HCN pada kacang koro seperti proses pencucian, perendaman, serta fermentasi (Arianto dkk., 2014). Semakin lama perendaman, maka semakin banyak pula asam sianida yang dapat dihilangkan (Sri dkk., 2008). Proses lain yang dapat menurunkan kadar sianida adalah dengan perebusan yang dapat mengaktifkan enzim  $\beta$ -glukosidase serta perendaman dalam abu sekam padi yang dapat melepaskan sianida (Pramitha dan Wulan, 2017).

Asam Fitat dapat mengikat kalsium, fosfor, magnesium, dan zat besi, serta dapat bergabung dengan protein sehingga dapat mempengaruhi zat gizi yang dapat diserap oleh tubuh. Asam fitat yang tinggi dapat menurunkan atau bahkan menghilangkan keberadaan fosfor. Asam fitat dapat dikurangi dengan metode pengolahan seperti perendaman dan pemasakan. Kandungan asam fitat akan berkurang jika bahan dimasukkan ke dalam autoklaf selama 20 menit (Reddy dkk., 1982; Adeparusi, 2001).

Antitripsin dapat menghambat daya kerja proses proteolitik dari enzim tripsin yang dihasilkan oleh pankreas. Zat antitripsin juga dapat merangsang pankreas untuk mensekresi enzim yang diproduksinya lebih banyak lagi sehingga energi metabolik makanan turun karena protein tidak tercerna dengan baik. Akibatnya tubuh akan mengalami kekurangan protein dan sering disertai dengan pembesaran pankreas (Lyli, 1987). Zat antitripsin dapat dihilangkan melalui proses pengolahan seperti perendaman, autoklaf serta pemanggangan (Adeparusi, 2001).

Tanin dapat mengganggu penyerapan protein, serta memberi pengaruh buruk terhadap bio-availabilitas zat besi non-hemoglobin sehingga menyebabkan buruknya penyerapan zat besi dan kalsium. Tanin juga dapat mempengaruhi komponen karbohidrat sehingga mengakibatkan berkurangnya nilai gizi bahan pangan tersebut. Proses perendaman dan pemanggangan lebih efektif mengurangi tanin daripada menggunakan autoklaf (Adeparusi, 2001).

Lektin, yang salah satunya berupa lunatin, memiliki sifat hemaglutinasi. Efek toksik hemaglutinin pada mamalia telah diteliti berkaitan dengan proses pencernaan serta proses penyerapan gizi yang tidak normal pada saluran pencernaan (Putzai dkk., 1979; King dkk., 1980). Lektin koro kratok dapat berkurang melalui proses pengolahan seperti perendaman, pemanggangan serta autoklaf seperti yang telah diteliti oleh Adeparusi (2001).

#### **2.4 Lunatin**

Lunatin merupakan lektin yang diisolasi dari biji *Phaseolus lunatus* L. Lektin merupakan protein pengikat karbohidrat yang memiliki paling sedikit satu

domain non-katalis yang secara selektif menerima dan secara spesifik mengikat beberapa jenis glikoprotein berbeda yang mengandung mono- atau oligosakarida. (Wu dkk., 2016). Lektin terkandung dalam setiap struktur pada tanaman, tetapi kandungannya terpusat pada biji-bijinya, dimana kandungan lektin memiliki proporsi yang lebih tinggi dibandingkan jenis protein lainnya (e Lacerda dkk., 2016).

Lunatin memiliki berat molekul sekitar 128 kDa menurut e Lacerda dkk. (2016) dan 24,3 kDa menurut Wu dkk. (2016). Sementara Gould dan Scheinberg (1970) mengisolasi dua faktor aglutinasi dari *Phaseolus lunatus* yang memiliki berat molekul 62 kDa, tetapi ketika ditambahkan reagen pereduksi berupa DTT, muncul pita protein baru yang memiliki berat molekul 31 kDa. Gould dan Scheinberg menyatakan bahwa kedua faktor aglutinasi tersebut merupakan lektin tunggal yang berada pada dua tahapan agregasi yang berbeda. Lunatin diasumsikan merupakan jenis lektin baru karena tidak memiliki kesamaan dengan lektin dari tanaman kacang-kacangan lainnya yang telah diteliti sebelumnya. Total rendemen yang dapat diperoleh dari 50 g koro kratok adalah 71,3 mg (Wu dkk., 2016).

Lunatin hanya memiliki efek aglutinasi terhadap eritrosit golongan darah A, dan sifat aglutinasi ini dapat dihambat oleh *N-acetyl-D-galactosamine*, D-fruktosa, D-galaktosa, D-glukosa serta manitol. Lunatin memiliki kestabilan yang tinggi terhadap rentang pH yang luas (2,0-11,0), serta memiliki kestabilan menengah terhadap suhu (sampai suhu 50°C) dibandingkan dengan jenis lektin lainnya. Lunatin juga resisten terhadap proteolisis enzimatis serta pengaruh dari urea, DTT, dan beta-merkaptotanol. Lunatin merupakan protein yang bergantung pada logam sehingga aktivitasnya dapat terhambat oleh senyawa logam seperti  $K_2Cr_2O_7$ ,  $SnCl_2$ , dan  $LiCl$ , tetapi tidak dapat efektif terhambat oleh senyawa  $MgCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $BaCl_2$ ,  $CuCl_2$ ,  $FeCl_3$ , ataupun  $CaCl_2$  (e Lacerda dkk., 2016; Wu dkk., 2016).

Aktivitas antioksidan dari lunatin ditandai dengan ketiadaan hemolitik potensial bagi eritrosit manusia, aktivitas antitumor terhadap sel melanoma, dan aktivitas gastroprotektif pada model *in vivo* (e Lacerda dkk., 2016). Lunatin

memiliki aktivitas antifungi yang potensial terhadap beberapa spesies fungi seperti *Pythium aphanidermatum*, *Physalospora piricola*, *Fusarium oxysporum*, dan *Botrytis cinerea*. Poliferasi sel leukemia K562 dapat dihambat dengan baik oleh lunatin dengan  $IC_{50}$  sebesar 13,7  $\mu$ M, sementara itu penghambatannya lemah terhadap sel HeLa dan HepG2 (Wu dkk., 2016).

## 2.5 Modifikasi Koro Kratok dengan Fermentasi

Fermentasi merupakan salah satu cara pengolahan melalui proses yang memanfaatkan penguraian senyawa dari bahan-bahan protein kompleks. Protein kompleks tersebut berasal dari bahan pangan, dan dalam keadaan yang terkontrol diubah menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana dengan bantuan enzim dari mikroorganisme (Adawyah, 2007). Secara teknik, fermentasi dapat didefinisikan sebagai suatu proses oksidasi anaerobik atau anaerobik parsial dari karbohidrat yang menghasilkan alkohol dan beberapa asam, namun ada juga beberapa proses fermentasi yang menggunakan substrat berupa protein dan lemak (Muchtadi dan Ayustaningwarno, 2010).

Fermentasi terbagi menjadi dua jenis, yaitu fermentasi spontan dan tidak spontan (menggunakan starter). Fermentasi spontan merupakan fermentasi secara alami yang biasa dilakukan menggunakan media penyeleksi seperti asam organik, asam mineral, garam, ataupun pati. Media penyeleksi tersebut akan menjadi media yang baik bagi tumbuh kembang bakteri selektif yang membantu jalannya fermentasi serta menyeleksi bakteri patogen. Fermentasi tidak spontan merupakan fermentasi yang dilakukan dengan penambahan kultur organisme bersama media penyeleksi sehingga proses fermentasi dapat berlangsung lebih cepat (Rahayu dkk., 1992).

Fermentasi pada proses pengolahan MOLEF koro kratok dilakukan melalui beberapa tahap dimulai dari pembuatan *Modified Legume Flour* (MOLEF) koro kratok spontan untuk memperoleh kultur kerja, kemudian dilakukan penyiapan kultur kerja *Modified Legume Flour* (MOLEF) koro kratok dengan melakukan penyegaran kultur *L. plantarum*, dan diakhiri dengan produksi

*Modified Legume Flour* (MOLEF) koro kratok secara fermentasi terkendali (Nafi' dkk., 2016).

Metabolisme Bakteri Asam Laktat (BAL) selama proses fermentasi akan merombak kandungan gizi dalam suatu bahan pangan. Mikroba membutuhkan energi yang umumnya diperoleh dari glukosa. Mikroba dalam keadaan aerob akan mengubah glukosa menjadi air, CO<sub>2</sub>, dan energi (ATP). Sementara itu, dalam keadaan anaerob, substrat hanya akan terurai sebagian menjadi air, CO<sub>2</sub>, energi, dan sejumlah asam organik lainnya, seperti asam laktat, asam asetat, etanol serta bahan-bahan organik lain yang mudah menguap. Penguraian dalam keadaan anaerob inilah yang dinamakan fermentasi (Muchtadi dan Ayutaningwarno, 2010).

Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri yang melakukan penguraian karbohidrat (glukosa) menjadi asam laktat yang akan menurunkan pH serta menimbulkan rasa asam (Muchtadi dan Ayutaningwarno, 2010). Bakteri asam laktat dibagi menjadi dua grup berdasarkan hasil akhir metabolisme glukosa. Bakteri asam laktat yang hanya menghasilkan asam laktat pada fermentasi glukosa termasuk dalam golongan homofermentatif dapat mengubah 95% dari glukosa atau heksosa lainnya menjadi asam laktat, sementara bakteri asam laktat yang dapat menghasilkan asam laktat, CO<sub>2</sub>, dan etanol dari heksosa termasuk dalam golongan heterofermentatif (Jay dkk., 2005; Adawyah, 2007). Bakteri yang termasuk kelompok bakteri asam laktat adalah *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, dan *Pediococcus* (Ringo dan Gatesoupe, 1998).

Bakteri asam laktat merupakan *food grade microorganism* atau dikenal sebagai mikroorganisme yang *Generally Recognized As Safe* (GRAS), yaitu mikroorganisme yang tidak beresiko terhadap kesehatan karena sifatnya yang tidak toksik dan tidak menghasilkan toksin sehingga aman jika ditambahkan dalam pangan. Beberapa jenis bakteri tersebut berguna bagi kesehatan serta bermanfaat untuk peningkatan kualitas *higiene* dan keamanan pangan melalui penghambatan secara alami terhadap flora berbahaya yang bersifat patogen (Daeschel, 1983, dalam Kusmiati dan Malik, 2002).

Produksi MOLEF dilakukan menggunakan *Lactobacillus plantarum* karena *Lactobacillus plantarum* telah banyak digunakan dalam proses produksi makanan dan produk pakan fermentasi seperti asinan kubis, keju, sosis, dan silase (Liu dkk., 2011). *Lactobacillus plantarum* digunakan sebagai kultur kerja untuk produksi makanan fermentasi karena mempunyai kemampuan untuk mengasamkan lingkungan makanan dan menghasilkan bakteriosin untuk meningkatkan keamanan pangan (Moghadam dkk., 2010). Fermentasi terkendali menggunakan *Lactobacillus plantarum* dapat mempersingkat waktu dibandingkan dengan proses fermentasi lainnya. Selain itu, *Lactobacillus plantarum* yang dominan pada lingkungan asam mengakibatkan penghambatan terhadap pertumbuhan mikroorganisme lainnya (Beganovic dkk., 2011).

## 2.6 Ekstraksi Lunatin

Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel. Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi (Mukhriani, 2014). Sebelum memilih suatu metode, target ekstraksi perlu ditentukan terlebih dahulu. Ada beberapa target ekstraksi diantaranya yaitu senyawa bioaktif yang tidak diketahui, serta senyawa yang diketahui ada pada suatu organisme atau sekelompok senyawa dalam suatu organisme yang berhubungan secara struktural (Sarker dkk., 2006 dalam Mukhriani, 2014).

Proses ekstraksi untuk bahan yang berasal dari tumbuhan secara umum adalah sebagai berikut: 1) Pengelompokan bagian tumbuhan (daun, bunga, biji, dan lain-lain), pengeringan serta penggilingan bagian tumbuhan; 2) pemilihan pelarut (pelarut polar yaitu seperti air, etanol, metanol, dan sebagainya, kemudian pelarut semipolar yaitu seperti etil asetat, diklorometan, dan sebagainya, sementara pelarut nonpolar yaitu seperti n-heksan, petroleum eter, kloroform, dan sebagainya) (Mukhriani, 2014).

Lunatin dapat diekstrak menggunakan pelarut natrium asetat (Wu dkk., 2016) karena natrium asetat merupakan salah satu senyawa hidrotop yang umum digunakan dalam proses peningkatan kelarutan senyawa fitokimia (Pribadi dkk., 2014). Ekstrak yang dihasilkan masih berupa ekstrak mentah sehingga perlu dilanjutkan dengan presipitasi menggunakan amonium sulfat dan dilakukan purifikasi. Beberapa teknik purifikasi yang dapat dilakukan antara lain menggunakan fraksinasi menggunakan kromatografi kolom (e Lacerda dkk., 2016), kromatografi afinitas, kromatografi pertukaran ion, kromatografi filtrasi gel (Wu dkk., 2016), ataupun menggunakan selulosa untuk mengikat senyawa lain yang tidak diperlukan (Ota, 2016 dalam Yulistingati, 2017).

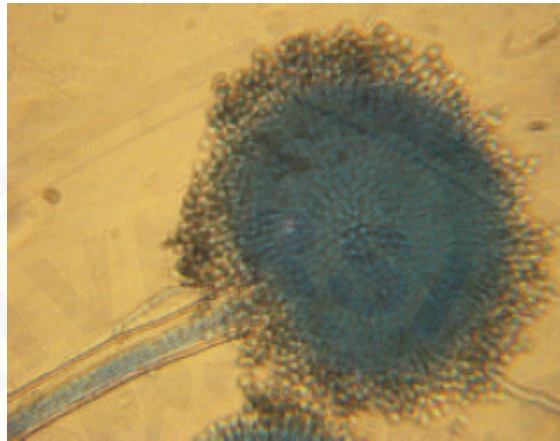
## 2.7 *Aspergillus niger*

*Aspergillus niger* merupakan fungi berfilamen yang dapat ditemukan di tanah, air, udara, bahan tanaman yang membusuk, dan sebagian besar makanan dan pakan di seluruh dunia (Pitt dan Hocking, 1997). Adapun klasifikasi *Aspergillus niger* adalah sebagai berikut:

Divisi : *Ascomycota*  
Subdivisi : *Pezizomycotina*  
Kelas : *Eurotiomycetes*  
Bangsa : *Eurotiales*  
Suku : *Trichocomaceae*  
Marga : *Aspergillus*  
Jenis : *Aspergillus niger*

Perbedaan jelas antara *Aspergillus niger* dengan jenis *Aspergillus* lain adalah produksi spora berwarna hitam karbon atau coklat sangat gelap dari *biseriate phialides*-nya (Raper dan Fennel, 1965). Koloni *Aspergillus niger* awalnya berwarna putih sampai kuning pada permukaan bawah koloni sebelum kemudian berubah warna menjadi coklat gelap hingga hitam setelah terbentuk konidiofor (konidia). Kepala konidia radian, tangkai konidia (konidiofor) berdinding halus, dan vesikula bulat sampai semi bulat dengan diameter 10-100  $\mu\text{m}$ . Fialid terletak pada metula dengan ukuran 7,0- 9,5 x 3- 4  $\mu\text{m}$ . Metula

seringnya bersekat dengan ukuran 15- 25 x 4,5-6,0  $\mu\text{m}$ . Konidia bulat sampai semi bulat dengan diameter 3,5-5  $\mu\text{m}$  dan berwarna coklat dengan ornamen (Noverita, 2009). Struktur mikroskopis *Aspergillus niger* dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Struktur mikroskopis *Aspergillus niger* (Gautam dkk., 2011)

Banyak penelitian telah menyebutkan bahwa *Aspergillus niger* dapat berlaku sebagai patogen bagi tumbuhan berupa hasil perkebunan maupun hasil pertanian. Fungi ini dapat menyebabkan pembusukan bagi beberapa jenis buah-buahan, sayuran, dan produk pangan lainnya, menyebabkan kerugian ekonomi yang cukup besar. Ada banyak sekali contoh kerusakan pada tumbuhan yang disebabkan oleh *Aspergillus niger* (Gautam dkk., 2011). Cendawan hitam pada bawang yang disebabkan oleh *Aspergillus niger* bertanggung jawab atas kehilangan besar hasil panen bawang baik di lapangan maupun selama penyimpanan (Narayana dkk., 2007). Penelitian lain menyatakan bahwa *Aspergillus niger* menyebabkan pembusukan pada anggur (Sharma dan Vir, 1986), manga (Prakash dan Raof, 1989), tomat (Sinha dan Saxena, 1987), kernel kacang mete, kurma, polong vanilla, dan plum kering (Bobbarala dkk., 2009). Selain pada tumbuhan, *Aspergillus niger* juga dapat membahayakan kesehatan manusia. Seperti yang dilaporkan pada penelitian oleh Person dkk. (2010) bahwa *Aspergillus niger* dapat menjadi penyebab dari penyakit *invasive pulmonary aspergillosis* atau pneumonia yang disebabkan oleh fungi dari golongan Aspergillus.



## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Rekayasa Proses Hasil Pertanian dan Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember, serta di *Food Microscopic Analysis Laboratory, Faculty of Life and Environmental Sciences, Prefectural University of Hiroshima*. Waktu penelitian dimulai pada bulan September 2018 sampai dengan bulan Juli 2019.

### 3.2 Bahan dan Alat Penelitian

#### 3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi biji koro kratok (*Phaseolus lunatus* L.) yang diperoleh dari Asosiasi Tani Hutan Rakyat Indonesia (ATHRI), *de Mann Rigorosa Sharpe Agar* (MRSA) (Merck), *de Mann Rigorosa Sharpe Broth* (MRSB) (Merck), *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Merck), NaCl (Cap Kapal), elektroda buffer (Mettler Toledo), kultur *Lactobacillus plantarum*, gula halus (Gulus), susu skim (Prolac), CH<sub>3</sub>COONa (Merck, Wako), asam sitrat (Cap Gajah, Wako), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, Wako), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Merck), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Aldrick), buffer natrium sitrat (Wako), ethanol (Wako), e-PAGEL mini gel ET10L (Atto), EzProtein Ladder WSE-7020 (Atto), EzApply AE-1430 (Atto), EzRun AE-1410 (Atto), CBB Staining Reagent Ez Stain Aqua AE-1340 (Atto), asam hipurat (Wako), *Aspergillus niger*, akuades.

#### 3.2.2 Alat Penelitian

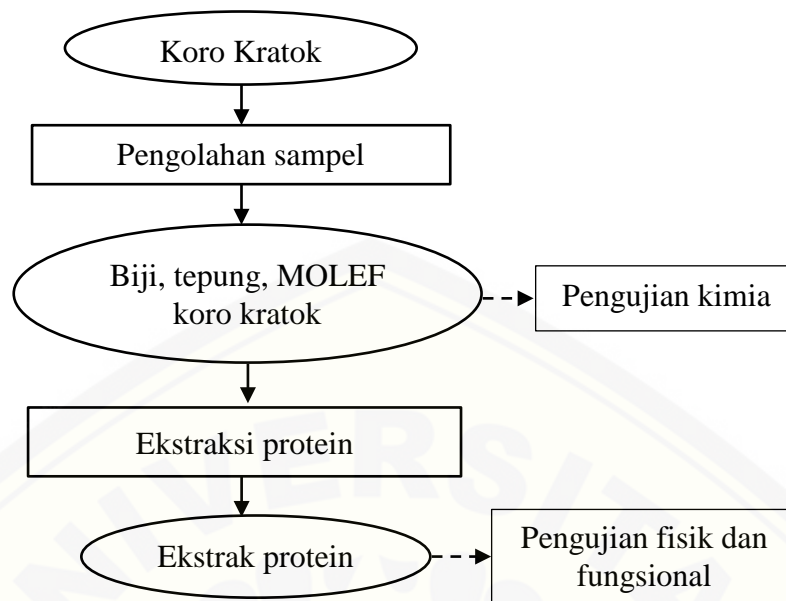
Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven (*Selecta*), *blender* (*Philips*), peralatan gelas (*Pyrex*, *Wako*, *Iwaki*, dan *As One*), *vortex* (*Medline VM-3000-MD*), inkubator (*Haraeus Inst B6200*, *Sanyo MCO-18AIC*), autoklaf (*Hirayama HL 36*), *laminar air flow* (*Crumair*), pH meter (*Hanna Hi98107*, *Eutech Instruments pH 510 Cyberscan*), neraca analitik (*Ohaus*, *AND GX-2000*, *Sartorius CPA 324S*, *Sartorius CPA225D*), pipet mikro (*Gilson AK55762*, *Gilson Z59380K*, *Watson Nexty-1000*, *Benchmate C56001200*), sentrifus (*Hermle Z206-*

A, Kubota 3700, Kubota 2800), *capsulfuge* (GMC Lab PMC-880), *waterbath* (As One thermo max TM-1, As One thermal robo TR-2A), *tube mixer trio* (As One TM-2F), filter penyuntik (MS NY025022), penyuntik (Terumo SS-01T), generator (Atto My Power 500 AE-500), sistem mini elektroforesis (Atto mPAGE AE-6530), *digital dry bath* (Accublock Labnet D1200), *orbital shaker* (Biosan PSU-10i), oven gelombang mikro (Hitachi MRO-658), *macro corder* (JM1000CN), *auto sampler* (JMA1000), *biological safety cabinet*, *suction pump* (Markos Mefar SP20), *inverted microscop* (Olympus CKX31, Olympus CKX41), adaptor kamera (Olympus U-CMAD3), kamera digital (MDCE-5C USB 2.0).

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui dua tahapan, yaitu pengolahan koro kratok dan ekstraksi protein dari koro kratok. Pengolahan koro kratok dilakukan dengan cara mengolah koro kratok menjadi biji koro kratok kering yang dihancurkan, tepung koro kratok, serta *Modified Legume Flour* (MOLEF) koro kratok. Sementara itu, ekstraksi sampel dilakukan dengan menggunakan tiga jenis variasi suhu ekstraksi yaitu 27°C, 40°C, dan 50°C.

Sebelum diekstraksi, biji koro kratok kering yang dihancurkan, tepung koro kratok, dan MOLEF koro kratok terlebih dahulu dilakukan uji kimia berupa total kandungan protein pada olahan bahan baku. Selanjutnya, dilakukan proses ekstraksi untuk memperoleh protein dari masing-masing sampel hasil kombinasi kedua perlakuan. Setelah proses ekstraksi selesai, ekstrak protein yang dihasilkan kemudian dianalisis sifat fisik berupa berat molekul yang terkandung pada masing-masing sampel menggunakan metode SDS-PAGE; dan juga sifat fungsional yang meliputi aktivitas antioksidan (dengan DPPH) serta aktivitas antifungi (menggunakan *Aspergillus niger*). Diagram rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Diagram alir rancangan penelitian

### 3.4 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dua faktor, yang terdiri dari faktor A (olahan bahan baku) dan faktor B (suhu ekstraksi). Variasi olahan bahan baku yang digunakan adalah sebagai berikut:

A1 = biji koro kratok kering yang dihancurkan

A2 = tepung koro kratok

A3 = MOLEF koro kratok

Sementara suhu ekstraksi yang digunakan adalah sebagai berikut:

B1 = 27°C

B2 = 40°C

B3 = 50°C

Kombinasi dari kedua faktor tersebut akan menghasilkan sembilan perlakuan seperti yang tertera pada Tabel 3.1.

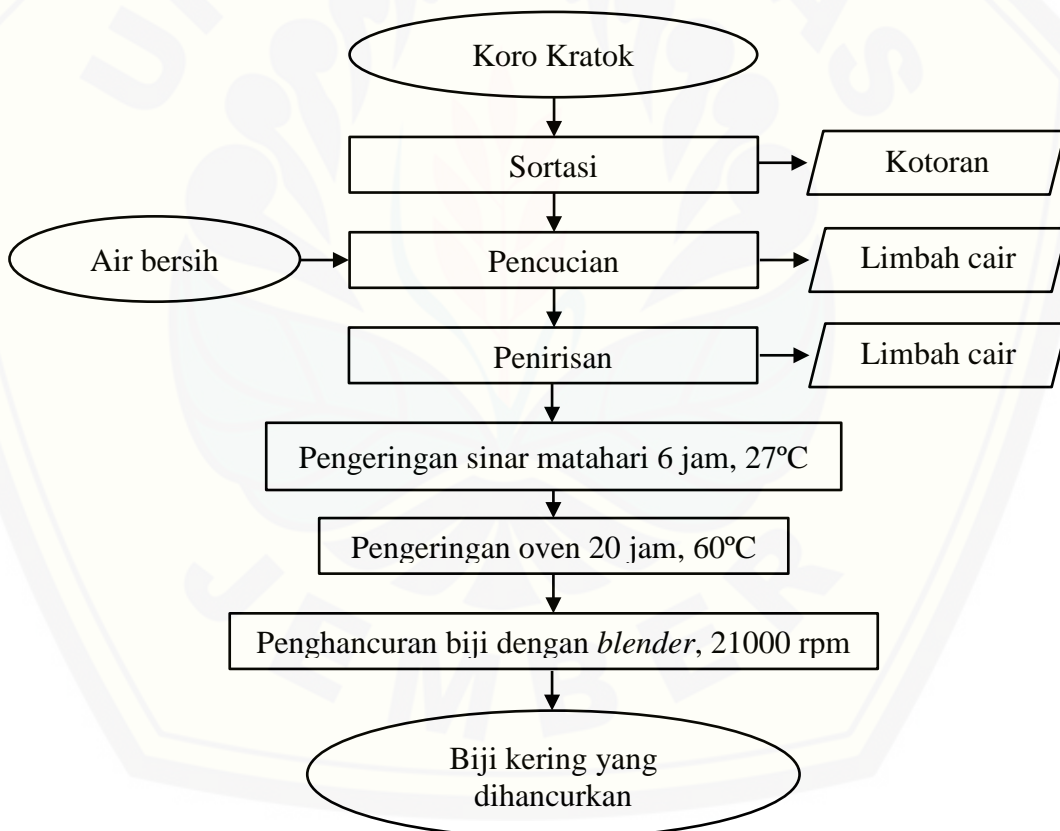
Tabel 3.1 Kombinasi perlakuan dari faktor olahan bahan baku (A) dan suhu ekstraksi (B)

	B1	B2	B3
A1	A1B1	A1B2	A1B3
A2	A2B1	A2B2	A2B3
A3	A3B1	A3B2	A3B3

### 3.5 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.5.1 Penyiapan Biji Koro Kratok Kering yang Dihancurkan

Koro kratok disortasi untuk mendapatkan biji dengan karakteristik yang seragam serta menghilangkan cacat bahan. Koro kratok kemudian dicuci hingga bersih untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada biji dan selanjutnya ditiriskan. Koro kratok dikeringkan menggunakan sinar matahari selama  $\pm 6$  jam kemudian dilanjutkan dengan pengeringan menggunakan oven selama  $\pm 20$  jam pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$  untuk mengurangi kadar air yang terkandung dalam bahan. Biji koro kratok yang telah kering kemudian dihancurkan menggunakan *blender* untuk mempermudah proses ekstraksi. Diagram alir penyiapan biji koro kratok kering yang dihancurkan dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2 Diagram alir penyiapan biji koro kratok (*Phaseolus lunatus* L.) kering yang dihancurkan

#### 3.5.2 Pembuatan Tepung Koro Kratok

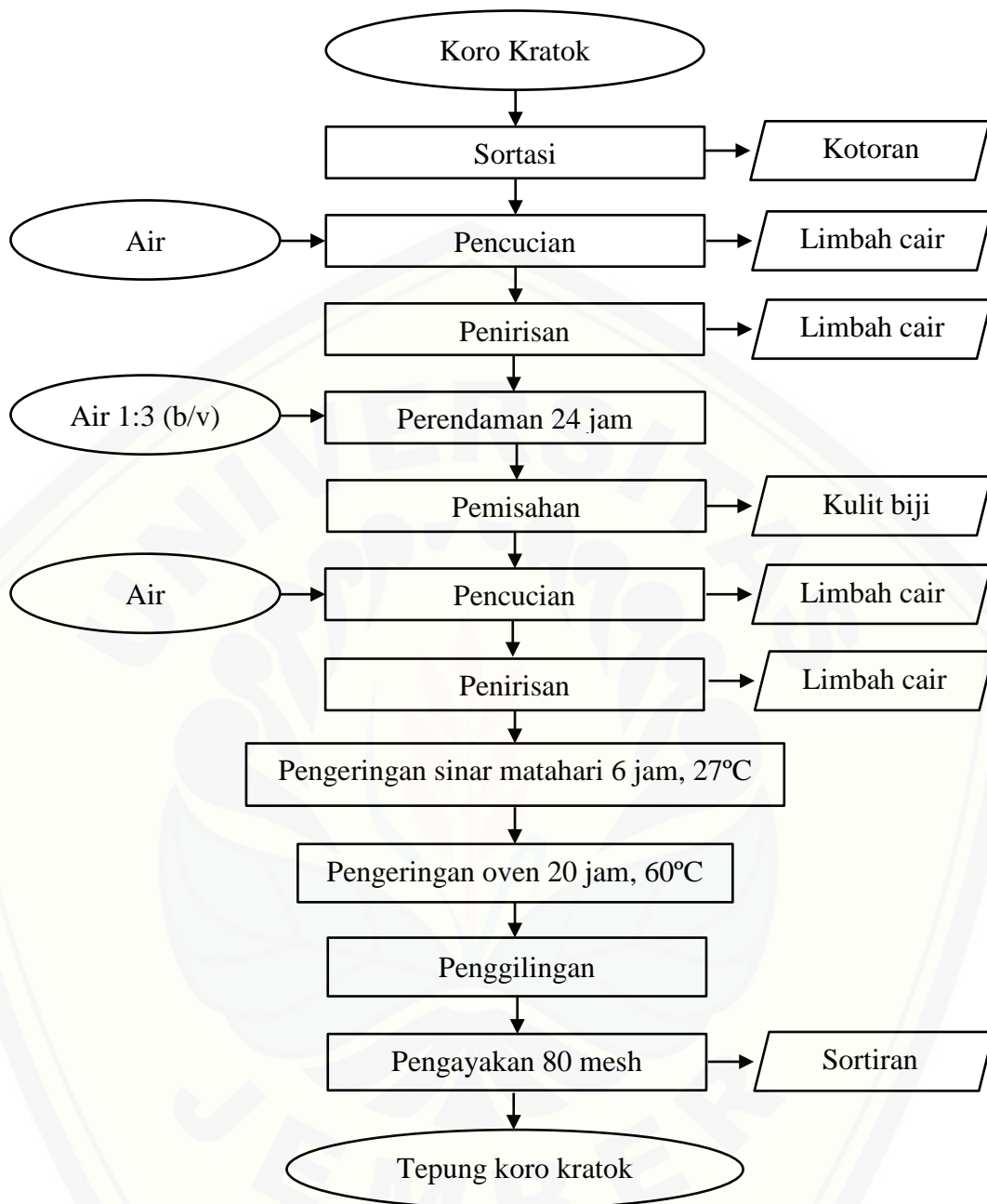
Koro kratok disortasi kemudian dicuci menggunakan air mengalir dan direndam selama 24 jam. Setelah dilakukan proses perendaman, bahan kemudian

ditiriskan, dipisahkan dengan kulitnya, dicuci kembali serta dikeringkan dengan bantuan sinar matahari kurang lebih selama 6 jam. Setelah itu, bahan dikeringkan kembali menggunakan oven dengan suhu 60°C selama 20 jam untuk memaksimalkan proses pengeringan. Setelah bahan benar-benar kering, dilakukan penggilingan serta pengayakan 80 mesh (Giyarto dkk., 2016, dengan modifikasi). Hasil tepung koro kratok disimpan pada suhu ruang. Diagram alir pembuatan tepung koro kratok dapat dilihat pada Gambar 3.3.

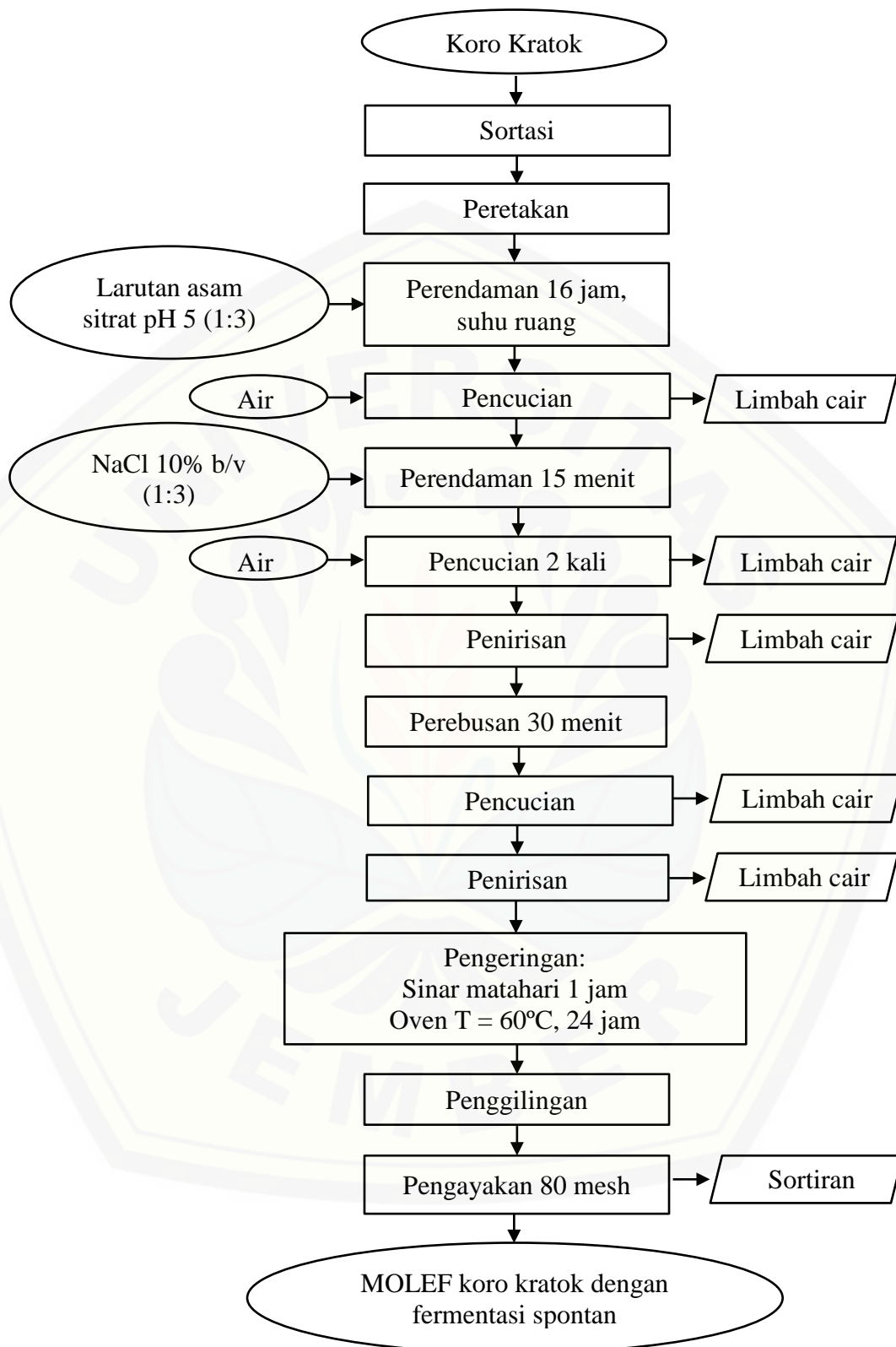
### 3.5.3 Pembuatan MOLEF Koro Kratok

- a) Pembuatan *Modified Legume Flour* (MOLEF) koro kratok dengan fermentasi spontan untuk kultur kerja

Pembuatan MOLEF koro kratok diawali dengan sortasi biji terlebih dahulu. Setelah itu, koro kratok direndam dengan perbandingan air 3:1 (b/v) selama 16 jam pada pH 5. Perendaman dilakukan untuk melunakkan tekstur koro kratok dan pH 5 dilakukan untuk memberikan kondisi asam yang optimal selama fermentasi (perendaman). Setelah direndam, koro kratok kemudian dicuci dengan air hingga bersih, lalu dilakukan perendaman dalam larutan NaCl 10% dengan perbandingan 3:1 selama 15 menit. Perendaman ini dilakukan untuk menghentikan proses fermentasi sebelumnya. Koro kratok kemudian dicuci sebanyak dua kali untuk menghilangkan NaCl dan ditiriskan. Koro kratok yang telah bersih selanjutnya direbus selama 30 menit untuk mengurangi kandungan HCN serta bau langu. Setelah itu koro kratok dicuci kembali menggunakan air bersih, ditiriskan, kemudian diiris dengan tebal 2-3 mm untuk mempermudah proses penggilingan. Proses selanjutnya yaitu pengeringan dengan menggunakan sinar matahari selama 1 jam dan dilanjutkan dengan pengeringan oven dengan suhu 60°C selama 24 jam. Koro kratok yang sudah kering kemudian digiling dan diayak menggunakan ayakan 80 mesh sehingga diperoleh *Modified Legume Flour* (MOLEF) koro kratok dengan hasil yang seragam (Nafi' dkk., 2016). Diagram alir pembuatan *Modified Legume Flour* (MOLEF) koro kratok spontan untuk kultur kerja dapat dilihat pada Gambar 3.4.



Gambar 3.3 Diagram alir pembuatan tepung koro kratok (Giyarto dkk., 2016 dengan modifikasi)



Gambar 3.4 Diagram alir pembuatan *Modified Legume Flour* (MOLEF) koro kratok dengan fermentasi spontan (Nafi' dkk., 2016)

b) Penyiapan kultur kerja *Modified Legume Flour* (MOLEF) koro kratok

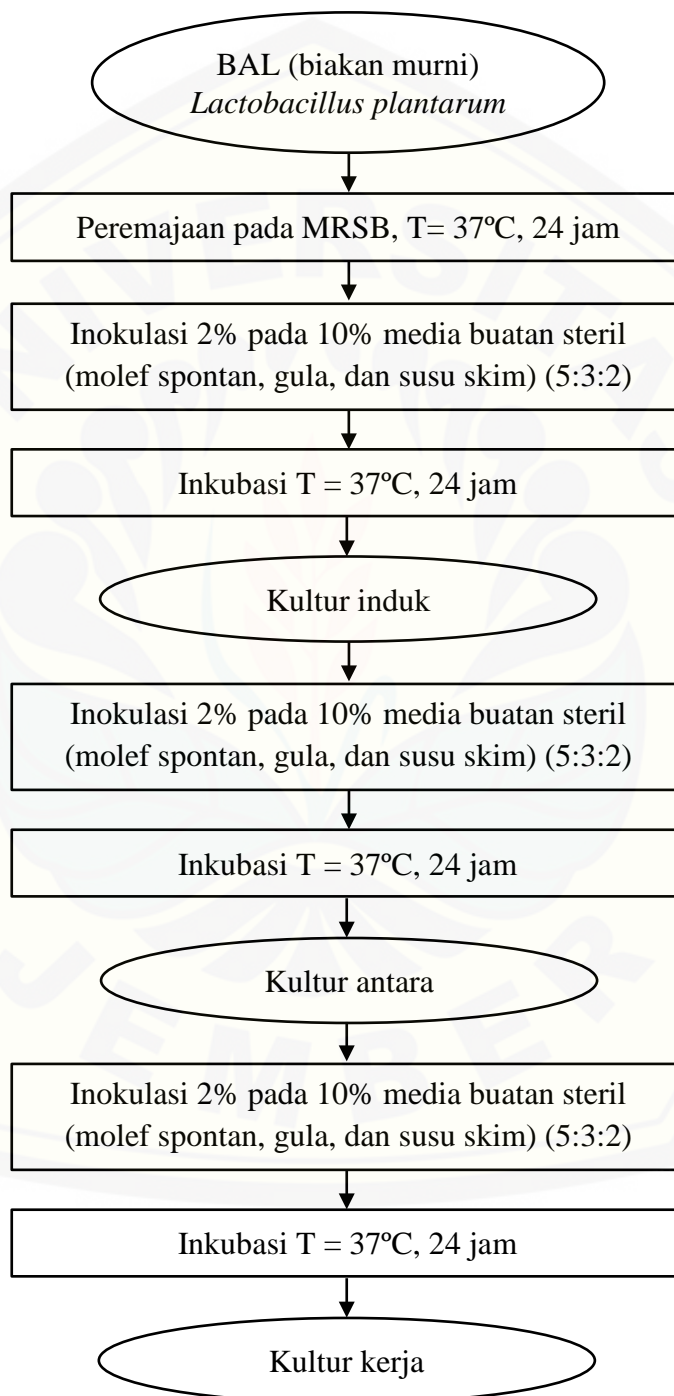
Penyiapan kultur kerja MOLEF dilakukan dengan peremajaan kultur *L. plantarum* pada media MRSB 37°C selama 24 jam. Kultur *L. plantarum* digunakan karena mempunyai kemampuan untuk mengasamkan lingkungan makanan, menghasilkan bakteriosin untuk meningkatkan keamanan pangan, mempersingkat waktu dibandingkan dengan proses fermentasi lainnya, dan *Lactobacillus plantarum* yang dominan pada lingkungan asam mengakibatkan penghambatan terhadap pertumbuhan mikroorganisme lainnya (Moghadam dkk., 2010; Beganovic dkk., 2011). Kultur hasil peremajaan sebanyak 2% v/v kemudian diinokulasikan pada 10% b/v larutan media buatan steril yang terdiri dari 5% *Modified Legume Flour* (MOLEF) spontan, 3% gula, dan 2% susu skim. Media buatan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan disebut sebagai kultur induk. Kultur induk sebanyak 2% v/v tersebut diinokulasikan pada larutan media buatan steril untuk dijadikan sebagai kultur antara. Selanjutnya, 2% v/v kultur antara tersebut diinokulasikan kembali sebagai kultur kerja (Ouweland dalam Nafi' dkk., 2016 dengan modifikasi). Diagram alir penyiapan kultur kerja *Modified Legume Flour* (MOLEF) koro kratok dapat dilihat pada Gambar 3.5.

c) Produksi *Modified Legume Flour* (MOLEF) koro kratok secara fermentasi terkendali

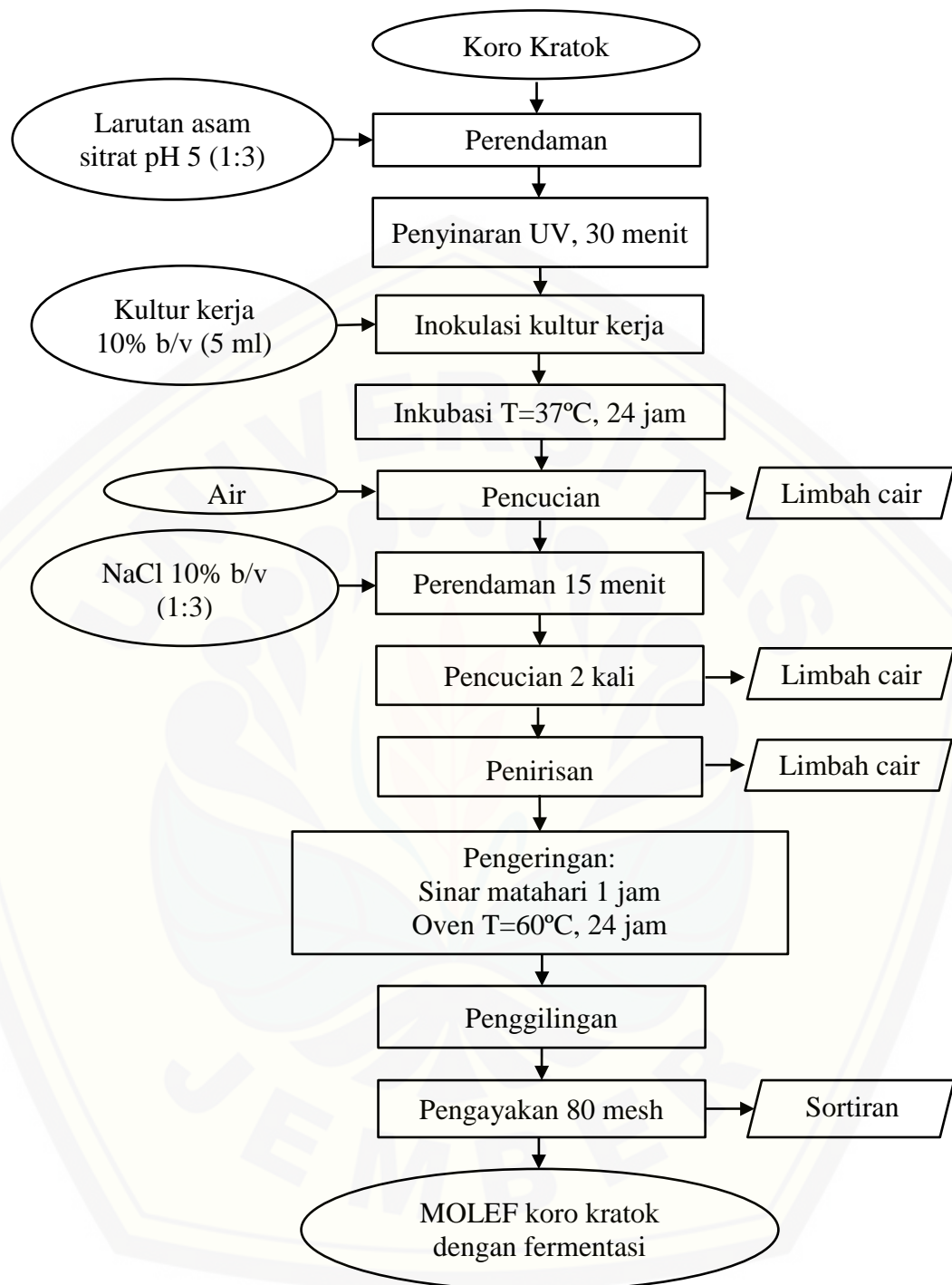
Produksi MOLEF koro kratok dengan fermentasi terkendali dilakukan dengan perendaman koro kratok dalam larutan asam sitrat dengan pH 5, kemudian diberikan sinar UV selama 30 menit untuk menghilangkan mikroorganisme lain karena dapat menghambat fermentasi dengan strain yang terspesifikasi. Setelah itu, dilakukan inokulasi 10% kultur BAL dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koro kratok yang telah difermentasi kemudian dicuci untuk menghilangkan sisa rendaman dan dilanjutkan dengan perendaman dalam larutan NaCl 10% dengan perbandingan 3:1 selama 15 menit. Perendaman ini bertujuan untuk menghentikan fermentasi. Selanjutnya, dilakukan pencucian koro kratok kembali sebanyak dua kali untuk menghilangkan NaCl pada bahan dan ditiriskan. Setelah itu, dilakukan penggilingan (*blender* basah) dan pengeringan dengan bantuan sinar matahari  $\pm 1$  jam, kemudian dilanjutkan dengan pengeringan



menggunakan oven selama  $\pm 24$  jam. Koro kratok yang telah kering kemudian digiling dan diayak menggunakan ayakan 80 mesh (Nafi' dkk., 2016). Diagram alir produksi *Modified Legume Flour* (MOLEF) koro kratok secara fermentasi terkendali dapat dilihat pada Gambar 3.6.



Gambar 3.5 Diagram alir penyiapan kultur kerja *Modified Legume Flour* (MOLEF) koro kratok (Nafi' dkk., 2016)



Gambar 3.6 Diagram alir produksi *Modified Legume Flour* (MOLEF) koro kratok secara fermentasi terkendali (Nafi' dkk., 2016)

#### 3.5.4 Ekstraksi Lunatin

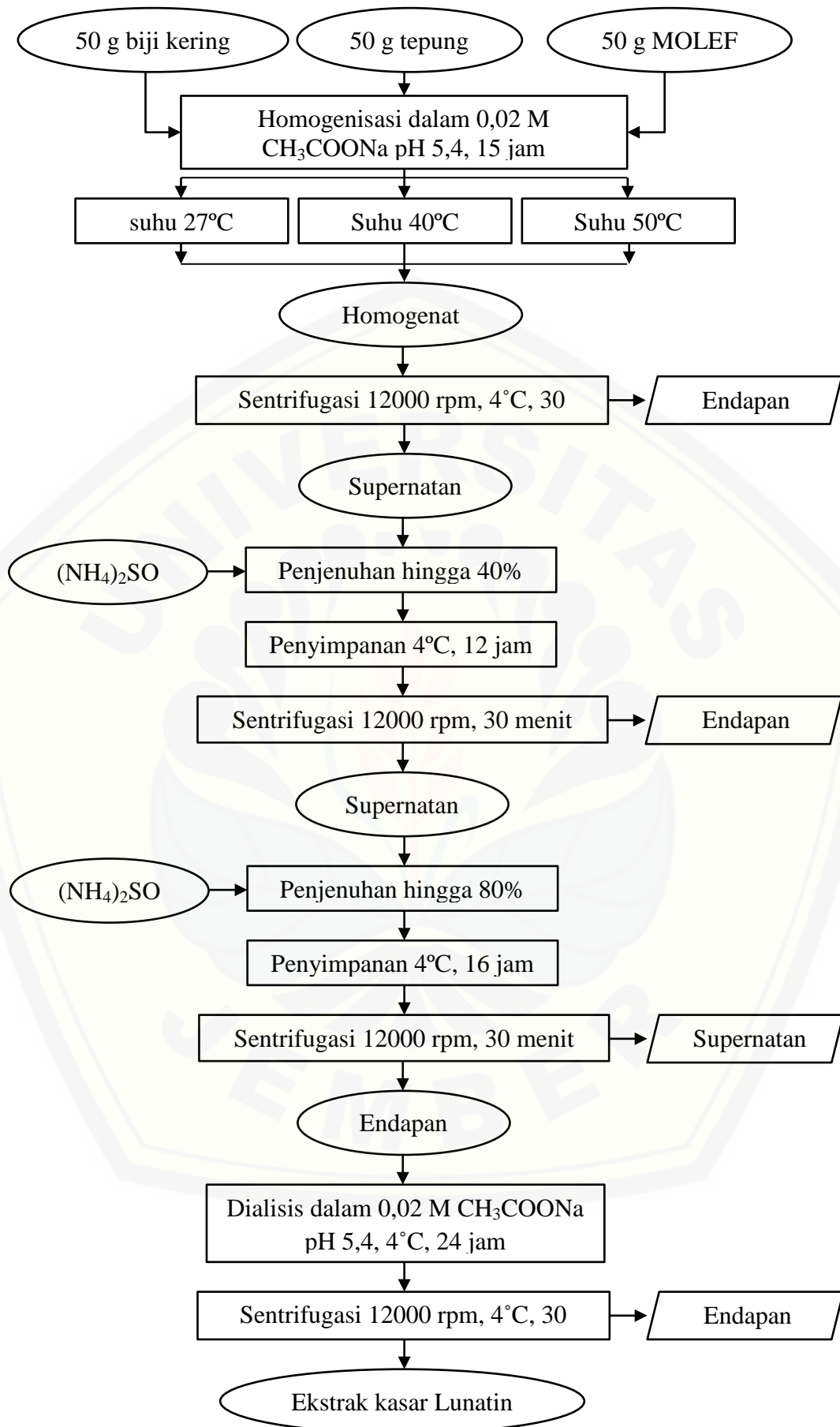
50 g bahan (biji koro kratok kering yang dihancurkan, tepung koro kratok, dan MOLEF koro kratok) homogenisasi dengan 0,02 M buffer natrium asetat pada pH 5,4 selama 15 jam dengan variasi suhu 27°C, 40°C, dan 50°C. Homogenat yang diperoleh disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh kemudian disebut sebagai ekstrak awal (Wu dkk., 2016).

Ekstrak awal diambil sebanyak 50 ml dan dijenuhkan sampai tingkat kejenuhan 40% dengan penambahan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , lalu disimpan pada suhu 4°C selama 12 jam. Setelah itu, larutan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh kemudian dijenuhkan kembali sampai tingkat kejenuhan 80% dengan penambahan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dan disimpan selama 16 jam pada suhu 4°C. Hari berikutnya akan terjadi kenaikan volume, suspensi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 menit. Presipitat yang diperoleh selanjutnya dilarutkan dalam 500 mL buffer natrium asetat 0,02 M dengan pH 5,4 dan didialisis selama 24 jam pada suhu 4°C. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C kemudian supernatan yang diperoleh disimpan pada suhu 4°C (Wu dkk., 2016 dan Marndi, 2012). Diagram alir ekstraksi Lunatin dapat dilihat pada Gambar 3.7.

#### 3.6 Parameter Pengamatan

Parameter yang akan diamati pada ekstraksi dan karakterisasi lunatin ini antara lain:

- a) Total protein dalam olahan bahan baku (biji koro kratok kering yang dihancurkan, tepung koro kratok, dan MOLEF koro kratok) (Otsuki dkk., 1983)
- b) Berat molekul pita protein, metode SDS-PAGE (Laemmli, 1970)
- c) Aktivitas Antioksidan dengan DPPH (Mensor dkk., 2001)
- d) Aktivitas Antifungi (Wu dkk., 2016)



Gambar 3.7 Diagram alir ekstraksi lunatin (Wu dkk., 2016 dan Marndi, 2012)

### 3.7 Prosedur Analisis

#### 3.7.1 Total Protein dalam Olahan Bahan Baku (Otsuki dkk., 1983)

Penentuan total protein dilakukan menggunakan alat berupa C-N Corder yang dapat menentukan kandungan karbon serta nitrogen dalam bahan. Sampel ditimbang terlebih dahulu dengan berat masing-masing sampel sekitar 50 mg, kemudian diletakkan pada plat besi. Sampel diduplikasi sebanyak tiga kali, dengan kontrol berupa asam hipurat 10 mg, 20 mg, 30 mg, dan 40 mg. Sampel beserta kontrol kemudian dimasukkan ke dalam C-N Corder yang langsung terhubung dengan komputer, lalu dibiarkan prosesnya hingga  $\pm 3$  jam. Setelah proses selesai, akan diperoleh persentase karbon dan nitrogen pada bahan kemudian diperkirakan total proteinnya dengan cara mengalikan persentase nitrogen dengan faktor perkalian nitrogen (6,25). Kadar protein dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Protein} = \% \text{N} \times \text{Faktor koreksi (6,25)}$$

#### 3.7.2 Berat Molekul Pita Protein (Laemmli, 1970)

SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) dilakukan menggunakan metode Laemmli (1970) dengan mempersiapkan *precast gel* 10%; reagen untuk preparasi sampel, yang terdiri dari campuran 100 mM dithiothreitol (DTT) serta larutan yang mengandung 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8,8), 2% SDS, 20% sukrosa, dan 0,06% bromofenol biru (BPB); penanda berat molekul protein sebagai standar; serta buffer elektroda yang mengandung 25 mM Tris, 192 mM glisin, dan 0,1% SDS. Buffer elektroda diisikan ke dalam alat sistem elektroforesis mini, lalu *precast gel* 10% dipasang di dalamnya. Masing-masing sampel serta penanda berat molekul direaksikan dengan reagen untuk preparasi sampel dengan perbandingan 1:1, kemudian disentrifus dengan kecepatan 6200 rpm, dipanaskan selama 5 menit pada suhu 100°C, lalu diteteskan ke dalam sumuran *precast gel*. Alat penyuplai energi yang telah tersambung dengan sistem elektroforesis mini kemudian dijalankan dengan pengaturan arus listrik 20 mA selama kurang lebih satu jam hingga sampel mencapai dasar gel.

Pewarnaan gel dilakukan untuk lokalisasi dan visualisasi pita sampel protein, menggunakan reagen pewarna yang mengandung *Coomassie Brilliant Blue* (CBB), asam sitrat, dan reagen penstabil. Reagen pewarna dituangkan ke dalam wadah yang tahan oven gelombang mikro sekitar 50 mL. Gel yang telah dilepaskan dari kaca pengaman kemudian direndamkan ke dalamnya. Wadah kemudian ditutup dengan plastik pembungkus, diberi beberapa lubang dan dimasukkan ke dalam oven gelombang mikro selama 50 detik dengan pengaturan energi 600 W. Setelah dikeluarkan, larutan diagitasi selama 60 menit dengan kecepatan 50 rpm. Reagen pewarna kemudian diganti dengan akuades untuk pembilasan, dengan perlakuan yang sama seperti saat proses pewarnaan. Langkah tersebut dilakukan beberapa kali hingga warna pada gel terlihat jelas. Pita protein diamati pada gel dan gel kemudian diletakkan pada doc gel untuk menentukan berat molekul yang sesuai. Dilakukan perhitungan RF (*Retention Factor*) pada sampel yang telah terpisah untuk mencari berat molekul dari sampel.

### 3.7.3 Aktivitas Antioksidan dengan Penangkapan Radikal DPPH (Mensor dkk., 2001)

Aktivitas Antioksidan dengan penangkapan radikal DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ditentukan menggunakan metode Mensor dkk. (2001) dengan beberapa penyesuaian. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang, kemudian difiltrasi menggunakan filter berukuran 0,22  $\mu\text{m}$ , serta dilakukan pengenceran 5x dan 10x. 400  $\mu\text{L}$  sampel direaksikan dengan 640  $\mu\text{L}$  buffer natrium sitrat, 1 mL etanol absolut, dan 560  $\mu\text{L}$  DPPH (dalam etanol absolut). Campuran yang diperoleh dihomogenisasi selama 80 menit dengan kecepatan 100 rpm pada area yang gelap. Absorbansi dihitung pada panjang gelombang 517 nm. Hasil yang diperoleh dinyatakan sebagai aktivitas antioksidan sampel dibandingkan dengan standar (etanol 60%) dan asam askorbat. Pengujian dilakukan dengan tiga kali pengulangan. Aktivitas antioksidan dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Aktivitas Antioksidan (\%)} = \frac{(A_{\text{standar}} - A_{\text{sampel}})}{A_{\text{standar}}} \times 100\%$$

#### 3.7.4 Aktivitas Antifungi (Wu dkk., 2016)

Empat buah *paper disk* steril berdiameter 0,5 cm diletakkan dengan jarak sekitar 4 cm antara satu sama lain mengelilingi fungi yang diinokulasi dalam *Potato Dextrose Agar* (PDA) pada *petri dish* berdiameter 100 mm dan tinggi 15 mm. Sampel terpurifikasi sebanyak 10  $\mu$ L dalam 0,02 M buffer natrium asetat (pH 5,4) dimasukkan dalam *paper disk*. *Petri dish* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam hingga pertumbuhan miselia berkembang di sekitar *disk* berisi kontrol (terdiri dari buffer tanpa lektin) dan telah membentuk daerah hambatan di sekitar *disk* berisi sampel dengan aktivitas antifungi.

### 3.8 Analisis Data

Data yang telah diperoleh diolah menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA) pada taraf uji ( $\alpha$ )  $\leq$  5% untuk mengetahui pengaruh perlakuan yang diberikan terhadap parameter yang diujikan. Apabila data yang diperoleh menunjukkan perbedaan nyata maka dilanjutkan dengan uji *Tukey*. Sementara untuk mengetahui secara spesifik perlakuan yang memberikan perbedaan nyata, dilakukan uji t parsial. Uji statistik dilakukan menggunakan menggunakan aplikasi SPSS 25. Hasil keseluruhan disajikan dalam bentuk tabel, grafik, dan histogram. Kemudian data tersebut dianalisa secara deskriptif serta dikomparasi dengan studi literatur.

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian yang telah dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Karakteristik kimia total protein dalam biji koro kratok kering yang dihancurkan yaitu sebesar 23,18%, tepung koro kratok sebesar 24,20%, dan MOLEF koro kratok sebesar 17,12%. Karakteristik fisik berat molekul lunatin yang terdeteksi pada semua sampel dan mendekati literatur sebelumnya adalah 30,25 kDa, variasi suhu tidak menyebabkan perbedaan pita protein yang dapat terdeteksi.
2. Karakteristik fungsional aktivitas antioksidan tertinggi dimiliki oleh ekstrak lunatin dari sampel A1B3 (biji koro kratok kering yang dihancurkan, ekstraksi 50°C) yaitu sebesar 83,58% dan aktivitas terendah dimiliki oleh ekstrak lunatin dari sampel A3B2 (MOLEF koro kratok, ekstraksi 40°C) yaitu sebesar 45,97%. Aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh proses pengolahan tetapi tidak dipengaruhi oleh suhu ekstraksi. Ekstrak lunatin dari biji koro kratok kering yang dihancurkan memiliki aktivitas antioksidan yang tertinggi, sementara ekstrak dari tepung koro kratok sejajar dengan asam askorbat, dan ekstrak dari MOLEF koro kratok memiliki aktivitas antioksidan yang paling rendah. Karakteristik fungsional aktivitas antifungi pada seluruh sampel ekstrak lunatin terhadap *Aspergillus niger* tidak signifikan, hanya membentuk zona bening di sekitar kertas cakram.

### 5.2 Saran

Diperlukan karakterisasi lebih lanjut pada ekstrak lunatin dengan terlebih dahulu melakukan purifikasi supaya ekstrak yang dihasilkan benar-benar mengandung lunatin murni sehingga dapat dikarakterisasi secara lebih detail.



**DAFTAR PUSTAKA**

- [AOAC] Association of Official Analytical Chemistry. 1990. *Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists 15<sup>th</sup> Edition*. Arlington, VA, Method 960: 52.
- Adawyah, R. 2007. *Pengolahan dan Pengawetan Ikan*. Bumi Aksara. Jakarta.
- Adeparusi, E. O. 2001. Effect of processing on the nutrients and anti-nutrients of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) flour. *Nahrung/Food*, Vol. 45, No. 2: 94-96.
- Amadou, I., M. T. Kamara, A. Tidjani, M. B. K. Foh, dan L. Guo-Wei. 2010. Physicochemical and nutritional analysis of fermented soybean protein meal by *Lactobacillus plantarum* Lp6. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, Vol. 5, No. 2: 114-118.
- Antony, H. dan T. S. Chandra. 1998. Antinutrient reduction and enhancement in protein, starch, and mineral availability in fermented flour of finger millet (*Eleusine coracana*). *Agric. Food Chem*, Vol. 46: 2578-2582.
- Arianto, A., B. Nohong, dan Nurhaedah. 2014. Analisis kandungan asam sianida (HCN) pada kacang koro pedang (*Canavalia ensiformis*) dengan menggunakan lama perendaman NaCl yang berbeda. *Jurnal Galung Tropika*, Vol. 3, No. 3: 186-191.
- Becana, M., M. A. Matamoros, M. Udvardi, dan D. A. Dalton. 2010. Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules. *New Phytologist*, Vol. 188: 960-976.
- Beganovic, J., A. L. Pavunc, K. Gjuracic, M. Spoljarec, J. Suskovic, dan B. Kos. 2011. Improved sauerkraut production with probiotic strain *Lactobacillus plantarum* L4 and *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954. *Journal of Food Science*, Vol. 76: 124-129.
- Bobbarala, V., P. K. Katikala, K. C. Naidu, dan S. Penumajji. 2009. Antifungal activity of selected plant extracts against phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* F2723. *Indian J. Sci. Technol.*, Vol. 20: 87-90.
- Cardador-Martínez, A., G. Loarca-Piña, dan B. D. Oomah. 2002. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 50: 6975-6980.

- Carrasco-Castilla, J., A. J. Hernández-Álvarez, C. Jiménez-Martínez, C. Jacinto-Hernández, M. Alaiz, J. Girón-Calle, J. Vioque, dan G. Dávila-Ortiz. 2012. Antioxidant and metal chelating activities of *Phaseolus vulgaris* L. var. Jamapa protein isolates, phaseolin and lectin hydrolysates. *Food Chemistry*, Vol. 131: 1157-1164.
- Diniyah, N., W. S. Windarti, dan Maryanto. 2013. Pengembangan teknologi pangan berbasis koro-koroan sebagai pangan alternatif pensubstitusi kedelai. *Prosiding Semnas Pengembangan Sumber Daya Lokal untuk Mendorong Ketahanan Pangan dan Ekonomi*. UPN Veteran, Jawa Timur.
- Diniyah, N., W. S. Windarti, Maryanto, dan S. Riady. 2015. Sifat fungsional tepung koro kratok hitam, merah dan putih (*Phaseolus lunatus* L.) dengan perlakuan lama perendaman. *Jurnal Hasil Penelitian Industri*, Vol. 28, No. 2: 70-77.
- Doss, A., M. Pugalenth, V. G. Vadivel, G. Subhashini, dan R. A. Subash. 2011. Effect of processing technique on the nutritional composition and antinutrients content of under utilized food legume *Canavalia ensiformis*. *International Food Research Journal*, Vol 18, No. 3: 965-970.
- Dungkir, S. G., D. G. Katja, V. S. Kamu. 2012. Aktivitas antioksidan ekstrak fenolik dari kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Jurnal MIPA Unsrat Online*, Vol. 1, No. 1: 11-15.
- e Lacerda, R. R., E. S. do Nascimento, J. T. J. G. de Lacerda, L. S. Pinto, C. Rizzi, M. M. Bezerra, I. R. Pinto, S. M. P. Filho, V. P. T. Pinto, G. C. Filho, C. A. A. Gadelha, dan T. S. Gadelha. 2017. Lectin from seeds of a Brazilian lima bean variety (*Phaseolus lunatus* L. var. Cascavel) presents antioxidant, antitumour and gastroprotective activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 95: 1072-1081.
- Elias, R. J., S. S. Kellerby, E. A. Decker. 2008. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, Vol. 48: 430-441.
- Feyi, A. S. 2014. Effect of soaking time on the proximate, mineral compositions, and anti-nutritional factors of lima bean. *Journal Food Science and Quality Management*, Vol. 27: 1-3.
- Frehner, M. dan E. E. Conn. 1987. The linamarin  $\beta$ -glucosidase in Costa Rican wild lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) is apoplastic. *Plant Physiol.*, Vol. 84: 1296-1300.
- Friedman, M. 1996. *Food Chemistry 3<sup>rd</sup> Ed.* Marcel Dekker Inc. New York.

- Galbraith, W. dan I. J. Goldstein. 1970. Phytohemagglutinins: a new class of metalloproteins. Isolation, purification, and some properties of the lectin from *Phaseolus lunatus*. *Febs Letters*, Vol. 9, No. 4: 197-201.
- Galbraith, W. dan I. J. Goldstein. 1972. Phytohemagglutinin of the lima bean (*Phaseolus lunatus*): isolation, characterization, and interaction with type A blood-group substance. *Biochemistry*, Vol. 11, No. 21: 3976-3984.
- Gautam, A. K., S. Sharma, S. Avasthi, dan R. Bhadauria. 2011. Diversity, pathogenicity and toxicology of *A. niger*: an important spoilage fungi. *Research Journal of Microbiology*, Vol. 6: 270-280.
- Giyarto, I. N. Hafidoh, dan W. S. Windarti. 2016. Sifat fungsional tepung bumbu hasil formulasi dengan penggunaan tepung koro kratok. *Prosiding Seminar Nasional APTA*, hal. 227-230. Jember, 26-27 Oktober 2016.
- Gould, N. R. dan S. L. Scheinberg. 1970. Isolation and partial characterization of two anti-A hemagglutinins from *P. lunatus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 137, Vo. 1: 1970.
- Huisman, J. 1991. Antinutritional factors in poultry feeds and their management. *8th European Symposium Poultry Nutrition*: 42-61. Venezia-Mestre, Italia, 14-17 Oktober 1991.
- Jay J. M., M. J. Loessner, dan D. A. Golden. 2005. *Modern Food Microbiology 7<sup>th</sup> Edition*. Springer. New York.
- Kanatt, S. R., Arjun K., dan A. Sharma. 2011. Antioxidant and antimicrobial activity of legume hulls. *Food Research International*, Vol. 44: 3182-3187.
- Kanetro, B., dan S. Hastuti. 2006. *Ragam Produk Olahan Kacang-kacangan*. Universitas Wangsa Manggala Press. Yogyakarta.
- King, T. P., A. Pusztai, dan E. M. Clarke. 1982. Kidney bean lectin-induced lesions in rat small intestine: 3. Ultrastructural studies. *J. Comp. Path.*, Vol. 92: 357-372.
- Kurniawati, N. 2007. Aktivitas proteolitik dan mutu protein dendeng sapi yang difermentasi *Lactobacillus plantarum* hasil isolasi dari daging sapi. *Skripsi*. Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.

- Kusmiati dan A. Malik. 2002. Aktivitas bakteriosin dari bakteri *Leuconostoc mesentroides* Pbac1 pada berbagai media. *Bulletin Kesehatan*, Vol. 6, No. 1:1-7.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London), Vol. 227: 680-685.
- Liu, Z., P. Zhang, Y. Ma, H. Chen, Y. Zhou, M. Zhang, Z. Chu, dan H. Qin. 2011. *Lactobacillus plantarum* prevents the development of colitis in IL-10-deficient mouse by reducing the intestinal permeability. *Journal of Molecular Biology Rep.*, Vol. 38: 1353-1361.
- Lyli, S. M. 1987. Penentuan daya hambat zat antitripsin yang dapat dalam biji kedelai terhadap aktivitas tripsin pada substrat kasein secara spektrofotometrik. *Skripsi*. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Surabaya.
- Marndi, R. 2012. Isolation and characterization of concanavalin A from the seeds of *Canavalia ensiformis*. *Thesis*. Department of Life Science. National Institute Of Technology. Rourkela, Odisha, India.
- Mensor, L. L., F. S. Meneses, G. G. Leitão, A. S. Reis, T. C. dos Santos, C. S. Coube, dan S. G. Leitão. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, Vol. 15: 127-130.
- Moghadam, M. S., H. L. Foo, T. C. Leow, R. A. Rahim, dan T. C. Loh. 2010. Novel bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* strains and their differentiation by sequence analysis of 16S rDNA, 16S-23S and 23S-5S intergenic spacer regions and randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Food Technology Biotechnology*, Vol. 48: 476-483.
- Montgomery, D. R. 1980. Cyanogens. *In: Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*. Academic Press. New York.
- Muchtadi T. R. dan F. Ayustaningwarno. 2010. *Teknologi Proses Pengolahan Pangan*. Alfabeta. Bandung.
- Mukhraini. 2014. Ekstraksi, pemisahan senyawa dan identifikasi senyawa aktif. *Jurnal Kesehatan*, Vol. 7, No. 2: 361-367.
- Nafi', A., N. Diniyah, dan F. T. Hastuti. 2015. Karakteristik fisikokimia dan fungsional teknis tepung koro kratok (*Phaseolus lunatus* L.) termodifikasi

- yang diproduksi secara fermentasi spontan. *Agrointek*, Vol. 9, No.1: 24-32.
- Nafi', A., N. F. Isnaini, dan D. A. Putri. 2016. Pembuatan nugget jamur merang (*Volvariella volvaceae*) dengan variasi rasio MOLEF (*Modified Legume Flour*) koro kratok (*Phaseolus lunatus L.*). *Prosiding Seminar Nasional APTA*, hal. 231-237. Jember, 26-27 Oktober 2016.
- Nafi', A., T. Susanto, dan A. Subagio. 2006. Pengembangan Tepung Kaya Protein (TKP) dari koro komak (*Lablab purperus L. Sweet*) dan koro kratok (*Phaseolus lunatus L.*). *Jurnal Teknol. dan Industri Pangan*, Vol. 17, No. 3: 159-165.
- Narayana, K. J. P., M. Srikanth, M. Vijayalakshmi, dan N. Lakshmi. 2007. Toxic spectrum of *Aspergillus niger* causing black mold rot of onions. *Res. J. Microbiol.*, Vol. 2: 881-884.
- Newman, C. W., N. R. Roth, dan R. H. Lockerman. 1987. Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum L.*). *Nutr. Rep. Int.*, Vol. 36: 1-5.
- Noverita. 2009. Identifikasi kapang dan khamir penyebab penyakit manusia pada sumber air minum penduduk pada sungai Ciliwung dan sumber air sekitarnya. *Vis vitalis*, Vol. 2, No. 2: 12-22.
- Onweluzo, J. C. dan C. C. Nwabugwu. 2009. Fermentation of millet (*Pennisetum americanum*) and pigeon pea (*Cajanus cajan*) seeds for flour production: effects on composition and selected functional properties. *Pakistan Journal of Nutrition*, Vol. 8, No. 6: 737-744.
- Otsuki, A., Y. Ino, dan T. Fujii. 1983. Simultaneous measurements and determinations of stable carbon and nitrogen isotope ratios, and organic carbon and nitrogen contents in biological samples by coupling of a small quadrupole mass spectrophotometer and modified carbon-nitrogen elemental analyzer. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, Vol. 48: 343-346.
- Person, A. K., S. M. Chudgar, B. L. Norton, B. C. Tong, dan J. E. Stout. 2010. *Aspergillus niger*: an unusual cause of invasive pulmonary aspergillosis. *Journal of Medical Microbiology*, Vol. 59: 834-838.
- Pitt, J. I. dan A. D. Hocking. 1997. *Fungi and Food Spoilage. 2nd Edn.* Springer. New York. ISBN-10: 0834213060. Hal: 593.

- Prakash, O. and M. A. Raoof. 1989. Control of mango fruit decay with postharvest application of various chemicals against black rot, stem end rot and anthracnose disease. *Int. J. Trop. Plant Dis.*, Vol. 6: 99-106.
- Pramitha, A. R. dan S. N. Wulan. 2017. Detoksifikasi sianida umbi gadung (*Dioscorea hispida* Dennst.) dengan kombinasi perendaman dalam abu sekam dan perebusan. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, Vol. 5, No. 2: 58-65.
- Pribadi, C., I. Hartati, dan L. Kurniasari. 2014. Ekstraksi andrographolid sambiloto menggunakan larutan hidrotop natrium asetat dan ethanol dengan proses gelombang mikro. *Momentum*, Vol. 10, No. 1: 43-46.
- PROSEA. 1989. *Plant Ressources of South-East Asia I with the Compliments of Prosea Project*. Wageningen Agricultural University. Netherlands.
- Purwanti, E. dan W. Prihata. 2017. Morphological diversity and germplasm conservation strategies of *Phaseolus lunatus* L in east java. *Proceeding of 4<sup>th</sup> International Conference the Community Development in ASEAN*: 238-247. Phnom Penh, Cambodia, 22-23 Maret, 2017.
- Pusztai, A., E. M. Clarke, dan T. P. King. 1979. The nutritional toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins. *Proc. Nutr. Soc.*, Vol. 38, hal. 115-200.
- Rahayu, W., S. Ma'oen, Suliantari, dan S. Fardiaz. 1992. *Teknologi Fermentasi Produk Perikanan*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Raper, K. B. dan D. I. Fennell. 1965. *The Genus Aspergillus*. Williams and Wilkins Co. Baltimore, Maryland. Hal: 686.
- Reddy, N. R., S. K. Sathe, dan D. K. Salukhe. 1982. Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Research*, Vol. 28: 1-92.
- Ringo, E. dan F. J. Gatesoupe. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *J. Aquaculture*, Vol. 160: 177-203.
- Sharma, R. C. and D. Vir. 1986. Postharvest diseases of grapes and studies on their control with benzimidazole derivatives and other fungicides. *Pesticides*, Vol. 20: 1415-1415.
- Sharon, N. dan H. Lis. 1972. Lectins: Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science*, Vol. 177: 949-59.

- Sinha, P. and S. K. Saxena. 1987. Effect of treating tomatoes with leaf extract of *Lantana camara* on development of fruit rot caused by *A. niger* in presence of *Drosophila busckii*. *Indian J. Exp. Biol.*, Vol. 25: 143-144.
- Sri, H., R. Dian, dan D. S. Pramita. 2008. *Karakteristik Kimia (HCN, Antioksidan dan Asam Fitat) Beberapa Jenis Koro Lokal Dengan Berbagai Perlakuan Pendahuluan*. Makalah disampaikan pada Widyakarya Nasional Pangan dan Gizi. Jakarta.
- Sudarmadji, S. 1989. *Analisa Bahan Makanan*. Liberty. Yogyakarta.
- Suhardi. 1989. *Kimia dan Teknologi Protein*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Tamat, S. R., T. Wikanta, dan L. S. Maulina. 2007. Aktivitas antioksidan dan toksisitas senyawa bioaktif dari ekstrak rumput laut hijau *Ulva reticulata* Forsskal. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, Vol. 5, No. 1: 31-36.
- Wu, J., J. Wang, S. Wang, dan P. Rao. 2016. Lunatin, a novel lectin with antifungal and antiproliferative bioactivities from *Phaseolus lunatus* L. Billb. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 89, No. 7: 17-24.
- Yulistingati, N. 2017. Ekstraksi dan karakterisasi concanavalin A dari koro pedang (*Canavalia Ensiformis* L.). *Skripsi*. Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember. Jember.

**LAMPIRAN**

Lampiran A. Data Hasil Pengukuran Total Protein dalam Olahan Bahan Baku

A1. Total Protein dalam Olahan Bahan Baku

Sampel	Ulangan	Total protein	Rata-rata	SD
Biji kering yang dihancurkan	1	24,07	23,18	0,78
	2	22,63		
	3	22,83		
Tepung	1	24,19	24,20	0,03
	2	24,24		
	3	24,18		
MOLEF	1	17,29	17,12	0,16
	2	17,09		
	3	16,97		

A2. Data Sidik Ragam Total Protein dalam Olahan Bahan Baku

**ANOVA**

protein

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	87.998	2	43.999	207.642	.000
Within Groups	1.271	6	.212		
Total	89.270	8			

A3. Data Uji Beda Nyata Total Protein dalam Olahan Bahan Baku

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: protein

Tukey HSD

(I) pengolahan	(J) pengolahan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Biji kering	Tepung	-1.02667	.37585	.076	-2.1799	.1266
	MOLEF	6.06000*	.37585	.000	4.9068	7.2132
Tepung	Biji kering	1.02667	.37585	.076	-.1266	2.1799
	MOLEF	7.08667*	.37585	.000	5.9334	8.2399
MOLEF	Biji kering	-6.06000*	.37585	.000	-7.2132	-4.9068
	Tepung	-7.08667*	.37585	.000	-8.2399	-5.9334

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



**protein**Tukey HSD<sup>a</sup>

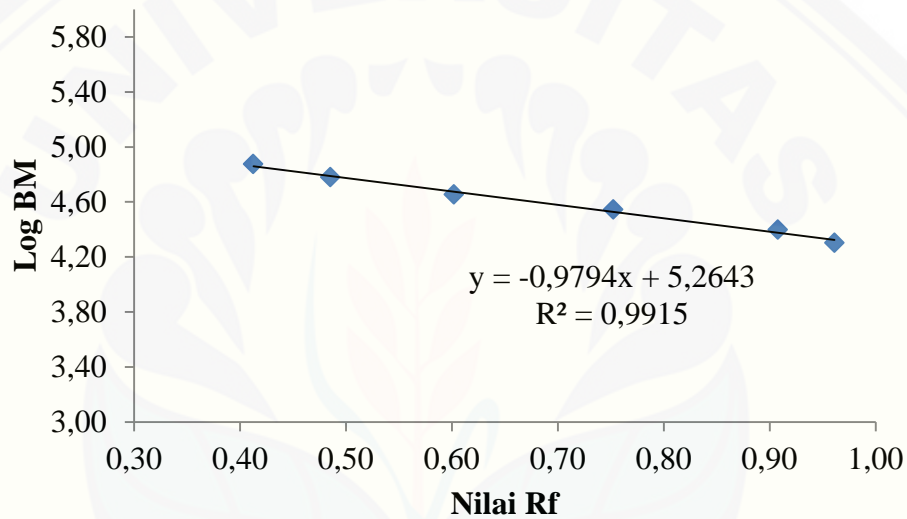
pengolahan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
MOLEF	3	17.1167	
Biji kering	3		23.1767
Tepung	3		24.2033
Sig.		1.000	.076



## Lampiran B. Data Hasil Pengukuran Berat Molekul

## B1. Kurva Standart Gel Optimasi

Berat Molekul (Da)	Jarak (r)	Rf (x)	Log BM (y)
75000	4,25	0,41	4,88
60000	5	0,49	4,78
45000	6,2	0,60	4,65
35000	7,75	0,75	4,54
25000	9,35	0,91	4,40
20000	9,9	0,96	4,30



## B2. Berat molekul pita protein pada sampel

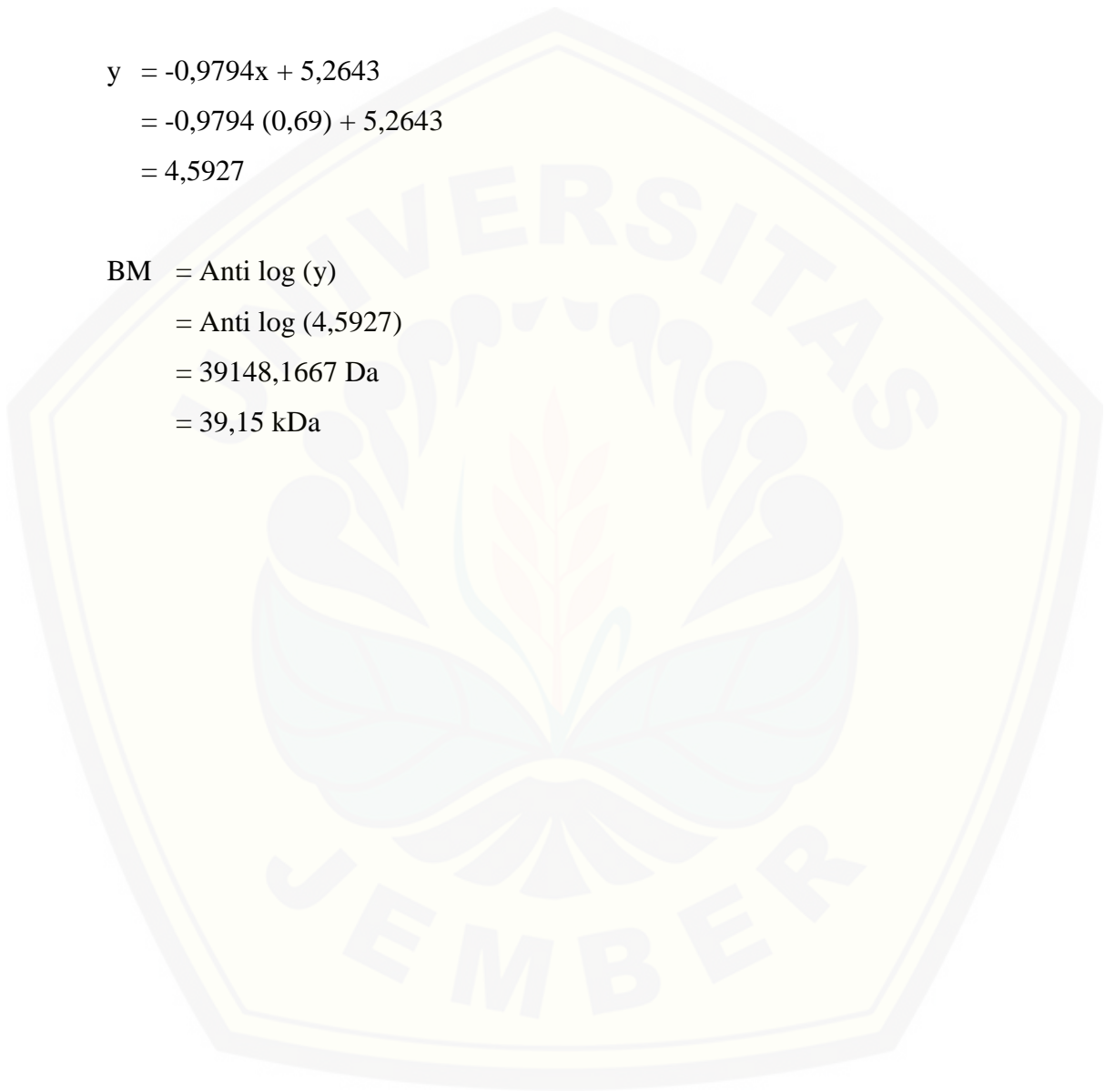
Pita protein	Jarak (r)	Rf (x)	Log BM (y)	Berat Molekul (Da)	Berat Molekul (kDa)
P1	7,20	0,69	4,5927	39148,1667	39,15
P2	7,95	0,76	4,5228	33323,7821	33,32
P3	8,40	0,80	4,4808	30253,8048	30,25
P4	8,70	0,83	4,4528	28365,9376	28,37
P5	9,30	0,89	4,3968	24936,2664	24,94
P6	9,75	0,93	4,3549	22638,9950	22,64
P7	10,1	0,96	4,3222	20999,5736	21,00

**B3. Contoh perhitungan berat molekul**

$$\begin{aligned} R_f(x) P1 &= r/\text{lebar gel} \\ &= 7,20/10,5 \\ &= 0,69 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} y &= -0,9794x + 5,2643 \\ &= -0,9794 (0,69) + 5,2643 \\ &= 4,5927 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BM} &= \text{Anti log } (y) \\ &= \text{Anti log } (4,5927) \\ &= 39148,1667 \text{ Da} \\ &= 39,15 \text{ kDa} \end{aligned}$$



## Lampiran C. Data Hasil Perhitungan Aktivitas Antioksidan

## C1. Aktivitas Antioksidan Koro Kratok

Perlakuan	Ulangan	Persentase penghambatan (%)	Rata-rata	SD
Asam askorbat	1	59,24	60,65	1,99
	2	62,06		
A1B1	1	82,52	82,69	0,25
	2	82,87		
A1B2	1	84,29	82,00	0
	2	84,29		
A1B3	1	82,69	83,58	1,25
	2	84,47		
A2B1	1	61,10	61,99	1,25
	2	62,87		
A2B2	1	61,99	63,22	1,73
	2	64,44		
A2B3	1	63,49	64,61	1,59
	2	65,74		
A3B1	1	47,41	47,75	0,48
	2	48,08		
A3B2	1	45,19	45,97	1,09
	2	46,74		
A3B3	1	48,49	48,86	0,52
	2	49,23		

## C2. Data Sidik Ragam Pengaruh Kombinasi Perlakuan

Variables Entered/Removed <sup>a</sup>			
Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	suhu, pengolahan <sup>b</sup>	.	Enter

a. Dependent Variable: penghambatan

b. All requested variables entered.

## Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.995 <sup>a</sup>	.989	.988	1.66478

**ANOVA<sup>a</sup>**

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	3894.786	2	1947.393	702.650	.000 <sup>b</sup>
	Residual	41.572	15	2.771		
	Total	3936.358	17			

a. Dependent Variable: penghambatan

b. Predictors: (Constant), suhu, pengolahan

**C3. Data Uji Beda Nyata Pengaruh Kombinasi Perlakuan****Coefficients<sup>a</sup>**

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	99.227	1.415		70.136	.000
	pengolahan	-17.999	.481	-.994	-37.453	.000
	suhu	.772	.481	.043	1.606	.129

**C4. Data Sidik Ragam Perhitungan Aktivitas Antioksidan****Test of Homogeneity of Variances**

		df1	df2	Sig.
penghambatan	Based on Mean	8	9	.000
	Based on Median	8	9	.000
	Based on Median and with adjusted df	8	2.579	.000
	Based on trimmed mean	8	9	.000

**ANOVA**

penghambatan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3925.914	8	490.739	422.893	.000
Within Groups	10.444	9	1.160		
Total	3936.358	17			

## C5. Data Uji Beda Nyata Perhitungan Aktivitas Antioksidan

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: penghambatan

Tukey HSD

(I) kombinasi	(J) kombinasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
biji 27	biji 40	-1.59500	1.07723	.840	-5.8566	2.6666
	biji 50	-.88500	1.07723	.993	-5.1466	3.3766
	tepung 27	20.71000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	16.4484	24.9716
	tepung 40	19.48000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	15.2184	23.7416
	tepung 50	18.08000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	13.8184	22.3416
	molef 27	34.95000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	30.6884	39.2116
	molef 40	36.73000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	32.4684	40.9916
	molef 50	33.83500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	29.5734	38.0966
biji 40	biji 27	1.59500	1.07723	.840	-2.6666	5.8566
	biji 50	.71000	1.07723	.998	-3.5516	4.9716
	tepung 27	22.30500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	18.0434	26.5666
	tepung 40	21.07500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	16.8134	25.3366
	tepung 50	19.67500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	15.4134	23.9366
	molef 27	36.54500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	32.2834	40.8066
	molef 40	38.32500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	34.0634	42.5866
	molef 50	35.43000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	31.1684	39.6916
biji 50	biji 27	.88500	1.07723	.993	-3.3766	5.1466
	biji 40	-.71000	1.07723	.998	-4.9716	3.5516
	tepung 27	21.59500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	17.3334	25.8566
	tepung 40	20.36500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	16.1034	24.6266
	tepung 50	18.96500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	14.7034	23.2266
	molef 27	35.83500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	31.5734	40.0966
	molef 40	37.61500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	33.3534	41.8766
	molef 50	34.72000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	30.4584	38.9816
tepung 27	biji 27	-20.71000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-24.9716	-16.4484
	biji 40	-22.30500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-26.5666	-18.0434
	biji 50	-21.59500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-25.8566	-17.3334
	tepung 40	-1.23000	1.07723	.951	-5.4916	3.0316
	tepung 50	-2.63000	1.07723	.363	-6.8916	1.6316
	molef 27	14.24000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	9.9784	18.5016
	molef 40	16.02000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	11.7584	20.2816
	molef 50	13.12500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	8.8634	17.3866

(I) kombinasi	(J) kombinasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
tepung 40	biji 27	-19.48000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-23.7416	-15.2184
	biji 40	-21.07500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-25.3366	-16.8134
	biji 50	-20.36500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-24.6266	-16.1034
	tepung 27	1.23000	1.07723	.951	-3.0316	5.4916
	tepung 50	-1.40000	1.07723	.909	-5.6616	2.8616
	molef 27	15.47000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	11.2084	19.7316
	molef 40	17.25000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	12.9884	21.5116
	molef 50	14.35500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	10.0934	18.6166
tepung 50	biji 27	-18.08000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-22.3416	-13.8184
	biji 40	-19.67500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-23.9366	-15.4134
	biji 50	-18.96500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-23.2266	-14.7034
	tepung 27	2.63000	1.07723	.363	-1.6316	6.8916
	tepung 40	1.40000	1.07723	.909	-2.8616	5.6616
	molef 27	16.87000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	12.6084	21.1316
	molef 40	18.65000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	14.3884	22.9116
	molef 50	15.75500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	11.4934	20.0166
molef 27	biji 27	-34.95000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-39.2116	-30.6884
	biji 40	-36.54500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-40.8066	-32.2834
	biji 50	-35.83500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-40.0966	-31.5734
	tepung 27	-14.24000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-18.5016	-9.9784
	tepung 40	-15.47000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-19.7316	-11.2084
	tepung 50	-16.87000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-21.1316	-12.6084
	molef 40	1.78000	1.07723	.760	-2.4816	6.0416
	molef 50	-1.11500	1.07723	.971	-5.3766	3.1466
molef 40	biji 27	-36.73000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-40.9916	-32.4684
	biji 40	-38.32500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-42.5866	-34.0634
	biji 50	-37.61500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-41.8766	-33.3534
	tepung 27	-16.02000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-20.2816	-11.7584
	tepung 40	-17.25000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-21.5116	-12.9884
	tepung 50	-18.65000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-22.9116	-14.3884
	molef 27	-1.78000	1.07723	.760	-6.0416	2.4816
	molef 50	-2.89500	1.07723	.270	-7.1566	1.3666
molef 50	biji 27	-33.83500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-38.0966	-29.5734
	biji 40	-35.43000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-39.6916	-31.1684
	biji 50	-34.72000 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-38.9816	-30.4584
	tepung 27	-13.12500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-17.3866	-8.8634
	tepung 40	-14.35500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-18.6166	-10.0934
	tepung 50	-15.75500 <sup>*</sup>	1.07723	.000	-20.0166	-11.4934
	molef 27	1.11500	1.07723	.971	-3.1466	5.3766
	molef 40	2.89500	1.07723	.270	-1.3666	7.1566

**penghambatan**Tukey HSD<sup>a</sup>

kombinasi	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
molef 40	2	45.9650		
molef 27	2	47.7450		
molef 50	2	48.8600		
tepung 27	2		61.9850	
tepung 40	2		63.2150	
tepung 50	2		64.6150	
biji 27	2			82.6950
biji 50	2			83.5800
biji 40	2			84.2900
Sig.		.270	.363	.840

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.



Lampiran D. Dokumentasi Kegiatan Penelitian



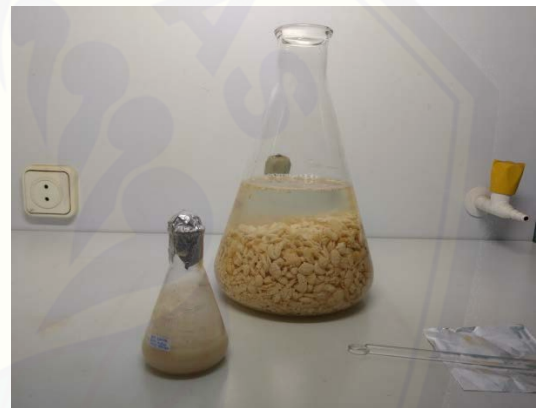
Pengeringan biji koro kratok



Pengayakan tepung koro kratok



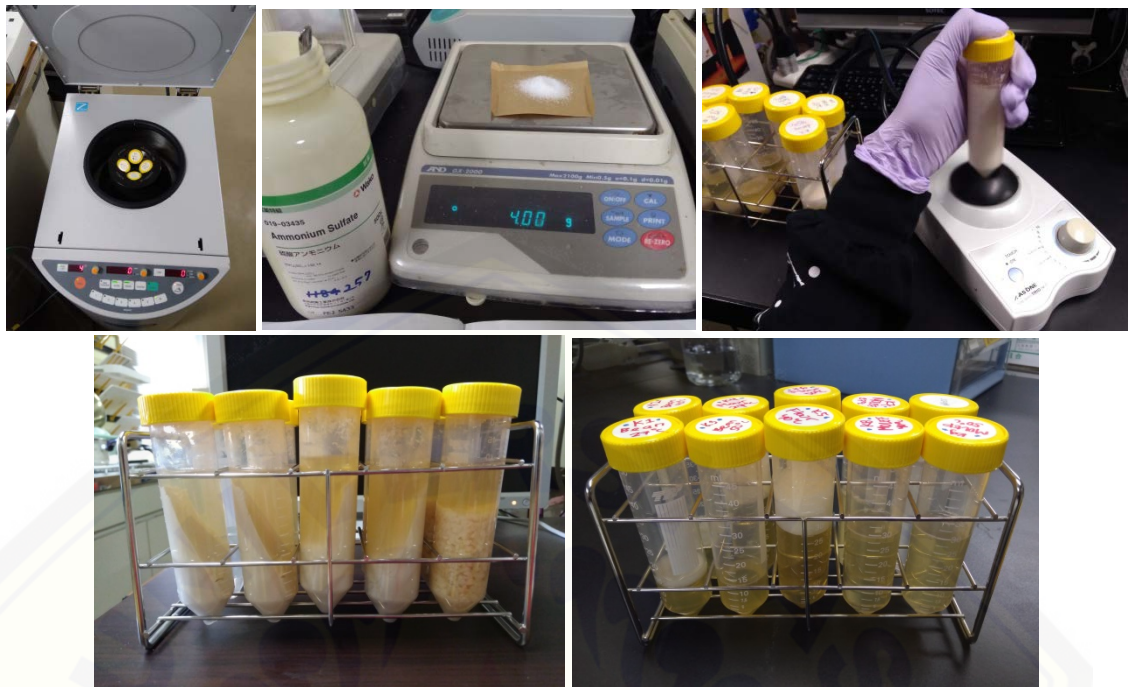
Fermentasi spontan koro kratok



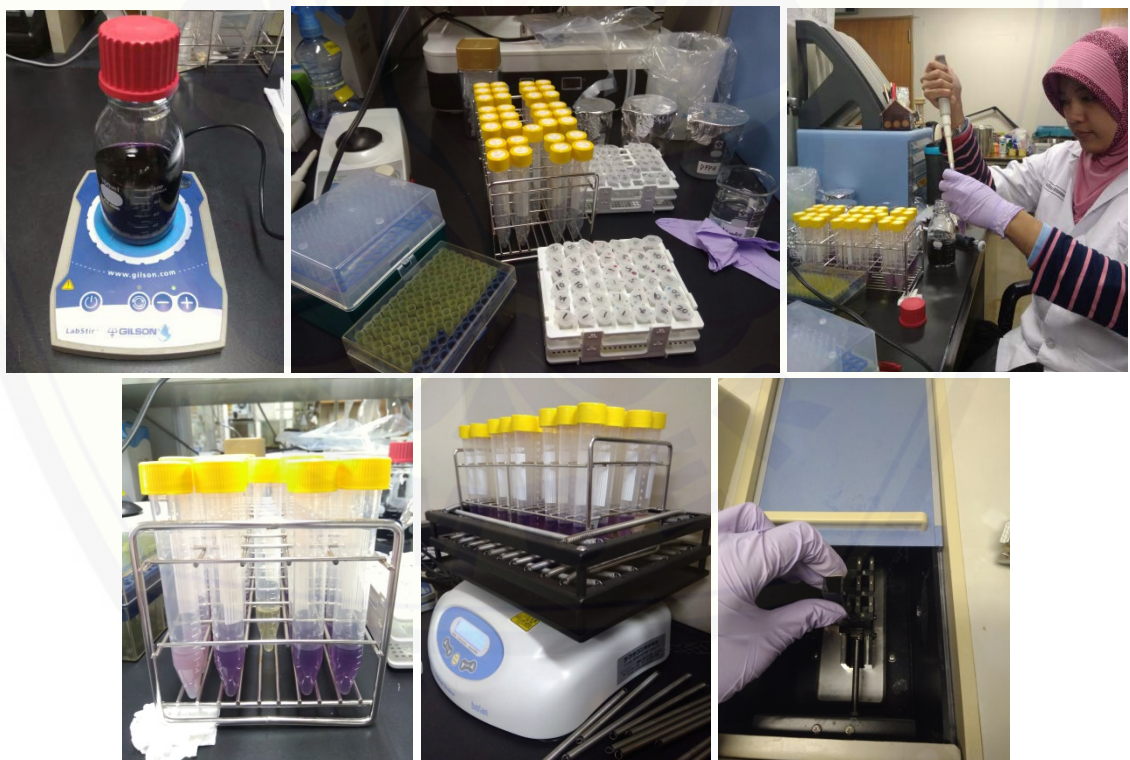
Inokulasi kultur kerja untuk fermentasi terkendali koro kratok



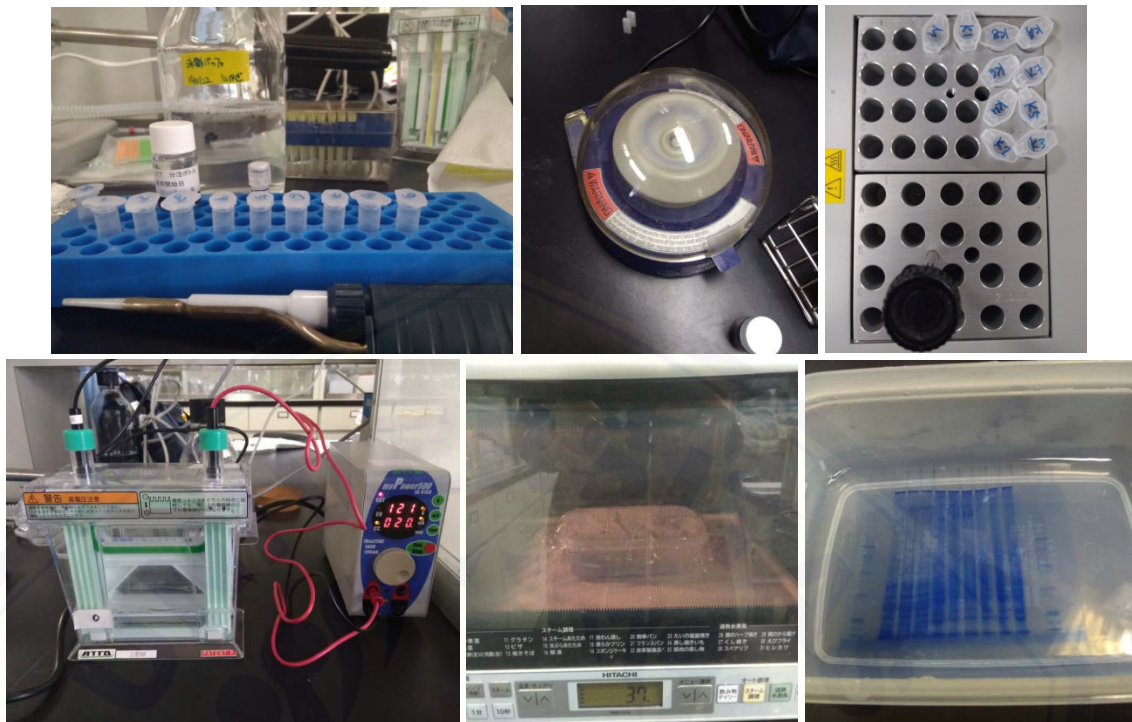
Homogenisasi sampel koro kratok



Ekstraksi protein dari sampel koro kratok



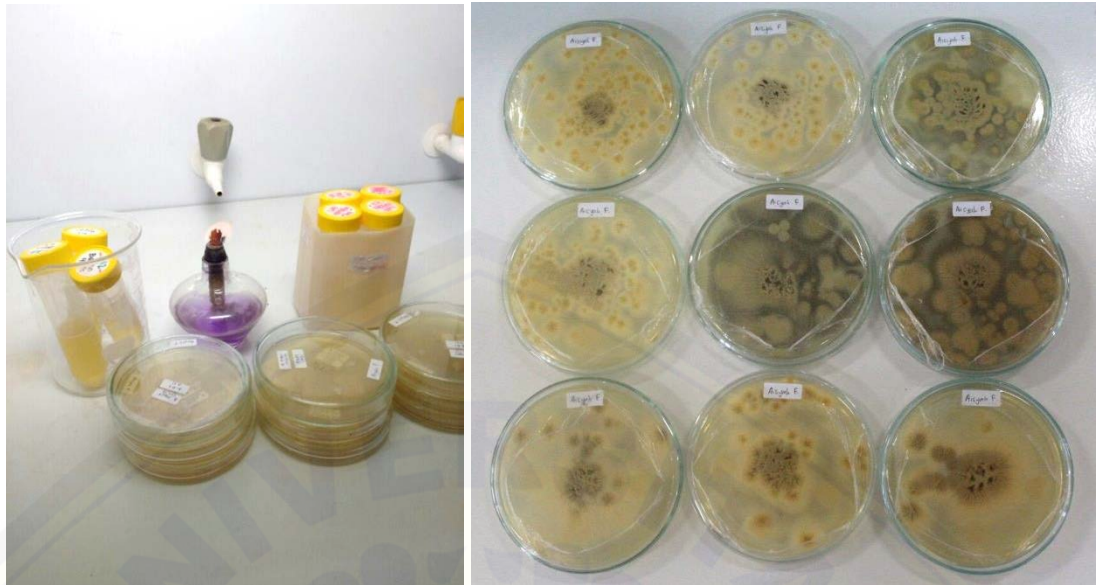
Pengujian aktivitas antioksidan dengan DPPH



Pengujian berat molekul dengan SDS-PAGE



Pengujian total protein dengan CN Coder



Pengujian aktivitas antifungi

