

## Identification of Antioxidant Levels, Catechin, Tannin, Crude Protein, and Crude Fiber from the Fermentation of Gambir Leaves (*Uncaria gambir* R.) using *Rhizopus oligosporus* and *Lactobacillus plantarum*

Athaya Faadhilah<sup>1</sup>, Tuti Widjastuti<sup>2</sup>, and Lovita Adriani<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Pascasarjana, Fakultas Peternakan, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Indonesia

<sup>2</sup>Departemen Produksi Ternak Unggas, Fakultas Peternakan, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Indonesia

<sup>3</sup>Departemen Fisiologi dan Biokimia Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Indonesia

### Abstract

Gambir leaves (*Uncaria gambir* Roxb.) are a traditional medicine that can function as an antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, and antihyperlipidemic agent. The utilization of gambir leaves is based on the pharmacological activities. The fermentation of gambir leaves is carried out to fulfill nutritional needs and enhance health functions. This study aims to identify antioxidant activity, catechin levels, tannin levels, crude protein, and crude fiber in gambir leaves after fermentation and will be applied to broilers as a substitute for AGP. The research used experimental methods with a Completely Randomized Design consisting of 10 treatments with 3 replications. This study evaluates the effects of gambir leaf fermentation using *Rhizopus oligosporus* and *Lactobacillus plantarum* on antioxidant activity and phytochemical composition. The results show that the combination of *L. plantarum* 1.5% + *R. oligosporus* 1% produced the highest antioxidant activity (25.415 ppm) and the lowest tannin and crude fiber content. The highest increase in catechin levels was found in the combination of *L. plantarum* 2.5% + *R. oligosporus* 2% (326.87 µg/ml). This study indicates that fermentation can enhance the nutritional value of gambir leaves, making them a potential feed additive for broilers.

**Keywords:** Antioxidant activity, catechin, Gambir leaves, *Lactobacillus plantarum*, *Rhizopus oligosporus*, tannin

### Identifikasi Aktivitas Antioksidan, Katekin, Tanin, Protein Kasar, dan Serat Kasar Hasil Fermentasi Daun Gambir (*Uncaria gambir* R.) Menggunakan *Rhizopus Oligosporus* dan *Lactobacillus Plantarum*

### Abstrak

Daun gambir (*Uncaria gambir* Roxb.) merupakan obat tradisional yang dapat berfungsi sebagai antioksidan, anti-inflamasi, antibakteri dan antihiperlipidemia. Pemanfaatan daun gambir didasari oleh aktivitas farmakologi. Fermentasi daun gambir dilakukan untuk melengkapi kebutuhan nutrisi dan meningkatkan fungsi kesehatan. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi aktivitas antioksidan, kadar katekin, kadar tanin, protein kasar dan serat kasar pada daun gambir setelah difermentasi akan diaplikasikan untuk broiler sebagai pengganti AGP. Penelitian menggunakan penelitian experimental dengan Rancangan Acak Lengkap yang terdiri dari 10 perlakuan 3 ulangan. Penelitian ini mengevaluasi efek fermentasi daun gambir menggunakan *Rhizopus oligosporus* dan *Lactobacillus plantarum* terhadap aktivitas antioksidan dan komposisi fitokimia. Hasil menunjukkan bahwa kombinasi *L. plantarum* 1,5% + *R. oligosporus* 1% menghasilkan aktivitas antioksidan tertinggi (25,415 ppm) serta kadar tanin dan serat kasar terendah. Peningkatan kadar katekin tertinggi ditemukan pada kombinasi *L. plantarum* 2,5% + *R. oligosporus* 2% (326,87 µg/ml). Penelitian ini menunjukkan bahwa fermentasi dapat meningkatkan nilai nutrisi daun gambir, sehingga berpotensi sebagai aditif pakan broiler.

**Kata Kunci:** Aktivitas antioksidan, daun gambir, katekin, *Lactobacillus plantarum*, *Rhizopus oligosporus*, tanin.

### Article History:

Submitted 17 May 2024

Revised 11 July 2024

Accepted 15 July 2024

Published 20 March 2025

\*Corresponding author:

[athaya17001@mail.unpad.ac.id](mailto:athaya17001@mail.unpad.ac.id)

### Citation:

Faadhilah, A.; Widjastuti, T.; Adriani, L. Identification of Antioxidant Levels, Catechin, Tannin, Crude Protein, and Crude Fiber from the Fermentation of Gambir Leaves (*Uncaria gambir* R.) using *Rhizopus oligosporus* and *Lactobacillus plantarum*. Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 2025: 12 (1), 112-118.

## 1. Pendahuluan

Penggunaan obat tradisional yang berasal dari tanaman semakin menarik perhatian sebagai alternatif dalam pengobatan,<sup>1</sup> seperti contohnya gambir (*Uncaria gambir* Roxb.). Daun gambir mengandung banyak zat aktif yang berfungsi sebagai, antioksidan, antihiperlipidemia, anti-inflamasi, dan antibakteri.<sup>2</sup> Zat aktif yang berperan adalah senyawa polifenol dan flavonoid yaitu katekin dan tannin.

Senyawa terbanyak pada daun gambir adalah katekin dan tannin. Senyawa katekin pada daun gambir sebesar 170,26 ( $\mu\text{g/ml}$ ).<sup>3</sup> Katekin dalam daun gambir mampu memperbaiki kerusakan sel pada tubuh dan menjaga fungsi enzim. Senyawa tanin memiliki sifat yang mampu menangkap radikal bebas untuk melindungi sel dari kerusakan dan mencegah penyakit. Daun gambir memiliki kandungan tannin sebesar 52,23%<sup>4</sup> namun, tingkat tanin yang tinggi dapat mengganggu penyerapan nutrisi pada pencernaan,<sup>5</sup> sehingga memerlukan pengolahan lebih lanjut melalui proses fermentasi. Fermentasi dapat memperbaiki nilai gizi pada suatu tumbuhan<sup>6</sup> dan mampu melepas ikatan senyawa kompleks menjadi senyawa yang mudah dicerna.<sup>7</sup>

*R. oligosporus* InaCC F74 dan *L. plantarum* InaCC B122 merupakan mikroba yang relatif aman (tidak termasuk dalam golongan mikroba patogen yang menyebabkan infeksi dan racun) serta telah banyak digunakan dalam industri makanan hasil fermentasi.<sup>8</sup> Fermentasi dengan *R. oligosporus* dapat menurunkan kandungan tannin yang terdapat pada kulit pisang goroho dari 0,56% menjadi 0,20%.<sup>9</sup> Sedangkan, Fermentasi *L. plantarum* dapat meningkatkan kadar katekin pada kayu manis sebesar 3,35% dari 29,40% menjadi 32,75%,<sup>10</sup> penambahan dua mikroba pada proses fermentasi akan mendapatkan hasil maksimal pada tumbuhan.<sup>11</sup>

Fermentasi daun gambir dilakukan untuk melengkapi kebutuhan nutrisi dan meningkatkan manfaat kesehatan, dengan harapan bahwa antioksidan yang terbentuk dapat diserap dengan optimal oleh tubuh melalui saluran pencernaan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi aktivitas antioksidan, kadar katekin, kadar tannin, protein kasar dan serat kasar pada daun gambir setelah difermentasi dengan inoculum *L. plantarum* dan *R. oligosporus* dan akan diaplikasikan untuk broiler sebagai pengganti AGP.

## 2. Bahan dan Metode

### 2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah

drum fermentasi, Oven (Yenaco, China), Tabung reaksi (Iwaki, Indonesia), Pipet (Ecopipette CAPP, Denmark), *Vortex mixer* (Raypa, Spanyol), *Ultrasonic waterbath* (Raypa, Spanyol), *Refrigerated centrifuge* (Sigma, Germany), Cuvette (Brand, Germany), Spectrofotometer UV-Vis (Shimadzu, Germany), HPLC (Shimadzu, Germany), Labu ukur 10 ml, Rotavapor (Buchi, Swiss), Neraca analitik (Shimadzu, Germany), Erlenmeyer (Pyrex, Germany), Alat yang tersedia dan sudah dirangkai di Lab Pengujian dan Riset Bioteknologi (labu khjeldal, alat destruksi, alat destilasi, alat titrasi, cawan porselen, tanur).

### 2.2. Bahan

Daun gambir yang digunakan berasal dari Kabupaten Musi Banyuasin, Sumatera Selatan. *Rhizopus oligosporus* ATCC 6010 (Lab. Riset dan Pengujian Bioteknologi), *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (Lab. Riset dan Pengujian Bioteknologi), Aquadest (Aqua Science), aseton 70% (CV. Meteora Pelangi Jaya), *Folin-Ciocalteu* (Merck),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Merck), *Polyvinyl polypyrrolidone* (Fluka), Tannic acid (Merck), HCL (Merck),  $\text{FeCl}_3$  (Merck), etanol 70% (CV. Meteora Pelangi Jaya), etanol absolut (Merck), katekin murni (Nitra Kimia),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Merck),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Merck), NaOH (Merck), kertas saring (Cytiva), DPPH (Merck), MRSB (Himedia), PDA (Himedia), NaCl (Merck), MHA (Himedia), PDB (Himedia),

### 2.3. Prosedur

Rangkain penelitian yang dilakukan meliputi Preparasi Mikroorganisme, fermentasi daun gambir, dan pengujian sampel (aktivitas antioksidan, analisis katekin, analisis tannin, analisis protein kasar dan lemak kasar).

#### 2.3.1. Preparasi Mikroorganisme

*L. plantarum* ATCC 8014 diinokulasikan di permukaan agar miring MHA, sedangkan *R. Oligosporus* ATCC 6010 diinokulasi pada media PDA agar miring dan diinkubasi dengan suhu pertumbuhan  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam. Bakteri dan kapang disuspensikan dalam larutan natrium klorida 0,9%, lalu kekeruhannya disesuaikan dengan larutan standar Mc Farland 0,5, yang setara dengan  $1 \times 10^7$  -  $1 \times 10^8$  CFU/mL.

Bakteri dan kapang yang sudah panen diambil 1 ose dan dimasukkan kedalam MRSB (*Man-Rogosa Broth*) untuk bakteri, sedangkan kapang dimasukkan PDB (*Potato Dextrose Broth*) sebanyak 9 mL. Bakteri dan kapang yang sudah di dalam Borth dihomogenkan menggunakan vortex, kemudian diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam.

### 2.3.2. Fermentasi Daun Gambir

Pembuatan fermentasi daun gambir dengan menggunakan starter *R. oligosporus* dan *L. plantarum* dengan proses fermentasi cair. Perlakuan masing-masing fermentasi yaitu, P0 (tanpa fermentasi), P1 (*L. plantarum* 1,5%), P2 (*L. plantarum* 2%), P3 (*L. plantarum* 2,5%), P4 (*R. oligosporus* 1%), P5 (*R. oligosporus* 1,5%), P6 (*R. oligosporus* 2%), P7 (*L. plantarum* 1,5% + *R. oligosporus* 1%), P8 (*L. plantarum* 2% + *R. oligosporus* 1,5%), P9 (*L. plantarum* 2,5% + *R. oligosporus* 2%). Daun gambir beserta mikroorganisme yang digunakan sesuai perlakuan dimasukkan ke dalam drum fermentasi, kemudian ditambahkan aquadest hingga daun gambir terendam, diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam.

### 2.3.3. Pengujian Sampel

#### Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan fermentasi daun gambir dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Aktivitas antioksidan dapat diperhatikan melalui perubahan warna dari masing-masing sampel setelah direaksikan dengan DPPH selama inkubasi. Kemudian nilai absorbansi sampel diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada Panjang gelombang 514 nm.

#### Analisis Kadar Katekin

Pengujian kadar katekin dilakukan dengan menggunakan HPLC. Fase gerak yang digunakan adalah campuran 25% asetonitril dalam 75%, asam asetat 0,3%. Larutan standar katekin dibuat dengan melarutkan 1 mg dalam 1 ml methanol, menghasilkan larutan induk 1000 ppm. Pengenceran kembali dengan konsentrasi 250; 100; 50; 25; 10; dan 5 ppm dalam 1 mL methanol, yang kemudian disaring menggunakan filter membran 0,45 µm. Ekstraksi sampel secara maserasi dengan pelarut 70% sebanyak 100 ml dengan banyak sampel 10 gram, diamkan selama 1x24 jam, lalu filtrat dan residu dipisahkan. Filtrat dikumpulkan dan pelarut diuapkan menggunakan rotavapor, kemudian dipekatkan hingga mendapatkan ekstrak kental. Kolom C18 digunakan sebagai fase diam, dan fase gerak dialirkan melalui kolom selama 10 menit pada suhu kolom 30°C. Laju aliran fase gerak adalah 0,5 mL/menit pada panjang gelombang 280 nm untuk memastikan stabilitas dasar. 20 µL larutan standar disuntikkan ke dalam injektor dalam posisi load. Injektor diaktifkan dalam posisi inject secara simultan, dan elusi dibiarkan terjadi. Langkah yang sama dilakukan untuk sampel.

#### Analisis Kadar Tannin

Pengujian kadar tannin menggunakan, *polyvinyl polypyrrolidone* (PVPP, insoluble) sebanyak 100 mg disimpan pada tabung uji (kapasitas 10 ml). Lalu ditambahkan 1 ml aquades pH 3 dan juga 1 ml ekstrak sampel secara berurutan. Setelah itu, dihomogenkan menggunakan vortex dan disimpan dalam suhu 4°C selama 15 menit, lalu vortex kembali dan disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 minutes menggunakan *refrigerated centrifuge*. Selanjutnya, 0,1 atau 0,2 ml supernatan ekstrak sampel yang sudah dihilangkan taninnya dimasukkan ke dalam tabung uji. Lalu 0,4 ml atau 0,3 ml aquades ditambahkan ke dalam tabung uji untuk membuat volume menjadi 0,5 ml. Selanjutnya 0,25 ml *Folin-Ciocalteu* (1N) dan 1,25 ml *Sodium carbonate* (20%) ditambahkan ke dalam tabung secara berurutan. Setelah itu, tabung divortex dan didiamkan pada rak penyimpanan selama 40 menit. Terakhir, transfer larutan ke dalam cuvette untuk dibaca di dalam spektrofotometer pada absorbansi 750 nm dengan menghitung nilai absorbansi blanko.

#### Analisis Kadar Protein Kasar

Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Terdiri dari 10 perlakuan, 3 ulangan dan di analisis statistik dengan uji F serta uji jarak berganda Duncan (DMRT) untuk memastikan keakuratan hasil berdasarkan variabilitas biologis

Penentuan kadar protein kasar diawali dengan menghitung persentase nitrogen dengan rumus<sup>12</sup>:

$$N = \frac{\text{titrasi formol}}{B \times 1000} \times N \text{ NaOH} \times 14,008 \times 100\%$$

Keterangan:

N : Besarnya Kandungan Nitrogen  
Titrasi formol : Volume Titran Sampel – Volume Titran Blanko  
N NaOH : Normalitas NaOH  
B : Berat Sampel

Rumus Protein:

$$\% \text{protein} = FK \times \%N$$

Keterangan:

FK : Faktor Koreksi  
N : Kandungan Nitrogen

#### Analisis Kadar Serat Kasar

Analisis dilakukan dengan sampel 2,5 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml dan ditambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mL dan direfluks selama 30 menit, lalu endapan di saring dan dinetralkan dengan aquadest, kemudian ditambahkan NaOH 100 mL dan di refluks

kembali selama 30 menit. Setelah itu disaring kembali menggunakan kertas saring. Penentuan kadar serat kasar dilakukan perhitungan dengan rumus<sup>13</sup>:

$$\text{Serat Kasar} = \frac{A-B}{\text{Berat Sampel}} \times 100\%$$

Keterangan:

A : Bobot Endapan Pada Kertas Saring (g)

B : Bobot Abu (g)

### 3. Hasil

#### 3.1. Aktivitas Antioksidan

Uji hasil identifikasi fermentasi daun gambir terhadap aktivitas antioksidan berbeda nyata  $P(<0,05)$  dengan hasil maksimal pada P7 sebesar 25,415 ppm yang terlihat pada Tabel 1. Nilai aktivitas antioksidan menggunakan campuran *L. Plantarum* dan *R. Oligosporus* mendapatkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan penggunaan inokulum tunggal.

#### 3.2. Kadar Katekin

Uji hasil identifikasi fermentasi daun gambir terhadap kadar katekin berbeda nyata  $P(<0,05)$  dengan nilai maksimal pada P9 sebesar 326,87 µg/ml menggunakan campuran antara *L. plantarum* dan *R. oligosporus* yang tersedia pada Tabel1. Sedangkan, hasil dari fermentasi menggunakan inokulum *R. oligosporus* pada P4 mendapatkan nilai maksimal kedua yaitu 322,82 µg/ml dan fermentasi dengan inokulum *L. plantarum* mendapatkan nilai maksimal pada P3 yaitu 251,95 µg/ml.

#### 3.3. Kadar Tannin

Uji hasil identifikasi fermentasi daun gambir terhadap kadar tanin berbeda nyata  $P(<0,05)$  dengan hasil terendah pada P7 yaitu 5,44% menggunakan

campuran antara *L. plantarum* dan *R. oligosporus* yang tersedia pada Tabel1. Sedangkan, hasil terendah dari fermentasi menggunakan inokulum *R. oligosporus* yaitu P4 mendapatkan 14,29% dan fermentasi dengan inokulum *L. plantarum* yang terendah adalah P2 dengan nilai 5,47%.

#### 3.4. Kadar Protein kasar dan Serat Kasar

Uji hasil identifikasi fermentasi daun gambir terhadap protein kasar berbeda nyata  $P(<0,05)$  dengan nilai maksimal pada P3 sebesar 13,55% menggunakan *L. plantarum* yang terlihat pada Tabel 2. Sedangkan, hasil dari fermentasi campuran inokulum *L. plantarum* dan *R. oligosporus* pada P9 mendapatkan nilai maksimal kedua yaitu 13,53% dan fermentasi menggunakan inokulum *R. oligosporus* mendapatkan nilai maksimal pada P4 yaitu 13,44%.

Uji hasil identifikasi fermentasi daun gambir terhadap serat kasar berbeda nyata  $P(<0,05)$  dengan hasil terendah pada P7 yaitu 15,78% menggunakan campuran antara *L. plantarum* dan *R. oligosporus* yang tersedia pada Tabel 2. Sedangkan, hasil terendah dari fermentasi menggunakan inokulum *R. oligosporus* yaitu P6 mendapatkan 17,58% dan fermentasi dengan inokulum *L. plantarum* yang terendah adalah P3 dengan nilai 19,66%.

### 4. Pembahasan

#### 4.1. Aktivitas Antioksidan

Hasil analisis menunjukkan bahwa fermentasi P7 mendapatkan hasil maksimal sebesar 25,415 (ppm), sehingga dapat meningkatkan aktivitas antioksidan atau mencegah kerusakan senyawa antioksidan dari pengaruh luar. Hasil penelitian ini menunjukkan nilai yang baik dibandingkan penelitian<sup>14</sup> bahwa aktivitas antioksidan dengan perlakuan ekstrak etanol pada

**Tabel 1.** Hasil analisis aktivitas fitokimia

| Perlakuan Fermentasi | Aktivitas Antioksidan<br>IC <sub>50</sub> (ppm) | Kadar Katekin<br>(µg/ml) | Kadar Tanin<br>(%)      |
|----------------------|-------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| P0                   | 36,736±0,33 <sup>d</sup>                        | 37,62±0,38 <sup>a</sup>  | 21,06±0,18 <sup>f</sup> |
| P1                   | 29,486±0,25 <sup>b</sup>                        | 118,46±0,42 <sup>b</sup> | 9,62±0,55 <sup>c</sup>  |
| P2                   | 46,176±0,47 <sup>e</sup>                        | 127,13±0,39 <sup>c</sup> | 5,47±0,46 <sup>a</sup>  |
| P3                   | 34,432±0,22 <sup>c</sup>                        | 251,95±0,23 <sup>f</sup> | 9,64±0,43 <sup>c</sup>  |
| P4                   | 26,423±0,29 <sup>a</sup>                        | 322,82±0,41 <sup>i</sup> | 14,29±0,51 <sup>d</sup> |
| P5                   | 26,547±0,30 <sup>a</sup>                        | 298,73±0,46 <sup>h</sup> | 15,68±0,34 <sup>e</sup> |
| P6                   | 30,684±0,60 <sup>b</sup>                        | 185,27±0,82 <sup>d</sup> | 14,95±0,33 <sup>d</sup> |
| P7                   | 25,415±0,01 <sup>a</sup>                        | 229,48±1,09 <sup>e</sup> | 5,44±0,56 <sup>a</sup>  |
| P8                   | 29,998±0,27 <sup>b</sup>                        | 284,54±0,49 <sup>g</sup> | 7,04±0,59 <sup>b</sup>  |
| P9                   | 36,420±1,02 <sup>d</sup>                        | 326,87±0,26 <sup>i</sup> | 5,48±0,52 <sup>a</sup>  |

Keterangan: Huruf superscript yang sama pada kolom yang sama menunjukkan pengaruh yang tidak nyata ( $P<0,05$ ). P0: Tidak dilakukan fermentasi; P1: *L. plantarum* 1,5%; P2: *L. plantarum* 2%; P3: *L. plantarum* 2,5%; P4: *R. oligosporus* 1%; P5: *R. oligosporus* 1,5%; P6: *R. oligosporus* 2%; P7: *L. plantarum* 1,5% + *R. oligosporus* 1%; P8: *L. plantarum* 2% + *R. oligosporus* 1,5%; P9: *L. plantarum* 2,5% + *R. oligosporus* 2%

**Tabel 2.** Hasil Kadar Protein Kasar dan Serat Kasar

| Perlakuan Fermentasi | Protein Kasar            | Serat Kasar             |
|----------------------|--------------------------|-------------------------|
|                      | -----%-----              |                         |
| P0                   | 10,80±0,36 <sup>a</sup>  | 22,03±0,25 <sup>e</sup> |
| P1                   | 11,65±0,57 <sup>b</sup>  | 21,46±0,41 <sup>d</sup> |
| P2                   | 11,26±0,47 <sup>b</sup>  | 21,42±0,49 <sup>d</sup> |
| P3                   | 13,55±0,59 <sup>d</sup>  | 19,66±0,70 <sup>c</sup> |
| P4                   | 13,44±39 <sup>d</sup>    | 19,58±0,40 <sup>c</sup> |
| P5                   | 11,10±0,38 <sup>a</sup>  | 19,52±0,84 <sup>c</sup> |
| P6                   | 11,17±0,63 <sup>ab</sup> | 17,58±0,62 <sup>b</sup> |
| P7                   | 12,71±0,36 <sup>c</sup>  | 15,78±0,98 <sup>a</sup> |
| P8                   | 12,38±0,72 <sup>c</sup>  | 15,89±0,26 <sup>a</sup> |
| P9                   | 13,53±0,54 <sup>d</sup>  | 15,81±0,38 <sup>a</sup> |

Keterangan: Huruf superscript yang sama pada kolom yang sama menunjukkan pengaruh yang tidak nyata ( $P < 0,05$ ). P0: Tidak dilakukan fermentasi; P1: *L. plantarum* 1,5%; P2: *L. plantarum* 2%; P3: *L. plantarum* 2,5%; P4: *R. oligosporus* 1%; P5: *R. oligosporus* 1,5%; P6: *R. oligosporus* 2%; P7: *L. plantarum* 1,5% + *R. oligosporus* 1%; P8: *L. plantarum* 2% + *R. oligosporus* 1,5%; P9: *L. plantarum* 2,5% + *R. oligosporus* 2%

*Uncaria gambir* Roxb. Mendapatkan nilai sebesar 39,566 (ppm). Aktivitas antioksidan dapat dinilai melalui  $IC_{50}$ , yang mengindikasikan kemampuan antioksidan untuk menghambat oksidasi sebanyak 50%.<sup>15</sup> Semakin rendah nilai  $IC_{50}$ , semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan fermentasi akan menambahkan aktivitas antioksidan pada *Uncaria gambir* Roxb.

Fermentasi akan menginduksi degradasi dinding sel yang menghasilkan pelepasan atau bahkan memicu pembentukan komponen bioaktif.<sup>16</sup> Peningkatan aktivitas antioksidan disebabkan oleh produksi asam-asam organik oleh bakteri asam laktat. *L. plantarum* adalah salah satu jenis bakteri asam laktat yang dapat meningkatkan aktivitas antioksidan. *L. plantarum* menunjukkan sifat sinergis dengan memberikan ion  $H^+$  kepada radikal bebas, yang menghasilkan peningkatan antioksidan primer.<sup>17</sup> Sifat sinergi ini berperan sebagai donor hidrogen bagi radikal bebas, yang membantu dalam regenerasi antioksidan primer.

Fermentasi menggunakan *R. oligosporus* dapat meningkatkan aktivitas antioksidan yang disebabkan oleh enzim *glucosidase*. Menurut hasil penelitian,<sup>18</sup> *Rhizopus* spp. yang terdapat pada tempe dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dengan memproduksi enzim glukosidase yang menghidrolisis senyawa isoflavone glikosida menjadi senyawa isoflavon bebas. Hal ini diperkuat dengan pendapat<sup>19</sup> bahwa peningkatan aktivitas antioksidan terjadi karena terjadi pemecahan glikosida fenolik dan pelepasan aglikon bebas yang mempunyai aktivitas antioksidan tinggi oleh enzim  $\beta$ -glukosidase dan  $\alpha$ -amilase. Pencampuran antara inokulum *L. Plantarum* dan *R. Oligosporus* mendapatkan hasil yang maksimal dalam meningkatkan aktivitas antioksidan.

#### 4.2. Kadar Katekin

Daun gambir memiliki senyawa penting berupa katekin karena senyawa ini bersifat sebagai antioksidan.<sup>17</sup> Hasil analisis menunjukkan bahwa fermentasi P9 mendapatkan hasil optimal, sebesar 326,87  $\mu\text{g/ml}$ . Hasil penelitian ini lebih besar dibandingkan hasil dari<sup>20</sup> yaitu ekstraksi daun gambir (*Uncaria gambir* Roxb.) dengan metode maserasi pada pelarut aquadest selama 24 jam yaitu 112,5  $\mu\text{g/ml}$ . Hal ini menunjukkan bahwa proses fermentasi dapat meningkatkan kadar katekin pada daun gambir.

Fermentasi dapat mengubah komposisi katekin.<sup>21</sup> Hal ini sesuai dengan pendapat<sup>10</sup> bahwa fermentasi *L. plantarum* dapat meningkatkan kadar katekin pada kayu manis sebesar 3,3%.

Perubahan tersebut terjadi melalui proses oksidasi yang dikatalisis enzim tannase. Ikatan ester galat pada gugus hidroksil cincin karbon *non ester catechins* (*epicatechin* dan *epicatechin gallate*) dihidrolisis oleh enzim tannase yang teresterifikasi dengan gallic acid, sebagai gugus inti pembentuk *ester catechins*.<sup>22</sup> Kenaikan kadar katekin akan sejalan dengan kenaikan aktivitas antioksidan karena katekin memiliki antioksidan yang berpotensi untuk menghambat stress oksidatif.<sup>23</sup> Fermentasi konsentrasi katekin dapat mengalami degradasi dan peningkatan. Peningkatan ini terjadi karena biotransformasi oleh enzim yang dihasilkan *L. plantarum* dan *R. oligosporus*. Menurut<sup>24</sup> fermentasi dengan menggunakan mikroorganisme dapat menyebabkan katekin lepas dari sel mikroorganisme karena rentan pada lingkungan asam.

#### 4.3. Kadar Tannin

Tanin pada daun gambir menyebabkan rasa pahit,

menurunkan daya cerna protein dan menurunkan aktivitas enzim pada sistem pencernaan Hasil analisis menunjukkan bahwa fermentasi P7 dapat menurunkan kadar tanin yang paling maksimal sebanyak 15,62%. Hasil penelitian ini mendapatkan hasil kadar tanin lebih rendah dari hasil<sup>25</sup> sebesar 16,22% dengan ekstraksi gambir pasta menggunakan pelarut air dengan 5 kali tahapan penyaringan.

Proses fermentasi dengan *R. Oligosporus* dan *L. Plantarum* membuktikan dapat mengurangi kadar tanin dari pada proses ekstraksi. Metabolisme mikroorganisme memecah protein dan karbohidrat menjadi senyawa yang lebih sederhana, sehingga menurunkan tanin.

Penurunan kadar tannin yang terjadi akibat *R. oligosporus* dan *L. plantarum* menghasilkan enzim tanase yang menguraikan tannin pada daun gambir. Menurut<sup>26</sup> tanin asil hidrolase atau tannase adalah enzim yang mengkatalisis pemecahan ikatan ester yang ada pada tannin menjadi hidrolisis dan menghasilkan ester asam galat. Bakteri asam laktat seperti *L. plantarum* dapat mengurangi senyawa antinutrien seperti tanin, fitat dan Alfatoksin.<sup>27</sup> Selain aktivitas mikroba, pada penelitian ini fermentasi dilakukan menggunakan metode perendaman, penurunan tanin terjadi disebabkan oleh kelarutan tanin dalam air, maka akan mengurangi kadar tanin.<sup>28</sup>

#### 4.4. Kadar Protein Kasar dan Serat Kasar

Hasil data penelitian yang didapatkan bahwa fermentasi menggunakan *R. oligosporus* dan *L. plantarum* dapat meningkatkan protein kasar. Hasil yang maksimal ditunjukkan pada P3 sebesar 15,32%.

Kenaikan kadar protein setelah fermentasi dalam semua perlakuan terjadi karena pembentukan protein dari mikroorganisme tunggal yang terlibat dalam proses fermentasi, karena *Rhizopus oligosporus* dan *L. plantarum* menghasilkan enzim protease. Hal ini sesuai dengan pendapat<sup>29</sup> menyatakan bahwa aktivitas proteolitik yang tinggi pada enzim protease dihasilkan oleh jenis kapang yaitu *R. oligosporus*, sehingga dapat mencerna protein gambir menjadi polipeptida sederhana dan asam-asam amino. Selain itu menurut<sup>30</sup> *L. Plantarum* memiliki kemampuan memproduksi enzim protease dalam metabolisme protein dan regulasi aktivitas sel, khususnya untuk menjaga keseimbangan antara degradasi dan sintesis protein, serta menggantikan protein yang sudah tidak bagus. Proses induksi dimulai dari protein mengalami metabolisme sebagai bagian dari biosintesis, dan enzim yang bisa diaktifkan ada dalam sel-sel yang sifatnya tidak permanen, tergantung pada keberadaan penginduksi.<sup>31</sup>

Hasil penelitian fermentasi dengan *R. oligosporus* dan *L. plantarum* dapat mengurangi kadar serat kasar pada daun gambir. Hasil tersebut menyatakan bahwa fermentasi campuran yaitu P7 dapat menurunkan kadar lebih tinggi sebanyak 6,22% dengan jumlah serat kasar sebesar 15,81%. Menurut<sup>32</sup> Penurunan serat kasar pada fermentasi daun gambir disebabkan oleh mikroba yang menghasilkan enzim, di mana enzim ini memiliki sifat katabolik atau mempermudah daya cerna dengan memecah senyawa kompleks menjadi sederhana dan ikatan serat yang kompleks dapat dipecahkan menjadi yang lebih sederhana oleh *R. oligosporus*. Menurut<sup>33</sup> kemampuan *L. plantarum* dalam mengubah serat kasar menjadi senyawa SCFA (*Short Chain Fatty Acid*) seperti asam propionate, asam butirat, asam laktat, dan asam asetat dapat menyebabkan penurunan serat kasar, meskipun proses ini berlangsung dengan laju yang lebih lambat daripada pemecahan serat pangan yang larut.

#### 5. Simpulan

Fermentasi daun gambir dengan *L. plantarum* dan *R. oligosporus* meningkatkan aktivitas antioksidan, kadar katekin, dan protein kasar, serta menurunkan kadar tanin dan serat kasar. Perlakuan optimal ditemukan pada kombinasi *L. plantarum* 1,5% + *R. oligosporus* 1%, yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai aditif pakan alami.

#### Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan bahwa data yang dipublikasikan pada naskah ini tidak ada konflik kepentingan terhadap pihak manapun.

#### Referensi

1. Ginovyan, M.; Petrosyan, M.; Trchounian, A. Antimicrobial activity of some plant materials used in Armenian traditional medicine. BMC Complement. Altern. Med. 2017;17,50.
2. Hidayati, M.; Rahmatulloh, A. Antioxidant Activity of Uncaria Gambir (Hunter) Roxb Extracts. Tropical Journal of Natural Product. 2022; 6(8):1215-1218.
3. Wardi, E. S.; Syukur, S.; Chaidir, Z.; Jamsari. Genotypic identification and catechin profiling of Uncaria gambir in West Sumatra, Indonesia. Biodiversitas Journal. 2024; 25(3): 1151-1158.
4. Alfaafa, J.; Suryahadi; Sofyan, A.; Sukria, H. A.; Istiqomah, L. Effect of tannin supplementation from Uncaria gambir extract on rumen fermentation, microbial protein and in vitro gas production. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2019; 387:1-5.
5. Soares, S.; Brandao, E.; Mateus, N.; De Freitas, V. Interaction between red wine procyanidins and salivary proteins: Effect of stomach digestion on the resulting complexes. RSC Advances. 2015; 5(17):12664-12670.
6. Fitriyani, I. N.; Urip S.; Tris A. Pengaruh Pemberian

- Tempe Dedak terhadap Performa Ayam Broiler. Jurnal Sain Peternakan Indonesia. 2019;14(3): 246-251.
7. Wibawa, A.A.; Wirawan I.; Partama I. Peningkatan Nilai Nutrisi Dedak Padi Sebagai Pakan Itik Melalui Biofermentasi Dengan Khamir. Majalah Ilmiah Peternakan. 2015;18(1): 12-16.
  8. Setiarto, R.H. dan Widhyastuti N. Penurunan Kadar Tanin Dan Asam Fitat Pada Tepung Sorgum Melalui Fermentasi *Rhizopus Oligosporus*, *Lactobacillus Plantarum* dan *Saccharomyces Cerevisiae*. Jurnal Berita Biologi. 2016;15(2): 149-157.
  9. Djuu, S. S., J. E. J. Saleh, S. Chuzaemi, H. I. Djunaidi, and H. M. Natsir. 2022. Adf (Acid Detergen Fiber) Dan Tanin Kulit Pisang Goroho Fermentasi. Kandungan NDF (Neutral Detergen Fiber) 5(1):104-9.
  10. Eweys, A.S.; Yang-Sheng Z.; Osama M.D. Improving the antioxidant and anticancer potential of *Cinnamomum cassia* via fermentation with *Lactobacillus plantarum*. Science Direct. 2022;36:00768.
  11. Yessirita, N.; Abbas, M. H.; Heryandi, Y.; Dharma, A. Peningkatan Kualitas Telur Itik Pitalah dengan Pemberian Pakan Tepung Daun Lamtoro (*Leucaena leucocephala*) yang Difermentasi dengan *Bacillus laterosporus* dan *Trichoderma Viride*. Indonesian Journal of Animal Science. 2015;17(1),54-62.
  12. Semaun, R.; Novieta, I.D.; Mutia A. Analisis Kandungan Protein Kasar dan Serat Kasar Tongkol Jagung Sebagai Pakan Ternak Alternatif dengan Lama Fermentasi yang Berbeda. Jurnal Galung Tropika. 2016;5(2):71-79.
  13. Jaelani, A.; Gunawan, A.; Indra A. Pengaruh Lama Penyimpanan Silase Daun Kelapa Sawit Terhadap Kadar Protein dan Serat Kasar. Ziraa'ah: Majalah Ilmiah Pertanian. 2014;39(1):8-16.
  14. Hartanti, L.; Ashari, A. M.; Warsidah. Total Phenol and Antioxidant Activity of Ethanol Extract and Water Extract from *Uncaria gambir* Roxb. Berkala Saintek. 2021; 9(3): 131-138.
  15. Liang, N. And Kitts D.D. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. Molecules: MDPI. 2014; 19:19180-19208.
  16. Rahmi, N.; Harmayanti, E.; Umar S.; Purnama D. Identifikasi Bakteri Asam Laktat dan Aktivitas Penghambat Radikal pada Jeruk Tigarun (*Crataeva nurvala*, Buch ham). Agritech. 2016;36(3):317-326.
  17. Musdholifah dan Zubaidah, E. Studi Aktivitas Antioksidan Kefir Teh Daun Sirsak dari Berbagai Merk Dipasaran. Jurnal Pangan dan Agroindustri. 2016;4(1):29-39.
  18. Sheih, I.; Fang, T.J.; Wu, T.; Chen, R. Effects of fermentation on antioxidant properties and phytochemical composition of soy germ. J Sci Food Agric. 2014;94:3163-3170.
  19. Hur, S.J.; Lee, S.Y.; Kim, Y.C.; Choi, I.; Kim, G.B. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant based foods. Food Chemistry. 2014;160:346-356.
  20. Damanik, D. D. P.; Nurhayati, S; Hasibun, R. Ekstraksi Katekin dari Daun Gambir (*Uncaria gambir* Roxb.) dengan Metode Maserasi. Jurnal Teknik Kimia USU. 2014; 3(2): 10-15.
  21. Guo, T.; Song, D.; Lu Cheng; Xin Z. Interactions of Tea Catechins With Intestinal Microbiota and Their Implication for Human Health. Food Science and Biotechnology. 2019;28:1617-1625.
  22. Ambasari, D.P.P; Budiarto, T.Y.; C. Amarantini. Pengaruh Proses Fermentasi Teh Tambi Merah (*Camellia sinensis* var. *Sinensis*) Terhadap Perubahan Komposisi Katekin, Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri. Prosiding Seminar Nasional Biologi. 2022;10:241-249.
  23. Sari, R.M.; Rita, R.S.; Eliza A. Pengaruh Pemberian Isolat Katekin Gambir (*Uncaria gambir* Roxb.) terhadap Kadar Hormon Testosteron dan Jumlah Spermatozoa Tikus Rattus Norvegicus Jantan Hiperlipidemia. Jurnal Kesehatan Andalas. 2018;7(3):6-9.
  24. Sukmawati, P.P.A. ; Ramona Y.; Ni P.E.L. Penetapan Aktivitas Antioksidan yang Optimal pada Teh Hitam Kombucha Lokal di Bali dengan Variasi Waktu Fermentasi. Garuda Kemdikbud. 2014.16:25-29.
  25. Fakhruzy; Kasim, A.; Asben, A.; Anwar, A. Relation Between Repeat Tanin Extraction Process with The Rendement and Contents of Tanin Extract Obtained. Menara Ilmu jurnal. 2021; 15(2): 19-25
  26. Aguilar-Zárate P, MACruz-Hernández, JC Montanez, RE Belmares-Cerda and CN Aguilar. Bacterial Tannases: Production, Properties and Applications. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 2014;13(1):63-74.
  27. Haryani, K.; P.R. Lakzita; P.P. Sari. Modifikasi tepung sorgum dengan metode fermentasi menggunakan bakteri asam laktat *Lactobacillus bulgaricus*. J. Inovasi Teknik Kimia. 2021. 6(1):11-16.
  28. Sembor, S.M.; Imbar, M.R.; H. Liwe; N.N. Lontaan. Kadar Tanin, Total Bakteri, pH dan Awal Kebusukan Salami Ayam Petelur Afkir Menggunakan Tepung Sorgum (*Sorghum bicolor* L.). Zootec. 2022;42(1):87-96.
  29. Mokoolang, M.C.; Wolayan, F.R.; Imbar, M.L.; Toar, W.L. Biokonversi Kulit Pisang Raja (*Musa Paradisiaca*) dengan *Rhizopus Oligosporus* Terhadap Perubahan Kandungan Bahan Kering, Bahan Organik Dan Protein Kasar. Zootec. 2017;38(1):56.
  30. Susantiningih, T. Enzymes Functions In Metabolism. Universitas Lampung. J Majority. 2014;1(2).
  31. Aeni, N. Analisis Kadar Protein pada Fermentasi Kembang Kol (*Brassica oleracea* L. Var. *Capitata*) Dengan Menggunakan Bakteri *Lactobacillus Plantarum*. Cokroaminoto Journal of Chemical Science. 2023;5(2):39-41.
  32. Malianti, L.; Lestari, N. Kandungan Nutrisi Limbah Biji Durian (*Durio Zibethinus* Murr) Yang Difermentasi Dengan Ragi Tape (*Saccharomyces Cerevisiae*) Dan Ragi Tempe (*Rhizopus oligosporus*). J Inspirasi Peternak. 2021;1(2):121-9.
  33. Jacinda, V.; Kusuma, M; Zubaidah, E. The Evaluation of *Lactobacillus Casei* and *Lactobacillus plantarum* Growth in The Fermented Banana Peel Flour Medium. Jurnal Pangan dan Agroindustri. 2016; 4(1):100-108