

**EFEKTIVITAS TEPUNG BIJI TREMBESI (*Samanea saman*)  
TERFERMENTASI DALAM PAKAN TERHADAP KINERJA  
PERTUMBUHAN UDANG VANAME *Litopenaeus vannamei***

**THE EFFECTIVENESS OF FERMENTED RAIN TREE  
(*Samanea saman*) SEED MEAL IN FEED ON THE GROWTH  
PERFORMANCE OF WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei***



**ASNI ANWAR  
L013211006**

**Pencetak**



Gedung UPT Unhas Press, Kampus Unhas Tamalanrea  
Jln. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar  
☎ +62 8229 9555 591 ✉ unhaspress@gmail.com  
🌐 unhaspress.unhas.ac.id



**PROGRAM STUDI S3 ILMU PERIKANAN  
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**EFEKTIVITAS TEPUNG BIJI TREMBESI (*Samanea saman*)  
TERFERMENTASI DALAM PAKAN TERHADAP KINERJA  
PERTUMBUHAN UDANG VANAME *Litopenaeus vannamei***

**ASNI ANWAR  
L013211006**



**PROGRAM STUDI S3 ILMU PERIKANAN  
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**EFEKTIVITAS TEPUNG BIJI TREMBESI (*Samanea saman*)  
TERFERMENTASI DALAM PAKAN TERHADAP KINERJA  
PERTUMBUHAN UDANG VANAME *Litopenaeus vannamei***

Disertasi

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar doktor

Program Studi Ilmu Perikanan

Disusun dan diajukan oleh

ASNI ANWAR  
L013211006

kepada

**PROGRAM STUDI S3 ILMU PERIKANAN  
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**DISERTASI**

**EFEKTIVITAS TEPUNG BIJI TREMBESI (*Samanea saman*)  
TERFERMENTASI DALAM PAKAN TERHADAP KINERJA  
PERTUMBUHAN UDANG VANAME *Litopenaeus vannamei***

**ASNI ANWAR  
L013211006**

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Doktor pada 08 Maret 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada

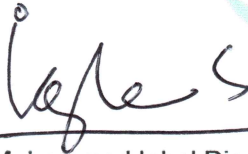
Program Studi S3 Ilmu Perikanan  
Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan  
Universitas Hasanuddin  
Makassar

Mengesahkan:  
Promotor,



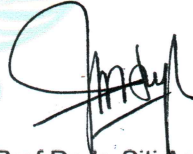
Prof. Dr. Ir. Zainuddin M.Si  
NIP. 196407211991031001

Ko-Promotor,



Ir. Muhammad Iqbal Djawad M. Sc., Ph.D  
NIP.196703181989031002

Ko-Promotor,



Prof. Dr. Ir. Siti Aslamyah M.P  
NIP.1969909011993032003

Ketua Program Studi S3 Ilmu Perikanan,



Prof. Dr. Ir. Musbir, M.Sc  
NIP. 196508101989111001

Dekan Fakultas Ilmu  
Kelautan dan Perikanan,



Prof. Safruddin, S.Pi., MP. Ph. D  
NIP.197506112003121003

## PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, disertasi berjudul “Efektivitas Tepung Biji Trembesi (*Samanea Saman*) Terfermentasi Dalam Pakan Terhadap Kinerja Pertumbuhan Udang Vaname *Litopenaeus Vannamei*” adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing (Prof. Dr. Ir. Zainuddin M.Si sebagai Promotor dan Ir. Muhammad Iqbal Djawad M.Sc. Ph.D sebagai co-promotor-1 serta Prof. Dr. Ir. Siti Aslamyah M.P sebagai co-promotor-2). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka disertasi ini. Sebagian dari isi disertasi ini telah dipublikasikan di Jurnal (Biodiversitas, Volume 24(11), Halaman 5863-5872, dan DOI: 10.13057/biodiv/d241104) sebagai artikel dengan judul “Fermentation of trembesi (*Samanea saman*) seed meal using mixed microbes to improve its nutritional quality”. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan disertasi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa disertasi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 8 Maret 2024



Handwritten signature of Asni Anwar.

Asni Anwar  
NIM L013211006

## UCAPAN TERIMAKASIH

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat Allah Subhanahu wa ta'ala, atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya kepada kita semua, sehingga penulis dapat menyelesaikan Disertasi yang berjudul: "Efektivitas Tepung Biji Trembesi (*Samanea saman*) Terfermentasi Dalam Pakan Terhadap Kinerja Pertumbuhan Udang Vaname *Litopenaeus vannamei*". Disertasi ini merupakan tugas akhir dalam penyelesaian studi pada Program Studi Doktor Ilmu Perikanan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin Makassar.

Penulisan disertasi hasil penelitian ini sepenuhnya sangat didukung oleh bantuan material dan inmaterial dari beberapa pihak terkait, untuk itu penulis mengucapkan terima kasih kepada; kedua orang tua tercinta ayahanda Anwar Lioe dan ibunda Habibah Djumat S.Pd, suami tercinta Ir. Miftahuddin Nur, ananda tersayang Muhammad Rinaldi Pratama ST, Serda Dicky Ihza Mahendra, Walda Dewi Berliana, Meyga Razak ST, Putri Adeliya, Fadel Ramadhan SP, Ananda Tasya, Fauzan Muhammad SE, Ayu Septianingsih SE, atas dukungannya selama ini.

Terimakasih yang sebesar-besarnya penulis ucapkan kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa M.Sc selaku Rektor Universitas Hasanuddin, Prof. Dr. H. Ambo Asse M.Ag selaku Rektor Universitas Muhammadiyah Makassar serta Prof. Syafruddin S.Pi, M.P, Ph.D dan Dr. Ir. Andi Khaeriyah M.Pd, IPU selaku Dekan FIKP Unhas dan Dekan Faperta Unismuh Makassar yang telah memfasilitasi kami dalam proses pendidikan doktor.
2. Prof. Dr. Ir. Zainuddin M.Si, Ir. Muhammad Iqbal Djawad M.Sc. Ph.D, dan Prof. Dr. Ir. Siti Aslamyah. M.P selaku Promotor dan Ko-promotor yang senantiasa memberi motivasi, arahan, membuka wawasan ilmiah mulai proses perencanaan penelitian sampai proses penyelesaian disertasi ini.
3. Prof. Dr. Ir. Haryati. M.Si, Dr. Ir. Edison Saade. M.Sc, Dr. Ir. Dody Dharmawan Trijuno, M.App.Sc, Prof. Dr. Ir Muhammad Yusri Karim. M.Si, selaku penguji internal yang telah banyak memberikan saran, masukan dan arahan mulai dari seminar proposal sampai penyempurnaan disertasi ini.
4. Prof. Dr. Ir. Dedi Jusadi M.Sc, selaku penguji eksternal yang meskipun memiliki jadwal yang padat, telah meluangkan waktu dan memberi masukan yang sangat berharga dalam proses perbaikan dalam penyusunan disertasi ini.
5. Seluruh dosen dan staf pada program Studi S3 Ilmu Perikanan.
6. Kamaruddin S.Pi. M.Si, Ibu Dian, Ibu Rosni serta staff laboran di Laboratorium Nutrisi Balai Pengembangan Penelitian Budidaya Air Payau Maros.
7. Staff laboran di Laboratorium Kimia Pakan Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin Makassar.
8. Dr. Ir. Syafiuddin M.Si di Laboratorium Penangkaran dan Rehabilitasi Ekosistem, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin.

9. Seluruh tim penelitian dan rekan-rekan mahasiswa Pascasarjana Ilmu Perikanan, Dr Imam Tauhid ST., M.Si, Dr. Andi Nur Apung S.Pi. M.Si, Andi Masriah S.Pi., M.Si, Siiti Zaenab S.Pi., M.Si dan Ayman Alamen M.Si.
10. Rekan-rekan sejawad dari Program Studi Budidaya Perairan, terkhusus Dr. Ir. Murni S.Pi. M.Si., IPP dan Dr. Hamsah S.Pi., M.Si yang telah memberikan motivasi dan dukungan hingga studi ini selesai.

Sebagai penutup, semoga hasil penelitian ini memberi berkah dan berkontribusi untuk kamaslahatan ummat dan kemajuan ipteks.

Penyusun

Asni Anwar

## ABSTRAK

ASNI ANWAR L013211006. “Efektivitas Tepung Biji Trembesi (*Samanea Saman*) Terfermentasi Dalam Pakan Terhadap Kinerja Pertumbuhan Udang Vaname *Litopenaeus Vannamei*”. (Di bimbing oleh Zainuddin, Muhammad Iqbal Djawad dan Siti Aslamyah)

**Latar Belakang.** Tepung biji trembesi sampai saat ini belum dimanfaatkan secara optimal, padahal sangat potensial sebagai bahan baku pakan udang vaname karena mengandung protein (40,01%) yang mendekati kadar protein kedelai. Namun disisi lain, sebagai bahan nabati, mengandung kadar serat 11,72% dan anti nutrisi tanin 3,99%, serta senyawa protein terbungkus dinding sel. Hal tersebut berdampak pada tingkat daya cerna dan kinerja pertumbuhan udang vaname. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis efektivitas tepung biji trembesi yang difermentasi menggunakan mix mikroorganisme dalam pakan buatan terhadap kinerja pertumbuhan udang vaname *Litopenaeus vannamei*. **Metode.** Penelitian *in vitro* dilakukan dengan menggunakan pola faktorial rancangan dasar acak lengkap, terdiri atas dua faktor, yaitu dosis mix mikroorganisme (0; 1,5; 3 dan 4,5mL/100g) dan lama waktu inkubasi (48, 72 dan 96 jam). **Hasil.** Hasil penelitian menunjukkan fermentasi tepung biji trembesi menggunakan dosis mix mikroorganisme dan lama waktu fermentasi berpengaruh signifikan ( $P < 0,05$ ) dan terjadi interaksi keduanya terhadap pencernaan bahan kering dan bahan organik, derajat hidrolisis serat kasar, protein, lemak kasar dan Bahan ekstrak tanpa Nitrogen (BETN), serta protein terlarut dan tanin. Variasi dosis 4,5mL/100g dan lama waktu fermentasi mix mikroorganisme 72 jam menurunkan kadar serat kasar dan lemak kasar senilai 59,60 dan 73,20 %, serta meningkatkan kadar protein kasar, Bahan Ekstrak Tanpa Nitrogen (BETN), pencernaan bahan kering, pencernaan bahan organik dan protein terlarut dan tanin berturut turut yaitu: 11,62, 6,52, 36,78, 50,42, 20,27 dan 37,72%. Berdasarkan hal tersebut, disimpulkan bahwa tepung biji trembesi yang difermentasi dengan dosis 4,5mL/100g, lama waktu fermentasi selama 72 jam, mengandung nilai nutrisi tinggi dan direkomendasikan sebagai bahan baku pakan udang vaname *Litopenaeus vannamei*, yang digunakan pada tahap penelitian selanjutnya. Pengujian *in vivo* menggunakan rancangan dasar acak lengkap, dengan lima perlakuan tiga ulangan pada tingkat substitusi tepung kedelai dengan tepung biji trembesi terfermentasi mix mikroorganisme berbeda, yaitu 0, 25, 50, 75, dan 100%. Sebanyak 600 ekor juvenil udang vaname *Litopenaeus vannamei* dipelihara selama 60 hari, dengan berat awal 0,08g/ekor, dalam akuarium berukuran 50x30x35 cm<sup>3</sup>, volume air 40 L, bersalinitas 27 ppt, diberi pakan dosis 10% dari bobot tubuh dengan frekwensi empat kali sehari pada pukul 06:00, 12:00, 18:00 dan 21:00 WITA. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa tingkat substitusi 50% tepung biji trembesi terfermentasi dalam pakan berpengaruh terhadap kinerja pertumbuhan udang vaname dibanding perlakuan lainnya. Hasil terbaik menunjukkan tingkat konsumsi pakan (117,87g), aktifitas



enzim pencernaan (selulase 111,57, protease 1,187, amilase 0,83 dan lipase 0,110 U/g/menit), efisiensi pakan (81,44%), pencernaan total (80,21%), pencernaan protein (89,45%), pencernaan lemak (70,25%), pencernaan serat (87,59%) retensi protein (57,05%), retensi lemak (60,04%), kadar glikogen tubuh (20,27%), laju pertumbuhan harian udang vaname (6,79%), pertumbuhan mutlak (4,09g) dan sintasan (89,16%).

**Kesimpulan.** Disimpulkan bahwa tepung biji trembesi terfermentasi mix mikroorganisme mampu mensubstitusi 50% tepung kedelai dalam pakan, tanpa memberi efek negatif terhadap kinerja pertumbuhan udang vaname. Substitusi 50% tepung kedelai dan 50% tepung biji trembesi terfermentasi mix mikroorganisme meningkatkan kinerja pertumbuhan udang vaname *Litopenaeus vannamei*.

**Kata Kunci:** Biji trembesi, *Litopenaeus vannamei*, mix mikroorganisme, pakan, substitusi

## ABSTRACT

ASNI ANWAR L013211006. “**Effectiveness of fermented rain tree seed meal (*Samanea saman*) in feed on the growth performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei***”. (supervised by Zainuddin, Muhammad Iqbal Djawad and Siti Aslamyah)

**Background.** Until now, rain tree seed meal has not been utilized optimally, even though it has great potential as a raw material for vaname shrimp feed because it contains protein (40.01%) which is close to soybean protein levels. However, on the other hand, as a vegetable ingredient, it contains 11.72% fiber and 3.99% tannin anti-nutrients, as well as protein compounds encased in cell walls. This has an impact on the level of digestibility and growth performance of vaname shrimp. **Aims.** This study aims to analyze the effectiveness of rain tree seed meal fermented using a mixture of microorganisms in artificial feed on the growth performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Methods.** Research *in vitro* was performed using a completely random design factorial pattern consisting of two factors: the dose of a mixed of microorganisms (0; 1,5; 3, and 4,5 mL/100g) and of incubation time (48; 72 and 96 hours). The results showed rain tree seed meal fermented using a mixture of microorganisms with doses 4.5mL/100g and an incubation time of 72 hours lower crude fibre content and natural fat worth 59.60 and 73.20 %. They increased the content of crude protein, NFE, dry matter digestibility, organic matter digestibility, and dissolved protein, respectively: 11.62, 6.52, 36.78, 50.42, and 20.27%. In comparison, the percentage of reduction in tannin levels was 37.72% in dose variations 4.5 mL/100g with a long fermentation time of 96 hours. Based on this, it was concluded that rain tree seed meal fermented for 72 hours contains a high nutritional value and is recommended as raw material for white shrimp feed *Litopenaeus vannamei*. Further, it is used at a later stage of research. Testing *in vivo* using a complete randomized design, with five three-repeat treatments at different substitution rates, namely 0, 25, 50, 75, and 100%. A total of 600 juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* were kept for 60 days, with an initial weight 0.08g/ind, in a sized aquarium 50x30x35 cm<sup>3</sup>, volume water 40 L, salinity 25 ppt, dosed feed 10% of body weight with a frequency of four times a day at o'clock 06:00, 12:00, 18:00 and 21:00. **Results.** The results of variety analysis showed that the substitution rate of 50% fermented rain tree seed meal in feed had an accurate effect on the growth performance of white shrimp compared to other treatments, with the level of feed consumption (117.87g), activity of digestive enzymes (cellulase 111.57, protease 1.187, amylase 0.083 and lipase 0.110 U/g/minute), feed efficiency (81.44%), total digestibility (80.21%), protein digestibility (89.45%), digestibility of fats (70.25%), digestibility of fiber (87.59%) Protein retention (57.05%), fat retention (60.04%), The body's glycogen rate (20.27%), Daily growth rate of white shrimp (6.79%), absolute growth (4.09%) and survival (89.16%). **Conclusions.** It was

concluded that fermented rain tree seed meal mixed with microorganisms could substitute 50% of soybean meal in feed without harming the growth performance of white shrimp. Covering 50% soybean meal and 50% fermented rain tree seed meal mix microorganisms improves the growth performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*.

**Keywords:** Feed, *Litopenaeus vannamei*, mix of microorganisms, rain tree seeds, substitution

# DAFTAR ISI

## Halaman

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGAJUAN .....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	v
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA.....	vii
UCAPAN TERIMAKASIH.....	ix
ABSTRAK.....	xi
ABSTRACT .....	xiii
DAFTAR ISI .....	xv
DAFTAR TABEL .....	xvii
<b>BAB I PENDAHULUAN UMUM .....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	3
1.3. Tujuan Penelitian .....	4
1.4. Manfaat Penelitian .....	4
1.5. Hipotesis Penelitian.....	4
1.6. Kebaharuan Penelitian ( <i>Novelties</i> ) .....	4
1.7. Kerangka Pikir Penelitian .....	5
1.8. Daftar Pustaka .....	6
<b>BAB II PENGARUH DOSIS DAN LAMA WAKTU FERMENTASI MENGUNAKAN MIX MIKROORGANISME TERHADAP KUALITAS TEPUNG BIJI TREMBESI .....</b>	<b>9</b>
2.1. Abstrak .....	9
2.2. Pendahuluan .....	10
2.4. Bahan dan Metode.....	11
2.5. Hasil .....	14
2.6. Pembahasan .....	21
2.7. Kesimpulan.....	29
2.8. Daftar Pustaka .....	29
<b>BAB III PENGARUH SUBSTITUSI TEPUNG KEDELAI DENGAN TEPUNG BIJI TREMBESI (<i>Samanea saman</i>) TERFERMENTASI MIX MIKROORGANISME DALAM PAKAN TERHADAP KINERJA PERTUMBUHAN UDANG VANAME <i>Litopenaeus vannamei</i> .....</b>	<b>37</b>
3.1. Abstrak .....	37
3.2. Pendahuluan .....	37
3.3. Bahan dan Metode.....	38
3.4. Hasil .....	45
3.5. Pembahasan .....	53

3.6.	Kesimpulan.....	60
3.7.	Daftar Pustaka .....	60
<b>BAB IV PEMBAHASAN UMUM.....</b>		<b>73</b>
<b>BAB V KESIMPULAN UMUM DAN REKOMENDASI.....</b>		<b>81</b>
5.1.	Kesimpulan Umum.....	81
5.2.	Rekomendasi .....	81
<b>LAMPIRAN .....</b>		<b>83</b>

## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
1. Kecernaan Bahan Kering Dan Bahan Organik Tepung Biji Trembesi Yang Difermentasi Mix Mikroorganisme Berdasarkan Dosis Dan Lama Waktu Fermentasi Pada Semua Perlakuan .....	14
2. Hasil Analisis Proksimat Serat kasar, Protein, Lemak dan BETN tepung Biji Trembesi Sebelum dan Setelah difermentasi Menggunakan Mix Mikroorganisme Berdasarkan Dosis dan lama waktu Fermentasi Pada Semua perlakuan .....	16
3. Derajat Hidrolisis serat kasar, protein, Lemak dan BETN Tepung Biji Trembesi Yang Difermentasi menggunakan Mix Mikroorganisme Berdasarkan Dosis dan Lama Waktu Fermentasi Pada Semua perlakuan...	17
4. Persentase Kadar Tanin Yang Difermentasi Mix Mikroorganisme Berdasarkan Dosis dan Lama Waktu Inkubasi Pada Semua Perlakuan.....	19
5. Protein Terlarut Tepung Biji Trembesi Yang Difermentasi menggunakan Mix Mikroorganisme Berdasarkan Dosis dan Lama Waktu Fermentasi pada Semua perlakuan .....	20
6. Formulasi Pakan Tepung Biji trembesi Terfermentasi .....	39
7. Rata-rata Kecepatan pecah dan Dispersi padatan Pakan substitui tepung kedelai menggunakan tepung biji trembesi terfermentasi Pada Semua Perlakuan .....	45
8. Komposisi Asam Amino Tepung Biji Trembesi Tanpa Fermentasi dan Yang Terfermentasi Menggunakan Mix Mikroorganisme .....	46
9. Komposisi Asam Amino Esensial dan Non Esensial Pakan Uji .....	47
10. Komposisi Asam Lemak Jenuh dan Tak Jenuh Pakan Uji .....	48
11. Analisis Proksimat Formulasi Pakan Uji.....	48
12. Tingkat Konsumsi Pakan(g), Efisiensi Pakan(%), Kadar Glikogen(%), SGR(%), Pertumbuhan Mutlak(%) dan Sintasan(%) udang vaname yang diberi pakan substitusi tepung kedelai menggunakan tepung biji trembesi terfermentasi pada semua perlakuan.....	49
13. Aktifitas Enzim Pencernaan Juvenil Udang Vaname Yang Diberi Pakan Substitusi Tepung Kedelai dengan tepung Biji Trembesi Terfermentasi Pada Semua Perlakuan .....	50
14. Kecernaan Juvenil Udang Vaname Yang Diberi Pakan Substitusi Tepung Kedelai Dengan Tepung Biji Trembesi Terfermentasi Pada Semua Perlakuan .....	51
15. Retensi Protein Dan Lemak Juvenil Udang Vaname Yang Diberi Pakan Substitusi Tepung Kedelai Dengan Tepung Bijitrembesi Terfermentasi Pada Semua Perlakuan. ....	52
16. Hasil Pengukuran Kualitas Air Pada Semua Perlakuan .....	52

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
1. Kerangka Pikir Penelitian .....	5
2. Interaksi Dosis dan lama Waktu Fermentasi Terhadap Degradasi Tanin Menggunakan Mix Mikroorganisme Pada Semua Perlakuan .....	15
3. Interaksi Dosis dan Lama Waktu Ferentasi Terhadap Protein Terlarut Tepung Biji Trembesi Yang Difermentasi Menggunakan Mix Mikroorganisme Pada Semua Perlakuan.....	18
4. Grafik Hubungan Antara Kandungan Tanin Dengan Protein Terlarut Tepung Biji Trembesi Terfermentasi Mix Mikroorganisme Pada Semua Perlakuan.....	19
5. Analisis Gugus Fungsi (PTIR) Tepung Biji Trembesi Tanpa Fermentasi dan Yang Difermentasi Menggunakan Mix Mikroorganisme.....	21
6. Grafik hubungan antara kandungan tanin dengan protein terlarut tepung biji trembesi terfermentasi mix mikroorganisme pada semua perlakuan .....	27
7. Analisis Gugus Fungsi /PTIR Tepung biji trembesi (A) Tanpa Fermentasi (B) Difermentasi Menggunakan Mix Mikroorganisme .....	26

# BAB I

## PENDAHULUAN UMUM

### 1.1. Latar Belakang

Kebutuhan kedelai secara nasional sampai bulan April 2021 sebanyak 258.817ton, dan hanya terpenuhi melalui produksi dalam negeri 7.558 ton, selebihnya berasal dari kedelai impor sebanyak 251.256 ton, dengan harga dipasaran yaitu Rp 11.796/kg (Departemen Perdagangan, 2021). Mahalnya harga tepung kedelai sebagai sumber protein nabati dalam pembuatan pakan udang, berdampak pada mahalanya harga pakan komersil, sedangkan pengadaan pakan merupakan pengeluaran paling tinggi dalam produksi udang vaname (Kari *et al.*, 2023), sehingga penting untuk mencari alternatif pengganti tepung kedelai yang bersumber dari bahan lokal dan tidak bersaing dengan kebutuhan manusia.

Pemanfaatan bahan lokal sebagai sumber bahan baku pakan terus dikembangkan untuk meningkatkan produksi udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) (Zainuddin *et al.*, 2014 dan 2019; Murni *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2022). Salah satu cara untuk menekan biaya produksi khususnya pengadaan pakan pada budidaya udang adalah penggunaan pakan yang memiliki komposisi tepung kedelai yang rendah, sumber protein nabati berkualitas dan murah, adalah menggunakan biji trembesi. Biji trembesi memiliki kandungan protein 40,01%, mendekati kandungan protein biji kedelai unggul yaitu 43% (Purba, 2017), sebagai sumber protein nabati, biji trembesi berpotensi mensubstitusi tepung kedelai sebagai bahan baku pakan udang.

Pemanfaatan biji trembesi, sebagai pakan unggas, dilaporkan dapat meningkatkan kinerja pertumbuhan ayam broiler serta penggunaannya lebih murah dibanding menggunakan pakan tepung kedelai (Hagan *et al.*, 2016). Biji trembesi juga dimanfaatkan sebagai campuran pakan ikan, seperti dilaporkan oleh (Rath *et al.*, 2014 & 2017), mampu meningkatkan rasio efisiensi protein, masing-masing sebesar  $2,29 \pm 0,19$ , pada benih ikan rohu (*Labeo rohita hamilton*), dan  $1,92 \pm 0,06$  pada ikan mas catla-catla (family Cyprynidae). Kasman *et al.*, (2022), melaporkan bahwa tepung biji trembesi terfermentasi dengan yogurt 4 ml/kg pakan, dapat meningkatkan pertumbuhan mutlak sebesar 21,51%, serta sintasan hingga 88% pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) namun belum ditemukan penggunaannya dalam pakan udang vaname.

Biji trembesi belum dimanfaatkan secara optimal sebagai bahan baku pakan disebabkan oleh kandungan zat anti nutrisi seperti senyawa tanin yang tinggi sebesar 7,4 % (Rath *et al.*, 2017), sedangkan udang vaname hanya mampu mentolerir tanin 2-3% dalam pakan (Novriadi *et al.*, 2021). Senyawa tanin mampu mengikat protein menjadi protein kompleks sehingga sulit dimanfaatkan oleh udang dan berdampak pada rendahnya pencernaan pakan. Selain itu, tanin memiliki rasa pahit, jika digunakan dalam dosis yang tinggi, berdampak terhadap tingkat palatabilitas pakan



yang menurunkan asupan pakan, serta berpengaruh terhadap tingkat penyerapan zat besi dalam tubuh, yang mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan udang (Bolivar *et al.*, 2022). Permasalahan lain yaitu, kandungan protein pada biji trembesi mempunyai dinding sel yang tebal, kandungan serat yang tinggi (11,72%) Anwar *et al.*, (2023). Novriadi *et al.*, (2023) melaporkan bahwa kendala utama dalam pemanfaatan protein dari bahan baku nabati adalah dinding sel yang tebal, tingginya kandungan serat kasar dan adanya zat anti nutrisi serta komposisi asam amino yang berbeda dengan bahan baku protein dari hewani. Berdasarkan hal tersebut, jika konsentrasi biji trembesi dalam pakan berlebihan, menurunkan tingkat pencernaan pakan, dan berdampak terhadap nilai nutrisi yang dimanfaatkan udang berkurang. Salah satu cara untuk menyelesaikan permasalahan tersebut, adalah pendekatan bioteknologi melalui teknik fermentasi.

Fermentasi adalah proses pengubahan bahan organik menjadi bentuk lain melalui kerja enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme (bakteri, protozoa, jamur/kapang/fungi, ragi/yeast) sebagai fermentor (Zhang *et al.*, 2023). Aslamyah *et al.*, (2017), melaporkan bahwa rumput laut yang difermentasi menggunakan mix mikroorganisme terjadi peningkatan kadar protein dari 9,23 ke 15,93%, serta pencernaan bahan kering 24,86 ke 27,76% dan pencernaan bahan organik dari 10,02 ke 11,66%.

Koni *et al.*, (2013), juga melaporkan bahwa kapang *Rhizopus oligosporus* mampu menghidrolisis biji asam sebagai pakan ternak, dengan dosis 3 g/kg dan masa waktu inkubasi selama 3 hari, meningkatkan protein kasar sebesar 64%, serta menurunkan senyawa tanin dari 5,72% ke 0,34%. Hal tersebut, didukung oleh kandungan enzim protease, amilase dan lipase yang diproduksi oleh *Rhizopus oligosporus* (De-Lima *et al.*, 2021). Selanjutnya Helmiati *et al.*, (2020), menyatakan bahwa terjadi peningkatan kandungan protein, dan penurunan kadar serat kasar, bahan ekstrak tanpa nitrogen, hemiselulosa, selulosa, lignin dan antinutrisi, antara lain fenol, tanin, asam fitat dan HCN pada daun kelor yang difermentasi *Bacillus* sp., dimana bakteri *Bacillus* sp menghasilkan enzim protease, amilase dan selulase (Khan *et al.*, 2023). Selanjutnya kapang *Saccharomyces* sp. melalui bantuan enzim invertase mampu meningkatkan nilai pencernaan pakan dan kualitas nutrisi dedak halus terfermentasi, sebagai pakan ikan biawan (*Heleostoma temminckii*) (Cici, 2019), penelitian tersebut menggunakan satu jenis mikroorganisme.

Zhang *et al.*, (2021) melaporkan bahwa fermentasi menggunakan mix mikroorganisme lebih efektif meningkatkan kandungan asam amino esensial (lisin dan metionin) pakan komersil, serta mengaktifkan aktifitas enzim pencernaan, yang menunjang pertumbuhan dan sintasan udang vaname jika dibandingkan dengan menggunakan mikroorganisme tunggal. Hal tersebut ditunjang oleh kontribusi enzim ekstraseluler berbeda yang dikeluarkan masing-masing mikroorganisme (Aslamyah *et al.*, 2022).

Mix mikroorganisme *Bacillus* sp., *Rhizopus* sp., dan *Saccharomyces* sp. dengan komposisi 1 mL + 1 g + 1 g 100 g<sup>-1</sup> tepung, terbukti meningkatkan pencernaan bahan kering (21,94-27,76%), pencernaan bahan organik (8,35-11,66%) protein (9,92-15,93%) dan BETN (58,47-70,26%). Selanjutnya juga dilaporkan bahwa mix

mikroorganisme *Bacillus* sp., *Rhizopus* sp., dan *Saccharomyces* sp. efektif memfermentasi bahan baku pakan ikan dan kepiting dengan dosis 10 mL/100g (Aslamyah *et al.*, 2017; 2021). Berdasarkan kandungan nutrisi biji trembesi terutama protein cukup tinggi sehingga berpotensi dijadikan bahan baku pakan udang vaname pengganti tepung kedelai yang saat ini harganya relatif mahal. Fermentasi tepung biji trembesi menggunakan mix mikroorganisme diharapkan mampu menurunkan kadar serat, kandungan tanin, meningkatkan kandungan asam amino esensial pakan, derajat hidrolisis nutrien, protein terlarut, pencernaan pakan, efisiensi pakan dan kinerja pertumbuhan udang vaname *Litopenaeus vannamei*.

## 1.2. Rumusan Masalah

Biji trembesi sebagai alternatif bahan baku pakan untuk mensubstitusi tepung kedelai pada formulasi pakan udang vaname. Kendala terhadap tingginya kandungan serat kasar, senyawa tanin dan protein yang terbungkus dinding sel dapat diatasi melalui fermentasi menggunakan berbagai jenis mikroorganisme. Mikroorganisme yang digunakan adalah mix mikroorganisme *Bacillus* sp., *Rhizopus* sp., dan *Saccharomyces* sp. berfungsi sebagai agen fermentasi untuk menurunkan kadar serat kasar, kandungan senyawa tanin, menyederhanakan ikatan protein kompleks dan meningkatkan kandungan asam amino esensial pada biji trembesi sebagai bahan baku pakan. Penggunaan beberapa mikroorganisme, mampu menghasilkan kualitas nutrisi yang lebih baik dibanding pakan tanpa fermentasi karena masing-masing mikroorganisme saling bersinergi untuk menghasilkan beberapa enzim pencernaan, seperti amilase, protease, dan lipase (Aslamyah *et al.*, 2022).

Dosis dan lama waktu fermentasi menjadi hal penting untuk mengetahui kinerja mikroorganisme dalam proses fermentasi. Dosis dan lama waktu fermentasi yang tidak optimal sangat berpengaruh terhadap jumlah enzim yang diproduksi oleh mikroorganisme yang berdampak terhadap tingkat degradasi substrat sebagai bahan baku pakan.

Optimalisasi penggunaan kadar substitusi tepung kedelai dengan tepung biji trembesi juga menjadi hal penting untuk dianalisis, sebab penggunaan kadar tepung biji trembesi yang berlebihan dalam formulasi pakan, akan mengurangi komposisi nutrisi yang lain, mengganggu keseimbangan komposisi nutrisi dalam pakan udang. Penggunaan kadar substitusi tepung biji trembesi terfermentasi terhadap tepung kedelai yang optimum dalam komposisi pakan, sangat penting karena kelebihan atau kekurangan dapat menurunkan pertumbuhan udang vaname (Hidayat *et al.*, 2021).

Berdasarkan hal tersebut, penting dilakukan penelitian tentang substitusi tepung kedelai dengan tepung biji trembesi terfermentasi sebagai bahan baku pakan untuk meningkatkan kinerja pertumbuhan udang vaname. Beberapa permasalahan dapat diidentifikasi sebagai berikut:

1. Berapa dosis dan lama waktu fermentasi mix mikroorganisme yang optimal, untuk menurunkan kandungan serat kasar, tanin, menyederhanakan senyawa protein kompleks, serta meningkatkan derajat hidrolisis nutrien tepung biji trembesi?

2. Berapa konsentrasi tepung biji trembesi terfermentasi dalam pakan yang optimal mensubstitusi tepung kedelai untuk menunjang respon kinerja pertumbuhan udang vaname *Litopenaeus vannamei*?

### 1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini secara khusus bertujuan untuk:

1. Mengevaluasi dosis dan lama waktu fermentasi terhadap penurunan kandungan serat, tanin, penyederhanaan senyawa protein kompleks serta meningkatkan derajat hidrolisis tepung biji trembesi terfermentasi.
2. Mengevaluasi kualitas pakan serta kinerja pertumbuhan udang vaname yang diberi pakan substitusi pakan tepung kedelai dengan tepung biji trembesi terfermentasi dalam pakan.

### 1.4. Manfaat Penelitian

Aplikasi mix mikroorganisme (*Bacillus* sp., *Rhizopus* sp., dan *Saccharomyces* sp.) terhadap tepung biji trembesi mampu meningkatkan nilai nutrisi sebagai bahan baku pakan dan mampu mensubstitusi tepung kedelai sebagai sumber protein nabati dalam pakan, untuk menunjang kinerja pertumbuhan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*).

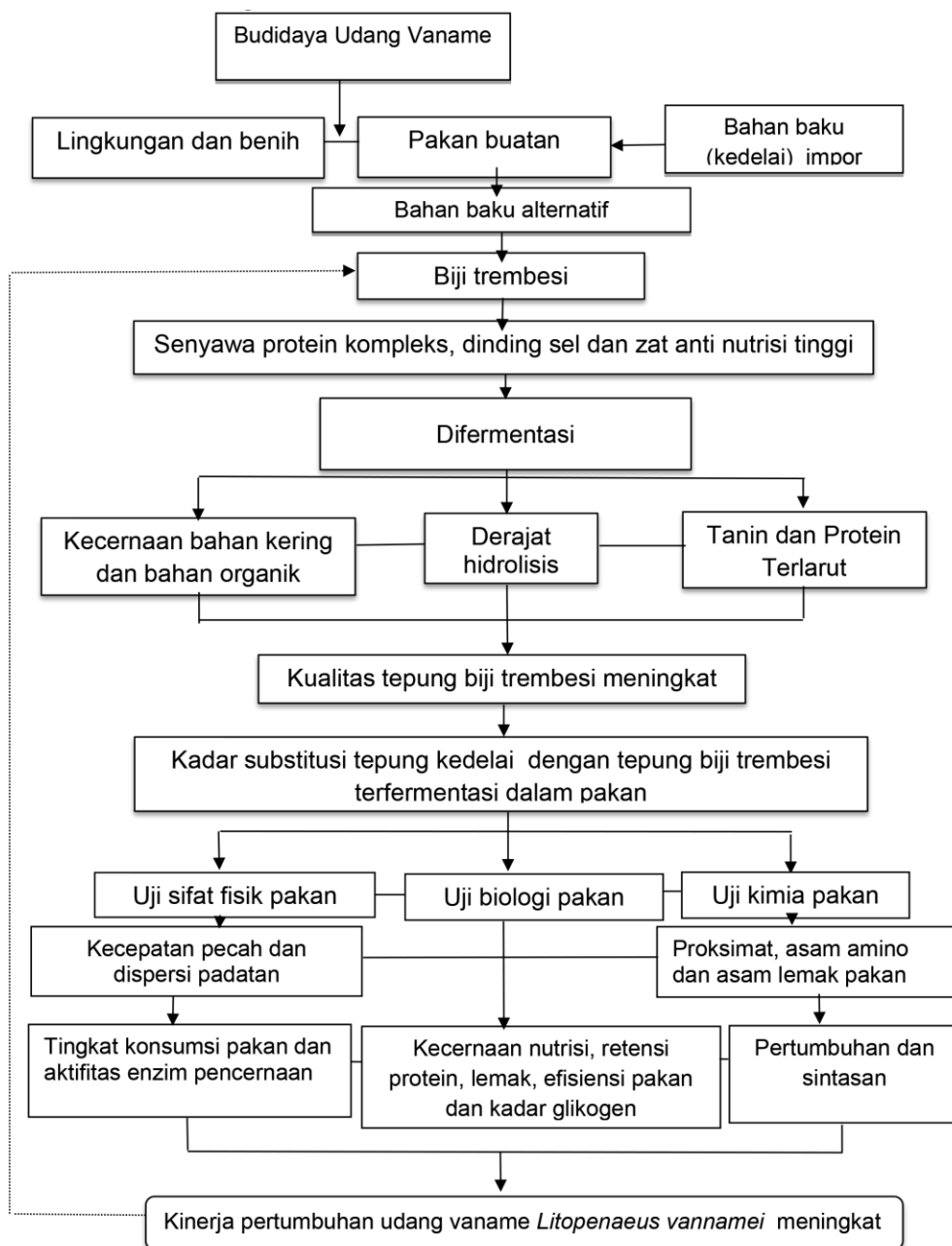
### 1.5. Hipotesis Penelitian

1. Aplikasi dosis dan lama waktu fermentasi menggunakan mix mikroorganisme efektif menurunkan kadar serat kasar, tanin, menyederhanakan senyawa protein kompleks serta meningkatkan derajat hidrolisis tepung biji trembesi terfermentasi.
2. Pakan berkualitas dan efektif mensubstitusi tepung kedelai dengan tepung biji trembesi terfermentasi dalam pakan, untuk meningkatkan kinerja pertumbuhan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*)

### 1.6. Kebaharuan Penelitian (*Novelties*)

Penelitian ini menghasilkan pakan buatan hasil substitusi tepung kedelai menggunakan tepung biji trembesi terfermentasi mix mikroorganisme untuk meningkatkan kinerja pertumbuhan udang vaname.

### 1.7. Kerangka Pikir Penelitian



### 1.8. Daftar Pustaka

- Anwar A, Zainuddin, Djawad M.I., & Aslamyah,S. 2023. Fermentation of trembesi (*Samanea saman*) seed meal using mixed microbes to improve its nutritional quality. *Journal Biodiversitas*. 24(11).
- Aslamyah, S., Karim, M. Y., & Badraeni. 2017. Fermentation of seaweed flour with various fermenters to improve the quality of fish feed ingredients. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 16(1), 8.
- Aslamyah, S., Zainuddin, Z., & Badraeni, B. 2022. The effect of microorganisms combination as probiotics in feed for growth performance, gastric evacuation rates, and blood glucose levels of milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal, 1775). *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 22(1), 77-91.
- Bolívar-Ramírez, N. C., Mallmann, A. S., Schleder, D. D., Machado, C., Seiffert, W. Q., & do Nascimento Vieira, F. 2022. Tannins as a food additive in pacific white shrimp diet. *Aquaculture*, 556, 738232.
- Cici, M. (2019). Pengaruh penambahan dedak halus yang difermentasi dengan *Saccharomyces cerevisiae* dalam pakan terhadap pertumbuhan ikan biawan (*Helostoma temminckii*) (Doctoral dissertation, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan).
- Dawood, M. A. O., & Koshio, S. 2020. Application of fermentation strategy in aquafeed for sustainable aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 987–1002.
- De Lima, T. M., de Almeida, A. B., Peres, D. S., de Sousa, T. L., de Freitas, B. S. M., Silva, F. G., & Egea, M. B. 2021. *Rhizopus oligosporus* as a biotransforming microorganism of *Anacardium othonianum* Rizz. byproduct for production of high-protein, -antioxidant, and-fiber ingredient. *LWT*, 135, 110030.
- Departemen Perdagangan. 2021. Analisis Perkembangan Harga Bahan Pangan Pokok Pasar Di Pasar Domestik Dan Internasional. Pusat pengkajian perdagangan dalam Negeri Badan Pengkajian Dan Pengembangan Perdagangan Kementerian Perdagangan Republik Indonesia.
- Purba, Y. L. A. 2017. Analisis Kadar Protein Pada Kacang Kedelai (*Glycine max* (L.) Merr), Tempe Dan Hasil Olahannya.
- Hagan, M. A. S., Donkoh, A., & Awunyo-Vitor, D. 2016. Growth performance and economic evaluation of broiler Chicken fed with trembesi (*Samanea saman*) seed meal. *Cogent Food and Agriculture*, 2(1), 1–10.
- Han, F., Qian, J., Qu, Y., Li, Z., Chen, H., Xu, C., Zhang, H., Qin, J. G., Chen, L., & Li, E. 2022. Partial replacement of soybean meal with fermented cottonseed meal in a low fishmeal diet improves the growth, digestion and intestinal microbiota of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, 27(May), 101339
- Helmiati, S., Rustadi, R., Isnansetyo, A., & Zulprizal, Z. 2020. Evaluasi Kandungan Nutrien dan Antinutrien Tepung Daun Kelor Terfermentasi sebagai Bahan Baku Pakan Ikan. *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada*, 22(2), 149-158.
- Hidayat, S., & Ginting, N. 2021. Effect of Fermentation Duration and Dosage of Eco Enzyme Use on Nutrient Content of Kepok Banana Stem (*Musa Paradisiaca*

- L.). *Jurnal Peternakan Integratif*, 9(3), 58-64.
- Kari, Z. A., Mat, K., Kabir, M. A., Zal, W. A., Munir, M. B., Wei, L. S., & Téllez-Isaías, G. U. I. L. L. E. R. M. O. 2023. Soybean By-Product: As An Alternative To Fish Meal As Protein Source For Aquaculture Industry. *Journal Of Sustainability Science And Management*, 18(5), 179-202.
- Kasman, Nikma, F., Beqi, Y. R., & Anwar, A. 2022. Aplikasi Bioteknologi Fermentasi Tepung Biji Trembesi Samanea saman Dalam Pakan Terhadap Pertumbuhan dan Sintasan Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Samakia: Jurnal Ilmu Perikanan*, 13(1), 90-97.
- Koni, T. N. I., Paga, A., & Jehemat, A. 2013. Kandungan Protein Kasar dan Tanin Biji Asam yang Difermentasi dengan *Rhizopus Oligosporus*. *Partner*, 20(2), 127–132.
- Mokomele, T., Brandt, B. A., & Görgens, J. F. 2023. Effective fermentation of sugarcane bagasse whole slurries using robust xylose-capable *Saccharomyces cerevisiae*. *BioEnergy Research*, 1-17.
- Murni, Haryati, Aslamyah, & Sonjaya, H. 2018. The Nutrition Waste Vegetables with Invitro Using Rumen Liquids for Feed. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 6(2), 58.
- Novriadi, Romi, Fadhilah, Rifqi, Wahyudi, Eka, A., Trullàs, & Clara. 2021. Effects Of Hydrolysable Tannins On The Growth Performance, Total Haemocyte Counts And Lysozyme Activity Of Pacific White Leg Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, 21.
- Rath, S. C., Nayak, K. C., Mohanta, K. N., Pradhan, C., Rangacharyulu, P. V, Sarkar, S., & Giri, S. S. 2014. Nutritional evaluation of trembesi (*Samanea saman*) pod and its incorporation in the diet of rohu (*Labeo rohita* Hamilton) larvae as a non-conventional feed ingredient. *Indian Journal of Fisheries*, 61(4), 105-U195.
- Rath, S. C., Nayak, K. C., Pradhan, C., Mohanty, T. K., Sarkar, S., Mohanta, K. N., Paul, B. N., & Giri, S. S. 2017. Evaluation of processed trembesi (*Samanea saman*) pod meal as a non-conventional ingredient in the diet of *Catla catla* fry. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 17(2), 323–332.
- Zainuddin, Haryati, & Aslamyah, S. S. 2014. The Influence Of Carbohydrate Level And Feeding Frequency On Feed Conversion Ratio And Survival Rate Of *Litopenaeus Vannamei* Juvenile. *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada*, 16(1), 29–34.
- Zainuddin, Z., Aslamyah, S., Nur, K., & Hadijah. 2019. The Effect of Dosage Combination and Feeding Frequency on Growth and Survival Rate of *Vannamei* Shrimp Juveniles in Ponds. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 370(1).
- Zhang, M., Pan, L., Fan, D., He, J., Su, C., Gao, S., & Zhang, M. 2021. Study of fermented feed by mixed strains and their effects on the survival, growth, digestive enzyme activity and intestinal flora of *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 530, 735703.
- Zhang, K., Zhang, T. T., Guo, R. R., Ye, Q., Zhao, H. L., & Huang, X. H. (2023). The regulation of key flavor of traditional fermented food by microbial metabolism: A review. *Food Chemistry: X*, 100871.

## BAB II

# PENGARUH DOSIS DAN LAMA WAKTU FERMENTASI MENGUNAKAN MIX MIKROORGANISME TERHADAP KUALITAS TEPUNG BIJI TREMBESI

### 2.1. Abstrak

Tepung biji trembesi (*Samanea saman*) merupakan sumber protein, namun pemanfaatannya belum optimal, akibat anti nutrisi seperti tanin sebagai penghambat protein, serat kasar tinggi, protein terlarut serta pencernaan bahan kering dan bahan organik yang rendah. Fermentasi menggunakan mix mikroorganisme mampu meningkatkan nilai nutrisi tepung biji trembesi. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan nilai nutrisi dan menurunkan anti nutrisi tepung biji trembesi menggunakan mix mikroorganisme pada berbagai dosis dan lama waktu inkubasi secara in-vitro. Mix mikroorganisme terdiri atas *Bacillus* sp. *Sacharomices cereviceae* dan *Rhizhopus* sp.. Penelitian didesain menggunakan pola faktorial rancangan dasar acak lengkap, terdiri atas dua faktor yaitu dosis mix mikroorganisme (0; 1,5; 3 dan 4,5mL/100g) dan lama waktu inkubasi (48; 72 dan 96 jam). Hasil penelitian menunjukkan bahwa fermentasi tepung biji trembesi menggunakan dosis mix mikroorganisme, lama waktu fermentasi dan interaksi keduanya berpengaruh signifikan ( $P < 0,05$ ) terhadap pencernaan bahan kering, bahan organik, derajat hidrolisis serat kasar, protein, lemak kasar, Bahan Ekstrak Tanpa Nitrogen (BETN), serta protein terlarut dan tanin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi dosis 4,5mL/100g dan lama waktu fermentasi mix mikroorganisme 72 jam mampu menurunkan kadar serat kasar 59,60%, lemak kasar 73,20% dan meningkatkan kadar protein kasar 11,62%, Bahan Ekstrak Tanpa Nitrogen 6,52%, pencernaan bahan kering 36,78%, pencernaan bahan organik 50,42%, dan protein terlarut 20,27%, serta pengurangan kadar tanin sebesar 37,72%. Penelitian ini menunjukkan bahwa fermentasi menggunakan mix mikroorganisme dengan dosis 4,5 mL/100g, lama waktu fermentasi 72 jam, meningkatkan pencernaan bahan kering, bahan organik dan nilai nutrisi tepung biji trembesi.

**Kata Kunci:** Fermentasi, in vitro, mix mikroorganisme, nutrisi, *Samanea saman*

\*) Telah Terbit Pada Jurnal Biodiversitas Journal Of Biological Diversity Volume 24(11), Halaman 5863-5872, dan DOI: 10.13057/biodiv/d241104

## 2.2. Pendahuluan

Industri pembuatan pakan organisme akuakultur, umumnya menggunakan tepung kedelai. Tepung kedelai efektif sebagai sumber protein nabati, mengandung protein tinggi dengan komposisi asam amino yang seimbang (Qin *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2020). Protein dari bahan nabati memiliki nilai komposisi tertinggi (30-35%), dalam penyusunan bahan baku pakan udang *Litopenaeus vannamei* dibanding protein hewani (Abu-Alya *et al.*, 2021 & Wang *et al.*, 2020), serta penentu utama kapasitas dan kualitas produksi akuakultur (Nunes *et al.*, 2022).

Kebutuhan pangan dunia saat ini, terkait penggunaan kedelai semakin meningkat, selain sebagai sumber nutrisi dalam pangan manusia (Kim *et al.*, 2021), hewan ternak (Vandenplas *et al.*, 2021), juga sebagai bahan baku pembuatan kosmetik (Majchrzak *et al.*, 2022). Kondisi tersebut menyebabkan tingginya persaingan penggunaan kedelai yang berimbas pada mahalnya harga kedelai (Syahril *et al.*, 2022). Berdasarkan hal tersebut, menjadi tantangan dalam akuakultur untuk mencari sumber protein nabati alternatif sebagai bahan baku pakan udang vaname (Murni *et al.*, 2019; Zainuddin *et al.*, 2019), yang tidak bersaing dengan kebutuhan pangan manusia. Salah satu alternatif pengganti tepung kedelai, yaitu tepung biji trembesi. Tepung biji trembesi mengandung protein yang cukup tinggi 40,01%, namun memiliki beberapa kelemahan, diantaranya mengandung serat kasar tinggi 11,72% (Anwar *et al.*, 2023) berdampak terhadap rendahnya pencernaan pakan dan menghambat penyerapan nutrisi (Nunes *et al.*, 2022). Selain itu, mengandung senyawa anti nutrisi seperti tanin 3,99%, dan penggunaannya dalam pakan udang direkomendasikan tidak lebih dari 3% (Novriadi *et al.*, 2021). Kadar tanin yang tinggi dalam pakan menyebabkan rasa pahit dan sepat serta membentuk ikatan kompleks dengan protein dan zat besi, sehingga mengganggu aktivitas enzim-enzim pencernaan yang berakibat menghambat pertumbuhan organisme (Hassan *et al.*, 2020; Soares *et al.*, 2020). Beberapa kelemahan biji trembesi tersebut, dapat diminimalisir melalui fermentasi.

Fermentasi merupakan proses produksi energi didalam sel dalam kondisi anaerobik, yang menghasilkan perubahan biokimia organik melalui kerja enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme (bakteri, protozoa, jamur/kapang/fungi, ragi/yeast) sebagai fermentor (Dawood & Koshio, 2020). Enzim-enzim tersebut mampu menyederhanakan senyawa kompleks menjadi senyawa sederhana, meningkatkan palatabilitas pakan, menghilangkan zat anti nutrisi dan meningkatkan nilai nutrisi bahan baku pakan (Jannathulla *et al.*, 2018). Selama proses fermentasi, *Bacillus* sp. mampu memproduksi enzim amilase sebesar 50.75 IU/g, lignoselulase 64.90 IU/g, selulase 264 U/gds, pektinase 1.19 IU/g dan protease 1546.5 U mL<sup>-1</sup> (Pham *et al.*, 2022 & Salim *et al.*, 2017). *Sacharomices cereviceae* mampu memproduksi enzim protease, amilase, karboksipeptidase, aminopeptidase, dan intervase (Fairbairn *et al.*, 2021; Fernandes *et al.*, 2021; Gronchi *et al.*, 2022). Selanjutnya *Rhizopus* sp. memproduksi enzim lipase, selulase, hemisellulase, amilase, pektinase dan protease (Fernandes *et al.*, 2021; Jaworska *et al.*, 2022; Pathania *et al.*, 2018). Fermentasi bahan baku pakan ikan dengan menggabungkan mikroorganisme



*Bacillus* sp, *Rhizopus* sp dan *Sacharomices* sp menunjukkan kualitas yang jauh lebih baik (Aslamyah *et al.*, 2017), dibanding menggunakan mikroorganisme tunggal (Zhang *et al.*, 2021).

Berdasarkan hal tersebut, menjadi penting untuk melakukan penelitian mengenai pengaruh dosis dan lama waktu fermentasi tepung biji trembesi menggunakan mix mikroorganisme dengan harapan mampu meningkatkan kualitas nutrisi tepung biji trembesi demi menunjang ketahanan pangan dunia.

## **2.4. Bahan dan Metode**

### **2.4.1. Waktu dan Tempat**

Proses fermentasi dilaksanakan pada bulan Juni sampai Juli Tahun 2022 di Laboratorium Nutrisi Balai Pengembangam Penelitian Budidaya Air Payau Maros. Analisis proksimat dan tanin tepung biji trembesi dilakukan di Laboratorium Kimia Pakan, Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin.

### **2.4.2. Prosedur Penelitian**

#### **2.4.2.1. Persiapan Biji Trembesi dan Mix Mikroorganisme**

Biji trembesi diperoleh dari buah trembesi tua dan matang yang jatuh disekitar pohon trembesi (wilayah pekarangan Perumahan Bukit Baruga Antang, Kota Makassar). Buah trembesi dikupas dan diambil bijinya, selanjutnya dijemur sampai kering, kemudian biji trembesi dihaluskan dan diayak dengan ukuran 60 mesh.

Mix mikroorganisme yang digunakan pada penelitian ini adalah *Bacillus* sp., *Rhizopus* sp. dan *Saccharomyces* sp. dicampur berdasarkan metode Aslamyah *et al.*, (2017) dengan komposisi 1 mL + 1g + 1g/100g tepung). *Bacillus* sp. yang digunakan adalah koleksi Laboratorium BRPBAP3 Maros dengan kepadatan  $1,5 \times 10^8$  cfu/mL, ragi tempe dengan kepadatan  $1,6 \times 10^7$  cfu/g dari *Rhizopus* sp. dan ragi roti dengan kepadatan  $1,2 \times 10^8$  cfu/g dari *Saccharomyces* sp.

Ketiga mikroorganisme disegarkan terlebih dahulu dengan cara *Bacillus* sp. dikultur dengan menambahkan air kelapa dan gula pasir, masing - masing 2 mL + 2L + 500g selama 24 jam. Sedangkan *Rhizopus* sp. dan *Saccharomyces* sp. sebanyak 7,5gram masing-masing ditambahkan 10gram gula pasir dan diencerkan dengan menambahkan 100 mL akuades dan disegarkan selama satu jam. *Bacillus* sp., *Rhizopus* sp. dan *Saccharomyces* sp. dihomogenkan dengan cara pengenceran berjumlah 12 mL.

#### **2.4.2.2. Proses Fermentasi Tepung Biji Trembesi**

Tepung biji trembesi sebanyak 100gram ditambahkan mix mikroorganisme sesuai perlakuan dengan menggunakan penyemprot (*sprayer*) secara merata, kemudian dimasukkan kedalam plastik klip ditutup rapat tanpa udara. Selanjutnya disimpan dalam boks dengan tujuan agar suhu ruangan sama, lalu difermentasi berdasarkan lama waktu sesuai perlakuan, setelah proses fermentasi, tepung biji trembesi dikukus pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$  selama satu menit untuk menghentikan kerja

enzim, kemudian didinginkan pada suhu kamar. Terakhir, hasil fermentasi dianalisis di Laboratorium Kimia Pakan, Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin.

### 2.4.3. Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan menggunakan pola faktorial dengan rancangan dasar acak lengkap, mengacu pada Aslamyiah *et al.*, (2017 dan 2021) dimodifikasi, faktor pertama yaitu dosis mix mikroorganisme, dan faktor kedua adalah lama waktu fermentasi.

Faktor pertama adalah dosis mix mikroorganisme pada tepung biji trembesi yaitu:

- (A1) Tanpa penambahan dosis mix mikroorganisme (kontrol)
- (A2) Dosis mix mikroorganisme 1,5 mL /100g tepung biji trembesi
- (A3) Dosis mix mikroorganisme 3,0 mL /100g tepung biji trembesi
- (A4) Dosis mix mikroorganisme 4,5 mL/ 100g tepung biji trembesi

Setiap dosis mix fermentor diberi ulangan sebanyak 3 kali. Faktor kedua adalah lama waktu fermentasi yaitu:

- (B1) lama waktu inkubasi 48 jam
- (B2) lama waktu inkubasi 72 jam
- (B3) lama waktu inkubasi 96 jam

Setiap perlakuan dosis dan lama waktu fermentasi, diperoleh 12 kombinasi perlakuan, dan masing-masing diberi ulangan sebanyak 3 kali sehingga diperoleh 36 satuan percobaan.

Peubah yang diamati adalah sebagai berikut:

#### a. Kecernaan Bahan Kering dan Kecernaan Bahan Organik.

Prosedur analisis kecernaan bahan kering dan organik dimulai dengan mengeringkan sample untuk dianalisis Kecernaan Bahan Kering dan Kecernaan Bahan Organik secara *in vitro*, mengacu pada Tilley dan Terry (1963) dan dihitung berdasarkan rumus :

$$\text{Kecernaan Bahan Kering (\%)} = \frac{\text{BK awal} - (\text{BK akhir} - \text{blanko})}{\text{BK awal}} \times 100\%$$

$$\text{Kecernaan Bahan Organik(\%)} = \frac{\text{BO awal} - (\text{BO akhir} - \text{blanko})}{\text{BO awal}} \times 100\%$$

Keterangan: BK awal = Berat bahan kering sampel sebelum fermentasi (g)  
 BK akhir = Berat bahan kering sampel setelah fermentasi (g)  
 BO awal = Berat bahan organik sampel sebelum fermentasi (g)  
 BO akhir = Berat bahan organik sampel setelah fermentasi (g)  
 Blanko = Berat tepung biji trembesi + saliva buatan (g)

### b. Derajat hidrolisis

Prosedur penentuan derajat hidrolisis, diawali dengan analisis proksimat terhadap tepung biji trembesi tanpa penambahan mix mikroorganisme (kontrol) dan tepung biji trembesi terfermentasi mengikuti metode *Association Of Official Analytical Chemists* (AOAC 1990) yaitu, analisis kadar protein dengan metode Mikrokjeldahl, analisis kadar air dengan metode *thermogravimetry*, analisis kadar abu dengan metode pengabuan cara kering, analisis kadar serat menggunakan metode van soest, analisis lemak menggunakan metode gravimetri. Setelah dilakukan uji proksimat pakan, dilanjutkan dengan menghitung derajat hidrolisis serat kasar, lemak, protein tepung biji trembesi hasil fermentasi diukur berdasarkan metode Aslamyah (2006):

$$\text{DHN} = \frac{N_o - N_t}{N_o} \times 100$$

Keterangan:

DHN = Derajat hidrolisis nutrisi

$N_o$  = Kadar nutrisi bahan baku pakan sebelum hidrolisis

$N_t$  = Kadar nutrisi bahan baku pakan setelah hidrolisis dalam jangka waktu t

### c. Kadar Tanin

Penentuan kadar tanin dalam biji trembesi, dilakukan dengan menganalisis kadar tanin biji trembesi tanpa fermentasi dan kadar tanin pada tepung biji trembesi terfermentasi, berdasarkan metode Nwosu *et al.*, (2014):

$$\% \text{ Tanin} = 100/W \times a_u/a_s \times C \times V_t/V_a \times D$$

Keterangan:

W = berat sampel,  $a_u$  = serapan sampel uji,  $a_s$  = serapan larutan standar tanin, C = konsentrasi larutan standar tanin,  $V_t$  = volume total ekstrak,  $V_a$  = volume ekstrak yang dianalisis, D = rasio antara volume akhir dan volume awal larutan.

### d. Kadar Protein Terlarut

Pengukuran kadar protein terlarut dilakukan pada akhir pengamatan. Tepung biji trembesi hasil fermentasi sebanyak 0,5g yang telah dihidrolisis dan diberhentikan reaksi crude enzimnya proteasenya dengan 1,5 mL trikloroasetat 5% dibiarkan pada suhu ruang, selanjutnya ditambah 3 mL Tris HCL pH 6,5 dan disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh digunakan untuk analisis protein terlarut. Penentuan kadar protein terlarut yang diukur mengacu pada metode Aslamyah (2006).

#### 2.4.4. Analisis Data

Kecernaan bahan kering dan pencernaan bahan organik, derajat hidrolisis serat, protein, lemak, Bahan Ekstrak Tanpa Nitrogen, dan protein terlarut serta kadar tanin, masing-masing perlakuan dianalisis menggunakan sidik ragam. Jika ada perbedaan

antar perlakuan maka dilanjutkan dengan menggunakan uji Duncan pada selang kepercayaan 95% menggunakan program SPSS versi 26.

## 2.5. Hasil

### 2.5.1. Kecernaan Bahan Kering dan Bahan Organik

Dosis mix mikroorganisme dan lama waktu fermentasi serta interaksi keduanya berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap kecernaan bahan kering dan kecernaan bahan organik (Tabel 1, Lampiran 10 dan 12). Nilai rata-rata tertinggi untuk kecernaan bahan kering (75,74%) dan kecernaan bahan organik (69,54%) diperoleh pada dosis mix mikroorganisme 4,5 mL/100 gram dengan lama waktu fermentasi 72 jam, nyata lebih tinggi dari perlakuan lainnya. Selanjutnya nilai rata-rata terendah pada kecernaan bahan kering (55,36%) dan kecernaan bahan organik (46,23%), nyata lebih rendah dibanding dengan perlakuan lainnya, disajikan pada Tabel 1:

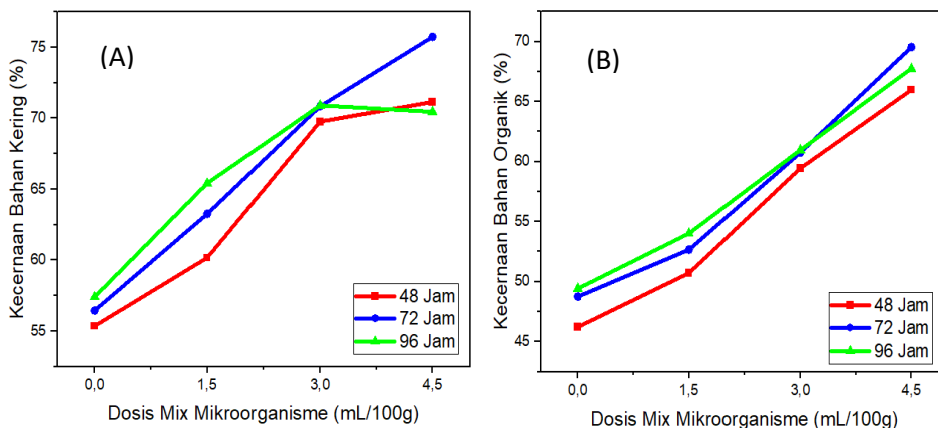
**Tabel 1.** Kecernaan bahan kering dan organik tepung biji trembesi yang difermentasi mix mikroorganisme berdasarkan dosis dan lama waktu fermentasi pada semua perlakuan.

Perlakuan	Kecernaan Bahan Kering (%)	Kecernaan Bahan Organik (%)
A1_B1	55,36±0,01 <sup>a</sup>	46,23±0,01 <sup>a</sup>
A1_B2	56,45±0,05 <sup>b</sup>	48,76±0,01 <sup>b</sup>
A1_B3	57,41±0,00 <sup>c</sup>	49,43±0,00 <sup>c</sup>
A2_B1	60,17±0,01 <sup>d</sup>	50,72±0,00 <sup>d</sup>
A2_B2	63,26±0,01 <sup>e</sup>	52,66±0,01 <sup>e</sup>
A2_B3	65,42±0,01 <sup>f</sup>	54,02±0,01 <sup>f</sup>
A3_B1	69,77±0,01 <sup>g</sup>	59,44±0,11 <sup>g</sup>
A3_B2	70,84±0,01 <sup>i</sup>	60,75±0,01 <sup>h</sup>
A3_B3	70,91±0,00 <sup>j</sup>	60,97±0,01 <sup>i</sup>
A4_B1	71,15±0,01 <sup>k</sup>	65,98±0,01 <sup>j</sup>
A4_B2	75,74±0,01 <sup>l</sup>	69,54±0,01 <sup>l</sup>
A4_B3	70,46±0,01 <sup>h</sup>	67,75±0,01 <sup>k</sup>

Keterangan: Huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ )

A1\_B1=Kontrol\_48 jam; A1\_B2= Kontrol\_72 jam; A1\_B3= kontrol\_96 jam;  
 A2\_B1= Dosis 1,5 ml/L\_48 jam; A2\_B2= Dosis 1,5 ml/100g\_72jam; A2\_B3=  
 Dosis 1,5 ml/100g\_96jam; A3\_B1= Dosis 3 ml/100g\_48 jam; A3\_B2= Dosis 3  
 ml/100g\_72jam; A3\_B3= Dosis 3 ml/100g\_96jam; A4\_B1= Dosis 4,5  
 ml/100g\_48 jam; A4\_B2= Dosis 4,5 ml/100g\_72jam; A4\_B3= Dosis 4,5  
 ml/100g\_96jam.

Interaksi antara dosis mix mikroorganisme dengan lama waktu fermentasi terhadap kecernaan bahan kering dan bahan organik disajikan pada Gambar 2 (A dan B):



**Gambar 2.** Interaksi Antara Dosis Dan Lama Waktu Fermentasi Terhadap Kecernaan Bahan Kering (A) Dan Bahan Organik (B) Tepung Biji Trembesi Yang Difermentasi Menggunakan Mix Mikroorganisme Pada Semua Perlakuan.

Gambar 2 (A dan B) memperlihatkan bahwa semakin tinggi dosis mix mikroorganisme maka semakin tinggi kecernaan bahan kering dan bahan organik tepung biji trembesi. Berbeda dengan lama waktu fermentasi, saat lama waktu ditambahkan menjadi 96 jam pada dosis 4,5mL/100g, kecernaan bahan kering dan bahan organik justru terjadi penurunan.

### 2.5.2. Derajat Hidrolisis Tepung Biji Trembesi

Derajat hidrolisis tepung biji trembesi dihitung menggunakan formula persentase hasil pengurangan analisis proksimat sebelum dan setelah difermentasi menggunakan mix mikroorganisme. Tabel 2 menunjukkan hasil analisis proksimat tepung biji trembesi tanpa fermentasi dan yang difermentasi menggunakan mix mikroorganisme. Hasil penelitian menunjukkan analisis proksimat tepung biji trembesi terfermentasi mix mikroorganisme menggunakan ANOVA memperlihatkan dosis mix mikroorganisme dan lama waktu fermentasi, berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) dan terdapat interaksi antara keduanya terhadap kadar serat kasar, protein, lemak kasar, dan Bahan Ekstrak Tanpa Nitrogen (BETN). Selanjutnya uji lanjut menggunakan Duncan menunjukkan peningkatan kadar protein dan BETN tertinggi berturut-turut yaitu (44,94 dan 44,44%) diperoleh pada dosis mix mikroorganisme 4,5 mL/100 gram dengan lama waktu fermentasi 72 jam, nyata lebih tinggi dari perlakuan lainnya, sedangkan kadar serat kasar (4,12%) dan lemak kasar (0,97%) terendah diperoleh pada dosis mix mikroorganisme 4,5 mL/100 gram dengan lama waktu fermentasi 72 jam, nyata lebih rendah dari perlakuan lainnya, disajikan pada Tabel 2:

**Tabel 2.** Hasil analisis proksimat; serat kasar, protein, lemak, dan BETN tepung biji trembesi sebelum dan setelah difermentasi menggunakan mix mikroorganisme berdasarkan dosis dan lama waktu fermentasi pada semua perlakuan:

No	Perlakuan	Serat Kasar (%)	Protein (%)	Lemak Kasar (%)	BETN (%)
0	00	11,72	40,01	3,63	40,37
1	A1_B1	10,20±0,01 <sup>l</sup>	40,26±0,00 <sup>a</sup>	3,62±0,00 <sup>k</sup>	41,54±0,01 <sup>a</sup>
2	A1_B2	9,23±0,20 <sup>k</sup>	40,36±0,00 <sup>b</sup>	3,60±0,00 <sup>j</sup>	42,46±0,02 <sup>b</sup>
3	A1_B3	9,19±0,10 <sup>k</sup>	40,38±0,05 <sup>c</sup>	3,58±0,00 <sup>i</sup>	42,51±0,01 <sup>c</sup>
4	A2_B1	8,55±0,03 <sup>j</sup>	41,07±0,01 <sup>d</sup>	3,02±0,00 <sup>h</sup>	43,03±0,03 <sup>d</sup>
5	A2_B2	8,22±0,01 <sup>i</sup>	41,88±0,00 <sup>e</sup>	2,97±0,01 <sup>g</sup>	42,64±0,01 <sup>e</sup>
6	A2_B3	8,12±0,01 <sup>h</sup>	42,04±0,00 <sup>f</sup>	2,67±0,00 <sup>f</sup>	42,68±0,01 <sup>f</sup>
7	A3_B1	7,30±0,09 <sup>f</sup>	42,95±0,00 <sup>g</sup>	2,34±0,00 <sup>e</sup>	43,16±0,09 <sup>g</sup>
8	A3_B2	6,56±0,03 <sup>e</sup>	43,01±0,00 <sup>h</sup>	2,20±0,00 <sup>d</sup>	44,00±0,03 <sup>h</sup>
9	A3_B3	6,32±0,02 <sup>d</sup>	43,92±0,00 <sup>i</sup>	2,11±0,00 <sup>c</sup>	43,43±0,02 <sup>i</sup>
10	A4_B1	6,11±0,01 <sup>c</sup>	44,56±0,00 <sup>j</sup>	1,13±0,00 <sup>b</sup>	44,02±0,01 <sup>i</sup>
11	A4_B2	4,12±0,00 <sup>a</sup>	44,94±0,00 <sup>l</sup>	0,97±0,00 <sup>a</sup>	44,44±0,01 <sup>k</sup>
12	A4_B3	5,10±0,00 <sup>b</sup>	44,80±0,00 <sup>k</sup>	1,12±0,00 <sup>b</sup>	44,37±0,01 <sup>j</sup>

Keterangan: Huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ )

Keterangan: 00= tanpa fermentasi; A1\_B1=Kontrol\_48 jam; A1\_B2= Kontrol\_72 jam; A1\_B3= kontrol\_96 jam; A2\_B1= Dosis 1,5ml/L\_48jam; A2\_B2= Dosis 1,5ml/100g\_72jam; A2\_B3= Dosis 1,5 ml/100g\_96jam; A3\_B1= Dosis 3 ml/100g\_48 jam; A3\_B2= Dosis 3 ml/100g\_72jam; A3\_B3= Dosis 3 ml/100g\_96jam; A4\_B1= Dosis 4,5 ml/100g\_48 jam; A4\_B2= Dosis 4,5 ml/100g\_72jam; A4\_B3= Dosis 4,5 ml/100g\_96jam.

Hasil analisis ragam tepung biji trembesi yang difermentasi menggunakan mix mikroorganisme dengan dosis dan lama waktu berpengaruh nyata ( $P<0,05$ ) dan terdapat interaksi keduanya terhadap derajat hidrolisis serat kasar, protein, lemak kasar dan BETN (Lampiran 14, 16,18 dan 20)

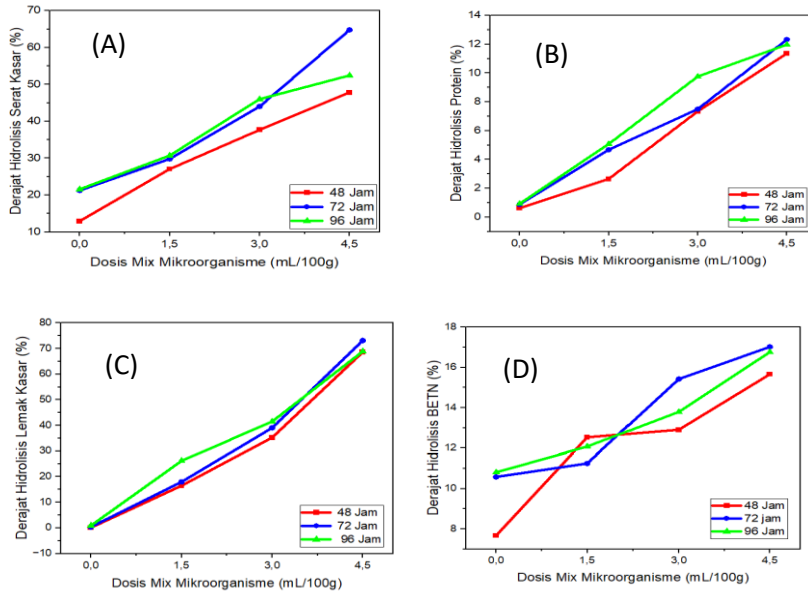
Hasil uji lanjut menggunakan Duncan menunjukkan bahwa derajat hidrolisis serat kasar, protein, lemak kasar dan BETN berturut-turut yaitu 64,76, 12,33, 73,10 dan 17,02% diperoleh pada dosis mix mikroorganisme 4,5 mL/100 gram dengan lama waktu fermentasi 72 jam, nyata lebih tinggi dari perlakuan lainnya, sedangkan derajat hidrolisis serat kasar, protein, lemak kasar dan BETN berturut turut yaitu 12,94, 0,62, 0,09, 7,67% diperoleh pada perlakuan kontrol, nyata lebih rendah dari perlakuan lainnya disajikan pada (Lampiran 13, 15, 17, dan 19) Gambar 3 dan Tabel 3. Selanjutnya pada Gambar 3 (A, B, C dan D) memperlihatkan bahwa semakin tinggi dosis mix mikroorganisme maka semakin tinggi derajat hidrolisis serat kasar, protein, lemak kasar dan BETN, saat lama waktu ditambahkan menjadi 96 jam pada dosis 4,5mL/100g, derajat hidrolisis justru terjadi penurunan.

**Tabel 3.** Derajat hidrolisis serat kasar, protein, lemak dan BETN tepung biji trembesi yang difermentasi mix mikroorganisme berdasarkan dosis dan lama waktu fermentasi pada semua perlakuan.

No	Perlakuan	Derajat Hidrolisis Serat Kasar (%)	Derajat Hidrolisis Protein (%)	Derajat Hidrolisis Lemak kasar (%)	Derajat Hidrolisis BETN (%)
1	A1_B1	12,93 ±0,12 <sup>a</sup>	0,62 ±0,01 <sup>a</sup>	0,09 ±0,15 <sup>a</sup>	7,67 ±0,04 <sup>a</sup>
2	A1_B2	21,24 ±0,17 <sup>b</sup>	0,88±0,01 <sup>b</sup>	0,36 ±0,16 <sup>a</sup>	10,58 ±0,08 <sup>b</sup>
3	A1_B3	21,58 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,93± 0,01 <sup>c</sup>	0,91 ±0,16 <sup>b</sup>	10,81 ±0,06 <sup>c</sup>
4	A2_B1	27,04 ±0,30 <sup>c</sup>	2,65 ±0,02 <sup>d</sup>	16,47±0,16 <sup>c</sup>	12,53±0,10 <sup>f</sup>
5	A2_B2	29,80 ±0,13 <sup>d</sup>	4,68 ±0,01 <sup>e</sup>	17,95 ±0,28 <sup>d</sup>	11,25 ±0,04 <sup>d</sup>
6	A2_B3	30,71 ±0,08 <sup>e</sup>	5,08 ±0,01 <sup>f</sup>	26,14 ±0,16 <sup>e</sup>	12,07 ±0,01 <sup>e</sup>
7	A3_B1	37,68 ±0,76 <sup>f</sup>	7,35 ±0,01 <sup>g</sup>	35,26 ±0,15 <sup>f</sup>	12,90 ±0,29 <sup>g</sup>
8	A3_B2	44,02 ±0,25 <sup>g</sup>	7,50 ±0,01 <sup>h</sup>	39,04 ±0,15 <sup>g</sup>	15,42 ±0,15 <sup>i</sup>
9	A3_B3	46,01 ±0,17 <sup>h</sup>	9,77 ±0,01 <sup>i</sup>	41,52 ±0,16 <sup>h</sup>	13,79 ±0,08 <sup>h</sup>
10	A4_B1	47,83 ±0,12 <sup>i</sup>	11,37 ±0,01 <sup>j</sup>	68,59±0,16 <sup>i</sup>	15,66±0,04 <sup>j</sup>
11	A4_B2	64,78 ±0,21 <sup>k</sup>	12,33 ±0,01 <sup>l</sup>	73,10±0,16 <sup>j</sup>	17,02±0,10 <sup>k</sup>
12	A4_B3	52,44 ±0,13 <sup>j</sup>	11,98 ±0,01 <sup>k</sup>	68,87±0,16 <sup>i</sup>	16,76±0,08 <sup>l</sup>

Keterangan: Huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ )

A1\_B1=Kontrol\_48 jam; A1\_B2= Kontrol\_72 jam; A1\_B3= kontrol\_96 jam;  
 A2\_B1= Dosis 1,5 ml/L\_48 jam; A2\_B2= Dosis 1,5 ml/100g\_72jam; A2\_B3=  
 Dosis 1,5 ml/100g\_96jam; A3\_B1= Dosis 3 ml/100g\_48 jam; A3\_B2= Dosis 3  
 ml/100g\_72jam; A3\_B3= Dosis 3 ml/100g\_96jam; A4\_B1= Dosis 4,5  
 ml/100g\_48 jam; A4\_B2= Dosis 4,5 ml/100g\_72jam; A4\_B3= Dosis 4,5  
 ml/100g\_96jam.



**Gambar 3.** Interaksi Dosis dan lama Waktu Fermentasi Terhadap Derajat Hidrolisis Serat kasar (A), protein(B), Lemak kasar (C) dan BETN (D) Tepung Biji Trembesi Terfermentasi Pada Semua Perlakuan

### 2.5.3. Pengaruh Dosis Dan Lama Waktu Fermentasi Terhadap Pengurangan Kadar Tanin

Tepung biji trembesi yang difermentasi menggunakan mix mikroorganisme menunjukkan bahwa dosis mix mikroorganisme dan lama waktu fermentasi berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) serta terdapat interaksi antar keduanya terhadap pengurangan kadar tanin. Kadar tanin tepung biji trembesi tertinggi (3,87%) diperoleh pada perlakuan kontrol, nyata lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Selanjutnya kadar tanin terendah (2,41%), pada penambahan dosis mix mikroorganisme 4,5 mL/100g dengan lama waktu fermentasi 96 jam, namun nilai ini sama dengan penambahan dosis mix mikroorganisme 4,5 mL/100g dengan lama waktu fermentasi 72 jam (2,46%), nyata lebih rendah dibanding perlakuan lainnya. Disajikan pada Lampiran (22 dan 24) Tabel 4 dan Gambar 4:



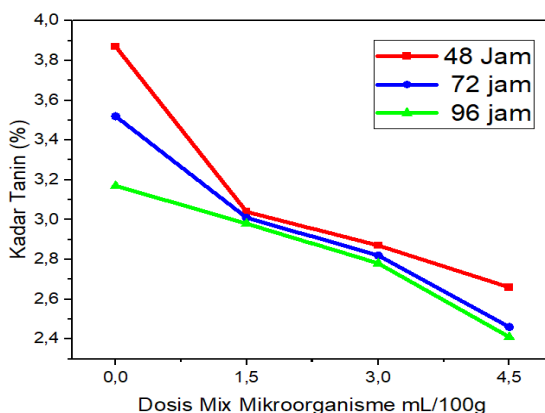
**Tabel 4.** Persentase kadar tanin yang difermentasi mix mikroorganisme berdasarkan dosis dan lama waktu inkubasi pada semua mix perlakuan.

Kombinasi perlakuan	Kadar tanin (%)
A1_B1	3,87 ± 0,00 <sup>h</sup>
A1_B2	3,52 ± 0,00 <sup>g</sup>
A1_B3	3,17 ± 0,00 <sup>f</sup>
A2_B1	3,04 ± 0,00 <sup>e</sup>
A2_B2	3,01 ± 0,01 <sup>e</sup>
A2_B3	2,98 ± 0,01 <sup>e</sup>
A3_B1	2,87 ± 0,01 <sup>d</sup>
A3_B2	2,82 ± 0,01 <sup>cd</sup>
A3_B3	2,78 ± 0,01 <sup>c</sup>
A4_B1	2,66 ± 0,01 <sup>b</sup>
A4_B2	2,46 ± 0,01 <sup>a</sup>
A4_B3	2,41 ± 0,01 <sup>a</sup>

Keterangan: Huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ( $P > 0.05$ )

A1\_B1=Kontrol\_48 jam; A1\_B2= Kontrol\_72 jam; A1\_B3= kontrol\_96 jam;  
 A2\_B1= Dosis 1,5 ml/L\_48 jam; A2\_B2= Dosis 1,5 ml/100g\_72jam; A2\_B3=  
 Dosis 1,5 ml/100g\_96jam; A3\_B1= Dosis 3 ml/100g\_48 jam; A3\_B2= Dosis 3  
 ml/100g\_72jam; A3\_B3= Dosis 3 ml/100g\_96jam; A4\_B1= Dosis 4,5  
 ml/100g\_48 jam; A4\_B2= Dosis 4,5 ml/100g\_72jam; A4\_B3= Dosis 4,5  
 ml/100g\_96jam.

Interaksi yang terjadi antara dosis dan lama waktu terhadap pengurangan kadar tanin yang ditunjukkan pada Gambar 4, bahwa semakin tinggi dosis mix mikroorganisme maka semakin tinggi penurunan kadar tanin tepung biji trembesi. Berbeda dengan lama waktu fermentasi, kadar tanin tidak mengalami penurunan saat lama waktu fermentasi ditambahkan menjadi 96 jam pada dosis 1,5 dan 4,5mL/100g.



**Gambar 4.** Interaksi Dosis Dan Lama Waktu Fermentasi Terhadap Degradasi Kadar Tanin Tepung Biji trembesi Yang Difermentasi Menggunakan Mix Mikroorganisme Pada Semua Perlakuan.

#### 2.5.4. Pengaruh Dosis Mix Mikroorganisme Dan Lama Waktu Fermentasi Terhadap Peningkatan Kadar Protein Terlarut.

Hasil analisis ragam menunjukkan penambahan dosis dan lama waktu fermentasi berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) serta terdapat interaksi antar keduanya terhadap kadar protein terlarut. Uji lanjut menggunakan Duncan memperlihatkan kadar protein terlarut tepung biji trembesi terfermentasi tertinggi (89,88%) pada dosis mix mikroorganisme 4,5 mL/100g dan lama waktu fermentasi 72 jam, nilai tersebut tertinggi dan nyata berbeda dibanding perlakuan lainnya. Selanjutnya kadar protein terlarut terendah (74,73%) pada perlakuan kontrol dengan lama waktu inkubasi 72 jam, kadar ini nyata lebih rendah dibanding dengan perlakuan lainnya, disajikan pada Lampiran (23 dan 24), Gambar 5 dan Tabel 5.

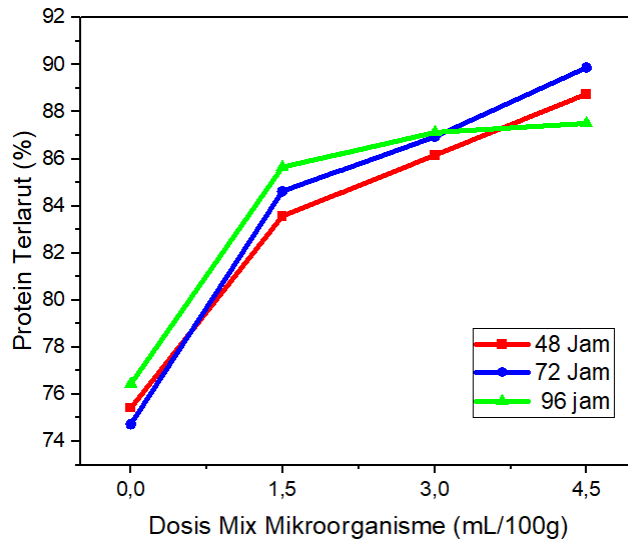
Interaksi yang terjadi antara dosis dan lama waktu terhadap peningkatan protein terlarut yang ditunjukkan pada Gambar 5, bahwa semakin tinggi dosis mix mikroorganisme dan lama waktu fermentasi, protein terlarut yang dihasilkan juga semakin tinggi.

**Tabel 5.** Persentase protein terlarut yang difermentasi mix mikroorganisme berdasarkan dosis dan lama waktu inkubasi pada semua mix perlakuan.

Perlakuan	Protein Terlarut (%)
A1_B1	75,42 ±0,01 <sup>b</sup>
A1_B2	74,73 ±0,01 <sup>a</sup>
A1_B3	76,44 ±0,02 <sup>c</sup>
A2_B1	83,57 ±0,01 <sup>d</sup>
A2_B2	84,63±0,01 <sup>e</sup>
A2_B3	85,65±0,02 <sup>f</sup>
A3_B1	86,16±0,01 <sup>g</sup>
A3_B2	86,94±0,00 <sup>h</sup>
A3_B3	87,13 ±0,01 <sup>i</sup>
A4_B1	88,76±0,01 <sup>k</sup>
A4_B2	89,88±0,00 <sup>l</sup>
A4_B3	87,51±0,14 <sup>j</sup>

Keterangan: Huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ )

A1\_B1=Kontrol\_48 jam; A1\_B2= Kontrol\_72 jam; A1\_B3= kontrol\_96 jam;  
 A2\_B1= Dosis 1,5 ml/L\_48 jam; A2\_B2= Dosis 1,5 ml/100g\_72jam; A2\_B3=  
 Dosis 1,5 ml/100g\_96jam; A3\_B1= Dosis 3 ml/100g\_48 jam; A3\_B2= Dosis 3  
 ml/100g\_72jam; A3\_B3= Dosis 3 ml/100g\_96jam; A4\_B1= Dosis 4,5  
 ml/100g\_48 jam; A4\_B2= Dosis 4,5 ml/100g\_72jam; A4\_B3= Dosis 4,5  
 ml/100g\_96jam.



**Gambar 5.** Interaksi Dosis Dan Lama Waktu Fermentasi Tepung Biji Trembesi Terfermentasi Terhadap Kadar Protein Terlarut Pada Semua Perlakuan.

## 2.6. Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan persentase pencernaan bahan kering berkisar antara 55,37 % hingga 75,74 % sedangkan pencernaan bahan organik berkisar antara 46,23% hingga 69,54 % tertinggi diperoleh pada dosis 4,5 mL/100g dengan lama waktu inkubasi 72 jam (Lampiran 9 dan 10). Tingginya pencernaan bahan organik dan bahan kering pada dosis 4,5 mL/100g, dengan lama waktu fermentasi 72 jam, disebabkan dosis mix mikroorganisme lebih tinggi dibanding perlakuan lainnya, selain itu, diduga akibat efek sinergis kontribusi enzim ekstraseluler protease, amilase dan lipase yang dihasilkan oleh mix mikroorganisme, yang menyebabkan aktivitas enzimnya lebih tinggi, sedangkan perlakuan dengan dosis yang lebih rendah yaitu 1,5 dan 3 mL/100g pencernaan bahan organik dan kering yang dihasilkan lebih rendah, hal ini diduga aktifitas enzim lebih rendah sehingga membutuhkan waktu inkubasi yang lebih lama dan akhirnya proses fermentasi tidak optimal (Liñan-Vidriales *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021; Harlina *et al.*, 2021). Berbeda halnya pada perlakuan kontrol, rendahnya nilai pencernaan bahan organik dan bahan kering akibat tidak adanya proses degradasi senyawa kompleks, akibat tidak ada penambahan mix mikroorganisme penghasil enzim. Selanjutnya penambahan lama waktu fermentasi 96 jam dosis mix mikroorganisme 4,5 mL/100g menunjukkan penurunan pencernaan bahan kering dan organik, yang diakibatkan waktu fermentasi lebih lama sehingga diduga ketersediaan substrat berkurang dan tidak seimbang dengan jumlah mikroorganisme. Hal ini sejalan dengan (Murtius *et al.*, 2022 & Zhu *et al.*, 2022), bahwa dinamika aktivitas enzim bervariasi, bergantung pada dosis dan lama waktu fermentasi.

Nilai kecernaan bahan kering dan organik yang diperoleh pada penelitian ini lebih tinggi dibanding hasil penelitian Lunagariya *et al.*, (2017), menyatakan bahwa fermentasi bahan baku pakan campuran menggunakan enzim protease menghasilkan kecernaan bahan kering 63,03% dan bahan organik 63,62%. Aslamyah *et al.*, (2017), melaporkan fermentasi rumput laut menggunakan mix mikroorganisme menghasilkan kecernaan bahan kering 60,92% dan bahan organik 57,77%. Murni *et al.*, (2018), juga melaporkan bahwa limbah sayur difermentasi menggunakan cairan rumen dengan nilai kecernaan bahan kering 27,76% dan kecernaan bahan organik 11,66%. Fattah *et al.*, (2020), menyatakan bahwa fermentasi konsentrat hijau dengan nilai kecernaan bahan kering 42 % dan kecernaan bahan organik 38,69%, sedangkan Maranatha *et al.*, (2020), melaporkan fermentasi tongkol jagung ditambah daun kelor yang difermentasi menggunakan EM<sub>4</sub> menghasilkan kecernaan bahan kering 67,94% dan bahan organik 66,77%. Selanjutnya Vargas-Ortiz *et al.*, (2022), menyatakan bahwa penggunaan *Acacia mearnsii* (AM) dalam pakan menghasilkan kecernaan bahan kering dan organik 69,5% dan 66,9%. Hal ini disebabkan jenis substrat dan enzim yang berbeda.

Kecernaan bahan kering dan bahan organik merupakan indikator kualitas bahan baku pakan, dimana komposisi bahan organik tersusun dari karbohidrat, protein, lemak, dan vitamin, sedangkan komposisi dari bahan kering terdiri atas abu, karbohidrat, protein, lemak, dan vitamin. Semakin tinggi kecernaan pakan berarti semakin tinggi kualitas bahan baku pakan, begitupun sebaliknya (Hernaman *et al.*, 2022; Selim *et al.*, 2022). Kecernaan bahan kering secara *in vitro* menunjukkan proporsi bahan kering bahan baku yang dapat dicerna oleh mikroorganisme, sedangkan kecernaan bahan organik menunjukkan proporsi bahan organik yang dicerna oleh mikroorganisme (Volpato *et al.*, 2023). Kecernaan merupakan indikasi awal nilai nutrisi dalam bahan pakan yang dapat dimanfaatkan oleh organisme (Hendarto *et al.*, 2022). Nilai daya cerna bahan kering dan bahan organik dapat dipengaruhi oleh komposisi bahan baku dan perlakuan pakan. Tingginya kecernaan bahan baku pakan mencerminkan besarnya kontribusi zat gizi tertentu dalam bahan baku, sedangkan kecernaan rendah menjelaskan bahwa bahan baku tersebut tidak menyediakan nutrisi untuk menunjang kebutuhan primer dan produksi organisme budidaya (Sousa *et al.*, 2023). Kualitas bahan baku pakan ditentukan oleh kualitas daya cerna pakan, semakin tinggi kecernaan bahan kering pakan, semakin tinggi pula kecernaan bahan organik pakan, dan peluang nutrisi bahan baku pakan termanfaatkan oleh organisme budidaya semakin tinggi, begitupun sebaliknya (Wang *et al.*, 2021). Beberapa kategori kualitas bahan pakan berdasarkan tingkat daya cernanya, yaitu: nilai kecernaan pada kisaran 50-60% adalah berkualitas rendah, 60-70% berkualitas sedang dan lebih besar dari 70% berkualitas tinggi (Kearl, 1982).

Hasil penelitian terhadap derajat hidrolisis serat kasar, tertinggi pada perlakuan menggunakan mix mikroorganisme dosis 4,5mL/100g, lama waktu fermentasi 72 jam dengan nilai rata rata yaitu 64,76%. Hal ini disebabkan oleh dosis mix mikroorganisme lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya, sehingga diduga mix mikroorganisme tumbuh dan berkembang lebih cepat, dan berdampak terhadap meningkatnya aktivitas enzim selulase. Fakta ini, dibuktikan pada Gambar

(7), dengan terjadinya peregangan gugus O-H dari gugus hidroksil dan gugus C-H dari gugus selulosa. Terjadinya peregangan gugus intra molekul didalam selulosa tersebut, menyebabkan penguraian ikatan dinding sel, sehingga isi sel keluar dari ikatan lignoselulosa dan hemiselulosa menjadi lebih sederhana pada tepung biji trembesi terfermentasi secara enzimatik yang dihasilkan oleh mix mikroorganisme. Hasil penelitian ini sejalan dengan Anyiam *et al.*, (2023), bahwa dosis mikroorganisme yang lebih tinggi menyebabkan proses fermentasi semakin cepat, akibat meningkatnya pertumbuhan mikroorganisme yang diiringi oleh peningkatan aktivitas enzim pada substrat. Kondisi sebaliknya, pada penambahan lama waktu fermentasi 96 jam, dosis 4,5 mL/100g justru terjadi penurunan derajat hidrolisis. Kondisi tersebut, diduga mix mikroorganisme mulai mengalami penurunan jumlah sel, akibat berkurangnya populasi mikroorganisme dan bertambahnya jumlah mikroorganisme yang mati, akibat sumber nutrisi untuk mendukung pertumbuhan sel mulai habis. Penelitian sebelumnya (Baena *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022; Yunilas *et al.*, 2019), melaporkan bahwa derajat hidrolisis serat dipengaruhi oleh interaksi antara substrat, periode inkubasi, serta jenis dan jumlah enzim, dan lambatnya laju fermentasi sangat menentukan jumlah enzim yang diproduksi dalam media (Pongsetkul *et al.*, 2022). Hasil penelitian tersebut sejalan dengan hasil penelitian ini, bahwa semakin lama waktu fermentasi, semakin banyak substrat terdegradasi oleh enzim yang dihasilkan oleh mix mikroorganisme, hingga mencapai waktu optimal dan akhirnya menurun.

Rendahnya derajat hidrolisis serat kasar pada perlakuan kontrol dengan lama waktu inkubasi 48 jam (12,94%) disebabkan tidak ditamahnya mix mikroorganisme, serta durasi fermentasi yang singkat, sehingga diduga tidak ada proses hidrolisis serat oleh enzim selulase. Selanjutnya rendahnya nilai hidrolisis pada dosis mix mikroorganisme 1,5 dan 3 mL/100g dengan masa waktu fermentasi 48, 72 dan 96 jam, disebabkan dosisnya lebih rendah sehingga aktifitas enzim belum bekerja secara optimal akibat rendahnya aktivitas enzim selulase. Berdasarkan hal tersebut, dosis mix mikroorganisme 4,5 mL/100g lama waktu fermentasi 72 jam adalah dosis dan waktu optimal untuk pertumbuhan mix mikroorganisme yang terdiri atas *Bacillus* sp., *Rhizopus* sp, dan *Saccharomyces* sp, penghasil enzim selulase yang baik. Hal ini sejalan dengan laporan peneliti sebelumnya, bahwa pada awal fermentasi, aktivitas enzim sangat rendah dan meningkat seiring dengan meningkatnya waktu fermentasi (Graf & Buchhaupt., 2022). Aktivitas enzim mengikuti pola pertumbuhan, dimulai dari fase adaptasi, eksponensial, stasioner sampai pada fase kematian.

Serat kasar yang terdiri atas selulosa adalah bagian karbohidrat yang tidak dapat dicerna dan bukan merupakan nutrisi penting pada udang. Sebagian besar serat nabati sulit dicerna oleh udang dan kebutuhannya tidak lebih dari 10% dalam pakan (Jannathulla *et al.*, 2017). Berdasarkan hal tersebut, hasil penelitian ini menunjukkan pengurangan kadar serat kasar dibawah 10%, sehingga tepung biji trembesi layak digunakan sebagai bahan baku pakan udang, terbukti dengan peningkatan derajat hidrolisis serat sebesar 305%. Hasil penelitian ini, sejalan dengan pernyataan peneliti lain, bahwa fermentasi ampas sagu dengan

menambahkan enzim selulase dosis 0,75g/kg pakan mampu menurunkan kadar serat kasar dari 12,79%-7,91% (Zulkarnain *et al.*, 2016). Selanjutnya dilaporkan bahwa serat kasar batang pisang kepok yang difermentasi menggunakan enzim selulase dengan dosis 5%, inkubasi 7 hari, mampu menurunkan kandungan serat kasar dari 17,82%-15,46% (Harahap *et al.*, 2022). Penyederhanaan komponen serat umumnya disebabkan endoglukanase pada enzim selulase mampu memutus ikatan  $\beta$ -1,4 glikosidik pada selulosa menjadi glukosa sebagai senyawa sederhana dan mudah dicerna oleh organisme (Zhou *et al.*, 2023).

Derajat hidrolisis protein tepung biji trembesi tertinggi diperoleh pada dosis 4,5 mL/100g, dengan lama waktu fermentasi 72 jam dan menurun pada lama waktu fermentasi 96 jam. Terjadinya peningkatan kadar protein tepung biji trembesi terfermentasi, juga dibuktikan melalui analisis gugus fungsi pada Gambar 7(A dan B). Gambar 7 menunjukkan adanya peningkatan intra molekul amina N-H adalah 1527/cm sebelum fermentasi dan 1539/cm setelah fermentasi, juga terjadi peningkatan gugus fungsi asam karboksilat C-H dari 1651 menjadi 1652/cm. Kondisi ini disebabkan penambahan mix mikroorganisme *Bacillus* sp, *Rhizopus* sp penghasil enzim protease lebih tinggi dibanding perlakuan lainnya, sebagaimana dilaporkan peneliti sebelumnya bahwa peningkatan konsentrasi enzim protease seiring dengan banyaknya ikatan peptida pada protein yang terputus (Razavizadeh *et al.*, 2022), dan selanjutnya menghasilkan peptida-peptida sederhana dengan kelarutan protein yang tinggi (Cruz-Casas *et al.*, 2021). Aslamyah *et al.*, (2022), juga melaporkan bahwa peningkatan konsentrasi enzim proteolitik pada proses hidrolisis menghasilkan peningkatan kandungan nitrogen terlarut dalam hidrolisat protein bahan baku pakan ikan.

Rendahnya derajat hidrolisis protein tepung biji trembesi pada perlakuan dengan dosis 1,5 dan 3 mL/100g, lama waktu inkubasi 48 dan 72 jam jika dibandingkan dengan dosis 4,5 mL/100g waktu inkubasi 72 jam disebabkan oleh dosis mix mikroorganisme lebih rendah sehingga membutuhkan waktu lebih lama dalam menghidrolisis protein tepung biji trembesi. Sama halnya dosis 4,5 mL/100g, waktu inkubasi 96 jam juga lebih rendah dibanding dosis 4,5 mL/100g dengan lama waktu fermentasi 72 jam. Hal ini disebabkan periode waktu yang terlalu lama sehingga substrat sebagai media tumbuh enzim protease semakin berkurang. Sesuai yang dilaporkan peneliti bahwa rasio antara enzim dan substrat berbanding lurus dengan derajat hidrolisis (Zhang *et al.*, 2022 & Zhu *et al.*, 2021).

Derajat hidrolisis protein merupakan penguraian gugus kovalen penghubung antar molekul asam amino penyusun protein yang menghasilkan asam amino bebas (Dinakarkumar *et al.*, 2022). Beberapa faktor yang berpengaruh terhadap proses hidrolisis yaitu substrat, rasio enzim, pH, perbedaan jenis enzim, suhu dan waktu hidrolisis. Fang *et al.*, (2022) juga melaporkan bahwa selama proses hidrolisis, peningkatan nitrogen terlarut disebabkan oleh meningkatnya enzim protease, kemudian terjadi penguraian senyawa-senyawa protein kompleks yang bersifat tidak larut, menjadi senyawa nitrogen seperti asam amino, amonia dan peptide-peptida yang lebih sederhana dan bersifat mudah larut (Yang *et al.*, 2020).

Derajat hidrolisis lemak kasar tertinggi saat penelitian, diperoleh pada dosis 4,5 mL/100g, dengan waktu inkubasi 72 jam, yaitu 73,10%. Jumlah lemak terhidrolisis meningkat seiring dengan meningkatnya dosis fermentasi, namun tidak demikian dengan lama waktu fermentasi. Lama waktu fermentasi 48 dan 72 jam pada perlakuan kontrol, serta lama waktu fermentasi 48 dan 96 jam pada dosis 4,5 mL/100g, hasil uji statistik, masing-masing menunjukkan hasil yang sama. Hal ini disebabkan konsentrasi substrat sebagai media tumbuh enzim lipase semakin berkurang. Hal yang sama juga dilaporkan bahwa derajat hidrolisis dipengaruhi oleh jenis bahan baku dan konsentrasi enzim yang digunakan, derajat hidrolisis tertinggi menunjukkan kondisi waktu hidrolisis terbaik (Alahmad *et al.*, 2022).

Lemak sebagai sumber energi, berfungsi untuk menjaga integritas struktur membran biologi dan sebagai *precursor* steroid yang penting. Pakan yang mengandung lemak menjadi sumber asam lemak esensial, phospholipid, sterol dan karotenoid yang digunakan untuk pertumbuhan, survival dan metabolisme (Felix and Velasques, 2002). Kandungan lemak dapat mempengaruhi daya simpan dan kestabilan produk hidrolisat terhadap oksidasi lemak (Ovissipour *et al.*, 2009). Produk hidrolisat protein dengan kadar lemak rendah umumnya lebih stabil dan tahan lama dibandingkan dengan produk hidrolisat yang mempunyai kadar lemak yang tinggi.

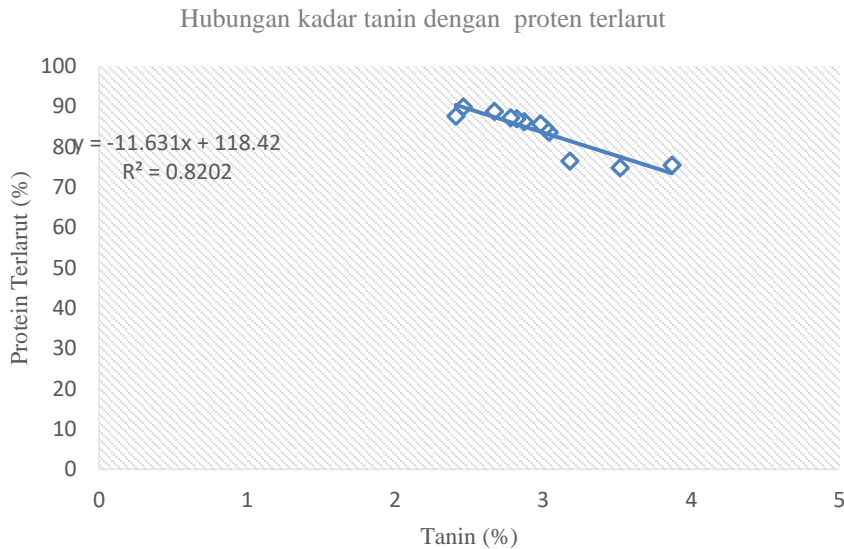
Perlakuan dengan dosis 4,5 mL/100g dengan lama waktu fermentasi 72 jam menghasilkan derajat hidrolisis BETN tertinggi yaitu 17,02% (Tabel 2, Lampiran 19 dan 20). Tingginya derajat hidrolisis BETN pada perlakuan tersebut, diduga akibat tingginya aktivitas enzim selulase, sebagaimana diketahui bahwa Bahan Ekstrak Tanpa Nitrogen (BETN), mengandung glukosa sebagai hasil degradasi karbohidrat oleh enzim selulase. Hal ini disebabkan oleh meningkatnya dosis mix mikroorganisme yang diberikan sehingga memungkinkan pertumbuhan mix mikroorganisme lebih cepat, namun pada dosis yang sama dengan penambahan lama waktu fermentasi 96 jam, derajat hidrolisis BETN justru menurun. Hal ini menunjukkan bahwa mix mikroorganisme optimal memproduksi enzim selulase pada dosis 4,5 mL/100g dengan lama waktu fermentasi 72 jam. Hasil penelitian ini, erat kaitannya dengan fase pertumbuhan mikroorganisme, dimana mikroorganisme bertumbuh mulai dari fase adaptasi, logaritme, stasioner dan fase kematian, dan produksi enzim maksimal pada fase logaritme. Berdasarkan hal tersebut, fase logaritme mix mikroorganisme berada pada dosis 4,5 mL/100g dengan lama waktu fermentasi 72 jam, sedangkan fase stasioner terjadi pada lama waktu fermentasi 96 jam. Hal ini sejalan dengan laporan peneliti sebelumnya bahwa mikroorganisme mampu memproduksi enzim tertinggi pada fase logaritme, dan menurun pada fase stasioner (Graf & Buchhaupt., 2022).

Hasil penelitian selanjutnya, menunjukkan pengurangan kandungan tanin dalam tepung biji trembesi setelah difermentasi menggunakan mix mikroorganisme sebesar 37,72%. Kadar tanin terendah terdapat pada penambahan dosis 4,5 mL/100g lama waktu fermentasi 96 jam (2,41%), namun secara statistik sama saja dengan penambahan lama waktu 72 jam (2,46%), sedangkan kadar tanin tertinggi didapatkan pada perlakuan kontrol yaitu 3,87%. Hal ini disebabkan penambahan

dosis dan lama waktu fermentasi menggunakan mix mikroorganisme *Rhizopus* sp, dan *Saccharomyces* sp, diduga sebagai penghasil enzim tannase, yang mereduksi tanin lebih tinggi dibanding perlakuan lainnya. Penyebab lain, bahwa bakteri asam laktat yang berasal dari *Rhizopus* sp dan *Saccharomyces* sp, diduga menghidrolisis gula dan karbohidrat yang terkandung dalam tepung biji trembesi, sehingga terhidrolisisnya karbohidrat juga menyebabkan tanin terhidrolisis dikarenakan gugus karbohidrat yang terdapat pada struktur molekul tanin. Hasil penelitian sebelumnya, juga dilaporkan bahwa fermentasi spontan pada tepung proso millet (*Panicum miliaceum*) menurunkan kandungan tanin hingga 1,51% (Mahendra *et al.*, 2019), sedangkan *Rhizopus* sp, merupakan penghasil enzim tannase yang baik, dan mampu menurunkan kadar tanin dalam kacang koro (*Canavalia ensiformis*), dosis 0,02 g/100g masa waktu inkubasi selama 26 jam (Ramli *et al.*, 2021). Shang *et al.*, (2019) juga melaporkan bahwa kandungan tanin buah mugua mampu diturunkan sebesar 78% melalui tehnik fermentasi menggunakan mikroorganisme *Lactobacillus* sp, dengan dosis 1g dengan lama waktu inkubasi 34 jam. Tanin merupakan senyawa golongan polyphenol berikatan dengan protein, terutama menghambat enzim protease dan membentuk protein kompleks yang tidak dapat dicerna, serta membatasi ketersediaan protein dan menurunkan pencernaan organisme akuakultur (Olawoye & Gbadamosi, 2017), sehingga penggunaannya dalam pakan ikan tidak lebih dari 3% (Ortiz *et al.*, 2022).

Hasil penelitian selanjutnya, menunjukkan terjadinya peningkatan protein terlarut tepung biji trembesi terfermentasi dari 74,73 menjadi 89,88%, pada dosis 4,5 mL/100g dengan lama waktu inkubasi 72 jam (Tabel 5, Lampiran 23 dan 24), hal ini disebabkan oleh mix mikroorganisme *Bacillus* sp, *Saccharomyces* sp, dan *Rhizopus* sp, bersama-sama mensekresikan enzim protease secara optimal (Hawar, 2022 & Zhang *et al.*, 2021). Hal ini diduga mix mikroorganisme menghasilkan enzim protease mengubah protein tepung biji trembesi menjadi peptida atau asam amino bebas yang mudah larut, sehingga tingginya protein terlarut pada substrat disebabkan oleh pemecahan molekul kompleks menjadi mikromolekul sederhana dan larut dalam air selama fermentasi. Namun bertambahnya waktu inkubasi 96 jam pada dosis yang sama, nilai derajat hidrolisis justru menurun dari 89,88% menjadi 87,51%, ini diduga waktu inkubasi yang terlalu lama, sehingga menyebabkan pertumbuhan mikroorganisme terganggu akibat kekurangan substrat, dan bertahap mati dalam proses fermentasi. Penyebab lain, peningkatan protein terlarut diakibatkan oleh berkurangnya kadar tanin selama proses fermentasi pada penelitian. Hal ini membuktikan, bahwa tanin mampu mengikat protein membentuk senyawa kompleks yang sulit terurai. Penelitian ini membuktikan terjadi korelasi negatif, antara pengurangan kadar tanin dengan peningkatan protein terlarut. Setiap pengurangan kadar tanin 11,631% dalam tepung biji trembesi terfermentasi mix mikroorganisme, protein terlarut bertambah sebesar 118,42 % dengan pengaruh sebesar 82,02%, selebihnya dipengaruhi oleh faktor lainnya yang tidak diteliti (Gambar 6).



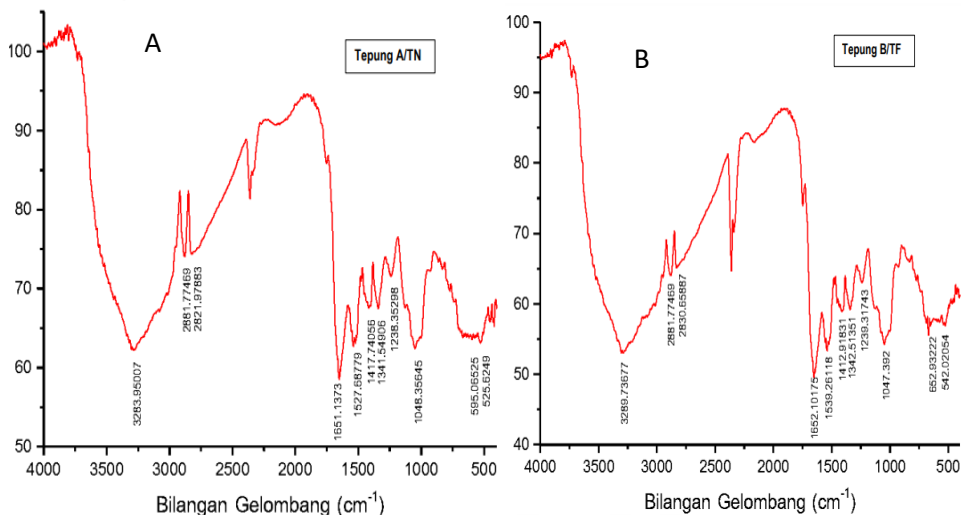


**Gambar 6.** Grafik hubungan antara kandungan tanin dengan protein terlarut tepung biji trembesi terfermentasi mix mikroorganisme pada semua perlakuan.

Pengujian protein terlarut, tidak hanya untuk mengevaluasi tingkat *over* dan *under-processing* tepung biji trembesi, tetapi juga untuk menilai tingkat denaturasi protein, yang menurunkan pemanfaatan protein secara efektif. Penelitian ini, ditemukan protein terlarut meningkat secara signifikan sebesar 13,4% setelah fermentasi, menunjukkan bahwa tepung biji trembesi tidak difermentasi secara berlebihan, dan protein terdegradasi secara efektif. Mekanisme kerja enzim protease dalam menghidrolisis ikatan peptide berlangsung secara endopeptidase, dimana endopeptidase merupakan enzim yang menghidrolisis ikatan peptida pada bagian dalam rantai polipeptida (Christensen *et al.*, 2022). Penelitian ini, sejalan dengan penelitian fermentasi pakan komersil menggunakan mix mikroorganisme (*Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae* dan *Bacillus safeensis*) pada kepadatan  $10^8\text{CFU}^{-1}$  lebih efektif meningkatkan protein terlarut, kandungan asam amino esensial (lisin dan metionin), dibanding menggunakan fermentasi galur tunggal (Zhang *et al.*, 2021). Hasil penelitian sebelumnya, juga dilaporkan bahwa terjadi peningkatan protein terlarut pada kedelai yang difermentasi *Bacillus subtilis natto*, sebesar 17,5% (Zhang *et al.*, 2021).

Pengurangan komposisi kimia kadar serat kasar, tanin dan peningkatan protein terlarut pada tepung biji trembesi terfermentasi pada penelitian ini, juga dibuktikan dengan membandingkan hasil analisis gugus fungsi antara

tepung biji trembesi tanpa fermentasi dengan tepung biji trembesi difermentasi menggunakan dosis mix mikroorganisme 1,5 mL/100g dengan lama waktu fermentasi 72 jam (Gambar 7). Hasil analisis gugus fungsi atau *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy* (FTIR), teridentifikasi pada gambar 4 (A dan B) menunjukkan terjadi peregangan O-H, peregangan C-H, tekukan C-H, dan peregangan C-O. Bilangan gelombang untuk setiap gugus fungsi berbeda antara gambar A dan B, yang mengindikasikan adanya perubahan komposisi kimiawi biji setelah fermentasi.



**Gambar 7.** Analisis Gugus Fungsi /FTIR Tepung biji trembesi (A) Tanpa Fermentasi (B) Difermentasi Menggunakan Mix Mikroorganisme.

Tepung biji trembesi pada penelitian ini, menunjukkan bilangan gelombang O-H stretching sedikit lebih tinggi setelah fermentasi (3289/cm) dibandingkan sebelum fermentasi (3283/cm). Bilangan gelombang untuk tekukan C-H sangat dekat, dengan perbedaan yang kecil, namun tetap berada pada kisaran yang sama sebelum dan sesudah fermentasi (2881/cm). Bilangan gelombang peregangan C-O adalah 1048/cm sebelum fermentasi dan 1047/cm setelah fermentasi menggunakan mix mikroorganisme.

Bilangan gelombang tekukan N-H adalah 1527/cm sebelum fermentasi dan 1539/cm setelah fermentasi, yang menunjukkan sedikit peningkatan pada gugus fungsi tepung biji trembesi setelah fermentasi. Bilangan gelombang tekukan N-H adalah 1238/cm sebelum fermentasi dan 1293/cm setelah fermentasi, menunjukkan peningkatan yang signifikan pada gugus fungsi ini setelah fermentasi. Bilangan gelombang peregangan C=O adalah 1651/cm sebelum fermentasi dan 1652/cm setelah fermentasi, yang menunjukkan sedikit peningkatan pada gugus fungsi pada tepung biji trembesi setelah difermentasi menggunakan mix mikroorganisme.

## 2.7. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa terjadi interaksi antara dosis dan lama waktu fermentasi tepung biji trembesi menggunakan mix mikroorganisme terhadap peningkatan pencernaan bahan organik, pencernaan bahan kering, derajat hidrolisis serat kasar, protein, lemak dan BETN serta protein terlarut dan tanin terbaik pada dosis 4,5 mL/100g dengan waktu fermentasi selama 72 jam.

## 2.8. Daftar Pustaka

- Anwar A, Zainuddin, Djawad M.I., & Aslamyah, S. 2023. Fermentation of trembesi (*Samanea saman*) seed meal using mixed microbes to improve its nutritional quality. *Journal Biodiversitas*. 24(11).
- Abu-Alya, I. S., Alharbi, Y. M., Fathalla, S. I., Zahran, I. S., Shousha, S. M., & Abdel-Rahman, H. A. 2021. Effect of partial soybean replacement by shrimp by-products on the productive and economic performances in African catfish (*Clarias lazera*) diets. *Fishes*, 6(4).
- Alahmad, K., Wenshui, X., Jiang, Q., & Xu, Y. 2022. Effect of the Degree of Hydrolysis on Nutritional, Functional, and Morphological Characteristics of Protein Hydrolysate Produced from Bighead Carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) Using Ficin Enzyme. *Foods*, 11(9).
- Anyiam, P. N., Nwuke, C. P., U huo, E. N., Ije, U. E., Salvador, E. M., Mahumbi, B., & Boyiako, B. H. 2023. Effect of Fermentation Time on Nutritional, Antinutritional Factors and In-Vitro Protein Digestibility of *Macrotermes nigeriensis*-Cassava Mahewu. Measurement: Food, 11, Article ID: 100096.
- Anwar, A., Zainuddin, Z., Djawad, M. I., & Aslamyah, S. 2023. Fermentation of rain tree (*Samanea saman*) seed meal using mixed microbes to improve its nutritional quality. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 24(11).
- Aslamyah, S., Fujaya, Y., Rukminasari, N., Hidayani, A. A., Darwis, M., & Achdiat, M. (2022). Utilization of Feed and Growth Performance of Mud Crabs: The Effect of Herbal Extracts as Functional Feed Additives. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 74.
- Aslamyah, S., Karim, M. Y., & Badraeni. 2017. Fermentation of seaweed flour with various fermenters to improve the quality of fish feed ingredients. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 16(1), 8.
- Aslamyah, S., Manalu, W., Astuti, D. A., Affandi, R., & Wiryawan, K. 2006. *Penggunaan mikroflora saluran pencernaan sebagai probiotik untuk meningkatkan pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan bandeng (Chanos chanos Forsskal)*.
- Baena, A., Orjuela, A., Rakshit, S. K., & Clark, J. H. 2022. Enzymatic hydrolysis of waste fats, oils and greases (FOGs): Status, prospective, and process intensification alternatives. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 175.
- Christensen, L. F., García-Béjar, B., Bang-Berthelsen, C. H., & Hansen, E. B. 2022. Extracellular microbial proteases with specificity for plant proteins in food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 381.

- Cruz-Casas, D. E., Aguilar, C. N., Ascacio-Valdés, J. A., Rodríguez-Herrera, R., Chávez-González, M. L., & Flores-Gallegos, A. C. 2021. Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 3.
- Dawood, M. A. O., & Koshio, S. 2020. Application of fermentation strategy in aquafeed for sustainable aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 987–1002.
- Dinakarkumar, Y., Krishnamoorthy, S., Margavelu, G., Ramakrishnan, G., & Chandran, M. (2022). Production and characterization of fish protein hydrolysate: Effective utilization of trawl by-catch. *Food Chemistry Advances*, 1.
- Fairbairn, S., Engelbrecht, L., Setati, M. E., du Toit, M., Bauer, F. F., Divol, B., & Rossouw, D. 2021. Combinatorial analysis of population dynamics, metabolite levels and malolactic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*/ *Lachancea thermotolerans* mixed fermentations. *Food Microbiology*, 96.
- Fang, X., Chen, Z., Wu, W., Chen, H., Nie, S., & Gao, H. 2022. Effects of different protease treatment on protein degradation and flavor components of *Lentinus edodes*. *EFood*, 3(6).
- Fattah, A. H., Syamsu, J. A., Natsir, A., & Garantjang, S. 2020. In vitro digestibility of fermented rice straw combined with different levels of green concentrate. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 492(1).
- Fernandes, H., Moyano, F., Castro, C., Salgado, J., Martínez, F., Aznar, M., Fernandes, N., Ferreira, P., Gonçalves, M., Belo, I., Oliva-Teles, A., & Peres, H. 2021. Solid-state fermented brewer's spent grain enzymatic extract increases in vitro and in vivo feed digestibility in European seabass. *Scientific Reports*, 11(1).
- Graf, F. M. R., & Buchhaupt, M. 2022. Comparative Investigations on Different  $\beta$ -Glucosidase Surrogate Substrates. *Fermentation*, 8(2), 1–9.
- Gronchi, N., De Bernardini, N., Cripwell, R. A., Treu, L., Campanaro, S., Basaglia, M., Foulquié-Moreno, M. R., Thevelein, J. M., Van Zyl, W. H., Favaro, L., & Casella, S. 2022. Natural *Saccharomyces cerevisiae* Strain Reveals Peculiar Genomic Traits for Starch-to-Bioethanol Production: the Design of an Amyolytic Consolidated Bioprocessing Yeast. *Frontiers in Microbiology*, 12.
- Hagan, M. A. S., Donkoh, A., & Awunyo-Vitor, D. 2016. Growth performance and economic evaluation of broiler Chicken fed with trembesi (*Samanea saman*) seed meal. *Cogent Food and Agriculture*, 2(1), 1–10.
- Han, F., Qian, J., Qu, Y., Li, Z., Chen, H., Xu, C., Zhang, H., Qin, J. G., Chen, L., & Li, E. 2022. Partial replacement of soybean meal with fermented cottonseed meal in a low fishmeal diet improves the growth, digestion and intestinal microbiota of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, 27(May), 101339.
- Harahap, Hasnudi, & N. Ginting. 2022. Effect of Fermentation Duration and Dosage of Eco Enzyme Use on Nutrient Content of Kepok Banana Stem (*Musa Paradisiaca* L.). *Jurnal Peternakan Integratif*, 9(3), 58–64.

- Harlina, H., Hamdillah, A., Kamaruddin, K., & Aslamyah, S. 2021. Digestibility of fermented copra meal for fish as plant protein source in the Saline tilapia (*Oreochromis niloticus*) Seeds. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 763(1).
- Haryati, Aslamyah, S., & Surianti. 2017. Pengaruh Penggunaan Bungkil Ampas Tahu Hasil Fermentasi dengan menggunakan Mikroorganisme Mix terhadap Aktivitas Enzim Pencernaan Juvenil Udang Vanname. *Prosiding. Simposium Kelautan Dan Perikanan*.
- Hassan, Z. M., Manyelo, T. G., Selaledi, L., & Mabelebele, M. 2020. The effects of tannins in monogastric animals with special reference to alternative feed ingredients. *Molecules*, 25(20), 1–17.
- Hawar, S. N. 2022. Extracellular Enzyme of Endophytic Fungi Isolated from *Ziziphos spina* Leaves as Medicinal Plant. *International Journal of Biomaterials*, 2022.
- Hendarto, E., Bahrun, B., Hidayat, N., Istiqomah, D., & Puspita Candrasari, D. 2022. Productivity and Nutrient Digestibility of Sorghum Fodder at Different Urine Fertilizers Levels and Harvest Times. *Animal Production*, 24(1), 23–30.
- Hernaman, I., Ayuningsih, B., Ramdani, D., & Islami, R. Z. 2022. The Improvement of Maize Cobs Quality through Soaking in Firewood Ash Filtrate and Its Impact on In Vitro Rumen Fermentability and Digestibility. *Internatonal Journal on Advanced Science, Engineering an Information Technology*, Vol. 12 (2022) No. 1, pages: 372-378,
- Jannathulla, R., Dayal, J. S., Ambasankar, K., Eugene, A. C., & Muralidhar, M. 2018. Fungus, *Aspergillus niger*, fermented groundnut oil cake as a fishmeal alternative in the diet of *Penaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 49(8), 2891–2902.
- Jannathulla, R., Dayal, J. S., Vasanthakumar, D., Ambasankar, K., & Muralidhar, M. 2017. Effect of fermentation methods on amino acids, fiber fractions and anti-nutritional factors in different plant protein sources and essential amino acid index for *Penaeus vannamei* Boone, 1931. *Indian Journal of Fisheries*, 64(2), 40–47.
- Jaworska, G., Szarek, N., & Hanus, P. 2022. Effect of Celeriac Pulp Maceration by *Rhizopus sp.* Pectinase on Juice Quality. *Molecules*, 27(23).
- Kearl. 1982. *Nutrient Requirements of Ruminants in Developing Countries*.
- Khan, M. (2018). Histidine Requirement of Cultivable Fish Species: A Review. *Oceanography & Fisheries Open Acces Journal* 8(5), 1–7.
- Kim, I. S., Kim, C. H., & Yang, W. S. 2021. Physiologically active molecules and functional properties of soybeans in human health—a current perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8).
- Liñan-Vidriales, M. A., Peña-Rodríguez, A., Tovar-Ramírez, D., Elizondo-González, R., Barajas-Sandoval, D. R., Ponce-Gracia, E. I., Rodríguez-Jaramillo, C., Balcázar, J. L., & Quiroz-Guzmán, E. 2021. Effect of rice bran fermented with *Bacillus* and *Lysinibacillus* species on dynamic microbial activity of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 531.
- Lunagariya, P. M., Gupta, R. S., & Parnerkar, S. 2017. In vitro evaluation of total

- mixed ration supplemented with exogenous fibrolytic enzymes for crossbred cows. *Veterinary World*, 10(3), 281–285.
- Mahendra, E. D. P., Luh Ari Yusasrini, N., & Desak Putu Kartika Pratiwi. 2019. The Effect of Processing Method on Tanin Content and Functional Properties Proso Millet (*Panicum Miliaceum*) Flour. *Ilmu Dan Teknologi Pangan*, 8(4), 354–367.
- Majchrzak, W., Motyl, I., & Śmigielski, K. 2022. Biological and Cosmological Importance of Fermented Raw Materials: An Overview. *Molecules*, 27(15).
- Manik, & Arleston. 2021. *Buku\_nutrisi-dan-pakan-ikan-64849eb1*.
- Maranatha, G., Fattah, S., Sobang, Y. U. L., Yunus, M., & Henuk, Y. L. 2020. Digestibility of dry matter and organic matter and the in vitro rumen parameters of complete feed from fermented corn cobs and moringa (*Moringa oleifera*) leaves meal. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 454(1).
- Mirawati, Ciptaan, G., & Ferawati. 2019. The effect of *Bacillus subtilis* inoculum doses and fermentation time on enzyme activity of fermented palm kernel cake. *Journal of World's Poultry Research*, 9(4), 211–216.
- Mubarok, M. T., Jumadi, R., & Rahim, A. R. 2020. Analysis Of The Feeding Of Fish And Fish Skin Waste To The Growth And Retention Of Protein In Dumbo Catfish (*Clarias gariepinus*). *Jurnal Perikanan Pantura (JPP)*, 3(1).
- Murni, Haryati, Aslamyah, & Sonjaya, H. 2018. The Nutrition Waste Vegetables with Invitro Using Rumen Liquids for Feed. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 6(2), 58.
- Murni, Sonjaya, H., Haryati, & Aslamyah, S. 2019. Measuring the Substitution of Vegetable Waste Fermented Rumen Fluid with Tofu Waste in Vannamei Shrimp Feed. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 9(6).
- Murtius, W. S., Hari, P. D., & Putri, I. N. 2022. The Effect of Incubation Time to the Activity of Lipase Produced by *Bacillus thuringiensis* on Coconut (*Cocos nucifera* L.) Dregs. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1059(1).
- Novriadi, Romi, Fadhilah, Rifqi, Wahyudi, Eka, A., Trullàs, & Clara. 2021. Effects Of Hydrolysable Tannins On The Growth Performance, Total Haemocyte Counts And Lysozyme Activity Of Pacific White Leg SHRIMP *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, 21.
- Nunes, A. J. P., Dalen, L. L., Leonardi, G., & Burri, L. 2022. Developing sustainable, cost-effective and high-performance shrimp feed formulations containing low fish meal levels. *Aquaculture Reports*, 27(September), 1–12.
- Nwosu JN, Ezegbe CC, Uzomah A, Iwouno JO, Olawuni IA. 2014. Evaluation of the anti-nutritional properties of the seed of Chinese fan palm (*Livistona chinensis*). *Intl J Curr Microbiol Appl Sci* 3 (5): 962- 974
- Olawoye, & Gbadamosi. 2017. Effect of different treatments on in vitro protein digestibility, antinutrients, antioxidant properties and mineral composition of *Amaranthus viridis* seed. *Cogent Food and Agriculture*, 3(1).
- Ortiz, Chavez-Garcia, D., Barros-Rodríguez, M., Andrade-Yucailla, V., Lima-Orozco, R., Macías-Rodríguez, E., Guishca-Cunuhay, C., & Zeidan Mohamed Salem,

- A. 2022. Rumen Function and In Vitro Gas Production of Diets Influenced by Two Levels of Tannin-Rich Forage. *Fermentation*, 8(11), 607.
- Pathania, S., Sharma, N., & Handa, S. 2018. Utilization of horticultural waste (Apple Pomace) for multiple carbohydrase production from *Rhizopus delemar* F2 under solid state fermentation. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(1), 181–189.
- Peng, K., Qiu, J., Li, C., Lu, H., Liu, Z., Liu, D., & Huang, W. 2023. A multi-angle analysis of injury induced by supplementation of soybean meal in *Litopenaeus vannamei* diets. *Frontiers in Microbiomes*, 2(March), 1–12.
- Pham, M. A., Hwang, G. D., Kim, Y. O., Seo, J. Y., & Lee, S. M. 2010. Soybean meal and wheat flour, proper dietary protein sources for optimal growth of snail (*Semisulcospira coreana*). *Aquaculture International*, 18(5), 883–895.
- Pham, V. H. T., Kim, J., Shim, J., Chang, S., & Chung, W. 2022. Purification and Characterization of Strong Simultaneous Enzyme Production of Protease and  $\alpha$ -Amylase from an Extremophile-Bacillus sp. FW2 and Its Possibility in Food Waste Degradation. *Fermentation*, 8(1).
- Pongsetkul, J., Benjakul, S., & Boonchuen, P. 2022. Changes in Volatile Compounds and Quality Characteristics of Salted Shrimp Paste Stored in Different Packaging Containers. *Fermentation*, 8(2), 1–19.
- Qin, P., Wang, T., & Luo, Y. 2022. A review on plant-based proteins from soybean: Health benefits and soy product development. *Journal of Agriculture and Food Research*, 7.
- Ramli, N. A. M., Chen, Y. H., Mohd Zin, Z., Abdullah, M. A. A., Rusli, N. D., & Zainol, M. K. 2021. Effect of soaking time and fermentation on the nutrient and antinutrients composition of *Canavalia ensiformis* (Kacang Koro). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 756(1).
- Rath, S. C., Nayak, K. C., Mohanta, K. N., Pradhan, C., Rangacharyulu, P. V, Sarkar, S., & Giri, S. S. 2014. Nutritional evaluation of trembesi (*Samanea saman*) pod and its incorporation in the diet of rohu (*Labeo rohita* Hamilton) larvae as a non-conventional feed ingredient. *Indian Journal of Fisheries*, 61(4), 105-U195.
- Rath, S. C., Nayak, K. C., Pradhan, C., Mohanty, T. K., Sarkar, S., Mohanta, K. N., Paul, B. N., & Giri, S. S. 2017. Evaluation of processed trembesi (*Samanea saman*) pod meal as a non-conventional ingredient in the diet of *Catla catla* fry. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 17(2), 323–332.
- Razavizadeh, S., Alencikiene, G., Vaiciulyte-Funk, L., Ertbjerg, P., & Salaseviciene, A. 2022. Utilization of fermented and enzymatically hydrolyzed soy press cake as ingredient for meat analogues. *LWT*, 165.
- Roy, S., Kumar, V., Mitra, A., Manna, R. K., Suresh, V. R., & Homechaudhuri, S. 2018. Amylase and protease activity in shrimps and prawn of sundarbans, west bengal, india. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 47(1), 53–59.
- Saade, E., Aslamyeh, S., & Salam, N. I. 2011. Kualitas pakan buatan udang windu yang menggunakan berbagai dosis tepung rumput laut ( *Gracilaria gigas* ) sebagai bahan perekat *Quality of tiger shrimp artificial feed using various dosages of seaweed ( Gracilaria gigas ) meal as binder*. 10(1980).

- Safir, M., Serdiati, N., Mansyur, K., & Tantu, F. Y. 2022. Evaluasi Tepung Bulu Seribu (*Acanthaster planci*) sebagai Kandidat Bahan Pakan Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Media Akuatika*, 7(4), 170.
- Salim, A. A., Grbavčić, S., Šekuljica, N., Stefanović, A., Jakovetić Tanasković, S., Luković, N., & Knežević-Jugović, Z. 2017. Production of enzymes by a newly isolated *Bacillus* sp. TMF-1 in solid state fermentation on agricultural by-products: The evaluation of substrate pretreatment methods. *Bioresource Technology*, 228, 193–200.
- Selim, Hasan, M. N., Rahman, M. A., Rahman, M. M., Islam, M. R., Bostami, A. B. M. R., Islam, S., & Tedeschi, L. O. 2022. Nutrient content and in vitro degradation study of some unconventional feed resources of Bangladesh. *Heliyon*, 8(5), e09496.
- Shang, Cao, H., Ma, Y. L., Zhang, C., Ma, F., Wang, C. X., Ni, X. L., Lee, W. J., & Wei, Z. J. 2019. Effect of lactic acid bacteria fermentation on tannins removal in Xuan Mugua fruits. *Food Chemistry*, 274(August 2018), 118–122.
- Simon, C. J., Truong, H., Habilay, N., & Hines, B. 2021. Feeding behaviour and bioavailability of essential amino acids in shrimp *penaeus monodon* fed fresh and leached fishmeal and fishmeal-free diets. *Animals*, 11(3), 1–17.
- Singh, P., & Krishnaswam, K. 2022. Sustainable zero-waste processing system for soybeans and soy by-product valorization. *Trends in Food Science & Technology*, 128, 331–344.
- Soares, S., Brandão, E., Guerreiro, C., Soares, S., Mateus, N., & De Freitas, V. 2020. Tannins in food: Insights into the molecular perception of astringency and bitter taste. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 11). MDPI AG.
- Sousa, R., Recio, I., Heimo, D., Dubois, S., Moughan, P. J., Hodgkinson, S. M., Portmann, R., & Egger, L. 2023. In vitro digestibility of dietary proteins and in vitro DIAAS analytical workflow based on the INFOGEST static protocol and its validation with in vivo data. *Food Chemistry*, 404.
- Syahril, S., Saputra, A., Irmayani, I., Fahlevi, M., Ertika, Y., & Mahdani, S. 2022. World Vegetable Oil Competition in 1960-2019. *International Journal of Energy Economics and Policy*, 12(3), 108–115.
- Tilley, J. M. A. and R. A. Terry. 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crop. *Journal of the British Grassland Society* 18: 104- 111
- Vandenplas, Y., Hegar, B., Munasir, Z., Astawan, M., Juffrie, M., Bardosono, S., Sekartini, R., Basrowi, R. W., & Wasito, E. 2021. The role of soy plant-based formula supplemented with dietary fiber to support children's growth and development: An expert opinion. *Nutrition*, 90, 111278.
- Vargas-Ortiz, L., Chavez-Garcia, D., Barros-Rodríguez, M., Andrade-Yucailla, V., Lima-Orozco, R., Macías-Rodríguez, E., Guishca-Cunuhay, C., & Zeidan Mohamed Salem, A. 2022. Rumen Function and In Vitro Gas Production of Diets Influenced by Two Levels of Tannin-Rich Forage. *Fermentation*, 8(11), 1–11.
- Wang, Al Farraj, D. A., Vijayaraghavan, P., Hatamleh, A. A., Biji, G. D., & Rady, A. M. 2020. Host associated mixed probiotic bacteria induced digestive enzymes in the gut of tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Saudi Journal of Biological*



*Sciences*, 27(9), 2479–2484.

- Wang, J., Zhang, H., Yang, Q., Tan, B., Dong, X., Chi, S., Liu, H., & Zhang, S. 2020. Effects of replacing soybean meal with cottonseed meal on growth, feed utilization and non-specific immune enzyme activities for juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, 16(November 2019).
- Wang, Ma, S., Li, L., & Huang, J. 2022. Effect of wheat bran dietary fiber on structural properties and hydrolysis behavior of gluten after synergistic fermentation of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Nutrition*, 9(3).
- Wang, R., Mohammadi, M., Mahboubi, A., & Taherzadeh, M. J. 2021. In-vitro digestion models: a critical review for human and fish and a protocol for in-vitro digestion in fish. In *Bioengineered* (Vol. 12, Issue 1, pp. 3040–3064). Bellwether Publishing, Ltd.
- Wedemeyer, G. A., & Yasutake, W. . 1977. Clinical methods for the assessment of the effects of environmental stress on fish health. *US Fish and Wildlife Service*, 89.
- Yang, Qu, Y., Li, J., Liu, X., Wu, R., & Wu, J. 2020. Improvement of the protein quality and degradation of allergens in soybean meal by combination fermentation and enzymatic hydrolysis. *Lwt*, 128(April), 109442.
- Yang, X., Chi, S., Tan, B., Nie, Q., Hu, J., Dong, X., Yang, Q., Liu, H., & Zhang, S. 2020. Yeast hydrolysate helping the complex plant proteins to improve the growth performance and feed utilization of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, 17(March), 100375.
- Yunilas, Lili Warly, Yetti Marli, & Irsan Riyanto. 2019. The Activity Of Cellulose Enzyme From Indigenous Bacteria “*Bacillus Sp YLB1*” As Bioactivator. *Jurnal Peternakan Integratif*, 7(2), 10–18.
- Zainuddin, Haryati, & Aslamyah, S. S. 2014. The Influence Of Carbohydrate Level And Feeding Frecuency On Feed Converting Ratio And Survival Rate Of *Litopenaeus Vannamei* Juvenile. *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada*, 16(1), 29–34.
- Zainuddin, Z., Aslamyah, S., Nur, K., & Hadijah. 2019. The Effect of Dosage Combination and Feeding Frequency on Growth and Survival Rate of *Vannamei* Shrimp Juveniles in Ponds. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 370(1).
- Zhang, L., Song, C., Chang, J., Wang, Z., & Meng, X. 2022. Optimization of protein hydrolysates production from defatted peanut meal based on physicochemical characteristics and sensory analysis. *LWT*, 163.
- Zhang, M., Pan, L., Fan, D., He, J., Su, C., Gao, S., & Zhang, M. 2021. Study of fermented feed by mixed strains and their effects on the survival, growth, digestive enzyme activity and intestinal flora of *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 530.
- Zhang, Y., Ishikawa, M., Koshio, S., Yokoyama, S., Dossou, S., Wang, W., Zhang, X., Shadrack, R. S., Mzengereza, K., Zhu, K., & Seo, S. 2021. Optimization of soybean meal fermentation for aqua-feed with *Bacillus subtilis natto* using the response surface methodology. *Fermentation*, 7(4).

- Zhou, S., Zhang, M., Zhu, L., Zhao, X., Chen, J., Chen, W., & Chang, C. (2023). Hydrolysis of lignocellulose to succinic acid: a review of treatment methods and succinic acid applications. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 16(1), 1-17.
- Zhu, L., Wei, W., Wu, R., Zhang, X., Guo, H., Wang, D., & Wu, F. 2022. Dynamics of Enzyme Activities during the Decomposition of *Castanopsis carlesii* Leaf Litter in the Forest Canopy and Forest Floor in a Mid-Subtropical Area. *Forests*, 13(11).
- Zhu, X., Wang, L., Zhang, Z., Ding, L., & Hang, S. 2021. Combination of fiber-degrading enzymatic hydrolysis and lactobacilli fermentation enhances utilization of fiber and protein in rapeseed meal as revealed in simulated pig digestion and fermentation in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 278.
- Zulkarnain, Zuprizal, Wihandoyo, & Supadmo. 2016. Effect of cellulase supplementation on in vitro digestibility and energy, crude fiber and cellulose content of sago palm (*Metroxylon* sp.) waste as broiler chicken feed. *Pakistan Journal of Nutrition*, 15(11), 997–1002.