

PENINGKATAN KANDUNGAN ASAM AMINO HIDROLISAT TEMPE SEMANGIT MELALUI PENGGUNAAN ENZIM PROTEASE DARI DAUN KELOR

Enhancing the Hydrolyzed Amino Acid Content of Overripe Tempeh through the Utilization of Moringa Leaf Protease Enzyme.

Adolf J. N. Parhusip^{1*}, Vania Christella Hartono², Alfredo², Elin Kristianto², Jesseline Fraulencia²

¹Laboratorium Mikrobiologi, Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Pelita Harapan, Tangerang, Indonesia

²Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Pelita Harapan, Tangerang, Indonesia

*e-mail : adolf.pahursip@uph.edu

ABSTRAK

Adanya perlakuan waktu fermentasi yang lebih lama pada tempe semangit menyebabkan peningkatan kandungan asam amino pada tempe semangit. Penambahan enzim protease daun kelor pada tempe semangit akan menyebabkan terjadinya hidrolisis yang memberikan efek peningkatan kandungan asam amino. Pada penelitian ini, hidrolisat tempe semangit dibuat dengan menggunakan variasi waktu fermentasi tempe selama 2 hari, 3 hari, 4 hari, dan 5 hari serta penambahan konsentrasi enzim protease dari daun kelor sebanyak 0.1%, 0.15%, 0.2%, dan 0.25%. Parameter uji yang dilakukan meliputi uji aktivitas enzim, kadar protein, uji asam amino, kadar air, dan chroma. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa hidrolisat tempe semangit dengan perlakuan waktu fermentasi selama 5 hari dan penambahan enzim sebesar 0.25% memiliki asam amino tertinggi serta kadar protein yang rendah. Uji warna menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada nilai a^* dan b^* akibat perlakuan antar sampel hidrolisat. Nilai *lightness* hidrolisat tempe semangit 5 hari dengan penambahan 0.25% menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dengan sampel kontrol. Kadar air yang didapat pada penelitian ini belum sesuai dengan standar SNI. Enzim protease daun kelor yang telah dipurifikasi melalui tahapan dialisis mencapai kondisi optimumnya pada suhu 50°C dan pH 7.

Kata kunci: aktivitas enzim, asam amino, daun kelor, hidrolisat tempe semangit, protease

ABSTRACT

Longer time of fermentation treatment in overripe tempeh causes an increase in amino acid content in overripe tempe. The addition of protease enzymes from dial oleifera leaves to overripe tempeh will cause protein hydrolysis that leads to an increase in amino acid content. In this study, hydrolysate from overripe tempeh was made with different fermentation time variation for 2 days, 3 days, 4 days and 5 days and the addition of protease enzyme from Moringa leaves with various concentrations (0.1%, 0.15%, 0.2%, and 0.25%). Several test conducted to get physical and chemical characteristics include enzyme activity test, protein content, amino acid test, water content, and chroma. The results obtained showed that the hydrolysate from overripe tempeh that have been fermented for 5 days with the addition of 0.25% Moringa oleifera leaves purified enzymes has the highest amino acids and low protein content. The color test showed a significant difference in the values of a^ and b^* due to the treatment between hydrolyzed samples. The value of lightness of overripe tempeh hydrolysate for with 5 days fermentation time and an addition of 0.25% enzymes indicates a significant difference with the control sample. The moisture content*

obtained in this study have greater value than SNI standards. *Moringa oleifera* leaves purified protease enzymes purified through the stages of dialysis reach their optimum conditions at 50°C and pH 7.

Keywords: overripe tempeh hydrolysate, moringa leaves, protease, enzyme activity, amino acids

PENDAHULUAN

Tempe merupakan salah satu pangan khas Indonesia yang penggunaannya sudah meluas. Tempe merupakan produk hasil fermentasi yang terbuat dari kedelai. Fermentasi tempe dilakukan dengan menggunakan kapang *Rhizopus* sp. Tempe merupakan pangan yang mengandung protein yang tinggi yaitu sebesar 20.29%. Selama proses fermentasi kedelai menjadi tempe, terjadi perubahan baik secara fisik maupun kandungan pada tempe. Selama proses fermentasi, terjadi hidrolisis yang menyebabkan makromolekul seperti protein diubah menjadi mikromolekul berupa asam amino dan peptida. Umumnya tempe difermentasi selama 24 hingga 48 jam.

Fermentasi tempe yang lebih lama (48-72 jam) menghasilkan produk berupa tempe semangit. Tempe semangit memiliki warna yang lebih gelap dibanding tempe segar serta rasa yang khas yaitu sedikit masam dan pahit sehingga kurang digemari masyarakat dan kurang dikembangkan lebih lanjut (Gunawan-Puteri *et al.*, 2015). Tempe semangit memiliki kandungan asam amino yang tinggi. Penelitian Witono *et al.* (2015) menunjukkan bahwa asam amino non esensial dengan kadar tertinggi pada tempe semangit adalah asam glutamat yaitu

sebesar 18.88 mg/100g dan asam amino esensial tertinggi adalah leusin yaitu sebesar 16.23 mg/100 g. Asam glutamat memiliki kecenderungan rasa umami sehingga dapat digunakan sebagai *flavor enhancer*.

Moringa oleifera atau yang sering dikenal dengan nama tanaman kelor merupakan tanaman yang banyak ditemukan di Indonesia. Daun kelor memiliki aktivitas protease yang tinggi. Aktivitas protease pada daun kelor sebesar 4.27 u/mg sedangkan enzim bromelain memiliki aktivitas protease sebesar 4.52 - 4.72 u/mg (Sharmila *et al.*, 2012; Mohan *et al.*, 2016). Enzim protease pada daun kelor tergolong ke dalam enzim serine endoprotease. Enzim ini akan bekerja secara optimum pada suhu 40-60°C pada pH 5-7 (Fathimah dan Wardani, 2014).

Enzim protease merupakan enzim yang dapat memecah ikatan polipeptida protein menjadi molekul yang lebih kecil yaitu peptida dan asam amino. Aktivitas dari sebuah enzim dipengaruhi oleh beberapa hal antara lain adalah suhu, pH, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, dan adanya inhibitor dan aktivator (Noviyanti *et al.*, 2012). Setiap enzim memiliki kondisi optimum yang berbeda-beda. Proses purifikasi enzim dilakukan untuk mengkaji struktur dan sifat enzim. Adanya proses

purifikasi enzim akan menghasilkan enzim dengan aktivitas yang lebih tinggi. Salah satu metode purifikasi enzim adalah metode dialisis. Prinsip metode dialisis adalah pemisahan molekul dengan menggunakan membran semipermeabel. Pemisahan molekul dilakukan berdasarkan perbedaan ukuran antar molekul. Pada metode ini, digunakan larutan buffer dalam jumlah yang banyak sehingga molekul-molekul berukuran kecil akan berpindah dari membran semipermeabel menuju buffer.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui suhu dan pH optimum enzim protease daun kelor, menentukan lama waktu fermentasi tempe yang dibutuhkan untuk mendapatkan tempe dengan kandungan asam amino yang tinggi, serta menentukan optimasi penambahan enzim protease pada hidrolisat tempe berdasarkan kadar protein dan kandungan asam aminonya.

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kedelai kuning yang didapat dari Pasar Modern Paramount Serpong, ragi tempe komersial (RAPRIMA), daun kelor yang diambil di daerah Tangerang, folin, natrium bikarbonat, trichloroacetic acid (TCA), kasein, aquades, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , methanol, H_3PO_4 , bovine serum albumin (BSA) dan indikator *coomasie blue*.

Pembuatan Enzim Protease

Proses isolasi enzim protease ini dibagi menjadi 2 tahap yaitu tahap ekstraksi dan purifikasi. Tahapan purifikasi dilakukan dengan menggunakan metode dialisis. Metode ini memisahkan molekul berdasarkan ukurannya dengan bantuan membran semipermeabel dan larutan buffer.

Pada tahap ekstraksi, daun kelor segar dicuci kemudian dipisahkan dari tangkainya. Daun kelor ditimbang sebanyak 100 g dan diblender dengan menggunakan buffer fosfat sebagai pelarut. Hasil yang didapatkan kemudian disaring menggunakan kain saring. Filtrat kemudian di sentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Supernatan dikumpulkan di botol gelap dan disimpan pada suhu dingin.

Ekstrak enzim kasar yang didapat dari proses ekstraksi selanjutnya akan dipurifikasi dengan menggunakan metode dialisis yang memiliki prinsip *salting out*. Enzim kasar dari hasil ekstraksi sebelumnya ditambah dengan ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 70% kemudian diaduk pada suhu rendah dengan bantuan *ice bath* dan selama 30 menit. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Endapan yang didapatkan kemudian dimasukkan ke dalam kantung dialisis dan direndam pada beaker berisi buffer fosfat dengan perbandingan 1:10. Beaker kemudian disimpan pada suhu 4°C (*chiller*). Larutan

buffer fosfat diganti dengan larutan yang baru setiap 2 jam selama 3x. Hasil yang didapatkan kemudian dimasukkan ke dalam botol kaca gelap dan disimpan pada suhu rendah (4°C).

Penelitian Tahap I

Sampel enzim dari ekstrak daun kelor segar dan ekstrak daun kelor terpurifikasi di uji dengan menggunakan uji aktivitas enzim dengan rentang suhu *waterbath* 40°C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, dan 60 °C serta pH 4,5,6,7, dan 8. Rancangan percobaan pada penelitian tahap I adalah rancangan acak lengkap (RAL) 1 faktor dengan pengulangan sebanyak 2 kali. Perlakuan yang diuji pada tahap preparasi adalah sumber enzim protease, suhu uji aktivitas enzim, dan pH uji aktivitas enzim. Sumber enzim protease yang diuji meliputi enzim protease daun kelor segar dan enzim protease daun kelor terdialisis. Suhu yang diujikan pada uji aktivitas enzim adalah suhu 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, dan 60°C. Taraf pH yang digunakan untuk uji aktivitas enzim meliputi 4,5,6,7, dan 8. Data statistik akan diolah dengan menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS).

Pembuatan Hidrolisat Tempe Semangit

Tahap ini terdiri dari 2 bagian yaitu pembuatan tempe semangit dan pembuatan hidrolisat tempe semangit. Kedelai kuning ditimbang sebanyak 300 gram kemudian dicuci dan direndam selama 12 jam dengan menggunakan air dengan perbandingan 1:2. Setelah 12 jam, kedelai dibilas dengan air

bersih kemudian dibersihkan kulit arinya. Kedelai yang telah bersih lalu dikukus selama 45 menit hingga lunak. Selanjutnya ragi ditambahkan ke dalam kedelai sebanyak 0.5% b/b dan dibungkus dengan menggunakan daun pisang yang telah dilayukan. Ragi yang digunakan pada proses pembuatan tempe ini merupakan ragi komersial. Fermentasi pada suhu ruang (30°C) selama waktu yang telah ditentukan (2, 3, 4, dan 5 hari).

Tempe dikukus selama 10 menit dan diblender dengan menggunakan air sebanyak 1:2. Hasil yang didapatkan kemudian ditambah dengan larutan NaOH 1 N atau HCL 1N hingga mencapai pH optimum. Enzim protease kemudian ditambahkan dengan jumlah tertentu (0.10%, 0.15%, 0.20% dan 0.25%). Inkubasi dilakukan selama 2.5 jam pada *waterbath* dengan suhu optimum. Setelah inkubasi selesai, larutan dikeringkan dengan menggunakan *cabinet dryer*. Selanjutnya dilakukan pengecilan ukuran dengan menggunakan *food processor* dan diayak dengan menggunakan ayakan 40 mesh.

Penelitian Tahap II

Rancangan percobaan pada penelitian tahap II adalah rancangan acak lengkap (RAL) 2 faktor dengan pengulangan sebanyak 2 kali. Faktor yang digunakan pada tahap preparasi adalah waktu fermentasi, suhu inkubasi hidrolisat tempe, konsentrasi enzim protease. Data statistik akan diolah dengan menggunakan

Statistical Package for the Social Sciences (SPSS).

Analisis

Parameter Analisis yang dilakukan selama penelitian ini meliputi perhitungan rendemen (Fahr Arnata *et al.*, 2015), Analisis Protein Metode Bradford (Utami *et al.*, 2016), Analisis Profil Asam Amino, Analisis Kadar Air (Fahroji dan Hendri, 2016), Uji Aktivitas Enzim (Cupp-Enyard, 2008), Uji Warna, dan Uji Asam Lemak.

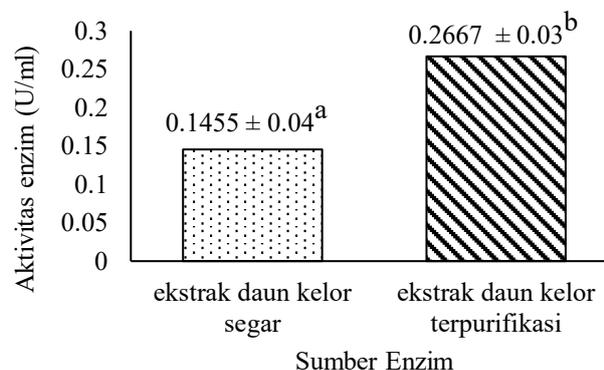
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Sumber Enzim Terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Daun Kelor

Adanya proses purifikasi akan menyebabkan enzim protease yang didapatkan lebih murni sehingga aktivitas enzim tersebut akan meningkat. Penelitian sebelumnya oleh Banik *et al.* (2018) juga menunjukkan bahwa

adanya tahapan purifikasi dengan menggunakan dialisis akan menyebabkan kenaikan aktivitas enzim sebesar 1.5 hingga 2 kali lipat dari dibanding ekstrak awal (*crude enzyme*)

Ekstraksi daun kelor (*Moringa oleifera*) yang dilakukan pada penelitian ini memiliki rendemen sebesar $64.49 \pm 3.55\%$ (v/w). Berdasarkan Gambar 1 terlihat bahwa ada perbedaan yang signifikan antara aktivitas enzim dari daun kelor segar dan aktivitas enzim dari daun kelor yang telah melalui tahap purifikasi dengan metode dialisis. Ekstrak daun kelor terpurifikasi memiliki aktivitas enzim yang lebih tinggi dibandingkan dengan enzim dari ekstrak daun segar.



Gambar 1. Grafik pengaruh sumber enzim terhadap aktivitas enzim

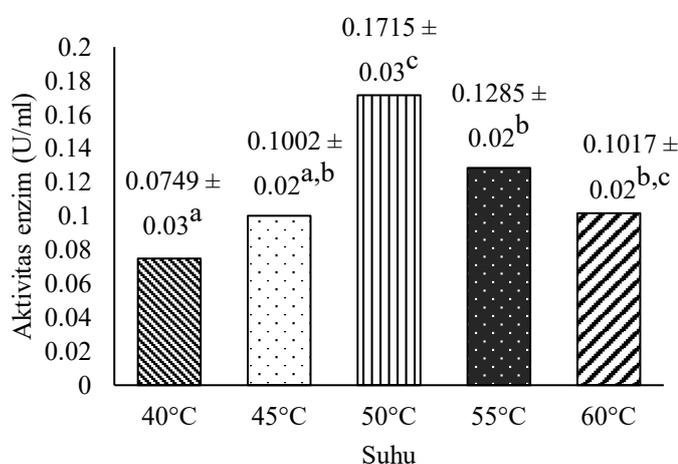
. Protein cenderung memiliki sifat yang larut dalam air dan hanya membutuhkan sedikit konsentrasi garam agar tetap stabil dan tidak terurai. Penggunaan garam amonium sulfat pada

proses purifikasi berfungsi untuk memisahkan protein yang mudah menggumpal (agregasi) dan menyisakan protein yang larut (Duong-Ly dan Sandra, 2014).

Penentuan Suhu Optimum Enzim Protease Daun Kelor

Hasil yang didapatkan dari pengolahan data dengan menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) menunjukkan bahwa adanya perbedaan signifikan pada aktivitas enzim protease daun kelor akibat perbedaan suhu. Pada Gambar 2 terlihat adanya perbedaan

aktivitas enzim yang disebabkan oleh perbedaan suhu. Pada suhu yang lebih rendah yaitu 40°C dan 45°C aktivitas enzim yang didapatkan lebih rendah dibanding pada suhu 50°C. Pada suhu 55°C dan 60°C terjadi penurunan aktivitas enzim. Suhu 50°C memiliki aktivitas enzim tertinggi dan menjadi suhu optimum bagi enzim protease daun kelor.



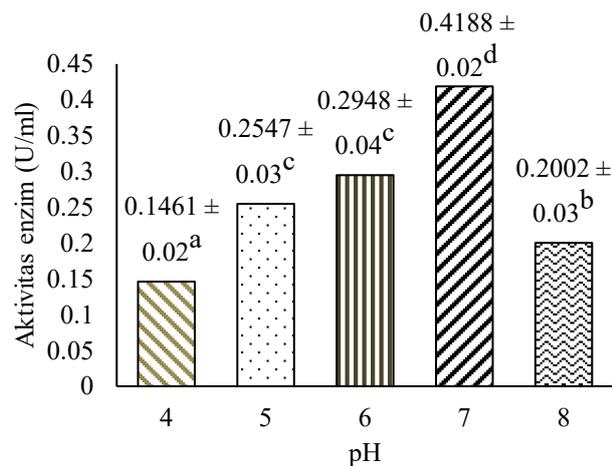
Gambar 2. Grafik pengaruh suhu inkubasi terhadap aktivitas enzim

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa suhu optimum enzim protease dari daun *Moringa oleifera* adalah 50°C (Fathimah dan Wardani, 2014; Pontual *et al.*, 2012). Selanjutnya pada suhu yang lebih tinggi yaitu pada suhu 55°C dan 60 °C aktivitas enzim semakin menurun.

Penentuan pH Optimum Enzim Protease Dari Daun Kelor

Hasil yang didapatkan melalui pengolahan data secara statistik

menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan aktivitas enzim protease pada pH yang berbeda. Gambar 3 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas enzim pada pH asam hingga pH netral (4-7) dan selanjutnya terjadi penurunan aktivitas enzim pada pH (8). Berdasarkan Gambar 3 juga terlihat bahwa pH 7 memiliki aktivitas enzim tertinggi dan menjadi pH optimum enzim protease daun kelor.



Gambar 3. Grafik pengaruh suhu inkubasi terhadap aktivitas enzim

Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Pontual *et al.* (2018) yang menunjukkan bahwa pada pH 8 (basa) terjadi penurunan drastis pada aktivitas enzim. Penelitian oleh Fathimah dan Wardani (2014) juga menunjukkan bahwa enzim protease dari daun kelor cenderung berada pada kondisi optimum pada pH 5-7. Penurunan ini disebabkan oleh karena pada pH basa (di atas 7), kestabilan enzim akan turun (Fathimah dan Wardani, 2014). Adanya perbedaan pH akan menyebabkan terjadinya perubahan bentuk/struktur, posisi, dan muatan substrat serta ionisasi pada sisi aktif enzim (Purich, 2010).

Penentuan Sampel Hidrolisat Tempe Terpilih berdasarkan Kadar Protein dengan Metode Bradford

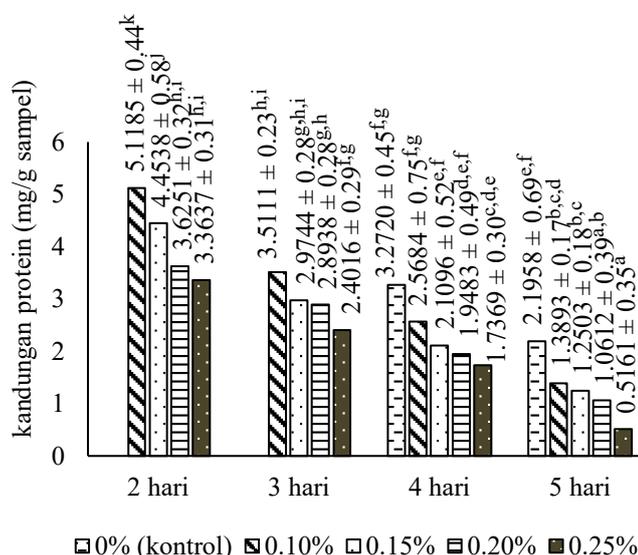
Hasil yang ditunjukkan pada Tabel 1 mengindikasikan bahwa daun kelor segar memiliki protein yang lebih tinggi dibandingkan daun kelor hasil dialisis. Berdasarkan perhitungan statistik dengan menggunakan SPSS, terdapat perbedaan yang signifikan antara kadar protein daun kelor segar dan daun kelor hasil dialisis. Hal ini disebabkan karena proses dialisis merupakan tahapan pemurnian enzim. Pada proses dialisis, pemisahan partikel berdasarkan ukuran partikel dengan menggunakan membran. Kandungan protein yang lebih kecil pada enzim daun kelor hasil dialisis disebabkan karena hilangnya partikel pengganggu selama proses pemurnian.

Tabel 1. Kadar protein daun kelor segar dan dialisis

Sumber protein	Kadar protein enzim (mg/ml)
Daun Kelor Segar	8.5573 ± 1.08
Daun Kelor Dialisis	5.4038 ± 0.72

Gambar 4 menunjukkan bahwa lama waktu fermentasi dan penambahan enzim menyebabkan penurunan kandungan protein. Kadar protein tertinggi dimiliki oleh hidrolisat tempe fermentasi 2 hari dengan

penambahan enzim 0.1%. Sedangkan kadar protein terendah dimiliki oleh hidrolisat tempe yang difermentasi selama 5 hari dengan penambahan enzim sebesar 0.25%.



Gambar 4. Grafik pengaruh waktu fermentasi dan penambahan konsentrasi enzim terhadap kandungan protein hidrolisat tempe semangit

Hidrolisat yang dibuat dari tempe semangit yang difermentasi selama 5 hari memiliki hasil uji Bradford yang rendah. Hasil yang rendah dari hari ke hari ini mengindikasikan bahwa protein yang terlarut semakin banyak jumlahnya. Ragi berupa kapang *Rhizopus sp.* yang ditambahkan pada tempe akan menghasilkan enzim-enzim yang berperan untuk memecah senyawa kompleks pada kedelai menjadi

senyawa yang lebih sederhana. Semakin lama waktu fermentasi, maka akan semakin banyak senyawa kompleks yang terpecah menjadi senyawa sederhana yang menyebabkan protein terlarut yang semakin banyak sehingga hasil konsentrasi protein pada sampel semakin rendah (Mukhoyaroh, 2015). Penelitian yang dilakukan oleh Witono *et al.* (2015) menunjukkan bahwa adanya proses fermentasi akan

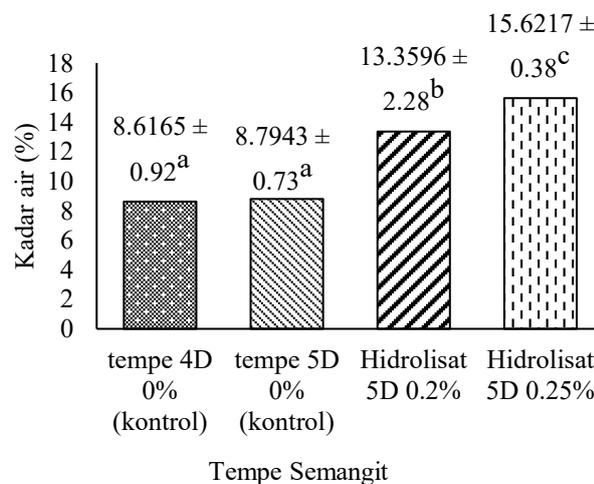
meningkatkan kandungan protein terlarut pada tempe. Pernyataan ini juga didukung oleh hasil penelitian Affandi *et al.* (2011) yang membuktikan bahwa tempe yang difermentasi selama 48 jam memiliki kandungan protein terlarut terbanyak jika dibandingkan dengan tempe dengan waktu fermentasi yang lebih singkat.

Penambahan konsentrasi enzim pada hidrolisat tempe semangit menyebabkan adanya peningkatan kandungan protein terlarut. Enzim protease diketahui mampu menghidrolisis makromolekul protein menjadi senyawa mikromolekul yang lebih sederhana (Okfrianti *et al.*, 2011). Secara keseluruhan, Gambar 4 menunjukkan bahwa penambahan enzim sebesar 0.25% menghasilkan peningkatan kandungan protein terlarut yang signifikan. Konsentrasi enzim merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim dan kemampuan enzim dalam melakukan

hidrolisis terhadap protein. Konsentrasi enzim yang semakin tinggi akan mempercepat laju reaksi enzim sehingga jumlah protein yang terhidrolisis akan semakin banyak (Purwaningsih, 2017). Hidrolisis pada protein akan menyebabkan adanya perubahan berat molekul senyawa menjadi lebih kecil sehingga akan mudah larut dalam pelarut (Agustina *et al.*, 2018). Berdasarkan penelitian oleh Hasniar *et al.* (2019), konsentrasi enzim yang besar akan menghasilkan produk dengan kandungan protein yang tinggi.

Kadar Air Sampel Hidrolisat Tempe Terpilih dan Tempe Semangit sebagai Kontrol

Hasil yang didapatkan dapat dilihat pada Gambar 5 menunjukkan bahwa perubahan hidrolisat tempe semangit (Hidrolisat 5D 0.2% dan hidrolisat 5D 0.25%) memiliki kadar air yang lebih tinggi dibandingkan dengan kadar air tempe kontrol.



Gambar 5. Grafik perbandingan kadar air tempe kontrol dan hidrolisat tempe semangit

Jika dibandingkan dengan SNI tepung (BSN, 2009) yaitu kadar air maksimal 14.5% sebagai syarat mutu, maka sampel hidrolisat tempe semangit fermentasi 5 hari dengan penambahan enzim 0.25% belum memenuhi syarat tersebut. Menurut Taslim *et al.* (2022), kadar air merupakan parameter yang penting yang berkaitan dengan umur simpan bahan. Semakin tinggi kadar air, maka umur simpan akan semakin singkat. Wijayanti *et al.* (2016) mengemukakan bahwa penambahan enzim akan menyebabkan peningkatan kadar air pada hidrolisat. Adapun peningkatan ini disebabkan karena terjadinya hidrolisis protein saat pembuatan hidrolisat sehingga senyawa menjadi lebih sederhana dan memiliki kemampuan mengikat air. Menurut Mulyana *et al.* (2014), semakin tinggi kandungan protein pada suatu bahan maka akan semakin tinggi kandungan air terikat pada bahan. Asam amino dengan rantai samping hidrokarbon dapat mengikat air dengan stabil. Hal lain yang dapat menjadi faktor penyebab kadar air yang tinggi adalah akibat penyimpanan pada kemasan yang

kurang kedap (non-vakum) menyebabkan adanya kenaikan kadar air karena hidrolisat tempe semangit berbentuk bubuk yang bersifat higroskopis. sehingga mudah menyerap air dari lingkungan sekitarnya.

Analisis Warna Sampel Hidrolisat Tempe Terpilih dan Tempe Semangit sebagai Kontrol

Tabel 2 menunjukkan bahwa adanya perbedaan yang signifikan antara nilai *lightness*, a* an b* sampel kontrol tempe semangit dan nilai *lightness*, a* an b* hidrolisat tempe semangit terpilih. Nilai *lightness* dan b* hidrolisat tempe semangit lebih kecil bandingkan dengan nilai *lightness* dan b* kontrol. Nilai a* hidrolisat tempe semangit lebih besar dibandingkan nilai a* pada sampel tempe kontrol. Nilai *lightness* sampel hidrolisat tempe semangit yang difermentasi selama 5 hari dengan penambahan enzim daun kelor sebanyak 0.2% dan 0.25% yang lebih rendah menunjukkan bahwa sampel terpilih tersebut lebih rendah dibandingkan sampel kontrol berupa tempe semangit yang difermentasi selama 5 hari.

Tabel 2. Perbandingan nilai L, a*, b* sampel kontrol dan sampel terpilih

Sampel	L	a*	b*
Tempe 4D 0% (kontrol)	59.01 ± 0.94 ^a	3.00 ± 0.51 ^a	19.76 ± 0.83 ^a
Tempe 5D 0% (kontrol)	57.68 ± 2.88 ^a	6.14 ± 0.27 ^b	20.47 ± 0.53 ^a
Hidrolisat 5D 0.2%	37.86 ± 0.31 ^b	6.87 ± 0.13 ^c	16.12 ± 0.36 ^b
Hidrolisat 5D 0.25%	36.03 ± 0.05 ^b	8.58 ± 0.03 ^d	15.33 ± 0.25 ^b

Nilai a* digunakan untuk mewakili warna merah dan hijau. Nilai a* yang positif

maka sampel cenderung berwarna merah, sedangkan jika a^* bernilai negatif maka sampel akan cenderung berwarna hijau (Pathare *et al.*, 2013). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa bahwa sampel cenderung bernilai positif yang menunjukkan bahwa sampel cenderung berwarna merah. Hidrolisat tempe semangit dengan waktu fermentasi 5 hari dan penambahan enzim 0.25% memiliki nilai a^* tertinggi yang dapat diartikan cenderung memiliki warna yang lebih merah dibandingkan tempe semangit kontrol dan hidrolisat tempe semangit fermentasi 5 hari dengan enzim 0.2%.

Nilai b^* didefinisikan sebagai warna biru dan kuning. Ketika b^* bernilai positif maka sampel cenderung berwarna kuning dan nilai b^* negatif menunjukkan sampel cenderung berwarna biru (Pathare *et al.*, 2013). Semua sampel yang diteliti menghasilkan nilai b^* yang positif yang berarti bahwa semua sampel cenderung memiliki warna kuning. Diantara ketiga sampel yang dianalisis warnanya, sampel kontrol berupa tempe semangit yang difermentasi selama 5 hari memiliki nilai b^* tertinggi dibandingkan nilai sampel lainnya.

Perubahan warna tempe dipengaruhi oleh lamanya waktu fermentasi. Semakin lama fermentasi maka warna tempe akan kecoklatan dan menjadi semakin gelap/kusam. Perubahan warna ini disebabkan karena semakin banyaknya *Rhizopus oligosporus* yang berada pada

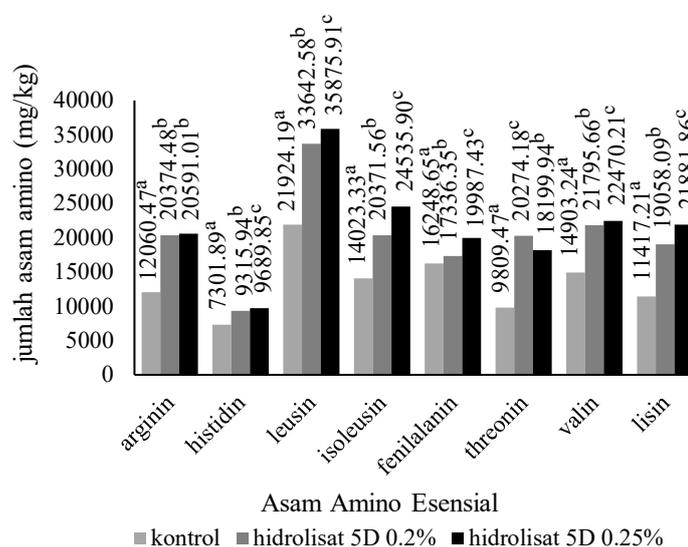
sudah mati (*death phase*) atau berada pada fase stationer (Barragan *et al.*, 2016). Selain kapang, proses fermentasi tempe semangit juga melibatkan oleh bakteri asam laktat. Menurut Muzdalifah *et al.* (2017), bakteri asam laktat dapat memproduksi vitamin B12 yang menyebabkan munculnya warna kemerahan pada tempe semangit. Faktor lain yang mempengaruhi perbedaan warna ini adalah adanya perbedaan waktu pengeringan dan adanya reaksi pencoklatan enzimatis *maillard* (Bernadeta *et al.*, 2012).

Profil Asam Amino Sampel Hidrolisat Tempe Terpilih

Pengujian kandungan asam amino dengan menggunakan instrumen *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) yang tertera pada Tabel 3 menunjukkan bahwa total asam amino sampel tempe kontrol lebih rendah dibandingkan sampel hidrolisat 5D 0.2% dan hidrolisat 5D 0.25%. Sampel hidrolisat tempe semangit dengan fermentasi 5 hari dan penambahan enzim sebesar 0.25% memiliki total asam amino tertinggi. Hasil yang didapat sesuai dengan hasil penelitian oleh Witono *et al.* (2015) dan Gunawan Puteri *et al.* (2015) yang menunjukkan bahwa adanya penambahan enzim serta lamanya waktu fermentasi mempengaruhi kandungan asam amino suatu bahan pangan. Pada tahap fermentasi, terjadi perubahan protein menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti asam amino sehingga semakin

Tabel 3. Total asam amino

Sampel	Total asam amino (mg/kg)
Tempe Kontrol 5D	220035.48
Hidrolisat 5D 0.2%	328666.21
Hidrolisat 5D 0.25%	356753.67

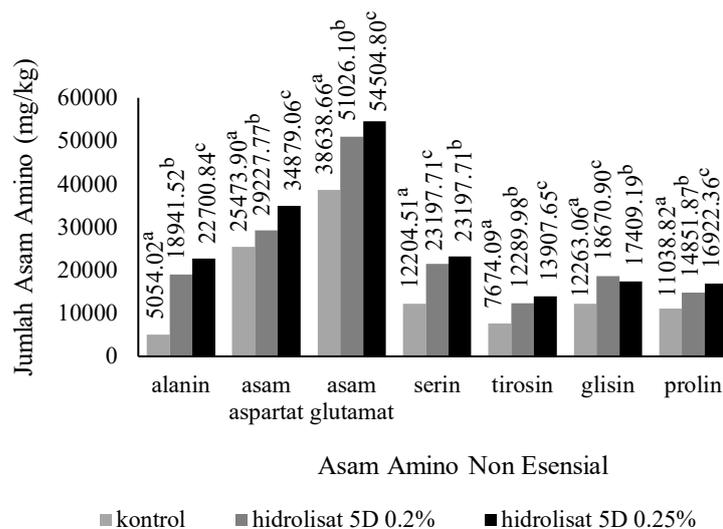


Gambar 6. Grafik kandungan asam amino esensial pada sampel kontrol dan sampel terpilih

banyak hidrolisis yang terjadi pada protein maka asam amino yang didapat juga semakin tinggi.

Berdasarkan Gambar 6, kandungan asam amino esensial pada sampel hidrolisat lebih tinggi dibanding sampel kontrol. Sampel hidrolisat 5D 0.25% leusin memiliki kandungan histidin, leusin, isoleusin, fenilalanin, valin, dan lisin yang lebih tinggi

dibandingkan sampel lainnya, namun kandungan threonin lebih rendah dibandingkan sampel hidrolisat 5D 0.2%. Sedangkan kandungan arginin pada sampel hidrolisat 5D 0.2% dan sampel hidrolisat 5D 0.25% tidak berbeda signifikan. Leusin merupakan asam amino esensial tertinggi pada semua sampel.



Gambar 7. Grafik kandungan asam amino non esensial pada sampel kontrol dan sampel terpilih

Gambar 7 menunjukkan bahwa sampel hidrolisat terpilih (hidrolisat 5D 0.2% dan hidrolisat 5D 0.25%) memiliki kandungan asam amino non esensial yang lebih besar dibandingkan sampel kontrol. kandungan alanin, asam aspartat, asam glutamat, tirosin dan prolin pada hidrolisat 5D 0.25% lebih besar dibandingkan hidrolisat 5D 0.2%, sedangkan kandungan serin dan glisin pada hidrolisat 5D 0.25% lebih rendah dibandingkan hidrolisat 5D 0.2%. Kandungan asam amino non esensial tertinggi pada semua sampel adalah asam glutamat.

Namun jika dilihat lebih lanjut, dapat terlihat bahwa threonin yang merupakan asam amino esensial serta asam amino non esensial glisin yang diperoleh sampel hidrolisat tempe semangit fermentasi 5 hari dengan penambahan enzim 0.2% lebih tinggi dibandingkan sampel hidrolisat tempe semangit fermentasi 5 hari dengan penambahan enzim 0.25%. Kedua asam

amino ini merupakan asam amino yang memiliki kecenderungan rasa manis. Rasa manis ini muncul akibat senyawa alifatik dengan kandungan gugus hidroksil (Sobri *et al.*, 2017).

Kandungan Asam Lemak Sampel Hidrolisat Tempe Terpilih

Tabel 4 menunjukkan profil asam lemak sedangkan Tabel 5 persentase asam lemak jenuh, asam lemak tidak jenuh, dan total asam lemak pada sampel kontrol dan terpilih. Secara keseluruhan jumlah asam lemak tidak jenuh yang terkandung pada seluruh sampel lebih besar dibandingkan asam lemak jenuh. Hidrolisat tempe terpilih (hidrolisat 5D 0.2% dan hidrolisat 5D 0.25%) memiliki total asam lemak yang lebih rendah dibandingkan sampel tempe kontrol. Sampel terpilih terpilih (hidrolisat 5D 0.2% dan hidrolisat 5D 0.25%) memiliki asam lemak jenuh yang lebih tinggi dibandingkan sampel kontrol.

Tabel 4. Kandungan asam lemak sampel kontrol dan sampel terpilih

Sampel	asam miristat (%)	asam linoleat (%)	asam erukat (%)	asam lignoserat (%)
Tempe kontrol 4D 0%	17.90	30.93	16.18	0.46
Tempe kontrol 5D 0%	18.85	38.29	14.98	0.32
Hidrolisat 5D 0.2%	19.63	16.59	11.26	0.35
Hidrolisat 5D 0.25%	19.35	13.79	11.29	0.33

Tabel 5. Total Kandungan asam lemak sampel kontrol dan sampel terpilih

Sampel	Asam lemak jenuh (%)	Asam lemak tidak jenuh (%)	Total asam lemak (%)
Tempe kontrol 4D 0%	18.36	47.11	65.47
Tempe kontrol 5D 0%	19.17	53.27	72.44
Hidrolisat 5D 0.2%	19.98	27.85	47.83
Hidrolisat 5D 0.25%	19.68	25.08	44.76

Hasil yang terdapat pada Tabel 4 dan 5 mengindikasikan bahwa proses fermentasi menyebabkan adanya perubahan kandungan asam lemak pada tempe semangit. Proses fermentasi menyebabkan kandungan asam lemak yang naik seiring dengan waktu. Kenaikan ini disebabkan karena pada saat fermentasi, kapang akan mensekresi enzim lipase sehingga lemak akan terurai menjadi molekul-molekul yang lebih kecil yaitu asam lemak dan gliserol (Triwibowo *et al.*, 2016). Pada Tabel 4 dan 5 juga terlihat bahwa penambahan enzim protease dalam hidrolisat tempe semangit memberikan pengaruh terhadap kandungan asam lemak. Hasil yang didapat sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Male *et al.* (2014) yang menyatakan bahwa adanya penambahan enzim protease akan menyebabkan penurunan kandungan asam lemak.

Jika diteliti lebih lanjut terlihat bahwa perubahan kandungan asam lemak

pada hidrolisat tempe semangit dengan penambahan enzim disebabkan oleh menurunnya jumlah asam lemak tidak jenuh yang cukup banyak. Menurut Sanjiwani *et al.* (2014), ikatan rangkap pada asam lemak tidak jenuh menyebabkan asam lemak tidak jenuh mudah mengalami oksidasi. Enzim yang digunakan pada pembuatan hidrolisat tempe semangit merupakan enzim protease yang mengalami pemurnian parsial (*partial purification*) sehingga kemungkinan masih terdapat enzim lain seperti enzim lipase. Adanya kandungan air yang tinggi pada hidrolisat juga menjadi pemicu oksidasi yang berlangsung lebih cepat (Sudaryatiningsih dan Supyani, 2009). Proses oksidasi menyebabkan terjadinya hidrolisis lebih lanjut pada asam lemak menjadi aldehid, keton, dan asam lemak bebas (Aryani *et al.*, 2016). Asam lemak bebas inilah yang bertanggung jawab terhadap munculnya aroma tengik (*rancid*) pada hidrolisat tempe semangit yang dibuat pada penelitian ini. Selain itu, penggunaan suhu yang cukup

tinggi pada saat inkubasi enzim yaitu pada suhu 50°C dan dalam waktu yang cukup lama menyebabkan terjadinya proses oksidasi asam lemak (Pramitha dan Juliadi, 2019).

KESIMPULAN

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa daun kelor dapat dimanfaatkan sebagai sumber enzim protease. Adanya perlakuan pemurnian enzim dengan menggunakan metode dialisis akan menyebabkan aktivitas enzim daun kelor meningkat. Enzim daun kelor merupakan enzim protease endopeptidase dan aktivitasnya akan mencapai kondisi optimum pada pH 7 dan suhu 50°C.

Lama fermentasi berpengaruh pada kandungan protein, asam amino, dan karakter fisikimia hidrolisat tempe semangit. Waktu fermentasi yang semakin lama menghasilkan produk dengan asam amino yang lebih tinggi. Selama fermentasi, terjadi perubahan makromolekul protein menjadi mikromolekul atau monomernya yaitu asam amino. Fermentasi dengan lama waktu 5 hari memiliki kandungan asam amino tertinggi. Penambahan enzim protease dari daun kelor pada penelitian ini memberikan hasil berupa peningkatan kandungan asam amino pada hidrolisat tempe semangit. Penambahan enzim sebesar 0.25% diketahui merupakan perlakuan terbaik yang memberikan hasil yang optimum pada penelitian ini.

SARAN

Hingga saat ini, masih sedikit riset yang dilakukan mengenai enzim pada daun kelor sehingga perlu dilakukan pengkajian lebih lanjut terhadap enzim protease dari daun kelor baik dalam sifat fisik maupun kimiawinya. Pada penelitian ini konsentrasi enzim protease dari daun kelor yang digunakan berada pada rentang 0.1% - 0.25%. Konsentrasi enzim yang digunakan dapat ditingkatkan pada penelitian lebih lanjut.

DAFTAR PUSTAKA

- Affandi, D.R., S. Handajani, dan R. Utami. 2010. Kajian Kandungan Protein, Senyawa Antinutrisi, Aktivitas Antioksidan, Dan Sifat Sensoris Tempe Koro Babi (*Vicia Faba L.*) Dengan Variasi Pengecilan Ukuran. *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian* 3(2): 77–86.
- Agustina, Rizki Karunianti, Fillah Fithra Dieny, Ninik Rustanti, Gemala Anjani, and Diana Nur Afifah. 2018. Antioxidant Activity and Soluble Protein Content of Tempeh Gembus Hydrolysate. *Hiroshima Journal of Medical Sciences* 67 (Special issue): 1–7.
- Arnata, I Wayan, Dwi Setyaningsih, and Nur Richana. 2015. Produksi Bioetanol dari Hidrolisat Asam Tepung Ubi Kayu dengan Kultur Campuran *Trichoderma viride* dan *Saccharomyces cerevisiae* (Ethanol Production from Acid Hydrolysate Cassava Flour with Mixed Culture *Trichoderma viride* and *Saccharomyces cerevisiae*). *Jurnal Agritech* 35(04): 396.

- Aryani, Titin, Fitria Siswi Utami, dan Isnin M Aulia Ulfah. 2016. Pengaruh Lama Penyimpanan Terhadap Kerusakan Asam Lemak Omega-3 pada Air Susu Ibu (ASI). *KESMAS*. Vol. 10. *Jurnal Teknologi Pertanian* 15 (3): 191–200.
- Badan Standarisasi Nasional. 2009. Tepung Terigu. Badan Stardisasi Nasional.SNI 3751:2009
- Banik, Swarnali, Shrutidhara Biswas, dan Srabani Karmakar. 2018. Extraction, Purification, and Activity of Protease from the Leaves of Moringa Oleifera. *F1000Research*, 7(1151), 1151.
- Barragan, L.A.P., J.J.B. Figueora, L.V. Rodriguez-Duran, C.N.A. Gonzalez, dan C. Hennigs. 2016. "Chapter 7: Fermentative Production Methods." In *Biotransformation of Agricultural Waste and by Product*, 189–215.
- Bernadeta, Puji Ardiningsih, dan Imelda H. Silalahi. 2012. Penentuan Kondisi Optimum Hidrolisat Protein Dari Limbah Ikan Ekor Kuning (*Caesio cuning*) Berdasarkan Karakteristik Organoleptik. *Jurnal Kimia Khatulistiwa* 1(1): 26–30.
- Cupp-Enyard, Carrie, dan Sigma Aldrich. 2008. Sigma's Non-Specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. *Journal of Visualized Experiments*, no. 19 (September).
- Duong-Ly, Krisna C., dan Sandra B. Gabelli. 2014. Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. *In Methods in Enzymology*, 541:85–94. Academic Press Inc.
- Fahroji, dan Hendri. 2016. Kinerja Beberapa Tipe Moisture Meter Dalam Penentuan Kadar Air Padi. *Jurnal Lahan Suboptimal* 5(1): 62–70.
- Fathimah, Azmy Nahdhiyati, dan Agustina Krisna Wardani. 2014. Ekstraksi Dan Karakterisasi Enzim Protease Dari Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lamk.). *Procedia Chemistry*. 14:263-269
- Gunawan-Puteri, Maria Dewi Puspitasari Tirtaningtya, Tia Raisha Hassanein, Elisabeth Kartika Prabawati, Christofora Hanny Wijaya, dan Anthony N. Mutukumira. 2015. Sensory Characteristics of Seasoning Powders from Overripe Tempeh, a Solid State Fermented Soybean. *Procedia Chemistry*. 14:263-269
- Hasniar, Muh. Rais, dan Ratnawaty Fadilah. 2019. Analysis of Nutrition Content and Organoleptic Test in Tempe. *Jurnal Pendidikan Teknologi Pertanian* 5:189–200.
- Male, Kasmir, Siti Nuryanti, dan Sitti Rahmawati. 2014. Ekstrak Enzim Protease dari Daun Palado (*Agave angustifolia*) dan Pemanfaatannya dalam Proses Pembuatan Virgin Coconut Oil." *Jurnal Akademika Kimia* 3(3): 111–20.
- Mohan, R., Sivakumar, V., Rangasamy, T., dan Muralidharan, C. 2016. Optimisation of bromelain enzyme extraction from pineapple (*Ananas comosus*) and application in process industry. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 12(3): 188-195.
- Mukhoyaroh dan Hanifah. 2015. Pengaruh Jenis Kedelai, Waktu Dan Suhu Pemeraman Terhadap Kandungan Protein Tempe Kedelai. *Florea: Jurnal Biologi dan Pembelajarannya* 2(2): 47–51.
- Mulyana, Wahono Hadi Susanto, dan Indria Purwantiningrum. 2014. The Effect of the Ratio of Over Fermented Tempeh Flour to Tapioca and Level of Water Addition on the Characteristics of Over Ferm. *Jurnal Pangan Dan Agroindustri* 2(4): 113–20.
- Muzdalifah, D., Z. A. Athaillah, W. Nugrahani, dan A. F. Devi. 2017.

- Colour and PH Changes of Tempe during Extended Fermentation. In *AIP Conference Proceedings* 1083(1):020-036
- Noviyanti, Tri, Puji Ardiningsih, dan Winda Rahmalia. 2012. Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Enzim Protease Dari Daun Sansakng (*Pycnarrhena cauliflora* Diels). *Jurnal Kimia Khatulistiwa* 1(1): 31–34.
- Okfrianti, Yenni, Kamsiah, dan Yessy Fitriyani. 2011. Pengaruh Penambahan Enzim Protease Tanaman Terhadap Sifat Fisik Dan Organoleptik Daging Sapi. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia* 6(2): 25–36.
- Sanjiwani, P., I.N.K. Widjaja, dan N.K. Warditiani. 2014. Analisis Kuantitatif Asam Lemak Tak Jenuh Pada Virgin Coconut Oil (VCO) Yang Dibuat Dengan Penambahan Sari Getah Pepaya (*Carica papaya* L.). *Jurnal Farmasi Udayana* 3(2): 32–35.
- Sharmila, S., L.J. Rebecca, dan M. Saduzzaman. 2012. Immobilization of Plant Protease Using Calcium Alginate Beads. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 10 (4): 4484–88.
- Sobri, Akhmad, Herpandi Herpandi, dan Susi Lestari. 2018. Uji Pengaruh Suhu Pengeringan Pada Karakteristik Kimia Dan Sensori Kaldu Bubuk Kepala Ikan Gabus (*Channa striata*). *Jurnal Fishtech* 6(2): 97–106.
- Sudaryatiningsih, Cicik, dan Supyani. 2010. Analisis Kandungan Asam Linoleat Dan Linolenat Tahu Kedelai Dengan *Rhizopus oryzae* Dan *Rhizopus oligosporus* Sebagai Koagulan." *Nusantara Bioscience* 2 (1): 110–16.
- Taslim, D., dan Siregar, T. M. 2022. Aktivitas Inhibisi α -Glukosidase Dan Antioksidan Ekstrak Etanol Srikaya (*Annona squamosa* L.). *Jurnal Teknologi Pangan*, 16(2).
- Triwibowo, R., M.A.M Andriani, and S. Ariviani. 2016. "Perubahan Biokimiawi Stakiosa Dan Asam Lemak Esensial Pada Tempe Kedelai (*Glycine max.*) Selama Proses Fermentasi." *Bioknologi* 13 (1): 34–41.
- Pathare, Pankaj B., Umezuruike Linus Opara, dan Fahad Al Julanda Al-Said. 2013. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food and Bioprocess Technology* 6:36-60
- Pontual, Emmanuel V, Belany EA Carvalho, Ranilson S Bezerra, Luana CBB Coelho, Thiago H Napoleão, dan Patrícia MG Paiva. 2012. Caseinolytic and Milk-Clotting Activities from Moringa Oleifera Flowers. *Food Chemistry* 135: 1848–54.
- Pramitha, Dewi Ayu Ika, dan Debby Juliadi. 2019. Pengaruh Suhu Terhadap Bilangan Peroksida dan Asam Lemak Bebas pada VCO (*Virgin Coconut Oil*) Hasil Fermentasi. *Cakra Kimia* 7 (2): 149–54.
- Purich, Daniel L. 2010. *Enzyme Kinetics: Catalysis & Control*. *Enzyme Kinetics: Catalysis & Control*. Elsevier Inc.
- Purwaningsih, Indah. 2017. Potensi Enzim Bromelin Sari Buah Nanas (*Ananas comosus* L.) Dalam Meningkatkan Kadar Protein Pada Tahu. *Jurnal Teknologi Laboratorium* 6 (1): 2–9.
- Utami, Rahayu, Christofora Hanny Wijaya, dan Hanifah Nuryani Lioe. 2016. Taste of Water-Soluble Extracts Obtained from Over-Fermented Tempe. *International Journal of Food Properties* 19 (9): 2063–73.
- Wijayanti, I., Romadhon, R., dan Rianingsih, L.(201). Karakteristik Hidrolisat Protein Ikan Bandeng (*Chanos*

chanos Forsk) dengan Konsentrasi Enzim Bromelin yang Berbeda. *SAINTEK PERIKANAN: Indonesian Journal of Fisheries Science and Technology*, 11(2): 129-133.

Witono, Yuli, Simon Bambang Widjanarko, Mujianto Mujianto, dan Dessy Tri Rachmawati. 2015. Amino Acids Identification of Over Fermented Tempeh, The Hydrolysate and The Seasoning Product Hydrolysed by Calotropin from Crown Flower (*Calotropis gigantea*). *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*.