

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tempe merupakan makanan fermentasi tradisional khas Indonesia yang umumnya berbahan dasar kedelai dan dihasilkan melalui fermentasi oleh kapang *Rhizopus* sp. Tempe dikenal luas dan dikonsumsi oleh masyarakat karena memiliki nilai gizi yang tinggi, meliputi protein, karbohidrat, lemak, vitamin, dan mineral (Winarno et al., 2020). Selain itu, tempe juga mengandung senyawa bioaktif golongan isoflavon, seperti daidzein, genistein, glisitein, serta 6,7,4'-trihidroksiisoflavon yang terbentuk selama proses fermentasi. Senyawa-senyawa tersebut berperan sebagai antioksidan alami yang memberikan manfaat kesehatan pada tempe (Teoh et al., 2024).

Tingginya nilai gizi dan manfaat kesehatan tersebut mendorong peningkatan konsumsi tempe di Indonesia. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik (BPS) tahun 2021, rata-rata konsumsi tempe per kapita di Indonesia mencapai 0,146 kg per minggu jumlah konsumsi ini meningkat sebesar 4,29% dibandingkan tahun sebelumnya (BPS, 2022). Peningkatan konsumsi tempe menyebabkan tingginya kebutuhan kedelai sebagai bahan baku utama pembuatan tempe.

Kedelai merupakan sumber protein nabati yang relatif murah bila dibandingkan sumber protein lainnya seperti daging, susu dan ikan. Kadar protein biji kedelai kurang lebih 35%, karbohidrat 35%, dan lemak 15%. Di samping itu, kedelai juga mengandung mineral seperti kalsium, fosfor, besi, vitamin A dan B (Hernawati dan Meylani, 2019). Namun, sekitar 70% kebutuhan kedelai nasional masih bergantung pada impor, dengan total impor mencapai 2,2 juta ton pada tahun 2020 dan 2,6 juta ton pada tahun 2022 (BPS, 2022). Ketergantungan pada kedelai impor ini menyebabkan kenaikan harga kedelai hingga 19,50%, yang berdampak pada biaya produksi tempe. Jika hal ini berlanjut terus-menerus akan berdampak lebih besar terhadap masyarakat Indonesia, yang tingkat ekonominya menengah ke bawah (Rahmawati, 2021). Kondisi tersebut mendorong perlunya inovasi dan diversifikasi bahan baku tempe dengan memanfaatkan sumber pangan lokal selain kedelai, seperti kacang tanah, kapri, koro, beras merah, kacang tanah, kacang roay, kacang merah dan kacang hijau dalam pembuatan tempe.

Kacang hijau merupakan salah satu komoditas lokal yang ketersediaannya cukup melimpah dan memiliki potensi gizi yang baik. Produksi dan ekspor kacang hijau Indonesia meningkat, dengan ekspor sebesar 1.625 ton pada tahun 2018 dan meningkat 53% menjadi 3.489 ton pada tahun 2019 (Izzah et al., 2023). Secara gizi, kacang hijau mengandung protein sebesar 21,04%, karbohidrat 63,55%, lemak 1,64%, serat 2,46%, serta memiliki kandungan lemak yang relatif rendah dibandingkan jenis kacang-kacangan lainnya (Sari et al., 2020). Hasil penelitian oleh Febriani (2019) kacang hijau dapat dijadikan sebagai bahan dasar pembuatan tempe menggunakan ragi bubuk (RAPRIMA) dengan fermentasi 72 jam dan konsentrasi ragi 0,07 g mendapatkan nilai protein sebesar 11,73%. Penggunaan kacang hijau sebagai pengganti bahan dasar tempe dapat dilakukan dengan tujuan diversifikasi pangan. Diversifikasi pangan adalah upaya peningkatan konsumsi pangan yang beragam, bergizi seimbang dan berbasis pada potensi sumber daya lokal (Sutrisno et al., 2023). Sehingga kombinasi kedelai dan

kacang hijau dalam pembuatan tempe berpotensi menghasilkan produk dengan nilai gizi yang lebih kaya dan bervariasi. Namun, hingga saat ini belum ada penelitian yang secara spesifik mengkaji tempe hasil kombinasi kedelai dan kacang hijau, khususnya dikaitkan dengan variasi konsentrasi ragi dan waktu fermentasi serta aktivitas antioksidan.

Selain penggunaan bahan baku, mutu tempe yang berkualitas dipengaruhi oleh beberapa faktor proses fermentasi, antara lain pH, suhu, waktu fermentasi dan konsentrasi ragi dalam proses pembuatannya (Utama dan Baroto, 2018). Tahap perendaman merupakan salah satu proses utama dalam pembuatan tempe. Waktu yang digunakan pada saat merendam biji kedelai cukup lama, berkisar antara 12 sampai dengan 24 jam. Hal tersebut dilakukan agar biji kedelai dapat mengembang dengan sempurna (Magdalena, 2022). Selama proses perendaman, pH bahan menurun dari 6,5 menjadi 5,3 akibat terbentuknya asam organik. Suasana asam pada pH 4-5 dapat membantu proses fermentasi berlangsung baik dan cepat (Putri dan kartikawati, 2022).

Fermentasi merupakan proses yang paling penting pada pembuatan tempe yang dilakukan dengan memanfaatkan jamur *Rhizopus* sp terutama *R. oryzae* dan *R. oligosporus* yang biasanya terdapat di dalam ragi tempe (Górska, 2025). Ragi tempe mampu menghidrolisis senyawa-senyawa kompleks dalam biji-bijian menjadi senyawa yang lebih sederhana sehingga mudah dicerna oleh tubuh manusia. Proses fermentasi mengaktifkan pertumbuhan kapang pada ragi tempe membentuk hifa yang berwarna putih dan menutupi permukaan biji kedelai. Hifa ini akan bergabung menjadi miselium yang membantu mengikat biji-bijian sehingga struktur tempe akan menjadi rapat dan padat. Suhu fermentasi tempe yang baik digunakan adalah pada suhu ruang (20-37 °C) dengan kondisi tempat agak gelap, dan suhu maksimal 40 °C karena apabila suhu terlalu tinggi pertumbuhan kapang tempe tidak akan sempurna (Saktiono et al., 2023).

Waktu fermentasi tempe bervariasi dari 18-72 jam agar mikroba pada ragi tempe dapat tumbuh dengan sempurna (Fazrin et al., 2020). Penelitian yang dilakukan oleh (Aisyah et al., 2022) menunjukkan bahwa fermentasi pada 36 jam dan konsentrasi ragi 2,5 g telah terjadi pertumbuhan jamur, ditandai dengan telah terbentuknya miselium pada permukaan biji-biji kacang tanah yaitu biji telah menyatu satu sama lain sehingga menjadi padat dan berwarna putih. Pertumbuhan jamur mencapai optimum pada fermentasi 48 jam ditandai dengan miselium telah menutupi seluruh permukaan biji kacang dan terlihat massa dan biji memiliki tekstur lebih kompak. Di samping itu juga terbentuk *flavor* spesifik tempe. Sedangkan pada lama fermentasi 60 jam pertumbuhan jamur hampir tetap, miselium yang terbentuk lebih banyak dari sebelumnya, sehingga menyebabkan tekstur tempe menjadi agak keras dan tempe mengalami perubahan warna dari putih menjadi sedikit kehitaman. Menurut (Putri et al., 2018) tempe dengan kualitas terbaik memiliki ciri fisik ditutupi oleh hifa kapang berwarna putih bersih yang merata pada permukaannya, memiliki struktur yang homogen dan kompak, serta berasa, berbau dan beraroma khas tempe.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa variasi konsentrasi ragi dan waktu fermentasi berpengaruh terhadap kualitas tempe yang dihasilkan. Hasil penelitian yang dilakukan oleh (Fauziah, 2022) diperoleh tempe kedelai kombinasi kacang roay kualitas terbaik menggunakan konsentrasi ragi 2,5% dan waktu fermentasi 42 jam, kadar air 60,92%, kadar abu 0,76%, kadar lemak 1,33%, kadar protein 31,45%, kadar karbohidrat 5,54%, dan aktivitas antioksidan 34,23% berdasarkan uji organoleptik lebih disukai dan dapat diterima di

kalangan masyarakat. Penelitian yang dilakukan (Putri dan kartikawati, 2022) diperoleh pada konsentrasi ragi 0,25-0,35% dan waktu fermentasi 24 jam menghasilkan kualitas tempe kacang tunggak terbaik dengan nilai gizi air 27,95-28,65%, abu 0,96-1,16%, lemak 1,73-3,94%, protein 25.03-26.01%, karbohidrat 42,61-43,84%, serat 0,31-0,38% dengan nilai pH 4,33-5,00, nilai formol 0,46-0,70% dan total asam tertitrasi 0,21-0,53%. Selain itu, penelitian yang dilakukan (Yulia et al., 2019) pada tempe biji melinjo diperoleh perlakuan terbaik yaitu konsentrasi ragi 1% dan lama fermentasi 24 jam dengan kadar air 69,72%, kadar protein 5,69% hasil uji organoleptiknya menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata terhadap nilai gizi tempe yang dihasilkan.

Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini dilakukan sebagai upaya untuk mengurangi ketergantungan terhadap impor kedelai melalui pengembangan tempe kombinasi kedelai dan kacang hijau. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh konsentrasi ragi dan waktu fermentasi terhadap nilai gizi dan aktivitas antioksidan tempe kombinasi kedelai dan kacang hijau (KEDAJO), yang hingga saat ini masih sangat terbatas.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. bagaimana pengaruh konsentrasi ragi dan waktu fermentasi terhadap kualitas tempe KEDAJO yang berkualitas dan bertekstur kompak?
2. bagaimana kandungan nilai gizi yang dihasilkan dari tempe KEDAJO dengan kualitas terbaik?
3. bagaimana aktivitas antioksidan dari tempe KEDAJO dengan kualitas terbaik?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Maksud dari penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh konsentrasi ragi dan waktu fermentasi yang optimal untuk menghasilkan produk tempe KEDAJO dengan kualitas terbaik dan menganalisis nilai gizi dan aktivitas antioksidan.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. menganalisis pengaruh konsentrasi ragi dan waktu fermentasi terhadap kualitas tempe KEDAJO menggunakan uji organoleptik (10 panelis)
2. menentukan kandungan nilai gizi (protein, lemak, dan karbohidrat) dari tempe KEDAJO dengan kualitas terbaik hasil uji organoleptik
3. menganalisis aktivitas antioksidan dari tempe KEDAJO dengan kualitas terbaik hasil uji organoleptik

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi yang bermanfaat pada pengembangan produk tempe yang lebih sehat, berkualitas tinggi, dan dapat menjadi peluang usaha yang prospektif di industri pangan, serta memberikan kontribusi terhadap diversifikasi bahan pangan lokal yang kaya akan nutrisi sebagai solusi inovatif untuk mengurangi ketergantungan terhadap kedelai impor.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kacang kedelai, kacang hijau, ragi tempe (RAPRIMA), air bersih, metanol p.a (Merck), n-heksana teknis, H₂SO₄ pekat, asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) (Merck), K-Na tartrat (Merck), akuades, HCl (Merck), NaOH (Merck), DPPH, (1,1-difenil-2- pikrilhidrazil), asam askorbat, selenium, indikator metil merah, Ninhidrin 2%, CuSO₄ (Merck), H₃BO₃ (Merck), NH₃ (Merck), AgNO₃ (Merck), reagen Millon, reagen Hopkins-Cole, aluminium *foil* dan kertas saring.

2.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah baskom, kompor, panci, sendok, plastik, pisau, blender, neraca analitik (Ohaus), *vorteks*, botol plastik, termometer, oven, desikator, cawan porselen, tanur, batu didih, labu alas bulat, Soxhlet, kondensor, labu destilasi, kuvet, *hot plate magnetic stirrer*, *magnetic bar*, kondensor, buret, *heating mantle*, termometer, statif, klem, mikropipet (100-1000 µL), tip, rak tabung, labu kjeldahl, spektrofotometer UV-Vis T60 dan alat-alat gelas umum yang digunakan di laboratorium.

2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret – November 2025 di Laboratorium Biokimia, dan Laboratorium Kimia Analitik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, serta Laboratorium Bioteknologi Terpadu Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Pembuatan Tempe Kombinasi Kacang Kedelai dan Kacang Hijau (KEDAJO)

Kacang kedelai dan kacang hijau ditimbang sebanyak 50 g, dicuci bersih dengan air mengalir, direbus selama 5 menit lalu direndam selama ± 12 jam selanjutnya kulit ari kacang dikupas hingga bersih. Kacang dicuci kembali dan direbus selama 30 menit. Setelah itu, kacang ditiriskan dan didinginkan hingga kandungan airnya berkurang kemudian ditambahkan ragi tempe dengan variasi konsentrasi 0,75. Selanjutnya dibungkus menggunakan plastik yang telah di, kemudian difermentasi selama 36 jam di tempat gelap pada suhu ruang (23-37 °C) diulangi perlakuan yang sama dengan variasi konsentrasi ragi 1,00; 1,25; dan 1,5 g dan waktu fermentasi 48; 60 dan 72 jam (Alvina et al., 2022 dimodifikasi). Rancangan penelitian selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rancangan perlakuan penelitian tempe KEDAJO dengan variasi konsentrasi ragi (A) dan waktu fermentasi (B)

Konsentrasi Ragi	Waktu Fermentasi			
	B ₁ :36 Jam	B ₂ :48 Jam	B ₃ :60 Jam	B ₄ :72 Jam
A ₁ : 0,75 g	A ₁ B ₁	A ₁ B ₂	A ₁ B ₃	A ₁ B ₄
A ₂ :1,00 g	A ₂ B ₁	A ₂ B ₂	A ₂ B ₃	A ₂ B ₄
A ₃ :1,25 g	A ₃ B ₁	A ₃ B ₂	A ₃ B ₃	A ₃ B ₄
A ₄ :1,50 g	A ₄ B ₁	A ₄ B ₂	A ₄ B ₃	A ₄ B ₄

Variasi tempe KEDAJO tersebut akan menghasilkan 16 kombinasi perlakuan yang akan dilakukan uji organoleptik (warna, aroma, tekstur dan rasa) dengan menggunakan 10 panelis untuk menganalisis pengaruh konsentrasi ragi dan waktu fermentasi dan menentukan kualitas terbaik dari tempe kombinasi kedelai kacang hijau (KEDAJO).

2.4.2 Uji Organoleptik Tempe KEDAJO

Sampel tempe KEDAJO dengan variasi konsentrasi ragi dan waktu fermentasi masing-masing dipotong dengan ukuran 4x4 cm, kemudian dimasukkan dalam wadah steril yang tertutup dan diberikan kode pada tiap perlakuannya. Sampel disajikan kepada 10 panelis terlatih yang memiliki pengalaman dalam pengujian sensorik serta dalam kondisi sehat. Panelis diminta untuk mengamati, mencicipi, dan memberikan penilaian terhadap atribut sensori yang meliputi rasa, warna, tekstur, dan aroma. Penilaian dilakukan menggunakan skala hedonik lima tingkat yaitu, 1 (sangat tidak suka); 2 (tidak suka); 3 (netral); 4 (suka); 5 (sangat suka). Data yang diperoleh akan dianalisis menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan bantuan perangkat lunak SPSS untuk mengetahui pengaruh konsentrasi ragi dan waktu fermentasi terhadap karakteristik sensori tempe KEDAJO (Agustina et al, 2021). Tempe dengan kualitas terbaik dan banyak disukai akan dilakukan preparasi untuk dianalisis kandungan gizinya.

2.4.3 Preparasi Sampel Tempe KEDAJO

Tempe yang memiliki kualitas terbaik dipotong kecil-kecil dan dihaluskan menggunakan blender. Setelah itu tempe yang telah halus ditimbang sebanyak 50 g dan disimpan di dalam wadah tertutup untuk digunakan sebagai sampel pada analisis kandungan gizi (proksimat) dan analisis aktivitas antioksidan.

2.4.4 Analisis Proksimat Tempe KEDAJO

Uji Kadar Air. Sampel tempe yang telah dipreparasi ditimbang sebanyak 2 g dalam cawan porselen yang sudah diketahui berat konstan. Kemudian cawan yang berisi sampel dipanaskan dalam oven pada suhu 105 °C selama ±5 jam. Selanjutnya sampel didinginkan dalam desikator selama 30 menit setelah itu ditimbang dan diulangi perlakuan yang sama hingga diperoleh berat konstan. Kadar air dapat dihitung menggunakan rumus pada persamaan (1):

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100\% \quad (1)$$

Keterangan:

W_0 = Bobot cawan kosong (g)

W_1 = Bobot cawan dan sampel sebelum dikeringkan (g)

W_2 = Bobot cawan dan sampel setelah dikeringkan (g)

Uji Kadar Abu. Sampel tempe yang telah dipreparasi ditimbang sebanyak 5 g dalam cawan porselen yang sudah diketahui bobot konstan. Kemudian cawan yang berisi sampel tersebut dimasukkan dalam tanur dengan suhu 600 °C selama 4 jam. Sampel didinginkan dalam desikator selama 30 menit. Setelah itu ditimbang dan diulangi perlakuan yang sama hingga diperoleh berat konstan. Kadar abu dihitung menggunakan rumus pada persamaan (2):

$$\text{Kadar abu (\%)} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100\% \quad (2)$$

Keterangan:

W_0 = Bobot cawan kosong (g)

W_1 = Bobot cawan dan sampel sebelum dikeringkan (g)

W_2 = Bobot cawan dan sampel setelah dikeringkan (g)

Uji Kadar Lemak. Sampel yang telah dipreparasi ditimbang sebanyak 5 g ke dalam gelas kimia, ditambahkan 45 mL akuades mendidih dan dihomogenkan selanjutnya ditambahkan HCl 8 M sebanyak 55 mL dan beberapa batu didih kemudian dipanaskan selama 15 menit. Selanjutnya endapan pada sampel disaring menggunakan kertas saring, dilakukan pencucian hingga bebas klor yang dapat ditentukan dengan penambahan ± 3 tetes AgNO_3 0,1 M pada filtrat, jika tidak terdapat endapan putih (AgCl) maka telah bebas klor. Endapan atau residu dikeringkan dalam oven pada suhu 100°C hingga kering. Labu alas bulat beserta beberapa batu didih di dalam oven lalu ditimbang hingga diperoleh berat konstan. Kertas saring yang berisi endapan hasil hidrolisis dimasukkan ke dalam *thimble*. *Thimble* dimasukkan ke dalam rangkaian alat *Soxhlet* yang telah dihubungkan dengan labu alas bulat. Kemudian pelarut n-heksan ditambahkan sampai sampel terendam dan diekstraksi selama 5-6 jam atau sampai pelarut lemak yang turun ke sampel berwarna jernih dan dilanjutkan dengan penguapan pelarut hingga kering. Labu yang berisi ekstrak lemak dikeringkan dalam oven pada suhu $100-105^\circ\text{C}$ selama 1 jam. Kemudian labu lemak didinginkan dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang untuk diperoleh bobot konstan (Pargiyanti, 2019). Kadar lemak dapat dihitung menggunakan rumus pada persamaan (3):

$$\text{Kadar lemak total (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{W} \times 100\% \quad (3)$$

Keterangan:

W = bobot sampel (g)

W_0 = bobot labu lemak sebelum ekstraksi (g)

W_1 = bobot labu lemak sesudah ekstraksi (g)

Uji Kadar Protein. Sampel hasil preparasi ditimbang sebanyak 0,5 g ke dalam labu Kjeldahl 100 mL, ditambahkan 1 g selenium sebagai katalis dan 10 mL H_2SO_4 pekat, setelah itu didestruksi dalam lemari asam hingga larutan menjadi jernih kehijauan. Larutan hasil destruksi didinginkan pada suhu ruang lalu diencerkan dengan akuades sampai 100 mL. Setelah homogen dan dingin dimasukkan ke dalam labu destilasi kemudian ditambahkan 5 mL larutan NaOH pekat hingga larutan menjadi basa yang ditandai dengan perubahan warna menjadi hitam. Labu destilat dipasang dan dihubungkan dengan kondensor lalu ujung kondensor dibenamkan ke dalam cairan penampung di dalam Erlenmeyer. Erlenmeyer penampung diisi dengan 20 mL larutan H_3BO_3 3% dan indikator metil merah sebanyak 3 tetes. Proses destilasi dihentikan jika terjadi perubahan warna menjadi kuning muda. Hasil destilasi pada Erlenmeyer dititrasi dengan menggunakan larutan HCl 0,1 N. Titik akhir titrasi ditandai dengan warna merah muda. Perlakuan ini dilakukan sebanyak 2 kali (Ispitasari dan Haryanti, 2022). Kadar protein dapat dihitung menggunakan rumus pada persamaan (4):

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,007 \times 6,25}{W_2} 100\% \quad (4)$$

Keterangan:

V_1 = volume HCl 0,1 N untuk titrasi sampel (mL)

V_2 = volume HCl 0,1 N untuk titrasi blanko (mL)

N = normalitas larutan HCl

W = bobot sampel

14,007 = bobot atom nitrogen

6,25 = faktor protein

Uji Kadar Karbohidrat

Pembuatan Reagen Dinitro Asam Salisilat (DNS). Asam 3,5-dinitrosalisilat ditimbang sebanyak 1 g ke dalam gelas kimia dan dilarutkan dengan 50 mL akuades dan 20 mL larutan NaOH 2 N. Setelah itu, ditambahkan 30 g K-Na tartrat dan diaduk dengan magnetik *stirrer*. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam 100 mL labu ukur dan ditambahkan akuades hingga tanda batas dan dihomogenkan (Nurprialdi et al., 2023).

Pembuatan Larutan Induk Glukosa 1 mg/mL. Kristal glukosa anhidrat ($C_6H_{12}O_6$) ditimbang sebanyak 0,1 g kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia, dilarutkan dengan sedikit akuades lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL. Larutan tersebut ditambahkan akuades hingga tanda batas dan dihomogenkan sehingga diperoleh larutan DNS 10 mg/mL. Selanjutnya dipipet sebanyak 1 mL dari larutan DNS 10 mg/mL ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan 9 mL akuades, kemudian dihomogenkan,

Pembuatan Deret Standar Glukosa. Larutan induk glukosa 1 mg/mL dipipet sebanyak 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 mL ke dalam 5 tabung reaksi yang berbeda, kemudian ditambahkan akuades secara berurut sebanyak 1,975; 1,95; 1,9; 1,8; 1,6 mL, maka diperoleh deret standar glukosa 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2 mg/mL.

Preparasi Sampel. Tempe KEDAJO yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 2 g ke dalam gelas kimia, lalu dilarutkan dengan akuades hingga 50 mL dan disaring menggunakan kertas saring. Filtrat tempe KEDAJO yang diperoleh diencerkan sebanyak 10 kali dengan cara dipipet sebanyak 1 mL ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan 9 mL akuades lalu dihomogenkan.

Penentuan Kadar Karbohidrat Tempe KEDAJO. Larutan standar glukosa (0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2 mg/mL), larutan sampel fp 10 dan larutan blanko yang telah dibuat. Masing-masing larutan ditambahkan 2 mL reagen DNS, kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex* selama 10 detik. Selanjutnya masing-masing tabung reaksi, dimasukkan ke dalam penangas air dan dididihkan selama 10 menit, kemudian didinginkan menggunakan air es. Setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 510 nm (Szklaerek et al., 2022).

2.4.5 Analisis Kandungan Asam Amino secara Kualitatif

Preparasi Sampel. Sampel yang telah dipreparasi sebelumnya ditimbang sebanyak 5 g dimasukkan ke dalam gelas kimia dan ditambahkan akuades sebanyak 25 mL, diaduk hingga homogen. Kemudian sampel disaring menggunakan kertas saring sehingga diperoleh filtrat sampel tempe KEDAJO.

Uji Ninhidrin. Sampel tempe dan asam amino alanin masing-masing dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi berbeda kemudian ditambahkan larutan Ninhidrin

1% sebanyak 0,5 mL dan dihomogenkan menggunakan *vortex*. Tabung reaksi dipanaskan selama 5 menit dan diamati perubahan warna yang terjadi. Hasil uji positif yang menandakan adanya asam amino bebas pada uji Ninhidrin ditandai dengan perubahan warna menjadi ungu sampel (Imtihani et al., 2020).

Uji Millon. Sampel tempe dan asam amino tirosin masing-masing dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi berbeda kemudian ditambahkan dengan 4 tetes reagen Millon dan dihomogenkan. Tabung reaksi dipanaskan selama 10 menit dan diamati perubahan warna yang terjadi. Hasil positif ditandai dengan munculnya endapan merah bata yang berarti sampel mengandung asam amino tirosin (Harini et al., 2019).

Uji Hopkins-Cole. Sampel tempe dan asam amino triptofan masing-masing dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi berbeda, kemudian ditambahkan dengan 2 mL reagen Hopkins-Cole dan dihomogenkan. H_2SO_4 pekat ditambahkan sebanyak 2 mL pada dinding tabung yang dialiri secara perlahan. Setelah itu, diamati dan dicatat perubahan warna yang terjadi. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuk cincin ungu yang berarti sampel mengandung asam amino triptofan (Cwahed et al., 2020).

Uji Gugus Rantai Samping. Sampel tempe dan asam amino sistein masing-masing dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi berbeda, kemudian ditambahkan dengan 0,5 mL natrium nitroprusida 1% dan dihomogenkan. NH_3 ditambahkan sebanyak 0,5 mL dan dihomogenkan. Setelah itu diamati dan dicatat perubahan warna yang terjadi. Hasil uji positif ditandai dengan warna merah yang berarti sampel mengandung asam amino sistein (Harini et al., 2019).

2.4.6 Analisis Aktivitas Antioksidan Tempe KEDAJO

Pembuatan Larutan DPPH 0,4 Mm. Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 0,015 g kemudian dilarutkan dengan metanol p.a dalam gelas kimia. Kemudian larutan tersebut dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, lalu ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas dan dihomogenkan

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (λ_{maks}). Larutan DPPH sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah metanol p.a sebanyak 4 mL, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 450- 550 nm terhadap blanko 5,0 mL metanol p.a, diplotkan hingga absorbansi maksimum.

Pembuatan Larutan Standar Asam Askorbat 500 mg/L dan 5 mg/L. Asam askorbat ditimbang sebanyak 0,005 g kemudian dilarutkan dengan 10 mL metanol p.a, dihomogenkan sehingga didapatkan larutan asam askorbat konsentrasi 500 mg/L. Kemudian asam askorbat 500 mg/L dipipet 0,1 mL dan ditambahkan metanol p.a sebanyak 9,9 mL sehingga didapatkan larutan asam askorbat konsentrasi 5 mg/L dengan volume total 10 mL

Penentuan Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat dengan Metode DPPH. Uji aktivitas antioksidan asam askorbat dilakukan dengan membuat deret standar asam askorbat terlebih dahulu dengan cara memipet asam askorbat konsentrasi 5 mg/L masing-masing 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; dan 4,0 mL ke dalam tabung reaksi yang 9 berbeda untuk membuat deret standar 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; dan 4,0 mg/L. larutan asam askorbat

ditambahkan masing-masing 1,0 mL larutan DPPH 0,4 mM. Setelah itu larutan asam askorbat ditambahkan metanol p.a masing-masing 3,75; 3,5; 3,0; 2,0; dan 0 mL sehingga didapatkan volume total 5 mL untuk masing-masing deret standar. Deret standar tersebut diinkubasi pada ruangan yang gelap dengan suhu ruang selama 30 menit. Selanjutnya, diukur serapannya pada panjang gelombang 515 nm

Penentuan Aktivitas Antioksidan Tempe KEDAJO dengan Metode DPPH. Tempe KEDAJO yang telah dipreparasi ditimbang sebanyak 0,5 g dan dilarutkan dalam 10 mL metanol p.a sehingga diperoleh larutan sampel dengan konsentrasi 50.000 mg/L. Larutan masing-masing dipipet sebanyak 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; dan 1,6 mL ke dalam tabung reaksi berbeda, kemudian ditambahkan masing-masing 1 mL larutan DPPH 0,4 mM. Lalu ditambahkan metanol p.a hingga didapatkan volume total 5 mL, maka diperoleh larutan deret ukur 500, 1000, 2000, 4000, 8000, dan 16000 mg/L. Selanjutnya larutan DPPH 0,4 mM dipipet sebanyak 1 mL dan 1,6 mL ke dalam tabung reaksi berbeda dan dicukupkan volumenya hingga 5 mL dengan metanol p.a, maka diperoleh larutan blanko. Kemudian larutan deret ukur 500, 1000, 2000, 4000, 8000, 16000 mg/L dan larutan blanko diinkubasi pada ruangan gelap dengan suhu ruang selama 30 menit (Baliyan et al., 2022). Lalu larutan tersebut diukur serapannya pada panjang gelombang 515 nm dan dihitung aktivitas antioksidan menggunakan rumus pada persamaan (5):

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{\text{Absorban blanko} - \text{Absorban sampel}}{\text{Absorban blanko}} \times 100\% \quad (5)$$

Keterangan

Absorban blanko: serapan radikal DPPH dengan λ maks

Absorban sampel: serapan sampel dalam radikal DPPH dengan λ maks

Nilai IC_{50} masing-masing konsentrasi sampel dihitung menggunakan persamaan regresi linier $y = ax + b$. Nilai IC_{50} dapat dihitung menggunakan rumus pada persamaan (6), (7), dan (8):

$$y = ax + b \quad (6)$$

$$IC_{50} = \frac{y - b}{a} \quad (7)$$

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{a} \quad (8)$$

Keterangan:

x : konsentrasi larutan sampel ($\mu\text{g/mL}$)

y : % inhibisi

a : slope

b : intersep