

LAPORAN PENELITIAN

**STUDI PENGARUH LAMA FERMENTASI TEMPE
KEDELAI TERHADAP AKTIVITAS TRIPSIN**



Oleh:

**Eddy Sulistyowati, Apt., M.S
Retno Arianingrum, M.Si
Das Salirawati, M.Si**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI YOGYAKARTA
2004**

**Penelitian ini didanai dengan dana DIK Tahun Anggaran 2004/2005
Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Yogyakarta
Nomor Kontrak : 1762/J.35/PL/2004**

**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN**

1. Judul Penelitian

**Studi Pengaruh Lama Fermentasi Tempe
Kedelai Terhadap Aktivitas Tripsin**

2. Ketua Peneliti
 - a. Nama lengkap dengan gelar akademik : Eddy Sulistyowati, Apt., M.S
 - b. Pangkat/Golongan dan NIP : Penata Tk. I/IIIId/131 121 716
 - c. Jabatan sekarang : Lektor
 - d. Jurusan/Program Studi : Pendidikan Kimia/Kimia

3. Jumlah Tim Peneliti : 3 (tiga) orang
4. Lokasi Penelitian : Lab. Biokimia Jurdik Kimia
FMIPA, UNY
5. Jangka Waktu Penelitian : 6 (enam) bulan
6. Biaya yang Diperlukan : Rp. 2.000.000,- (dua juta rupiah)

Yogyakarta, 10 Nopember 2004

Mengetahui,
Kajurdik Kimia

Ketua Peneliti

Suharno, M.Si
NIP. 130 530 811

Eddy Sulistyowati, Apt., M.S
NIP. 131 121 716

Menyetujui,
Dekan FMIPA UNY

H. Sukirman, M.Pd
NIP. 130 340 113

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penelitian yang berjudul “Studi Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Aktivitas Tripsin” dapat terlaksana dengan baik hingga tersusunnya laporan penelitian ini.

Penelitian ini dapat terlaksana karena dukungan dana dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini kami ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dekan FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta yang telah memberikan kesempatan dan memberikan dana untuk melaksanakan penelitian ini pada tahun anggaran 2004/2005.
2. Ketua Program Studi Kimia FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta yang telah memberikan kesempatan untuk melaksanakan penelitian ini.
3. BPP FMIPA UNY yang telah mereview proposal dan memberikan masukan pada seminar proposal maupun Laporan hasil penelitian ini.
4. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Pendidikan Kimia FMIPA UNY atas saran dan masukannya demi kesempurnaan laporan penelitian ini.
5. Ananda Dwi dan Marsiti serta mbak Poni yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian di Laboratorium Biokimia bersama-sama tim kami.
6. Semua pihak yang terlibat, baik secara langsung maupun tidak langsung hingga penelitian ini terselesaikan.

Kami menyadari bahwa dalam Laporan ini masih terdapat banyak kekurangan, oleh karena kami mengharapkan saran dan kritik yang membangun demi kesempurnaannya. Akhirnya kami berharap agar hasil penelitian ini dapat bermanfaat dan menambah wawasan dan pengetahuan bagi kita semua.

Yogyakarta, Nopember 2004

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
ABSTRAK	ix
BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Rumusan Masalah.....	3
C. Tujuan Penelitian.....	4
D. Manfaat Penelitian.....	4
E. Definisi Operasional.....	4
BAB II KAJIAN PUSTAKA	
A. Kajian Teoritik.....	6
B. Kerangka Berpikir.....	13
C. Hipotesis.....	14
BAB III METODE PENELITIAN	
A. Populasi dan Sampel.....	15
B. Desain Penelitian.....	15
C. Instrumen Penelitian dan Validasi Instrumen	15
D. Prosedur Penelitian.....	16
E. Teknik Analisis Data.....	22
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
A. Hasil Penelitian.....	24
B. Pembahasan.....	30

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
A. Kesimpulan.....	40
B. Saran.....	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN.....	43

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Letak Hidrolisis Protein.....	11
Gambar 2. Grafik Hubungan Absorbansi dan Waktu Kestabilan Komplek Warna	24
Gambar 3. a Tempe Kedelai Hasil Fermentasi selama 0 jam, 24 jam, dan 48 jam.....	25
b. Tempe Kedelai Hasil Fermentasi selama 72 jam, 96 23 jam, dan 120 jam.....	26
Gambar 4. Grafik Hubungan Absorbansi dan Panjang Gelombang dari Komplek Warna.....	27
Gambar 5. Profil Kadar Protein Terlarut Selama Proses Fermentasi	32
Gambar 6. Grafik Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Tripsin.....	35
Gambar 7. Grafik Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Tripsin.....	36
Gambar 8. Grafik Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Aktivitas Tripsin....	37
Gambar 9. Profil Prosentase Kenaikan Aktivitas Tripsin dan Kadar Protein Pada Setiap Lama Fermentasi.....	37

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Komposisi Kimia Kedelai (dalam 100 g bahan).....	6
Tabel 2.	Komposisi Asam Amino Kedelai.....	7
Tabel 3.	Komposisi Zat Gizi Tempe Kedelai (dalam 100 g Bahan).....	9
Tabel 4.	Komposisi Asam Amino Tripsin.....	11
Tabel 5.	Sifat Fisikokimia Inhibitor Kunitz dan Bowman-Birk.....	12
Tabel 6.	Komposisi Asam Amino Antitripsin Kuniz.....	13
Tabel 7.	Data Pengamatan Absorbansi Larutan Standar Kasein.....	27
Tabel 8.	Kadar Protein terlarut dalam Biji Kedelai dan Tempe Hasil Fermentasi.....	28
Tabel 9.	Aktivitas Tripsin terhadap Protein terlarut Biji Kedelai Pada Berbagai pH.....	29
Tabel 10.	Aktivitas Tripsin terhadap Protein terlarut Biji Kedelai Pada Berbagai Suhu.....	29
Tabel 11.	Aktivitas Tripsin terhadap Protein terlarut Biji Kedelai dan Tempe Kedelai pada Berbagai Lama Fermentasi.....	30

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan Larutan Pereaksi.....	43
Lampiran 2. Data Penentuan Waktu Kestabilan Komplek Warna Untuk Penentuan Kadar Protein.....	44
Lampiran 3. Data Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Untuk Penentuan Kadar Protein.....	45
Lampiran 4. Perhitungan Persamaan Garis dari Kurva Standar Kasein dan Perhitungan Kadar Protein Terlarut.....	46
Lampiran 5. Data Penentuan Waktu Kestabilan Komplek Warna dan Panjang Gelombang Maksimum Untuk Penentuan Aktivitas Tripsin.....	49
Lampiran 6. Data Pengamatan dan Perhitungan pH Optimum untuk Aktivitas Tripsin.....	50
Lampiran 7. Data Pengamatan dan Perhitungan Suhu Optimum untuk Aktivitas Tripsin.....	51
Lampiran 8. Data Pengamatan dan Perhitungan Aktivitas Tripsin pada Tempe Kedelai.....	52
Lampiran 9. Perhitungan Kenaikan Protein dan Aktivitas Tripsin Pada Setiap Lama Fermentasi.....	53

STUDI PENGARUH LAMA FERMENTASI TEMPE KEDELAI TERHADAP AKTIVITAS TRIPSIN

Oleh:

*Eddy Sulistyowati, Apt, M.S, Retno Arianingrum, M.Si dan
Das Salirawati, M.Si*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama fermentasi kedelai terhadap kadar protein terlarut dalam tempe kedelai dan aktivitas tripsin terhadap protein terlarut tersebut.

Penentuan kadar protein terlarut dilakukan dengan metode Lowry menggunakan larutan standar kasein, dan penentuan aktivitas tripsin ditentukan dengan metode Anson dengan terlebih dahulu menentukan pH dan suhu optimum untuk aktivitas tripsin. Variasi lama fermentasi yang digunakan adalah 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam dan 120 jam.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar protein terlarut tempe kedelai pada fermentasi selama 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam dan 120 jam berturut-turut adalah 0,172% ; 0,212%; 0,217%, 0,212%; 0,197% dan 0,158% (b/b). Aktivitas tripsin terhadap protein terlarut dalam tempe kedelai hasil fermentasi 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam dan 120 jam berturut-turut adalah 1,35; 2,33; 2,73; 2,13; 1,17 dan 0,78 unit. Hasil tersebut menunjukkan bahwa lama fermentasi berpengaruh terhadap kadar protein terlarut dalam tempe dengan kadar protein terlarut tertinggi adalah pada lama fermentasi 48 jam dan berpengaruh pula terhadap aktivitas tripsin dengan aktivitas tertinggi pada lama fermentasi 48 jam.

Kata kunci: *tempe kedelai, lama fermentasi dan aktivitas tripsin*

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Protein merupakan komponen penting bagi sel hewan maupun manusia. Fungsi utamanya adalah sebagai unsur pembentuk struktur sel. Di samping itu berfungsi pula sebagai protein yang aktif, yaitu sebagai enzim yang berperan dalam mengkatalis berbagai proses biokimia dalam sel (Wirahadikusumah M., 1989: 8).

Protein adalah sumber asam amino. Ada 2 (dua) jenis asam amino, yaitu asam amino *essensial* yang tidak dapat dibuat oleh tubuh dan asam amino *non essensial* yang dapat dibuat oleh tubuh (Poedjiadi A., 1994: 94). Kebutuhan akan asam amino *essensial* dapat diperoleh dari bahan makanan berprotein tinggi yang dikonsumsi tubuh, salah satunya adalah dari tanaman kacang-kacangan seperti kedelai yang dapat diolah menjadi tempe, tahu, susu dan kecap.

Bahan makanan yang mengandung protein di dalam tubuh akan diserap oleh usus dalam bentuk asam amino. Salah satu enzim yang berperan dalam menghidrolisis protein menjadi asam amino adalah enzim tripsin. Tripsin adalah enzim pencernaan yang dapat menghidrolisis ikatan peptida dari polipeptida menjadi oligopeptida dan asam amino. Tripsin disekresikan dalam bentuk tripsinogen yang tidak aktif oleh sel-sel pankreas. Tripsinogen akan diaktifkan menjadi bentuk tripsin oleh enzim enterokinase dalam usus kecil. Enzim tripsin memiliki spesifikasi kerja, yaitu hanya memecah ikatan-ikatan

peptida yang mengandung gugus karboksil arginin atau lisin (Noor, Z., 1989: 15).

Tempe kedelai merupakan salah satu makanan yang populer di Indonesia. Selain murah harganya dan enak rasanya, kandungan protein di dalam tempe cukup tinggi dan banyak mengandung asam ammolisin. Tempe dapat dibuat dari bahan dasar kedelai ataupun jenis tanaman kacang-kacangan yang lain melalui proses fermentasi menggunakan *Rhizopus oligosporus* dan *Rhizopm oryzae*.

Kedua jenis jamur ini berkemampuan untuk mengubah kedelai menjadi asam amino dan protein lain yang cepat larut bila dikonsumsi, sehingga kandungan protein yang dapat diserap oleh tubuh akan lebih tinggi dibandingkan bila hanya dikonsumsi dalam bentuk kedelai (Wood, B.J.B., 1985: 230).

Namun demikian, di dalam kedelai juga terkandung senyawa antigizi yang dapat mengurangi manfaat kedelai sebagai sumber protein. Salah satu senyawa antigizi yang terdapat dalam kacang-kacangan adalah senyawa antitripsin. Senyawa antitripsin adalah senyawa yang menghambat kerja tripsin yang dihasilkan oleh pankreas, sehingga protein makanan tidak dapat diuraikan atau dicerna oleh enzim di dalam tubuh. Dengan demikian tidak terbentuk asam-asam amino yang diperlukan untuk pembentukan/sintesis jaringan tubuh (Sutrisno, 1995: 19). Senyawa antitripsin mempunyai efek menghambat pertumbuhan badan yang penghambatannya dapat mencapai 40% dari normal (Winarno, F.G., 1983: 46). Senyawa antitripsin dapat berupa

protein atau non protein. Menurut Hafez dan Mohamed (1983), senyawa anti tripsin yang terdapat dalam kedelai ada yang berupa senyawa anti tripsin non protein atau NPTI (*Non Protein Trypsin Inhibitor*) yang besarnya antara 27-55% dari aktivitas total antitripsin. Jumlah ini besarnya tergantung pada jenis kedelai.

Pada proses fermentasi dalam pembuatan tempe kedelai terjadi perubahan-perubahan susunan zat gizi di dalam kedelai, dan diduga berpengaruh juga terhadap kadar senyawa antitripsinnya. Oleh karena itu perlu dilakukan suatu penelitian untuk mengetahui profil kadar senyawa anti tripsin selama proses fermentasi pembuatan tempe. Kadar senyawa anti- tripsin dapat dipelajari dengan melihat besarnya aktivitas tripsin terhadap protein terlarut yang terdapat di dalam tempe kedelai selama berlangsungnya proses fermentasi. Bila kadar protein meningkat dan aktivitas tripsin menurun, berarti semakin besar kadar senyawa antitripsin dalam tempe kedelai. Cara ini lebih mudah dan murah bila dibandingkan dengan menghitung kadar senyawa anti tripsinnya.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan, maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

- A. Bagaimana pengaruh lama fermentasi kedelai terhadap kadar protein terlarut dalam tempe kedelai?
- B. Bagaimana pengaruh lama fermentasi kedelai terhadap aktivitas tripsin pada protein terlarut dalam tempe kedelai?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui:

- a. pengaruh lama fermentasi kedelai terhadap kadar protein terlarut dalam tempe kedelai.
- b. pengaruh lama fermentasi kedelai terhadap aktivitas tripsin pada protein terlarut dalam tempe kedelai.

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk memberikan informasi tentang pengaruh lama fermentasi terhadap kadar senyawa antitripsin dengan mengamati kadar protein terlarut dalam tempe kedelai dan aktivitas tripsin terhadap protein tersebut.

E. Definisi Operasional

Variabel dalam penelitian ini meliputi lama fermentasi, kadar protein dan aktivitas tripsin.

1. Lama fermentasi adalah waktu dalam satuan jam yang digunakan untuk melakukan proses fermentasi kedelai menghasilkan tempe menggunakan jamur *Rhizopm oligosporus* berbentuk serbuk yang diproduksi oleh LIPL. Pada penelitian ini lama fermentasi kedelai dilakukan selama 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam dan 120 jam.
2. Kadar protein adalah kadar protein terlarut dalam % (b/b) yang terdapat dalam tempe hasil fermentasi yang ditentukan dengan metode Lowry .

3. Aktivitas tripsin adalah aktivitas tripsin yang bekerja spesifik pada substrat (yaitu protein terlarut yang terdapat di dalam tempe kedelai) dan dapat menghasilkan produk dengan kenaikan absorbansi sebesar 0,001 per menit dari absorbansi kontrol pada kondisi optimum dan dihitung sebagai satu unit aktivitas enzim. Pada penelitian ini penentuan aktivitas tripsin dilakukan dengan metode Anson.

BAB II KAJIAN PUSTAKA

A. Kajian Teoretik

1. Kedelai

Kedelai (*Glycine max* (L) Merrill), termasuk dalam famili Leguminose (kacang-kacangan), genus *Glycine*, sub famili Papilioneideae, ordo Polypetales dan species *max*.

Berdasarkan atas warnanya, kedelai dapat dibedakan atas kedelai kuning atau putih, kedelai hitam, kedelai coklat, dan kedelai hijau. Kedelai yang banyak ditanam di Indonesia adalah kedelai kuning atau putih, kedelai hitam, dan kedelai hijau. Kedelai merupakan bahan makanan yang dapat digunakan sebagai sumber protein nabati. Komposisi kimia yang terdapat dalam kedelai disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Kimia Kedelai (dalam 100 g bahan)

Zat Gizi	Jumlah
Kalori (kal)	331
Protein (g)	34,9
Lemak (g)	18,1
Karbohidrat (g)	34,8
Kalsium (mg)	227
Fosfor (mg)	585
Besi (mg)	8
Vitamin B1 (mg)	1,07
Vitamin A	110
Air (g)	7,5

(Anonim, 1989: 21)

Di dalam kedelai juga banyak mengandung asam amino yang cukup lengkap, seperti terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi Asam Amino Kedelai (dalam 100 g bahan)

Asam Amino	Jumlah (mg)
Isoleusin	1912
Leusin	3127
Lisin	2300
Fenilalanin	1996
Tirosin	1305
Metionin	446
Sistein	349
Treonin	1667
Triptophan	465
Valin	1925
Arginin	2355
Histidin	930
Alanin	1764
Asam Aspartat	5097
Asam Glutamat	7328
Glisin	1712
Prolin	1783
Serin	2145

(Anonim. 1989: 59-76)

2. Proses Fermentasi dalam Pembuatan Tempe

Istilah fermentasi dalam biokimia diartikan sebagai pembentukan energi melalui katabolisme senyawa organik, sedangkan dalam bidang industri, fermentasi diartikan sebagai proses pemanfaatan mikroba untuk menghasilkan suatu produk (Stanburry, P.P. dan Whitaker, A., 1984).

Kedelai dapat diolah menjadi tempe melalui proses fermentasi dengan menambahkan ragi tempe. Ragi tempe adalah bahan yang mengandung biakan jamur tempe dan digunakan sebagai agensia pengubah bahan baku menjadi tempe akibat tumbuhnya jamur tempe dan melakukan kegiatan fermentasi yang menyebabkan berubahnya sifat karakteristik menjadi tempe (Kasmidjo, Rb., 1990: 38).

Di dalam proses pembuatan tempe, tercatat 2 (dua) jenis jamur yang berperan yaitu jamur *Rhizopus oligosporus* dan *Rhizopus oryzae*. Kedua jenis jamur ini mempunyai kemampuan untuk mengubah kedelai menjadi asam amino dan protein lain yang cepat larut bila di konsumsi (Imam dan Sukanto, 1999: 4). Menurut Rachman A. (1989: 121) *Rhizopus oligosporus* mensintesis enzim protease lebih banyak sehingga menyebabkan terjadinya peningkatan nilai gizi protein kedelai. Kemampuannya dalam mengubah kedelai menjadi tempe meliputi: aktivitas enzimatik, perkecambahan spora dan penetrasi miselia jamur tempe ke dalam jaringan biji kedelai.

Tempe mempunyai ciri-ciri warna putih, tekstur kompak dan flavor spesifik. Warna putih disebabkan adanya miselia jamur yang tumbuh pada permukaan biji kedelai dan tekstur kompak juga disebabkan oleh miselia-miselium jamur yang menghubungkan antara biji-biji kedelai tersebut. Terjadinya degradasi komponen-komponen dalam kedelai dapat menyebabkan terbentuknya flavor spesifik setelah fermentasi (Rahayu, K. dan Sudarmaji, S., 1989: 271).

Pada dasarnya cara pembuatan tempe meliputi tahapan sortasi, pembersihan biji, perendaman, penghilangan kulit, perebusan, penirisan, pendinginan, inokulasi dengan jamur tempe, pengemasan, inkubasi atau proses fermentasi (Rahayu, K. dan Sudarmaji, S., 1989: 271).

Proses fermentasi tempe dibagi menjadi tiga tahap, yaitu:

- a. Tahap pertumbuhan cepat (0 – 30 jam fermentasi), terjadi kenaikan jumlah asam lemak bebas, kenaikan suhu, pertumbuhan jamur cepat, dengan

terlihat terbentuknya miselia pada permukaan biji makin lama makin lebat, sehingga menunjukkan masa yang lebih kompak.

- b.** Tahap transisi (30 – 50 jam fermentasi), merupakan tahap optimal fermentasi dan siap dipasarkan. Pada tahap ini terjadi penurunan suhu, jumlah asam lemak yang dibebaskan dan pertumbuhan jamur hampir tetap atau bertambah sedikit, flavor spesifik tempe optimal dan tekstur lebih kompak.
- c.** Tahap pembusukan atau fermentasi lanjut (50 – 90 jam fermentasi), terjadi kenaikan jumlah bakteri dan jumlah asam lemak bebas, pertumbuhan jamur menurun dan pada kadar air tertentu pertumbuhan jamur terhenti, terjadi perubahan flavor karena degradasi protein lanjut sehingga terbentuk amonia.

Dalam proses fermentasi terjadi perubahan-perubahan yang meliputi perubahan komponen lemak, karbohidrat, protein, vitamin dan komponen lain. (Rahayu, K. dan Sudarmaji, S., 1989: 281). Menurut Wood, B.J.B. (1985: 230-231). Tempe bersifat lebih mudah dicerna karena selama proses fermentasi terjadi perubahan senyawa kompleks menjadi senyawa sederhana yang sifatnya lebih mudah larut. Tempe juga banyak mengandung vitamin B12; mineral seperti Ca, Fe, tidak mengandung kolesterol; dan relatif bebas dari racun kimia. Komposisi zat gizi dalam tempe kedelai disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Komposisi Zat Gizi Tempe Kedelai dalam 100 gram Bahan

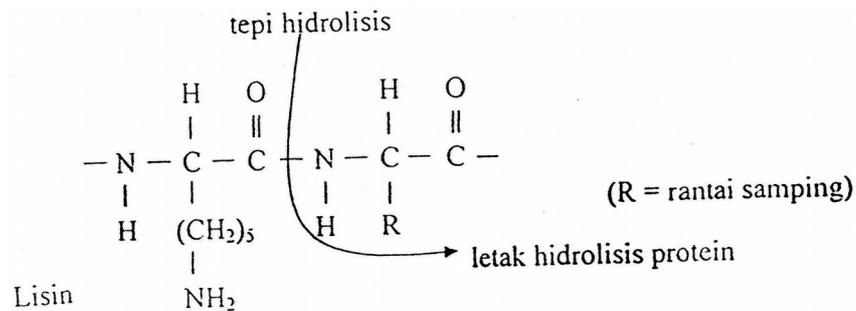
Zat Gizi	Jumlah
Kalori (kal)	149,0
Protein (g)	18,3
Lemak (g)	4,0
Karbohidrat (g)	12,7
Kalsium (mg)	129,0
Fosfor (mg)	154,0
Besi (mg)	10,0
Air (g)	64,0

3. Tripsin dan Antitripsin

Tripsin merupakan endopeptidase yang disekresikan dalam bentuk tripsinogen yang tidak aktif oleh sel-sel pankreas. Tripsin adalah salah satu dari serin protease, yaitu merupakan enzim proteolitik yang mempunyai berat molekul sekitar 24.000. Tripsinogen diaktifkan menjadi tripsin oleh enzim enterokinase, yaitu suatu enzim yang dihasilkan di dalam usus. Molekul tripsin yang terjadi, dengan bantuan ion Ca^{2+} dapat bertindak sebagai katalis untuk mengubah tripsinogen menjadi tripsin (Rick, W., 1965: 807).

Aktivitas optimum tripsin terjadi pada pH 7 – 9. Protein-protein yang telah mengalami denaturasi dapat dihidrolisis oleh tripsin dengan lebih mudah dibandingkan protein asalnya. Tripsin merupakan enzim pencernaan yang dapat menghidrolisis ikatan peptida dari polipeptida menjadi oligopeptida dan beberapa asam amino. Tripsin dapat menyerang semua jenis protein, termasuk beberapa protein yang tidak dapat diserang oleh pepsin. Namun demikian, tripsin adalah biokatalis yang memiliki spesifitas kerja, yaitu menyerang ikatan-ikatan peptida yang mengandung gugus karboksil arginin atau IIsin. Tripsin dapat memecah ester-ester maupun amida secara sederhana (Noor, Z.,

1989: 15 dan Winarno, F.G., 1983: 17). Letak hidrolisis protein dapat ditunjukkan pada gambar 1. Menurut Walsh, *et.al.* (1964), komposisi asam amino dari tripsin seperti disajikan pada Tabel 4 (Nur R., 1990).



Gambar 1. Letak Hidrolisis Protein (F.G.Winarno, 1982: 17)

Tabel 4. Komposisi Asam Amino Tripsin

AsamAmino	Jumlah	AsamAmino	Jumlah
Lisin (Lys)	14	Alanin (Ala)	14
Histidin (His)	3	Sistein (half-cystein) (cis)	12
Arginin (Arg)	2	Valin (val)	17
Asam Aspartat (Asp)	22	Metionin (Met)	2
Treonin (Thr)	10	Isoleusin (He)	15
Serin (Ser)	33	Leusin (Leu)	14
Asam glutamat (Glu)	14	Tirosin (Try)	10
Prolin (Pro)	9	Fenilalanin (Phe)	3
Glisin (Gly)	25	Triptofan (Trp)	4

Di samping senyawa yang berguna, ternyata pada kedelai juga terdapat senyawa anti gizi. Di antara senyawa tersebut yang sangat mempengaruhi mutu produk olahan kedelai adalah: antitripsin, hemaglutinin, asam fitat, antivitamin, saponin, estrogen, lisincalin dan oligosakarida faktor flatulensi (timbulnya gas dalam perut sehingga perut menjadi kembung (Winarno, F.G., 1993: 256).

Anti tripsin adalah suatu zat yang menghambat kerja enzim tripsin di

dalam tubuh. Senyawa ini secara alami terdapat pada kedelai, kara, kentang dan gandum. Beberapa senyawa antitripsin merupakan protein dengan berat molekul rendah (Winarno, F.G., 1983: 46), Ada dua jenis inhibitor protease utama dalam kedelai yang telah diketahui, yaitu antitripsin Kunitz (Kunitz inhibitor) dan antitripsin BBI (Bowman-Birk Inhibitor). Sifat fisikokimia kedua jenis antitripsin tersebut dapat di lihat pada Tabel 5.

Hafez dan Mohammed (1983: 1265) melaporkan ternyata terdapat senyawa antitripsin, khususnya pada kedelai yang bukan berupa protein. Senyawa tersebut disebutnya sebagai senyawa NPTI (*Non Protein Trypsin Inhibitor*). NPTI berkisar antara 27-55% dan aktivitas total antitripsin yang besarnya tergantung pada jenis kedelai.

Tabel 5. Sifat Fisikokimia Inhibitor Kunitz dan Bowman-Birk

Sifat Fisikokimia	Inhibitor	
	Kunitz	Bowman – Birk
Titik isoelektrik	4,5	4,2
Berat molekul	21500	7975
Jumlah Asam amino	197	72
Jumlah sistin per mol	2	7
Stabilitas terhadap panas, asam dan pepsin	Tidak stabil	Stabil
Penghambatan terhadap khi mo tripsin	Rendah	Tinggi
Hipertrofi pankreas	+	+

Sumber: Wolf and Cowan (1971) dalam Sutrisno, 1995: 20

Seperti protein lain, antitripsin tersusun oleh asam-asam amino dalam urutan-urutan yang khas. Komposisi asam amino dari antitripsin Kuniz disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Komposisi Asam Amino Antitripsin Kuniz

AsamAmino	Jumlah	AsamAmino	Jumlah
Lisin (Lys)	12	Sistein (half-cystein) (cis)	4
Histidin (His)	2	Valin (val)	15
Arginin (Arg)	10	Metionin (Met)	2
Asam Aspartat (Asp)	29	Isoleusin (He)	15
Treonin (Thr)	8	Leusin (Leu)	15
Serin (Ser)	12	Tirosin (Try)	4
Asam glutamat (Glu)	19	Fenilalanin (Phe)	10
Prolin (Pro)	11	Triptofan (Trp)	2
Glisin (Gly)	17	N total	16,34
Alanin (Ala)	9		

Sumber: Kassell (1970) dalam Nur Rachmat, 1990: 20

Mekanisme penghambatan tripsin oleh antitripsin, khususnya pada kedelai terjadi akibat terbentuknya ikatan kovalen antara gugus aktif enzim tripsin dengan residu asam amino Arg (64)-Ile (65) yang terdapat pada antitripsin (Reed, 1975: 150). Senyawa penghambat ini dapat bergabung dengan tripsin dengan perbandingan 1 mg dengan 1,05 mg tripsin. Gabungan ini merupakan kompleks enzim dengan senyawa penghambat (kompleks tripsin-antitripsin) yang terikat kuat, sehingga enzim terhalang fungsinya atau tripsin menjadi tidak aktif (Winarno, F.G., 1983: 79)

B. Kerangka Berpikir

Tempe kedelai merupakan makanan berprotein tinggi yang dibuat melalui fermentasi. Di dalam tubuh, protein akan dihidrolisis menjadi asam-asam amino oleh enzim protease, salah satunya adalah enzim tripsin. Di dalam kedelai selain mengandung protein diketahui mengandung senyawa antitripsin yang menghambat aktivitas tripsin. Pada proses fermentasi tempe terjadi perubahan-perubahan komponen seperti lemak, karbohidrat, protein, vitamin

dan komponen lain dan kemungkinan berpengaruh juga terhadap senyawa antitripsin yang terdapat di dalam kedelai. Perubahan kadar senyawa antitripsin selama proses fermentasi akan mempengaruhi aktivitas tripsin.

C. Hipotesis

1. Ada pengaruh lama fermentasi kedelai terhadap kadar protein terlarut dalam tempe.
2. Ada pengaruh lama fermentasi kedelai terhadap aktivitas tripsin pada protein terlarut dalam tempe.

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi dalam penelitian ini adalah kedelai sebagai bahan dasar pembuatan tempe kedelai yang di jual di daerah Kotamadya Yogyakarta.
2. Sampel dalam penelitian ini adalah kedelai yang diperoleh dan sebuah toko di Jl. Achmad Dahlan.

Pengambilan sampel dilakukan secara *purposive random sampling*, yaitu memilih biji kedelai yang berkualitas baik untuk digunakan dalam pembuatan tempe kedelai.

B. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan desain *one shot case study*, yaitu memberikan perlakuan terhadap variabel bebas, kemudian mengamati hasil pada variabel terikat.

C. Instrumen Penelitian dan Validasi Instrumen

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat dan bahan.

a. Alat

Spektronic 20 D⁺ (merk *MILTON ROY*), sentrifus (Jouan B₃. 11), pH meter, blender, neraca analitik, *vortex* (Thermolyne type 37600 mixer), pemanas air, *stopwatch*, kompor, pengukus, daun pisang, kertas saring,

pengaduk magnet, almari es, dan peralatan gelas (tabung reaksi, pipet tetes, gelas beker, labu ukur, pipet ukur, corong gelas).

b. Bahan

Serbuk inokulum biakan jamur *Rhizopus oligosporum* dari LIPI (merk RAPRIMA), biji kedelai, tripsin (E Merck), kasein, asam trikloroasetat (TCA), kristal $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, kristal $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, kristal NaOH, kristal Na_2CO_3 , kristal $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, kristal $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, reagen Folin-Ciocalteu, dan akuades.

Validasi instrumen dilakukan dengan terlebih dahulu melakukan optimasi kondisi penelitian, seperti waktu kestabilan dan panjang gelombang maksimum. Pembuatan larutan (pereaksi yang digunakan) disajikan pada Lampiran 1.

D. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Tempe Kedelai

Biji kedelai yang berkualitas baik dicuci sampai bersih kemudian direbus lebih kurang selama 60 menit sampai masak (setiap 1 kg biji kedelai membutuhkan sekitar 2,5 liter air). Biji kedelai selanjutnya direndam semalam. Setelah perendaman kulit biji kedelai dikupas dan dicuci hingga bersih, kemudian dikukus selama 45 menit. Biji kedelai tersebut kemudian ditiriskan dan setelah dingin di tambahkan (diinokulasi) jamur tempe *Rhizopus oligosporus* sebanyak 2g untuk 1 kg biji kedelai dan dicampur hingga rata. Selanjutnya dibungkus dengan daun pisang dan diinkubasi pada

suhu kamar masing-masing selama 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam dan 120 jam (Suliantari dan Rahayu, W.P., 1990).

2. Penentuan Kadar Protein Terlarut dengan Metode Lowry

a. Penentuan Waktu Kestabilan (*Operating Time*)

Ke dalam tabung reaksi dimasukkan 0,6 mL kasein 1 mg/mL, kemudian ditambahkan akuades hingga 1,2 mL dan 6,0 mL pereaksi Lowry C., dikocok dengan *vortex* dan didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit. Campuran ditambah 0,3 mL reagen Folin-Ciocalteu, dan dikocok dengan *vortex*. Selanjutnya diamati absorbansinya pada panjang gelombang 710 nm selama 2 jam tiap 5 menit.

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Cara kerja dilakukan seperti penentuan waktu kestabilan (2a), tetapi absorbansi diukur pada waktu kompleks warna stabil (60 menit), dan diamati pada variasi panjang gelombang antara 650-750 nm.

c. Pembuatan Kurva Standar Protein (Kasein)

Dibuat larutan induk kasein dengan konsentrasi 1 mg/ml. Dari larutan induk tersebut dibuat sederetan larutan standar kasein masing-masing dengan konsentrasi: 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09 dan 0,10 mg/mL. Masing-masing larutan diambil 0,6 mL, kemudian ditambah air hingga 1,2 mL. Selanjutnya ditambahkan 6,0 mL pereaksi Lowry C dan dikocok dengan *vortex*, dan didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit. Larutan kemudian ditambahkan dengan 0,3 mL reagen Folin-Ciocalteu, segera dikocok dengan *vortex* dan didiamkan selama 60

menit. Selanjutnya diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimum, yaitu 710 nm. Sebagai blangko digunakan 1,2 mL akuades dan ditambahkan pereaksi seperti pada larutan standar.

d. Kadar Protein Terlarut dalam Tempe Kedelai

Masing-masing sebanyak 1 g tempe kedelai hasil fermentasi selama 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam dan 120 jam yang sudah dihaluskan dengan blender dilarutkan dengan 50 mL buffer fosfat pH 8 dan diaduk dengan pengaduk magnet. Selanjutnya campuran disentrifus dan disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh dipindahkan ke dalam labu takar 50 mL, kemudian ditambahkan buffer fosfat pH 8 sampai tanda batas.

Masing-masing filtrat diambil 0,6 mL, kemudian ditambah akuades hingga 1,2 mL dan diperlakukan seperti prosedur (2c), dan diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 710 nm. Pada penelitian ini diamati pula kadar protein terlarut dalam biji kedelai tanpa fermentasi dengan cara yang sama.

3. Penentuan Aktivitas Tripsin dengan Metode Anson

Biji kedelai sebanyak 1 g (tanpa fermentasi) yang telah dihaluskan dengan blender dilarutkan dengan 50 mL buffer fosfat pH 8 dan diaduk dengan pengaduk magnet. Selanjutnya campuran disentrifus dan disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh dipindahkan ke dalam labu takar 50 mL, kemudian ditambahkan buffer fosfat pH 8 sampai tanda batas.

a. Penentuan pH Optimum

Disiapkan sejumlah tabung reaksi masing-masing untuk:

1) Tabung Eksperimen (T_E)

Ke dalam lima buah tabung reaksi masing-masing dimasukkan 5 mL larutan filtrat biji kedelai (sebagai substrat), kemudian dipra-inkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya masing-masing tabung ditambahkan 2 mL larutan enzim tripsin dalam buffer fosfat dengan pH berturut-turut 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; dan 8,5, kemudian dikocok dengan *vortek* dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 37°C. Proses inkubasi dihentikan tepat pada waktu 20 menit (dihitung dari penambahan enzim). Selanjutnya reaksi dihentikan dengan cara menambahkan 3 ml larutan TCA 20% (b/v) dan di aduk dengan *vortex*. Masing-masing tabling kemudian di masukkan dalam air es selama 30 menit. Campuran disentrifus dan disaring dengan kertas saring. Filtratnya diuji dengan metode Anson, yaitu mencampurkan 2 mL larutan filtrat dengan 4 mL NaOH 0,5 M. Selanjutnya didiamkan hingga terbentuk kompleks warna yang stabil (10 menit) dan ditentukan absorbansi pada panjang gelombang maksimum.

Penentuan waktu kestabilan pengoperasian alat dilakukan pada kondisi pH 7 dan antara selang waktu 2 – 40 menit, sedangkan pengamatan panjang gelombang maksimum dilakukan setelah pembentukan kompleks 10 menit pada variasi panjang gelombang antara 600 – 700 nm (Lampiran 5).

2) Tabung Kontrol (T_K)

Ke dalam tabling dimasukkan terlebih dahulu 2 mL larutan enzim tripsin, kemudian ditambahkan 3 mL TCA 20% (b/v) dan terakhir 5 mL larutan filtrat biji kedelai (sebagai substrat). Selanjutnya dilakukan perlakuan yang sama seperti tabling eksperimen.

3) Tabung Blangko (T_B)

Ke dalam lima tabung reaksi masing-masing dimasukkan 2 mL larutan buffer fosfat dengan pH berturut-turut 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; dan 8,5; kemudian ditambahkan 3 mL larutan TCA 20% (b/v) dan 5 mL akuades serta diaduk dengan *vortex*. Masing-masing larutan tersebut diambil 2 mL kemudian ditambahkan dengan 4 mL NaOH 0,5 M dan diaduk. Selanjutnya ditambahkan 1 mL reagen Folin-Ciocalteau dan didiamkan selama 10 menit.

b. Penentuan Suhu Optimum

Cara kerja dilakukan sama seperti penentuan pH optimum, tetapi kondisi pH dibuat tetap, yaitu pada pH optimum (dari hasil penentuan pH di atas), dan suhu divariasikan pada 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, dan 38°C, waktu inkubasi 20 menit.

c. Penentuan Aktivitas Tripsin Pada Substrat (Protein Tempe Kedelai)

Disiapkan sejumlah tabung reaksi masing-masing untuk:

1) Tabung Eksperimen (T_E)

Ke dalam tujuh buah tabung reaksi masing-masing dimasukkan 5 mL larutan filtrat tempe kedelai hasil fermentasi selama 0 jam, 24

jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam dan 120 jam dan biji kedelai tanpa fermentasi, kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya masing-masing tabung ditambahkan 2 mL larutan enzim tripsin dalam buffer fosfat dengan pH optimum, kemudian dikocok dengan *vortek* dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu optimum. Proses inkubasi dihentikan tepat pada waktu 20 menit (dihitung dari penambahan enzim). Selanjutnya reaksi dihentikan dengan cara menambahkan 3 ml larutan TCA 20% (b/v) dan di aduk dengan *vortex*. Masing-masing tabung kemudian di masukkan dalam air es selama 30 menit. Campuran disentriffts dan disaring dengan kertas saring. Filtratnya diuji dengan metode Anson, yaitu mencampurkan 2 mL larutan filtrat dengan 4 mL NaOH 0,5 M. Selanjutnya didiamkan selama 10 menit dan ditentukan absorbansi pada panjang gelombang 650.

2) Tabung Kontrol (T_K)

Ke dalam tujuh buah tabung reaksi masing-masing dimasukkan terlebih dahulu 2 mL larutan enzim tripsin, kemudian ditambahkan 3 mL TCA 20% (b/v) dan terakhir berturut-turut 5 mL larutan filtrat tempe kedelai dari hasil fermentasi selama 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam dan 120 jam dan biji kedelai tanpa fermentasi (sebagai substrat). Selanjutnya dilakukan perlakuan yang sama seperti tabling eksperimen.

3) Tabung Biangko (T_B)

Ke dalam tujuh buah tabung reaksi masing-masing dimasukkan 2 mL larutan buffer fosfat dengan pH optimum, kemudian ditambahkan 3 mL larutan TCA 20% (b/v) dan 5 mL akuades serta diaduk dengan *vortex*. Masing-masing larutan tersebut diambil 2 mL kemudian ditambahkan dengan 4 mL NaOH 0,5 M dan diaduk. Selanjutnya ditambahkan 1 mL reagen Folin-Ciocalteau dan didiamkan selama 10 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 650.

E. Teknik Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini menggunakan teknik analisis deskriptif non statistik.

1. Penentuan Kadar Protein Terlarut dalam Tempe Kedelai

Konsentrasi protein terlarut dalam sampel (mg/mL) dihitung dengan persamaan garis lurus yang diperoleh dari kurva standar kasein, selanjutnya dinyatakan dalam % b/b dengan menggunakan rumus:

$$\text{Kadar Protein Terlarut dalam Sampai (\% b/b)} = \frac{\text{Berat Protein Terlarut}}{100 \% \text{ Berat Sampel}} \times 100\%$$

Selanjutnya data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan membuat kurva antara kadar protein terlarut dalam % (b/b) sebagai sumbu y dengan variasi lama fermentasi yang dinyatakan dalam jam sebagai sumbu x.

2. Penentuan Aktivitas Tripsin Terhadap Protein Terlarut Tempe Kedelai

Aktivitas enzim tripsin dihitung dengan mencari selisih serapan antara tabung eksperimen dengan kontrol. Satu unit aktivitas enzim tripsin adalah banyaknya enzim tripsin yang bekerja spesifik pada substrat protein dan menghasilkan produk dengan kenaikan serapan sebesar 0,001 per menit dari serapan kontrol pada kondisi percobaan. Rumus yang digunakan:

$$A = \frac{At - Ao}{0,001 \times t}$$

A = aktivitas enzim tripsin

At = absorbansi pada waktu t menit

Ao = absorbansi pada waktu 0 menit

t = waktu inkubasi (menit), dalam penelitian ini digunakan t = 20 menit

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan membuat kurva antara aktivitas tripsin (sebagai sumbu y) dengan variasi lama fermentasi (sebagai sumbu x).

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

Berdasarkan hasil pengamatan yang telah dilakukan diperoleh data sebagai berikut:

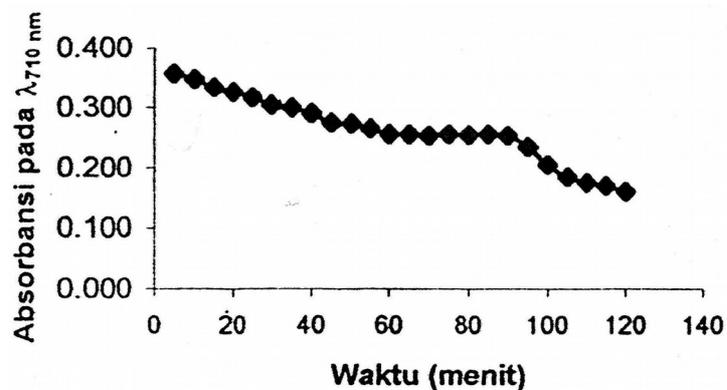
1. Proses Fermentasi Kedelai

Hasil pengamatan terhadap lama fermentasi kedelai pada 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam, dan 120 jam (gambar 3a dan 3b) menunjukkan bahwa permukaan tempe hasil fermentasi pada jam ke-48 memiliki tekstur yang paling kompak.

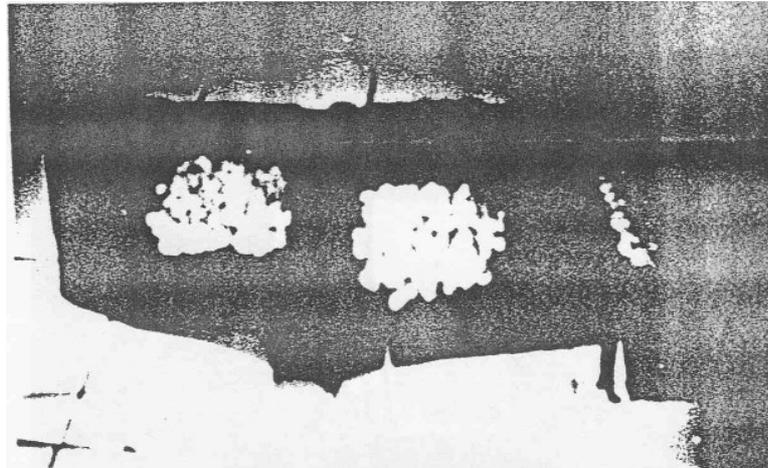
2. Penentuan Kadar Protein Terlarut

a. Penentuan Waktu Kestabilan

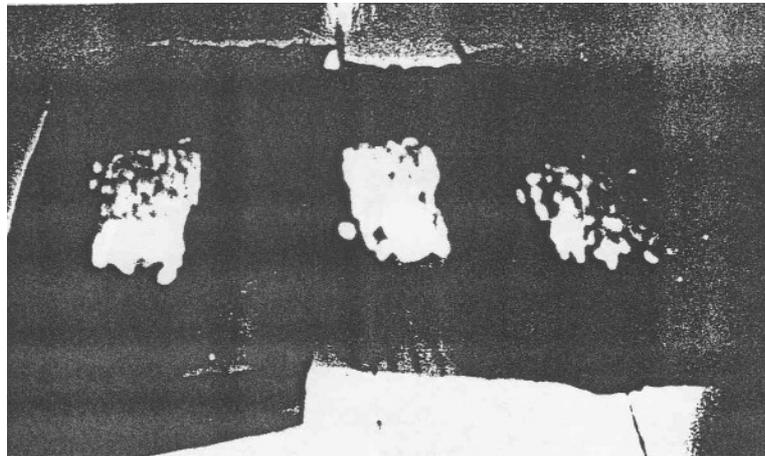
Dari pengukuran waktu kestabilan diperoleh grafik hubungan antara waktu dan absorbansi (gambar 2). Dari grafik tersebut nampak waktu kestabilan dari kompleks warna adalah antara 60-90 menit. Data selengkapnya disajikan pada lampiran 2.



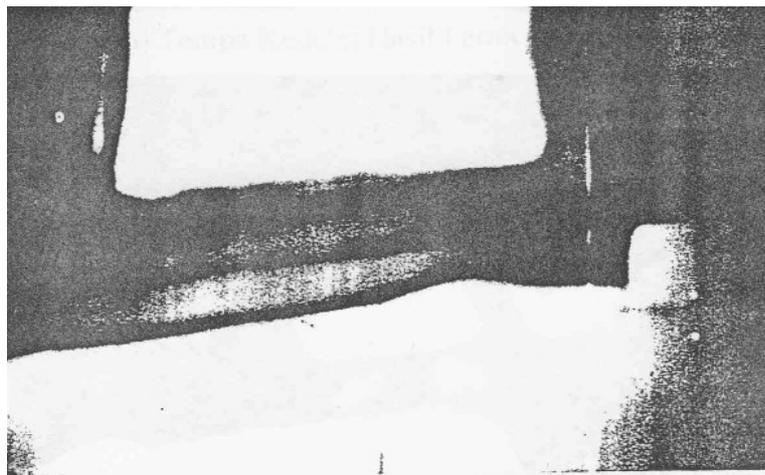
Gambar 2. Grafik Hubungan Absorbansi dan Waktu Kestabilan Komplek Warna



(a) Tempe Kedelai Hasil Fermentasi 0 jam

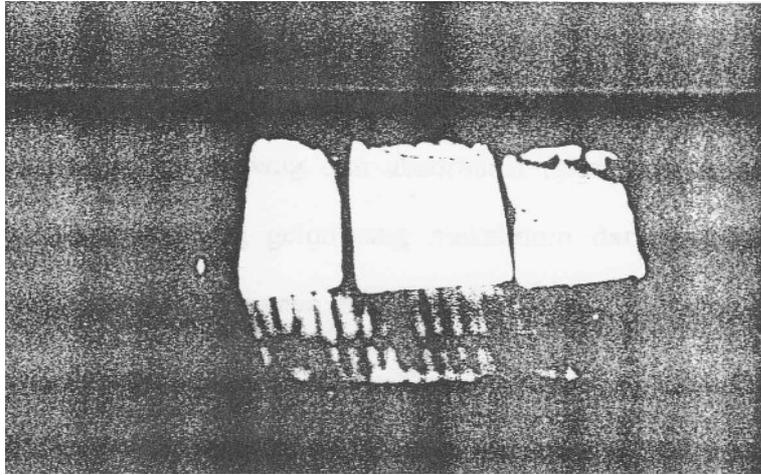


(b) Tempe Kedelai Hasil Fermentasi 24 jam

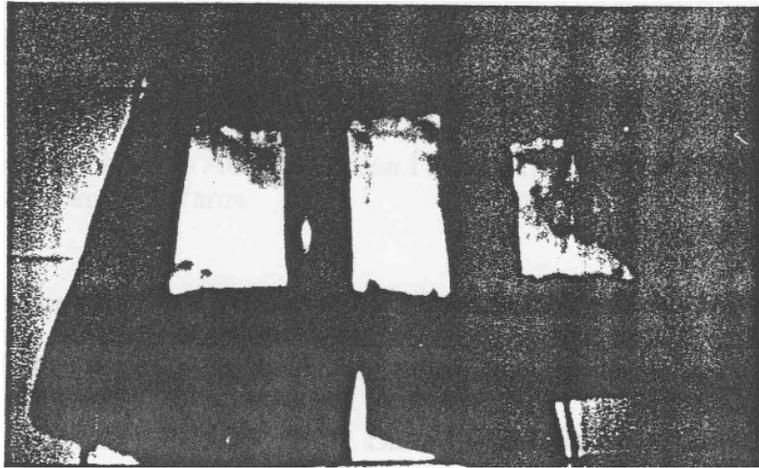


(c) Tempe Kedelai Hasil Fermentasi 48 jam

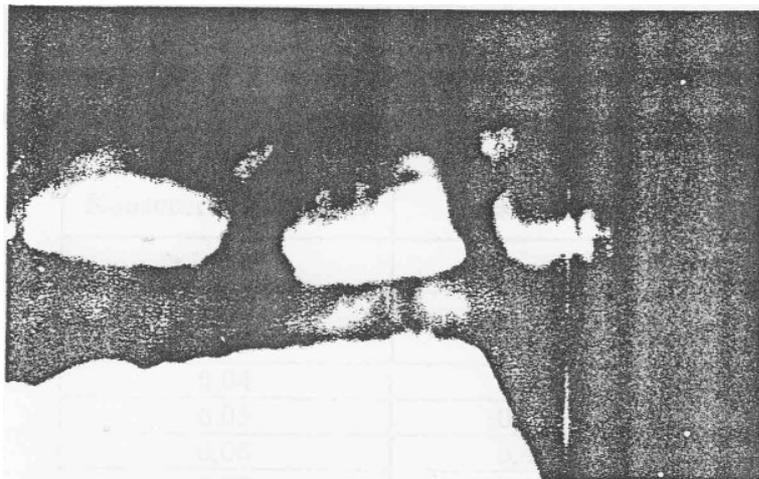
Gambar 3a. Tempe Kedelai Hasil Fermentasi selama: 0 jam, 24 jam, dan 48 jam



(a) Tempe Kedelai Hasil Fermentasi 72 jam



(b) Tempe Kedelai Hasil Fermentasi 96 jam

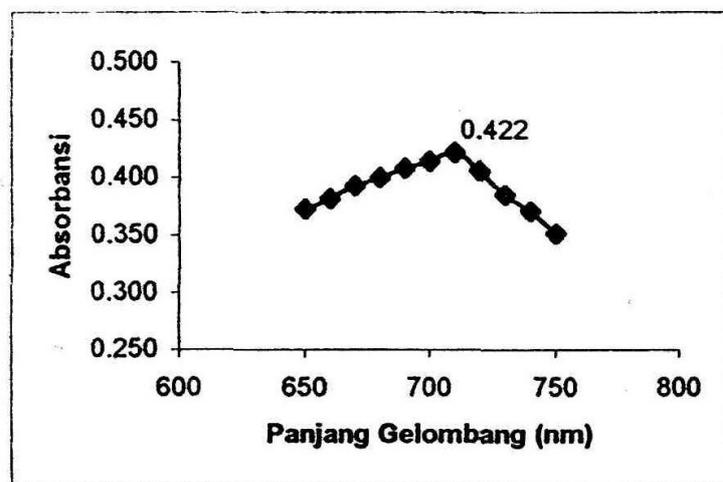


(c) Tempe Kedelai Hasil Fermentasi 120 jam

Gambar 3b. Tempe Kedelai Hasil Fermentasi selama 72 jam, 96 jam dan 120 jam

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimura

Dari pengukuran panjang gelombang maksimum diperoleh grafik hubungan antara panjang gelombang dan absorbansi (gambar 4). Dari grafik tersebut nampak bahwa panjang gelombang maksimum dan kompleks warna adalah pada 710 nm. Data selengkapnya disajikan pada lampiran 3.



Gambar 4. Grafik Hubungan Absorbansi dan Panjang Gelombang dari Komplek Warna

c. Kurva Standar Protein (Kasein)

Dari pengukuran absorbansi pada sederetan larutan standar kasein diperoleh data seperti terlihat pada Tabel 7. Dari data tersebut diperoleh persamaan garis lurus $Y = 5,9958 X + 0,0561$, perhitungan selengkapnya disajikan pada lampiran 4.

Tabel 7. Data Pengamatan Absorbansi Larutan Standar Kasein

Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi
0,01	0,111
0,02	0,180
0,03	0,240
0,04	0,292

0,05	0,364
0,06	0,420
0,07	0,466
0,08	0,526
0,09	0,598
0,10	0,662

d. Kadar Protein Terlarut

Dari perhitungan dengan menggunakan persamaan garis dari kurva standar kasein diperoleh data kadar protein terlarut dalam biji kedelai dan tempe kedelai basil fermentasi seperti disajikan pada label 8. Data dan perhitungan selengkapnya disajikan pada lampiran 4. Dari data tersebut menunjukkan bahwa kadar protein tertinggi diperoleh pada lama fermentasi 48 jam.

Tabel 8. Kadar Protein Terlarut dalam Biji kedelai dan Tempe Basil Fermentasi

No.	Sampel	Kadar Protein % (b/b)
1.	Biji kedelai (tanpa fermentasi)	0,167
2.	Tempe 0 jam fermentasi	0,172
3.	Tempe 24 jam fermentasi	0,212
4.	Tempe 48 jam fermentasi	0,217
5.	Tempe 72 jam fermentasi	0,212
6.	Tempe 96 jam fermentasi	0,197
7.	Tempe 120 jam fermentasi	0,158

3. Penentuan Aktivitas Tripsin dengan Metode Anson

a. pH Optimum

Pengukuran pH optimum dilakukan setelah 10 menit pembentukan kompleks warna dan pada panjang gelombang 650 nm (lampiran 5). Berdasarkan hasil pengamatan menunjukkan bahwa pH optimum untuk aktivitas tripsin dengan protein kedelai adalah pada pH

8 (Tabel 9). Data dan perhitungan selengkapnya disajikan pada lampiran 6.

b. Suhu Optimum

Hasil pengamatan suhu optimum untuk aktivitas tripsin terhadap substrat (protein kedelai) menunjukkan bahwa suhu optimum untuk aktivitas tripsin dengan protein kedelai adalah pada suhu 37°C (Tabel 10). Data dan perhitungan selengkapnya disajikan pada lampiran 7.

Tabel 9. Aktivitas Tripsin Terhadap Protein Terlarut Biji Kedelai Pada Berbagai pH

No.	pH	Aktivitas Tripsin
1.	6,5	0,70
2.	7,0	0,95
3.	7,5	1,43
4.	8,0	1,72
5.	8,5	1,27

Tabel 10. Aktivitas Tripsin Terhadap Protein Terlarut Biji Kedelai Pada Berbagai Suhu

No.	Suhu	Aktivitas Tripsin
1.	34	0,98
2.	35	1,25
3.	36	1,37
4.	37	1,50
5.	38	1,38

c. Aktivitas Tripsin Terhadap Protein Terlarut Tempe Kedelai

Hasil pengamatan aktivitas tripsin terhadap protein terlarut dalam tempe selama fermentasi 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam dan 120 jam dan biji kedelai tanpa fermentasi disajikan pada Tabel 11. Data tersebut menunjukkan bahwa aktivitas tripsin tertinggi adalah

terhadap protein tempe hasil fermentasi selama 48 jam. Data dan perhitungan selengkapnya pada lampiran 8.

Tabel 11. Aktivitas Tripsin Terhadap Protein Terlarut dalam Biji Kedelai dan Tempe Kedelai pada Berbagai Lama Fermentasi

No.	Sampel	Aktivitas Tripsin
1.	Biji kedelai (tanpa fermentasi)	1,13
2.	Tempe 0 jam fermentasi	1,35
3.	Tempe 24 jam fermentasi	2,33
4.	Tempe 48 jam fermentasi	2,73
5.	Tempe 72 jam fermentasi	2,13
6.	Tempe 96 jam fermentasi	1,17
7.	Tempe 120 jam fermentasi	0,78

B. Pembahasan

1. Proses Fermentasi Kedelai

Pada penelitian ini tempe kedelai dibuat melalui proses fermentasi biji kedelai menggunakan jamur *Rhizopus oligosporus*, melalui beberapa tahap perlakuan, yaitu: sortasi, pembersihan, perebusan, perendaman, penghilangan kulit, perebusan (pengkukusan), penirisan, pendinginan, dan inokulasi dengan jamur. Sortasi dilakukan untuk memilih biji kedelai yang berkualitas baik dan selanjutnya dilakukan perebusan dan perendaman yang bertujuan untuk memperlunak biji kedelai dan menghilangkan beberapa komponen antigizi yang tidak stabil pada pemanasan. Biji kedelai yang lunak akan mempermudah enzim protease yang dihasilkan oleh jamur dalam melakukan aktivitasnya. Proses penghilangan kulit biji kedelai dilakukan untuk memudahkan penetrasi *miselia* jamur ke dalam jaringan biji kedelai, karena *miselia* yang dihasilkan jamur sulit untuk menembus kulit biji kedelai.

Sebelum inokulasi, dilakukan pengukusan yang bertujuan untuk mematikan bakteri-bakteri kontaminan yang dapat mengganggu proses fermentasi. Penirisan setelah proses pengukusan dilakukan untuk mengurangi kandungan air dalam biji kedelai yang dapat menstimulasi pertumbuhan bakteri kontaminan dan menghambat pertumbuhan jamur. Dalam penelitian ini inokulasi dengan jamur dilakukan setelah biji kedelai dingin untuk menyesuaikan dengan kondisi optimum untuk pertumbuhan jamur *Rhizophits oligosporus*. Menurut Sudarmadji, S., (1982: 22), suhu optimum untuk *Rhizophus oligosporus* adalah 30 – 42°C.

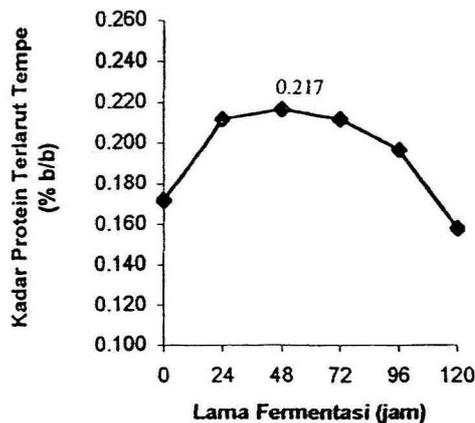
Pada 0-24 jam fermentasi kedelai (gambar 2a) telah terjadi pertumbuhan jamur yang terlihat dengan terbentuknya *miselia* pada permukaan biji kedelai. Pertumbuhan jamur mencapai optimal pada lama fermentasi 48 jam, dimana seluruh permukaan biji kedelai telah tertutup dengan *miselia* dan terlihat sebagai massa dengan tekstur lebih kompak (gambar 3a). Di samping itu juga terbentuk flavor spesifik tempe. Pada tempe hasil fermentasi 72 jam pertumbuhan jamur hampir tetap bahkan cenderung menurun (gambar 3b), dan pada tempe hasil fermentasi 96 jam mulai tampak terjadi perubahan warna tempe menjadi kecoklatan dan pada fermentasi 120 jam terjadi proses pembusukan tempe dan perubahan flavor yang disebabkan karena degradasi protein lanjut sehingga terbentuk amonia. Oleh karena itu dapat dikatakan bahwa proses fermentasi tempe kedelai yang optimal adalah pada lama fermentasi 48 jam. Hal ini sesuai penelitian yang telah dilakukan oleh Rahayu, K. dan Sudarmaji, S., (1989: 281), yaitu fermentasi selama 30 -

50 jam merupakan tahap optimal fermentasi tempe dan siap dipasarkan.

2. Kadar Protein Terlarut Tempe Kedelai

Penentuan kadar protein dilakukan menggunakan spektrometri J20D pada panjang gelombang 710 nm setelah 60 menit pembentukan kompleks berwarna biru dari tembaga-protein yang dihasilkan dari reduksi fosfomolibdat dan fosfotungstat yang terdapat dalam reagen Folin-Ciocalteu oleh tirosin dan triptofan dalam molekul protein. Panjang gelombang yang digunakan ini berbeda dengan yang dikemukakan oleh Colowick dan Kaplan (1957: 449), yang menyatakan bahwa kadar protein 5-25 ug/mL panjang gelombang maksimum yang digunakan sekitar 500 nm. Perbedaan ini disebabkan karena kondisi penelitian dan alat yang kemungkinan berbeda.

Profil kadar protein terlarut dalam tempe hasil fermentasi selama 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam dan 120 jam disajikan pada gambar 5.



Gambar 5. Profil Kadar Protein Terlarut Selama Proses Fermentasi

Dari grafik tersebut nampak bahwa lama fermentasi kedelai berpengaruh terhadap kadar protein terlarut dalam tempe. Semakin lama proses fermentasi, kadar protein terlarut dalam tempe semakin meningkat dan

mencapai maksimum pada lama fermentasi 48 jam, kemudian mengalami penurunan.

Mulai 0 jam fermentasi hingga 48 jam fermentasi terjadi kenaikan kadar protein terlarut dalam tempe. Peningkatan kadar protein terlarut tersebut disebabkan oleh adanya aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh jamur *Rhizopus oligosporus* selama pertumbuhannya. Menurut Wood (1985: 230), enzim ini memecah protein kompleks menjadi protein yang lebih sederhana dengan cara memutuskan ikatan-ikatan peptida dalam protein. Pemutusan tersebut menyebabkan protein bersifat mudah larut, sehingga kadar protein terlarutnya meningkat. Penurunan kadar protein setelah lama fermentasi 48 jam disebabkan oleh degradasi lebih lanjut dari protein membentuk amonia.

Bila dibandingkan dengan kadar protein terlarut dalam biji kedelai tanpa fermentasi, yaitu sebesar 0,167 % (b/b), maka kadar protein terlarut dalam tempe hasil fermentasi pada 0-96 jam masih lebih tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa melalui proses fermentasi dapat meningkatkan kadar protein terlarut, namun kadar protein terlarut tersebut akan menurun lebih rendah dari kadar protein biji kedelai tanpa fermentasi bila telah terjadi proses pembusukan menghasilkan amonia. Peningkatan kadar protein pada 0 jam fermentasi (0,172% b/b) disebabkan karena adanya penambahan biomassa jamur *Rhizopus Oligosporus* yang mengandung protein, karena pada 0 jam fermentasi belum terjadi proses degradasi oleh enzim proteolitik jamur.

3. Aktivitas Tripsin Terhadap Protein Terlarut dalam Tempe

Penentuan aktivitas tripsin dilakukan dengan metode Anson, yaitu dengan mengamati pembentukan senyawa kompleks berwarna dari reaksi antara hasil hidrolisis tripsin dengan reagen Folin-Ciocalteu. Warna biru yang terjadi disebabkan adanya reduksi fosfomolibdat dan fosfotungstat dari reagen Folin-Ciocalteu menjadi molibdenum biru dan tungsten biru oleh tirosin dan triptofan. Warna yang terbentuk kemudian diukur absorbansinya. Besarnya absorbansi sebanding dengan besarnya hasil hidrolisis tripsin terhadap protein terlarut dalam tempe. Reaksi antara substrat (S), dalam hal ini adalah protein tempe kedelai dan dengan enzim tripsin (E) membentuk kompleks enzim substrat (ES) dan akhirnya menghasilkan produk (P) dengan melepaskan enzim kembali dapat digambarkan sebagai berikut:



Protein + Tripsin \rightleftharpoons Kompleks Protein-Tripsin \rightarrow asam amino + tripsin

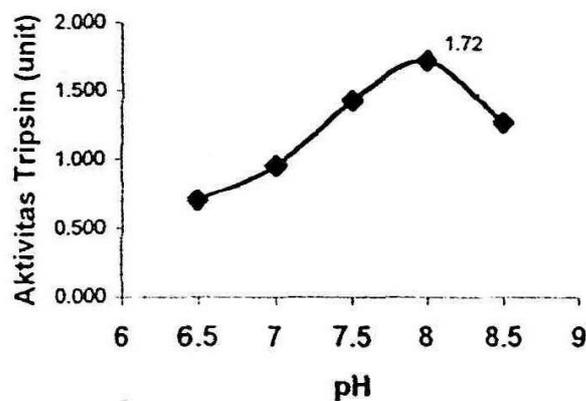
Tirosin & Triptofan + reagen Folin-Ciocalteu \rightarrow kompleks warna biru

Pada penelitian ini sebelum menentukan aktivitas tripsin, ditentukan terlebih waktu kestabilan dari kompleks warna, panjang gelombang maksimum, pH dan suhu optimum untuk aktivitas tripsin terhadap substrat (protein terlarut dalam tempe). Dari data diperoleh waktu kestabilan kompleks terjadi pada 8-30 menit dan panjang gelombang maksimum terjadi pada 650 nm.

Pengukuran kondisi pH dan suhu optimum dilakukan karena perubahan pH dan suhu akan berpengaruh terhadap konformasi enzim dan letak aksi katalitik. Disamping itu enzim juga merupakan protein yang

tersusun atas asam amino, sehingga pH berkaitan erat dengan sifat-sifat ion dan sifat asam basa dari protein tersebut.

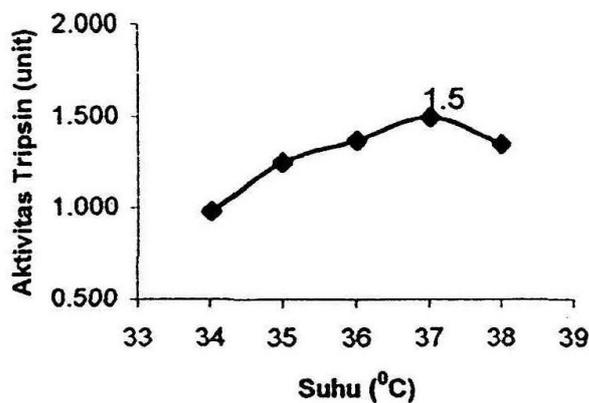
Penentuan pH optimum menunjukkan bahwa aktivitas tripsin tertinggi pada pH 8 (gambar 6). Hasil ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Bergmeyer (1974: 807), bahwa pH optimum untuk tripsin antara 7-9. Pada pH ini kecepatan reaksi paling tinggi karena struktur dan konformasi enzim dalam keadaan optimal untuk menghidrolisis substrat, sehingga kompleks enzim-substrat yang dihasilkan telah stabil. Pada pH yang lebih rendah atau lebih tinggi dari pH optimal, struktur dan konformasi enzim tidak optimal, sehingga kompleks enzim-substrat yang dihasilkan kurang stabil. Hal ini mengakibatkan kecepatan hidrolisis enzim berjalan lambat (aktivitas turun).



Gambar 6. Grafik Pengaruh pH terhadap Aktivitas Tripsin

Penentuan suhu optimum menunjukkan bahwa aktivitas tripsin tertinggi pada suhu 37°C (gambar 7). Pada suhu optimum, yaitu suhu dimana kecepatan reaksi enzim berlangsung maksimum, umumnya stabilitas enzim cukup tinggi. Hasil yang diperoleh ini tidak menyimpang dari teori yang dikemukakan oleh Poedjiati (1994: 162), bahwa tripsin dapat bekerja secara

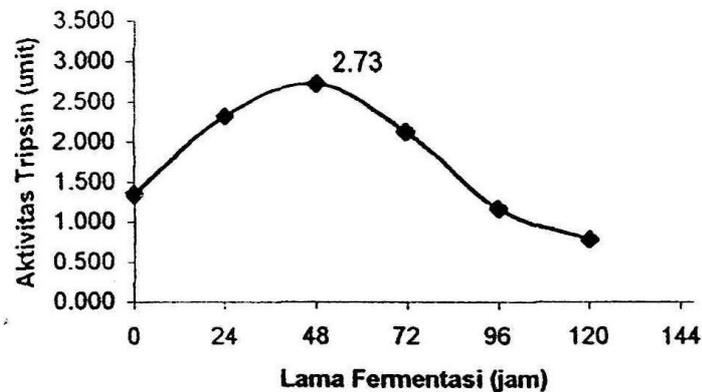
maksimal pada suhu tubuh normal manusia, antara 35°C – 37°C. Seperti halnya pengaruh pH, pada suhu diatas atau di bawah suhu optimal aktivitas tripsin lebih rendah. Hal ini disebabkan struktur dan konformasi enzim tidak optimal, sehingga kompleks enzim-substrat yang dihasilkan kurang stabil dan mengakibatkan kecepatan hidrolisis enzim berjalan lambat



Gambar 7. Grafik Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Tripsin

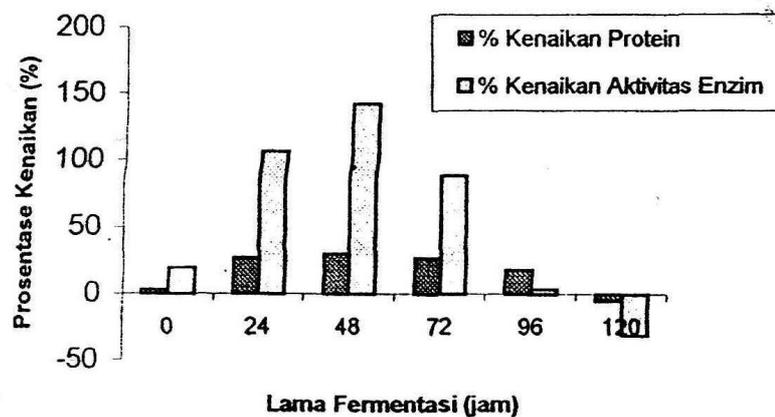
Profil aktivitas tripsin selama proses fermentasi yang diamati pada suhu dan pH optimal, yaitu pada pH 8 dan suhu 37°C disajikan pada gambar 8. Dari grafik tersebut menunjukkan bahwa aktivitas tripsin mengalami peningkatan dari fermentasi 0 jam sampai dengan 48 jam dan kemudian mengalami penurunan.

Peningkatan aktivitas tripsin dari 0-48 jam fermentasi disebabkan adanya peningkatan kadar protein terlarut dalam tempe kedelai sebagai substrat enzim. Peningkatan protein terlarut ini menyebabkan kompleks enzim-substrat yang terbentuk akan meningkat sehingga mengakibatkan aktivitas tripsin juga meningkat. Pada lama fermentasi 48- 120 jam terjadi penurunan aktivitas enzim, karena terjadi penurunan kadar protein terlarut sebagai substrat tripsin.



Gambar 8. Grafik Pengaruh Lama Fermentasi terhadap Aktivitas Tripsin

Bila dikaji lebih lanjut dengan melihat profil prosentase kenaikan protein dan aktivitas tripsin pada setiap lama fermentasi yang dibandingkan dengan kadar protein dan aktivitas tripsin pada biji kedelai (tanpa fermentasi) pada gambar 9 (perhitungan disajikan pada lampiran 9), maka selain faktor kenaikan kadar protein terlarut dalam tempe ada faktor lain yang mempengaruhi aktivitas tripsin.



Gambar 9. Profil Prosentase Kenaikan Aktivitas Tripsin dan Kadar Protein Pada Setiap Lama Fermentasi

Faktor lain yang diperkirakan mempengaruhi aktivitas tripsin adalah adanya senyawa yang dapat menghambat aktivitas tripsin. Senyawa tersebut mengalami perubahan selama proses fermentasi. Pada lama fermentasi antara

24 jam; dan 72 jam peningkatan kadar protein terlarut sama besarnya, namun terjadi perbedaan cukup besar pada aktivitas tripsin (gambar 9). Nampak bahwa aktivitas tripsin lebih rendah pada lama fermentasi 72 jam, dan selanjutnya menurun tajam hingga tahap fermentasi 120 jam. Pada lama fermentasi 96 jam juga nampak bahwa penurunan protein tidak seimbang dengan penurunan aktivitas tripsin. Sebaliknya pada 48 jam fermentasi peningkatan protein tidak seimbang dengan peningkatan aktivitas tripsin. Hal ini menunjukkan bahwa selama proses fermentasi tempe berlangsung, terjadi perubahan komponen lain yang mempengaruhi aktivitas tripsin, dan diperkirakan komponen tersebut adalah antitripsin.

Hal ini didukung oleh hasil penelitian yang dilakukan oleh Rachmat, N. (1990) yang menunjukkan bahwa di dalam kedelai mengandung senyawa antitripsin dengan prosentase inhibisi sebesar 19,48%. Melalui proses fermentasi menyebabkan berkurangnya sebagian besar senyawa antitripsin yang ditandai dengan berkurangnya prosentase inhibisi menjadi 8,46%, sedangkan antitripsin dalam “tempe bosok” meningkat dengan prosentase inhibisi menjadi 22,66%.

Dari grafik gambar 9, dapat diperkirakan bahwa senyawa antitripsin mengalami penurunan selama fermentasi 48 jam dan mengalami peningkatan pada lama fermentasi 72 jam hingga 120 jam. Pada fermentasi selama 48 jam diperkirakan terjadi perubahan konformasi ikatan-ikatan peptida dalam senyawa antitripsin menjadi bentuk inaktif, tetapi pada fermentasi lebih lanjut, yaitu 72 hingga 120 jam diperkirakan terjadi perubahan konformasi ikatan-

ikatan peptida dalam senyawa antitripsin menjadi bentuk aktif. Senyawa antitripsin ini selanjutnya dapat bergabung dengan tripsin membentuk kompleks tripsin-antitripsin yang terikat erat, sehingga tripsin terhalang fungsinya.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Kadar protein terlarut dalam tempe kedelai pada lama fermentasi 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam dan 120 jam berturut-turut sebesar 0,172% (b/b); 0,212% (b/b); 0,217% (b/b); 0,212% (b/b); 0,197% (b/b) dan 0,158 % (b/b).
2. Aktivitas tripsin terhadap protein terlarut dalam tempe kedelai hasil fermentasi 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam dan 120 jam berturut-turut sebesar 1,35; 2,33; 2,73; 2,13; 1,17 dan 0,78 unit.
3. Pengaruh lama fermentasi terhadap kadar protein terlarut tempe kedelai adalah dengan bertambahnya lamanya fermentasi kadar protein terlarut meningkat dan mencapai maksimum pada fermentasi 48 jam, kemudian menurun.
4. Pengaruh lama fermentasi terhadap aktivitas tripsin terhadap protein terlarut tempe kedelai adalah dengan bertambahnya lamanya fermentasi, maka aktivitas tripsin pada protein tempe kedelai meningkat dan mencapai maksimum pada 48 jam, kemudian menurun.

B. Saran

Perlu dilakukan suatu penelitian untuk mengetahui profil senyawa antitripsin selama proses fermentasi tempe kedelai.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. (1989). *Daftar Komposisi Bahan Makanan*. Jakarta: Bharata.
- Bergmeyer, H.U- (1974). *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol 2. New York: Academic Press Inc.
- Colowick, S.P. dan Kaplan, N.O. (1957). *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press Inc.
- Hafez, Y.S. dan Mohamed, A.I. (1983). Biochemical Study on the Nonprotein Trypsin and Chymotrypsin Inhibitors in the Soybean. *Journal of Food Science*. Volume 48. Number 4. A Publication of the Institute of Food Technologists.
- Imam Supardi dan Sukamto. (1999). *Mikrobiologi dalam Pengolahan dan Keamanan Pangan*. Edisi Pertama. Bandung: Penerbit Alumni
- Kasmidjo, Rb. (1990). *Tempe: Mikrobiologi dan Biokimia Pengolahan Serta Pemanfaatannya*. Yogyakarta: PAU Pangan dan Gizi UGM.
- Noor, Z. (1989). *Biokimia Nutrisi Bagian Pertama*. Yogyakarta: PAU Pangan dan Gizi UGM.
- Nur Rachmat. (1990). *Pengaruh Ekstrak Kedelai, Tempe dan Tempe "Bosok" Terhadap Tripsin*. Skripsi. Yogyakarta: Fakultas Farmasi UGM.
- Poedjiadi, A.(1994). *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: UI-Press.
- Rachman, A. (1989). *Pengantar Teknologi Fermentasi*. Bogor ; PAU Pangan dan Gizi.
- Rahayu, K. dan Sudarmaji, S., (1989). *Mikrobiologi Pangan*. Yogyakarta: PAU Pangan dan Gizi UGM.
- Reed, G. (1975). *Enzymes in Food Processing*. Second Edition. Wisconsin: Universal Foods Corporation.
- Rick, W. (1965). *Trypsin, Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer, H.U. Second Printing Revised. New York-London: Verlag Chemie Weinheim/Bergstr Academic Press.
- Sutrisno Koswara. (1995). *Teknologi Pengolahan Kedelai Menjadikan Makanan Bermutu*. Jakarta: Pustaka Sinar Harapan.
- Suliantari dan Rahayu, W.P. (1990). *Teknologi Fermentasi Umbi-umbian dan Biji-bijian*. Bogor: PAU Pangan dan Gizi IPB.

- Sudarmadji, S., (1989). *Mikrobiologi Pangan*. Yogyakarta: PAU Pangan dan Gizi UGM.
- Stanburry, P.P. dan Whitaker, A., (1984). *Principles of Fermentation Technology*, Pergamon, U.K.
- Walsh, K.A. dan Wilcox, P.E. (1965). *Serine Protease, Methods in Enzimologi*. Volume XIX. Permann,. G.E. Laszlorand. New York-London: Academic Press Inc.
- Wirahadikusumah, M.(1989). *Biokimia Protein, Enzim dan Asam Nukleat*, Bandung: ITS.
- Winarno, F.G.(1983). *Enzim Pangan*. Jakarta: Gramedia.
- Wood, B.J.B. (1985). *Microbiology of Fermented Foods*. Vol 2. New York: Elsevier Applied Science Publishers.

LAMPIRAN 1

PEMBUATAN LARUTAN PEREAKSI

A. Pereaksi Lowry

1. Pereaksi A

Berisi Na_2CO_3 2% (b/v) dalam NaOH 0,1 N. Dibuat dengan cara melarutkan 2 g Na_2CO_3 ke dalam NaOH 0,1 N hingga volumenya 100 mL.

2. Pereaksi B

Berisi $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% (b/v) dan $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 2% (b/v).

3. Pereaksi C

Tiap 100 mL terdiri dari 1 mL larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% (b/v), 1 mL larutan $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 2% (b/v) dan 98 mL larutan Na_2CO_3 2% (b/v) dalam NaOH 0,1 N. Pereaksi ini selalu dibuat baru setiap kali akan digunakan.

B. Buffer Fosfat

1. Buffer A

Dibuat dengan melarutkan 15,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dalam akuades dan diencerkan hingga volumenya 500 mL.

2. Buffer B

Dibuat dengan melarutkan 17,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dalam akuades dan diencerkan hingga volumenya 500 mL.

Pembuatan buffer fosfat pH 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 dan 8,5 dilakukan dengan menambahkan buffer A dan buffer B hingga pH yang diinginkan dan diencerkan hingga 200 mL. Pengukuran pH dilakukan dengan pH-meter.

C. Larutan Kasein 1 mg/mL

Dibuat dengan melarutkan 0,1 g kasein ke dalam buffer fosfat pH 8 dan diencerkan hingga volumenya 100 mL.

D. Larutan Enzim Tripsin 8 mg/20 mL

Dibuat dengan melarutkan 8 mg enzim tripsin ke dalam 20 mL buffer fosfat.

LAMPIRAN 2

DATA PENENTUAN WAKTU KESTABILAN KOMPLEK WARNA UNTUK PENENTUAN KADAR PROTEIN

Waktu (menit)	Absorbansi pada $\lambda_{710 \text{ nm}}$	Waktu (menit)	Absorbansi pada $\lambda_{710 \text{ nm}}$
5	0,358	65	0,256
10	0,348	70	0,254
15	0,334	75	0,256
20	0,327	80	0,255
25	0,317	85	0,256
30	0,305	90	0,254
35	0,300	95	0,235
40	0,291	100	0,205
45	0,275	105	0,185
50	0,274	110	0,175
55	0,265	115	0,170
60	0,256	120	0,160

LAMPIRAN 3

DATA PENENTUAN PANJANG GELOMBANG MAKSIMUM UNTUK PENENTUAN KADAR PROTEIN

Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi
650	0,373
650	0,382
670	0,393
680	0,400
690	0,408
700	0,414
710	0,422
720	0,406
730	0,385
740	0,371
750	0,352

LAMPIRAN 4

PERHITUNGAN PERSAMAAN GAMS DARI KURVA STANDAR KASEIN DAN PERHITUNGAN KADAR PROTEIN TERLARUT

A. Penentuan Persamaan Garis Regresi Linear $Y = ax + b$

Data penentuan persamaan garis regresi linear dari kurva standar kasein adalah sebagai berikut:

No	X Konsentrasi Kasein (mg/mL)	Y Absorbansi pada $\lambda_{710 \text{ nm}}$	X^2	Y^2	XY
1	0,01	0,111	0,0001	0,012321	0,00111
2	0,02	0,180	0,0004	0,032400	0,00360
3	0,03	0,240	0,0009	0,057600	0,00720
4	0,04	0,292	0,0016	0,085264	0,01168
5	0,05	0,364	0,0025	0,132496	0,01820
6	0,06	0,420	0,0036	0,176400	0,02520
7	0,07	0,466	0,0049	0,217156	0,03262
8	0,08	0,526	0,0064	0,276676	0,04208
9	0,09	0,598	0,0081	0,357604	0,05382
10	0,10	0,662	0,0100	0,438244	0,06620
Σ	0,55	3,859	0,0385	1,786161	0,26171

$$a = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2} = \frac{10(0,26171) - (0,55)(3,859)}{10(0,0385) - (0,55)^2} =$$

5,9958

$$b = \frac{(\sum Y)(\sum X^2) - (\sum X)(\sum XY)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2} =$$

$$\frac{(3,859)(0,0385) - (0,55)(0,26171)}{10(0,0385) - (0,55)^2}$$

= 5,9958

dengan demikian persamaan garis regresi linear dari kurva standar kasein $Y = 5,9958 X + 0,0561$.

Signifikansi korelasi kurva standar (r) dihitung dengan rumus:

$$r = \frac{n(\sum XY) - \{(\sum X)(\sum Y)\}}{\{n(\sum X^2) - (\sum X)^2\} \{n\sum Y^2 - (\sum Y)^2\}}$$

$$r = \frac{10(0,26171) - \{(0,55)(3,859)\}}{\{10(0,0385) - (0,55)^2\} \{10(1,786161) - (3,859)^2\}} = 0,9993$$

Harga r tersebut bila dikonsultasikan dengan harga r Tabel pada taraf signifikansi 5% dengan jumlah data (n) = 10, yaitu sebesar 0,632, maka dapat disimpulkan bahwa ada korelasi antara konsentrasi larutan standar kasein (x) dan absorbansi (y) yang bermakna, karena $r > r$ Tabel.

Uji linieritas persamaan garis regresi linear larutan standar protein dilakukan dengan cara menghitung F regresinya menggunakan rumus:

$$F_{reg} = \frac{RJK_{reg}}{RJK_{res}}, \text{ dimana } RJK_{reg} = \frac{JK_{reg}}{db_{reg}} \text{ dan } RJK_{res} = \frac{JK_{res}}{db_{res}}$$

$$JK_{reg} = \frac{(\sum xy)^2}{\sum x^2}, \text{ dan } db_{reg} = 1$$

$$\text{dimana : } \sum xy = \frac{\sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{N} = \frac{0,26171 - \{(0,55)(3,859)\}}{10} = 0,049465$$

$$\sum x^2 = \frac{\sum X^2 - (\sum X)^2}{N} = \frac{0,0385 - (0,55)^2}{10} = 0,00825$$

$$JK_{reg} = \frac{(0,049465)^2}{0,00825} = 0,296580148$$

$$JK_{res} = \frac{\sum y^2 - (\sum xy)^2}{\sum x^2}, \text{ dan } db_{res} = 10 - 2 = 8$$

$$\text{dimana : } \sum y^2 = \frac{\sum Y^2 - (\sum Y)^2}{N} = \frac{1,786161 - (3,859)^2}{10} = 0,2969729$$

$$JK_{res} = \frac{0,2969729 - (0,049465)^2}{0,00825} = 3,92752 \cdot 10^{-4}$$

$$RJK_{reg} = \frac{JK_{reg}}{db_{reg}} = \frac{0,296580148}{1} = 0,296580148$$

$$RJK_{res} = \frac{JK_{res}}{db_{res}} = \frac{3,92752 \cdot 10^{-4}}{8} = 4,9094 \cdot 10^{-5}$$

$$F_{reg} = \frac{RJK_{reg}}{RJK_{res}} = \frac{0,296580148}{4,9094 \cdot 10^{-5}} = 6041,0671$$

Harga F regresi bila dikonsultasikan dengan harga F tabel pada taraf signifikansi 5% dengan db pembilang = 1 dan db penyebut = 8, diperoleh F Tabel sebesar 5,32, sehingga F regresi > F Tabel, sehingga persamaan garis

regresi larutan standar kasein adalah linear.

B. Perhitungan Kadar Protein Terlarut

Dari persamaan garis kurva standar kasein $Y = 5,9958 X + 0,0561$, dapat dihitung konsentrasi protein terlarut dari masing-masing sampel, misalnya untuk sampel biji kedelai (tanpa fermentasi) diperoleh absorbansi (y) = 0,252 ; maka konsentrasi protein terlarutnya (x) dalam mg/mL adalah:

$$0,252 = 5,9958 X + 0,0561, \text{ maka } X = 0,033 \text{ mg/mL}$$

Kadar protein dihitung dengan rumus (%b/b) : $\frac{\text{Berat protein terlarut} \times 100\%}{\text{Berat sampel}}$

Berat sampel biji kedelai maupun tempe hasil fermentasi masing-masing adalah 1 g dalam 50 mL buffer fosfat pH 8, sehingga dalam 50 mL terdapat: $50 \text{ mL} \times 0,033 \text{ mg/mL} = 1,65 \text{ mg} = 1,65 \times 10^{-3} \text{ g}$ berat protein terlarut.

Kadar protein terlarut dalam sampel adalah:

$$\frac{1,65 \times 10^{-3} \text{ g}}{1 \text{ g}} \times 100\% = 0,165 \text{ (b/b)}$$

Dengan cara yang sama diperoleh kadar protein dalam sampel yang lain sebagai berikut:

Sampel	Absorbansi ($\lambda_{710 \text{ nm}}$)	Konsentrasi (mg/mL)	Kadar Protein Terlarut (%b/b)	Rata-rata Kadar Protein Terlarut (%b/b)
Biji Kedelai (tanpa fermentasi)	0,252	0,033	0,165	0,167
	0,255	0,033	0,165	
	0,259	0,034	0,170	
Tempe 0 jam fermentasi	0,260	0,034	0,170	0,172
	0,261	0,034	0,170	
	0,264	0,035	0,175	
Tempe 24 jam fermentasi	0,308	0,042	0,210	0,212
	0,311	0,043	0,215	
	0,305	0,042	0,210	
Tempe 48 jam fermentasi	0,318	0,044	0,220	0,217
	0,316	0,043	0,215	
	0,315	0,043	0,215	
Tempe 72 jam fermentasi	0,306	0,042	0,225	0,212
	0,300	0,041	0,205	
	0,299	0,041	0,205	

Tempe 96 jam fermentasi	0,289	0,039	0,195	0,197
	0,294	0,040	0,200	
	0,288	0,039	0,195	
Tempe 120 jam fermentasi	0,248	0,032	0,160	0,158
	0,244	0,031	0,160	
	0,251	0,031	0,155	

LAMPIRAN 5

DATA PENENTUAN WAKTU KESTABILAN KOMPLEK WARNA DAN PENENTUAN PANJANG GELOMBANG MAKSIMUM UNTUK PENENTUAN AKTIWTAS TRIPSEN

Data Penentuan Waktu Kestabilan untuk Penentuan Aktivitas Enzim

Waktu (menit)	Absorbansi ($\lambda_{710 \text{ nm}}$)	Waktu (menit)	Absorbansi ($\lambda_{710 \text{ nm}}$)
2	0,328	22	0314
4	0,325	24	0315
6	0,323	26	0315
8	0316	28	0313
10	0315	30	0313
12	0314	32	0,308
14	0315	34	0,307
16	0315	36	0,307
18	0313	38	0,307
20	0315	40	0,306

Data Penentuan Panjang Gelombang Maksimum untuk Penentuan Aktivitas Enzim

λ (nm)	Absorbansi
600	0,196
610	0,198
620	0,210
630	0,230
640	0,290
650	0310
660	0,280
670	0,250
680	0,230
690	0,200

LAMPIRAN 6

DATA PENGAMATAN DAN PERHITUNGAN pH OPTIMUM UNTUK PENENTUAN AKTIVITAS TRIPSIN

Rumus yang digunakan:

$$A = \frac{At - Ao}{0,001 \times t}$$

A = aktivitas enzim tripsin

At = absorbansi pada waktu t menit

Ao = absorbansi pada waktu 0 menit

t = waktu inkubasi (menit), dalam penelitian ini digunakan

t = 20 menit.

Misal pada pH 6,5 maka $A = \frac{0,220 - 0,204}{0,001 \times 20} = 0,80$

dengan cara yang sama diperoleh harga aktivitas enzim pada berbagai pH sebagai berikut:

pH	A _o (λ _{650 nm})	A _t (λ _{650 nm})	Aktivitas Enzim (unit)	Rata-rata Aktivitas Enzim (unit)
6,5	0,204	0,220	0,80	0,70
		0,219	0,75	
		0,215	0,55	
7,0	0,209	0,228	0,95	0,95
		0,227	0,90	
		0,229	1,00	
7,5	0,218	0,247	1,45	1,43
		0,245	1,35	
		0,248	1,50	
8,0	0,226	0,259	1,65	1,72
		0,260	1,70	
		0,262	1,80	
8,5	0,212	0,238	1,30	1,27
		0,236	1,20	
		0,238	1,30	

LAMPIRAN 7

DATA PENGAMATAN DAN PERHITUNGAN SUHU OPTIMUM UNTUK PENENTUAN AKTIVITAS TRIPSIN

Rumus dan perhitungan yang digunakan sama dengan cara perhitungan pada lampiran 6, sehingga diperoleh harga aktivitas enzim pada berbagai suhu sebagai berikut:

pH	A₀ (λ₆₅₀ nm)	A_t (λ₆₅₀ nm)	Aktivitas Enzim (unit)	Rata-rata Aktivitas Enzim (unit)
34	0,216	0,236	1,00	0,98
		0,234	0,90	
		0,237	1,05	
35	0,217	0,243	1,30	1,25
		0,241	1,20	
		0,242	1,25	
36	0,220	0,245	1,25	1,37
		0,247	1,35	
		0,250	1,50	
37	0,229	0,258	1,45	1,50
		0,260	1,55	
		0,259	1,50	
38	0,223	0,250	1,35	1,35
		0,252	1,45	
		0,248	1,25	

LAMPIRAN 8

DATA PENGAMATAN DAN PERHITUNGAN AKTIVITAS TRIPSIN PADA TEMPE KEDELAI

Rumus dan perhitungan yang digunakan sama dengan cara perhitungan pada lampiran 6, sehingga diperoleh harga aktivitas enzim pada berbagai berbagai sampel sebagai berikut:

Sampel	Absorbansi ($\lambda_{710 \text{ nm}}$)	Konsentrasi (mg/mL)	Kadar Protein Terlarut (%b/b)	Rata-rata Kadar Protein Terlarut (%b/b)
Biji Kedelai (tanpa fermentasi)	0,217 0,211 0,206	0,237 0,233 0,232	1,00 1,10 1,30	1,13
Tempe Kedelai 0 jam fermentasi	0,220 0,217 0,221	0,249 0,244 0,246	1,45 1,35 1,25	1,35
Tempe Kedelai 24 jam fermentasi	0,226 0,228 0,230	0,272 0,273 0,279	2,30 2,25 2,45	2,33
Tempe Kedelai 48 jam fermentasi	0,344 0,348 0,352	0,398 0,404 0,406	2,70 2,80 2,70	2,73
Tempe Kedelai 72 jam fermentasi	0,342 0,341 0,340	0,386 0,382 0,383	2,20 2,05 2,15	2,13
Tempe Kedelai 96 jam fermentasi	0,253 0,261 0,257	0,276 0,282 0,283	1,15 1,05 1,30	1,17
Tempe Kedelai 120 jam fermentasi	0,191 0,186 0,185	0,207 0,200 0,202	0,80 0,70 0,85	0,78

LAMPIRAN 9

PERHITUNGAN PROSENTASE KENAIKAN PROTEIN DAN AKTIVITAS TRIPSIN PADA SETIAP LAMA FERMENTASI

Perhitungan prosentase kenaikan protein pada setiap tahap fermentasi dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ kenaikan protein} = \frac{\text{jumlah protein pada x jam} - \text{sebelum fermentasi}}{\text{jumlah protein sebelum fermentasi}} \times 100\%$$

Misalkan:

- kenaikan protein selama 0 jam fermentasi adalah:

$$\frac{1,72 - 1,67}{1,67} \times 100\% = 2,99 \%$$

- Kenaikan protein selama 24 jam fermentasi adalah:

$$\frac{2,12 - 1,67}{1,67} \times 100\% = 26,95 \%$$

Untuk prosentase kenaikan enzim dihitung dengan cara sama, yaitu:

$$\% \text{ kenaikan aktivitas enzim} = \frac{\text{aktivitas enzim pada x jam} - \text{sebelum fermentasi}}{\text{aktivitas enzim sebelum fermentasi}} \times 100\%$$

Sehingga diperoleh data sebagai berikut:

Sampel	Rata-rata Jumlah Protein Terlarut (mg)	Rata-rata Aktivitas Enzim (unit)	Peningkatan Kadar Protein pada setiap lama fermentasi (%)	Peningkatan Aktivitas Enzim pada setiap lama fermentasi (%)
Biji Kedelai (tanpa fermentasi)	1,67	1,13	-	-
Tempe 0 jam fermentasi	1,72	1,35	2,99	19,47
Tempe 24 jam fermentasi	2,12	2,33	26,95	106,19
Tempe 48 jam fermentasi	2,17	2,73	26,94	141,59
Tempe 72 jam fermentasi	2,12	2,13	26,95	88,50
Tempe 96 jam fermentasi	1,97	1,17	17,96	3,54
Tempe 120 jam fermentasi	1,58	0,78	(-5,39)	(-30,97)

