

Biofarmasi

Journal of Natural Products Biochemistry

**VOLUME 12
NOMOR 2
AGUSTUS 2014
ISSN: 1693-2242**

PENERBIT:

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta

ALAMAT PENERBIT/REDAKSI:

Laboratorium Pusat MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta

Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126

Tel. & Fax. +62-271-663375

E-mail: unsjournals@yahoo.com

Online: <http://biosains.mipa.uns.ac.id/C/index.htm>

TERBIT PERTAMA TAHUN:

2003

ISSN:

1693-2242

PEMIMPIN REDAKSI/PENANGGUNGJAWAB:

S u t a r n o

SEKRETARIS REDAKSI:

Ahmad Dwi Setyawan

PENYUNTING PELAKSANA:

Djoko Santoso

Ratna Setyaningsih

Solichatun

Suratman

Tetri Widiyani

PENYUNTING AHLI:

Prof. Dr. Dayar Arbain – Universitas Andalas Padang

Prof. Dr. dr. Santosa, M.S. – Universitas Sebelas Maret Surakarta

Prof. Dr. Syamsul Arifin Achmad – Institut Teknologi Bandung

Prof. Drs. Suranto, M.Sc., Ph.D. – Universitas Sebelas Maret Surakarta

Dr. Chaerul, Apt. – Pusat Penelitian Biologi LIPI Bogor

Dr. C.J. Sugiharjo, Apt. – Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

Dr. Ir. Supriyadi, M.Sc. – Balai Penelitian Tanaman Obat dan Rempah Bogor

Biofarmasi, Journal of Natural Products Biochemistry

mempublikasikan tulisan ilmiah, baik hasil penelitian asli maupun telaah pustaka (*review*) dalam lingkup ilmu-ilmu farmasi dan biologi, dengan tema khusus biokimia bahan alam (*natural product biochemistry*). Setiap naskah yang dikirimkan akan ditelaah oleh redaktur pelaksana, redaktur ahli, dan redaktur tamu yang diundang secara khusus sesuai bidangnya. Dalam rangka menyongsong pasar bebas, penulis sangat dianjurkan menuliskan karyanya dalam Bahasa Inggris, meskipun tulisan dalam Bahasa Indonesia yang baik dan benar tetap sangat dihargai. Hingga nomor ini, jurnal dikirimkan kepada institusi-institusi yang meminta tanpa biaya pengganti, sebagai bentuk pertukaran pustaka demi mendorong penelitian, pengembangan, dan pemanfaatan bahan alam. Jurnal ini terbit dua kali setahun, setiap bulan Pebruari dan Agustus.

VOLUME 12

NOMOR 2

AGUSTUS 2014

ISSN: 1693-2242

Penghambatan produksi enzim eksoprotease pada sistem *quorum sensing* *Aeromonas hydrophila* dengan pemberian ekstrak metanol rimpang segar dan rimpang kering lengkuas (*Alpinia galanga*)

Inhibition of exoprotease enzyme production in *Aeromonas hydrophila* quorum sensing system due to methanol extract of fresh and dried galangal rhizome (*Alpinia galanga*)

YASHINTA NOVITASARI, ARTINI PANGASTUTI, RITA RAKHMAWATI

Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Sebelas Maret, Jl. Ir. Sutami 36a Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 27 September 2013. Revisi disetujui: 4 Maret 2014.

Abstract. Novitasari Y, A Pangastuti, R Rakhmawati. 2012. Inhibition of exoprotease enzyme production in *Aeromonas hydrophila* quorum sensing system due to methanol extract of fresh and dried galangal rhizome (*Alpinia galanga*). *Biofarmasi* 14: 51-61. Motile *Aeromonas* septicemia disease is one of the factors causing the failure of fish farming. The disease is caused by *Aeromonas hydrophila*. One of the virulence factors of *A. hydrophila* is an exoprotease. Exoprotease enzyme molecules are controlled by N-butanoyl-L-homoserine lactone (C4-HSL), which is a signal molecule in quorum sensing system. One of the natural resources that have the potential to inhibit the experiment of exoprotease enzyme is Galanga rhizomes (*Alpinia galanga* L.). The rhizomes contain the active compound groups including flavonoids, phenols, and terpenoids. The purposes of this research were to determine the inhibition of *A. hydrophila* exoprotease enzyme production by methanol extracts of fresh and dried rhizomes and the optimal concentration to inhibit the production of exoprotease enzyme. Exoprotease enzyme activity was measured qualitatively by the diameter of clear zone on LB supplemented by skim milk and quantitatively by spectrophotometric method. The methanol extracts of fresh and dried rhizomes were added to *A. hydrophila* culture. The growth, exoprotease activities protein concentration were measured every 2 hours for 10 hours. The test results were analyzed by univariate analysis with significance level of 0.05. The results showed that methanol extract of fresh rhizome was more effective in reducing the activity of *A. hydrophila* exoprotease. 8% methanol extract of fresh rhizome significantly reduced the activity of *A. hydrophila* exoprotease without inhibiting the growth.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, *Alpinia galanga*, exoprotease enzymes, quorum sensing

PENDAHULUAN

Sektor perikanan mempunyai peranan penting dibidang penyediaan protein hewani bagi masyarakat Indonesia. Usaha budidaya ikan tidak terlepas dari berbagai hambatan dan risiko biologis yang ditimbulkan oleh organisme penyakit (Mariyono dan Agus 2002). Secara ekonomi, masalah ini sangat penting karena dapat merugikan usaha yang disebabkan oleh penyakit ikan dan menimbulkan kematian total, penurunan produksi dan penurunan kualitas ikan (Maulina et al. 2006).

Bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri penyebab penyakit ikan *Motil Aeromonas Septicemia* (MAS) (Tan et al. 1998). Faktor virulensi ekstraseluler yang disekresikan oleh bakteri *A. hydrophila* adalah enzim eksoprotease. Enzim ini bersifat proteolitik karena mampu menghidrolisis protein sehingga berpotensi sebagai patogen (Thomas et al. 1987).

Ekspresi enzim eksoprotease dikontrol oleh suatu molekul senyawa *N-butanoyl-L-homoserine lactone* (C4-HSL) yang berfungsi sebagai autoinduser pada sistem *quorum sensing* (alat komunikasi interseluler pada bakteri) (Aini dan Setyawan 2006). *Quorum sensing* merupakan mekanisme regulasi biosintesis metabolisme yang

dipengaruhi oleh kepadatan populasi bakteri. Senyawa sinyal akan terakumulasi dengan meningkatnya kepadatan populasi bakteri tersebut.

Semakin banyak populasi bakteri, semakin tinggi konsentrasi C4-HSL di lingkungan sehingga mampu mengaktifkan gen penyandi enzim eksoprotease.

Bakteri *A. hydrophila* menggunakan *quorum sensing* sebagai pengontrol virulensinya terhadap organisme lain sehingga *quorum sensing* merupakan target untuk agen kemoterapeutik (Rasch et al. 2004). Menurut Kievit dan Iglewski (2000), *A. hydrophila* yang virulen dapat dijadikan nonvirulen dengan menghambat sistem *quorum sensing*nya. Mekanisme ini dapat dijadikan sebagai cara pencegahan infeksi kronis yang merusak tanpa menggunakan agen yang menghambat pertumbuhan seperti antibiotik. Penggunaan antibiotik ternyata dapat menimbulkan efek samping bagi patogen itu sendiri maupun terhadap ikan yang dipelihara. Pemberian antibiotik yang tidak tepat dapat menyebabkan organisme patogen menjadi resisten, sehingga penggunaan antibiotik menjadi tidak efektif (Lewis 2001).

Beberapa tumbuhan telah diketahui dapat menghambat sistem *quorum sensing*, misalnya ekstrak etil asetat dan etanol rimpang temu lawak (*Curcuma xanthorrhiza*)

dengan konsentrasi 4% dapat menghambat aktivitas molekul sinyal *N-butanoyl-L-homoserine lactone* (C4-HSL) secara optimal pada *A. hydrophila* tanpa mengganggu pertumbuhannya (Lestari 2006), dan ekstrak toluen umbi bawang putih (*Allium sativum*) mempunyai senyawa aktif yang mampu menghambat sistem *quorum sensing* pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (Persson et al. 2005). Selain itu ekstrak metanol rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.) dapat menghambat pembentukan biofilm dengan sistem *quorum sensing* pada *Vibrio* (Magdalena 2007). Namun penelitian mengenai penghambatan enzim eksoprotease dengan sistem *quorum sensing* pada *A. hydrophila* akibat pemberian rimpang lengkuas belum pernah dilaporkan.

Rimpang lengkuas mengandung golongan senyawa flavonoid, fenol dan terpenoid (Oka dan Fanny 2008). Pengambilan senyawa aktif dalam rimpang lengkuas dilakukan dengan ekstraksi menggunakan pelarut metanol. Metanol merupakan senyawa yang bersifat polar (polaritas 0,73) sehingga mampu melarutkan senyawa-senyawa polar yang terkandung dalam rimpang lengkuas. Penentuan pelarut ini didasarkan pada tingkat polaritas dan pertimbangan bahwa pelarut tersebut sering digunakan dalam mengekstrak komponen makanan. Senyawa aktif yang terkandung dalam suatu tanaman tersebut dapat terdegradasi jika metode pengolahannya tidak diperhatikan. Salah satu tahap pengolahan yang berpotensi menyebabkan kerusakan senyawa aktif dalam pembuatan simplisia adalah tahap pengeringan. Hal ini dipengaruhi oleh adanya suhu, oksigen, pH, dan cahaya (Octyaningrum 2009). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengukur aktivitas enzim eksoprotease setelah pemberian ekstrak metanol baik rimpang lengkuas segar maupun rimpang lengkuas yang dikeringkan terhadap *A. hydrophila*.

Tujuan Penelitian: Mengetahui adanya penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak metanol rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.) segar dan kering. Mengetahui jenis ekstrak yang lebih optimal antara ekstrak metanol lengkuas (*Alpinia galanga* L.) segar dan kering untuk menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*. Mengetahui konsentrasi ekstrak metanol terpilih yang optimal dalam menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dari variasi konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10%.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Oktober 2009 sampai bulan April 2010 di Sub Laboratorium Biologi, Laboratorium Pusat MIPA Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: Alat untuk ekstraksi: pisau (*cutter*), toples kaca, timbangan elektrik, *rotary evaporator*, erlenmeyer, *beaker glass*, corong pisah, *water bath*, aluminium foil, dan kertas saring.

Alat untuk pemeliharaan kultur: tabung reaksi, neraca analitik, jarum ose, *beaker glass*, erlenmeyer, cawan petri, *bunsen buchner*, freezer, *laminar air flow*, *hot plate*. Alat untuk pengujian kualitatif aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila*: mikropipet dan tip, pelubang gabus, gelas ukur, cawan petri, *syringe filter*, *laminar air flow*, *bunsen buchner*, *vortek*, *hot plate*. Alat untuk pengukuran pertumbuhan dan pengukuran aktivitas enzim eksoprotease: spektrofotometer, kuvet, *syringe filter*, *shaker*, *laminar air flow*, mikropipet dan tip, tabung reaksi, erlenmeyer, gelas ukur, sentrifus, inkubator shaker, dan *hot plate*. Alat sterilisasi: *autoclave*

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: Bahan utama: Rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.) yang berumur satu tahun diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional. Kultur bakteri yang digunakan: Kultur *A. hydrophila* (*wild type*) diisolasi dari ikan gurame yang sakit dan diperoleh dari Jurusan Perikanan Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. Bahan untuk uji aktivitas enzim: Medium Luria-Bertani broth (LB Broth), Luria-Bertani agar (LB), aquades, kasein, susu skim, *Trichloro Acetic Acid* (TCA), dan buffer fosfat pH 8. Bahan untuk uji protein: pereaksi bradford, BSA (Bovine Serum Albumin). Pelarut ekstrak: metanol, *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO).

Cara kerja

Ekstrak metanol rimpang lengkuas kering

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Rimpang lengkuas yang segar dibersihkan dan dipotong kecil-kecil kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 45oC selama dua hari. Setelah ini direndam dengan pelarut metanol selama tiga hari sampai diperoleh filtrat metanol. Filtrat ini diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* dengan suhu 50oC sampai diperoleh ekstrak kental metanol. Ekstrak kental metanol diuapkan lagi menggunakan *water bath* (Ye dan Li 2006).

Ekstrak metanol rimpang lengkuas segar

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut metanol. Rimpang lengkuas yang segar dibersihkan dan dipotong kecil-kecil. Setelah itu direndam dengan pelarut metanol selama tiga hari sampai diperoleh filtrat metanol. Filtrat metanol ini diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* dengan suhu 50oC sampai diperoleh ekstrak kental metanol. Ekstrak kental metanol diuapkan lagi menggunakan *water bath*.

Pembuatan larutan stok

Ekstrak metanol lengkuas segar dan kering diuapkan semua pelarutnya. Filtrat kental lalu dilarutkan dalam DMSO dengan konsentrasi 10 mg/mL. Larutan disterilkan dengan cara disaring menggunakan *syringe filter*. Larutan disimpan sebagai stok kemudian larutan stok ini dibuat seri konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10% dari volume media LB (Lestari 2006).

Pemeliharaan kultur

A. hydrophila ditumbuhkan pada medium agar miring LB secara aseptis dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Setelah tumbuh sebagai biakan, *A. hydrophila* disimpan pada lemari pendingin (4°C) sebagai biakan cadangan (Lestari 2006).

Pengujian kualitatif produksi enzim eksoprotease

Medium yang digunakan adalah LB agar yang ditambah dengan 2% susu skim. Sterilisasi medium menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit, sedangkan sterilisasi susu skim pada suhu 110°C selama 30 menit. Cawan petri disiapkan kemudian diisi 16 mL medium dengan penambahan ekstrak metanol lengkuas segar dan ekstrak metanol lengkuas kering. Konsentrasi yang digunakan yaitu 2, 4, 6, 8, dan 10% dengan asumsi pada variasi konsentrasi di atas produksi enzim eksoprotease dapat dihambat tanpa harus menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*. Isolat *A. hydrophila* yang telah ditumbuhkan dalam media LB Broth selama 12 jam diinokulasikan sebanyak 4 µL pada cawan petri berisi LB agar yang telah dibuat sumuran lalu diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Inokulasi *A. hydrophila* ini dilakukan pada saat fase log. Masing-masing dilakukan dengan tiga kali ulangan. Produksi enzim eksoprotease dapat dilihat dengan adanya zona bening di sekitar koloni. Zona bening terbentuk karena aktivitas proteolitik dari enzim eksoprotease. Diameter zona bening dihitung dengan cara diameter lingkaran total (diameter isolat bakteri+diameter zona bening) dikurangi diameter isolat kemudian dibandingkan dengan kontrol (Lestari 2006).

Penyiapan Inokulum *Aeromonas hydrophila*

Penyiapan inokulum *A. hydrophila* dilakukan dengan cara memindahkan satu ose biakan bakteri ke dalam 10 ml medium LB Broth secara aseptik, kemudian diinkubasi dalam suhu kamar pada inkubator goyang dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam (Irawan et al. 2003).

Pengukuran pertumbuhan *A. hydrophila* dan pengujian produksi enzim eksoprotease secara kuantitatif

Metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas enzim eksoprotease yaitu dengan spektrofotometri. Prinsip pengujiannya berdasarkan pada metode Kunitz (1971) yaitu kemampuan enzim protease untuk menghidrolisis kasein. Residu kasein yang tidak terhidrolisis akan diendapkan oleh Trichloro Acetic Acid (TCA). Endapan dipisahkan kemudian filtratnya dapat diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 280 nm.

Pengujian secara kuantitatif dapat dilakukan pada ekstrak yang menunjukkan pengurangan aktivitas proteolitik terbesar. Hal ini ditunjukkan dengan luas zona bening paling kecil lalu dibandingkan dengan kontrolnya pada uji kualitatif.

Isolat *A. hydrophila* dari inokulum LB selama 24 jam ditumbuhkan pada 200 mL LB broth yang sudah ditambahkan ekstrak metanol lengkuas segar dengan konsentrasi 4, 6, dan 8%. Pada kontrol negatif ditambahkan pelarut DMSO lalu masing-masing medium diinkubasi pada suhu 30°C dan dikocok dengan shaker. Pengukuran

pertumbuhan bakteri dilakukan mulai jam ke-0 dan setiap 2 jam selama 24 jam, 10 ml suspensi bakteri diambil dan diukur pertumbuhannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm sehingga dapat diamati ODnya.

Sebanyak satu setengah mL suspensi bakteri yang telah diukur pertumbuhannya disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Filtratnya diambil sebanyak 1 mL untuk pengujian aktivitas enzim. Substrat sebanyak 1 mL (kasein 1% dalam buffer fosfat pH 8) diinkubasi dalam *shaking waterbath* 37°C selama 15 menit. Selanjutnya ditambah 0,5 mL enzim dan 0,5 mL buffer fosfat pH 8 dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 37°C. Reaksi dihentikan selama 20 menit dengan penambahan 3 mL TCA 5% dicampur dengan sempurna lalu didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Pemisahan filtrat dilakukan dengan sentrifugasi pada putaran 2500 rpm selama 20 menit. Filtrat yang diperoleh merupakan peptida hasil hidrolisis substrat oleh protease/sampel. Serapannya ditentukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280nm.

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan setiap 2 jam sekali selama 24 jam sebanyak 3 kali ulangan. Satu unit aktivitas enzim eksoprotease didefinisikan dinyatakan dalam besarnya serapan produk (satu unit sama dengan satu absorban) hasil inkubasi selama 20 menit, pada pH 8 dan suhu 37°C.

Pengukuran total protein (Bradford 1976)

Pengukuran total protein dilakukan untuk melihat efek ekstrak terhadap produksi enzim atau terhadap aktivitas enzim. Konsentrasi protein ditentukan melalui metode Bradford (1976) dengan menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai larutan standar protein. Konsentrasi awal larutan BSA adalah 0,3 mg/ml. Konsentrasi standar protein BSA tersebut kemudian dibuat menjadi 0,06 hingga 0,3 mg/ml.

Sebanyak 100 µL sampel ditambah 5 ml pereaksi Bradford, selanjutnya dihomogenkan dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C dan kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada 595 nm. Nilai absorbansi dan konsentrasi protein dari standar BSA diplotkan pada grafik Cartesius dengan konsentrasi sebagai absis (sumbu X) dan absorbansi sebagai ordinat (sumbu Y), kemudian ditentukan persamaan garis regresinya.

Rancangan penelitian

Jenis penelitian ini eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu arah. Percobaan dilakukan dengan menggunakan 1 perlakuan yaitu konsentrasi yang terdiri dari 5 sub perlakuan yaitu konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10%.

Analisis data

Analisis yang digunakan adalah analisis kualitatif dan kuantitatif. Analisis kualitatif meliputi besarnya zona bening yang dibandingkan dengan kontrol. Analisis kuantitatif meliputi pengukuran pertumbuhan *A. hydrophila*, aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* berupa absorbansi pada masing-masing perlakuan

dibandingkan pada kontrol. Data ini kemudian dianalisis sidik ragam dengan menggunakan uji *repeated measures* dan dilanjutkan dengan uji tukey taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi rimpang lengkuas

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang lengkuas segar dan kering. Rimpang lengkuas yang digunakan sebagai simplisia adalah rimpang yang berumur 1 tahun dan berwarna merah kecoklatan. Umur merupakan periode kritis yang sangat menentukan kualitas dan kuantitas hasil tanaman. Kualitas hasil tanaman meliputi senyawa yang terkandung dan kondisi fisik dari hasil tanaman, sedangkan kuantitas hasil tanaman meliputi banyaknya kandungan senyawa aktif dalam hasil tanaman. Oleh karena itu pemilihan umur tanaman yang tepat dan benar merupakan faktor penentu kualitas dan kuantitas simplisia yang akan digunakan.

Waktu pemanenan untuk rimpang bervariasi tergantung penggunaan. Tetapi pada umumnya pemanenan dilakukan pada saat tanaman berumur 8-10 bulan. Sebagai bahan obat, rimpang dipanen setelah tua yaitu umur 9-12 bulan setelah tanam. Rimpang yang dipanen pada umur tersebut menghasilkan kadar senyawa aktif yang tinggi. Faktor-faktor yang dapat meningkatkan kadar senyawa aktif sangat tergantung pada lingkungan antara lain jenis tanah, unsur hara, curah hujan, temperatur dan cahaya. Penanaman rimpang dilakukan pada saat awal musim hujan dan dipanen pada pertengahan musim kemarau untuk mendapatkan hasil yang optimal (Sembiring 2007).

Rimpang lengkuas diekstrak untuk diambil senyawa kimia yang terkandung di dalamnya. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi terhadap rimpang segar dan kering. Maserasi adalah proses perendaman simplisia dengan menggunakan pelarut pada temperatur ruangan (Depkes RI 2000). Selama proses maserasi, wadah selalu dalam keadaan tertutup untuk menghindari kemungkinan terjadinya proses oksidasi oleh udara luar dan untuk menghindari pengaruh cahaya (sinar matahari) terhadap stabilitas senyawa-senyawa yang akan diambil. Pemilihan metode maserasi dikarenakan cara pengerjaannya mudah, menggunakan peralatan yang sederhana dan jika menggunakan metode ekstraksi dengan pemanasan yang terlalu tinggi, dikhawatirkan senyawa aktif yang terkandung akan rusak, sehingga pemilihan metode ekstraksi dengan maserasi dianggap lebih tepat.

Tujuan dilakukan pengeringan dalam ekstraksi lengkuas adalah untuk mengurangi kadar air pada bahan. Menkes (1994) mensyaratkan kadar air kurang dari 10%. Hal ini bertujuan untuk menjamin penyimpanan, serta mencegah pertumbuhan jamur yang dapat menurunkan mutu simplisia. Selain ekstraksi menggunakan simplisia (rim pang kering) juga menggunakan rimpang segar. Rimpang lengkuas diekstrak dalam kondisi segar supaya pelarut lebih mudah berpenetrasi ke dalam rimpang sehingga zat-zat yang terdapat dalam sampel lebih mudah terekstraksi. Selain itu juga diharapkan senyawa aktif yang dikehendaki dalam rimpang tidak mengalami kerusakan

oleh adanya metode pengeringan. Faktor yang mempengaruhi kecepatan penyarian adalah kecepatan difusi zat yang larut melalui lapisan-lapisan batas antara cairan penyari dengan bahan yang mengandung zat tersebut. Bila permukaan potongan simplisia yang bersentuhan dengan cairan penyari makin luas, maka penyarian akan bertambah baik (Nur 2009).

Ekstraksi rimpang lengkuas segar dan kering menggunakan metanol sebagai larutan penyarinya. Metanol merupakan pelarut polar dengan indek polaritas 0,73 yang mampu menarik senyawa-senyawa polar dari rimpang lengkuas (Solehudin 2001). Metanol banyak digunakan untuk ekstraksi tanaman obat dan dapat menarik zat aktif yang terkandung di dalamnya (Noor et al. 2006). Hasil skrining fitokimia rimpang lengkuas mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, terpenoid, dan steroid (Nurhayati 2010).

Ekstrak metanol rimpang lengkuas dipekatkan untuk mendapatkan hasil ekstrak berupa pasta berwarna coklat tua kehitaman. Pemekatan berarti peningkatan jumlah *partial solute* (senyawa terlarut) secara penguapan pelarut tanpa sampai menjadi kondisi kering, ekstrak hanya menjadi kental atau pekat (Depkes RI 2000). Pemekatan ini bertujuan untuk menguapkan pelarut metanol yang masih tersisa sehingga didapatkan ekstrak kental (Arifin et al. 2006).

Produksi enzim eksoprotease *Aeromonas hydrophila*

Isolat *A. hydrophila* yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari ikan gurame (*Osporonemus gouramy*) yang sakit sehingga bakteri ini telah memproduksi faktor virulensinya. Faktor virulensi bakteri ini salah satunya adalah enzim eksoprotease (Khajanchi et al. 2009). Faktor virulensi tersebut berkaitan dengan kepadatan sel yang tinggi pada fase eksponensial/fase stasioner.

Enzim eksoprotease merupakan eksotoksin yang diproduksi oleh bakteri *A. hydrophila*. Enzim eksoprotease adalah enzim proteolitik yang berfungsi untuk melawan pertahanan tubuh inang untuk berkembangnya penyakit dan mengambil persediaan nutrisi inang untuk berkembang biak (Baehaki et al. 2005). Enzim eksoprotease ini juga merupakan faktor virulensi utama pada bakteri *A. hydrophila* sehingga perlu diturunkan produksinya jika ingin mencegah patogenitasnya. Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dikontrol oleh suatu sistem komunikasi bakteri yang disebut sistem *quorum sensing*, dengan molekul sinyal C4-HSL (Swift et al. 1999).

Banyaknya enzim yang diproduksi oleh suatu bakteri tidak bisa diukur secara langsung (Aini 2006). Pengukuran produksi enzim oleh *A. hydrophila* dapat dilakukan karena adanya aktivitas katalisis yang dimiliki enzim eksoprotease (Adinarayana et al. 2005). Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dapat diketahui dengan cara kualitatif dan kuantitatif.

Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* secara kualitatif dapat diketahui dari terbentuknya zona bening pada medium di sekitar biakan *A. hydrophila*. Aktivitas hidrolisis secara kualitatif merupakan gambaran dari kemampuan isolat bakteri proteolitik merombak protein dengan membandingkan besarnya zona jernih di sekitar

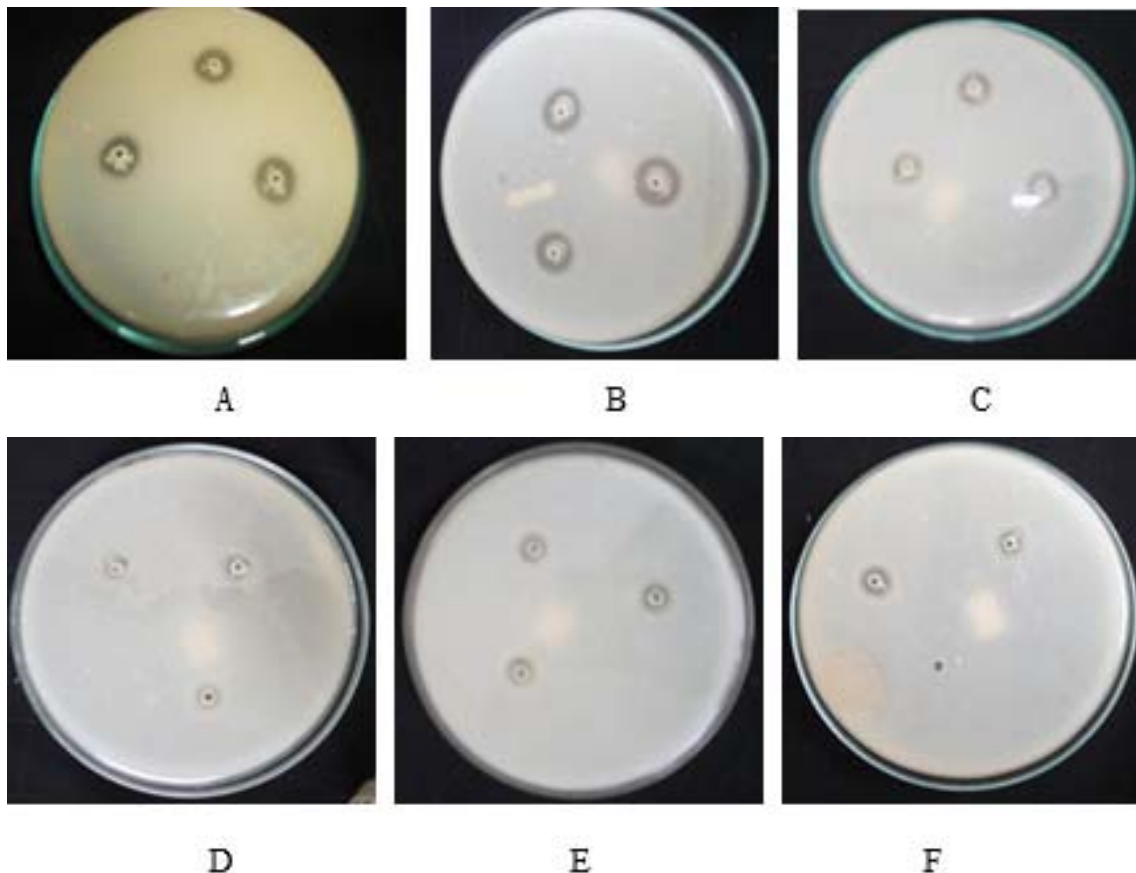
koloni dengan besarnya diameter koloni (Widhyastuti dan Dewi 2001).

Isolat *A. hydrophila* ditumbuhkan dalam media LB Agar yang ditambah dengan 2% susu skim. Media ini digunakan dalam uji kualitatif produksi enzim eksoprotease karena pada media ini terdapat kasein yang terkandung dalam susu skim sehingga dapat memacu aktivitas enzim proteolitik. Susu skim tersuspensi dalam media LB Agar. Setelah inokulasi dan inkubasi kultur *plate agar*, bakteri akan mensekresikan eksoprotease. Suspensi susu skim ini berwarna putih dan dapat diamati secara langsung pada kultur media padat LB. Kasein yang terkandung dalam susu skim berfungsi sebagai substrat bagi enzim eksoprotease. Kasein ini akan terhidrolisis menjadi peptida-peptida dan asam-asam amino dengan adanya enzim eksoprotease *A. hydrophila*. Berkurangnya partikel kasein di dalam media susu skim ditandai dengan adanya zona lisis (zona jernih) di sekitar koloni bakteri. Semakin luas zona jernih berarti semakin banyak produksi enzim eksoprotease yang disintesis sehingga kasein yang terhidrolisis juga semakin banyak begitu juga sebaliknya. Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dapat dilihat pada Gambar 1. Sementara Gambar 2 menunjukkan

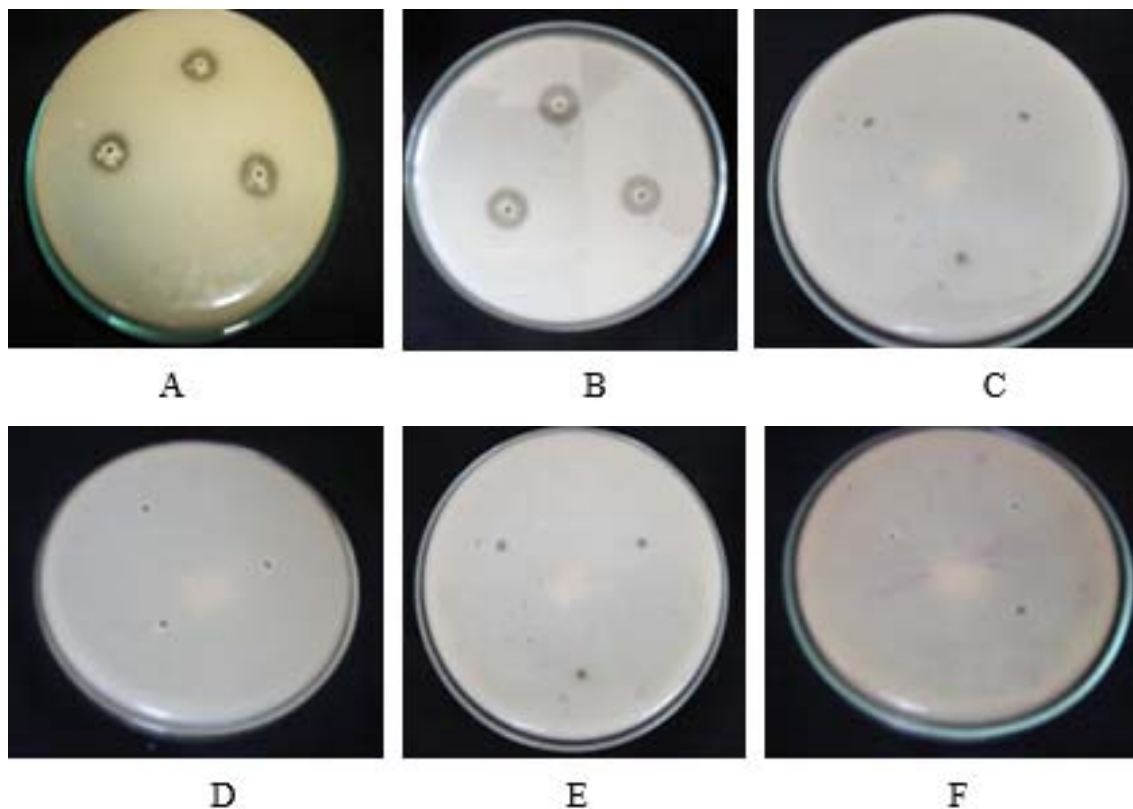
penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak metanol rimpang lengkuas kering dan Gambar 3 menunjukkan penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak metanol rimpang lengkuas segar.



Gambar 1. Produksi enzim eksoprotease menyebabkan terbentuknya zona lisis di sekitar biakan *A. hydrophila*



Gambar 2. Penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak metanol rimpang lengkuas kering. Keterangan: A: Kontrol (media LB Agar), B: LB Agar ditambah 2% ekstrak metanol rimpang lengkuas kering, C: LB Agar ditambah 4% ekstrak metanol rimpang lengkuas kering, D: LB Agar ditambah 6% ekstrak metanol rimpang lengkuas kering, E: LB Agar ditambah 8% ekstrak metanol rimpang lengkuas kering, F: LB Agar ditambah 10% ekstrak metanol rimpang lengkuas kering



Gambar 3. Penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak metanol rimpang lengkuas segar. Keterangan: A: Kontrol (media LB Agar), B: LB Agar ditambah 2% ekstrak metanol rimpang lengkuas segar, C: LB Agar ditambah 4% ekstrak metanol rimpang lengkuas segar, D: LB Agar ditambah 6% ekstrak metanol rimpang lengkuas segar, E: LB Agar ditambah 8% ekstrak metanol rimpang lengkuas segar, F: LB Agar ditambah 10% ekstrak metanol rimpang lengkuas segar

Pada pembuatan media susu skim, susu yang digunakan harus disterilisasi secara terpisah. Sterilisasi ini merupakan pemanasan susu yang bertujuan untuk mematikan beberapa mikroba dan dilakukan dengan pemanasan pada suhu 110°C selama 30 menit. Jika susu langsung diautoklaf bersama-sama dengan komponen media lainnya, maka susu akan pecah dan menghambat pengamatan terhadap aktivitas protease mikroba.

Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* secara kuantitatif dapat diketahui dengan cara mengukur aktivitasnya dalam mendegradasi substrat. Substrat yang digunakan yaitu senyawa kasein. Jumlah enzim yang disekresikan ke luar sel oleh bakteri sangat sedikit. Oleh karena itu pengukuran produksi enzim dapat dilakukan dengan mengukur aktivitas katalisis enzim. Pengukuran aktivitas katalisis enzim ini dilakukan menggunakan metode spektrofotometri.

Penghambatan produksi enzim eksoprotease *Aeromonas hydrophila* secara kualitatif

Penghambatan produksi enzim eksoprotease oleh ekstrak metanol rimpang lengkuas kering

Aktivitas hidrolisis secara kualitatif merupakan kemampuan dari isolat *A. hydrophila* untuk merombak protein dengan membandingkan antara zona bening di sekitar koloni dengan besarnya diameter koloni. Hasil dari penelitian ini dapat diamati besarnya zona bening di sekitar

koloni setelah pemberian ekstrak metanol rimpang lengkuas kering dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10%. Diameter zona bening dapat dilihat pada Tabel 1.

Zona bening yang terbentuk setelah inkubasi bakteri selama 24 jam menunjukkan bahwa protein pada susu telah dipecah oleh protease yang dihasilkan dari bakteri menjadi asam amino. Berdasarkan Tabel 1 terlihat bahwa produksi enzim eksoprotease setelah pemberian ekstrak metanol rimpang lengkuas kering dari tiap konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10% mengalami penurunan sejalan dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak yang diberikan, tetapi belum optimal karena masih terbentuk zona bening di sekitar koloni *A. hydrophila*. Oleh karena itu ekstrak metanol rimpang lengkuas kering ini tidak dilanjutkan pada uji kuantitatif.

Pemberian ekstrak metanol rimpang lengkuas kering dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10% belum optimal menghambat sistem *quorum sensing* karena masih terbentuk zona bening di sekitar koloni. Pengeringan merupakan kegiatan yang penting artinya dalam pengawetan bahan maupun pengolahan hasil pertanian. Pengeringan adalah pengeluaran air sampai kadar air yang seimbang dengan keadaan udara atmosfer normal atau pada kadar air dimana penurunan mutu bahan oleh kapang, aktivitas enzim dan serangga dapat diabaikan. Penelitian ini menggunakan metode pengeringan dengan cara panas buatan yaitu oven pada suhu 45°C. Pengeringan

menggunakan oven memiliki keuntungan antara lain tidak tergantung cuaca, kapasitas pengeringan dapat dipilih sesuai yang diperlukan, tidak memerlukan tempat yang luas, dan kondisi pengeringan dapat dikontrol (Reco dan Yustina 2003).

Bahan pangan yang dikeringkan umumnya memiliki nilai gizi yang lebih rendah dibandingkan bahan segarnya. Selama pengeringan terjadi perubahan warna, tekstur, aroma, dan lain-lain. Pada umumnya bahan yang dikeringkan akan berubah warna menjadi coklat. Perubahan warna ini disebabkan oleh reaksi-reaksi baik enzimatis maupun non enzimatis.

Efek lainnya adalah terjadi "case hardening" yaitu keadaan dimana bagian luar atau permukaan bahan sudah kering, sedangkan bagian dalam masih basah. Apabila suhu pengeringan terlalu tinggi, hal ini akan menyebabkan bagian permukaan cepat mengering dan menjadi keras sehingga menghambat penguapan air selanjutnya.

Pada proses pengeringan rimpang lengkuas ini terjadi pengurangan kadar air karena sebagian air pada rimpang menguap selama pemanasan. Selama pemanasan tersebut, kandungan senyawa aktif pada rimpang lengkuas mengalami penurunan. Lama pengeringan menyebabkan banyaknya kerusakan senyawa aktif yang terkandung dalam lengkuas serta senyawa lain seperti vitamin, pigmen juga ikut mengalami penguapan.

Penghambatan produksi enzim eksoprotease oleh ekstrak metanol rimpang lengkuas segar

Berdasarkan Tabel 2 dapat dilihat bahwa penghambatan produksi enzim eksoprotease terjadi seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak. Pemberian ekstrak metanol rimpang lengkuas segar dengan konsentrasi 4, 6, 8, dan 10% sudah dapat menghambat produksi enzim eksoprotease hingga tidak terbentuk lagi zona bening di sekitar koloni. Hal ini disebabkan oleh penurunan produksi enzim eksoprotease. Penurunan produksi enzim eksoprotease disebabkan oleh penghambatan sistem *quorum sensing* yang meregulasi sintesis enzim eksoprotease oleh senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak metanol rimpang lengkuas. Konsentrasi 4% dari uji kualitatif merupakan konsentrasi yang paling optimal untuk menurunkan aktivitas enzim eksoprotease karena dari konsentrasi 4, 6, 8, dan 10 % yang dapat menurunkan produksi enzim eksoprotease, konsentrasi 4% merupakan konsentrasi paling kecil dan sudah mampu menurunkan aktivitas enzim eksoprotease. Penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* ditunjukkan dengan tidak terbentuknya zona bening di sekitar koloni sejalan dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Apabila sistem *quorum sensing* terhambat, maka produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* menurun sehingga kasein yang terhidrolisis juga akan berkurang dan diameter zona bening berkurang bahkan tidak terbentuk lagi.

Ekstrak metanol rimpang lengkuas segar memiliki aktivitas yang lebih optimal daripada ekstrak metanol rimpang lengkuas kering. Hasil pengujian ekstrak metanol rimpang lengkuas segar terhadap aktivitas enzim eksoprotease menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak yang diujikan dapat menghambat aktivitas enzim eksoprotease

A. hydrophila sedangkan pada ekstrak metanol rimpang lengkuas kering dengan seluruh konsentrasi ekstrak yang diujikan ternyata masih terbentuk zona bening di sekitar koloni. Menurut Magdalena (2007), ekstrak laos segar mempunyai pengaruh terbaik dalam menekan pembentukan biofilm *V. cholerae*.

Penghambatan produksi enzim eksoprotease Aeromonas hydrophila secara kuantitatif

Pengukuran secara kuantitatif dilakukan dengan tiga macam pengukuran, yaitu pengukuran pertumbuhan *A. hydrophila*, pengukuran aktivitas enzim eksoprotease dalam mendegradasi kasein, dan pengukuran kadar protein. Berdasarkan uji kualitatif diketahui bahwa ekstrak metanol rimpang lengkuas segar mampu menghambat produksi enzim eksoprotease sehingga dilanjutkan dengan pengukuran secara kuantitatif.

Tabel 1. Diameter zona bening pada pemberian ekstrak metanol rimpang lengkuas kering

Persentase ekstrak metanol rimpang lengkuas kering (%)	Diameter zona bening (mm)
0	9,6
2	7,4
4	5,7
6	2,4
8	2,4
10	1,4

Tabel 2. Diameter zona bening pada pemberian ekstrak metanol rimpang lengkuas segar

Persentase ekstrak metanol rimpang lengkuas segar (%)	Diameter zona bening (mm)
0	9,6
2	9
4	tidak terbentuk zona bening
6	tidak terbentuk zona bening
8	tidak terbentuk zona bening
10	tidak terbentuk zona bening

Tabel 3. Hasil analisis statistik pertumbuhan dan aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* dengan pemberian konsentrasi 4, 6, 8% dan DMSO

Konsentrasi ekstrak metanol rimpang lengkuas segar	Absorbansi pertumbuhan <i>A. Hydrophila</i>	Absorbansi aktivitas enzim eksoprotease
Kontrol	4,796a	8,400a
4%	5,121a	6,408ab
6%	4,725a	6,950ab
8%	4,867a	3,550b
DMSO	5,350a	7,729ab

Keterangan: angka-angka yang diikuti huruf yang sama (dalam kolom yang sama) menunjukkan tidak berbeda nyata dalam uji tukey pada taraf uji 5%

Pengukuran kekeruhan medium pada selang waktu tertentu dilakukan untuk melihat kemampuan bakteri memperbanyak sel dalam medium. Data-data yang diperoleh dibuat kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan dalam penelitian ini digunakan untuk mengetahui bahwa penurunan aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* tidak disebabkan oleh terhambatnya pertumbuhan bakteri tersebut. Akan tetapi, penurunan aktivitas enzim eksoprotease disebabkan penurunan produksi enzim eksoprotease oleh senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak metanol rimpang lengkuas segar yang dapat menghambat sistem *quorum sensing* bakteri.

Kekeruhan terjadi karena sel bakteri tumbuh, berkembang, memperbanyak diri dan mensekresikan enzim ke medium kultur. Kekeruhan tersebut diukur dengan mengukur turbiditas medium pada panjang gelombang 600 nm selama 24 jam. Kultur bakteri yang semakin keruh menunjukkan semakin banyak jumlah selnya. Pertumbuhan *A. hydrophila* sudah mengalami fase kematian pada jam kesepuluh. Hal ini disebabkan oleh keterbatasan substrat, kepadatan populasi yang tinggi, tekanan parsial oksigen yang rendah, dan timbunan produk metabolisme yang toksik. Populasi *A. hydrophila* bertambah secara cepat dan teratur menjadi dua kali lipat pada interval waktu (waktu generasi) yang singkat selama inkubasi. Waktu yang diperlukan untuk pembelahan satu sel menjadi dua sel lebih kurang 10 menit (Samsundari 2006).

Kurva pertumbuhan pada Gambar 4 terlihat bahwa kerapatan optik kultur medium pada kontrol dari jam 0-2 sudah menunjukkan kenaikan. Fase ini merupakan fase eksponensial. Fase ini menunjukkan bahwa sel mulai memperbanyak diri, ukuran sel mulai membesar, dan kurva mulai naik menunjukkan terjadinya pertumbuhan populasi. Fase eksponensial terjadi ketika aktivitas metabolisme sel paling tinggi, kecepatan pembelahan maksimum, serta waktu generasi paling pendek dan konstan.

Jumlah populasi bakteri cenderung konstan setelah jam kedua. Pada saat itu bakteri memasuki fase stasioner. Fase ini terjadi sampai jam kesepuluh. Pada fase ini menunjukkan adanya kompetisi sesama bakteri dalam memperebutkan nutrisi dan ruang sehingga jumlah bakteri yang hidup hampir sama dengan jumlah bakteri yang mati. Kerapatan optik sangat menurun setelah jam kesepuluh. Pada fase ini bakteri mulai memasuki fase kematian. Kematian ini terjadi karena zat makanan yang diperlukan bakteri berkurang dan hasil ekskresi bakteri telah tertimbun dalam medium, sehingga mengganggu pembiakan dan pertumbuhan bakteri selanjutnya.

Berdasarkan Gambar 4 dapat diketahui bahwa pemberian konsentrasi 4, 6, dan 8% ekstrak metanol rimpang lengkuas segar, pertumbuhan *A. hydrophila* berlangsung dengan normal dimana ekstrak tidak berpengaruh terhadap terhambatnya pertumbuhan *A. hydrophila*.

Pemakaian DMSO digunakan sebagai pelarut ekstrak dan merupakan kontrol negatif. Pengujian terhadap DMSO digunakan untuk memastikan bahwa penambahan DMSO tidak mempengaruhi pertumbuhan *A. hydrophila*. Apabila dibandingkan dengan kontrol negatif, pemberian konsentrasi 4, 6, dan 8% ekstrak metanol rimpang lengkuas

segar tidak menunjukkan perbedaan nyata pada pertumbuhan *A. hydrophila*. Hal ini menunjukkan bahwa DMSO maupun ekstrak tidak berpengaruh^{lyiii} pada pertumbuhan bakteri. Hal ini juga ditunjukkan dari hasil analisis statistik variasi konsentrasi terhadap pertumbuhan bakteri dan aktivitas enzim eksoprotease dapat dilihat pada Tabel 3.

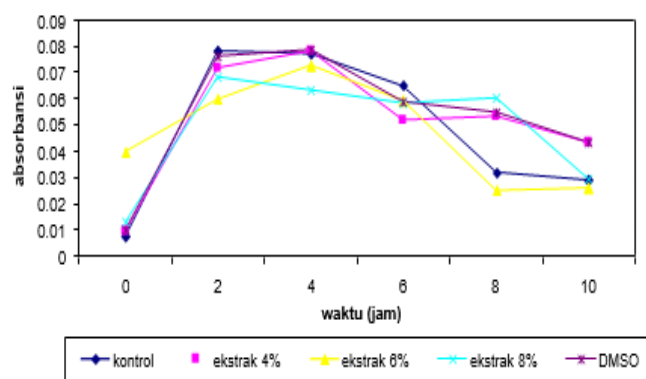
Uji statistik menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh yang signifikan antara kontrol dengan pemberian ekstrak metanol rimpang lengkuas segar pada seluruh konsentrasi ekstrak yang diujikan terhadap pertumbuhan *A. hydrophila*. Uji statistik juga menunjukkan bahwa pemakaian DMSO sebagai pelarut ekstrak tidak menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*. Hal ini berarti penggunaan DMSO sebagai pelarut tidak menyebabkan penghambatan pertumbuhan ataupun penurunan aktivitas enzim.

Aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* di medium LB Broth diketahui dengan mengukur kemampuan enzim eksoprotease menghidrolisis substrat menggunakan metode Kunitz (1971). Pengukuran dilakukan selama 24 jam, tetapi pertumbuhan bakteri pada jam kesepuluh sudah mengalami kematian. Oleh karena itu pengukuran aktivitas enzim eksoprotease juga dilakukan hanya sampai jam kesepuluh. Pengukuran enzim eksoprotease dilakukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm dan dilakukan bersamaan dengan pengukuran absorbansi pertumbuhan *A. hydrophila*.

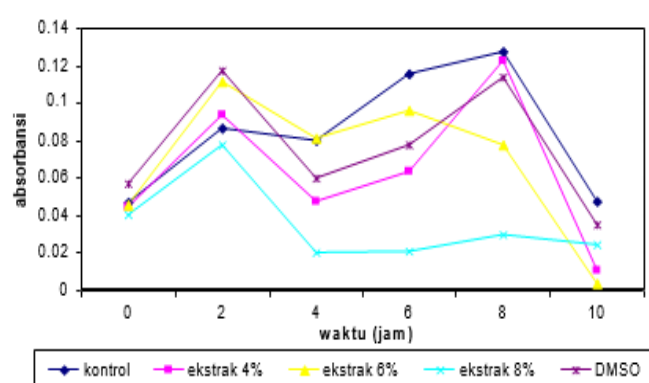
Pada metode ini kasein digunakan sebagai substrat untuk mengetahui tingkat aktivitas enzim eksoprotease. Kasein akan dihidrolisis oleh enzim eksoprotease dengan memutuskan ikatan peptida kemudian akan menghasilkan asam amino. Besarnya aktivitas eksoprotease ditentukan berdasarkan jumlah asam amino yang dihasilkan dari hidrolisis kasein (Naiola dan Widhiastuti 2002).

Berdasarkan Gambar 5 menunjukkan bahwa produksi enzim eksoprotease sudah terdeteksi sejak jam ke-0 yaitu pada waktu bakteri memasuki fase eksponensial. Hal ini terjadi karena dari inokulum berumur 24 jam sudah ada produksi enzim eksoprotease sehingga pada pengukuran menggunakan spektrofotometer pada jam ke-0 sudah terdeteksi adanya enzim eksoprotease. Menurut Marokhazi (2004), aktivitas proteolitik *A. hydrophila* terdeteksi pada fase eksponensial.

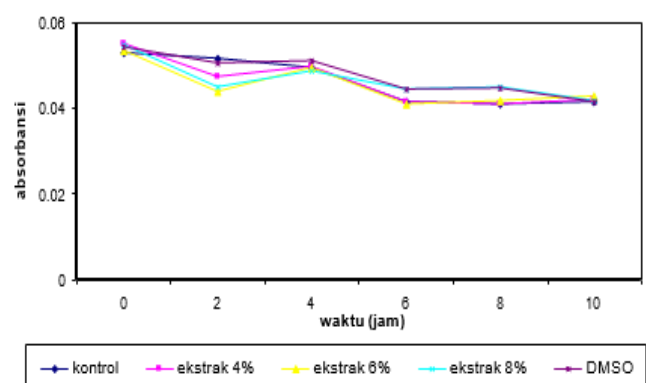
Kondisi optimum untuk produksi enzim perlu dicari untuk mengetahui aktivitas enzim tertinggi dari mikroorganisme penghasilnya. Keadaan lingkungan yang baik bagi sintesis enzim, biasanya juga baik untuk pertumbuhan mikroorganisme. Mencari kondisi optimum bagi sintesis enzim dapat berarti pula mencari kondisi optimum bagi pertumbuhan mikroba dan mencari hubungan antara sintesis enzim spesifik dengan kecepatan pertumbuhan. Faktor-faktor yang mempengaruhi fermentasi antara lain pH, suhu, aerasi dan jenis media (Anggarani 2003).



Gambar 4. Kurva pertumbuhan *A. hydrophila*



Gambar 5. Kurva aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila*



Gambar 6. Kurva pengukuran protein setelah pemberian ekstrak metanol rimpang lengkuas segar

Berdasarkan kurva pertumbuhan *A. hydrophila*, diketahui bahwa produksi enzim eksoprotease optimum terjadi setelah masa pertumbuhan sel eksponensial. Pada isolat *A. hydrophila* aktivitas enzim eksoprotease tertinggi dicapai pada jam kedelapan ketika pertumbuhannya mencapai fase stasioner, diduga terkait dengan penyediaan nutrisi bagi *A. hydrophila*. Hal ini didukung oleh Anggarani (2003) yang menyatakan umumnya *Bacillus sp.*

menghasilkan protease ekstraseluler setelah pertumbuhannya mencapai fase eksponensial. Weichert (2003) menyebutkan bahwa sintesis protease ekstraseluler optimum biasanya terjadi pada fase stasioner. Hal ini berkaitan dengan adanya glukosa dalam media yang berlebih pada saat bakteri memasuki fase eksponensial. Saat memasuki fase eksponensial, ketersediaan nutrisi bagi bakteri masih banyak dan glukosa yang terdapat pada media juga masih banyak sehingga sintesis enzim terhambat. Memasuki fase stasioner, ketersediaan nutrisi mulai berkurang dan glukosa juga menurun sehingga biosintesis enzim aktif kembali. Berdasarkan kurva pada Gambar 5 menunjukkan apabila dibandingkan dengan kontrol, maka konsentrasi 4% ekstrak metanol rimpang lengkuas segar tidak dapat menurunkan aktivitas enzim eksoprotease. Penurunan aktivitas enzim eksoprotease mulai terjadi pada jam ke-4 atau pada saat *A. hydrophila* memasuki fase stasioner. Pemberian 6% ekstrak metanol rimpang lengkuas segar juga tidak dapat menurunkan aktivitas enzim eksoprotease. Penurunan aktivitas enzim eksoprotease ini mulai terjadi pada jam ke-6 atau pada saat *A. hydrophila* juga memasuki fase stasioner. Namun pemberian 8% ekstrak metanol rimpang lengkuas segar dapat menurunkan aktivitas enzim eksoprotease yang ditandai dengan menurunnya produksi enzim eksoprotease dan mulai terjadi dari jam ke-0 atau pada saat *A. hydrophila* memasuki fase eksponensial. Hal ini juga ditunjukkan dari hasil analisis statistik pada Tabel 3. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pemberian konsentrasi 8% ekstrak metanol rimpang lengkuas segar berbeda nyata dengan kontrol.

Adanya perbedaan nilai aktivitas enzim eksoprotease secara kualitatif dan secara kuantitatif kemungkinan disebabkan karena perbedaan suhu alami pertumbuhan bakteri dengan perlakuan di laboratorium sehingga aktivitas bakteri tidak optimum. Pertumbuhan mikroorganisme sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti faktor fisika-kimia (suhu, pH, aerasi, agitasi, dan komposisi media tumbuh). Oleh karena itu tidak selalu terdapat korelasi yang baik antara zona jernih protein di sekitar zona jernih koloni pada media padat dengan kemampuan organisme tersebut. Beberapa faktor yang diduga menjadi penyebab tidak terkorelasinya nilai aktivitas hidrolisis secara kualitatif dengan nilai enzim secara kuantitatif adalah kecepatan pertumbuhan bakteri pada medium padat dan cair serta jumlah inokulum yang diberikan pada kedua medium (Pakpahan 2009).

Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dikontrol oleh suatu sistem komunikasi bakteri yang disebut sistem *quorum sensing* dengan molekul sinyal C4-HSL. Penghambatan sistem *quorum sensing* dilakukan untuk menurunkan produksi enzim eksoprotease, yaitu dengan menggunakan ekstrak metanol rimpang lengkuas segar. Ekstrak ini diharapkan dapat mengurangi sekresi molekul C4-HSL supaya tidak terjadi pengaktifan gen penyandi enzim eksoprotease *A. hydrophila*. Selain uji pertumbuhan dan aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila*, juga dilakukan uji protein. Uji protein dilakukan bersamaan dengan pengukuran absorbansi pertumbuhan *A. hydrophila*.

Berdasarkan Gambar 6 terlihat bahwa protein yang terdeteksi dalam pengukuran selama 10 jam setelah pemberian ekstrak metanol rimpang lengkuas segar dengan konsentrasi 4, 6, dan 8% menunjukkan bahwa kadar protein tidak berbeda jika dibandingkan dengan kontrol. Kurva tersebut menunjukkan bahwa tidak terjadi penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila*.

Berdasarkan kurva pertumbuhan pada Gambar 4 menunjukkan bahwa pengukuran kekeruhan tidak dapat membedakan antara bakteri yang hidup dengan yang mati sehingga bakteri yang mati tetap terukur. Oleh karena itu dilakukan pengukuran protein yang bertujuan untuk mengetahui bahwa bakteri yang diuji hanya bakteri yang masih hidup karena jika bakteri telah mati, maka tidak mensintesis protein dan hanya bakteri yang hidup saja yang mampu mensintesis protein.

Berdasarkan hal di atas dapat dikatakan bahwa ekstrak metanol rimpang lengkuas segar dapat menghambat sistem *quorum sensing* *A. hydrophila*. Penghambatan *quorum sensing* ditunjukkan dengan adanya penurunan aktivitas enzim eksoprotease yang disebabkan oleh senyawa kimia dari ekstrak rimpang lengkuas segar tanpa disertai dengan penghambatan pertumbuhan bakteri sehingga penghambatan sistem *quorum sensing* ini dapat digunakan untuk mengatasi permasalahan di bidang sektor perikanan yaitu sebagai bentuk pengobatan pada penyakit ikan terutama penyakit yang disebabkan oleh *A. hydrophila*.

KESIMPULAN

Terjadi penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak metanol rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.) segar dan kering. Ekstrak metanol rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.) segar lebih optimal untuk menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* daripada ekstrak metanol rimpang lengkuas kering. Berdasarkan hasil analisis statistik, konsentrasi 8% ekstrak metanol rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.) segar merupakan konsentrasi yang paling optimal untuk penghambatan enzim eksoprotease *A. hydrophila*.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinarayana K, Jyothi B, Ellaiah P. 2005. Production of Alkaline Protease with Immobilized Cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in Various Matrices by Entrapment Technique. *AAPS PharmSciTech* 6 (03): 391-397.
- Aini N, Setyawan AD. 2006. Senyawa Bioaktif Penghambat Sistem Quorum Sensing pada Bakteri Gram Negatif. *Biofarmasi* 4 (1): 35-42.
- Aini N. 2006. Penurunan Produksi Enzim Eksoprotease *Aeromonas hydrophila* oleh Ekstrak Buah Tomat. Skripsi. Program Pendidikan S1 Program Studi Biologi Universitas Negeri Sebelas Maret, Surakarta.
- Anggarani M. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Protease Alkalin dan Karakterisasi Enzim. [Skripsi]. Program Pendidikan S1 Program Studi Biologi Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Arifin H, Anggraini N, Handayani D, Rasyid R. 2006. Standarisasi Ekstrak Etanol Daun *Eugenia cumini* Merr. *J Sains Tek Far* 11 (2): 88-93.
- Octyaningrum A. 2009. Karakteristik Pengeringan Rimpang Jahe (*Zingiber officinale* Roxb) Menggunakan Metode Pengeringan Oven Dengan Pra-Proses Perendaman Osmotik. [Skripsi]. Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember, Jember.
- Baehaki A, Nurhayati T, Suhartono MT. 2005. Karakteristik protease dari bakteri patogen staphylococcus epidermidis. *J Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 8 (2): 25-35.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of protein utilization. The principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Depkes RI. 2000. Parameter Umum Standar Ekstrak Tumbuhan Obat Cetakan Pertama. Direktorat jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Irawan GDE, Winarno K, Susilowati A. 2003. Pengaruh ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) terhadap penurunan mortalitas lele dumbo (*Clarias gariepinus*) akibat infeksi *Aeromonas hydrophila*. *Enviro* 3 (1): 28-35.
- Khajanchi BK, Sha J, Kozlova EV, Erova TE, Suarez G, Sierra JC, Popov VL, Horneman AJ, Chopra AK. 2009. N-Acylhomoserine Lactones Involved in quorum sensing control the Type VI secretion system, biofilm formation, protease production, and in vivo virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. *J Microbiology* 155: 3518-3531.
- Kievit TR, Iglewski BH. 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationship. *J Infect Immunol* 68 (9): 4839-4849.
- Lestari U. 2006. Penghambatan Produksi Enzim Eksoprotease *Aeromonas hydrophila* oleh Ekstrak Temu Lawak (*Curcuma xanthorrhiza* (Roxb)). [Skripsi]. Program Pendidikan S1 Program Studi Biologi Universitas Negeri Sebelas Maret, Surakarta.
- Lewis K. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45 (4): 999-1007.
- Magdalena S, Lay BW. 2007. Isolasi *Vibrio cholerae* dan Penapisan Senyawa Bioaktif Asal Ekstrak Tanaman Penghambat Pembentukan Biofilm. Unika Atma Jaya, Jakarta.
- Mariyono, Sundana A. 2002. Teknik Pencegahan dan Pengobatan Penyakit Bercak Merah pada Ikan Air Tawar yang Disebabkan oleh Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Buletin Teknik Pertanian* 7 (1):-.
- Marokhazi J, Lengyel K, Pekár S, Felföldi G, Patthy A, Gráf L, Fodor A, Venekei I. 2004. Comparison of Proteolytic Activities Produced by Entomopathogenic Photobacterium Bacteria: Strain-and Phase-Dependent Heterogeneity in Composition and Activity of Four Enzymes. *J Environ Microbiol* 70 (12): 7311-7320.
- Maulina I, Haetami K, Junianto. 2006. Pengaruh Meniran Dalam Pakan Untuk Mencegah Infeksi Bakteri *Aeromonas* sp. pada Benih Ikan Mas (*C. carpio*). UNPAD, Bandung.
- Menkes RI. 1994. Persyaratan Obat Tradisional. Direktorat jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Naiola E, Widhyastuti N. 2002. Isolasi seleksi dan optimasi produksi protease dari beberapa iaolat bakteri. *Berita Analis* 6 (3): 467-473.
- Noor SM, Paeloengan M, Yulianti T. 2006. Analisis Senyawa Kimia Sekunder dan Uji Daya Antibakteri Ekstrak Daun Tanjung (*Mimusops elengi* L) terhadap *Salmonella typhi* dan *Shigella boydii*. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2006.
- Nur M. 2009. Aktivitas Anti Bakteri Ekstrak Metanol Bunga Pepaya Jantan (*Carica papaya* L.) terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* Multiresisten Antibiotik. [Skripsi]. Program Pendidikan S1 Program Studi Farmasi, Universitas Muhammadiyah, Surakarta.
- Nurhayati T, Fachriyah E., Kusri D. 2010. Isolasi, Identifikasi dan Uji Toksisitas Senyawa Flavonoid Ekstrak Etil Asetat Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia galanga* L. Wild). Seminar Tugas Akhir S1 Jurusan Kimia FMIPA UNDIP, Jurusan Kimia UNDIP, Semarang.
- Oka I.M, Fanny P. 2008. Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri dari Rimpang Lengkuas (*Alpinia galanga* L.). *J Kimia* 2 (2): 100-104.
- Pakpahan R. 2009. Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Protease Termofilik dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatra Utara. [Tesis]. Sekolah Pasca Sarjana. Program Studi Biologi Universitas Sumatra Utara, Medan.
- Persson T, Hansen T.H., Rasmussen T.B., Skindersoe S.E., Givskov M., Nielsen J. 2005. Rational design and synthesis of new quorum sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactone and natural product from garlic. *J Royal Soc* 3 (2): 253-262.
- Rasch M, Buch C, Austin B, Slierendrecht WJ, Ekmann KS, Larsen JL, Johansen C, Riedel K, Eberl L, Givskov M, Gram L. 2004. An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortality caused by vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss wal-baum*). *J Syst Appl Microbiol* 27 (3): 350-359.

- Reco B, Yustina SH. 2003. Pengaruh Metode Pengeringan dengan Oven dan Pengeringan di bawah Sinar Matahari terhadap Cemaran *Staphylococcus aureus* pada Simplisia Dlingo. JFSK 1 (2): 89-96.
- Samsundari S. 2006. Pengujian ekstrak temulawak dan kunyit terhadap resistensi bakteri *Aeromonas hydrophila* yang menyerang ikan mas (*Ciprinus carpio*). Gamma 2 (1): 71-83.
- Sembiring BB. 2007. Teknologi Penyiapan Simplisia Terstandar Tanaman Obat. Warta Puslitbangbun 13 (2).
- Solehudin H. 2001. Ekstraksi Minyak dan Oleoresin dari Kulit Kayu Manis (*Cinnamomum burmanii* Blume). [Skripsi]. Program Pendidikan S1 Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Swift S, Lynch MJ, Fish L, Leink DF, Thomas JM, Stewart CJAB, Williams P. 1999. Quorum Sensing-Dependent Regulation and Blokade of Eksoprotease Production in *Aeromonas hydrophila*. Infection and Immunity 4: 18-28.
- Tan E, Low KW, Wong WSF, Leung KY. 1998. Internalization of *Aeromonas hydrophila* by fish epithelial cells can be inhibited with a tyrosine kinase inhibitor. J Microbiol 144: 299-307.
- Thomas TD, Pritchard GG. 1987. Proteolytic enzymes from dairy starter cultures. Fed Eur Microbiol Soc Microbiol 46: 245.
- Weichart D1, Querfurth N, Dreger M, Hengge-Aronis R. 2003. Global Role for ClpP-Containing Proteases in Stationary-Phase Adaptation of *Escherichia coli*. J Bacteriol 185 (1): 115-125.
- Widhyastuti N, Dewi RM. 2001. Isolasi Bakteri Proteolitik dan Optimasi Produksi Protease. Laporan Teknik. Proyek Inventarisasi dan Karakterisasi Sumberdaya Hayati. Pusat Penelitian Biologi. LIPI, Bogor.
- Ye Y, Li B. 2006. 19S-19-Acetoxychavicol acetate isolated from alpinia galanga inhibits human immunodeficiency virus Type 1 Replication by Blocking Rev Transport. J General Virol 87: 2047-2053.

Karakterisasi senyawa bioaktif isoflavon dan uji aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol tempe berbahan baku kedelai hitam (*Glycine soja*), koro hitam (*Lablab purpureus*), dan koro kratok (*Phaseolus lunatus*)

Characterization of isoflavone bioactive compounds and antioxidant activity test of ethanol extract of tempe made from *Glycine soja*, *Lablab purpureus*, and *Phaseolus lunatus*

HENY RAHMA SULISTIANI, SRI HANDAYANI, ARTINI PANGASTUTI

Prodi Biosains, Program Pascasarjana, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36a, Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 26 Februari 2014. Revisi disetujui: 7 Mei 2014.

Abstract. Sulistiani HR, Handayani S, Pangastuti A. 2012. Characterization of isoflavone bioactive compounds and antioxidant activity test of ethanol extract of tempe made from *Glycine soja*, *Lablab purpureus*, and *Phaseolus lunatus*. *Biofarmasi* 14: 62-72. The aim of this research was: (i) finding out the content of the isoflavone compounds of daidzein, genistein, glisitein, and factor-2, (ii) conducting the test of antioxidant activity of the tempeh made of black soybean, hyacinth bean, and lima bean with the variations of length of fermentation (0,1,2, 3, 4 day(s)), and (iii) comparing the antioxidant activity of the black soybean, hyacinth bean, and lima bean and their tempeh product with both the ethanol extract of the yellow soybean and its tempeh product and several natural antioxidants (α -tocopherol, β carotene, ascorbic acid) and BHT synthetic antioxidant. The materials used for the research were black soybean, hyacinth bean, and lima bean with the variations of seed measure (whole seed and chopped seed) and length of fermentation (0,1,2, 3, 4 day(s)). The method used to extract the isoflavone compounds was maceration, and the method used to identify the isoflavone compounds was that of HPLC. The test of antioxidant activity used the method of DPPH. The calculation of the antioxidant activity used the computer program of SPSS, Version 15. General Model – Univariate and One Way – Anova. The results of the research showed that both the whole black soybean and hyacinth bean genistein, while the whole lima bean contained daidzein. The largest total contents of isoflavone were in the 2-day fermentation of the black soybean, in the 1-day fermentation of the hyacinth bean, in the 3-day fermentation of the lima bean, and in the 2-day fermentation of the yellow soybean. The highest antioxidant activity in the 3-day fermentation of the black soybean, hyacinth bean, lima bean, and yellow soybean; the black soybean highest antioxidant activity compared to other compounds such as β -carotene, α -tocopherol, vitamin C, and BHT synthetic antioxidant. Thus, the black soybean and its tempeh product fermented for three days were potential to be used as a natural antioxidant.

Keywords: Antioxidant, ethanol extract, *Glycine soja*, isoflavone, *Lablab purpureus*, *Phaseolus lunatus*, tempe

PENDAHULUAN

Senyawa isoflavon merupakan senyawa metabolit sekunder yang banyak disintesa oleh tanaman. Namun, tidak sebagai layaknya senyawa metabolit sekunder karena senyawa ini tidak disintesis oleh mikroorganisme. Dengan demikian, mikroorganisme tidak mempunyai kandungan senyawa ini. Oleh karena itu, tanaman merupakan sumber utama senyawa isoflavon di alam. Dari beberapa jenis tanaman, kandungan isoflavon yang lebih tinggi terdapat pada tanaman Leguminosae, khususnya pada tanaman kedelai (Pradana 2008).

Isoflavon yang terdapat dalam biji kedelai dorman adalah dalam bentuk isoflavon glikosida yaitu daidzin, genistin dan glisitin. Isoflavon glikosida tersebut mempunyai aktivitas fisiologis yang rendah. Pawiroharsono (1995), menyatakan bahwa 99% isoflavon glikosida yang terdapat pada biji kedelai, selama proses perendaman (dalam pembuatan tempe) dapat terhidrolisis menjadi isoflavon aglukan dan glukosa. Isoflavon aglukan yang mempunyai

aktivitas fisiologis tinggi tersebut adalah genistein, daidzein, dan glisitein, selanjutnya pada proses fermentasi kedelai rendam dengan kapang *Rhizopus oligosporus*, daidzein dapat mengalami proses hidrosilasi sehingga menjadi senyawa faktor-2. Faktor-2 mempunyai aktivitas antioksidan dan antihemolisis yang lebih baik dari daidzein dan genistein (Gyorgy et al. 1964).

Salah satu aktivitas fisiologis yang menonjol dari isoflavon daidzein, genestein, glisitein dan faktor-2 adalah aktivitas antioksidan. Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menunda, memperlambat dan mencegah proses oksidasi lipid. Dalam arti khusus, antioksidan adalah zat yang dapat menunda atau mencegah terjadinya reaksi antioksidasi radikal bebas (Kochar dan Rossell 1990).

Antioksidan pada isoflavon sangat dibutuhkan tubuh untuk menghentikan reaksi pembentukan radikal bebas, sehingga dapat menghambat proses penuaan dini, mencegah penyakit degeneratif seperti aterosklerosis, jantung koroner, diabetes melitus, dan kanker (Horwitz 1980).

Selama ini kita ketahui antioksidan yang digunakan sebagai pengawet pada bahan makanan adalah antioksidan sintetik seperti Butylated Hydroxyanisole (BHA), Butylated Hydroxytoluene (BHT), Propyl Gallat (PG) dan Etylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA). Pemanfaatan zat antioksidan sintetik dapat menimbulkan gangguan kesehatan bagi konsumen antara lain gangguan fungsi hati, paru, mukosa usus, dan keracunan (Suryo dan Tohari 1995). Untuk itu perlu dicari alternatif lain untuk mengatasi permasalahan tersebut. Salah satu cara adalah dengan mengganti pemanfaatan antioksidan sintetik dengan antioksidan alami. Mengingat adanya kandungan isoflavon dalam kedelai yang dapat berfungsi sebagai antioksidan, maka tempe kedelai dapat direferensikan sebagai bahan baku sumber antioksidan alami. Disamping sebagai antioksidan, isoflavon daidzein, genistein, glisitein dan faktor-2 juga mempunyai khasiat lain diantaranya sebagai estrogenik (zat yang mirip estrogen), anti inflamasi, anti tumor atau anti kanker, anti hemolisis, anti kontriksi (penyempitan) pembuluh darah, anti kolesterol, menurunkan kadar trigliserida VLDL dan LDL serta meningkatkan HDL (pawiroharsono 2001). Dengan demikian isoflavon dari tempe kedelai selain berkhasiat sebagai antioksidan juga mempunyai khasiat ganda seperti yang tertera diatas.

Pada saat ini tengah terjadi dilema dalam memproduksi bahan pangan berbahan baku kedelai (termasuk tempe), karena harganya yang melambung yaitu, dari Rp 2.500,00 (tahun 2004) menjadi Rp 8.000,00 (tahun 2009) / kg. Penurunan harga kedelai sudah tidak memungkinkan lagi karena saat ini kedelai selain diperebutkan sebagai bahan pangan (food), juga untuk pakan (feed). Untuk itu perlu dicari alternatif lain, yaitu dengan menggali potensi bahan lokal yang murah dan melimpah di Indonesia sebagai alternatif pengganti kedelai sebagai sumber antioksidan alami khususnya isoflavon (Ariani 2001)

Handajani et al. (2008) menyatakan bahwa Indonesia mempunyai banyak jenis legume yang beberapa diantaranya belum dimanfaatkan secara optimal. Salah satu jenis legume yang cocok dibudidayakan di Indonesia dan dapat berfungsi sebagai bahan pangan tetapi produk olahannya masih jarang dikonsumsi yaitu koro hitam (*Lablab purpureus*), koro kratok (*Phaseolus lunatus*), dan kedelai hitam (*Glycine soja*).

Dalam rangka pengembangan senyawa antioksidan alami khususnya isoflavon maka perlu dilakukan penelitian tentang optimasi produksi senyawa antioksidan dari koro hitam, koro kratok, dan kedelai hitam dan produk tempunya serta karakterisasi kandungan isoflavonnya. Dipilihnya koro hitam, koro kratok dan kedelai hitam sebagai alternatif obyek penelitian sumber isoflavon karena isoflavon merupakan metabolit sekunder yang banyak disintesis oleh tanaman namun tidak disintesis oleh mikroorganisme. Koro hitam, koro kratok, dan kedelai hitam merupakan spesies dari familia leguminoceae sehingga dimungkinkan juga mengandung isoflavon seperti yang dijumpai pada kedelai.

Selama ini tempe kedelai yang dikonsumsi oleh masyarakat adalah tempe hasil fermentasi kedelai selama 48 jam. Lama waktu fermentasi tersebut merupakan lama

waktu fermentasi kedelai untuk menghasilkan tempe yang paling optimum dari sisi cita rasa untuk dikonsumsi, tetapi lama waktu fermentasi yang optimum untuk menghasilkan ekstrak antioksidan khususnya isoflavon yang optimum belum diketahui. Kedelai hitam, koro hitam, dan koro kratok mempunyai ukuran biji yang hampir sama dari ukuran biji kedelai, untuk itu perlu diteliti lama waktu fermentasi untuk menghasilkan ekstrak antioksidan khususnya isoflavon yang optimum. Penelitian ini akan difokuskan pada optimasi produksi senyawa antioksidan khususnya isoflavon dengan variasi lama waktu fermentasi baik pada biji kedelai dan produk tempunya maupun pada biji koro hitam, koro kratok serta kedelai hitam dan produk tempunya.

Untuk memperoleh zat antioksidan alami, dapat dilakukan dengan cara ekstraksi tanaman menggunakan pelarut organik seperti, heksana, benzena, etil eter, kloroform, etanol atau metanol. Metanol 90 % merupakan pelarut optimum untuk mengekstrak isoflavon dari kedelai, namun penggunaannya untuk skala komersial masih perlu dikaji lebih lanjut karena bersifat toksik. Penelitian dengan menggunakan pelarut etanol untuk ekstraksi diharapkan dapat mengganti metanol untuk menghasilkan ekstrak antioksidan alami secara komersial, karena kepolaran etanol mendekati metanol dan relatif tidak beracun (Ariani dan Hastuti 2009). Untuk selanjutnya pada penelitian ini juga akan difokuskan pada ekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol.

Tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah: Mengetahui lama waktu fermentasi yang optimum untuk menghasilkan ekstrak etanol tempe berbahan baku kedelai hitam, koro hitam dan koro kratok dengan aktivitas antioksidan yang optimum pada perlakuan fermentasi (0, 1, 2, 3, 4 hari). Mengetahui Isoflavon jenis apa saja yang terkandung dalam tempe berbahan baku koro hitam, koro kratok serta kedelai hitam dan produk tempunya berdasarkan variasi lama waktu fermentasi (0, 1, 2, 3, dan 4 hari). Mengetahui aktivitas antioksidan tempe berbahan baku koro hitam, koro kratok serta kedelai hitam dan produk tempunya bila dibandingkan dengan ekstrak etanol dari kedelai dan produk tempunya serta beberapa antioksidan alami (α -tokoferol, β -karoten, dan asam askorbat) maupun antioksidan sintesis (BHT).

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada pertengahan bulan Maret sampai Juni 2009. Laboratorium Program Kimia P.MIPA FKIP UNS, Surakarta. Sub Laboratorium Biologi Pusat MIPA UNS, Surakarta, dan Laboratorium Kimia Organik F.MIPA UGM, Yogyakarta.

Prosedur kerja

Pembuatan tempe

Pembuatan tempe kedelai berbahan baku kedelai kuning Madura sebagai berikut: Sebelum difermentasi, kedelai mengalami serangkaian perlakuan yang meliputi: Persiapan bahan dan sortasi, Penyiapan bahan baku berupa

kedelai kuning Madura dan kedelai 500 gr dipilih biji-biji yang besar, licin dan mengkilat kulitnya. Perendaman dilakukan dengan merendam 500 gr kedelai kuning Madura dalam 1000 mL air bersih selama 24 jam, dengan penggantian air rendaman setiap 8 jam. Pengupasan kulit dilakukan untuk menghasilkan biji yang bersih sekaligus mempermudah penetrasi miselium kapang disaat terjadi fermentasi. Biji direbus dalam air sebanyak 1000 mL selama 45 menit, kemudian ditiriskan dan diangin-anginkan sampai biji kedelai dalam keadaan lembab (tidak terlalu basah). Setelah sampel dalam keadaan tidak terlalu basah, ditaburi ragi atau Inokulum sebanyak 0,5 gr untuk 500 gr sampel. Inokulum yang digunakan produk dari LIPI dengan merek RAPRIMA. Sampel yang sudah diberi inokulum dicampur dengan rata kemudian dibungkus dengan menggunakan daun pisang dan diperam selama 24, 48, 72, 96 jam dalam suhu kamar (27°C) dan terbentuklah tempe kedelai.

Pembuatan tempe berbahan baku koro hitam dari Wonogiri, kedelai hitam dan koro kratok dari Solo sebagai berikut: Tahap pertama dimulai dengan penyiapan bahan baku yaitu biji koro hitam (*Lablab purpureus*), koro kratok (*Phaseolus lunatus*), kedelai hitam (*Glycine soja*) masing-masing 500 g. Perendaman dilakukan dengan merendam 500 g biji koro hitam, koro kratok dan kedelai hitam dalam 1000 mL air bersih selama 3 x 24 jam, dengan penggantian air rendaman sebanyak tiga kali dalam 24 jam, untuk menghilangkan senyawa asam sianida (HCN). Pengupasan kulit dilakukan untuk menghasilkan biji yang bersih sekaligus mempermudah penetrasi miselium kapang disaat terjadi fermentasi. Pemasakan dilakukan dengan cara mengukus biji koro hitam, koro kratok dan kedelai hitam selama satu jam, kemudian ditiriskan dan diangin-anginkan. Setelah sampel dalam keadaan tidak terlalu basah, ditaburi ragi/inokulum. Bahan inokulum yang digunakan dari produk LIPI dengan merk RAPRIMA. Sampel yang sudah diberi inokulum dicampur dengan rata, kemudian dibungkus dengan menggunakan daun pisang dan diperam selama 24, 48, 52, 96 jam dalam suhu kamar (27oC) dan terbentuklah tempe koro hitam, tempe koro kratok dan tempe kedelai hitam.

Ekstraksi isoflavon dengan metode maserasi

Sebanyak 100gr sampel diblender hingga terbentuk bubur, kemudian dimaserasi dalam 250 mL etanol 70 % selama 24 jam, kemudian disaring dan filtratnya ditampung. Residu ditambah dengan 100 mL etanol 70 %, kemudian dimaserasi selama 24 jam, kemudian disaring dan filtratnya ditampung. Residu kedua ditambah dengan 100 mL etanol 70 %, lalu di saring lagi. Filtrat hasil maserasi kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental di oven selama 30 menit dengan suhu 50oC sehingga diperoleh ekstrak etanol. Ekstrak etanol yang dihasilkan kemudian diidentifikasi isoflavonnya dengan metode HPLC.

Metode identifikasi isoflavon

Identifikasi isoflavon dengan menggunakan metode HPLC dilakukan dengan pengkondisian instrumen HPLC dan pembuatan larutan sampel. Larutan sampel dibuat

dengan mengambil 1 mg ekstrak etanol hasil ekstraksi, lalu masing-masing dilarutkan dalam etanol 10 mL. Larutan kemudian disentrifuge lalu diambil 20 µL dengan alat injeksi. Selanjutnya sampel diinjeksikan ke dalam HPLC setelah pengkondisian HPLC selesai. Menganalisis kromatogram HPLC dengan menggunakan pembanding kromatogram isoflavon standar yang terdiri dari daidzein, genistein, glisitein dan faktor-2. Adapun kondisi HPLC adalah sebagai berikut: Panjang Kolom: 10 cm, Jenis Kolom: Lichrosper (R) 100 RP-18 (non polar), Fase Gerak: metanol:asam asetat 0,02 (57,5%; 42,5%), Volume Injeksi: 20 µL, Detektor: sinar UV pada panjang gelombang 265 nm, Suhu Oven: suhu kamar

Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

Pembuatan Larutan DPPH; Pembuatan larutan DPPH dengan menimbang kristal sebanyak 7,88 mg DPPH dan dilarutkan dalam metanol 100 mL sehingga diperoleh konsentrasi 0,2 mM sebagai larutan kontrol. Pengukuran absorbansi larutan DPPH dilakukan dengan memipet 600 µL pelarut (metanol) ke dalam kuvet dan ditambahkan larutan DPPH sampai volume 3 mL kemudian ditutup dan dikocok sampai homogen warnanya. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang (λ) 400-600 nm dan mencatat absorbansinya pada puncak panjang gelombang 517 nm sebagai absorbansi kontrol.

Pembuatan Larutan Sampel; Pembuatan larutan uji dengan menimbang ekstrak sebanyak 2 mg dan melarutkan ke dalam etanol 4 mL untuk membuat larutan uji dengan konsentrasi 100 ppm. Kemudian pengukuran antioksidan bahan uji digunakan metode yang sama, dimana 600 µL pelarut diganti dengan 600 µL larutan uji (sampel). Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang (λ) 400-600 nm dan mencatat absorbansinya pada puncak panjang gelombang mendekati 517nm sebagai absorbansi sampel.

Pengukuran kadar antioksidan

Aktivitas antiradikal dihitung dengan metode DPPH dimana sampel direaksikan dengan larutan DPPH. Aktivitas antiradikal diperlihatkan pada sistem yang warnanya berubah dari ungu menjadi kekuningan.

Perubahan warna larutan menunjukkan aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH dan dapat diukur dengan perbedaan absorbansi yang dihasilkan pada sampel dibandingkan dengan kontrol. Aktivitas antiradikal dinyatakan dalam bentuk persen penangkapan radikal DPPH dan dihitung dengan persamaan (Yen dan Chen 1995).

$$\% \text{ aktivitas antioksidan} = \left(1 - \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \right) \times 100 \%$$

Nilai 0% berarti tidak mempunyai aktivitas antiradikal bebas atau antioksidan, sedangkan nilai 100% berarti peredaman total dan pengujian perlu dilanjutkan dengan pengenceran larutan uji untuk melihat batas konsentrasi aktivitasnya.

Analisis data

Analisis data dengan dua faktor yaitu jenis bahan dasar pembuat tempe dan lama fermentasi, menggunakan program SPSS *version 15*. Analisis data pada Program SPSS tersebut adalah analisis data berupa *General Linear Model– Univariate*. Analisis data dengan satu faktor yaitu jenis bahan dasar, menggunakan program SPSS *version 15*. Analisis data pada Program SPSS tersebut adalah analisis data berupa *Compare Means – One Way Anova*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil fermentasi aneka legume dan produk tempenya

Biji kedelai hitam, koro hitam dan koro kratok setelah mengalami serangkaian perlakuan sebelum terjadi proses fermentasi, antara lain: persiapan bahan dan sortasi, perendaman, pengupasan kulit, pemasakan biji koro, penambahan inokulum dan yang terakhir pemeraman, dari proses diatas didapatkan hasil (Tabel 1):

Biji kedelai hitam dan produk tempenya

Fermentasi hari ke-0: Kedelai hitam berupa biji-biji yang sudah lunak, ada yang terbelah menjadi dua dan ada yang utuh serta ada penambahan inokulum tetapi tidak difermentasikan lebih lanjut, sehingga bentuknya seperti kedelai kukus.

Fermentasi hari ke-1: Pada biji kedelai hitam sudah tumbuh sedikit miselium meski belum merata pada permukaan, dan belum dapat diiris (akan terlepas satu persatu), sehingga diperkirakan kandungan isoflavon belum optimum.

Fermentasi hari ke-2: Miselium jamur yang berwarna putih sudah tumbuh merata dan kompak sehingga sudah terbentuk tempe seperti halnya tempe kedelai kuning dan diiris tidak pecah, sehingga diperkirakan kandungan isoflavon sudah ada.

Fermentasi hari ke-3: Miselium semakin berwarna putih merata menutupi biji-biji kedelai hitam dan kompak, diiris tidak pecah dan belum terlihat warna kuning pada tepinya seperti halnya tempe kedelai, sehingga diperkirakan kandungan isoflavon sudah optimum.

Fermentasi hari ke-4: Miselium mengalami perubahan warna menjadi kuning pada bagian tepi tempe dan menyusut kekompakannya, diiris tidak pecah, sehingga diperkirakan kandungan isoflavonnya pun berkurang.

Biji koro hitam dan produk tempenya

Fermentasi hari ke-0: Pada biji koro hitam sama dengan biji kedelai hitam yaitu biji-biji yang lunak, ada yang terbelah ada yang utuh, ada penambahan inokulum dan tidak difermentasikan lebih lanjut dan bentuknya seperti kedelai kukus.

Fermentasi hari ke-1: pada biji koro hitam sudah tumbuh sedikit miselium dan belum merata pada permukaan biji, sehingga tidak dapat diiris (terlepas satu-persatu), diperkirakan kandungan isoflavon belum optimum.

Fermentasi hari ke-2: Miselium berwarna putih dan tumbuh merata, serta kompak sehingga sudah berbentuk

tempe, diiris tidak pecah, dan diperkirakan kandungan isoflavon sudah ada.

Fermentasi hari ke-3: Miselium makin berwarna putih merata menutupi biji-biji koro hitam dan kompak, diiris tidak pecah dan belum terlihat warna kuning pada tepi tempe, dan diperkirakan kandungan isoflavon sudah optimum.

Fermentasi hari ke-4: Miselium mengalami penyusutan dan perubahan warna menjadi kuning pada bagian tepi tempe, diiris tidak pecah, dan diperkirakan kandungan isoflavonnya juga mulai berkurang.

Biji koro katrok dan produk tempenya

Fermentasi hari ke-0: sama seperti kedelai hitam dan koro hitam, biji koro katrok berupa biji-biji yang lunak, ada yang terbelah dan utuh serta ada penambahan inokulum dan tidak difermentasikan lebih lanjut.

Fermentasi hari ke-1: sudah tumbuh miselium pada permukaan biji koro meskipun belum merata dan kompak, diiris akan pecah (terlepas satu persatu), dan diperkirakan kandungan isoflavon belum optimum.

Fermentasi hari ke-2: Miselium yang berwarna putih tumbuh merata dan kompak sehingga sudah berbentuk tempe dan diiris tidak pecah, dan diperkirakan kandungan isoflavon sudah ada.

Fermentasi hari ke-3: Miselium semakin berwarna putih, merata menutupi biji koro dan kompak, diiris tidak pecah dan belum terlihat warna kuning pada tepi tempe, dan diperkirakan kandungan isoflavon sudah optimum.

Fermentasi hari ke-4: Miselium mengalami penyusutan dan perubahan warna menjadi kuning pada bagian tepi tempe, diiris tidak pecah, dan diperkirakan kandungan isoflavonnya juga mulai berkurang.

Dari ketiga jenis legume dan produk tempenya, hasil fermentasi yang optimum untuk menjadi tempe adalah pada fermentasi hari ke-3, karena pada hari tersebut sudah nampak adanya miselium yang berwarna putih yang tumbuh merata dan kompak sehingga biji-biji tertutupi dan pada saat tempe diiris tidak pecah yang disebabkan adanya miselium yang mengikat dan menembus biji-biji legume yang lunak, selain itu pada fermentasi hari ke-3 pada bagian tepi tempe belum terlihat adanya warna kuning yang menunjukkan adanya penyusutan miselium dan dimungkinkan kandungan isoflavonnya paling optimum (Faktor-2) karena hasil fermentasinya juga optimum.

Hasil fermentasi tempe dari jenis legume yang paling optimum adalah hari ke-3 dimana hasil tersebut sama dengan hasil fermentasi tempe pada kedelai kuning Madura.

Hasil ekstraksi aneka legume dan produk tempenya

Tempe hasil fermentasi hari ke-0, 1, 2, 3, 4 diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Etanol 70% diketahui mampu mengekstrak isoflavon secara optimal (Kudou et al. 1991), sedangkan maserasi merupakan cara ekstraksi senyawa organik yang mudah dan sederhana. Bahan yang akan diekstrak dipotong dengan ukuran tipis, kemudian diblender hingga berbentuk bubuk tempe dan dimaserasi dalam pelarut etanol selama 24 jam, dan diperoleh hasil berupa filtrat yang berwarna kuning

dari senyawa protein termasuk senyawa isoflavon yang masih kompleks, selanjutnya filtrat dipisahkan dari residu untuk diproses lebih lanjut menjadi ekstrak yang murni. Filtrat yang diperoleh selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50° C sampai didapatkan ekstrak yang pekat atau hampir semua etanol teruapkan. Ekstrak ini selanjutnya disimpan dalam oven suhu 40°C (untuk menguapkan pelarut yang masih tersisa) dan ditimbang sehingga diperoleh massa hasil ekstraksi. Hasil ekstraksi seperti yang tercantum dalam Tabel 2.

Dari Tabel 2 dapat diketahui bahwa semakin lama waktu fermentasi semakin banyak massa ekstrak etanol yang dihasilkan. Massa ekstrak etanol terbanyak pada tempe kedelai hitam, koro kratok, koro hitam dan kedelai kuning terjadi fermentasi hari ke-4, yaitu 9,658 g/100g tempe; 3,172 g/100g tempe; 2,513 g/100g tempe; dan 5,192 g/100g tempe yang menunjukkan massa ekstrak pada kedelai hitam lebih banyak daripada koro kratok, koro hitam dan kedelai kuning. Demikian juga pada massa hasil ekstraksi dari biji kedelai hitam mentah lebih banyak dibanding biji koro hitam, biji koro kratok dan kedelai kuning mentah yaitu 4,541 g; 3,93 g; 4,215 g; dan 3,422 g. Hal ini disebabkan spesies tanaman yang diekstraksi memiliki kandungan materi yang tidak sama meski dalam 1 jenis legume, ini terlihat pada warna hasil ekstraksi yang dihasilkan biji mentah. Pada kedelai, koro kratok, dan koro hitam hasil ekstraksi berwarna hitam karena masih mengandung senyawa sianida sedangkan hasil ekstraksi kedelai kuning mentah berwarna coklat tua, karena kemungkinan kandungan sianidanya relative lebih sedikit dan hilang pada saat perendaman selama 24 jam dan pengukusan. Hasil ekstraksi biji yang sudah difermentasikan berwarna kuning muda sampai coklat tua karena senyawa sianidanya sudah hilang pada saat perendaman selama 3 x 24 jam sehingga aman untuk dikonsumsi.

Berdasarkan Tabel 2 dapat disimpulkan bahwa massa hasil ekstraksi dari beberapa legume ternyata bervariasi, yang dapat disebabkan karena perbedaan sifat kekerasan atau kelunakan biji, kepadatan komponen zat, serta kandungan zat yang ada dalam biji. Menurut Handajani dan Atmaka (1993), bahwa faktor varietas, faktor daerah tempat tumbuh, musim tanam dan musim panen ternyata memberikan pengaruh yang cukup bervariasi terhadap sifat fisis dan khemis dari biji kacang-kacangan.

Hasil identifikasi isoflavon dengan metode HPLC

Analisis dengan HPLC bertujuan untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa isoflavon daidzein, glisitein, genistein dan faktor-2 dalam sampel tempe kedelai hitam, koro hitam dan koro kratok pada berbagai waktu fermentasi. Seperti metode kromatografi yang lain, analisis HPLC dilakukan dengan membandingkan waktu retensi dari senyawa isoflavon standar dengan waktu retensi dari masing-masing sampel. Adanya puncak-puncak yang memiliki waktu retensi relatif sama dengan senyawa isoflavon daidzein, glisitein, genistein dan faktor-2 standar menunjukkan bahwa dalam sampel tersebut terdapat kandungan isoflavon daidzein, glisitein, genistein dan faktor-2. Penentuan waktu retensi senyawa daidzein,

glisitein, genistein dan faktor- 2 standar dilakukan pada hari yang sama dengan penentuan waktu retensi dari masing-masing sampel untuk meminimalkan perbedaan kondisi.

Analisis kuantitatif senyawa isoflavon dilakukan dengan cara menghitung area di bawah puncak luas. Konsentrasi senyawa isoflavon daidzein, glisitein, genistein dan faktor-2 dapat diketahui dengan mengalikan persentase luas masing-masing senyawa isoflavon dalam kromatogram dengan massa ekstrak etanol yang dihasilkan. Hasil identifikasi senyawa isoflavon berdasarkan kromatogram pada kedelai hitam, koro hitam, koro kratok dan kedelai kuning dapat dilihat pada Tabel 3.



















Berdasarkan Tabel 3 dapat diketahui bahwa: (i) Tempe kedelai hitam mentah memiliki kandungan isoflavon genistein saja. Hasil fermentasi hari ke-0, 1, 2 memiliki kandungan isoflavon Faktor-2, daidzein, glisitein dan genistein. Hasil fermentasi hari ke-3 mengandung isoflavon daidzein, glisitein dan genistein sementara hasil fermentasi hari ke-4 tidak mengandung isoflavon Faktor-2, daidzein, glisitein dan genistein. (ii) Tempe koro hitam mentah memiliki kandungan isoflavon genistein saja. Hasil fermentasi hari ke-0, 1, 4 mempunyai kandungan isoflavon Faktor-2, daidzein, glisitein dan genistein. Hasil fermentasi hari ke-2 hanya mengandung isoflavon Daidzein saja dan hasil fermentasi hari ke-4 kandungan isoflavonnya adalah Faktor-2, daidzein, dan glisitein

Tempe koro kratok mentah memiliki kandungan isoflavon daidzein saja. Hasil fermentasi hari ke-0 mempunyai kandungan isoflavon Daidzein, Glisitein, dan genistein. Hasil fermentasi hari ke-1 mengandung isoflavon daidzein dan glisitein. Hasil fermentasi hari ke-3 mengandung isoflavon Faktor-2 dan genistein. Sementara itu, hasil fermentasi hari ke-4 mengandung isoflavon glisitein dan genistein.

Tempe kedelai kuning mentah memiliki kandungan isoflavon daidzein, glisitein, dan genistein. Hasil fermentasi hari ke-0 sampai dengan hasil fermentasi hari ke-4 kandungan isoflavonnya optimum yaitu terdiri dari Faktor-2, daidzein, glisitein dan genistein.

Dari data hasil identifikasi isoflavon total pada Tabel 3. dapat dijelaskan bahwa pada kedelai hitam dan koro hitam mentah hanya memiliki kandungan genistein, pada koro kratok mentah hanya memiliki kandungan daidzein dan pada kedelai kuning mentah memiliki kandungan daidzein, glisitein dan genistein. Dari keempat sampel legume (kedelai kuning, kedelai hitam, koro kratok dan koro hitam) mentah tidak ditemukan faktor-2, hal tersebut dimungkinkan karena pada biji mentah tidak terjadi proses fermentasi sehingga faktor-2 belum terbentuk. Menurut Barz dan Papendorf (1991) faktor-2 dapat terbentuk selama proses fermentasi dengan *Rhizopus oligosporus* terjadi biokonversi lebih lanjut dari daidzein dan glisitein menjadi faktor-2. Biosintesa faktor-2 juga dapat terjadi melalui demetilasi glisitein oleh bakteri *Brevibacterium epidermis* dan *Micrococcus luteus*, dan melalui reaksi hidroksilasi daidzein oleh bakteri *microbacterium arbosrescens* (Barz et al. 1993), dan berdasarkan Tabel 3 dapat dijelaskan pula bahwa:

Tabel 1. Hasil pengamatan biji kedelai hitam, koro hitam dan koro kratok serta produk tempenya

Perlakuan	Kedelai hitam			Koro hitam			Koro kratok		
	Foto	Warna	Aroma	Foto	Warna	Aroma	Foto	Warna	Aroma
Biji mentah		Hitam	Khas kedelai		Hitam	Tidak beraroma		Hitam	Tidak beraroma
Kukus (fermentasi hari ke-0)		Putih	Khas kedelai		Putih	Khas kedelai rebus		Putih	Khas kedelai rebus
Fermentasi hari ke-1		Putih agak kuning dan ada warna hitam	Khas tempe kedelai		Putih agak hitam	Khas tempe kedelai		Putih agak hitam	Khas tempe kedelai
Fermentasi hari ke-2		Putih kuning kehitaman	Khas tempe kedelai		Putih	Khas tempe kedelai		Putih	Khas tempe kedelai
Fermentasi hari ke-3		Putih	Khas tempe kedelai		Putih	Khas tempe kedelai		Putih	Khas tempe kedelai
Fermentasi hari ke-4		Putih	Sedikit berbau amoniak		Putih	Sedikit berbau amoniak		putih	Sedikit berbau amoniak

Kedelai hitam, meskipun mempunyai massa ekstrak etanol yang optimum pada fermentasi hari ke-4, tetapi jumlah kandungan isoflavon yang optimum terdapat pada fermentasi 0, 1, 2, 3 hari sedangkan pada fermentasi hari ke-4 kandungan isoflavon (Faktor-2, daidzein, genistein dan glisitein) menghilang atau tidak muncul, hal tersebut kemungkinan dapat terjadi karena pada fermentasi hari ke-4 pertumbuhan kapang sudah mengalami penurunan dan sudah terjadi pembusukkan pada tempe sehingga kandungan isoflavonnyapun menurun atau menghilang karena isoflavon sebagai antioksidan memiliki sifat mudah teroksidasi dan mudah bereaksi dengan radikal bebas sehingga kandungan isoflavon tidak dapat muncul karena sudah terurai menjadi senyawa lain yang belum diketahui.

Koro hitam, seperti halnya kedelai hitam massa ekstrak etanol koro hitam yang tertinggi pada fermentasi hari ke-4, tetapi jumlah kandungan isoflavon yang optimum terdapat pada hasil fermentasi hari ke-0, 1, 3, 4, hari. Kandungan isoflavon Faktor-2, glisitein dan genistein tidak ditemukan pada hasil fermentasi hari ke-2, hal tersebut dapat terjadi karena pada Faktor-2 fermentasi hari ke-1 kadarnya sudah menurun dibanding hari ke-0, sampai pada fermentasi hari ke-3 dan 4, dan pada fermentasi hari ke-2 kemungkinan tidak muncul dapat disebabkan karena dalam proses pengolahannya menjadi tempe yaitu senyawa isoflavon glukosidanya sudah larut pada saat proses perendaman karena perendaman biji koro hitam untuk dibuat tempe harus direndam 3 x 24 jam (selama 3 hari) dengan pergantian air 3 kali dalam 1 hari sampai air menjadi jernih sedangkan pada kedelai hitam (sama seperti kedelai kuning) hanya direndam 1 x 24 jam (selama 1 hari), sehingga dengan perendaman yang lama menyebabkan isoflavon glukosidanya banyak yang hilang, demikian juga pada genistein tidak muncul pada fermentasi hari ke-2 dan 3, pada fermentasi hari ke-4 dapat ditemukan atau muncul kembali dengan kadar mengalami penurunan, hal tersebut dapat juga disebabkan karena faktor perendaman yang lama seperti diatas atau faktor lain yaitu ekstrak etanolnya sudah teroksidasi atau terurai menjadi senyawa lain.

Koro kratok mempunyai massa ekstrak etanol yang terbanyak pada hasil fermentasi hari ke-4, tetapi jumlah kandungan isoflavon yang optimum (daidzein, glisitein, genistein) terdapat pada hasil fermentasi hari ke-0 yang mempunyai kadar konsentrasi faktor-2 yang kecil sehingga tidak muncul sampai pada fermentasi hari ke-1, kemudian dengan bertambahnya jumlah kapang pada fermentasi hari ke-2, faktor-2 dapat terlihat atau muncul dengan kadar konsentrasi yang kecil pula dan mengalami penurunan pada fermentasi hari ke-3 dan hari ke-4. Demikian pula pada kandungan isoflavon glisitein dan genistein, pada fermentasi hari ke-0, 1, 2 nampak terlihat dengan kadar yang kecil kemudian pada fermentasi hari ke-3 dan hari ke-4 mengalami penurunan sehingga tidak nampak atau menghilang, hal tersebut dapat disebabkan karena kadarnya kecil atau sedikit pada awal fermentasi yang disebabkan karena faktor perendaman yang lama sehingga isoflavon glukosidanya banyak yang hilang dan pada saat dibuat menjadi tempe meskipun dipengaruhi pertumbuhan kapang akan menghasilkan isoflavon aglukon yaitu daidzein, glisitein, genistein dan terutama faktor-2 tidak dapat muncul.

Pada kedelai kuning sebagai kontrol/pembanding dalam penelitian ini, mempunyai massa ekstrak etanol optimum pada hasil fermentasi hari ke-4, dan memiliki kandungan isoflavon optimum (faktor-2, daidzein, glisitein, genistein) pada fermentasi hari ke-0, 1, 2, 3, 4 karena pada biji kedelai kuning dan produk tempenya memang sudah diketahui adanya kandungan senyawa isoflavon yang berkhasiat sebagai antioksidan.

Berdasarkan data hasil identifikasi senyawa isoflavon total pada Tabel 3. dapat dijelaskan bahwa kedelai hitam memiliki kandungan jenis-jenis isoflavon rata-rata yang lebih tinggi dibandingkan dengan koro hitam dan koro kratok serta kedelai kuning sebagai kontrolnya. Kandungan isoflavon total pada kedelai hitam fermentasi hari ke-2 (4,6202mg/100 g sampel) lebih tinggi dibanding kedelai kuning hasil fermentasi hari ke-2 yaitu 1,8104 mg/100 g sampel, sedangkan koro kratok paling tinggi pada fermentasi hari ke-3 yaitu 1,7252 mg/100 g sampel dan koro hitam yang paling tinggi pada fermentasi hari ke-1 yaitu 0,6099 mg/100 g sampel. Dari data tersebut dapat diartikan bahwa kedelai hitam dan kedelai kuning sama dalam menghasilkan jenis isoflavon dan sama terjadi dalam fermentasi hari ke-2 tetapi berbeda kadar isoflavon totalnya, dimana kedelai kuning dan produk tempenya sudah diketahui banyak mengandung jenis isoflavon dibandingkan kedelai hitam. Kandungan isoflavon pada jenis legume/kacang-kacangan dipengaruhi varietas, waktu tanam dan lokasi penanaman (Mazur et al. 1995). Kondisi pertumbuhan, varietas, lokasi dan waktu tanam membedakan jumlah jenis senyawa isoflavon (Harbone 1996). Dari berbagai tanaman, kandungan isoflavon yang lebih tinggi terdapat pada kelompok Leguminosae dan tidak terdapat pada organisme seperti bakteri, alga, jamur, lumut (Markham 1988).

Banyaknya kandungan jenis isoflavon pada masing-masing sampel yaitu kedelai hitam, kedelai kuning, koro hitam dan koro kratok ditampilkan pada Gambar 2.

Hasil identifikasi senyawa isoflavon dengan metode HPLC berdasarkan dari ketiga macam legume diatas, jumlah kandungan isoflavon yang muncul berbeda pada tiap hasil fermentasi (perlakuan) dan pada tiap jenis legume (sampel), hal ini dapat disebabkan karena beberapa faktor diantaranya kadar isoflavon yang kecil atau sedikit pada awal fermentasi sehingga tidak nampak pada fermentasi berikutnya, dan seiring dengan bertambahnya misellium pada fermentasi berikutnya dapat terlihat meski dengan kadar yang kecil atau sedikit; atau dapat juga disebabkan karena proses perendaman yang lama pada pembuatan tempe pada koro; faktor lain dari ketidak nampakkan isoflavon pada akhir fermentasi dapat juga terjadi karena sudah terurai menjadi zat lain, atau disebabkan karena pada spesies tanaman tersebut tidak memiliki kandungan isoflavon seperti yang dijumpai pada kedelai kuning, sehingga perlu penelitian lebih lanjut mengenai hal tersebut.

Aktivitas antioksidan dengan metode DPPH hasil uji

Pada pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (2,2 difenil 1 picril hidrazil). Metode yang dipilih adalah metode DPPH karena sederhana, mudah,

cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel. Metode aktivitas antiradikal bebas DPPH merupakan metode terpilih untuk menapis aktivitas antioksidan bahan alam (Amrun et al. 2007). Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning.

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan melakukan 3 kali pengulangan, kemudian dari 3 kali pengulangan tersebut diambil rata-rata aktivitas antioksidan sampel. Hasil uji aktivitas antioksidan dapat dilihat dalam Lampiran, dan dari hasil pengukuran rata-rata diperoleh data yang disajikan dalam Tabel 4.

Dari Tabel 4 dapat dijelaskan, bahwa: Dari 3 kali pengulangan, hasil uji aktivitas antioksidan diperoleh rata-rata aktivitas antioksidan sampel tempe kedelai hitam, tempe koro hitam, tempe koro kratok dan tempe kedelai kuning hasil fermentasi 0, 1, 2, 3, 4 hari.

Pada kedelai hitam, dari 3 kali pengulangan diperoleh hasil fermentasi hari ke-0, 1, 2, 3, 4 berturut-turut adalah 48,10%; 68,29%; 77,33%; 82,49%; 74,81% yang berarti menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan yang optimum terjadi pada fermentasi hari ke-3 setelah mengalami penurunan pada fermentasi hari ke-4.

Pada koro hitam, dari 3 kali pengulangan diperoleh hasil fermentasi hari ke-0, 1, 2, 3, 4 berturut-turut adalah 81,44%; 69,30%; 67,19%; 77,90%; 69,34% yang berarti juga menunjukkan aktivitas antioksidan yang optimum terjadi pada fermentasi hari ke-3 yang kemudian mengalami penurunan juga pada fermentasi hari ke-4.

Pada koro kratok, dari 3 kali pengulangan diperoleh hasil fermentasi hari ke-0, 1, 2, 3, 4 berturut-turut adalah 62,04%; 56,25%; 56,44%; 65,12%; 59,09% yang berarti juga menunjukkan aktivitas antioksidan yang optimum terjadi pada fermentasi pada hari ke-3 dan mengalami penurunan pada fermentasi pada hari ke-4.

Dari Tabel 4 diketahui bahwa aktivitas antioksidan biji mentah pada koro kratok lebih tinggi dibanding kedelai kuning yaitu 76,49%; sedangkan aktivitas antioksidan kedelai hitam lebih rendah dibanding kedelai kuning yaitu 30,0%, hal ini kemungkinan disebabkan terhidrolisisnya senyawa isoflavon glukosida menjadi isoflavon bebas yang disebut aglukon oleh enzim α -glukosidase yang terdapat pada jenis legume yang dihasilkan oleh mikroorganisme selama fermentasi. Dari Tabel 4 juga menunjukkan bahwa rata-rata tempe hasil fermentasi 3 hari memiliki aktivitas antioksidan yang tertinggi, yaitu 81,43% pada tempe kedelai kuning, 82,49% pada tempe kedelai hitam, 77,90% pada tempe koro hitam dan 65,12% pada tempe koro kratok kemudian menurun pada fermentasi hari ke-4, hal ini dapat disebabkan karena adanya hidrolisis pada saat fermentasi atau kemungkinan disebabkan oleh reaksi lebih lanjut senyawa isoflavon menjadi senyawa lain yang aktivitasnya belum diketahui dan perlu dikaji lebih mendalam.

Dari Tabel 4 dapat juga diuraikan bahwa tingkat aktivitas antioksidan rata-rata kedelai hitam mentah menunjukkan hasil yang paling rendah dibandingkan dengan kedelai kuning, koro kratok dan koro hitam mentah, tetapi pada hasil fermentasi hari ke-3 kedelai hitam mempunyai tingkat aktivitas antioksidan yang paling tinggi

dibandingkan kedelai kuning, koro hitam dan koro kratok, hal ini disebabkan kemungkinan karena reaksi enzimatik yang mengubah senyawa isoflavon glukosida menjadi isoflavon aglukan terjadi secara optimum pada lama fermentasi hari ke-3 tersebut. Seperti telah diketahui, senyawa aglukan isoflavon memiliki aktivitas fisiologis yang lebih tinggi dibanding isoflavon glukosida.

Lama waktu fermentasi berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan senyawa isoflavon. Hal ini dapat dilihat dari hasil uji aktivitas antioksidan yang dilakukan. Terjadi kenaikan aktivitas antioksidan seiring bertambahnya waktu fermentasi, hingga mencapai maksimum pada hari ketiga.

Hasil uji aktivitas antioksidan optimum pada tempe kedelai hitam, koro hitam dan koro kratok berdasarkan lama waktu fermentasi dapat dianalisis dengan statistik program SPSS *version* 15, untuk mencari perbedaan yang nyata dari pengaruh lama waktu fermentasi terhadap aktivitas antioksidan yang dapat dilihat pada lampiran.

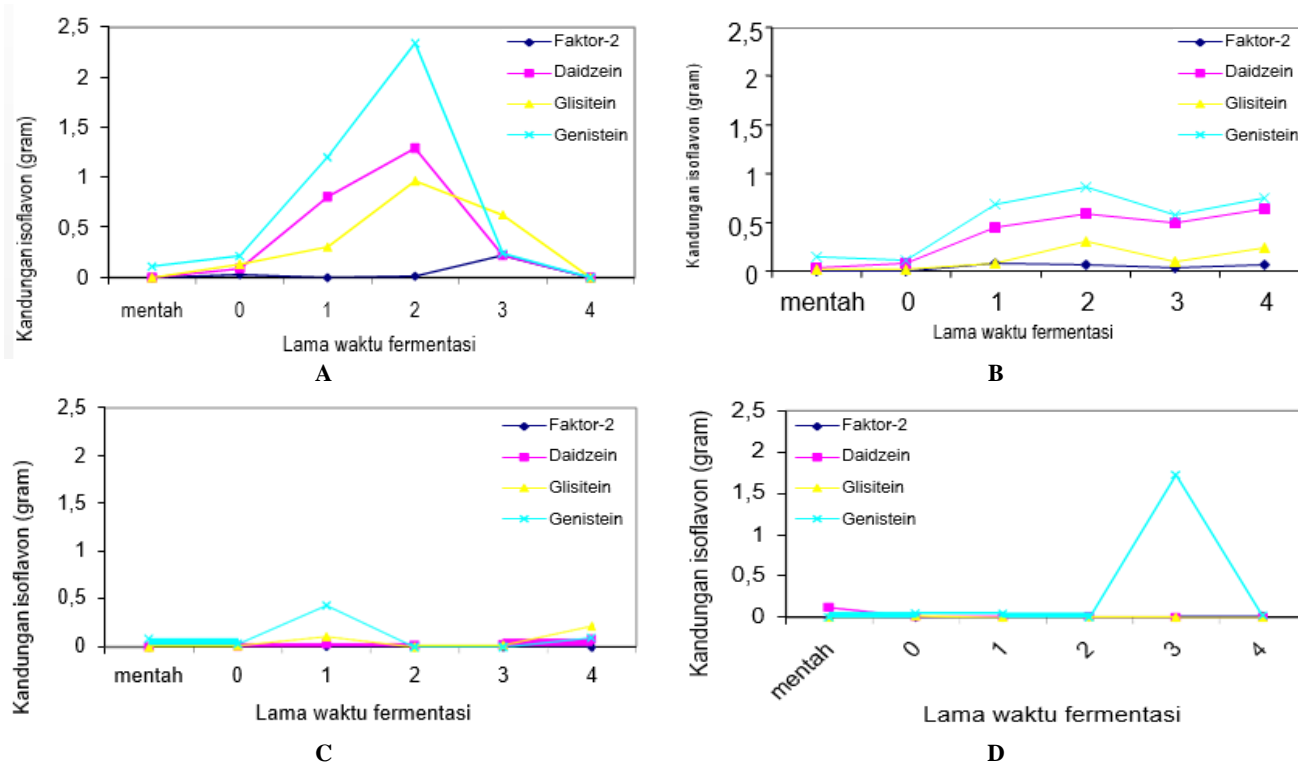
Tabel 4 menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan kedelai kuning, kedelai hitam, koro hitam dan koro kratok dipengaruhi lama waktu fermentasi. Berdasarkan perbedaan antar perlakuan, biji mentah koro kratok menunjukkan aktivitas antioksidan yang tertinggi diantara biji kedelai kuning mentah, biji kedelai hitam mentah dan biji koro hitam mentah. Pada hasil fermentasi hari ke-0 dan hasil fermentasi hari ke-2 aktivitas antioksidan kedelai kuning tidak menunjukkan beda nyata dibanding hasil fermentasi hari ke-1, 3 dan ke-4. Untuk koro hitam hasil fermentasi hari ke-1 dan fermentasi hari ke-4 aktivitas antioksidannya tidak menunjukkan beda nyata bila dibandingkan dengan hasil fermentasi biji mentah, fermentasi hari ke-0, 2, dan ke-3. Untuk kedelai hitam dan koro kratok pada biji mentah hingga fermentasi hari ke-4 memiliki aktivitas antioksidan yang menunjukkan perbedaan secara signifikan.

Berdasarkan perbedaan antar perlakuan, fermentasi hari ke-3 merupakan fermentasi yang optimum untuk menghasilkan aktivitas antioksidan tertinggi diantara fermentasi hari ke-0, 1, 2, 4. Pada fermentasi hari ke-3 tersebut tempe kedelai hitam memiliki aktivitas antioksidan yang tertinggi diikuti tempe kedelai kuning, tempe koro hitam dan tempe koro kratok, tetapi hasil aktivitas antioksidan antara tempe kedelai hitam dan tempe kedelai kuning menunjukkan beda nyata. Berdasarkan Tabel 4, juga dapat diketahui bahwa pada fermentasi hari ke-0 kedelai kuning, kedelai hitam, koro hitam dan koro kratok aktivitas antioksidannya mengalami kenaikan dibanding pada saat belum difermentasikan (mentah) kemudian menurun pada fermentasi hari ke-1 sampai fermentasi hari ke-2, setelah itu mengalami kenaikan pada fermentasi hari ke-3, kemudian menurun lagi pada fermentasi hari ke-4, kecuali pada kedelai hitam hasil uji aktivitas antioksidannya pada biji mentah sampai fermentasi hari ke-3 terus mengalami kenaikan kemudian menurun pada fermentasi hari ke-4 yang dimungkinkan sudah mulai terjadi pembusukkan yang ditandai dengan munculnya warna hitam misellium pada bagian tepi dan aroma busuk yang menyengat.

Hubungan antara aktivitas antioksidan yang tinggi pada beberapa jenis legume diatas tidak dipengaruhi oleh kadar

kandungan senyawa isoflavon yang optimum. Pada kedelai hitam, koro hitam, koro kratok serta kedelai kuning sebagai kontrol memiliki rata-rata aktivitas antioksidan yang tinggi pada fermentasi hari ke-3 tetapi kandungan isoflavon optimumnya tidak terjadi pada fermentasi hari ke-3. Pada kedelai hitam dan kedelai kuning kadar kandungan isoflavon optimum terjadi pada fermentasi hari ke-2, pada koro hitam kadar kandungan isoflavon optimum terjadi pada fermentasi hari ke-1, dan pada koro kratok kadar kandungan isoflavon optimum terjadi pada fermentasi hari ke-3. Ini menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan yang tinggi tidak selalu mempunyai kandungan isoflavon yang optimum pula, hal ini kemungkinan dapat disebabkan adanya senyawa-senyawa lain misalnya fenolik lain yang

bukan dalam golongan flavonoid yang terdapat dalam ekstrak etanol yang memiliki aktivitas seperti antioksidan atau dapat juga disebabkan adanya senyawa yang bukan isoflavon tetapi memiliki kemampuan seperti antioksidan atau kemungkinan karena faktor lain yaitu terjadi pada saat berlangsungnya proses fermentasi dimana enzim a-glukosidase cepat memecah glukosida menjadi agluron sehingga juga dapat menambah jumlah senyawa isoflavon. Sebaliknya, ada beberapa jenis kandungan isoflavon yang tinggi tetapi memiliki aktivitas antioksidan yang rendah, hal ini dapat dimungkinkan pada waktu proses ekstraksi, pengemasan hasil ekstraksi dan penyimpanan hasil ekstraksi sudah teroksidasi atau bereaksi dengan senyawa lain yang bersifat radikal bebas.



Gambar 1. Kandungan isoflavon. A. Tempe kedelai hitam, B. Tempe kedelai kuning, C. Tempe koro hitam, D. Tempe koro kratok

Tabel 2. Hasil ekstraksi biji legume dan produk tempenya

Sampel	Kedelai madura		Kedelai hitam		Kedelai kratok		Koro hitam	
	Massa (g)	Warna	Massa (g)	Warna	Massa (g)	Warna	Massa (g)	Warna
Biji mentah	3,422	Kuning muda	4,541	Hitam	3,293	Hitam	4,215	Hitam
Hasil fermentasi hari ke								
0	0,677	Kuning muda	1,113	Kuning	0,584	Coklat	0,354	Coklat
1	2,933	Kuning	4,386	Coklat	1,340	Coklat	1,650	Coklat
2	4,982	Kuning coklat	8,492	Coklat	0,768	Coklat tua	1,904	Coklat Tua
3	3,421	Coklat tua	8,43	Coklat tua	2,423	Coklat hitam	2,666	Coklat Hitam
4	5,192	Coklat tua	9,658	Coklat hitam	2,513	Coklat hitam	3,172	Coklat Hitam

Tabel 3. Hasil identifikasi Isoflavon total beberapa legume (100 g sampel)

Jenis sample	Lama waktu fermentasi (hari)	Kandungan isoflavon (g)				Isoflavon total (g)
		Faktor-2	Daidzein	Glisitein	Genistein	
Kedelai hitam	Mentah	-	-	-	0,1130	0,1130
	0	0,0321	0,0915	0,1325	0,2159	0,4722
	1	0,0097	0,8069	0,3051	1,2042	2,3259
	2	0,0161	1,2947	0,9670	2,3424	4,6202
	3	0,2250	0,2234	0,6562	0,2415	1,3461
	4	-	-	-	-	-
Koro hitam	Mentah	-	-	-	0,0937	0,0937
	0	0,0239	0,0105	0,0165	0,0344	0,0853
	1	0,0149	0,0401	0,1145	0,4404	0,6099
	2	-	0,0177	-	-	0,0177
	3	0,0085	0,0235	0,0251	-	0,0571
	4	0,0038	0,0884	0,2254	0,1043	0,4219
Koro kratok	Mentah	-	0,1237	-	-	0,1237
	0	-	0,0140	0,0202	0,0597	0,0939
	1	-	0,0151	-	0,0532	0,0683
	2	0,0089	0,0122	0,0090	-	0,0301
	3	0,0036	-	-	1,7252	1,7288
	4	0,0178	-	-	0,0241	0,0419
Kedelai kuning	Mentah	-	0,034	0,0092	0,1398	0,183
	0	0,0009	0,0752	0,0128	0,1057	0,1937
	1	0,083	0,4414	0,0838	0,6769	1,2021
	2	0,0637	0,5853	0,3058	0,8556	1,8104
	3	0,0246	0,4994	0,0909	0,5682	1,1585
	4	0,0575	0,6318	0,232	0,7549	1,6187

Tabel 4. Aktivitas antioksidan aneka legume dan produk tempnya dengan variasi lama waktu fermentasi

Sampel	Perlakuan (fermentasi hari)					
	Mentah	0 hari	1 hari	2 hari	3 hari	4 hari
Kedelai kuning	67,4500hi	76,0600kl	72,0833j	76,0567kl	81,4300m	77,1400l
Koro hitam	60,8000e	81,4400m	69,3000i	67,1900h	77,9033l	69,3400i
Kedelai hitam	30,0000a	48,1033c	68,2867hi	77,3267l	82,4867m	74,8133k
Koro kratok	76,4900kl	62,0367f	43,4067b	56,4400d	65,1200g	59,0900e

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada blok yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata dengan uji Duncan 5% (berlaku pada kolom yang sama)

Tabel 5. Perbandingan aktivitas antioksidan tempe beberapa legume dan sumber lainnya (%)

Sampel	Aktivitas antioksidan (%)
a-karoten	43,2533a
Tempe koro kratok (3hari)	65,1200b
Vitamin C	75,6200c
a-tokoferol	76,4100d
Tempe koro hitam (3 hari)	77,9033e
BHT	81,1567f
Tempe kedelai kuning (3 hari)	81,4300f
Tempe kedelai hitam (3hari)	82,4867g

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada blok yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata dengan uji Duncan 5% (berlaku pada kolom yang sama)

Hasil uji aktivitas antioksidan dengan pembandingan antioksidan alami dan antioksidan sintetik

Aktivitas antioksidan tempe kedelai hitam, tempe koro hitam, dan tempe koro kratok dapat kita uji dan dibandingkan dengan aktivitas antioksidan lain yang sudah ada yaitu α -tokoferol, β -karoten dan vitamin C sebagai antioksidan alami maupun BHT yang merupakan antioksidan sintesis, yang dapat dilihat pada Tabel 5. Berdasarkan Tabel 5 dapat diketahui bahwa aktivitas antioksidan tempe beberapa legume dan sumber lainnya menunjukkan tempe kedelai hitam 3 hari memiliki aktivitas antioksidan tertinggi (82,49%) dan menunjukkan beda nyata dibanding tempe koro hitam (77,90%), tempe koro kratok (65,12%) dan tempe kedelai kuning (81,43%) sebagai kontrol serta antioksidan sumber lainnya.

Dan dari Tabel 5 juga dapat diketahui bahwa antara tempe kedelai kuning dengan BHT (81,16%) sebagai antioksidan sintetis menunjukkan beda tidak nyata, dengan aktivitas antioksidannya cenderung sedikit lebih rendah dibanding tempe kedelai hitam. Pada tempe koro hitam memiliki aktivitas antioksidan yang sedikit lebih tinggi dan menunjukkan beda nyata dengan a-tokoferol (76,41%) dan vitamin C (75,62%) sebagai antioksidan alami, sedangkan tempe koro kratok (65,12%) memiliki aktivitas antioksidan yang sedikit lebih tinggi dan menunjukkan beda nyata dengan b-karoten (43,25%) sebagai antioksidan sintetis.

Dari Tabel 5 dapat diketahui bahwa aktivitas antioksidan beberapa senyawa dari yang terendah ke yang tertinggi berturut-turut adalah b- caroten, tempe koro kratok (3hari), Vitamin C, a-tokoferol, tempe koro hitam (3 hari), BHT, Tempe Kedelai kuning (3 hari), dan tempe kedelai hitam (3 hari). Dari hasil perbandingan aktivitas antioksidan tersebut dapat juga disimpulkan bahwa kedelai hitam dengan fermentasi 3 hari didapatkan hasil aktivitas antioksidan yang optimum yang dapat digunakan sebagai sumber isoflavon yang berkhasiat antioksidan.

Dari perbandingan 4 jenis legume diatas dapat disimpulkan bahwa Tempe kedelai hitam memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan aktivitas senyawa antioksidan tempe kedelai kuning sebagai kontrolnya. Aktivitas antioksidan tempe kedelai hitam lebih baik bila dibandingkan BHT yang merupakan antioksidan sintetis. Sedangkan tempe koro hitam memiliki aktivitas antioksidan yang sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan a-tokoferol, dan vitamin C, meskipun dibandingkan dengan tempe kedelai kuning hasil uji aktivitas antioksidan koro hitam cenderung tidak terpaut jauh.

Menurut Suryo dan Tohari (1995), penggunaan zat antioksidan sintetis tertentu misalnya BHT dapat menimbulkan akibat buruk terhadap kesehatan konsumen seperti gangguan fungsi hati, paru, mukosa usus dan keracunan. Dan dari hasil tersebut diatas, maka tempe kedelai hitam hasil fermentasi hari ke-3 potensial untuk dimanfaatkan sebagai antioksidan alami pengganti BHT (sebagai antioksidan sintetis) yang dapat digunakan sebagai sumber isoflavon yang berkhasiat antioksidan, sehingga dapat memberikan manfaat yang baik bagi kesehatan tubuh apabila dikonsumsi, dan mengkonsumsi tempe yang paling baik bagi kesehatan adalah tempe hasil fermentasi hari ke-3 karena memiliki aktivitas antioksidan yang optimum dan disarankan mengkonsumsi tempe koro dengan fermentasi lebih dari 2 hari dengan cara dipanaskan terlebih dahulu untuk menghindari keracunan tempe.

KESIMPULAN

Jenis-jenis senyawa isoflavon berkhasiat antioksidan selama fermentasi optimum adalah: Tempe kedelai hitam dengan lama fermentasi 2 hari mengandung faktor-2 (0,0161 g), daidzein (1,2947g), glisitein (0,9670 g), genistein (2,3424 g) dengan isoflavon total 4,6202 g. Tempe koro hitam dengan lama fermentasi 1 hari mengandung faktor-2 (0,0149 g), daidzein (0,0401 g), glisitein (0,1145 g), genistein (0,4404 g) dengan isoflavon

total 0,0699 g. Tempe koro kratok dengan lama fermentasi 3 hari mengandung faktor-2 (0,0036 g), genistein (1,7252 g) dengan isoflavon total 1,7288 g. Lama fermentasi optimum menghasilkan senyawa antioksidan tinggi adalah fermentasi 3 hari, untuk kedelai hitam, koro hitam dan koro kratok masing- masing adalah 82,49%; 77,90%; 65,12%. Bahwa kedelai hitam, koro hitam dan koro kratok serta produk tempunya berpotensi dalam upaya pemanfaatan sebagai antioksidan alami khususnya isoflavon bila dibandingkan dengan ekstrak etanol dari kedelai kuning dan produk tempunya serta beberapa antioksidan alami (α -tokoferol, β -karoten, dan asam askorbat) maupun antioksidan sintetis (BHT).

DAFTAR PUSTAKA

- Amrun HM, Umiyah, Umayah EU. 2007. Uji aktivitas antioksidan ekstrak air dan ekstrak metanol beberapa varian buah kenit (*Chrysopylum cainito* L.) dari daerah Jember. Berkala Penelitian Hayati 13: 45-50.
- Ariani SRD, Hastuti W. 2009. Analisis Isoflavon dan Uji Aktivitas Antioksidan Pada Tempe Kedelai (*Glycine max* L. Merrill) dengan Variasi Lama Waktu Fermentasi Dan Metode Ekstraksi, Prosiding Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia dengan Tema: Teknologi Informasi dalam Mendukung Perkembangan Riset dan Pembelajaran Kimia, Surakarta 18 Maret 2009.
- Ariani SRD. 2001. Identifikasi Senyawa Faktor-2 (Suatu Senyawa Isoflavon) dari Tempe Selama Proses Fermentasi Hari ke-0,1,2,3,4, dan 5, Paedagogia, Jilid 4 No.1, 2001.
- Barz W, Heskamp K, Rehms H, Steinkamp R. 1993. Recent aspect of protein, phytate and isoflavone metabolism by microorganisms isolated from tempe-fermentation. Tempo Workshop, Jakarta, 15 February 1993.
- Barz W, Papendorf GB. 1991. Metabolism of isoflavones and formation of factor-2 by tempeh producing microorganism Tempeh Workshop, Cologne. 20 May 1991.
- Gyorgy P, Murata K, Ikehata H. 1964. Antioksidants isolated from fermented soybeans tempeh. Nature 203: 872-875.
- Handajani S, Atmaka W. 1993. Analisis Sifat Fisis Khemis Beberapa Biji Kacang-Kacangan, Kekerasan, Kualitas Tanak, Protein, dan Mineralnya. Lembaga Penelitian Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Handajani S, Rachmawati D, Pramita DS. 2008. Studi Pendahuluan Karakteristik Kimia (HCN, Antioksidan, dan Asam Fitat) Beberapa Jenis Koro Lokal dengan Berbagai Perlakuan Pendahuluan. Widyakarya Nasional Pangan dan Gizi. Jakarta. Agustus 2008.
- Horwitz W. 1980. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 13th ed. AOAC, Gaithersburg, USA.
- Kocher SP, Rossell B. 1990. Detection estimation and evaluation of antioxidants in food system. In: Hudson BJF (ed.). Food Antioxidants. Elsevier, London.
- Kudou S, Fleury Y, Welti D, Magnolato D, Uchida T, Kitamura K, Okubo K. 1991. Malowd isoflavone glycoside in soybean seeds (*Glycine max* Merr). Agric Biol Chem 55: 2227-2233.
- Markham KR. 1988. Cara Mengidentifikasi Flavonoida. Penerj.: Padmawinata K. ITB, Bandung
- Mazur WM, Duke JA, Wähälä K, Rasku S, Adlercreutz H. 1998. Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans. J Nutr Biochem 9 (4): 193-200.
- Pawiroharsono S. 1995. Metabolisma Isoflavon dan Faktor-II Pada Proses Pembuatan Tempe. Prosiding Simposium Nasional Pengembangan Tempe Dalam Industri Pangan Modern, April 1995. UGM. Yogyakarta.
- Pawiroharsono S. 2001. Prospek dan Manfaat Isoflavon untuk Kesehatan. Direktorat. Teknologi Bioindustri. Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Serpong.
- Pradana S. 2008. Prospek dan Manfaat Isoflavon sebagai Fitoestrogen Bagi Kesehatan. Balai Penerbit FKUI, Jakarta
- Suryo I, Tohari I. 1995. Aktivitas Antioksidan Buah jambu Mete dan Penerapannya pada Abon. Biosains 1 (7): 50-61.
- Yen GC, Chen HY. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. J Agric Food Chem 43: 27-32.

Karakteristik sensoris, nilai gizi dan aktivitas antioksidan tempe kacang gude (*Cajanus cajan*) dan tempe kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) dengan berbagai variasi waktu fermentasi

Sensory characteristic, nutrient value and antioxidant activities of pigeon pea tempeh (*Cajanus cajan*) and cow pea tempeh (*Vigna unguiculata*) with variations of fermentation time

INTAN WAHYU RISTISA DEWI, CHORUL ANAM, ESTI WIDOWATI

Prodi Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret, Jl. Ir. Sutami 36a, Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 11 Maret 2014. Revisi disetujui: 11 Juni 2014.

Abstract. Dewi IWR, Anam C, Widowati E. 2012. Sensory characteristic, nutrient value and antioxidant activities of pigeon pea tempeh (*Cajanus cajan*) and cow pea tempeh (*Vigna unguiculata*) with variations of fermentation time. *Biofarmasi* 14: 73-82. The objective of this research was to know sensory characteristic, nutrient value (protein content, fat content, and carbohydrate content) and antioxidant activities pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) tempeh and cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) tempeh with time of fermentation variations. Experiment design was Randomized Block Design consist of 2 factors, they were time of fermentation (30, 36, 42 hours) and variations of bean (soybean, pigeon pea, cow pea). The data that were obtained from this research then were analyzed with ANOVA at level of confident $\alpha = 0.05$ then continued with DMRT at the same level. Result of research showed that time of fermentation variations and variations of bean effected on water content, ash content, protein content, fat content, carbohydrate content and antioxidant activities. The longer time of fermentation caused increase of water content, ash content and protein content, while the fat content and carbohydrate content decreased. The longer time of fermentation also caused antioxidant activities increasing. The highest of water content pigeon pea tempeh 42-hour fermentation 64.417%, the lowest soybean tempeh 30-hour fermentation 56.503%. The highest of ash content soybean tempeh 42-hour fermentation 1.287%, the lowest pigeon pea tempeh 30-hour fermentation 0.580%. The highest of protein content soybean tempeh 42-hour fermentation 28.875%, the lowest pigeon pea tempeh 30-hour fermentation 12.500%. The highest of fat content soybean tempeh 30-hour fermentation 9.877%, the lowest pigeon pea tempeh 42-hour fermentation 0.620%. The highest of carbohydrate content pigeon pea tempeh 30-hour fermentation 25.033%, the lowest soybean tempeh 30-hour fermentation 1.037%. The highest antioxidant capacity cow pea tempeh 42-hour fermentation 59.667%, the lowest pigeon pea tempeh 30-hour fermentation 13.000%. The highest total phenol content soybean tempeh 42-hour fermentation 3.490%, the lowest cow pea tempeh 30-hour fermentation 0.233%. Overall, for sensory test uncooked and cooked tempeh, the most preferred by consumer is soybean tempeh.

Keywords: Cow pea, fermentation, pigeon pea, tempeh

PENDAHULUAN

Tempe merupakan makanan yang sangat populer di Indonesia, sebagian besar masyarakat Indonesia menjadikan tempe sebagai pendamping makanan pokok. Tempe memiliki manfaat kesehatan yaitu berpotensi untuk melawan radikal bebas sehingga dapat menghambat proses penuaan dan mencegah terjadinya penyakit degeneratif (aterosklerosis, jantung koroner, diabetes melitus, kanker, dan lain-lain) (Adam 2009) karena adanya aktivitas enzim superoksida dismutase. Nilai gizi yang unggul lainnya dalam tempe antara lain antioksidan faktor II (6,7,4-trihidroksi isoflavon) yang memiliki sifat antioksidan paling kuat dibandingkan dengan isoflavon dalam kedelai, vitamin B12 yang aktivitasnya semakin meningkat selama proses fermentasi serta kandungan asam glutamat sebagai asam amino esensial yang tinggi.

Kacang kedelai bagi industri pengolahan pangan di Indonesia banyak digunakan sebagai bahan baku pembuatan tahu, tempe dan kecap. Jenis industri yang tergolong skala kecil-menengah ini tetapi dalam jumlah

sangat banyak menyebabkan tingginya tingkat kebutuhan konsumsi kedelai yang mencapai lebih dari 2,24 juta setiap tahunnya. Pada tahun 1998 Indonesia mengimpor kedelai sebanyak 343.124 ton. Lonjakan importasi kedelai disebabkan peningkatan konsumsi produk industri rumahan (tahu dan tempe). Pada tahun 2004 diperkirakan kebutuhan kedelai mencapai 1,95 juta ton sehingga harus mengimpor 1,1 juta ton sampai 1,3 juta ton untuk menutupi kekurangan.

Impor kedelai Indonesia sekitar 70% berasal dari Amerika Serikat yang menguasai 60% pasar kedelai dunia. Kedelai yang berasal dari Amerika Serikat adalah kedelai transgenik. Kelebihan kedelai transgenik antara lain tahan terhadap hama, tahan terhadap herbisida dan kualitas hasil yang tinggi tetapi dikhawatirkan memiliki efek negatif antara lain dapat terjadi perubahan nutrisi, menyebabkan efek alergi atau toksisitas karena proses rekayasa genetika (Gsianturi 2002). Oleh karena itu muncul berbagai kekhawatiran dalam mengkonsumsi kedelai transgenik. Pangan transgenik sebanyak 60-70% belum memiliki kepastian keamanan konsumsi walaupun sampai saat ini

belum banyak dilaporkan bahwa konsumsi pangan transgenik menyebabkan gangguan kesehatan terutama di Indonesia (Anon 2008).

Adanya kekurangan kebutuhan kedelai tersebut maka perlu dicari alternatif kedelai sebagai bahan baku pembuatan tempe yang memiliki kandungan gizi hampir sama dengan kedelai. Kacang-kacangan yang berpotensi sebagai pengganti kedelai yaitu kacang gude dan kacang tunggak.

Kacang gude (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) merupakan jenis kacang-kacangan yang tumbuh sepanjang tahun dan mampu tumbuh pada lahan kering (Messakh 2004). Komposisi kacang gude dalam 100 g biji yaitu 62,0 g karbohidrat; 20,7 g protein dan 1,4 g lemak.

Kacang tunggak (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) merupakan jenis kacang yang toleran terhadap kekeringan. Komposisi gizi kacang tunggak dalam 100 g biji yaitu 22 g protein; 1,4 g lemak dan 60,1 g karbohidrat (Haliza 2008).

Keunggulan kacang gude dan kacang tunggak adalah memiliki kadar lemak yang lebih rendah sehingga dapat meminimalisasi efek negatif dari penggunaan produk pangan berlemak. Kacang gude jika dibandingkan dengan kedelai memiliki keseimbangan asam amino yang baik. Sedangkan pada kacang tunggak memiliki kandungan vitamin B1 lebih tinggi dan pada produk tempennya mengandung *p-caumaric acid* dan asam ferulat yang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat (Kunia 2008).

Riset yang dilakukan oleh Tranggono et al. (1992) adalah pembuatan tempe kacang gude yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas asam fitat yang menurun selama proses pembuatan dan fermentasi. Sedangkan pada tempe kacang tunggak, penelitian yang dilakukan oleh Haliza pada tahun 2008 dengan waktu fermentasi 24 jam yaitu tiap 100 g tempe mengandung 33 g protein, 2 g lemak, 53 g karbohidrat, dan 3 g serat.

Oleh karena itu pada penelitian ini akan dikaji karakteristik sensoris, nilai gizi dan kapasitas antioksidan pada tempe kacang gude dan kacang tunggak dengan variasi waktu fermentasi. Pemanfaatan kacang gude dan kacang tunggak sebagai pengganti kedelai untuk bahan baku tempe dapat meningkatkan diversifikasi produk olahan kacang gude dan kacang tunggak.

Tujuan dari penelitian adalah untuk mengetahui karakteristik sensoris, nilai gizi dan aktivitas antioksidan tempe kacang gude dan tempe kacang tunggak dengan variasi waktu fermentasi sehingga diketahui potensinya sebagai pengganti kedelai.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Rekayasa Proses Pengolahan Pangan dan Hasil Pertanian, Jurusan/Program Studi Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret Surakarta dimulai pada bulan Maret-Agustus 2010.

Bahan dan alat

Bahan utama yang digunakan adalah kacang tunggak yang berasal dari Pasar Legi, Surakarta; kacang gude yang berasal dari Pasar Wonogiri dan kedelai lokal yang berasal dari Pasar Legi, Surakarta. Untuk pembuatan tempe digunakan ragi tempe (bentuk bubuk). Bahan-bahan yang digunakan untuk analisis antara lain:

Analisis kadar protein: larutan HCl 0,02 N (Merck), H₂SO₄ (Merck), HgO (Merck), larutan NaOH-Na₂S₂O₃ (Merck), K₂SO₄ (Merck), Na₂B₄O₇.10H₂O (Merck), H₃BO₃ (Merck), indikator (campuran 2 bagian metil merah 0,2% dalam alkohol dan 1 bagian bromo creosol green (bcg) 0,2% dalam alkohol), aquadest.

Analisis kadar lemak: petroleum ether. Analisis penangkapan radikal bebas: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) dan ethanol. Analisis total fenol: Na₂CO₃ alkali, Folin ciocalteu, fenol murni. Alat yang digunakan untuk analisis tempe antara lain: Analisis kadar air: oven listrik, timbangan analitik digital, eksikator cawan aluminium, dan tang penjepit. Analisis kadar abu: tanur dan cawan porselen. Analisis kadar lemak: perangkat alat ekstraksi Soxhlet, tabung reaksi soxhlet, kondensor, tabung ekstraksi, penangas air, oven dan botol timbang.

Analisis penangkapan radikal bebas: spektrofotometer UV-Vis 1240, sentrifuge kecepatan 5000 rpm, erlenmeyer 25 mL, tabung propilen, vortex mixer, pipet volume 1 mL, propipet dan mikropipet.

Analisis kadar total fenol: vortex mixer, labu takar 100 mL, pipet volume, pengaduk, dan gelas ukur 100 mL. Uji sensoris: nampan, cawan dan gelas. Alat pembantu: baskom, panci, tampah besar, ember, kompor dan plastik.

Tahapan penelitian

Pembuatan tempe

Proses pembuatan tempe pada penelitian ini didasarkan pada modifikasi dari Haliza (2008). Kacang tunggak dan kacang gude yang dibuat tempe terlebih dahulu dikupas kulitnya secara kering yaitu dengan menggunakan alat penyosoh, sebelum dilakukan penyosohan biji harus kering sehingga saat penyosohan biji dapat terkupas sempurna. Setelah pengupasan maka kacang akan terpecah menjadi 2 dan terpisah dengan kulitnya. Kacang gude dan kacang tunggak kemudian direbus sampai mendidih supaya kacang menjadi lunak sehingga dapat ditembus oleh miselia kapang yang menyatukan biji dan tempe menjadi kompak. Perebusan akan membuat warna biji kacang gude dan kacang tunggak menjadi berubah, kacang gude akan berubah menjadi menjadi kecoklatan sedangkan pada kacang tunggak menjadi putih. Kacang kemudian direndam semalam untuk menurunkan pH sehingga sesuai untuk pertumbuhan kapang. Perendaman selama 24 jam akan menyebabkan air rendaman menjadi berbusa dan beraroma asam. Selama prose perendaman telah berlangsung proses fermentasi oleh bakteri yang terdapat di air terutama karena bakteri asam laktat, pH akan turun dari 6,5 menjadi 4,5-5,3. Setelah perendaman kacang dicuci bersih dengan air mengalir untuk membuang kulit yang masih tertinggal dan untuk menghilangkan bakteri dan mikroorganisme lain yang tumbuh selama perendaman serta membuang kelebihan asam dan lendir yang terproduksi. Setelah

pencucian, kacang dikukus selama 20 menit yang bertujuan mematikan bakteri-bakteri yang tumbuh selama perendaman. Kacang kemudian didinginkan, ditiriskan yang bertujuan untuk menurunkan suhu dan menghilangkan air pada permukaan kacang. Kemudian dilakukan inokulasi dengan ragi (bubuk) dan diaduk merata. Pada tahap terakhir dilakukan fermentasi selama 30, 36 dan 42 jam pada suhu ruang dalam kantong plastik (PE) yang dilubangi menggunakan gunting. Tempe yang telah terbentuk akan dianalisis karakteristik sensoris (warna, aroma, rasa, aftertaste, tekstur dan rasa), nilai gizi dan aktivitas antioksidan. Analisis parameter kimia pada penelitian ditunjukkan pada Tabel 1.

Rancangan percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) pola faktorial yang terdiri dari 2 faktor atau variabel yaitu variasi waktu fermentasi pembuatan tempe 36, 42 dan 48 jam dan jenis kacang (kedelai, gude dan tunggak). Untuk sampel kontrolnya adalah tempe kedelai, sehingga jumlah sampelnya ada 9 buah. Setiap perlakuan dilakukan ulangan sampel dan ulangan analisis kimia sebanyak 3 kali (Tabel 2). Data hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan menggunakan ANOVA melalui program SPSS for Windows versi 16.0 untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perbedaan perlakuan dan dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf signifikansi $\alpha = 0,05$.

Tabel 1. Metode analisis

Metode analisis	Metode
Kadar air	Thermogravimetri (Sudarmadji et al. 2003)
Kadar abu	Cara kering (Sudarmadji et al. 2003)
Kadar protein	Kjehldal (Apriyantono et al. 1989)
Kadar lemak	Ekstraksi Soxhlet (Apriyantono et al. 1989)
Kadar karbohidrat	<i>By difference</i> (Winarno 2002)
Penangkapan radikal bebas	DPPH (Subagio dan Morita 2001)
Total fenol	Folin-Ciocalteu (Senter et al. 1989)
Analisis sensoris	Uji Kesukaan (Setyaningsih et al. 2008)

Tabel 2. Rancangan percobaan

Lama fermentasi	Kacang		
	Kedelai (K1)	Tunggak (K2)	Gude (K3)
30 jam (F1)	F1K1	F1K2	F1K3
36 jam (F2)	F2K1	F2K2	F2K3
42 jam (F2)	F3K1	F3K2	F3K3

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar air

Kadar air merupakan salah satu unsur penting dalam bahan makanan. Meskipun bukan merupakan sumber

nutrisi, tetapi kadar air sangat esensial dalam kelangsungan proses biokimiawi organisme hidup yaitu berperan sebagai pembawa zat-zat makanan dan sisa metabolisme, sebagai media reaksi yang menstabilkan pembentukan biopolimer dan sebagainya. Dalam bahan pangan, kadar air berfungsi untuk menentukan bentuk, kenampakan, kesegaran, cita rasa, dan daya simpan serta derajat penerimaan konsumen terhadap suatu produk pangan. Hal ini disebabkan 50-90 % bahan pangan hasil pertanian terdiri dari air. Hasil analisis kadar air tempe lama fermentasi (30 jam, 36 jam dan 42 jam) dan jenis kacang (kacang kedelai, kacang gude, dan kacang tunggak) ditunjukkan pada Tabel 3.

Berdasarkan data Tabel 3, kadar air tempe berkisar antara 56,503-64,417%. Semakin lama waktu fermentasi kadar airnya meningkat. Kadar air dengan penggunaan jenis kacang yang berbeda menunjukkan adanya beda nyata. Kadar air tertinggi terdapat pada tempe kacang gude sebesar 64,417% dan kadar air terendah terdapat pada tempe kacang kedelai sebesar 56,503%. Hal ini karena air bahan awal kacang berbeda. Kacang gude mempunyai kadar air paling tinggi yaitu sebesar 12,2% kemudian kacang tunggak sebesar 11,64% dan kadar air kacang kedelai sebesar 7,55% (Anon 1992). Selain kadar air bahan awal, tingginya kadar air pada tempe gude dan tempe tunggak disebabkan pada proses awal setelah pengupasan dengan cara kering biji kacang akan pecah. Pemecahan biji kacang ini mengakibatkan kulit biji lepas sehingga lembaga akan menjadi bagian luar dari biji, saat dilakukan perebusan maka kacang gude dan kacang tunggak akan mudah menyerap air dibandingkan kacang kedelai yang belum mengalami pengupasan sehingga kadar air pada kacang gude dan kacang tunggak akan lebih tinggi.

Perlakuan lama fermentasi memberikan pengaruh terhadap kadar air tempe. Dari Tabel 3 dapat dilihat bahwa semakin lama fermentasi maka semakin meningkat kadar airnya. Setelah fermentasi 30 jam kadar air cenderung mengalami peningkatan. Menurut Steinkrauss (1995), selama fermentasi tempe air dihasilkan sebagai hasil dari pemecahan karbohidrat oleh mikrobia. Menurut Rochmah (2008) air merupakan salah satu produk hasil fermentasi aerob. Selama fermentasi tempe, mikrobia mencerna substrat dan menghasilkan air, karbondioksida dan sejumlah besar energi (ATP). Selama fermentasi, kapang *Rhizopus* akan menghancurkan matriks antara sel bakteri pada hari ketiga untuk kedelai akan menjadi lunak, tapi pada fermentasi selanjutnya antara sel pada kedelai hancur ditambah air hasil pemecahan karbohidrat yang menyebabkan tempe menjadi lembek dan berair (Syarief 1999). Menurut pendapat Mulato dan Widyotomo (2003), waktu fermentasi merupakan salah satu faktor terpenting penyebab meningkatnya kadar air sehingga dengan meningkatnya waktu fermentasi maka kadar air akan meningkat pula.

Pada fermentasi lanjut atau *overfermented* yaitu pada 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 (Hidayat 2009).

Kadar abu

Abu merupakan zat anorganik sisa hasil pembakaran suatu bahan makanan. Kandungan abu dan komposisinya tergantung pada macam bahan dan cara pengabuannya. Kadar abu memiliki hubungan dengan mineral suatu bahan. Mineral yang terdapat dalam bahan dapat merupakan dua macam garam yaitu garam organik dan garam anorganik. Sebagian bahan makanan, yaitu sekitar 96% terdiri dari bahan organik dan air. Sisanya terdiri dari unsur-unsur mineral atau kadar abu (Winarno 2002; Sudarmadji 2003). Hasil analisis kadar abu dengan lama fermentasi (30 jam, 36 jam dan 42 jam) dan jenis kacang (kacang kedelai, kacang gude, dan kacang tunggak) ditunjukkan pada Tabel 4.

Variasi perlakuan lama fermentasi memberikan pengaruh terhadap kadar abu tempe. Semakin lama waktu fermentasi kadar abu tempe semakin meningkat. Kadar abu tertinggi pada tempe kedelai fermentasi 42 jam yaitu sebesar 1,433% sedangkan kadar abu terendah terdapat pada tempe gude fermentasi 30 jam sebesar 0,580%. Tingginya kadar abu pada tempe kedelai disebabkan komposisi mineral total dalam kedelai yaitu kalsium, fosfor, dan besi lebih tinggi jika dibandingkan pada kacang gude dan kacang tunggak.

Peningkatan kadar abu berasal dari vitamin yang terbentuk oleh bakteri yang tumbuh selama fermentasi tempe khususnya vitamin B12 (Ferlina 2009). Astuti et al. (2000), menyebutkan bahwa selama fermentasi tempe jumlah vitamin B kompleks meningkat kecuali tiamin. Vitamin B12 diproduksi oleh bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang merupakan mikroorganisme yang diinginkan dan mungkin diperlukan dalam proses fermentasi tempe secara alami (Steinkraus 1983). Adanya bakteri ini dalam tempe disebabkan kandungan karbohidrat yang merupakan substrat bagi *Klebsiella pneumoniae* yang mensintesis sukrosa dalam karbohidrat sebagai sumber makanan.

Vitamin B12 adalah suatu vitamin yang sangat kompleks molekulnya, yang mengandung sebuah atom cobalt (Co) yang terikat mirip dengan besi terikat dalam hemoglobin atau magnesium dalam klorofil (Winarno 2002). Vitamin B12 merupakan anggota kelompok kobalamin. Selama fermentasi tempe mengalami pembentukan vitamin B12, sehingga kenaikan jumlah abu berasal dari cobalt (Co pada vitamin B12) yang terkandung dalam vitamin B kompleks tersebut.

Kadar protein

Protein dapat mengalami degradasi molekul kompleks menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana yaitu asam amino oleh pengaruh asam, basa dan enzim. Menurut Pangastuti dan Triwibowo (1996), hal ini penting dalam fermentasi tempe dan merupakan salah satu faktor utama penentu kualitas tempe, yaitu sebagai sumber protein nabati yang memiliki nilai cerna tinggi. Hasil degradasi protein dapat berupa bentuk protease, pepton, polipeptida asam amino, NH₃ dan unsur N (Deliani 2008).

Banyak sekali jamur yang aktif selama fermentasi tempe, namun menurut Pudjiraharti, et al. (2004) kapang *Rhizopus* sp., merupakan kapang yang memegang peranan

utama pada proses fermentasi kedelai menjadi tempe. Jenis-jenis kapang yang ditemukan yaitu *R. oryzae* yang mempunyai sifat amilolitik kuat dan proteolitik kurang, *R. oligosporus* bersifat proteolitik kuat amilolitik kurang kuat dan *R. stolonifer* bagus dalam produksi asam laktat dan kurang kuat dalam aktivitas amilolitik dan proteolitik.

Dari Tabel 5 dapat dilihat bahwa variasi waktu fermentasi dan jenis kacang memberikan pengaruh terhadap kandungan protein tempe. Dari hasil analisis diketahui bahwa kandungan protein berkisar antara 12,500-28,875%. Perlakuan variasi lama fermentasi dan jenis kacang memberikan pengaruh terhadap kadar protein tempe. Kadar protein tempe cenderung mengalami kenaikan dengan meningkatnya waktu fermentasi (Tabel 4.4). hal ini selain dari pelepasan gugus-gugus amino juga disebabkan karena unsur N yang terdapat pada vitamin B12. Selama waktu fermentasi, protein akan mengalami proses katabolisme yaitu pelepasan gugus-gugus amino menjadi asam-asam amino yang mengandung unsur N sehingga kadar proteinnya semakin meningkat. Hasil tersebut sesuai dengan pendapat Astuti et al. (2000), protein terlarut akan meningkat secara signifikan akibat produksi enzim protease selama proses fermentasi. Pada tempe kandungan nitrogen terlarutnya 8,7 mg/g sedangkan pada kedelai nitrogen terlarutnya 3,5 mg/g.

Selama proses fermentasi, protein kasar hanya sedikit yang berubah tetapi kelarutannya meningkat menjadi 50% (Jones 1975). Selanjutnya kualitas protein dalam tempe lebih tinggi dibandingkan kedelai. Hal ini dikarenakan perubahan protein menjadi asam amino akan lebih mudah dicerna.

Tingginya kadar protein tempe kacang kedelai dibandingkan dengan tempe kacang tunggak dan tempe kacang gude dikarenakan kandungan protein biji kedelai mentah lebih tinggi dibandingkan kacang tunggak maupun kacang gude yaitu sebesar 34,9% sedangkan kandungan protein kacang tunggak dan kacang gude sebesar 25,53% dan 20,7% (Anon 1992; Danuwarsa 2006).

Kadar lemak

Kadar lemak tempe dengan berbagai variasi lama fermentasi dan jenis kacang ditunjukkan pada Tabel 6. Dari hasil analisis dapat diketahui bahwa waktu fermentasi dan jenis kacang memberikan pengaruh terhadap tempe. Kadar lemak tempe dengan variasi waktu fermentasi dan jenis kacang berkisar antara 0,620-9,877%. Kadar lemak tempe dengan perlakuan lama fermentasi dan jenis kacang dapat diketahui bahwa semakin lama waktu fermentasi, kadar lemak tempe semakin menurun dan selisih kadar lemak antara tempe kedelai dengan tempe tunggak dan tempe gude yang cukup tinggi.

Kasmidjo (1990), menyebutkan bahwa kadar lemak kedelai akan mengalami penurunan akibat fermentasi menjadi tempe. Lebih dari 1/3 lemak netral (monogliserida, digliserida, trigliserida) dari kedelai terhidrolisis oleh enzim lipase selama 3 hari fermentasi oleh *R. oligosporus* yang bersifat lipolitik pada T 37°C. Setelah 48 jam fermentasi, lemak akan terhidrolisis (Smith dan Alford 1986). Jamur menggunakan lemak dari substrat sebagai sumber energinya (Iljas 1973).

Kadar lemak berkurang selama fermentasi juga karena akibat aktivitas enzim lipase yang bergantung pada lamanya waktu fermentasi. Lemak dapat diuraikan oleh enzim lipase melalui katabolisme lemak menjadi asam lemak bebas dan gliserol, kemudian gliserol akan diubah menjadi gliserol dehid fosfat dan mengikuti jalur glikolisis sehingga terbentuk piruvat sedangkan asam lemak akan diuraikan menjadi molekul-molekul dengan 2 atom C dan diubah menjadi asetil koenzim A. (Muchtadi 1989).

Dari Table 6 dapat dilihat bahwa tempe tunggak dan tempe gude tidak berbeda nyata selama waktu fermentasi, hal ini menunjukkan bahwa keduanya memiliki kadar lemak yang hampir sama.

Kadar lemak tertinggi terdapat pada tempe kacang kedelai sebesar 9,877% sedangkan kadar lemak terendah terdapat pada tempe kacang gude sebesar 0,620%. Berdasarkan tabel di atas maka kadar lemak tempe kacang kedelai memiliki selisih yang besar dengan kadar lemak tempe kacang tunggak dan kacang gude. Hal ini dikarenakan kadar lemak kacang kedelai memang sangat tinggi dibandingkan kadar lemak kacang-kacangan yang lain yaitu sebesar 18,1% sedangkan kadar lemak kacang tunggak dan kacang gude hanya sebesar 1,67% dan 1,4% (Anon 1992; Danuwarsa 2003).

Kadar karbohidrat

Kadar karbohidrat dengan variasi waktu fermentasi dan jenis kacang ditunjukkan pada Tabel 7. Hasil analisis menunjukkan bahwa waktu fermentasi dan jenis kacang memberikan pengaruh terhadap tempe. Kadar karbohidrat tempe dengan variasi waktu fermentasi berkisar antara 1,038-25,063. Dari Tabel 7 dapat diketahui semakin lama waktu fermentasi maka kadar karbohidratnya semakin menurun. Pada tempe kedelai fermentasi 30 dan 36 jam tidak berbeda nyata hal ini menunjukkan perbedaan waktu fermentasi pada tempe kedelai tidak memberikan pengaruh terhadap kadar karbohidrat selama waktu fermentasi 30 dan 36 jam. Kadar karbohidrat tertinggi terdapat pada tempe gude fermentasi 30 jam sebesar 25,063% sedangkan kadar karbohidrat terendah terdapat pada tempe kedelai fermentasi 42 jam sebesar 1,038%. Penurunan kadar karbohidrat karena karbohidrat telah banyak dimanfaatkan oleh mikroba sebagai nutrisi selama proses fermentasi berlangsung.

Menurut Kasidjo (1990), selama proses perendaman terjadi peningkatan monosakarida, tetapi perendaman selama 24 jam pada suhu 25 oC dengan perbandingan biji:air adalah 1:3 dan 1:10 tidak mengakibatkan

penurunan oligosakarida. Menurut Mulyowidarso (1988), sukrosa turun sebesar 84 %, sedangkan stakhiosa, rafinosa dan melibiosa secara bersama-sama turun sebesar 64 %, dari kadar dalam biji selama perendaman. Menurunnya kadar stakhiosa, rafinosa dan melibiosa ini sangat penting dari sudut gizi, karena ketiga senyawa gula tersebut adalah termasuk dalam keluarga rafinosa yang dapat menyebabkan gejala flatulensi jika dikonsumsi secara berlebihan (Eksari 2009).

Pengurangan senyawa stakhiosa, rafinosa, melibiosa dan meningkatnya monosakarida, selain memiliki

keuntungan dari sudut nutrisi, juga memberikan keuntungan mikrobiologis dalam pembuatan tempe. *Rhizopus oligosporus* tidak memiliki kemampuan untuk memetabolisasikan senyawa-senyawa tersebut, sebaliknya dapat memanfaatkan monosakarida dengan baik. Di samping itu glukosa juga merupakan senyawa gula yang mendorong terjadinya perkecambahan spora *Rhizopus oligosporus*. Peningkatan kadar monosakarida oleh jamur tempe juga akan mendorong tumbuhnya bakteri dalam fermentasi tempe hal ini dikarenakan monosakarida akan digunakan oleh bakteri sebagai sumber makanan.

Kadar karbohidrat paling tinggi terdapat pada tempe kacang gude fermentasi 30 jam sebesar 25,063% dan kadar karbohidrat terendah pada tempe kacang kedelai fermentasi 42 jam sebesar 1,038%. Hal ini dikarenakan kandungan karbohidrat kacang gude dan kacang tunggak lebih tinggi yaitu sebesar 62% dan 61,6% dibandingkan kandungan karbohidrat kedelai yaitu sebesar 30,1% (Anon 1992; Danuwarsa 2003) hal ini sesuai dengan hasil analisis kadar karbohidrat tempe kacang kedelai yang memiliki kadar karbohidrat terendah dibandingkan yang lain.

Aktivitas antioksidan

Aktivitas antioksidan dengan variasi waktu fermentasi dan jenis kacang ditunjukkan pada Tabel 8. Dari Tabel 8 dapat dilihat bahwa variasi waktu fermentasi dan jenis kacang memberikan pengaruh terhadap aktivitas antioksidan tempe. Dari tabel di atas dapat diketahui kapasitas antioksidan berkisar antara 13,000-59,667%. Semakin lama waktu fermentasi maka aktivitas antioksidan juga semakin meningkat. Aktivitas antioksidan paling tinggi terdapat pada tempe tunggak fermentasi 42 jam sebesar 59,667% sedangkan aktivitas antioksidan terendah terdapat pada tempe gude fermentasi 30 jam sebesar 13,000%. Pada uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan tempe mentah, hal ini dikarenakan jika dilakukan untuk tempe matang melalui proses penggorengan maka aktivitas antioksidannya akan berkurang akibat adanya pemanasan.

Berdasarkan penelitian Ningsih (2007), peningkatan aktivitas antioksidan tempe tunggak disebabkan selama proses fermentasi terjadi peningkatan aktivitas antioksidan oleh aktivitas mikroorganisme sebesar 39,69%, sedangkan pada bahan awal kacang tunggak aktivitas antioksidan sebesar 29,9%. Peningkatan ini disebabkan selama fermentasi tempe tunggak menghasilkan senyawa antioksidan asam ferulat dan p-kumarat yang memiliki aktivitas antioksidan cukup tinggi. Asam ferulat dan p-kumarat merupakan senyawa antioksidan yang berasal dari biosintesa fenilpropanoide.

Dari Tabel 8 dapat dilihat aktivitas antioksidan tempe kedelai, tempe tunggak dan tempe gude mengalami peningkatan yang signifikan dari waktu fermentasi 30 jam ke fermentasi 36 jam. Hal ini ditunjukkan pada tabel bahwa kenaikan waktu fermentasi 30 jam ke fermentasi 36 jam menunjukkan adanya beda nyata. Pada fermentasi 36 jam ke fermentasi 42 jam peningkatan aktivitas antioksidan juga berbeda nyata kecuali pada tempe gude yang tidak berbeda nyata hal ini menunjukkan peningkatan kapasitas tempe gude fermentasi 36 jam stabil.

Tabel 3. Kadar air dengan variasi waktu fermentasi dan jenis kacang

Lama fermentasi	Jenis kacang		
	Kedelai	Tunggak	Gude
30 jam	56,503a	59,287b	60,893bc
36 jam	56,137a	61,917cd	61,447bcd
42 jam	60,453bc	63,477de	64,417e

Keterangan: *) notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0.05$)

Tabel 4 Kadar abu dengan variasi waktu fermentasi dan jenis kacang

Lama fermentasi	Jenis kacang		
	Kedelai	Tunggak	Gude
30 jam	1,287e	0,650a	0,580a
36 jam	1,330e	0,733b	0,810c
42 jam	1,433f	0,833c	1,187d

Keterangan: *) notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0.05$)

Tabel 5 Kadar protein dengan variasi waktu fermentasi dan jenis kacang

Lama fermentasi	Jenis kacang		
	Kedelai	Tunggak	Gude
30 jam	24,792d	14,583b	12,500a
36 jam	27,125e	15,083bc	15,167bc
42 jam	28,875f	16,042c	16,042c

Keterangan: *) notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0.05$)

Tabel 6 Kadar lemak dengan variasi waktu fermentasi dan jenis kacang

Lama fermentasi	Jenis kacang		
	Kedelai	Tunggak	Gude
30 jam	9,877c	1,367a	0,963a
36 jam	9,403c	0,950a	0,833a
42 jam	8,200b	0,670a	0,620a

Keterangan: *) notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0.05$)

Tabel 7 Kadar karbohidrat dengan variasi waktu fermentasi dan jenis kacang

Lama fermentasi	Jenis kacang		
	Kedelai	Tunggak	Gude
30 jam	7,542b	24,113e	25,063e
36 jam	6,005b	21,317d	21,743d
42 jam	1,038a	18,978c	17,735c

Keterangan: *) notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0.05$)

Tabel 8 Aktivitas antioksidan dengan variasi waktu fermentasi dan jenis kacang

Lama fermentasi	Jenis kacang		
	Kedelai	Tunggak	Gude
30 jam	39,000d	33,667c	13,000a
36 jam	49,333e	51,000e	28,667b
42 jam	56,667f	59,667f	30,333b

Keterangan: *) notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0.05$)

Tabel 9 Total fenol dengan variasi waktu fermentasi dan jenis kacang

Lama fermentasi	Jenis kacang		
	Kedelai	Tunggak	Gude
30 jam	2,857e	0,233a	1,253b
36 jam	3,410f	1,327bc	1,327bc
42 jam	3,490f	1,580d	1,393c

Keterangan: *) notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0.05$)

Tabel 10. Hasil uji sensoris tempe mentah

Pengujian sifat sensoris	Lama fermentasi (jam)	Jenis kacang		
		Kedelai	Tunggak	Gude
Warna	30	6,250d	4,125c	2,583a
	36	6,042d	3,917c	3,583bc
	42	6,208d	3,667bc	2,917ab
Aroma	30	5,083a	4,458a	4,417a
	36	5,042a	4,333a	4,250a
	42	5,167a	4,333a	4,417a
Tekstur	30	5,083cde	4,542abc	3,667a
	36	5,583de	4,250abc	4,500abc
	42	5,792e	4,833bcd	3,958ab
Overall	30	5,583b	4,333a	3,583a
	36	5,583b	4,167a	4,000a
	42	5,875b	4,083a	3,750a

Keterangan: *) notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0.05$). Skala nilai: 1) sangat tidak suka 2) tidak suka 3) agak tidak suka 4) netral 5) agak suka 6) suka 7) sangat suka

Tabel 11. Hasil uji sensoris tempe matang

Pengujian sifat sensoris	Lama fermentasi (jam)	Jenis kacang		
		Kedelai	Tunggak	Gude
Warna	30	6,500d	3,792c	2,250a
	36	6,125d	3,167bc	2,167a
	42	6,208d	3,792c	2,542ab
	30	5,750b	4,333a	4,583a
Aroma	36	6,042b	4,542a	4,333a
	42	5,625b	4,667a	4,375a
	30	5,583cd	4,042ab	4,625ab
Tekstur	36	6,083d	4,750b	4,042ab
	42	4,833bc	4,125ab	3,792a
	30	5,000d	3,625ab	4,375bc
Overall	36	5,667d	4,500c	4,250abc
	42	4,453bc	4,250abc	3,500a
	30	4,792bc	4,042ab	4,292ab

Keterangan: *) notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0.05$)

Peningkatan aktivitas antioksidan selama fermentasi dikarenakan adanya aktivitas mikroorganisme dalam tempe. Dalam penelitian yang dilakukan Astuti, et al. (1995) menunjukkan bahwa dalam tempe terdapat aktivitas

enzim superoksida dismutase yang merupakan enzim antioksidan sedangkan dalam kedelai tidak ditemukan. Sedangkan menurut Wang dan Murphy (1996) setelah 22 jam fermentasi, isoflavon aglikon yang terkandung dalam tempe meningkat 6,5 kali dan glukosidanya turun 57% dari kedelai rebus. Pembentukan aglikon selama fermentasi tempe disebabkan oleh aktivitas hidrolitik enzim β -glukosidase yang diproduksi oleh *Rhizopus* sp. Hal ini menunjukkan bahwa selama proses fermentasi aktivitas antioksidan yang dibebaskan akan semakin meningkat akibat aktivitas mikroba.

Total fenol

Total fenol tempe dengan variasi waktu fermentasi dan jenis kacang ditunjukkan pada Tabel 9. Dari Tabel 9 dapat dilihat bahwa variasi waktu fermentasi dan jenis kacang memberikan pengaruh terhadap total fenol tempe. Dari tabel di atas dapat diketahui total fenol berkisar antara 0,233-3,490%. Semakin lama waktu fermentasinya maka total fenolnya juga semakin meningkat. Total fenol paling tinggi terdapat pada tempe kedelai fermentasi 42 jam sebesar 3,490% sedangkan total fenol terendah terdapat pada tempe tunggak fermentasi 30 jam sebesar 0,233%.

Tingginya total fenol tempe kedelai dibandingkan tempe tunggak dan tempe gude dikarenakan total fenol kacang kedelai juga lebih tinggi yaitu sebesar 54,03 mg/100g dibandingkan dengan total fenol kacang tunggak dan kacang gude yaitu sebesar 38,22 mg/100g dan 28,64 mg/100g (Marsono 2004).

Total fenol merupakan senyawa antioksidan yang umumnya terdapat dalam kacang-kacangan. Selama fermentasi total fenol tempe mengalami peningkatan, hal ini akibat adanya bakteri yang mensintesis senyawa antioksidan. Pada penelitian yang dilakukan oleh Ningsih (2007), pada tempe tunggak selama fermentasi menghasilkan senyawa antioksidan berupa asam p-kumarat dan asam ferulat. Jika dibandingkan dengan aktivitas antioksidan, total fenol dari tempe tunggak lebih rendah dibandingkan dengan total fenol pada tempe kedelai hal ini dikarenakan antioksidan pada tempe tunggak telah disintesa menjadi senyawa turunan sehingga total fenolnya akan menjadi lebih rendah.

Handajani (2002) mengatakan bahwa fermentasi tempe telah mengubah bentuk isoflavon glukosida menjadi isoflavon aglikon yaitu daidzein, genistein, glisitein, dan faktor II (6,7,4 tri-hidroksiisoflavon). Senyawa-senyawa turunan tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan isoflavon glukosida. Pawiroharsono (1995) menjelaskan bahwa proses pembentukan Faktor II terjadi melalui dua reaksi yaitu (i) melalui reaksi dimetilasi glisitein oleh bakteri *Brevibacterium epidermis* dan *Micrococcus luteus*, dan (ii) melalui reaksi hidroksilasi daidzein oleh bakteri *Micrococcus arborescens*. Faktor II berperan sebagai antioksidan, antihemolisis, antikolesterol dan antikanker. Faktor II sangat menarik perhatian karena aktivitas antioksidannya 10 kali lebih besar daripada vitamin A dan 3 kali lebih besar dari aglikon lain (Jha 1985). Pernyataan tersebut mengindikasikan bahwa semakin lama fermentasi

semakin tinggi aktivitas antioksidan tempe terutama ditinjau dari komponen isoflavonnya.

Karakteristik sensoris

Uji sensoris pada suatu produk memiliki arti penting, berkaitan dengan penerimaan konsumen terhadap produk yang dihasilkan. Uji sensoris dalam penelitian ini dilakukan pengujian kesukaan panelis dengan metode skoring oleh 24 orang panelis tidak terlatih. Uji sensoris dilakukan 2 kali yaitu uji sensoris tempe mentah dan uji sensoris tempe matang. Parameter yang digunakan untuk uji sensoris tempe mentah meliputi warna, aroma, tekstur dan overall sedangkan parameter yang digunakan untuk uji sensoris tempe matang meliputi warna, aroma, rasa, aftertase, tekstur dan overall.

Hasil analisis sensoris tempe dengan variasi waktu fermentasi dan jenis kacang pada penelitian ini ditunjukkan pada Tabel 10 dan 11.

Warna

Umumnya tempe kedelai memiliki ciri-ciri kenampakan berwarna putih. Warna putih disebabkan adanya miselia jamur yang tumbuh pada permukaan biji kedelai (Kasmidjo 1990). Uji organoleptik sampel tempe diujikan secara mentah dan matang dengan tujuan untuk mengetahui perbedaan warna antara keduanya serta penerimaan panelis terhadap sampel tempe. Skor kesukaan terhadap warna tempe ditunjukkan pada Tabel 10 dan 11.

Dari Tabel 10 dapat dilihat waktu fermentasi untuk masing-masing kacang tidak menunjukkan beda nyata terhadap warna tempe mentah. Namun untuk masing-masing jenis kacang menunjukkan adanya beda nyata antara tempe kacang tunggak, tempe kacang gude dengan tempe kacang kedelai. Hal ini dikarenakan tempe kacang tunggak, tempe kacang gude dan tempe kacang kedelai yang masih mentah menunjukkan perbedaan warna yang cukup jelas. Warna tempe kacang kedelai cenderung berwarna kuning, sedangkan warna tempe kacang tunggak berwarna putih dan untuk warna tempe kacang gude berwarna agak kehitaman. Pada tempe kacang kedelai fermentasi 30 jam memiliki nilai terbesar yaitu 6,250 pada skala nilai suka sedangkan tempe kacang gude fermentasi 30 jam memiliki nilai terendah yaitu 2,583 pada skala nilai tidak suka sehingga dapat diketahui untuk warna tempe mentah tempe kacang kedelai paling disukai konsumen.

Dari Tabel 11 untuk tempe matang hampir sama dengan tempe mentah yaitu untuk waktu fermentasi masing-masing kacang tidak menunjukkan beda nyata namun untuk masing-masing kacang menunjukkan adanya beda nyata. Pada tempe matang yang telah digoreng warna tempe kedelai, tempe tunggak dan tempe gude menunjukkan warna yang berbeda sehingga panelis dapat secara langsung membedakannya. Pada tempe matang nilai tertinggi yaitu pada tempe kedelai sebesar 6,500 pada skala nilai suka sedangkan nilai terendah pada tempe gude sebesar 2,167 pada skala nilai tidak suka. Dari kedua Tabel 10 dan 11 untuk parameter warna ternyata panelis lebih menyukai warna tempe matang atau yang telah digoreng hal ini diketahui melalui nilai paling tinggi terdapat pada tempe kedelai matang sebesar 6,500.

Aroma

Tempe mempunyai aroma yang spesifik, yang disebabkan oleh terjadinya degradasi komponen-komponen dalam kedelai selama fermentasi. Menurut Hesseltine et al. (1976), proses pembuatan tempe menjadikan kedelai lebih enak dimakan dan meningkatkan nilai gizinya. Skor kesukaan terhadap aroma tempe ditunjukkan pada Tabel 10 dan 11.

Dari Tabel 10 dapat dilihat bahwa semua data menunjukkan tidak ada beda nyata terhadap aroma tempe untuk semua perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa panelis secara umum menyukai aroma tempe dengan semua perlakuan. Tempe kacang kedelai 42 jam memiliki nilai tertinggi sebesar 5,167 pada skala nilai agak suka sedangkan tempe kacang gude 36 jam memiliki nilai terendah sebesar 4,250 pada skala nilai netral.

Dari Tabel 11 dapat dilihat adanya beda nyata yaitu antara tempe kacang kedelai dengan tempe kacang tunggak dan tempe kacang gude. Sedangkan tempe kacang tunggak dan tempe kacang gude menunjukkan tidak ada beda nyata. Tempe kacang kedelai fermentasi 36 jam memiliki nilai tertinggi 6,042 pada skala nilai suka sedangkan tempe kacang tunggak fermentasi 36 jam dan tempe kacang gude fermentasi 30 jam memiliki nilai terendah 4,333 pada skala nilai netral. Dari kedua Tabel 9 dan 10 untuk parameter aroma panelis lebih menyukai tempe matang dibandingkan dengan tempe mentah. Hal ini dapat dilihat dari nilai tertinggi pada sampel tempe kedelai matang 36 jam yaitu 6,042.

Tempe kacang tunggak dan tempe kacang gude memiliki aroma yang berbeda dengan tempe kacang kedelai, pada tempe tunggak dan tempe gude aromanya menyengat. Aroma pada tempe disebabkan adanya senyawa-senyawa volatil dan non-volatil. Senyawa-senyawa volatil tersebut antara lain methana, ethana, n-heksana, 2-propanon, 2-pentanon, 2-heptanol dan 2,4 dekadiena sedangkan senyawa non-volatil terdiri dari ester karbonil dan asam karbonilat (Ilyas et al. 1977). Perbedaan aroma antara tempe kedelai, tempe tunggak dan tempe gude disebabkan pengaruh aktivitas mikroorganisme, ini sesuai dengan pendapat Supriyanto dalam Pawiroharsono (1995) bahwa jenis aroma yang dihasilkan sangat dipengaruhi oleh jenis mikroorganisme yang digunakan untuk inokulasi.

Rasa

Rasa tempe pada umumnya gurih hal ini karena adanya kandungan protein dan lemak yang cukup tinggi pada kedelai yang kemudian dihidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana.

Parameter rasa diujikan hanya untuk sampel tempe matang hal ini dikarenakan untuk tempe mentah rata-rata panelis tidak mau mencobanya. Skor kesukaan terhadap aroma tempe ditunjukkan pada Tabel 11. Dari Tabel 11 dengan parameter rasa cenderung menunjukkan adanya beda nyata. Rasa tempe kedelai berbeda nyata dengan tempe tunggak dan tempe gude. Sedangkan tempe tunggak dan tempe gude keduanya tidak berbeda nyata.

Nilai untuk parameter rasa berkisar antara 3,792 - 6,083 yang berarti pada skala nilai agak tidak suka sampai skala

nilai suka. Nilai tertinggi yaitu pada tempe kedelai 36 jam sebesar 6,083 dan terendah pada tempe gude 42 jam sebesar 3,792. Hal ini menunjukkan rasa tempe kedelai tetap yang paling disukai diantara ketiga tempe sedangkan tempe gude merupakan tempe yang paling tidak disukai dari segi rasanya hal ini dikarenakan pada rasa tempe gude agak sedikit pahit jika dibandingkan dengan tempe kedelai.

Aftertaste

Aftertaste diujikan sama seperti pada parameter rasa yaitu hanya untuk sampel tempe matang. Skor kesukaan terhadap aftertaste tempe ditunjukkan pada Tabel 11.

Dari Tabel 11 dengan parameter aftertaste cenderung menunjukkan adanya beda nyata. Aftertaste tempe kedelai fermentasi 30 jam dan 36 jam menunjukkan tidak berbeda nyata namun berbeda nyata dengan fermentasi 42 jam. Aftertaste tempe tunggak fermentasi 30 jam berbeda nyata dengan fermentasi 36 jam namun tidak berbeda nyata dengan tempe tunggak fermentasi 42 jam, tempe gude fermentasi 30 jam, tempe gude fermentasi 36 jam dan tempe gude fermentasi 42 jam.

Nilai untuk parameter aftertaste berkisar antara 3,500 - 5,667 yang berarti pada skala nilai agak tidak suka sampai agak suka. Nilai tertinggi yaitu pada tempe kedelai 36 jam sebesar 5,667 dan terendah pada tempe gude 42 jam sebesar 3,500. Hal ini menunjukkan aftertaste tempe kedelai tetap yang paling disukai diantara ketiga tempe sedangkan tempe gude merupakan tempe yang paling tidak disukai.

Tekstur

Tekstur yang kompak pada tempe disebabkan oleh miselia-miselial yang menghubungkan antara biji-biji kacang. Skor kesukaan terhadap tekstur tempe ditunjukkan pada Tabel 10 dan 11.

Dari Tabel 10 dapat dilihat tekstur yang paling tinggi nilainya yaitu tekstur tempe kedelai 42 jam sebesar 5,792 pada skala nilai agak suka sedangkan yang paling rendah nilainya yaitu tekstur tempe gude 30 jam sebesar 3,667 pada skala agak tidak suka. Dilihat dari skala nilai maka penerimaan panelis berkisar antara agak tidak suka sampai suka dengan tempe kedelai memiliki nilai paling tinggi.

Dari Tabel 11 dapat dilihat tekstur yang paling tinggi nilainya yaitu tekstur tempe kedelai 36 jam sebesar 5,458 pada skala nilai agak suka sedangkan yang paling rendah nilainya yaitu tekstur tempe gude 42 jam sebesar 3,667 pada skala agak tidak suka. Dilihat dari skala nilai maka penerimaan panelis berkisar antara agak tidak suka sampai suka dengan tempe kedelai memiliki nilai paling tinggi. Sedangkan dari kedua Tabel 10 dan 11 tekstur tempe kedelai mentah memiliki nilai paling tinggi. Hal ini karena pada tempe kedelai teksturnya lebih empuk dibandingkan tempe tunggak dan tempe gude. Pada tempe tunggak dan tempe gude teksturnya masih agak keras sehingga panelis kurang menyukainya.

Menurut Winarno (1989), kelunakan biji dipengaruhi oleh senyawa penyusun dinding sel maupun isi sel. Penyusun dinding sel terdiri dari polisakarida yang terdiri dari hemiselulosa, pektin, lignin dan selulosa. Pelunakan biji selama proses pembuatan tempe terjadi saat perendaman dan pengukusan. Selama fermentasi dan

fermentasi lanjut tempe biji kedelai semakin lunak disebabkan oleh degradasi komponen penyusun sel dan rusaknya jaringan akibat mikroba (Patriatami 1996).

Overall

Overall merupakan gabungan dari parameter-parameter sebelumnya yaitu warna, aroma, rasa, aftertaste dan tekstur. Skor kesukaan terhadap overall tempe ditunjukkan pada Tabel 10 dan 11.

Dari Tabel 10 dapat dilihat bahwa tempe kedelai selama fermentasi menunjukkan beda nyata dengan tempe tunggak dan tempe gude selama fermentasi. Sedangkan tempe tunggak dan tempe gude keduanya tidak berbeda nyata. Tempe kedelai 42 jam memiliki nilai tertinggi sebesar 5,875 pada skala nilai agak suka sedangkan tempe gude 30 jam memiliki nilai terendah sebesar 3,583 pada skala nilai agak tidak suka. Dilihat dari skala nilai maka penerimaan panelis berkisar antara agak tidak suka sampai suka dengan tempe kedelai memiliki nilai paling tinggi.

Dari Tabel 11 dapat dilihat yang paling tinggi nilainya yaitu tekstur tempe kedelai 36 jam sebesar 5,875 pada skala nilai agak suka sedangkan yang paling rendah nilainya yaitu tempe gude 42 jam sebesar 3,625 pada skala agak tidak suka. Dilihat dari skala nilai maka penerimaan panelis berkisar antara agak tidak suka sampai suka dengan tempe kedelai memiliki nilai paling tinggi. Sedangkan dari kedua Tabel 9 dan 10 secara overall tempe kedelai mentah maupun tempe kedelai matang memiliki nilai paling tinggi atau yang paling disukai karena keduanya sama-sama memiliki nilai paling tinggi sebesar 5,875.

Berdasarkan penilaian secara keseluruhan terhadap sampel tempe mentah dan tempe matang maka dapat dilihat bahwa tempe kedelai merupakan tempe yang paling disukai oleh panelis dengan rata-rata nilainya 5 (agak suka) sedangkan tempe tunggak maupun tempe gude memiliki nilai yang hampir sama berkisar antara 3 (agak tidak suka) dan 4 (netral). Penyebab tempe tunggak dan tempe gude kurang disukai antara lain karena warnanya yang kurang menarik pada tempe gude warnanya agak kehitaman sedangkan pada tempe tunggak warnanya putih kecoklatan. Tekstur tempe tunggak dan tempe gude yang lebih keras dibandingkan tempe kedelai serta aromanya yang menyengat.

KESIMPULAN

Berdasarkan pada penelitian yang telah dilakukan, dapat diketahui: Variasi perlakuan jenis kacang dan waktu fermentasi memberikan pengaruh terhadap nilai gizi tempe kedelai, tempe tunggak dan tempe gude. Semakin lama waktu fermentasinya kadar air, kadar abu dan kadar protein tempe juga mengalami peningkatan. Sedangkan kadar lemak dan kadar karbohidratnya mengalami penurunan. Jika dibandingkan dengan SNI 01-3144-1992 maka kadar air tempe tunggak dan tempe gude lebih tinggi dibandingkan tempe kedelai sedangkan kadar protein dan kadar abu tempe tunggak dan tempe gude lebih rendah dibandingkan tempe kedelai. Variasi perlakuan jenis kacang dan waktu fermentasi memberikan

pengaruh terhadap aktivitas antioksidan dan kadar total fenol tempe kedelai, tempe tunggak dan tempe gude. Semakin lama waktu fermentasinya maka kapasitas antioksidan dan kadar total fenolnya juga semakin meningkat. Variasi perlakuan jenis kacang dan waktu fermentasi memberikan pengaruh terhadap sifat sensoris tempe kedelai, tempe tunggak dan tempe gude. Tempe kedelai memiliki tingkat kesukaan lebih tinggi dibandingkan tempe tunggak dan tempe gude. Secara keseluruhan penerimaan panelis terhadap tempe tunggak dan tempe gude yaitu netral atau masih dapat diterima.

DAFTAR PUSTAKA

- Adam. 2009. Tempe dan Proses Pembuatannya. <http://www.ad4msan.com/>. Diakses pada tanggal 24 November 2009.
- Anon. 1992. Komposisi Gizi Kacang-kacangan. Direktorat Gizi. Jakarta.
- Anon. 2008. Antioksidan: Mengapa Kita Memerlukannya?. <http://www.sendokgarpu.com/>. Diakses pada tanggal 12 November 2009.
- Apriyantono A, Fardiaz D, Puspitasari NL, Sedarnawati, Budiyanto S. 1989. Analisis Pangan. PAU Pangan dan Gizi IPB. Bogor.
- Ardiansyah. 2007. Antioksidan dan Peranannya Bagi Kesehatan. <http://ardiansyah.multiply.com/journal>. Diakses pada tanggal 2 Juni 2009.
- Astuti M. 1995. Tempe dan Antioksidan: Prospek Pencegahan Penyakit Degeneratif. Bunga Rampai Tempe Indonesia. Yayasan Tempe Indonesia. Jakarta.
- Astuti M, Meliala A, Fabien D, Wahlg M. 2000. Tempe, a nutritious and healthy food from Indonesia. Asia Pacific J Clin Nutr 9 (4): 322-325.
- Danuwarsa. 2006. Analisis Proksimat dan Asam Lemak pada Beberapa Komoditas Kacang-kacangan. Buletin Teknik Pertanian Vol 11 No. 1.
- Deliani. 2008. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Protein, Lemak, Komposisi Asam Lemak dan Asam Fitat pada Pembuatan Tempe. [Tesis]. Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Ekasari Y. 2009. Pengaruh Lama Fermentasi Rhizopus oligosporus Terhadap Kadar Oligosakarida dan Sifat Sensorik Tepung Tempe Kedelai (*Glycine max*). [Skripsi]. Program Studi Gizi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Ferlina S. 2009. Tempe. <http://www.adn.lib.unair.ac.id/go.php>. Diakses pada tanggal 20 September 2010.
- Gsianturi. 2002. Pangan Transgenik. <http://www.gizi.net/>. Diakses pada tanggal 14 Januari 2010.
- Haliza W. 2008. Tanpa Kedelai Masih Bisa Makan Tempe. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pasca Panen Pertanian. Bogor. Hal 10-12.
- Handajani. 2002. Potensi Koro Sebagai Sumber Gizi dan Makanan Fungsional. UNS Press. Surakarta.
- Hesseltine CW. 1976. Research at Northern Regional Research Laboratory on Fermented Foods. Proc. Conf. Soybean Product for Protein in Human Foods. USDA .
- Hidayat N. 2009. Tahapan Proses Pembuatan Tempe. <http://lecture.brawijaya.ac.id/nurhidayat/>. Diakses pada tanggal 14 Januari 2010.
- Ijlas N. 1973. Preservation and Shelf-Life Studies of Tempe. Unpublished M. S. Thesis. The Ohio State University.
- Jha HC, Kiriakidis S, Hoppe M, Edge H. 1997. Tempe constituents as antioxidants. Paper Abstract for International Tempe Symposium, Bali. Institutes Physiological Chemistry, University of Bonn.
- Jones ID. 1975. Effects of processing by fermentation on nutrients. In Nutritional Evaluation of Food Processing. 2nd ed. Harris RS, Karmas E (eds). AVI Publishing Co., Westport, CT.
- Kasmidjo. 1990. Tempe Mikrobiologi dan Biokimia Pengolahan Serta Pemanfaatannya. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi UGM. Yogyakarta.
- Kunia, K. 2008. Potensi Kacang Hiris untuk Obat dan Pangan. <http://kabelan-kunia.blogspot.com/2008/11/potensi-kacang-hiris-untuk-obat-dan.html/>. Diakses pada tanggal 9 Februari 2010.

- Muchtadi, D. 1989. Petunjuk Laboratorium Evaluasi Nilai Gizi Pangan. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Mulato S, Widyotomo S. 2003. Teknik Budaya dan Hasil Tanaman Kakao. Pusat Pelatihan Kopi dan Kakao, Jember
- Mulyowidarso RK. 1988. The Microbiology and Biochemistry of Soybean. Soaking for Tempe Fermentation. [Thesis]. Departement of Food Science and Technology, The University of New South. Wales..
- Ningsih, W. 2007. Evaluasi Senyawa Fenolik (Asam ferulat dan Asam p-kumarat) pada Biji, Kecambah dan Tempe Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*). Departemen Teknologi Pertanian. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Pangastuti HP, Triwibowo S. 1996. Proses Pembuatan Tempe Kedelai III: Analisis Mikrobiologi. Cermin Dunia Kedokteran No 109.
- Patriatami SU. 1996. Perubahan Sensoris dan Mikrobiologis selama Terjadinya Tempe Busuk. [Skripsi]. Jurusan THP FTP UGM. Yogyakarta.
- Pudjiraharti S, Budiwati TA, Iskandar YM. 2004. Studi Aplikasi Ampas Tahu untuk Inokulum Strain *Rhizopus* Protease Tinggi. Prosiding Seminar Tantangan Penelitian Kimia. Pusat Penelitian Kimia LIPI. Bandung.
- Reynertson. 2007 dalam Skripsi Dita Restya. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. 2009. Uji Aktivitas Penangkap Radikal Isolat C dan D Fraksi IV Ekstrak Etanol Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora*. L) dengan Metode DPPH.
- Senter SD, Robertson JA, Meredith FI. 1989. Phenolic compounds of the mesocarp of Cresthaven peaches during storage and ripening. J Food Sci 54:1259-1260.
- Setyaningsih D, Apriyantono A, Sari MP. 2008. Analisis Sensoris untuk Agroindustri. Bogor. Hal 50.
- Smith JL, alford JA. 1968. Action of microorganisms on the peroxides and carbonyls of rancid fat. J Food Sci 33: 93-97.
- Steinkraus, KH. 1983. Handbook of Indegenous Fermented Foods. Marcel Dekker, Inc. New York. 131-146.
- Subagio A, Morita N. 2001. No Effect of Esterification with Fatty Acid on Antioxidant Activity of Lutein. Food Res. Intl 34: 315-320.
- Prawiroharsono S. 1996. Aspek Mikrobiologi Tempe. Bunga Rampai Tempe Indonesia. Yayasan Tempe Indonesia, Jakarta.
- Sudarmadji S, Haryono B, Suhardi. 2003. Analisa Bahan Makanan dan Pertanian. Liberty. Yogyakarta.
- Syarief R. 1999. Wacana Tempe Indonesia. Universitas Katolik Widya Mandala Press, Surabaya.
- Tranggono, Sutardi, Kuswijayanto B. 1992. Aktivitas tripsin inhibitor selama proses pembuatan tempe koro benguk (*Mucuna pruriens*), kacang tolo (*Vigna unguiculata*) dan gude (*Cajanus cajan*). Agritech 12 (4): 2-11.
- Wang HJ, Murphy P A. 1996. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. J Agric Food Chem 44: 2377-2383.
- Winarno FG. 1989. Enzim Pangan dan Gizi. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Winarno FG. 2002. Kimia Pangan dan Gizi. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Marsono Y. 2004. Serat Pangan Dalam Perspektif Ilmu Gizi. Pidato Pengukuhan Guru Besar. Majelis Guru Besar Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta

Kapasitas antioksidan dan kadar kurkuminoid ekstrak rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) menggunakan pelarut air dengan variasi proporsi pelarut dan metode pemanasan

Antioxidant capacity and curcuminoid content of temulawak rhizome extract (*Curcuma xanthorrhiza*) using water solvent with variation of solvent proportion and heating method

TRIWIK SUSILOWATI, KAWIJI, SETYANINGRUM ARIVIANI

Prodi Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret, Jl. Ir. Sutami 36a Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 5 April 2014. Revisi disetujui: 8 Juni 2014.

Abstract. Susiowati T, Kawiji, Ariviani S. 2012. Antioxidant capacity and curcuminoid content of temulawak rhizome extract (*Curcuma xanthorrhiza*) using water solvent with variation of solvent proportion and heating method. *Biofarmasi* 14: 83-89. Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) rhizome has some advantages such as analgesic, antibacterial, antifungal, antidiabetic, and antioxidant agent. The advantages of Temulawak due to its curcuminoid, germacrene, xanthorrhizol, alpha-beta-curcumin contents. Antioxidant capacity of temulawak rhizome is dominated by phenolic compounds including curcuminoid. Although, curcuminoid doesn't soluble in water, commonly the consumption of temulawak rhizome extract was done by water solvent extraction, such as in herbal medicine and health drinks. In the other way, Curcuminoid tends to decrease during heating process in boiling water because of its degraded to be ferulic acid and diferuloymethane, so it is necessary to study the heating method which is suitable to minimize the damage of curcuminoid and decrease of antioxidant capacity. The research used Completely Randomized Design (CRD), which consists of two steps. The first step was to determine the effects of solvent proportion, includes five levels (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5). The second step was to determine the effects of heating method on the three selected samples which include three levels: 100°C for 5 minutes, 80°C for 15 minutes, and 65°C for 30 minutes. Curcuminoid content of temulawak rhizome extract increased along the solvent increasing proportion, the optimum solvent proportion of 1:4. Total phenolic content and antioxidant potency of extracts of Temulawak rhizomes decreased along the increasing of proportion of the solvent. The long time of heating method although using low temperature determined the decreased of content of curcuminoid, the total phenolic content and antioxidant potency. Extraction techniques and the best heating of antioxidant capacity used Temulawak solvent proportion of 1:1 and heated at 100°C for 5.

Keywords: antioxidant, *Curcuma xanthorrhiza*, curcuminoid, temulawak extract

PENDAHULUAN

Indonesia kaya akan tanaman herbal yang perlu dikembangkan sebagai alternatif dari obat-obatan medis yang harganya mahal. Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) merupakan salah satu tanaman herbal yang mempunyai potensi untuk dikembangkan. Pemerintah telah memberikan perhatian pada tanaman temulawak, antara lain Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia telah menentukan 9 tanaman unggulan dimana salah satunya adalah temulawak. Pada tahun 2004 pemerintah mencanangkan "Gerakan Nasional Minum Temulawak" (BPOM RI 2005). Saat ini temulawak selain di Asia Tenggara dapat ditemui pula di Cina, IndoCina, Bardabos, India, Jepang, Korea, Amerika Serikat dan beberapa negara Eropa.

Rimpang temulawak bermanfaat bagi kesehatan karena mengandung senyawa aktif, antara lain Kurkuminoid, Germacrene, Xanthorrhizol, Alpha- Beta-Curcumen. Karena kandungan bahan aktif tersebut, rimpang temulawak mempunyai berbagai khasiat, yaitu sebagai analgesik, antibakteri, antijamur, antidiabetik, antidiare,

antiinflamasi, anti-hepatotoksik, antioksidan, antitumor, depresan, diuretik, hipolipidemik, insektisida, dan lain-lain (Purnomowati 2008). Komposisi kimia rimpang temulawak tersusun atas pati 29-30%, kurkuminoid 2-2,81% per berat kering (Kiswanto 2005), dan minyak atsiri 6-10% (Sidik et al. 1993).

Kurkuminoid pada rimpang temulawak merupakan turunan dari diferuloilmetan yaitu senyawa dimetoksi diferuloilmetan (kurkumin) dan monodesmetoksi diferuloilmetan (desmetoksikurkumin). Kurkuminoid berwarna kuning, rasa sedikit pahit, larut dalam aseton, alkohol, asam asetat glasial, dan alkali hidroksida. Kurkuminoid tidak bersifat toksik serta tidak larut dalam air dan dietileter (Kiso 1985), tetapi umumnya konsumsi rimpang temulawak dilakukan dengan ekstraksi menggunakan air sebagai pelarutnya, misalnya pada jamu dan minuman kesehatan.

Penelitian Safitriani (2005) menunjukkan bahwa ekstraksi rimpang temulawak dengan pelarut air menghasilkan ekstrak dengan kadar kurkuminoid yang semakin meningkat seiring penambahan proporsi pelarut. Perlakuan pengendapan terhadap ekstrak air rimpang

temulawak memperlihatkan penurunan kadar kurkuminoidnya. Penurunan kadar kurkuminoid terjadi karena beberapa senyawa ikut mengendap termasuk pati dan kurkuminoid, sehingga tidak perlu dilakukan pengendapan lagi untuk mempertahankan kandungan bahan aktif dalam ekstrak rimpang temulawak.

Menurut hasil penelitian yang dilakukan oleh Pudjiharti (1999) dalam Safitriani (2005), kandungan kurkuminoid yang diperoleh dari ekstrak kunyit segar cenderung turun selama pemanasan dalam air mendidih. Penurunan ini terjadi karena kurkuminoid terdegradasi, sehingga perlu dikaji variasi suhu dan lama pemanasan yang sesuai untuk meminimalisasi kerusakan kurkuminoid.

Kapasitas antioksidan rimpang temulawak disebabkan oleh komponen senyawa fenolik termasuk di dalamnya kurkuminoid. Kurkuminoid memiliki kapasitas antioksidan karena ada gugus OH fenolik yang terdapat pada rantai sampingnya (Zahro 2009). Kurkuminoid peka terhadap radikal bebas dan dapat bereaksi selama atom H dilepaskan (Safitriani 2005). Senyawa fenol bisa berfungsi sebagai antioksidan karena kemampuannya meniadakan radikal-radikal bebas dan radikal peroksida sehingga efektif dalam menghambat oksidasi lipida (Suradi 1998).

Menurut Hariyadi (2000), ada berbagai teknik pasteurisasi dalam bahan pangan, antara lain *long time pasteurization* (suhu 65 °C selama 30 menit), dan *High temperature short time (HTST) pasteurization* (suhu 73°C selama 15 detik). Pasteurisasi juga dipengaruhi oleh jenis bahan dan komposisinya. Berdasarkan tingkat keasaman, bahan pangan sering dikelompokkan menjadi pangan asam atau *acid food* (pH<4.) dan pH berasam rendah atau *low acid food* (pH≥4.5). Produk pangan berasam rendah merupakan produk pangan yang berisiko bagi kesehatan karena mempunyai kemungkinan tumbuhnya mikroba patogen sehingga perlu dilakukan pasteurisasi untuk mengurangi jumlah mikroba patogen. Ekstrak rimpang temulawak termasuk dalam *low acid food*. Teknik pasteurisasi pada *low acid food* antara lain suhu 80 °C selama 15 menit, dan 65 °C selama 30 menit. Sedangkan teknik pemanasan yang biasa dilakukan pada proses pembuatan jamu adalah pada suhu 100 °C selama 5 menit.

Tujuan penelitian ini adalah (i) Menentukan pengaruh proporsi pelarut terhadap kadar kurkuminoid dan kapasitas antioksidan ekstrak rimpang temulawak. (ii) Menentukan pengaruh metode pemanasan terhadap kadar kurkuminoid dan kapasitas antioksidan ekstrak rimpang temulawak.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Rekayasa Proses Pengolahan Pangan dan Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret, Surakarta. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-April 2010.

Bahan dan alat

Bahan utama yang digunakan adalah rimpang temulawak yang dibeli dari pasar Legi, Surakarta. Pelarut

yang digunakan adalah aquades. Bahan-bahan yang digunakan untuk analisa antara lain: (i) Kadar kurkuminoid: kurkumin standar, etanol 96%. (ii) Penangkapan Radikal Bebas: DPPH (Diphenyl picrylhydrazyl), methanol. (iii) Total Fenol: Na₂CO₃ alkali, Folin ciocalteu, fenol murni, aquades.

Alat-alat yang digunakan untuk membuat ekstrak temulawak antara lain alat parut, saringan, waskom, gelas ukur. Alat-alat yang digunakan untuk analisa antara lain: (i) Kadar kurkuminoid : spektrofotometer UV-Visible, tabung reaksi, gelas ukur, vortex, pipet volume, Penangkapan Radikal Bebas (DPPH) : spektrofotometer UV-Visible, tabung reaksi tertutup, pipet volume, vortex. (ii) Total Fenol : spektrofotometer UV-Visible, tabung reaksi, gelas ukur, vortex, pipet volume, labu takar.

Tahapan penelitian

Kadar kurkuminoid (Zahro 2009)

Larutan standar kurkuminoid dibuat dalam pelarut etanol 96% dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 mg/l, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 425 nm. Sebanyak 1 ml larutan ekstrak dilarutkan dalam pelarut etanol 96% menjadi 10 ml lalu distirer selama 10 menit. Dari larutan tersebut diambil 0,1 ml dan ditambahkan ethanol 96% menjadi 5 ml lalu ditera absorbansinya pada panjang gelombang 425 nm.

Penangkapan radikal bebas (DPPH) (Subagio 2001)

0,1 ml larutan ekstrak rimpang temulawak ditambahkan methanol sampai 10 ml, lalu distirer selama 10 menit. Dari larutan tersebut kemudian diambil 1 ml dan ditambahkan 0,5 ml larutan DPPH lalu ditambahkan 3,5 ml methanol setelah itu divortex. kemudian didiamkan selama 20 menit. Setelah itu ditera absorbansinya pada panjang gelombang 515 nm. Untuk blanko digunakan 4,5 ml methanol ditambahkan 0,5 ml larutan DPPH. Larutan yang digunakan digunakan sebagai kontrol adalah methanol.

Aktivitas antioksidan rimpang temulawak ditentukan dengan membandingkan absorbansi ekstrak rimpang temulawak dengan absorbansi blanko.

Total fenol (Plumer 1971; Senter et al. 1989)

Sebanyak 1 ml larutan sampel ditambahkan 5 ml Na₂CO₃ alkali 2% kemudian divortex dan dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit, lalu ditambahkan Folin ciocalteu encer sebanyak 0,5 ml dan divortex. Sampel kemudian didiamkan selama 30 menit. Absorbansi ditera pada panjang gelombang 750 nm. Konsentrasi fenol dihitung berdasarkan kurva standar yang diperoleh dari larutan fenol murni 10-50 ppm.

Analisa data

Perancangan Penelitian menggunakan pola Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari dua tahap. Tahap pertama dilakukan untuk mengetahui pengaruh proporsi pelarut, meliputi lima taraf yaitu rimpang parut : air (1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5). Tahap kedua dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemanasan pada tiga sampel terpilih meliputi 3 taraf yaitu suhu 100°C selama 5 menit, suhu 80°C selama 15 menit, dan suhu 65°C selama 30 menit.

Masing-masing perlakuan dilakukan tiga kali ulangan sampel dan dua kali ulangan analisa. Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan perlakuan, data yang diperoleh dianalisis dengan *one-way* ANOVA pada tingkat $\alpha = 0,05$. Kemudian dilanjutkan dengan analisa Duncan pada tingkat $\alpha = 0,05$ untuk melihat ada tidaknya perbedaan antar perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh proporsi pelarut terhadap kadar kurkuminoid dan kapasitas antioksidan ekstrak rimpang temulawak

Secara umum ekstraksi dapat didefinisikan sebagai proses pemisahan dengan penambahan pelarut tertentu untuk mengeluarkan komponen campuran dari zat padat atau zat cair (Srijanto 2004). Proses ekstraksi pada penelitian ini diawali dengan pengecilan ukuran rimpang temulawak untuk mempermudah mengeluarkan zat-zat dalam rimpang temulawak. Pengecilan ukuran dilakukan dengan pamarutan menggunakan alat parut sederhana. Setelah itu rimpang parut ditambahkan air kemudian diremas untuk mengeluarkan zat-zat dalam rimpang parut. Proses ekstraksi yang dilakukan menggunakan pendekatan seperti pada pembuatan jamu tradisional.

Pada umumnya konsumsi rimpang temulawak dilakukan dengan ekstraksi menggunakan air sebagai pelarutnya, misalnya pada jamu dan minuman kesehatan. Rimpang temulawak mempunyai beberapa manfaat bagi kesehatan terkait kapasitasnya sebagai antioksidan. Kapasitas antioksidan rimpang temulawak terutama didukung oleh senyawa-senyawa fenolik termasuk di dalamnya kurkuminoid. Dalam penelitian ini dikaji pengaruh proporsi pelarut air yang digunakan terhadap kadar kurkuminoid dan kapasitas antioksidan ekstrak yang dihasilkan.

Kadar kurkuminoid

Kurkuminoid secara luas digunakan sebagai zat pewarna makanan, bumbu, rempah-rempah, dan berguna dalam bidang pengobatan (Gaikar and Dandekar 2001). Menurut Sidik et al. (1993), kurkuminoid pada rimpang temulawak merupakan turunan dari diferuloilmetan yaitu senyawa dimetoksi diferuloilmetan (kurkumin) dan monodesmetoksi diferuloilmetan (desmetoksikurkumin). Kurkuminoid rimpang temulawak adalah suatu zat yang berwarna kuning atau kuning jingga, dengan rasa sedikit pahit, larut dalam aseton, alkohol, asam asetat glasial, dan alkali hidroksida. Kurkuminoid tidak larut dalam air dan dietileter (Kiso,1985).

Ekstraksi kurkuminoid menggunakan pelarut air menurut Safitriani (2005) yaitu semakin banyak air yang ditambahkan maka senyawa yang larut dalam air akan semakin bertambah. Semakin tinggi proporsi pelarut maka kadar kurkuminoid juga semakin tinggi. Ekstrak rimpang temulawak tanpa pengendapan memiliki kadar kurkuminoid lebih tinggi dibandingkan ekstrak rimpang temulawak yang diendapkan. Hal ini dapat terjadi karena pada waktu pengendapan, beberapa senyawa ikut

mengendap termasuk pati dan kurkuminoid. Sehingga tidak perlu dilakukan pengendapan lagi untuk mempertahankan kandungan bahan aktif dalam ekstrak rimpang temulawak.

Berdasarkan analisis data yang telah dilakukan, diketahui bahwa proporsi pelarut berpengaruh terhadap kadar kurkuminoid ekstrak rimpang temulawak. Kadar kurkuminoid ekstrak rimpang temulawak meningkat seiring penambahan proporsi pelarut, berturut-turut pada proporsi pelarut 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 (b/v), yaitu 1,26; 1,69; 1,85; dan 2,01 g/100 g bahan kering rimpang temulawak. Kurkuminoid bersifat tidak larut air. Penambahan proporsi pelarut menyebabkan tekanan yang diterima rimpang parut menjadi semakin kecil dan penurunan baru terjadi pada proporsi pelarut 1:5, yaitu 1,37 g/100 g bahan kering rimpang temulawak. Hal ini mengindikasikan bahwa ekstraksi dengan proporsi pelarut 1:4 (b/v) merupakan teknik ekstraksi yang optimum untuk mendapatkan ekstrak rimpang temulawak dengan kadar kurkuminoid terbesar (Tabel 1).

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Safitriani (2005) yang memperlihatkan bahwa semakin tinggi proporsi pelarut maka semakin banyak komponen kurkuminoid yang ikut terekstrak. Menurut Kiswanto (2005), kadar kurkuminoid rimpang temulawak antara 2%-2,81% per berat kering. Hal ini menunjukkan bahwa teknik ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini cukup efisien yang menghasilkan kadar kurkuminoid antara 1,26-2,01 (g/100 g bahan kering rimpang temulawak).

Kapasitas antioksidan

Kapasitas antioksidan dalam penelitian ini ditinjau dari kadar total fenol dengan metode folin ciocalteu dan kapasitas anti radikal dengan metode DPPH (Diphenyl picrylhydrazyl). Menurut Kumalaningsih (2006), senyawa fenol merupakan antioksidan yang memberikan atom hidrogen yang berasal dari gugus hidroksi sehingga terbentuk senyawa yang stabil. DPPH menerima elektron atau radikal hidrogen akan membentuk molekul diamagnetik yang stabil. Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH, akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH (Gurav et al. 2007).

Total fenol

Senyawa fenolik telah diketahui memiliki berbagai efek biologis seperti aktivitas antioksidan melalui mekanisme sebagai pereduksi, penangkap radikal bebas, pengkelat logam, peredam terbentuknya oksigen singlet serta pendonor elektron (Kaur dan Kapoor 2002). Penentuan kandungan fenolik total dapat dilakukan dengan menggunakan pereaksi Folin-Ciocalteu. Metode ini berdasarkan kekuatan mereduksi dari gugus hidroksi fenolik. Semua senyawa fenolik termasuk fenol sederhana dapat bereaksi dengan reagen Folin Ciocalteu. Adanya inti aromatis pada senyawa fenol (gugus hidroksi fenolik) dapat mereduksi fosfomolibdat fosfotungstat menjadi molibdenum yang berwarna biru (Pratimasari 2009).

Tabel 1. Kadar kurkuminoid ekstrak rimpang temulawak

Proporsi pelarut	Kadar kurkuminoid ekstrak (%)	Randemen	Kadar kurkuminoid (g/100 g bahan kering rimpang temulawak)
1:1	0,09	84,01	1,26a
1:2	0,13	90,88	1,69c
1:3	0,14	91,86	1,85d
1:4	0,15	95,03	2,01e
1:5	0,10	96,48	1,37b

* Angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan adanya beda nyata pada taraf $\alpha=0,05$

Tabel 2. Kadar total fenol ekstrak rimpang temulawak

Proporsi pelarut	Kadar total fenol (g/100 g bahan kering rimpang temulawak)
1:1	7,64d
1:2	7,54c
1:3	6,89b
1:4	6,43a
1:5	6,33a

*Angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan adanya beda nyata pada taraf $\alpha=0,05$

Tabel 3. Potensi antioksidan ekstrak rimpang temulawak

Proporsi pelarut	Potensi antioksidan (%)
1:1	47,23e
1:2	33,09a
1:3	26,26c
1:4	19,73b
1:5	16,59a

*Angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan adanya beda nyata pada taraf $\alpha=0,05$

Tabel 4. Kadar kurkuminoid ekstrak rimpang temulawak setelah pemanasan

Proporsi pelarut	Kadar kurkuminoid ekstrak rimpang temulawak (g/100 g bahan kering rimpang temulawak)			
	Tanpa pemanasan	T:65°C, 30 menit	T:80°C, 15 menit	T: 100°C, 5 menit
1:1	1,26	0,65a	0,69b	0,79c
1:2	1,69	0,87d	0,90e	0,94i
1:3	1,85	0,95f	1,03g	1,19h

* Angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan adanya beda nyata pada taraf $\alpha=0,05$

Tabel 5. Penurunan kadar kurkuminoid ekstrak rimpang temulawak pada berbagai metode pemanasan

Proporsi pelarut	Penurunan kadar kurkuminoid ekstrak rimpang temulawak (%)		
	T:65°C, 30 menit	T:80°C, 15 menit	T: 100°C, 5 menit
1:1	48,03e	44,76c	37,44b
1:2	48,71e	46,26a	44,35c
1:3	48,47e	44,41c	35,49a

* Angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan adanya beda nyata pada taraf $\alpha=0,05$

Tabel 6. Kadar total fenol ekstrak rimpang temulawak setelah pemanasan

Proporsi pelarut	Kadar total fenol ekstrak rimpang temulawak (g/100 g bahan kering rimpang temulawak)			
	Tanpa pemanasan	T:65°C, 30 menit	T:80°C, 15 menit	T: 100°C, 5 menit
1:1	7,64	5,84e	6,24i	6,29i
1:2	7,54	4,93c	5,62a	5,75a
1:3	6,89	3,66a	4,17b	4,51b

* Angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan adanya beda nyata pada taraf $\alpha=0,05$

Tabel 7. Penurunan kadar total fenol ekstrak rimpang temulawak pada berbagai metode pemanasan

Proporsi pelarut	Penurunan kadar total fenol ekstrak rimpang temulawak (%)		
	T:65°C, 30 menit	T:80°C, 15 menit	T: 100°C, 5 menit
1:1	23,61b	18,31a	17,6a
1:2	30,77c,a	25,44a	27,6b,c
1:3	46,88t	39,36e	34,18d

* Angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan adanya beda nyata pada taraf $\alpha=0,05$

Tabel 8. Potensi Antioksidan Ekstrak Rimpang Temulawak Setelah Pemanasan

Proporsi pelarut	Potensi antioksidan ekstrak ekstrak rimpang temulawak (%)			
	sebelum pemanasan	T:65°C, 30 menit	T:80°C, 15 menit	T: 100°C, 5 menit
1:1	47,23	36,38i	39,00g	40,72b
1:2	33,09	19,79c	22,06d	26,19e
1:3	26,26	14,38a	18,30b	19,32c

* Angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan adanya beda nyata pada taraf $\alpha=0,05$

Tabel 9. Penurunan Potensi Antioksidan Ekstrak Rimpang Temulawak pada Berbagai Metode Pemanasan

Proporsi pelarut	Penurunan potensi antioksidan fenol ekstrak rimpang temulawak (%)		
	T:65°C, 30 menit	T:80°C, 15 menit	T: 100°C, 5 menit
1:1	23,68d	17,4b	13,77a
1:2	40,06h	33,02g	20,69c
1:3	44,54i	30,28f	26,35e

* Angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan adanya beda nyata pada taraf $\alpha=0,05$

Berdasarkan analisis data yang telah dilakukan, diketahui bahwa proporsi pelarut berpengaruh terhadap kadar total fenol ekstrak rimpang temulawak. Kadar total fenol menurun seiring peningkatan proporsi pelarut, berturut-turut pada proporsi pelarut 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; dan 1:5 (b/v), yaitu 7,64; 7,54; 6,89; 6,43; dan 6,33 g/100 g bahan kering rimpang temulawak (Tabel 2).

Kadar total fenol berbanding terbalik dengan kadar kurkuminoid yang terdapat dalam ekstrak rimpang temulawak. Kadar total fenol menurun seiring peningkatan proporsi pelarut sedangkan kadar kurkuminoid meningkat seiring penambahan proporsi pelarut. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa fenol dalam ekstrak rimpang temulawak bukan didominasi oleh kurkuminoid tetapi senyawa fenol selain kurkuminoid yang larut air. Menurut Anon (2010), rimpang temulawak mengandung terpenoid dan xanthorizol (sesquiterpenoid). Terpenoid merupakan senyawa fenol yang larut dalam air (Cowan 1999).

Kapasitas anti radikal

Metode DPPH merupakan metode yang terbukti akurat dan praktis untuk mengetahui aktivitas penangkapan radikal beberapa senyawa. Radikal DPPH adalah suatu senyawa organik yang mengandung nitrogen tidak stabil dan berwarna ungu gelap. Setelah bereaksi dengan senyawa antioksidan, DPPH tersebut akan tereduksi. Penurunan intensitas warna yang terjadi disebabkan oleh berkurangnya ikatan rangkap terkonjugasi pada DDPH. Hal ini terjadi karena penangkapan satu elektron oleh antioksidan menyebabkan tidak adanya kesempatan elektron tersebut untuk beresonansi (Pratimasari 2009).

Kapasitas anti radikal dalam penelitian ini dinyatakan dalam potensi antioksidan. Potensi antioksidan dinyatakan dalam perkalian antara randemen ekstraksi dengan aktivitas antioksidan (Winarni 1998). Hasil analisa potensi antioksidan ekstrak rimpang temulawak pada berbagai proporsi pelarut pada Tabel 3.

Berdasarkan analisis data yang telah dilakukan, diketahui bahwa proporsi pelarut berpengaruh terhadap potensi antioksidan ekstrak rimpang temulawak. Potensi antioksidan menurun seiring peningkatan proporsi pelarut, berturut-turut pada proporsi pelarut 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5 (b/v), yaitu 47,23%; 33,09%; 26,26%; 19,73%; dan 16,59% (Tabel 3).

Potensi antioksidan terutama berasal dari senyawa fenol yang larut air selain kurkuminoid karena data yang diperoleh berkebalikan. Korelasi antara kadar total fenol dan potensi antioksidan ekstrak rimpang temulawak bernilai positif sedangkan korelasi antara kadar kurkuminoid dan potensi antioksidan ekstrak rimpang temulawak bernilai negatif.

Senyawa fenol dalam ekstrak rimpang temulawak merupakan antioksidan alami. Untuk mengetahui sejauh mana potensi anti radikal dari antioksidan alami dalam ekstrak rimpang temulawak terhadap antioksidan sintesis dalam penelitian ini digunakan BHT (*Butylated Hydroxy-Toluene*) sebagai kontrol positif. BHT digunakan sebagai kontrol positif karena diharapkan dapat memberikan aktivitas antioksidan lebih besar dibandingkan antioksidan alami yang terdapat dalam ekstrak rimpang temulawak. BHT memiliki nama kimia 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenoldan rumus kimianya adalah $C_{15}H_{24}O$ dengan bobot molekul sebesar 220.35 g/mol. BHT memiliki bentuk seperti butiran kristal tidak berwarna. Dalam pelarut metanol, BHT tidak berwarna. BHT mempunyai gugus

hidroksil sehingga memiliki aktivitas anti radikal (Pratiwi 2009).

Kadar BHT yang digunakan adalah 200 ppm, hal ini mengacu pada batas penggunaan BHT. Fungsi BHT adalah sebagai pemutus rantai radikal bebas (*free radical terminator*). BHT akan memberikan atom hidrogen sehingga terbentuk senyawa yang stabil (Kumalaningsih 2006). Aktivitas anti radikal ekstrak temulawak lebih rendah dibandingkan dengan kontrol positif BHT 200 ppm.

Aktivitas anti radikal ekstrak rimpang temulawak pada proporsi pelarut 1:1 adalah 47,23%; pada proporsi pelarut 1:2 adalah 33,09%; pada proporsi pelarut 1:3 adalah 26,26%; pada proporsi pelarut 1:4 adalah 19,73%; pada proporsi pelarut 1:5 adalah 16,59%, sedangkan aktivitas anti radikal BHT 200 ppm adalah 72,13%. Meskipun demikian, ekstrak rimpang temulawak dapat digunakan sebagai antioksidan alami karena aktivitas anti radikalnya tidak jauh beda dengan BHT 200 ppm yang merupakan batas maksimum penggunaan BHT.

Pengaruh metode pemanasan terhadap kadar kurkuminoid dan kapasitas antioksidan ekstrak rimpang temulawak

Dalam pembuatan jamu dan minuman kesehatan umumnya dilakukan pemanasan yang bertujuan untuk mengurangi jumlah mikroba patogen supaya layak untuk dikonsumsi. Dalam penelitian ini pengaruh pemanasan dilakukan pada ekstrak rimpang temulawak dengan proporsi pelarut 1:1; 1:2; dan 1:3 karena dari kelima proporsi pelarut yang digunakan, proporsi pelarut 1:1; 1:2; dan 1:3 menghasilkan kapasitas antioksidan yang paling tinggi. Perlakuan pemanasan yang dilakukan adalah suhu 65°C selama 30 menit, suhu 80°C selama 15 menit, dan suhu 100°C selama 5 menit. Variasi suhu dan lama pemanasan bertujuan untuk mengetahui metode pemanasan yang sesuai untuk meminimalisasi kerusakan kurkuminoid dan kapasitas antioksidan.

Kadar kurkuminoid

Dalam pembuatan jamu dan minuman kesehatan umumnya dilakukan pemanasan yang bertujuan untuk mengurangi jumlah mikroba patogen supaya layak untuk dikonsumsi. Menurut hasil penelitian yang dilakukan oleh Pudjiharti (1999) dalam Safitriani (2005), kandungan kurkuminoid yang diperoleh dari ekstrak kunyit segar cenderung turun selama pemanasan.

Dalam penelitian ini pengaruh pemanasan dilakukan pada ekstrak rimpang temulawak dengan proporsi pelarut 1:1; 1:2; dan 1:3. Hal ini dilakukan karena dari kelima proporsi air yang digunakan, diambil tiga terbaik berdasarkan kapasitas antioksidan, yaitu sampel dengan proporsi pelarut 1:1; 1:2; dan 1:3. Perlakuan pemanasan yang dilakukan adalah suhu 65°C selama 30 menit, suhu 80 °C selama 15 menit, dan suhu 100 °C selama 5 menit. Pemanasan pada suhu 65 °C selama 30 merupakan metode pemanasan secara pasteurisasi LTLT (*Low Temperature Long Time*) sedangkan pada suhu 80 °C selama 15 merupakan metode pemanasan yang biasa dilakukan untuk pasteurisasi susu dan pada suhu 100 °C selama 5 merupakan metode pemanasan pada pembuatan jamu.

Variasi suhu dan lama pemanasan bertujuan untuk mengetahui metode pemanasan yang sesuai untuk meminimalisasi kerusakan kurkuminoid. Analisis data yang telah dilakukan menunjukkan bahwa metode pemanasan berpengaruh terhadap kadar kurkuminoid ekstrak rimpang temulawak.

Berdasarkan Tabel 4 dapat diketahui bahwa semakin lama waktu pemanasan maka kadar kurkuminoid akan semakin menurun walaupun suhu yang digunakan lebih rendah. Menurut Pudjiharti (1999) dalam Safitriani (2005), kandungan kurkuminoid yang diperoleh dari ekstrak kunyit segar cenderung turun selama pemanasan dalam air mendidih.

Penurunan terbesar dengan lama 60 menit yaitu dari 1,089 g/100 g (db) menjadi 0,63 g/100 g (db). Hal ini disebabkan karena selama pemanasan, kurkuminoid mengalami degradasi dan membentuk asam ferulat dan ferulolimetan yang berwarna kuning kecoklatan (Mohammad et al. 2007). Dari penelitian yang telah dilakukan dapat diketahui kadar kurkuminoid ekstrak rimpang temulawak setelah pemanasan pada suhu 65 °C selama 30 menit berturut-turut pada proporsi pelarut 1:1; 1:2; 1:3 yaitu 0,65; 0,87; dan 0,95 g/100 g bahan kering rimpang temulawak. Pemanasan pada suhu 80 °C selama 15 menit berturut-turut pada proporsi pelarut 1:1; 1:2; 1:3 yaitu 0,69; 0,90; dan 1,03 g/100 g bahan kering rimpang temulawak. Pemanasan pada suhu 100 °C selama 5 menit pada proporsi pelarut 1:1; 1:2; 1:3 yaitu 0,79; 0,94; dan 1,19 g/100 g bahan kering rimpang temulawak. Penurunan kadar kurkuminoid ekstrak rimpang temulawak pada berbagai metode pemanasan pada Tabel 5.

Berdasarkan Tabel 5 diketahui bahwa penurunan kadar kurkuminoid ekstrak rimpang temulawak dengan proporsi pelarut 1:1 pada pemanasan suhu 65°C selama 30 menit, pemanasan suhu 80°C selama 15 menit, dan pemanasan suhu 100°C selama 5 menit berturut-turut yaitu 48,03%; 44,76%; dan 37,44%. Pada proporsi pelarut 1:2 pemanasan suhu 65°C selama 30 menit, pemanasan suhu 80°C selama 15 menit, dan pemanasan suhu 100°C selama 5 menit berturut-turut yaitu 48,71%; 46,26%; dan 44,35%. Pada proporsi pelarut 1:3 pemanasan suhu 65°C selama 30 menit, pemanasan suhu 80°C selama 15 menit, dan pemanasan suhu 100°C selama 5 menit berturut-turut yaitu 48,47%; 44,41%; dan 35,49%. Penurunan kadar kurkuminoid ekstrak rimpang temulawak semakin besar seiring lamanya waktu pemanasan walaupun suhu yang digunakan lebih rendah.

Metode pemanasan pada suhu 100 °C selama 5 menit merupakan metode pemanasan yang paling baik ditinjau dari kadar kurkuminoid ekstrak rimpang temulawak karena dengan metode ini, kerusakan kurkuminoid ekstrak rimpang temulawak dapat diminimalisasi.

Total fenol

Dalam penelitian ini pengaruh pemanasan terhadap kadar total fenol dilakukan pada ekstrak rimpang temulawak dengan proporsi pelarut 1:1; 1:2; dan 1:3 seperti halnya pada pengaruh pemanasan terhadap kadar kurkuminoid. Perlakuan pemanasan juga sama dengan pada penentuan pengaruh pemanasan terhadap kadar

kurkuminoid. Kadar total fenol pada berbagai metode pemanasan dapat dilihat pada Tabel 6.

Berdasarkan Tabel 4.6 diketahui bahwa kadar total fenol ekstrak rimpang temulawak setelah pemanasan suhu 65 °C selama 30 menit berturut-turut pada proporsi pelarut 1:1; 1:2; 1:3 yaitu 5,84; 4,93; dan 3,66 g/100 g bahan kering rimpang temulawak. Pemanasan pada suhu 80 °C selama 15 menit berturut-turut pada proporsi pelarut 1:1; 1:2; 1:3 yaitu 6,24; 5,62; dan 4,17 g/100 g bahan kering rimpang temulawak. Pemanasan pada suhu 100 °C selama 5 menit berturut-turut pada proporsi pelarut 1:1; 1:2; 1:3 yaitu 6,29; 5,75; dan 4,51 g/100 g bahan kering rimpang temulawak.

Analisis data yang telah dilakukan menunjukkan bahwa pemanasan berpengaruh terhadap kadar total fenol ekstrak rimpang temulawak. Kadar total fenol ekstrak rimpang temulawak setelah mendapat perlakuan pemanasan pada suhu 80 °C selama 15 menit tidak berbeda nyata dengan pemanasan pada suhu 100 °C selama 5 menit, tetapi berbeda nyata dengan pemanasan pada suhu 65 °C selama 30 menit. Kadar total fenol menurun seiring lamanya waktu pemanasan meskipun dengan suhu yang lebih rendah. Hal ini sejalan dengan pengaruh metode pemanasan terhadap kadar kurkuminoid. Senyawa fenol mengalami degradasi karena panas sehingga semakin lama pemanasan maka senyawa fenol semakin rusak. Penurunan kadar total fenol ekstrak rimpang temulawak pada berbagai metode pemanasan pada Tabel 7.

Berdasarkan Tabel 7 diketahui bahwa penurunan kadar total fenol ekstrak rimpang temulawak pada proporsi pelarut 1:1 pada pemanasan suhu 65°C selama 30 menit, pemanasan suhu 80°C selama 15 menit, dan pemanasan suhu 100°C selama 5 menit berturut-turut yaitu 23,61%; 18,31%; dan 17,6%. Pada proporsi pelarut 1:2 pemanasan suhu 65°C selama 30 menit, pemanasan suhu 80°C selama 15 menit, dan pemanasan suhu 100°C selama 5 menit berturut-turut yaitu 30,77%; 25,44%; dan 27,06%. Pada proporsi pelarut 1:3 pemanasan suhu 65°C selama 30 menit berturut-turut yaitu, pemanasan suhu 80°C selama 15 menit, dan pemanasan suhu 100°C selama 5 menit berturut-turut yaitu 46,88%; 39,36%; dan 34,18%.

Penurunan kadar total fenol semakin besar seiring lamanya waktu pemanasan walaupun suhu yang digunakan lebih rendah. Pola penurunan kadar total fenol sama dengan kadar kurkuminoid ekstrak rimpang temulawak. Hal ini mengindikasikan bahwa kerusakan senyawa fenolik lebih didominasi akibat kerusakan kurkuminoid.

Kapasitas anti radikal

Dalam penelitian ini pengaruh pemanasan terhadap kapasitas anti radikal dilakukan pada ekstrak rimpang temulawak dengan proporsi pelarut 1:1; 1:2; dan 1:3 seperti halnya pada pengaruh pemanasan terhadap kadar kurkuminoid dan total fenol. Perlakuan pemanasan juga sama dengan pada penentuan pengaruh pemanasan terhadap kadar kurkuminoid dan total fenol. Kapasitas anti radikal dalam penelitian ini dinyatakan dengan potensi antioksidan pada berbagai metode pemanasan, hasilnya dapat dilihat pada Tabel 6.

Dari Tabel 8 dapat diketahui potensi antioksidan ekstrak rimpang temulawak setelah pemanasan pada suhu 65 °C selama 30 menit berturut-turut pada proporsi pelarut 1:1; 1:2; 1:3 yaitu 36,38%; 19,79%; dan 14,38%. Pemanasan pada suhu 80 °C selama 15 menit berturut-turut pada proporsi pelarut 1:1; 1:2; 1:3 yaitu 39%; 22,06%; dan 18,30%. Pemanasan pada suhu 100 °C selama 5 menit berturut-turut pada proporsi pelarut 1:1; 1:2; 1:3 yaitu 40,72%; 26,19%; dan 19,32%.

Analisis data yang telah dilakukan menunjukkan bahwa pemanasan berpengaruh terhadap potensi antioksidan ekstrak rimpang temulawak. Penurunan potensi antioksidan ekstrak rimpang temulawak pada Tabel 9.

Berdasarkan Tabel 10 diketahui bahwa penurunan potensi antioksidan ekstrak rimpang temulawak proporsi pelarut 1:1 pada pemanasan suhu 65°C selama 30 menit, pemanasan suhu 80°C selama 15 menit, dan pemanasan suhu 100°C selama 5 menit berturut-turut yaitu 23,68%; 17,4%; dan 13,77%. Pada proporsi pelarut 1:2 pemanasan suhu 65°C selama 30 menit, pemanasan suhu 80°C selama 15 menit, dan pemanasan suhu 100°C selama 5 menit berturut-turut yaitu 40,06%; 33,02%; dan 20,69%. Pada proporsi pelarut 1:3 pemanasan suhu 65°C selama 30 menit, pemanasan suhu 80°C selama 15 menit, dan pemanasan suhu 100°C selama 5 menit berturut-turut yaitu 44,54%; 30,28%; dan 26,35%.

Potensi antioksidan menurun seiring lamanya waktu pemanasan meskipun menggunakan suhu yang lebih rendah. Hal ini sejalan dengan data kadar total fenol pada Tabel 5 dan data kadar kurkuminoid pada Tabel 4. Sebagaimana diketahui bahwa senyawa fenol termasuk di dalamnya kurkuminoid bertanggung jawab terhadap kemampuan rimpang temulawak sebagai antioksidan. Menurut Chai et al. (2006) dalam Mustafa et al. (2010), aktivitas antioksidan dan penangkapan radikal bebas oleh senyawa fenol disebabkan karena donor hidroksil pada cincin aromatik sehingga penurunan kadar total fenol dan penurunan kadar kurkuminoid sejalan dengan penurunan potensi antioksidan ekstrak rimpang temulawak.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah: Berdasarkan analisis data yang telah dilakukan, diketahui bahwa proporsi pelarut berpengaruh terhadap kadar kurkuminoid, kadar total fenol, dan potensi antioksidan. Kadar kurkuminoid ekstrak rimpang temulawak semakin meningkat seiring penambahan proporsi pelarut, optimum pada proporsi pelarut 1:4. Kadar total fenol dan potensi antioksidan ekstrak rimpang temulawak semakin menurun seiring penambahan proporsi pelarut. Berdasarkan analisis data yang telah dilakukan, diketahui bahwa metode pemanasan berpengaruh terhadap kadar kurkuminoid, kadar total fenol, dan potensi antioksidan. Semakin lama waktu pemanasan meskipun menggunakan suhu yang lebih rendah menyebabkan kadar kurkuminoid, kadar total fenol, dan potensi antioksidan menjadi semakin kecil. Teknik ekstraksi dan metode

pemanasan yang paling baik adalah menggunakan perbandingan rimpang parut dan air sebesar 1:1 dan dipanaskan pada suhu 100oC selama 5 menit karena memiliki kapasitas antioksidan terbesar.

DAFTAR PUSTAKA

- Anon. 2010. *Curcuma xanthorrhiza*. <http://pdf-searchengine.com/curcuminoid-compounds-curcuma-xanthorrhiza-pdf.html>. Diakses tanggal 5 Juni 2010.
- BPOM RI. 2005. Gerakan Nasional Minum Temulawak. BPOM RI. Jakarta.
- Cowan, M.M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Review*. Vol. 12. No.4.
- Gaikar VG, Dandekar, DV. 2001. Process for Extraction of Curcuminoids from *Curcuma* Species. United States Patent.
- Gurav, S, N; Deshkar, V Gulkari N; Duragkar; dan A Patil. 2007. Free Radical Scavenging Activity of *Polygala chinensis* Linn. *Pharmacologyonline*. 2 : 245-253.
- Hariyadi, P (Ed). 2000. Dasar-dasar Teori dan Praktek Proses Termal. Pusat Studi Pangan dan Gizi IPB, Bogor.
- Kaur, CH, Kapoor. 2002. Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian Vegetables. *J Food Sci Technol* 37: 153.161.
- Kiso. 1985. Antihepatotonic Principles of *Curcuma Longa* Rhizome. *Simposium Nasional Temulawak*. UNPAD. Bandung.
- Kiswanto. 2005. Perubahan Kadar Senyawa Bioaktif Rimpang temulawak dalam Penyimpanan. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Yogyakarta. Yogyakarta
- Kumalaningsih S. 2006. Antioksidan Alami. *Trubus Agrisarana*. Surabaya.
- Mohammad, Rosmawani, Ahmad M, Mohd Daud J. 2007. Potensi Kurkumin Sebagai Penunjuk pH. *Malaysian J Anal Sci* 11 (2): 35 36
- Mustafa RA, Abdul Hamid A, Mohamed S, Abu Bakar F. 2010. Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants. *J Food Sci* 75 (1):-.
- Plummer DT. 1971. An introduction of Practical Biochemistry. McGraw Hill Book Co. Ltd. Maidenhead Berkshire, UK.
- Pratimasari D. 2009. Uji Aktivitas Penangkap Radikal Buah Carica papaya L. dengan Metode DPPH dan Penetapan Kadar Fenolik Serta Flavonoid Totalnya. [Skripsi]. UMS, Surakarta.
- Pratiwi E. 2009. Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Aktif Temukunci (*Boesenbergia pandurata* Roxb.). [Skripsi]. IPB, Bogor.
- Purnomowati S. 2008. Khasiat Temulawak. *Indofarma*, Bandung.
- Safitriani RR. 2005. Potensi Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) sebagai Sumber Antioksidan Alami. [Thesis]. UGM, Yogyakarta.
- Senter SD, Robertson JA, Meredith FI. 1989. Phenolic compounds of the mesocarp of cresthaven peaches during storage and ripening. *J Food Sci* 54: 1259–1260 and 1268.
- Sidik, Mulyono MW, Muhtadi A. 1993. Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). Yayasan Pengembangan Obat Bahan Alam Phytomedica. Jakarta.
- Srijanto B. 2004. Pengaruh Waktu, Suhu dan Perbandingan Bahan Baku-Pelarut pada Ekstraksi Kurkumin dari Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) dengan Pelarut Aseton. *Prosiding Seminar Nasional Rekayasa Kimia dan Proses*. Semarang.
- Subagio A, Morita N. 2001. No effect of esterification with fatty acid on antioxidant activity of lutein. *Food Rest Intl* 34:315-320.
- Suradi. 1998. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Jambu Air (*Eugenia aquae* Born), Jambu Biji (*Psidium guajava* Linn), Jambu Mete (*Anacardium occidentale* Linn), dan Langsep (*Lansium domesticum* Corr). [Skripsi]. UGM. Yogyakarta.
- Winarni. 1998. Evaluasi Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Salam (*Eugenia polynhawight*), Sereh (*Andropogon hardus* L.), Sirih (*Piper betle* L.) dan Ampas Teh (*Camella sinensis* L.). [Skripsi]. Fakultas Teknologi Pertanian. UGM. Yogyakarta.
- Zahro L. 2009. Profil Tampilan Fisik dan Kandungan Kurkuminoid dari *Simplicia Temulawak (Curcuma xanthorrhiza* Roxb) pada Beberapa Metode Pengeringan. *Jurnal Sains & Matematika*. 17 (1): 24-32.

PEDOMAN UNTUK PENULIS

Format penulisan pada nomor ini merupakan acuan utama bagi para penulis, adapun pedoman ini hanya merupakan ringkasannya. Setiap naskah harus disertai surat pengantar yang menyatakan bahwa tulisan merupakan hasil karya penulis atau para penulis dan belum pernah dipublikasikan. Penulis diminta mengirimkan dua kopi naskah dan satu disket ukuran 3½", kecuali naskah yang dikirim melalui e-mail. Pada koreksi terakhir kembali diminta satu disket untuk pencetakan.

Tulisan diketik pada satu sisi kertas putih, ukuran A4 (210x297 mm²), dalam satu kolom, menggunakan spasi ganda, jenis huruf *Times New Roman*, ukuran 12 point, dengan jarak tepi 2 cm di semua sisi. Program pengolah kata atau jenis huruf tambahan dapat digunakan, namun harus *PC compatible* dan berbasis *Microsoft Word*. **Nama ilmiah** (genus, spesies, author), dan kultivar atau strain disebutkan secara lengkap pada penyebutan pertama kali. Nama genus dapat disingkat setelahnya penyebutan yang pertama, kecuali menimbulkan kerancuan. Nama author dapat dihilangkan setelah penyebutan pertama. Misalnya pertama kali ditulis *Rhizopus oryzae* L. UICC 524, selanjutnya ditulis *R. oryzae* UICC 524. Nama daerah dapat dicantumkan apabila tidak menimbulkan makna ganda. Penyebutan nama ilmiah secara lengkap dapat diulang pada bagian Bahan dan Metode. **Tata nama kimia dan biokimia** mengikuti aturan IUPAC-IUB. Simbol-simbol kimia standar dan penyingkatan untuk nama kimia dapat dilakukan apabila jelas dan umum digunakan, misalnya pertama kali ditulis lengkap butirat hidrositoluen (BHT) selanjutnya ditulis BHT. **Ukuran metrik** menggunakan satuan SI, penggunaan satuan lain harus diikuti nilai ekuivalen dengan satuan SI pada penyebutan pertama. Penyingkatan satuan, seperti g, mg, ml, dan sebagainya tidak diikuti titik. Indeks minus (m⁻², l⁻¹, h⁻¹) disarankan untuk digunakan, kecuali dalam hal-hal seperti "per-tanaman" atau "per-plot". **Persamaan matematika** tidak selalu dapat dituliskan dalam satu kolom dengan teks, untuk itu dapat ditulis secara terpisah. **Angka** satu hingga sepuluh dinyatakan dengan kata-kata, kecuali apabila berhubungan dengan pengukuran, sedangkan nilai di atasnya dituliskan dalam angka, kecuali di awal kalimat. Pecahan sebaiknya dinyatakan dalam desimal. Dalam teks digunakan "%" bukannya "persen". Pengungkapan ide dengan kalimat yang rumit dan bertele-tele perlu dihindari, sebaiknya digunakan kalimat yang efektif dan efisien. Naskah hasil penelitian diharapkan tidak lebih dari 25 halaman (termasuk gambar dan tabel), naskah telah disesuaikan, masing-masing halaman berisi 700-800 kata, atau sebanding dengan naskah dalam nomor penerbitan ini.

Judul ditulis secara padat, jelas, dan informatif, maksimum 20 kata. Judul ditulis dalam bahasa Indonesia dan Inggris untuk naskah dalam bahasa Indonesia atau bahasa Inggris saja untuk naskah dalam bahasa Inggris. Naskah yang terlalu panjang dapat dibuat berseri, tetapi naskah demikian jarang diterbitkan jurnal ini. **Judul pelari** (*running title*) sekitar 5 kata. **Nama penulis** atau para penulis pada naskah kelompok ditulis secara lengkap dan tidak disingkat. **Nama dan alamat institusi** ditulis lengkap dengan nama dan nomor jalan (lokasi), kode pos, nomor telepon, nomor faksimili, alamat e-mail dan website. Pada naskah kelompok perlu ditunjukkan penulis untuk korespondensi beserta alamat dengan urutan seperti di atas. **Abstract** sebaiknya tidak lebih dari 200 kata, ditulis dalam bahasa Indonesia dan Inggris untuk naskah dalam bahasa Indonesia atau bahasa Inggris saja untuk naskah dalam bahasa Inggris. **Kata kunci** (*Keywords*) sekitar 5 kata, meliputi nama ilmiah dan daerah (apabila ada), topik penelitian, dan metode-metode khusus yang digunakan.

Pendahuluan (*Introduction*) sekitar 400-600 kata, meliputi latar belakang, tinjauan pustaka, dan tujuan penelitian. **Bahan dan Metode** (*Materials and Methods*) sebaiknya ditekankan pada cara kerja dan cara analisis data. **Hasil dan Pembahasan** (*Results and Discussion*) ditulis sebagai satu rangkaian, pada tulisan yang cukup panjang sebaiknya dibuat beberapa sub judul. Pembahasan merupakan jawaban pertanyaan *mengapa* dan *bagaimana* hasil penelitian dapat terjadi, bukan sekedar mengungkapkan kembali hasil penelitian dalam bentuk kalimat. Pembahasan yang lengkap dan menyeluruh lebih disukai dari pada pembahasan yang tidak tuntas. Naskah telah ada tanpa sub judul Bahan dan Metode, serta Hasil dan Pembahasan. **Kesimpulan** (*Conclusion*) sebaiknya tetap diberikan, meskipun biasanya sudah terungkap pada Hasil dan Pembahasan. **Ucapan terima kasih** (*Acknowledgments*) apabila diperlukan ditulis secara singkat. **Gambar dan Tabel** maksimum 3 halaman, dapat dibuat dengan tinta cina atau printer laser. Judul gambar ditulis di bawah gambar, sedangkan judul tabel ditulis di atas tabel. Foto dicetak pada kertas *glossy* dan diberi keterangan. Gambar berwarna dapat diterima apabila informasi ilmiah dalam naskah dapat hilang tanpa gambar tersebut. Setiap gambar dan foto

sebaiknya menyertakan file digital. Penulis dianjurkan menyertakan foto atau gambar untuk sampul depan meskipun tidak dimuat dalam naskah sendiri. **Tidak ada lampiran**, semua data atau analisis data dimasukkan dalam Hasil dan Pembahasan.

Pustaka dalam naskah ditulis dalam bentuk nama belakang penulis dan tahun. Pada kalimat yang diacu dari beberapa penulis, nama penulis diurutkan berdasarkan kebaruan pustaka. Pada naskah yang ditulis oleh dua penulis, nama keduanya disebutkan, sedangkan pada naskah yang ditulis oleh tiga penulis atau lebih, hanya nama penulis pertama yang ditulis diikuti et al. atau dkk., misalnya: Sprent dan Sprent (1990) atau (Suranto et al. 1998; Baker and Manwell 1991; Smith 1982a, b). Pada sitasi bertingkat digunakan kata *cit* atau dalam, misalnya (Gyorgy 1991 *cit* Coward 1999) atau Gyorgy (1991, dalam Coward 1999).

Daftar Pustaka diketik dengan spasi ganda. Sitasi mengikuti CBE-ELSE-Vancouver style dengan modifikasi sebagai berikut:

Jurnal:

Suranto S, Gough KH, Shukla DD et al. 1998. Coat protein sequence of Krish-infecting strain of Johnson-grass mosaic potyvirus. Arch Virol 143: 1015-1020.

Buku:

Sprent JI, Sprent P. 1990. Nitrogen fixing organisms: Pure and applied aspects. Chapman and Hall, London.

Bab dalam buku:

Baker CMA, Manwell C. 1991. Population genetics, molecular markers and gene conservation of bovine breeds. In: Hickman CG (ed). Cattle Genetic Resources. Elsevier, Amsterdam.

Abstrak:

Liu Q, Salih S, Ingersoll J et al. 2000. Response of transgenic 'Royal Gala' apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoots, containing the modified cecropin MB39 gene to *Erwinia amylovora* [084]. Abstracts of 97th Annual International Conference of the American Society for Horticultural Science. Lake Buena Vista, FL, 23-26 July 2000.

Prosiding:

Alikodra HS. 2000. Keanekaragaman hayati bagi pembangunan daerah otonom. In: Setyawan AD, Sutarno (eds). Menuju Taman Nasional Gunung Lawu, Prosiding Semiloka Nasional Konservasi Biodiversitas untuk Perlindungan dan Penyelamatan Plasma Nutfah di Pulau Jawa. Surakarta, 17-20 Juli 2000.

Skripsi, Tesis, Disertasi:

Purwoko T. 2001. Biotransformasi Isoflavon oleh *Rhizopus oryzae* UICC 524 dan Aktivitas Antioksidan Isoflavon Aglikon dari Tempe terhadap Oksidasi Minyak Kedelai. [Tesis]. Universitas Indonesia, Jakarta.

Informasi dari Internet:

Rosauer D. 1998. Forest disturbance and succession. <http://www.anu.edu.au/Forestry/silviculture/daniel/chapter1/1.1.html>

Naskah publikasi "*in press*" dapat disitasi dan dicantumkan dalam daftar pustaka. "Komunikasi pribadi" dapat disitasi, tetapi tidak dapat dicantumkan dalam daftar pustaka. Penelitian yang tidak dipublikasikan atau sedang dalam tahap pengajuan publikasi tidak dapat disitasi.

Beberapa catatan tambahan. Naskah diketik tanpa tanda hubung (-), kecuali kata ulang. Penggunaan huruf "l" (el) untuk "1" (satu) atau "O" (oh) untuk "0" (nol) perlu dihindari. Simbol α , β , χ , dan lain-lain dimasukkan melalui fasilitas insert, bukan mengubah jenis huruf. Kata-kata dan tanda baca sesudahnya tidak diberi spasi.

Kemajuan Naskah. Pemberitahuan naskah dapat diterima atau ditolak akan diberitahukan sekitar satu bulan setelah pengiriman. Naskah dapat ditolak apabila materi yang dikemukakan tidak sesuai dengan misi jurnal, kualitas materi rendah, format tidak sesuai, gaya bahasa terlalu rumit, terjadi ketidakjujuran keaslian penelitian, dan korespondensi tidak ditanggapi. Penulis atau penulis pertama pada naskah kelompok akan mendapatkan satu eksemplar jurnal yang memuat tulisannya selambat-lambatnya sebulan setelah naskah diterbitkan. Penulis akan kembali mendapatkan satu eksemplar jurnal nomor penerbitan berikutnya.

PENTING: Penulis atau para penulis dalam naskah kelompok masih memegang hak cipta (*copyright*) dan mempertahankan hak penerbitan tanpa pembatasan atas naskah yang diterbitkan *Biofarmasi*. Penulis atau pihak lain diperkenankan memperbanyak naskah dalam jurnal ini selama tidak untuk tujuan komersial. Untuk penemuan baru, penulis disarankan mengurus hak patennya sebelum mempublikasikan dalam jurnal ini.

- Pengaruh suplementasi getah pepaya dalam ransum terhadap pencernaan bahan kering dan bahan organik pada kelinci New Zealand White jantan** 45-50
- RIZKI YUDATAMA, EKA HANDAYANTA, Y.B.P. SUBAGYO
- Penghambatan produksi enzim eksoprotease pada sistem quorum sensing *Aeromonas hydrophila* dengan pemberian ekstrak metanol rimpang segar dan rimpang kering lengkuas (*Alpinia galanga*)** 51-61
- YASHINTA NOVITASARI, ARTINI PANGASTUTI, RITA RAKHMAWATI
- Karakterisasi senyawa bioaktif isoflavon dan uji aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol tempe berbahan baku kedelai hitam (*Glycine soja*), koro hitam (*Lablab purpureus*), dan koro kratok (*Phaseolus lunatus*)** 62-72
- HENY RAHMA SULISTIANI, SRI HANDAYANI, ARTINI PANGASTUTI
- Karakteristik sensoris, nilai gizi dan aktivitas antioksidan tempe kacang gude (*Cajanus cajan*) dan tempe kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) dengan berbagai variasi waktu fermentasi** 73-82
- INTAN WAHYU RISTISA DEWI, CHORUL ANAM, ESTI WIDOWATI
- Kapasitas antioksidan dan kadar kurkuminoid ekstrak rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) menggunakan pelarut air dengan variasi proporsi pelarut dan metode pemanasan** 83-89
- TRIWIK SUSILOWATI, KAWIJI, SETYANINGRUM ARIVIANI

