

HIDROLISAT PROTEIN KACANG MERAH (*Phaseolus vulgaris* L.) : PENYEDAP RASA ALAMI



HIDROLISAT PROTEIN KACANG MERAH (*Phaseolus vulgaris* L.) : PENYEDAP RASA ALAMI

**Penulis :
Prof. Dr. Ir. Sri Wahjuni, M.Kes.**



GETPRESS INDONESIA

**HIDROLISAT PROTEIN KACANG MERAH (*Phaseolus vulgaris* L.) :
PENYEDAP RASA ALAMI**

Penulis :

Prof. Dr. Ir. Sri Wahjuni, M.Kes.

ISBN :

Editor : Dr. Oktavianis, M.Biomed.

Penyunting: Mila Sari, M.Si.

Desain Sampul dan Tata Letak : Tri Putri Wahyuni, S.Pd.

Penerbit: CVGETPRESS INDONESIA

Anggota IKAPI No. 033/SBA/2022

Redaksi:

Jl. Palarik RT 01 RW 06, Kelurahan Air Pacah
Kecamatan Koto Tangah, Padang, Sumatera Barat

website: www.getpress.co.id
email: adm.getpress@gmail.com

Cetakan pertama, November 2023

Hak cipta dilindungi undang-undang
Dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk
dan dengan cara apapun tanpa izin tertulis dari penerbit.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Ida Sang Hyang Widhi Wasa (Tuhan Yang Maha Esa), yang berkat rahmat-Nyalah penulis menyelesaikan Penulisan buku ajar yang berjudul Hidrolisat Protein Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.) yang diproduksi sebagai Penyedap Rasa Alami dibanding dengan Penyedap Rasa di Pasaran.

Penulis Buku ajar ini secara khusus berkeinginan untuk menunjang proses pembelajaran mata kuliah kapita selekta biokimia yang dapat melihat sejauh mana potensi kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) sebagai penyedap rasa alami. Kandungan protein dalam kacang merah sangatlah tinggi yakni faseolin 20% (berat kering), faseolin 2%, konfaseolin 0,36-0,40%.

Pada dasarnya buku ajar ini disusun tentang asam amino apa yang terkandung pada kacang merah dan mekanisme reaksi yang terjadi pada kacang merah yang dapat berpotensi dijadikan sebagai penyedap rasa alami. Asam amino tertinggi dalam hidrolisat protein kacang merah yakni leusin. Kandungan leusin yang tinggi ini yang menghasilkan rasa gurih pada hidrolisat protein dalam kacang merah. Disamping itu, penyedap rasa alami rendah akan natrium dibanding penyedap rasa buatan yang beredar di pasaran.

Denpasar, Oktober 2023

Penulis

DAFTAR ISI

PRAKATA.....	i
DAFTAR ISI	ii
DAFTAR TABEL.....	iv
DAFTAR GAMBAR	v
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II POTENSI KACANG MERAH (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) SEBAGAI PENYEDAP RASA ALAMI	7
1. Penyedap Rasa	7
2. Kacang Merah (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	9
3. Protein	14
4. Isolasi Protein.....	16
5. Hidrolisis Protein secara Enzimatik.....	20
6. Enzim Papain	26
7. Spektrofotometri UV-Vis	27
8. Kadar α -Amino Bebas.....	29
9. Kadar Protein Terlarut	31
10. Uji Organoleptik.....	32
BAB III MEKANISME KACANG MERAH SEBAGAI PENYEDAP RASA ALAMI	34
1. Pembuatan Kecambah Kacang Merah	34
2. Pembuatan Tepung Kecambah Kacang Merah	35
3. Isolasi Protein Kecambah Kacang Merah.....	35
4. Hidrolisis Protein Kecambah Kacang Merah	38
5. Pengaruh Variasi Rasio E/S 3, 4, 5, 6, dan 7% terhadap Kadar α - Amino Bebas Hidrolisat Protein Kecambah Kacang Merah	39
6. Pengaruh Variasi Rasio E/S 3, 4, 5, 6, dan 7% terhadap Kadar Protein Terlarut Hidrolisat Protein Kecambah Kacang Merah	42
7. Hasil Uji Organoleptik Hidrolisat Protein Kecambah Kacang Merah	45
8. Perbandingan penyedap rasa alami Kacang Merah dengan penyedap rasa sintetis	49
9. Evaluasi	51

BAB IV PENUTUP	52
1. Simpulan.....	52
2. Saran.....	52
DAFTAR PUSTAKA.....	54
BIODATA PENULIS	65

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Komposisi asam amino dalam Kacang Merah	11
Tabel 2.	Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Metanol Kacang Merah.....	11
Tabel 3.	Jenis Asam Amino dan Rantai Samping Masing-Masing Asam Amino.....	14
Tabel 4.	Rasa dari Beberapa Jenis Asam Amino.....	25
Tabel 5.	Variasi Rasio E/S Hidrolisis Kecambah Kacang Merah.....	46
Tabel 6.	Hasil Perhitungan Skor Uji Organoleptik (Penilaian Rasa Gurih) dari Hidrolisat Protein Kecambah Kacang Merah dengan Variasi Rasio E/S.....	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Reaksi Pembentukan Ikatan Peptida	15
Gambar 2. Protein dalam Larutan Bersuasana Basa	36
Gambar 3. Struktur Protein pada Titik Isoelektrik	37
Gambar 4. Mekanisme Hidrolisis Ikatan Peptida dengan Enzim Papain	39
Gambar 5. Reaksi pada Uji Ninhidrin	40
Gambar 6. Kadar α -Amino Bebas Hidrolisat Protein Kecambah Kacang Merah.....	41
Gambar 7. Reaksi pada Uji Biuret	43
Gambar 8. Kadar Protein Terlarut Hidrolisat Protein Kecambah Kacang Merah.....	44

BAB I

PENDAHULUAN

Penyedap rasa merupakan salah satu bahan tambahan pada makanan yang digunakan untuk meningkatkan cita rasa pada makanan tersebut. Penyedap rasa buatan yang beredar di pasaran banyak digunakan karena mudah ditemukan dan diaplikasikan. Penyedap rasa buatan contohnya adalah ester, etil butirat, etil vanilin, kaldu instan, dan yang paling banyak digunakan yakni monosodium glutamat (MSG) (Praja, 2015). Data Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Litbangkes) di Indonesia tahun 2014 menunjukkan bahwa jumlah masyarakat yang biasa mengonsumsi makanan asin dengan penyedap rasa garam lebih dari 1 kali sehari adalah sebesar 26,2%. Jumlah masyarakat yang mengonsumsi makanan dengan kandungan natrium tinggi lebih dari 2000 mg dalam 1 hari adalah sebesar 52,7%. Natrium merupakan kandungan utama dalam penyedap rasa monosodium glutamat (MSG). Pengendalian konsumsi makanan dengan kandungan natrium tinggi di Indonesia belum menjadi prioritas bagi beberapa pihak. Dampak negatif dari konsumsi penyedap rasa secara berlebihan adalah kenaikan kadar garam dalam darah, kelainan tulang, kelainan otak, dan pendarahan pada otak anak-anak, serta kasus yang paling banyak ditemukan adalah hipertensi (Litbangkes RI, 2014).

Penyedap rasa berbahan alami merupakan salah satu produk yang dapat dipilih untuk mengurangi penggunaan penyedap rasa buatan berbahan sintetis. Hidrolisis bahan yang

mengandung protein tinggi dengan bantuan enzim protease dapat menghasilkan peptida-peptida pendek yang memiliki rasa asin, gurih, dan manis tanpa adanya kandungan natrium sehingga berpotensi sebagai penyedap rasa yang lebih aman (Wiwata, 2019). Hidrolisat protein dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan karakteristik dari sebuah produk makanan, salah satunya adalah sebagai penambah cita rasa pada makanan atau penyedap rasa. Hidrolisat protein merupakan produk hasil reaksi hidrolisis terhadap molekul protein yang mengandung campuran berbagai jenis peptida rantai pendek maupun asam amino bebas (Bougatef dkk., 2012).

Hidrolisat protein dapat diproduksi secara *in vitro*, salah satunya dengan hidrolisis protein secara enzimatik menggunakan enzim protease. Proses produksi hidrolisat protein secara enzimatik menggunakan enzim protease dinilai paling aman dan menguntungkan karena kemampuan enzim dalam menghidrolisis protein lebih mudah diatur. Hidrolisis secara enzimatik tidak merusak struktur asam amino, sehingga dapat mencegah terjadinya kerusakan pada produk. Enzim protease yang sering digunakan adalah enzim pepsin, tripsin, papain, bromelin, fisin, dan kimotripsin (Machin, 2012). Enzim papain merupakan salah satu enzim yang sering digunakan dalam hidrolisis protein karena memiliki beberapa kelebihan, seperti bahan-bahan yang digunakan mudah didapatkan, tahan terhadap suhu yang cukup tinggi yakni sekitar 50°C sampai 70°C, dan mempunyai rentang pH yang cukup luas yakni sekitar 5 sampai 7,5 (Arief dkk., 2016).

Kacang-kacangan adalah salah satu sumber protein yang dapat dimanfaatkan untuk memproduksi hidrolisat protein. Kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) merupakan sumber protein nabati yang dapat dimanfaatkan untuk memproduksi hidrolisat protein karena kacang ini mengandung protein

sebanyak 20-22%. Kacang merah juga mengandung berbagai jenis asam amino seperti asam aspartat, serin, histidin, glisin, asam glutamat, arginin, tirosin, metionin, fenilalanin, treonin, valin, isoleusin, lisin, dan leusin (Prastika dkk., 2019). Asam-asam amino dalam hidrolisat protein kacang-kacangan seperti asam glutamat, glisin, asam aspartat, dan alanin diketahui dapat memberikan rasa asin, gurih, maupun manis. Asam-asam amino ini berpotensi untuk menghasilkan rasa yang dapat dimanfaatkan sebagai penyedap rasa. Potensi hidrolisat protein sebagai penyedap rasa dapat diketahui melalui uji organoleptik (Prayudi, 2019).

Proses produksi hidrolisat protein kacang-kacangan pada umumnya dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti waktu hidrolisis, pH, suhu (Puspawati dkk., 2020), konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, dan variasi rasio enzim-substrat (E/S) (Khayatun dkk., 2017). Se jauh ini, belum banyak penelitian yang mengkaji pengaruh rasio E/S terhadap hidrolisat protein dari kacang merah. Rasio E/S adalah perbandingan jumlah enzim-substrat yang digunakan pada saat hidrolisis protein berlangsung, dimana jika rasio E/S yang digunakan adalah 1% (b/b), maka perbandingannya adalah 1 g enzim dalam 100 g substrat. Penelitian Khayatun dkk. (2017) dan Binoto dkk. (2015) menunjukkan bahwa rasio enzim-substrat berpengaruh terhadap hidrolisat protein yang diperoleh berdasarkan hidrolisis secara enzimatik. Pada kedua penelitian tersebut, kacang yang digunakan adalah kacang merah dan kacang kedelai. Rasio E/S yang digunakan dengan jumlah yang semakin meningkat menyebabkan tumbukan antara molekul enzim dengan substrat (protein) semakin sering terjadi, sehingga masuknya molekul substrat ke dalam sisi aktif enzim juga akan lebih sering terjadi. Hal ini akan menyebabkan produk hasil hidrolisis isolat protein semakin meningkat karena semakin

banyak molekul substrat yang bergabung dengan sisi aktif enzim dan membentuk kompleks enzim-substrat yang konsentrasinya semakin meningkat. Kedua penelitian tersebut belum mengkaji hubungan antara rasio enzim-substrat terhadap parameter lain yang dapat menunjukkan aktivitas fisiologis hidrolisat protein, seperti aktivitas antioksidan, antibakteri, antihipertensi, maupun potensinya sebagai penyedap rasa.

Perkecambahan terhadap biji atau kacang yang akan dijadikan sebagai sumber substrat protein dalam proses hidrolisis merupakan faktor lain yang dapat memengaruhi hasil hidrolisis protein dari kacang-kacangan secara enzimatik. Proses perkecambahan akan memengaruhi ukuran molekul dari substrat protein yang akan dihidrolisis (Benincasa dkk., 2019). Kacang yang dikecambahkan selama 24 jam menghasilkan hidrolisat protein dengan rantai peptida yang lebih pendek dengan kadar protein terlarut yang lebih tinggi yakni sebesar 15,85% daripada hidrolisat protein kacang yang tidak dikecambahkan dan menghasilkan kadar protein terlarut sebesar 12,04% (Martianingsih dkk., 2016). Proses perkecambahan menyebabkan protein cadangan pada biji kacang mengalami degradasi untuk menghasilkan protein baru dan menghasilkan tunas tanaman baru, sehingga ketika kecambah kacang dihidrolisis maka rantai peptida yang dihasilkan akan lebih pendek, dibandingkan dengan hidrolisat protein hasil hidrolisis kacang yang tidak melalui proses perkecambahan (Bau dkk., 2000). Proses degradasi ini dimulai ketika terjadi kontak antara protease endogen dalam biji kacang dengan air sehingga menembus sel biji kacang (proses imbibisi). Protein dalam kacang dapat dipisahkan dari komponen lain dalam kacang dengan mengisolasi protein tersebut. Metode yang dapat digunakan untuk mengisolasi protein dari suatu kecambah kacang adalah metode ekstraksi

alkalik - presipitasi isoelektrik. Prinsip dari metode ini adalah pelarutan protein dalam suatu bahan yang dilakukan dalam suasana basa (alkalik) dengan menggunakan larutan basa kuat dan dilanjutkan dengan presipitasi isoelektrik, yakni pengaturan pH supernatan hasil ekstraksi alkali sehingga diperoleh pH isoelektrik protein yang menyebabkan terjadinya presipitasi (pengendapan) (Pratiwi dkk., 2018).

Proses perkecambahan kacang sebelum isolasi protein, jenis enzim, dan variasi rasio E/S yang digunakan dalam proses hidrolisis protein juga dapat memengaruhi parameter-parameter keberhasilan hidrolisis protein seperti kadar α -amino bebas dan kadar protein terlarut. Kadar α -amino bebas adalah parameter yang menunjukkan jumlah gugus amina ($-NH_2$) bebas yang dihasilkan akibat proses hidrolisis suatu protein (Bougatef dkk., 2012). Kadar protein terlarut adalah parameter yang menunjukkan jumlah protein yang terurai dan mengalami konversi dari protein yang bersifat tidak larut menjadi peptida-peptida rantai pendek yang lebih larut sebagai hasil hidrolisis (Aluko dan Monu, 2003). Kadar α -amino bebas dan kadar protein terlarut dipengaruhi oleh waktu, pH, konsentrasi enzim, dan konsentrasi substrat. Selain itu, variasi rasio E/S juga dapat berpengaruh terhadap kadar α -amino bebas dan kadar protein terlarut, karena semakin bertambahnya rasio E/S yang digunakan menyebabkan tumbukan antara molekul enzim dengan substrat semakin meningkat. Hal ini menyebabkan masuknya molekul substrat ke dalam sisi aktif enzim juga semakin meningkat dan menyebabkan ikatan peptida yang terputus semakin banyak (Restiani, 2016), sehingga protein yang terlarut juga semakin banyak (Wardi dkk., 2019). Oleh karena itu, kadar α -amino bebas dan kadar protein terlarut juga akan semakin meningkat. Kadar α -amino bebas dapat diukur dengan metode

spektrofotometri menggunakan reagen ninhidrin dan nilai kadar protein terlarut dapat diukur dengan metode spektrofotometri dengan reagen biuret. Hasil penelitian Pratiwi dkk. (2018) menunjukkan bahwa dari rasio E/S 1, 2, 3, dan 4% yang digunakan dalam hidrolisis protein kacang merah, rasio E/S 4% menghasilkan nilai kadar protein terlarut dan derajat hidrolisis tertinggi yakni sebesar 1,1044 mg/mL dan 10,24%.

Evaluasi

1. Senyawa apa saja yang tergolong dalam penyedap rasa buatan?
2. Dampak negatif apa saja yang ditimbulkan apabila kita mengkonsumsi/menambahkan penyedap rasa secara berlebihan?
3. Bagaimana cara membuat penyedap rasa berbahan alami?
4. Enzim apakah yang digunakan dalam proses hidrolisis protein? Dan apa saja kelebihan dari penggunaan enzim ini?
5. Asam-asam amino apa saja yang terkandung dalam kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.)?
6. Metode apa yang digunakan untuk mengisolasi protein dalam suatu kecambah? Dan bagaimana prinsip dari metode ini?
7. Parameter – parameter apa saja yang dapat mempengaruhi keberhasilan dari hidrolisis protein?
8. Apa yang dimaksud dengan variasi rasio E/S? dan apakah yang terjadi apabila variasi rasio E/S bertambah?

BAB II

POTENSI KACANG MERAH (Phaseolus vulgaris L.) SEBAGAI PENYEDAP RASA ALAMI

1. Penyedap Rasa

Penyedap rasa merupakan salah satu bahan tambahan pangan yang digunakan untuk meningkatkan cita rasa pada makanan. Bahan Tambahan Pangan (BTP) adalah bahan yang ditambahkan ke dalam pangan untuk memengaruhi sifat maupun bentuk pangan. Bahan Tambahan Pangan (BTP) dapat dikelompokkan menjadi beberapa jenis yakni pengawet, pewarna, penyedap rasa, pengental, pengemulsi, pemanis, dan penguas (Sari dkk., 2019). Masakan yang tidak ditambahkan penyedap rasa dinilai akan mengurangi kepuasan konsumen dalam hal rasa dan kualitas makanan. Penyedap rasa sintetis yang beredar di pasaran banyak digunakan karena mudah ditemukan dan diaplikasikan. Penyedap rasa sintetis juga dinilai dapat memberikan rasa yang lebih kuat dibandingkan penyedap rasa berbahan alami. Penyedap rasa sintetis contohnya ester, etil butirat, etil vanilin, kaldu instan, dan yang paling banyak digunakan yakni MSG atau monosodium glutamat (Praja, 2015).

Asam glutamat (asam amino non-esensial) merupakan penyusun utama dalam protein dalam makanan yang pada umumnya hadir pada keseluruhan bahan pangan seperti daging, poultry, seafood, dan sayuran yang biasa ditambahkan sebagai

flavor enhancer (Ninomiya, 1998). Peningkatan nilai sensori yang dimiliki suatu produk pangan hanya dapat dimiliki oleh produk pangan yang tinggi akan kandungan asam amino atau protein terhidrolisa. Ribonukleotida yang berperan dalam penguatan rasa yang mampu bekerja secara sinergis dengan senyawa l-glutamat adalah 5-inosinat, 5-guanilat, serta 5-adenilat. Inosinat banyak ditemukan dalam produk daging, guanilat banyak ditemukan dalam produk sayuran, sedangkan adenilat banyak ditemukan dalam produk fish dan shelfish. Bahan pangan yang tinggi akan kandungan glutamat bebas terdiri atas tomat, jamur, dan keju (Jinap & Hajeb, 2010)

Penyedap rasa sudah menjadi kebutuhan dasar oleh masyarakat yang berperan sebagai flavor enhancer yang mengutamakan sisi kepraktisan dalam memasak. Kemudahan dalam penggunaan produk bumbu penyedap rasa menjadi alasan dasar produk penyedap rasa menjadi semakin digemari pada saat ini. Penyedap rasa merupakan produk bubuk maupun kubus yang mengandung ekstrak tertentu seperti daging sapi atau ayam, dengan tambahan maupun tanpa tambahan makanan lain yang diizinkan. Penyedap tersusun atas berbagai bahan baku yang terdiri atas garam, gula, lemak nabati, monosodium glutamate, flavoring agent, lada, bawang, kunyit, flavor enhancer, zat pewarna, dan senyawa anti gumpal (Eritha, 2006)

Penyedap rasa yang dikonsumsi secara berlebihan tentu akan memberikan beberapa dampak negatif seperti kenaikan kadar garam dalam darah, kelainan tulang, kelainan otak, pendarahan pada otak, dan hipertensi. Diperkirakan hingga tahun 2020, hipertensi masih merupakan salah satu masalah utama dalam bidang kesehatan di Indonesia maupun dunia yang diperkirakan kasusnya akan semakin meningkat setiap tahunnya (Yamin, 2020). Data *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2015 menunjukkan sebanyak 1,3 miliar

orang di dunia menderita hipertensi. Jumlah ini diperkirakan akan semakin meningkat hingga tahun 2025 dan akan mencapai angka 1,5 miliar orang penderita hipertensi (Kemkes Indonesia, 2019).

Salah satu upaya untuk mengurangi penggunaan penyedap rasa sintetis dengan tujuan untuk mengurangi risiko dampak negatifnya adalah menggunakan penyedap rasa berbahan alami. Beberapa contoh penyedap rasa berbahan alami adalah lada, vanili, daun jeruk, gula, cabai, dan bawang. Hidrolisat protein juga merupakan salah satu contoh bahan yang dapat digunakan sebagai penyedap rasa. Sumber protein yang digunakan untuk menghasilkan hidrolisat protein dapat berupa protein nabati seperti kacang-kacangan dan protein hewani seperti protein ikan dan daging ayam (Prayudi, 2019).

2. Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.)

Kacang Jogo atau Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.) bukan merupakan tanaman asli Indonesia. Tanaman ini berasal dari Meksiko Selatan, Amerika Selatan dan daratan Cina. Selanjutnya tanaman tersebut menyebar ke daerah lain seperti Indonesia, daerah yang banyak ditanami kacang jogo atau kacang merah adalah Lembang (Bandung), Pacet (Cipanas), Kota Batu (Bogor) dan Pulau Lombok. Biji kacang jogo atau kacang merah berwarna merah atau merah berbintik-bintik putih. Oleh karena itulah, dalam kehidupan sehari-hari kacang jogo juga disebut sebagai kacang merah (*red kidney bean*). Nama lain untuk kacang merah adalah kacang galling. Kacang merah hanya dimakan dalam bentuk biji yang telah tua, baik dalam keadaan segar maupun yang telah dikeringkan. Biasanya yang dimanfaatkan dari kacang merah adalah bijinya. Biji kacang merah merupakan bahan makanan yang mempunyai energi tinggi dan sekaligus sumber protein nabati yang potensial.

Kacang merah dapat digunakan sebagai sayuran (sayur asam, sup), campuran salad, sambal goreng, kacang goreng, bahan dodol, wajik, dan aneka kue lainnya (Astawan, 2009).

Komposisi zat gizi biji kacang merah sangat bervariasi, tergantung pada kondisi tanaman dan cara perawatannya. Jenis-jenis protein yang terdapat dalam kacang merah adalah faseolin 20% (berat kering), faselin 2%, konfaseolin 0,36-0,40% (Astawan, 2009).

Kandungan karbohidrat pada kacang merah juga sangat tinggi, yaitu mencapai 61,2 gram/100 gram. Komponen karbohidrat pada kacang merah terdiri dari gula 1,6%, dekstrin 2,7%, pati 35,2%, pentosa 8,4%, galaktan 1,3%, dan pektin 0,7%. Tingginya kadar karbohidrat pada kacang merah merupakan sumber energi yang baik, yaitu sekitar 348 kkal per 100 gram. Sedangkan kadar lemak pada kacang merah juga relatif rendah, yaitu 1,5 gram/100 gram. Adapun komponen lemak dari kacang merah terdiri atas asam lemak jenuh 19% dan asam lemak tak jenuh 63,3%. Selain itu, Kacang merah merupakan sumber mineral yang baik. Komposisi mineral per 100 gram kacang merah adalah fosfor (410 mg), kalsium (260 mg), mangan (194 mg), besi (5,8 mg), tembaga (0,95 mg), serta natrium (15 mg) (Astawan, 2009).

Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris L*) selain dimasak menjadi berbagai makanan lezat, kandungan nutrisi kacang merahnya juga unggul. Kacang merah kaya akan asam folat, kalsium, karbohidrat kompleks, serat, dan protein yang tergolong tinggi. Kandungan karbohidrat kompleks dan serat yang tinggi dalam kacang merah membuatnya dapat menurunkan kadar kolesterol darah. Kadar indeks glikemik kacang merah juga termasuk rendah sehingga menguntungkan penderita diabetes dan menurunkan risiko timbulnya diabetes. Prinsip penggabungan antara kacang – kacang dan biji-bijian

maka dapat memperbaiki keseimbangan asam aminonya, sehingga tujuan perbaikan mutu protein dapat tercapai. Lebih jelasnya bisa dilihat pada tabel 1 berikut ini: (Muchtadi, 1988).

Tabel 1. Komposisi asam amino dalam Kacang Merah

No.	Komponen Asam Amino	Miligram/gram Protein
1.	Isoleusin	41,5
2.	Leusin	72,2
3.	Lisin	72,0
4.	Metionin	10,6
5.	Fenilalanin	52,2
6.	Tirosin	25,3
7.	Triftofan	10,1
8.	Valin	45,9
9.	Arginin	56,8
10.	Histidin	28,3
11.	Alanin	52,2

Kacang merah mengandung berbagai jenis zat kimia. Berikut ini merupakan hasil uji fitokimia ekstrak kacang merah dalam penelitian (Djamil dan Anelia, 2009) yaitu:

Tabel 2. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Metanol Kacang Merah

Nama Senyawa	Hasil Analisis
Alkaloid	Negatif
Flavonoid	Positif
Saponin	Positif
Tanin	Positif
Kuinon	Negatif
Steroid/Triterpenoid	Positif
Kumarin	Positif
Minyak Atsiri	Negatif

Dari tabel diatas dapat diketahui bahwa dalam kacang merah mengandung zat kimia berupa fitroestrogen, ditunjukkan dengan adanya senyawa flavonoid, menyatakan bahwa fitoestrogen adalah senyawa yang terkandung dalam kelompok tanaman, baik biji – bijian, kacang – kacangan, sayuran, dan buah – buahan yang memiliki sifat khasiat menyerupai hormon estrogen. Meskipun saat ini, sifat atau khasiat tersebut menimbulkan pro dan kontra, terhadap perannya pada sistem reproduksi, namun kenyataan bahwa pengguna/pemakai fitoestrogen, disadari atau tidak tentang khasiat berupa estrogen tersebut, terus meningkat. Peningkatan ini selain merupakan suatu kebiasaan menggunakan/memakai kandungan jenis fitoestrogen dalam makanan sehari-hari, juga penelitian epidemiologi, menemukan relatif menurunnya atau berkurangnya, penyakit – penyakit reproduksi, terkait dampak hormon estrogen dan ada juga kelompok fitoestrogen ini termasuk ke dalam golongan fitofarmaka, yakni sebagai obat – obatan herbal (Biben, 2012).

Khasiat Kacang Merah Kacang merah sering digunakan dalam berbagai hidangan, terutama beras, kari, salad dan topping. Ada banyak manfaat kesehatan dari kacang merah yang perlu kita ketahui. Berikut adalah manfaat kesehatan dari kacang merah menurut (Astawan, 2009) :

1.) Memasok banyak energi

Kacang merah dapat meningkatkan energi karena tinggi kandungan zat besi. Makanan ini mengandung banyak zat besi yang merupakan sumber utama yang diperlukan untuk meningkatkan metabolisme dan energi tubuh. Kacang merah juga membantu sirkulasi oksigen ke seluruh tubuh.

2.) Mengontrol berat badan

Makanan ini baik dikonsumsi bagi mereka yang ingin mengontrol berat badan karena memberi rasa kenyang yang lebih lama.

3.) Menjaga gula darah

Kacang merah terkenal kaya serat. Serat ini dapat menurunkan tingkat metabolisme kandungan karbohidrat dalam kacang-kacangan.

4.) Baik untuk otak

Kacang merah menawarkan manfaat yang luar biasa bagi otak. Makanan ini mengandung banyak vitamin K yang menyediakan nutrisi penting untuk otak dan sistem saraf.

5.) Sumber vitamin

Kacang merah juga merupakan sumber yang baik untuk vitamin B, yang penting untuk sel-sel otak. Vitamin ini memelihara saraf otak dan sel-sel yang mencegah penyakit yang terkait usia seperti Alzheimer.

6.) Mempermudah buang air besar

Serat yang hadir dalam kacang merah dapat membantu mempertahankan gerakan usus yang sehat. Jika dimakan dalam jumlah yang tepat, kacang merah membantu membersihkan saluran pencernaan. Buang air besar secara teratur berhubungan dengan rendahnya resiko kanker usus besar.

7.) Kardiovaskular

Kacang merah juga mengandung banyak magnesium dan serat yang bertanggung jawab untuk menurunkan kadar kolesterol jahat. Ingin terhindar dari risiko stroke, serangan jantung, dan penyakit pembuluh darah perifer.

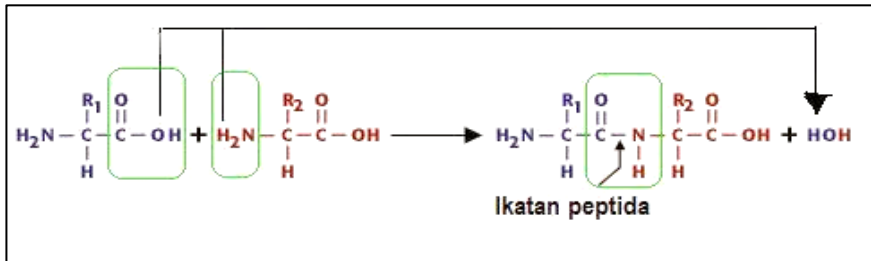
3. Protein

Protein adalah senyawa organik dengan massa molekul besar yang disusun oleh sejumlah asam amino, dimana asam amino satu dengan yang lainnya terikat melalui ikatan peptida. Asam amino yang menyusun protein memiliki struktur molekul yang berbeda-beda tergantung pada rantai samping yang terikat pada struktur asam amino tersebut. Urutan asam amino dalam protein yang akan menentukan identitas, aktivitas, dan fungsi dari protein tersebut. Secara teori, terdapat 20 jenis asam amino dengan rantai samping yang berbeda seperti yang terlihat pada Tabel 3. dan dari 20 jenis asam amino tersebut dapat membentuk berbagai jenis protein (Murray dkk., 1951).
Tabel 3. Jenis Asam Amino dan Rantai Samping Masing-Masing

Asam Amino

Asam Amino	Rantai Samping	Asam Amino	Rantai Samping
Glisin	-H	Isoleusin	-CH(CH ₃)C ₂ H ₅
Alanin	-CH ₃	Metionin	-(CH ₂) ₂ SCH ₃
Serin	-CH ₂ -OH	Asam Aspartat	-CH ₂ -COOH
Sistein	-CH ₂ -HS	Asparagin	-CH ₂ CONH ₂
Threonin	-CH(CH ₃)OH	Asam Glutamat	-(CH ₂) ₂ COOH
Valin	-CH(CH ₃)CH ₃	Glutamin	-(CH ₂) ₂ CONH ₂
Leusin	-CH ₂ CH(CH ₃)CH ₃	Arginin	-(CH ₂) ₂ NH(C=NH)NH ₂
Fenilalanin	-CH ₂ -cincin benzen	Lisin	-(CH ₂) ₄ NH ₂
Tirosin	-CH ₂ -gugus fenol	Prolin	Gugus prolin
Triptofan	-CH ₂ -cincin indol	Histidin	-CH ₂ -cincin imidazol

Ikatan peptida pada protein merupakan suatu ikatan kovalen. Ikatan ini terbentuk pada saat gugus α -karboksil ($\text{C}=\text{O}$) dari suatu asam amino berikatan dengan gugus α -amino ($\text{N}-\text{H}$) dari asam amino yang lain melalui reaksi kondensasi seperti yang terlihat pada Gambar 1. Reaksi antara kedua gugus ini akan menyebabkan terjadinya pelepasan satu molekul air (H_2O) setiap pembentukan satu ikatan peptida. Setiap peptida mengandung gugus $-\text{NH}_2$ bebas yang disebut dengan N-terminal dan gugus $-\text{COOH}$ bebas yang disebut C-terminal (Wahjuni, 2014).



Gambar 1. Reaksi Pembentukan Ikatan Peptida (Budianto, 2009)

Ikatan peptida dapat dihidrolisis menjadi asam-asam amino penyusunnya, yang mana secara non-spesifik dapat dilakukan dengan penambahan asam kuat maupun basa kuat, sedangkan hidrolisis ikatan peptida secara spesifik dapat dilakukan dengan bantuan enzim protease yakni enzim yang dapat mengkatalisis pemecahan ikatan peptida dalam suatu polipeptida menjadi peptida rantai pendek dan asam-asam amino melalui reaksi hidrolisis. Enzim protease yang sering digunakan dalam hidrolisis protein yakni enzim pepsin, kimotripsin, papain, bromelin, elastase, dan pankreatin. Hidrolisis ikatan peptida pada protein harus memperhatikan sifat fisikokimia protein (Suhartono dan Artika, 2017).

Sifat fisikokimia protein yakni protein memiliki massa molekul yang sangat besar, beberapa protein mudah larut dalam pelarut air tetapi ada pula protein yang sukar larut dalam pelarut air, memiliki viskositas yang besar dalam pelarut air, bersifat amfoter (dapat bereaksi dengan asam dan basa), dan memiliki sifat sebagai *zwitter-ion*. Sifat protein sebagai *zwitter-ion* disebabkan oleh kandungan asam amino yang menyusun protein. Pada larutan basa, protein akan bermuatan negatif dan pada larutan asam, protein akan bermuatan positif. Protein dapat dihidrolisis dengan asam, basa, maupun enzim sehingga menghasilkan peptida rantai pendek maupun beberapa asam amino. Beberapa protein juga dapat membentuk dispersi koloid ketika dilarutkan dalam pelarut air karena massa molekul protein yang sangat besar. Struktur protein juga sangat mudah mengalami perubahan karena protein sangat peka terhadap pengaruh-pengaruh fisik maupun kimia. Protein banyak terkandung dalam bahan-bahan pangan seperti telur, ikan, daging, dan kacang-kacangan. Protein yang terkandung dalam bahan-bahan pangan maupun bahan lainnya dapat dipisahkan dari makromolekul lain dalam bahan tersebut melalui proses isolasi protein (Pratiwi dkk., 2018).

4. Isolasi Protein

Isolasi protein merupakan metode yang digunakan untuk memisahkan protein dari komponen lainnya dalam suatu bahan. Hasil isolasi protein dapat disebut sebagai isolat protein jika nilai kadar protein total yang diperoleh yakni lebih dari 90%, tetapi jika nilai kadar protein total yang diperoleh kurang dari 90% dan lebih dari 70% maka hasil isolasi protein disebut sebagai konsentrat protein (Preeti dkk., 2008). Isolasi protein dilakukan dengan mempertimbangkan sifat-sifat fisik dan kimia dari protein tersebut agar tidak menyebabkan perubahan

konformasi maupun aktivitas dari protein itu sendiri (Kurniaty dkk., 2018). Jayanti (2019) menyatakan bahwa protein dapat diisolasi dari berbagai jenis bahan pangan, salah satunya adalah kacang-kacangan. Jenis kacang-kacangan seperti kacang kedelai, kacang merah, kacang merah, kacang hijau, dan kacang tanah diketahui mengandung protein rata-rata sekitar 20-22% protein sehingga protein banyak diisolasi dari kacang-kacangan tersebut.

Metode yang dapat digunakan untuk mengisolasi protein dari kacang-kacangan adalah metode ekstraksi alkali – presipitasi isoelektrik. Prinsip dari metode ini adalah proses pelarutan protein yang dilakukan dalam suasana basa (alkali) dengan menggunakan larutan basa kuat karena sebagian besar protein akan larut dalam suasana basa. Protein akan bermuatan negatif pada suasana basa, sehingga memungkinkan terjadinya interaksi antar molekul protein menjadi lebih rendah karena terdapat reaksi tolak-menolak yang terjadi antara muatan sejenis, yang mana hal ini akan meningkatkan kelarutan protein. Semakin jauh perbedaan pH ekstraksi dari titik isoelektrik maka kelarutan protein akan semakin meningkat (Pratiwi dkk., 2018).

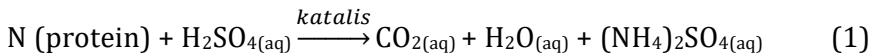
Proses isolasi protein dengan metode ekstraksi alkali kemudian dilanjutkan dengan proses presipitasi isoelektrik. Proses presipitasi isoelektrik dilakukan dengan mengatur pH supernatan hasil ekstraksi alkali sehingga diperoleh pH isoelektrik protein, kemudian terjadi presipitasi (pengendapan). Pada pH isoelektrik, protein akan memiliki daya larut yang minimum karena pada titik isoelektrik terjadi keseimbangan antara gugus yang bermuatan negatif dengan gugus yang bermuatan positif sehingga muatan total dari masing-masing asam amino dalam protein sama dengan nol. Pada kondisi ini, protein akan berada dalam keadaan tidak

bermuatan dan memiliki kelarutan minimum sehingga akan terjadi pengendapan protein tanpa adanya denaturasi protein. Proses presipitasi isoelektrik ini pada praktiknya akan ditunjukkan dengan terbentuknya larutan yang berwarna putih susu (Yatno dkk., 2018). Nilai pH isoelektrik protein berbeda-beda tergantung pada bahan yang menghasilkan protein tersebut. Protein kacang-kacangan memiliki nilai pH isoelektrik sekitar 4-5 (Elygio dkk., 2016), protein ikan memiliki nilai pH isoelektrik sekitar 5-11 (Oktasari dkk., 2015), dan protein daging memiliki pH isoelektrik sekitar 5-5,1 (Suantika dkk., 2017)

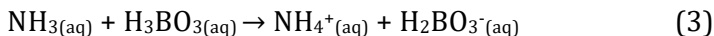
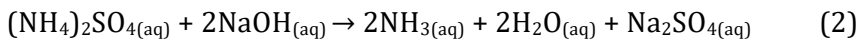
Protein hasil isolasi dapat ditentukan kadar protein totalnya untuk mengetahui jumlah protein yang terisolasi. Metode yang dapat digunakan adalah metode Kjeldahl. Pada metode Kjeldahl, yang ditentukan adalah nilai total nitrogen dari isolat protein, kemudian dengan adanya faktor konversi maka nilai total nitrogen ini dapat diubah menjadi nilai kadar protein total dari sumber protein yang digunakan (Prastika dkk., 2019). Analisis dengan metode ini terdiri dari tiga tahapan dengan tahap pertama adalah destruksi sampel dengan menggunakan asam sulfat (H_2SO_4) dan ditambahkan katalis sehingga dihasilkan ammonium sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) yang tujuannya mengoksidasi senyawa organik karbon, hidrogen, dan oksigen (C, H, dan O) dalam sampel menjadi karbon dioksida, air, dan oksigen (CO_2 , H_2O , dan O_2) tanpa diikuti oksidasi nitrogen (N) menjadi gas nitrogen (N_2). Tahap kedua yakni dilakukan penambahan basa (alkali) kuat (NaOH atau KOH) dengan tujuan untuk memecah senyawa amonium sulfat menjadi ammonia (NH_3), kemudian amonia yang terbentuk didistilasi dan dialirkan ke dalam larutan penyerap (H_3BO_3) dan tahap terakhir dilakukan titrasi dengan larutan asam klorida (HCl) untuk membasakan sisa asam borat (H_3BO_3) yang

bereaksi dengan ammonia (NH₃). Pada tahap destruksi, destilasi, maupun titrasi dalam metode Kjeldahl melibatkan beberapa reaksi. Reaksi-reaksi yang terjadi selama proses analisis ditunjukkan dalam Persamaan Reaksi 1 – 4.

Reaksi pada tahap destruksi:



Reaksi pada tahap destilasi:



Reaksi pada tahap titrasi:



Nilai total nitrogen N(%) dan kadar protein (%) dapat ditentukan dengan Persamaan 5 dan 6 (Rosaini dkk., 2015).

$$N(\%) = \frac{(V \text{ HCl sampel} - V \text{ HCl blanko}) \times N \text{ HCl} \times 14,007}{m \text{ sampel (mg)}} \times 100\% \quad (5)$$

Keterangan:

V HCl sampel = volume HCl yang digunakan untuk mentitrasi sampel (mL)

V HCl blanko = volume HCl yang digunakan untuk mentitrasi blanko (mL)

N HCl = Normalitas HCl yang digunakan (N)

m sampel = Massa sampel yang digunakan (g)

Rata-rata kandungan nitrogen (N₂) dalam protein adalah 16%, yang artinya terdapat 16 g N₂ dalam 100 g protein. Hal ini berarti 1 g N₂ setara dengan 100/16 g protein atau 6,25 protein, sehingga seperti yang terlihat pada Persamaan 6 bahwa 6,25 merupakan faktor konversi dalam penentuan kadar protein menggunakan metode Kjeldahl (Putri dkk., 2015).

$$\text{Kadar Protein Total (\%)} = N(\%) \times 6,25 \quad (6)$$

5. Hidrolisis Protein secara Enzimatik

Hidrolisis protein secara enzimatik merupakan proses penguraian protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida rantai pendek dan asam-asam amino dengan bantuan enzim protease. Produk dari hidrolisis protein disebut dengan hidrolisat protein. Hidrolisis protein secara enzimatik dengan menggunakan enzim protease dinilai paling aman dan menguntungkan. Pada hidrolisis protein, kemampuan enzim dalam menghidrolisis protein lebih mudah diatur, tidak merusak struktur asam amino dalam protein, dan enzim bekerja secara spesifik sehingga kerusakan produk hidrolisis dapat dicegah (Machin, 2012).

Faktor-faktor yang memengaruhi hidrolisis protein secara enzimatik dapat dijelaskan sebagai berikut.

1.) Suhu

Suhu hidrolisis yang digunakan akan memengaruhi kerja enzim. Setiap enzim memiliki suhu optimum yang berbeda-beda untuk dapat mengkatalisis suatu reaksi. Semakin tinggi suhu yang digunakan, maka semakin meningkat pula aktivitas enzim dalam mengkatalisis suatu reaksi karena tumbukan antara enzim dan substrat semakin meningkat sehingga energi kinetik reaksi semakin meningkat. Secara umum, setiap peningkatan sebesar 10°C di atas suhu minimum, aktivitas enzim akan meningkat sebanyak dua kali lipat. Aktivitas enzim akan mengalami peningkatan pada kondisi ini sehingga dapat tercapai kondisi optimum enzim. Peningkatan suhu melebihi batas optimum enzim dapat menyebabkan ikatan di dalam enzim melemah secara struktural. Pada kondisi ini, enzim akan terdenaturasi sehingga aktivitas enzim juga akan menurun (Yusriah dan Kuswyasari, 2013).

2.) Nilai pH

Nilai pH berpengaruh terhadap kecepatan aktivitas enzim dalam mengkatalisis reaksi hidrolisis protein. Setiap enzim memiliki pH optimum yang berbeda-beda. Jika konsentrasi ion hidrogen berubah karena adanya pengaturan pH, maka akan memengaruhi aktivitas enzim dalam memutus ikatan peptida dalam protein. Setiap protein mengandung asam amino yang berbeda-beda sehingga pengaturan pH harus diperhatikan dengan baik, karena jika pH terlalu tinggi atau rendah, dapat merusak struktur asam amino dalam protein sehingga memengaruhi hasil hidrolisis protein. Pada umumnya, enzim bekerja dengan optimum pada pH 7 (netral), tetapi ada juga enzim yang bekerja optimum pada pH rendah (asam) maupun pH tinggi (basa) (Yusriah dan Kuswytasari, 2013).

3.) Waktu Hidrolisis

Semakin lama waktu hidrolisis, putusnya ikatan peptida pada protein oleh enzim protease juga semakin meningkat, maka semakin banyak asam amino bebas yang terlepas. Akan tetapi, pada waktu tertentu, substrat yang dihidrolisis akan habis sehingga enzim akan jenuh dan aktivitasnya menurun. Oleh karena itu, waktu hidrolisis optimum setiap enzim protease juga berbeda-beda tergantung pada substrat (protein) yang dihidrolisis (Restiani, 2016).

4.) Konsentrasi Enzim

Bertambahnya konsentrasi enzim dalam suatu proses hidrolisis protein akan menyebabkan bertambahnya kecepatan reaksi hidrolisis karena semakin banyak sisi aktif enzim yang dapat bereaksi dengan substrat dan membentuk kompleks enzim-substrat (ES) sehingga dihasilkan produk. Akan tetapi, pada batas tertentu penambahan konsentrasi enzim secara

terus-menerus (berlebihan) tidak akan menyebabkan produk bertambah karena substrat (protein) telah habis dihidrolisis, sehingga pada kondisi ini enzim akan jenuh dan mengalami penurunan aktivitas (Putra, 2019).

5.) Konsentrasi Substrat

Penambahan konsentrasi substrat pada awal reaksi hidrolisis protein akan menyebabkan kecepatan reaksi meningkat. Akan tetapi, jika penambahan konsentrasi substrat dilakukan secara berlebih, maka pembentukan kompleks enzim substrat (ES) akan mencapai batas optimum yang mengakibatkan sebagian besar substrat tidak berubah menjadi produk. Hal ini disebabkan karena pada kondisi konsentrasi substrat berlebih, semua bagian sisi aktif enzim telah berikatan dengan substrat dan pada keadaan tersebut kecepatan reaksi hidrolisis berada dalam kondisi maksimum (Permanasari dkk., 2018).

6.) Rasio Enzim-Substrat (E/S)

Rasio E/S adalah perbandingan jumlah enzim-substrat yang digunakan pada saat hidrolisis protein berlangsung. Menurut Khayatun dkk. (2017) dan Binoto dkk. (2015), apabila rasio enzim-substrat dalam proses produksi suatu hidrolisat yang digunakan semakin meningkat, maka akan semakin sering terjadi tumbukan antara molekul substrat dengan enzim, sehingga masuknya molekul substrat ke dalam sisi aktif enzim akan lebih sering terjadi. Hal ini akan menyebabkan produk hasil hidrolisis protein juga semakin meningkat karena semakin banyak molekul substrat yang bergabung dengan sisi aktif enzim dan membentuk kompleks enzim-substrat (ES) sehingga meningkatkan laju reaksi. Rasio E/S pada umumnya dinyatakan dalam bentuk persen (%b/b), contohnya jika rasio enzim-

substrat yang digunakan adalah 2% (b/b) maka ini berarti 2 g enzim berbanding 100 g substrat.

7.) Perkecambahan

Perkecambahan juga memengaruhi produk hasil hidrolisis protein secara enzimatik jika protein yang dihidrolisis berasal dari bahan kacang-kacangan. Harjadi (1979) menyatakan bahwa perkecambahan merupakan aktivitas awal pertumbuhan embrio pada biji kacang yang ditandai dengan pecahnya kulit biji dan munculnya calon individu tanaman baru. Kacang-kacangan mengandung senyawa-senyawa antigizi seperti tanin, asam fitat, dan polifenol yang diketahui dapat berinteraksi dengan protein dan membentuk senyawa kompleks yang dapat menghambat kerja enzim. Oleh karena itu, senyawa-senyawa antigizi ini dapat dihilangkan melalui proses perkecambahan. Perkecambahan menyebabkan terjadinya beberapa reaksi seperti hidrolisis, oksidasi, dan sintesis. Reaksi-reaksi ini dapat membuat kandungan senyawa-senyawa antigizi berkurang, yang dicirikan dengan mengelupasnya kulit biji yang mengandung tanin dan menurunnya kadar asam fitat dan polifenol dalam biji kacang tersebut (Onyango dkk., 2013).

Selama proses perkecambahan, protein cadangan pada biji kacang akan mengalami degradasi untuk menghasilkan protein baru sehingga ketika kacang dihidrolisis maka rantai polipeptida yang dihasilkan akan lebih pendek daripada hidrolisat protein hasil hidrolisis kacang yang tidak melalui proses perkecambahan. Proses degradasi ini dimulai ketika terjadi kontak antara protease endogen dalam biji kacang dengan air sehingga menembus sel biji kacang (proses imbibisi) (Bau dkk., 2000). Protease endogen akan menghidrolisis protein yang memiliki massa molekul besar

menjadi peptida rantai pendek dengan massa molekul yang lebih kecil dan ketika peptida rantai pendek ini dihidrolisis kembali secara enzimatik, maka akan dihasilkan asam-asam amino dan peptida-peptida yang lebih pendek lagi. Proses perkecambahan dapat dihentikan dengan menyimpan kecambah pada suhu -20 sampai -25°C selama minimal 24 jam, yang mana pada proses ini enzim dalam biji kacang yang digunakan selama perkecambahan akan inaktif (Dewi dkk., 2018).

Hasil penelitian Martianingsih dkk. (2016) menunjukkan bahwa biji kacang yang tidak melalui perkecambahan menghasilkan hidrolisat protein yang memiliki kandungan protein terlarut lebih tinggi daripada hidrolisat protein yang berasal dari biji kacang yang melalui perkecambahan. Kacang yang dikecambahkan selama 24 jam menghasilkan hidrolisat protein dengan rantai peptida yang lebih pendek dengan kadar protein terlarut yang lebih tinggi yakni sebesar 15,85% daripada hidrolisat protein kacang yang tidak dikecambahkan yang menghasilkan kadar protein terlarut sebesar 12,04%. Hal ini terjadi karena selama proses perkecambahan berlangsung, protein mengalami degradasi menjadi peptida-peptida rantai pendek, yang artinya kadar protein terlarutnya semakin meningkat. Waktu perkecambahan kacang yang baik agar selanjutnya dapat digunakan dalam proses hidrolisis protein adalah selama 48-72 jam. Perbedaan waktu perkecambahan inilah yang memengaruhi hidrolisis protein pada masing-masing kecambah kacang-kacangan (Sulieman dkk., 2008) dan (Khairi dan Kantero, 2014).

Hidrolisat protein diketahui bermanfaat dalam berbagai bidang, seperti pada bidang farmasi, hidrolisat protein dapat dimanfaatkan dalam pembuatan produk-produk dermatologis, seperti krim pembersih wajah dan krim pelembab kulit. Pada

bidang pangan dan kesehatan, hidrolisat protein bermanfaat sebagai sumber peptida bioaktif, fortifikasi ke dalam formulasi pangan non-alergenik untuk bayi dan suplemen makanan diet, sebagai bahan pengemulsi, untuk memperbaiki karakteristik berbagai produk pangan, dan juga sebagai penyedap rasa (Wijana dkk., 2018). Hidrolisat protein yang dapat digunakan sebagai penyedap rasa yakni hidrolisat protein kacang-kacangan. Hal ini disebabkan karena asam-asam amino sebagai hasil hidrolisis protein kacang-kacangan diketahui memiliki rasa seperti rasa manis, asam, dan pahit yang menyebabkan hidrolisat protein menjadi berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai penyedap rasa. Pada Tabel 4. ditunjukkan masing-masing rasa dari beberapa jenis asam amino berdasarkan hasil penelitian Haefeli *and* Glaser (1990) dalam Wiwata (2019).

Tabel 4. Rasa dari Beberapa Jenis Asam Amino

Asam Amino	Rasa	Asam Amino	Rasa
Glisin	Tidak ada rasa	Isoleusin	Manis
Alanin	Manis/pahit	Metionin	Manis
Serin	Manis	Asam	Asam
		Aspartat	
Sistein	Manis/Pahit/Asam	Asparagin	Manis
Threonin	Manis	Asam	Asam/Asin
		Glutamat	
Valin	Manis	Glutamin	Gurih
Leusin	Gurih	Arginin	Manis/Pahit
Fenilalanin	Manis/Pahit	Lisin	Manis/Pahit
Tirosin	Tidak ada rasa	Prolin	Pahit/Asam
Triptofan	Sangat manis	Histidin	Sangat manis

6. Enzim Papain

Enzim papain adalah enzim yang terkandung di dalam getah pepaya baik pada bagian buah, batang, maupun daun pepaya. Enzim papain merupakan jenis enzim proteolitik yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi pemecahan rantai polipeptida pada protein dengan cara menghidrolisis ikatan peptida pada protein tersebut sehingga dihasilkan peptida rantai pendek dan asam-asam amino. Setiap enzim memiliki *E.C. Number* yakni *Enzyme Commission Number* yang merupakan sistem klasifikasi untuk suatu jenis enzim berdasarkan reaksi kimia yang dikatalisis. Enzim papain memiliki *E.C. Number* yakni 3.4.22.2. Pada *E.C. Number* enzim papain, angka pertama (3) memiliki arti enzim dengan kelas hidrolase, angka kedua (4) memiliki arti enzim dengan sub-kelas menghidrolisis reaksi pemutusan ikatan peptida pada polipeptida, angka ketiga (22) memiliki arti sub-sub kelas endopeptidase, dan angka keempat (2) menunjukkan enzim spesifik ditemukan pada urutan ke-2 (Baehaki dkk., 2015).

Enzim papain termasuk jenis enzim endopeptidase yakni enzim yang memotong ikatan peptida dalam suatu rantai polipeptida (protein) pada bagian tengah rantai (Anggraini dan Yunianti, 2015). Kondisi optimum dari enzim papain yakni pada suhu sekitar 50°C sampai 70°C dan pada rentang pH yang cukup luas yakni sekitar 5 sampai 7,5 (Arief dkk., 2016). Enzim papain terdiri dari 212 asam amino dengan tiga sisi aktif. Tiga sisi aktif katalitik utama dari enzim papain yakni sistein, histidin, dan asparagin (Refai dkk., 2011). Reaksi yang terjadi selama proses hidrolisis protein dengan enzim papain yakni sisi aktif katalitik papain yaitu gugus sistin dan histidin akan memutus rantai peptida substrat protein menjadi produk. Selama proses tersebut terjadi perubahan struktural diantara enzim dan substrat yang mana gugus sistin yang sangat reaktif akan

berikatan dengan substrat membentuk ikatan kovalen enzim-substrat (ES) yang berbentuk tetrahedral. Sementara itu, gugus histidin terprotonasi dan berikatan dengan nitrogen pada substrat sehingga mengakibatkan gugus amina pada substrat akan terdifusi dan posisinya digantikan oleh molekul air yang akhirnya menghidrolis produk intermediet dan enzim kembali ke fungsi dan bentuknya semula (Beveridge dkk., 1996).

7. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri adalah metode yang digunakan untuk mengukur absorbansi suatu sampel (larutan), yang mana alat yang digunakan yaitu spektrofotometer, yang terdiri dari spektrometer dan fotometer. Spektrometer menghasilkan sinar dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi (Gandjar, 2007). Spektrofotometer merupakan alat yang digunakan untuk mengukur absorbansi suatu larutan dengan cara melewatkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu pada suatu objek kaca atau kuarsa yang disebut kuvet. Sebagian dari cahaya tersebut akan diserap dan sisanya akan dilewatkan. Spektrofotometer UV-Vis merupakan alat yang digunakan untuk mengukur absorbansi suatu sampel (larutan) pada panjang gelombang sinar UV-Vis, yakni pada 190 – 380 nm untuk sinar ultraviolet (UV) dan 380 – 760 nm untuk sinar tampak (*visible*). Konsentrasi senyawa dalam larutan yang diukur dapat dihitung berdasarkan Hukum Lambert-Beer seperti pada Persamaan 7 dan 8 (Sastrohamidjojo, 2007).

$$A = \log \frac{I_0}{I_1} = a.b.c \quad (7)$$

Dengan:

(A = absorbansi; a = absorptivitas (g/cm); b = tebal kuvet (cm); c = konsentrasi (mol/L); I₀ = intensitas sinar yang datang; dan I₁ = intensitas sinar diteruskan)

Hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa absorbansi berbanding lurus dengan konsentrasi dan ketebalan sel. Jika konsentrasi bertambah, jumlah molekul yang dilalui berkas sinar akan bertambah, sehingga absorbansi juga bertambah. Konsentrasi senyawa yang dianalisis akan sebanding dengan jumlah sinar yang diserap oleh senyawa yang terdapat dalam larutan. Konsentrasi senyawa dalam sampel tidak diketahui, oleh karena itu, diperlukan kurva standar. Kurva standar adalah sebuah metode statistik yang digunakan untuk menentukan konsentrasi suatu senyawa dalam sampel yang tidak diketahui, dengan membandingkan sampel yang tidak diketahui konsentrasinya dengan sebuah standar yang konsentrasinya telah diketahui. Kurva standar ini akan menghasilkan persamaan regresi linier (Sastrohamidjojo, 2007):

$$y = bx + a \quad (8)$$

Dengan:

(y = absorbansi, b = kemiringan, a = intersep, dan x = konsentrasi senyawa dalam sampel)

Nilai x merupakan konsentrasi senyawa dalam sampel karena nilai x berbanding lurus dengan nilai y (absorbansi). Absorbansi (y) ini dalam Hukum Lambert-Beer sebanding dengan a (absorptivitas molar), yang mana absorptivitas molar menentukan seberapa kuat larutan dapat menyerap berkas cahaya dan dengan nilai a ini akan dapat diperkirakan banyaknya kromofor dari senyawa yang dianalisis (Sastrohamidjojo, 2007).

Syarat senyawa dapat dianalisis dengan metode spektrofotometri adalah senyawa yang mengandung gugus kromofor. Kromofor adalah gugus fungsional yang mengabsorpsi radiasi sinar ultraviolet dan sinar tampak, jika diikat oleh gugus auxokrom. Hampir semua kromofor

mempunyai ikatan rangkap berkonjugasi, misalnya pada diena ($C=C-C=C$), dienon ($C=C-C=O$), benzen, dan beberapa gugus lainnya. Ausokrom adalah gugus fungsional yang mempunyai elektron bebas, seperti $-OH$, NH_2 , NO_2 , dan $-X$. Protein memiliki gugus kromofor ($C=O$) dan gugus auksokrom (NH_2), oleh karena itu protein dapat dianalisis menggunakan metode spektrofotometri karena protein mengandung gugus kromofor dan auksokrom (Harmita, 2006).

8. Kadar α -Amino Bebas

Kadar α -amino bebas adalah parameter yang menunjukkan jumlah gugus amina ($-NH_2$) bebas yang dihasilkan akibat proses hidrolisis suatu protein. Kadar α -amino bebas ini dipengaruhi oleh waktu, suhu, pH, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, dan rasio E/S (Bougatef dkk., 2012). Metode yang dapat digunakan untuk menentukan kadar α -amino bebas adalah dengan uji ninhidrin. Uji ninhidrin adalah metode yang digunakan untuk menganalisa asam amino bebas dalam protein secara kualitatif dan akan menjadi uji kuantitatif jika dilanjutkan dengan pengujian menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Hart, 1990). Reagen ninhidrin dapat digunakan untuk mendeteksi semua jenis asam amino bebas atau peptida yang mengandung asam α -amino bebas dengan mendeteksi gugus amina ($-NH_2$) dalam molekul asam amino. Uji positif ditandai dengan terbentuknya senyawa kompleks berwarna ungu (Yazid dkk., 2006).

Ninhidrin akan bereaksi dengan asam amino membentuk *schiff base* (senyawa dengan struktur umum $R_1R_2C=NR$). Setelah itu, senyawa ini akan mengalami dekarboksilasi dengan melepaskan CO_2 dan membentuk imino (gugus fungsi yang mengandung ikatan rangkap karbon-nitrogen). Imino kemudian bereaksi dengan H_2O dan membentuk aldehid serta

diketohidridamina (senyawa intermediat). Senyawa ini kemudian bereaksi kembali dengan ninhidrin dan membentuk senyawa kompleks yang berwarna ungu. (Yazid dkk., 2006). Semakin banyak ninhidrin yang bereaksi dengan NH_2 sampel, maka warna ungu yang timbul semakin pekat. Kompleks berwarna ungu tersebut menyerap pada panjang gelombang 570 nm sehingga secara kuantitatif penggunaan reagen ninhidrin ini juga dapat digunakan untuk menentukan kadar α -amino bebas secara spektrofotometri (Scopes, 2013). Pada penentuan kadar α -amino bebas, diperlukan kurva standar untuk membantu menentukan nilai kadar α -amino bebas tersebut. Kurva standar yang digunakan akan menghasilkan persamaan regresi linier ($y = bx + a$). Setelah itu, diperoleh juga absorbansi sampel yang merupakan nilai y , maka dengan menggunakan persamaan regresi linier, kadar α -amino bebas hidrolisat protein (x) dapat diketahui.

Kecenderungan nilai kadar α -amino bebas terhadap suatu hidrolisat protein yakni semakin lama waktu hidrolisis maka pemutusan ikatan peptida semakin meningkat dan jumlah asam amino bebas juga semakin meningkat (Prastika dkk., 2019). Semakin meningkatnya suhu yang digunakan dalam proses hidrolisis, menyebabkan energi kinetik dan tumbukan yang terjadi antara enzim dengan substrat (protein) semakin meningkat sehingga semakin banyak ikatan peptida yang terputus dan nilai kadar α -amino bebas juga semakin meningkat (Purnama dkk., 2019). Semakin meningkat rasio E/S yang digunakan menyebabkan semakin bertambahnya tumbukan antara molekul substrat dengan enzim, sehingga masuknya molekul substrat ke dalam sisi aktif enzim akan lebih sering terjadi dan pemutusan ikatan peptida juga semakin meningkat sehingga nilai kadar α -amino bebas yang dihasilkan

semakin meningkat karena asam amino bebas yang dilepaskan semakin banyak (Restiani, 2016).

9. Kadar Protein Terlarut

Kadar protein terlarut adalah parameter yang menunjukkan jumlah protein yang terurai dan mengalami konversi dari protein yang bersifat tidak larut menjadi peptida-peptida rantai pendek yang lebih larut sebagai hasil hidrolisis. Peptida-peptida pendek yang dihasilkan memiliki berat molekul yang lebih rendah sehingga lebih mudah terlarut (Aluko dan Monu, 2003). Salah satu metode yang dapat digunakan untuk menentukan kadar protein terlarut adalah metode spektrofotometri dengan menggunakan reagen Biuret. Prinsip metode ini adalah ion tembaga (Cu^{2+}) dalam CuSO_4 yang digunakan dalam suasana basa akan membentuk senyawa kompleks dengan ikatan peptida pada protein yang menghasilkan warna ungu. Oleh karena itu, nilai serapannya dapat diukur dengan alat spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang (λ) 540 nm, karena warna ungu yang dihasilkan memiliki panjang gelombang pada 540 nm. Nilai kadar protein terlarut dengan metode ini ditentukan dengan menggunakan kurva standar protein. Standar protein yang digunakan biasanya berupa kasein atau *Bovine Serum Albumin* (BSA). Kurva standar yang digunakan akan menghasilkan persamaan regresi linier ($y = bx + a$). Setelah itu, diperoleh juga absorbansi sampel yang merupakan nilai y , maka dengan menggunakan persamaan regresi linier, kadar protein terlarut hidrolisat protein (x) dapat diketahui (Jubaidah dkk., 2016).

Kecenderungan nilai kadar protein terlarut dalam proses hidrolisis protein yakni semakin lama waktu hidrolisis maka semakin besar nilai kadar protein terlarutnya. Semakin meningkat rasio E/S yang digunakan, maka semakin bertambah

tumbukan antara molekul substrat dengan enzim, sehingga masuknya molekul substrat ke dalam sisi aktif enzim akan lebih sering terjadi dan pemutusan ikatan peptida juga semakin meningkat sehingga semakin banyak protein yang mengalami konversi dari protein yang bersifat tidak larut menjadi peptida-peptida rantai pendek yang lebih larut sebagai hasil hidrolisis atau kadar protein terlarutnya semakin besar (Wardi dkk., 2019).

10. Uji Organoleptik

Uji organoleptik adalah suatu metode pengujian dengan menggunakan indera perasa manusia sebagai alat utama untuk pengukuran daya penerimaan terhadap suatu produk. Syarat-syarat yang harus ada dalam uji organoleptik adalah adanya sampel yang akan diuji, adanya panelis (orang yang menilai), dan pernyataan respon yang jujur. Uji organoleptik untuk mengetahui rasa dari suatu produk biasanya dilakukan dengan mencicipi produk yang akan diuji secara langsung maupun tidak langsung. Kesimpulan hasil pengujian oleh panelis ditentukan sesuai dengan rentang nilai yang disepakati (Bernadeta dkk., 2012).

Prinsip uji organoleptik ini adalah panelis diminta untuk mencoba suatu makanan, kemudian panelis diminta untuk memberikan respon dan penilaian terhadap produk yang telah dicoba tersebut tanpa membandingkannya dengan yang lain. Sedangkan secara umum, Tujuan dari uji organoleptik adalah untuk mengetahui tingkat kesukaan konsumen terhadap produk atau makanan dan untuk menilai komoditas jenis atau produk pengembangan secara organoleptik (Michael, 2009). Tujuan diadakannya uji organoleptik terkait langsung dengan selera. Setiap orang di setiap daerah memiliki kecenderungan selera tertentu sehingga produk yang akan dipasarkan harus

disesuaikan dengan selera masyarakat setempat (Jayalangkara, 2017).

Uji organoleptik merupakan uji yang didasarkan pada alat-alat indra pada manusia yang bertindak sebagai panelis. Uji organoleptik sering kali menguji tekstur, rasa, *Flavor*, tampilan dan aroma dari produk tersebut. Uji organoleptik dapat dilakukan oleh orang yang mampu dijadikan sebagai panelis atau orang yang akan memberikan penilaian pada produk yang disediakan. Dalam makanan atau produk banyak dipengaruhi oleh cita rasa, warna, aroma dan nilai gizi dari produk tersebut (Prasetyo, 2014).

Betty dan Tjutju (2008), mengelompokkan panelis menjadi beberapa kelompok berdasarkan berdasarkan tingkat sensitivitas dan tujuan dari setiap pengujian, yaitu :

- 1.) Panelis ahli adalah panelis yang mempunyai kepekaan yang tinggi dan mempunyai pengalaman dan latihan yang lama dalam mengukur dan menilai sifat karakteristik secara tepat.
- 2.) Panelis terlatih adalah panelis yang memiliki kepekaan yang tidak setinggi panelis ahli tetapi panelis ini merupakan panelis pilihan dan telah lulus seleksi pada tes kemampuan menilai makanan.
- 3.) Panelis tidak terlatih merupakan panelis yang tidak berdasarkan kepekaan namun hanya untuk menguji tingkat kesenangan pada suatu produk atau tingkat kemauan untuk menggunakan suatu produk.

BAB III

MEKANISME KACANG MERAH

SEBAGAI PENYEDAP RASA ALAMI

1. Pembuatan Kecambah Kacang Merah

Kacang merah dikecambahkan selama 72 jam atau 3 hari, dengan perubahan yakni pada hari pertama, kecambah yang tumbuh tidak banyak dan masih berukuran pendek yakni sekitar 0,5-1 cm, kemudian pada hari ke-2 kecambah yang tumbuh bertambah panjang dan besar dengan ukuran sekitar 1-1,5 cm, dan pada hari ketiga kecambah yang tumbuh semakin bertambah panjang dan besar dengan ukuran 2-2,5 cm. Kacang merah ini dikecambahkan pada suhu ruang dan disemprot dengan akuades setiap 12 jam dengan tujuan untuk menjaga kelembaban. Proses perkecambahan dapat mengurangi senyawa antigizi yang ada dalam kacang merah seperti tanin, asam fitat, polifenol, dan tripsin inhibitor (Onyango dkk., 2013). Perkecambahan menyebabkan protein cadangan dari biji kacang merah terdegradasi dan menghasilkan protein yang lebih pendek untuk pertumbuhan tanaman baru. Proses degradasi ini dimulai ketika terjadi kontak antara protease endogen dalam biji kacang merah dengan air selama proses imbibisi yang dilakukan dengan merendam biji kacang merah menggunakan air hangat (50°C) dan didiamkan pada suhu kamar selama waktu yang ditentukan. Pembentukan protein dengan rantai polipeptida yang lebih pendek selama perkecambahan kacang merah akan memberikan keuntungan pada proses hidrolisis protein kecambah kacang merah secara enzimatik. Ukuran molekul substrat protein yang lebih kecil akan meningkatkan efisiensi

kontak antara substrat protein dengan sisi aktif enzim protease yang digunakan selama proses hidrolisis. Selain itu, ketika protein dengan rantai peptida yang lebih pendek dihidrolisis dengan enzim papain, maka akan menghasilkan protein dengan rantai peptida yang lebih pendek lagi dibandingkan dengan substrat protein kacang merah yang tidak dikecambahkan (Khairi dan Kantero, 2014).

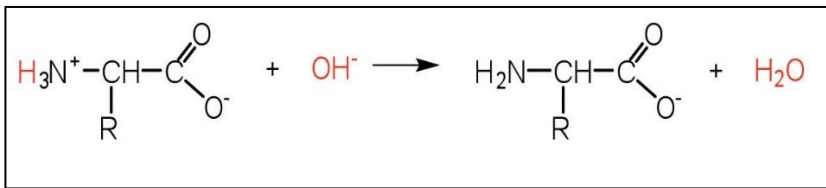
2. Pembuatan Tepung Kecambah Kacang Merah

Tepung kecambah kacang merah yang dihasilkan diukur kadar airnya. Berdasarkan hasil penelitian dan perhitungan nilai kadar air tepung kecambah kacang merah diperoleh sebesar 2,08%. Standar Nasional Indonesia (SNI) menyatakan persyaratan maksimal kadar air dari tepung kacang-kacangan adalah sebesar 10%, sehingga nilai kadar air tepung kecambah kacang merah yang diperoleh kurang dari 10% dan dinyatakan sesuai dengan baku mutu SNI. Kandungan air dari tepung sangat penting untuk diketahui karena dapat menentukan daya tahan produk. Kadar air yang lebih tinggi dari 10% dapat menjadi media bagi pertumbuhan jamur, bakteri, dan serangga sehingga dapat merusak tepung kecambah kacang merah selama penyimpanan (Budianto, 2009).

3. Isolasi Protein Kecambah Kacang Merah

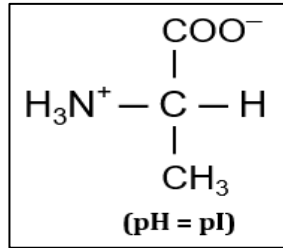
Proses isolasi protein kecambah kacang merah, yakni pada tahap ekstraksi alkali, dilakukan pengaturan pH menjadi basa (pH 10) terhadap tepung kecambah kacang merah dengan adanya penambahan NaOH 0,01% yang bertujuan untuk mengatur pH larutan agar menjadi pH basa (pH=10). Pada suasana basa, protein protein akan bermuatan negatif seperti yang terlihat pada Gambar 2. Hal ini menyebabkan adanya reaksi tolak-menolak antar molekul protein yang bermuatan sejenis

(negatif) pada gugus COO^- , sehingga interaksi antar molekul protein menjadi rendah dan kelarutan protein meningkat. Hasil ekstraksi ini kemudian disentrifugasi dengan tujuan memisahkan supernatan dengan endapannya, dimana supernatan yang dihasilkan mengandung protein yang terlarut.



Gambar 2. Protein dalam Larutan Bersuasana Basa (Pratiwi dkk., 2018)

Proses isolasi protein selanjutnya yakni presipitasi isoelektrik, yang mana supernatan yang diperoleh ditambahkan HCl 2 N sehingga pH larutan berada pada pH isoelektrik yakni 4,5. Protein pada pH isoelektriknya akan terjadi reaksi kesetimbangan antara gugus bermuatan negatif (COO^-) dengan gugus bermuatan positif (NH_3^+), seperti yang terlihat pada Gambar 3. Hal ini menyebabkan muatan total dari asam-asam amino dalam protein kecambah kacang merah tersebut sama dengan nol, sehingga protein mempunyai tingkat kelarutan yang paling rendah dan protein akan mengendap tetapi tidak terdenaturasi. Pengendapan ini ditunjukkan dengan adanya perubahan warna dari filtrat yang dihasilkan yakni dari kuning bening menjadi putih susu. Setelah proses presipitasi isoelektrik, dilakukan pencucian endapan hasil sentrifugasi dengan akuades untuk melarutkan pengotor yang tersisa dan disentrifugasi kembali untuk memisahkan endapan yang mengandung protein dengan supernatan yang mengandung pengotor.



Gambar 3. Struktur Protein pada Titik Isoelektrik (Naga dkk., 2010)

Endapan hasil sentrifugasi terakhir merupakan protein-protein yang telah terekstrak dari kecambah kacang merah. Sebanyak 224,32 g tepung kecambah kacang merah menghasilkan hasil isolasi protein sebesar 50,36 g, sehingga diperoleh rendemennya sebesar 22,45%. Rendemen yang diperoleh memiliki nilai lebih tinggi jika dibandingkan dengan hasil penelitian (Pratiwi dkk., 2016) yang menggunakan kacang merah yang tidak dikecambahkan dan menghasilkan rendemen sebesar 17,29%. Hasil isolasi protein ini diukur kadar protein totalnya dengan metode Kjeldahl. Pada metode Kjeldahl, yang ditentukan adalah nilai total nitrogen dari isolat protein, kemudian dengan adanya faktor konversi maka nilai total nitrogen ini dapat diubah menjadi nilai kadar protein. Hasil pengukuran dengan metode Kjeldahl diperoleh nilai kadar nitrogen total (% N) sebesar 11,86%. Berdasarkan perhitungan, diperoleh kadar protein total dari hasil isolasi protein kecambah kacang merah tersebut adalah sebesar 74,18%. Nilai kadar protein total yang diperoleh lebih dari 70% sehingga disebut sebagai konsentrat protein (Preeti dkk., 2008).

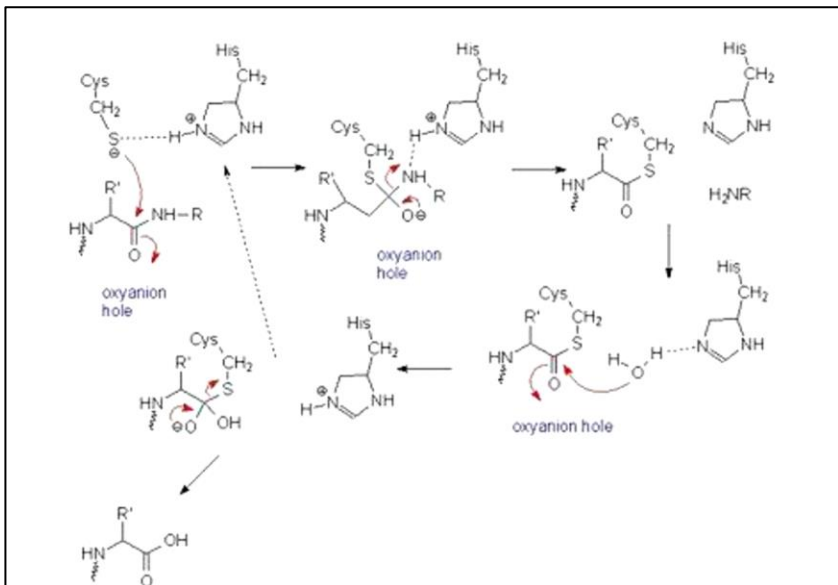
4. Hidrolisis Protein Kecambah Kacang Merah

Hidrolisis protein kecambah kacang merah pada penelitian ini dilakukan secara enzimatik dengan menggunakan enzim protease yakni enzim papain. Enzim papain merupakan enzim protease yang dapat menguraikan protein menjadi unsur-unsur yang lebih sederhana yaitu peptida dengan rantai lebih pendek hingga asam-asam amino. Oleh karena itu, adanya penambahan enzim papain dalam proses hidrolisis protein bertujuan untuk membantu mengkatalis reaksi hidrolisis tersebut. Hidrolisis protein secara enzimatik dengan menggunakan enzim protease memiliki beberapa keuntungan yakni kemampuan enzim dalam menghidrolisis protein lebih mudah diatur, tidak merusak struktur asam amino dalam protein, dan enzim bekerja secara spesifik sehingga kerusakan produk hidrolisis dapat dicegah.

Hidrolisis protein kecambah kacang merah pada penelitian ini dilakukan pada kondisi optimal enzim papain yakni pada suhu 50°C dan pH 7 dan dengan variasi rasio enzim-substrat (E/S) yakni 3, 4, 5, 6, dan 7%. Setelah proses hidrolisis selesai, maka dilakukan inaktivasi enzim dengan pemanasan pada suhu 100°C sehingga enzim mengalami kerusakan pada konformasi gugus aktif enzim (terdenaturasi). Hal ini menyebabkan enzim mengalami hambatan dalam berinteraksi dengan substrat dan aktivitas katalitik enzim akan berhenti. Setelah diinaktivasi, maka dilakukan sentrifugasi dan diambil supernatannya dengan tujuan untuk memperoleh hidrolisat protein yang jernih.

Reaksi yang terjadi selama proses hidrolisis berlangsung yakni sisi aktif katalitik papain yaitu gugus sistin dan histidin akan memutus rantai peptida substrat protein menjadi produk. Selama proses tersebut, terjadi perubahan struktural diantara enzim dan substrat yang mana gugus sistin yang sangat reaktif akan berikatan dengan substrat membentuk ikatan kovalen

enzim-substrat (ES) yang berbentuk tetrahedral. Sementara itu, gugus histidin terprotonasi dan berikatan dengan nitrogen pada substrat sehingga mengakibatkan gugus amina pada substrat akan terdifusi dan posisinya digantikan oleh molekul air yang akhirnya menghidrolis produk intermediet dan enzim kembali ke fungsi dan bentuknya semula (Beveridge, 1996). Mekanisme reaksi yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 4.

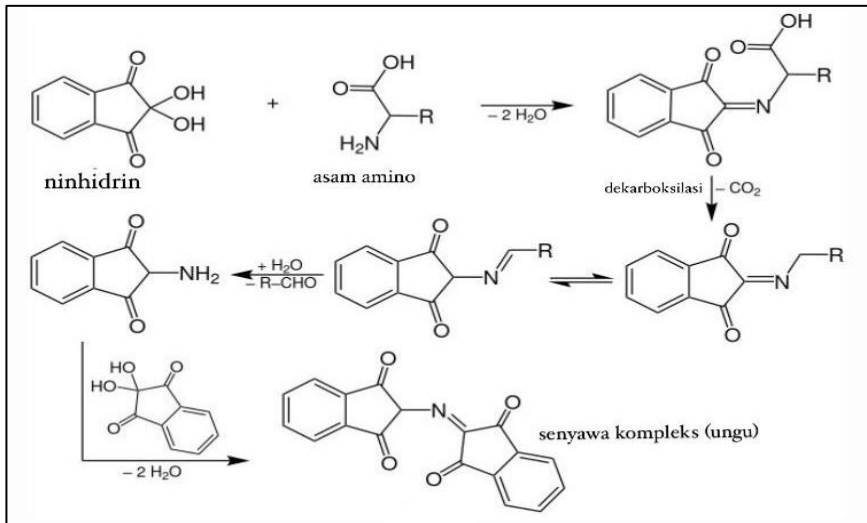


Gambar 4. Mekanisme Hidrolisis Ikatan Peptida dengan Enzim Papain (Beveridge, 1996)

5. Pengaruh Variasi Rasio E/S 3, 4, 5, 6, dan 7% terhadap Kadar α -Amino Bebas Hidrolisat Protein Kecambah Kacang Merah

Penentuan kadar α -amino bebas hidrolisat protein kecambah kacang merah dilakukan dengan metode spektrofotometri menggunakan reagen ninhidrin. Ninhidrin akan bereaksi dengan asam amino membentuk *schiff base*

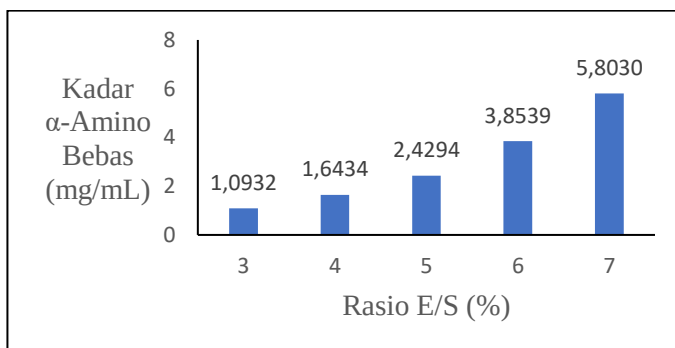
(senyawa dengan struktur umum $R_1R_2C=NR$). Setelah itu, senyawa ini akan mengalami dekarboksilasi dengan melepaskan CO_2 dan membentuk imino (gugus fungsi yang mengandung ikatan rangkap karbon-nitrogen). Imino kemudian bereaksi dengan H_2O dan membentuk aldehyd serta diketohidridamina (senyawa intermediet). Senyawa ini kemudian bereaksi kembali dengan ninhidrin dan membentuk senyawa kompleks yang berwarna ungu (Yazid dkk., 2006). Reaksi yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 5. Kompleks berwarna ungu tersebut terserap pada panjang gelombang 570 nm jika diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis.



Gambar 5. Reaksi pada Uji Ninhidrin (Yazid dkk., 2006)

Pada penelitian ini digunakan standar asam amino (leusin) dengan konsentrasi 0; 0,1; 0,2; 0,3; dan 0,4 mg/mL yang telah diuji absorbansinya dan dihasilkan absorbansi masing-masing larutan tersebut sebesar 0,0586; 0,2394; 0,3723; 0,5342; dan 0,6272. Setelah itu, diperoleh persamaan regresi linier standar asam amino (leusin) yakni $y = 1,4320x + 0,0799$ dengan

nilai $R^2 = 0,9903$. Pengukuran kadar α -amino bebas dilakukan terhadap hidrolisat protein kecambah kacang merah dengan variasi rasio E/S yakni 3, 4, 5, 6, dan 7%, dengan menggunakan metode spektrofotometri dengan reagen ninhidrin. Hasil yang diperoleh yakni absorbansi masing-masing sampel hidrolisat protein kecambah kacang merah sebesar 0,3409; 0,4161; 0,5769; 0,6931; dan 0,7724. Berdasarkan data absorbansi sampel tersebut, dilakukan perhitungan menggunakan persamaan regresi linier standar leusin ($y = 1,4320x + 0,0799$) sehingga diperoleh nilai kadar α -amino bebas (x) dari masing-masing hidrolisat protein, seperti yang terlihat pada Gambar 6.



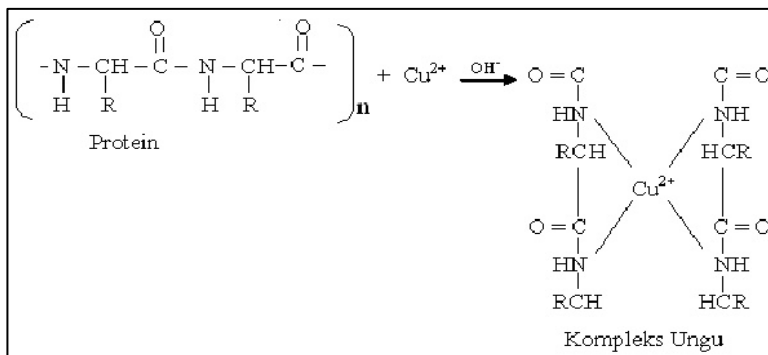
Gambar 6. Kadar α -Amino Bebas Hidrolisat Protein Kecambah Kacang Merah

Nilai α -amino bebas merupakan parameter yang menunjukkan jumlah gugus amina ($-NH_2$) bebas yang dihasilkan akibat proses hidrolisis suatu protein. Data yang diperoleh menunjukkan variasi rasio E/S berpengaruh terhadap nilai α -amino bebas dari hidrolisat protein kecambah kacang merah. Semakin meningkat rasio E/S yang digunakan yakni dari 3% hingga 7%, maka semakin meningkat pula nilai kadar α -amino bebas yang diperoleh. Pada penelitian ini, nilai kadar α -amino bebas tertinggi diperoleh pada rasio E/S 7% dengan nilai

sebesar 5,8030 mg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa hasil penelitian yang diperoleh sesuai dengan pernyataan (Restiani, 2016), yakni selama proses hidrolisis berlangsung, molekul protein yang dikatalisis oleh enzim papain mengalami pemutusan ikatan peptida. Semakin meningkat rasio E/S yang digunakan menyebabkan semakin bertambahnya tumbukan antara molekul substrat (protein kecambah kacang merah) dengan enzim papain, sehingga masuknya molekul substrat ke dalam sisi aktif enzim papain akan lebih sering terjadi dan pemutusan ikatan peptida dari protein kecambah kacang merah juga semakin meningkat. Oleh karena itu, nilai kadar α -amino bebas yang dihasilkan semakin meningkat karena asam-asam amino bebas yang dilepaskan semakin banyak.

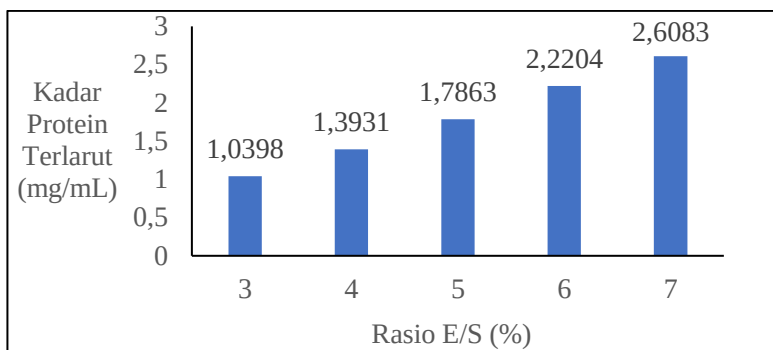
6. Pengaruh Variasi Rasio E/S 3, 4, 5, 6, dan 7% terhadap Kadar Protein Terlarut Hidrolisat Protein Kecambah Kacang Merah

Penentuan kadar protein terlarut dari hidrolisat protein kecambah kacang merah dilakukan dengan metode spektrofotometri menggunakan reagen biuret. Ion tembaga (Cu^{2+}) dalam CuSO_4 yang digunakan dalam suasana basa akan membentuk senyawa kompleks dengan ikatan peptida pada protein yang menghasilkan warna ungu (Jubaidah dkk., 2016), seperti yang terlihat pada Gambar 7. Warna ungu ini akan terserap pada 540 nm jika diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Semakin banyak ikatan peptida yang bereaksi dengan ion tembaga, maka warna ungu yang dihasilkan akan semakin pekat.



Gambar 7. Reaksi pada Uji Biuret (Baehakki dkk., 2015)

Pada penelitian ini digunakan standar protein (kasein) dengan konsentrasi 0, 1, 2, 3, dan 4 mg/mL yang telah diuji absorbansinya dan dihasilkan absorbansi masing-masing larutan tersebut sebesar 0,0511; 0,2657; 0,4213; 0,6751; dan 0,7987. Setelah itu, diperoleh persamaan regresi linier standar protein (kasein) yakni $y = 0,1905x + 0,0615$ dengan nilai $R^2 = 0,9914$. Pengukuran kadar protein terlarut dilakukan terhadap hidrolisat protein kecambah kacang merah dengan variasi rasio E/S yakni 3, 4, 5, 6, dan 7%, dengan menggunakan metode spektrofotometri dengan reagen biuret. Hasil yang diperoleh yakni absorbansi masing-masing sampel hidrolisat protein kecambah kacang merah sebesar 0,2596; 0,3269; 0,4018; 0,4845; dan 0,5584. Berdasarkan data absorbansi sampel tersebut, dilakukan perhitungan menggunakan persamaan regresi linier standar kasein ($y = 0,1905x + 0,0615$) sehingga diperoleh nilai kadar α -amino bebas (x) dari masing-masing hidrolisat protein, seperti yang terlihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Kadar Protein Terlarut Hidrolisat Protein Kecambah Kacang Merah

Nilai kadar protein terlarut yang diperoleh menunjukkan jumlah protein yang terurai dan mengalami konversi dari protein yang bersifat tidak larut menjadi peptida-peptida rantai pendek yang lebih larut sebagai hasil hidrolisis. Peptida-peptida pendek yang dihasilkan memiliki berat molekul yang lebih rendah sehingga lebih mudah terlarut. Berat molekul dapat memengaruhi kelarutan karena semakin kecil berat molekul suatu senyawa, maka luas permukaan semakin meningkat dan memungkinkan interaksi antara peptida-peptida pendek sebagai zat terlarut dengan suatu pelarut menjadi lebih besar. Data yang diperoleh menunjukkan variasi rasio E/S berpengaruh terhadap kadar protein terlarut dari hidrolisat protein kecambah kacang merah. Semakin meningkat rasio E/S yang digunakan yakni dari 3% hingga 7%, maka semakin meningkat pula nilai kadar protein terlarut yang diperoleh. Hal ini dikarenakan selama proses hidrolisis berlangsung, seiring dengan meningkatnya rasio E/S yang digunakan, maka tumbukan antara molekul substrat (protein kecambah kacang merah) dengan enzim papain, sehingga masuknya molekul substrat ke dalam sisi aktif enzim papain akan lebih sering terjadi dan pemutusan ikatan peptida juga semakin meningkat.

Hal ini menyebabkan semakin banyak protein yang terurai menjadi peptida-peptida rantai pendek yang lebih larut. Oleh karena itu, pada penelitian ini diperoleh hasil kadar protein terlarut hidrolisat protein kecambah kacang merah yang semakin meningkat dan nilai tertinggi diperoleh pada rasio E/S 7% dengan nilai sebesar 2,6083 mg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa hasil penelitian yang diperoleh sesuai dengan pernyataan (Wardi dkk., 2019) yakni semakin meningkat rasio E/S yang digunakan, maka kadar protein terlarutnya juga semakin meningkat dan sebanding dengan nilai kadar α -amino bebas.

7. Hasil Uji Organoleptik Hidrolisat Protein Kecambah Kacang Merah

Hidrolisat protein mengandung komponen peptida-peptida rantai pendek maupun asam-asam amino bebas. Hidrolisat protein ini diketahui dapat memberikan rasa yang berbeda-beda tergantung dari jenis asam-asam amino bebas yang dihasilkan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Wiwata (2019) yang menyatakan bahwa hidrolisat protein dapat mengandung peptida-peptida pendek maupun asam-asam amino bebas yang berpotensi sebagai penyedap rasa yang aman. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan uji organoleptik untuk mengetahui seberapa besar potensi dari hidrolisat protein kecambah kacang merah dengan berbagai variasi rasio E/S sebagai penyedap rasa. Uji ini dilakukan oleh 5 orang panelis dengan mencicipi langsung masing-masing sampel dan memberikan nilai serta pendapat mereka pada sebuah lembar penilaian dan hasil yang diperoleh ditampilkan dalam Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Perhitungan Skor Uji Organoleptik (Penilaian Rasa Gurih) dari Hidrolisat Protein Kecambah Kacang Merah dengan Variasi Rasio E/S

Rasa	Kode Sampel					
	Sko r	HP3	HP4	HP 5	HP6	HP 7
Gurih	5	0	2	2	3	5
Agak gurih	4	3	2	3	2	0
Netral	3	2	1	0	0	0
Agak tidak gurih	2	0	0	0	0	0
Tidak gurih	1	0	0	0	0	0
Total skor		18	21	22	23	25

Keterangan:

HP3 = hidrolisat protein dengan rasio E/S 3%

HP4 = hidrolisat protein dengan rasio E/S 4%

HP5 = hidrolisat protein dengan rasio E/S 5%

HP6 = hidrolisat protein dengan rasio E/S 6%

HP7 = hidrolisat protein dengan rasio E/S 7%

Data pada Tabel 5. menunjukkan penilaian terhadap hasil uji hidrolisat protein kecambah kacang merah dengan kecenderungan rasa gurih. Hasil yang diperoleh dari 5 variasi rasio E/S hidrolisat protein yang diuji, rasa gurih dengan skor tertinggi diperoleh pada sampel HP7 (rasio E/S 7%). Berdasarkan data tersebut, maka diketahui bahwa hidrolisat protein dengan rasio E/S 7% memiliki potensi paling tinggi

dalam menghasilkan rasa gurih, sehingga paling berpotensi untuk dijadikan produk penyedap rasa. Rasa gurih yang dihasilkan kemungkinan berasal dari peptida-peptida rantai pendek maupun asam-asam amino bebas yang dihasilkan dari hidrolisis protein kecambah kacang merah. Hal ini sesuai dengan hasil kadar α -amino bebas dan kadar protein terlarut yang diperoleh, yang artinya hidrolisat dengan rasio E/S 7% menghasilkan paling banyak protein terlarut, peptida-peptida rantai pendek, maupun asam-asam amino bebas, sehingga dapat memberikan rasa gurih yang paling kuat diantara hidrolisat protein kecambah kacang merah dengan rasio E/S yang lainnya. Hasil penelitian Haefeli dan Glaser (1990) menunjukkan bahwa jenis asam amino yang dapat memberikan rasa gurih yakni glutamin dan leusin, sehingga kemungkinan 2 jenis asam amino bebas ini yang banyak terdapat di dalam hidrolisat protein kecambah kacang merah pada rasio E/S 7% sehingga dapat dirasakan rasa gurih. Glutamin merupakan asam amino dengan rantai samping amida ($-(CH_2)_2CONH_2$) dan leusin merupakan asam amino dengan rantai samping hidrokarbon alifatik ($-CH_2CH(CH_3)CH_3$). Selain rasa gurih, panelis juga memberikan penilaian terhadap hidrolisat protein kecambah kacang merah dengan kecenderungan rasa lainnya seperti yang terlihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Perhitungan Skor Uji Organoleptik (Penilaian Rasa Selain Gurih) dari Hidrolisat Protein Kecambah Kacang Merah dengan Variasi Rasio E/S

Kode Sampel	Rasa	Jumlah Skor
HP3	Agak Manis	4
HP4	Agak Manis	3
HP5	Agak Manis	2
HP6	Agak Manis	2
HP7	Agak Manis	2

Keterangan:

HP3 = hidrolisat protein dengan rasio E/S 3%

HP4 = hidrolisat protein dengan rasio E/S 4%

HP5 = hidrolisat protein dengan rasio E/S 5%

HP6 = hidrolisat protein dengan rasio E/S 6%

HP7 = hidrolisat protein dengan rasio E/S 7%

Data pada Tabel 6. menunjukkan bahwa terdapat rasa selain gurih dari hidrolisat protein yang dihasilkan berdasarkan hasil uji organoleptik, yaitu rasa agak manis. Hidrolisat protein dengan kode sampel HP3 (rasio E/S 3%) mendapatkan skor tertinggi dengan kecenderungan rasa agak manis. Rasa agak manis yang dihasilkan kemungkinan juga berasal dari peptida-peptida rantai pendek maupun asam-asam amino bebas yang dihasilkan dari hidrolisis protein kecambah kacang merah. Hasil penelitian Haefeli dan Glaser (1990) menunjukkan bahwa jenis asam amino yang dapat memberikan rasa manis yakni serin (dengan rantai samping gugus hidroksi / $-\text{CH}_2\text{-OH}$), threonin (dengan rantai samping gugus hidroksi / $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$), valin (dengan rantai samping gugus hidrokarbon alifatik / $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$), isoleusin (dengan rantai samping gugus hidrokarbon alifatik / $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_5$), metionin (dengan rantai samping gugus sulfur / $-(\text{CH}_2)_2\text{SCH}_3$), dan asparagin (dengan rantai samping gugus amida / $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$). Asam-asam amino bebas tersebut yang kemungkinan banyak terdapat di dalam hidrolisat protein kecambah kacang merah pada rasio E/S 3% sehingga dapat dirasakan rasa agak manis. Hidrolisat protein dengan rasio E/S yang lainnya juga diketahui menghasilkan rasa baik gurih maupun agak manis. Pada

penelitian ini, uji organoleptik dilakukan untuk mengetahui hidrolisat protein dengan rasio E/S mana yang memiliki potensi paling tinggi sebagai penyedap rasa. Oleh karena itu, berdasarkan data yang diperoleh, maka hasil yang diperoleh yakni hidrolisat protein dengan rasio E/S 7% memiliki potensi tertinggi dalam menghasilkan rasa gurih dan hidrolisat protein dengan rasio E/S 3% memiliki potensi tertinggi dalam menghasilkan rasa agak manis.

8. Perbandingan penyedap rasa alami Kacang Merah dengan penyedap rasa sintetis

Pada hasil uji organoleptik hidrolisat protein kecambah kacang merah yakni diketahui bahwa hidrolisat protein dengan rasio E/S 7% memiliki potensi paling tinggi dalam menghasilkan rasa gurih, sehingga paling berpotensi untuk dijadikan produk penyedap rasa. Rasa gurih ini dipicu dengan adanya kandungan asam amino leusin yang tinggi. Menurut (Muchtadi, 1988) kadar asam amino leusin yang terdapat pada kacang merah yakni sebesar 72,2 mg/g protein yang lebih tinggi dibanding asam amino lainnya. Keuntungan memakai penyedap rasa alami yakni aman dikonsumsi dan lebih sehat serta rendah akan natrium dibandingkan dengan penyedap rasa sintetis yang tinggi akan natrium. Komposisi mineral per 100 gram dalam kacang merah adalah fosfor (410 mg), kalsium (260 mg), mangan (194 mg), besi (5,8 mg), tembaga (0,95 mg), serta natrium (15 mg). Untuk kandungan penyedap rasa buatan yang banyak beredar di pasaran yakni mengandung sebagian besar merupakan produk hasil sintesis yang terbuat dari asam amino L atau garamnya dan 5-nukleotida (5-IMP dan 5-GMP) (Perdani *et al.*, 2022). Garam asam amino L yang banyak digunakan sebagai bahan baku penyedap rasa makanan adalah monosodium glutamate

(MSG) (Salem *et al.*, 2022). MSG merupakan garam natrium dari asam glutamat yang dapat terurai menjadi natrium dan glutamat saat terkena air ludah, yang juga merupakan sumber natrium tinggi. MSG mengandung glutamat 78,2%, natrium 12,2% dan air 9,6%. Konsumsi penyedap rasa sintetis khususnya MSG yang berlebihan dapat menyebabkan pembentukan radikal bebas dalam tubuh dan menyebabkan ketidakseimbangan kadar hormon estrogen dan progesterone yang berperan dalam siklus reproduksi (Mandang *et al.*, 2022). MSG memberikan efek buruk terhadap hati dan jantung dengan mengubah lipid serum profil, peningkatan kadar enzim penanda hepato-jantung dan sitokin pro-inflamasi, serta menyebabkan stres oksidatif melalui mengganggu status redoks untuk mengurangi kelangsungan hidup sel dan kerusakan jaringan tergantung dosis yang diberikan (Burhanuddin & Riyanto, 2022)

9. Evaluasi

1. Apa tujuan dari perkecambahan dari pembuatan kecambah kacang merah?
2. Apa keuntungan dari pembentukan rantai polipeptida pendek pada proses perkecambahan kacang merah?
3. Mengapa baku mutu SNI menyatakan syarat kadar air pada tepung kacang-kacangan harus dibawah 10%?
4. Mengapa pada proses presipitasi isoelektrik dapat terjadi reaksi kesetimbangan antara gugus bermuatan negatif (COO^-) dengan gugus bermuatan positif (NH_3^+)?
5. Apa keuntungan penggunaan enzim protease pada proses hidrolisis protein? Apakah enzim protease dapat digantikan dengan enzim lainnya?
6. Reaksi apa yang terjadi pada saat proses hidrolisis kecambah berlangsung?
7. Warna apa yang terbentuk pada saat reaksi uji ninhidrin?
8. Asam amino apakah yang menyebabkan rasa gurih pada hidrolisat protein saat uji organoleptik?
9. Apa keuntungan memasak menggunakan penyedap rasa alami dibanding dengan penyedap rasa buatan?
10. Apa saja dampak yang ditimbulkan akibat mengkonsumsi MSG secara berlebihan?

BAB IV

PENUTUP

1. Simpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, beberapa simpulan yang dapat ditarik yakni:

- 1.) Semakin meningkat rasio E/S yang digunakan maka semakin meningkat pula nilai kadar α -amino bebas dari hidrolisat protein kecambah kacang merah yang dihasilkan dan dari rasio E/S 3, 4, 5, 6, dan 7% yang digunakan, diperoleh kadar α -amino bebas tertinggi pada rasio E/S 7% yakni sebesar 5,8030 mg/mL.
- 2.) Semakin meningkat rasio E/S yang digunakan maka semakin meningkat pula nilai kadar protein terlarut dari hidrolisat protein kecambah kacang merah yang dihasilkan dan dari rasio E/S 3, 4, 5, 6, dan 7% yang digunakan, diperoleh kadar protein terlarut tertinggi pada rasio E/S 7% yakni sebesar 2,6083 mg/mL.
- 3.) Hidrolisat protein dengan rasio E/S 7% memiliki potensi tertinggi dalam menghasilkan rasa gurih dan hidrolisat protein dengan rasio E/S 3% memiliki potensi tertinggi dalam menghasilkan rasa agak manis.

2. Saran

Saran yang dapat diberikan untuk penelitian lebih lanjut berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, antara lain:

- 1.) Perlu dilakukan analisis komposisi asam amino dari hidrolisat protein kecambah kacang merah untuk

mengetahui secara pasti jenis asam amino yang menghasilkan rasa pada saat uji organoleptik.

- 2.) Perlu dilakukan optimasi yakni dengan menambahkan variasi rasio E/S saat proses hidrolisis protein untuk mengetahui ada atau tidaknya peningkatan maupun penurunan dari nilai kadar α -amino bebas dan kadar protein terlarut, sehingga dapat diketahui secara pasti pengaruh variasi rasio E/S terhadap 2 parameter tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Adler-Nissen. 1986. *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. Elsevier Applied Science Publisher. New York
- Aluko, R. E and Monu, E. 2003. Functional and Bioactive of Quinoa Seed Protein Hydrolysate. *Journal of Food Sciences*. 68(5): 1254-125
- Anggraini, A. dan Yunianta. 2015. Pengaruh Suhu dan Lama Hidrolisis Enzim Papain terhadap Sifat Kimia, Fisik, dan Organoleptik Sari *Edamame*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3(3): 1015-1025
- AOAC. 1995. *Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemist*. AOAC. Washington DC
- Arief, M., Manan, A., dan Pradana, C.A. 2016. Penambahan Papain pada Pakan Komersial Terhadap Laju Pertumbuhan, Rasio Konversi Pakan, dan Kelulushidupan Ikan Sidat (*Anguilla bicolor*) *Stadia Elver*. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 8(2): 67-76
- Astawan, M. 2009. *Sehat dengan Hidangan Kacang dan Biji-Bijian*. Penebar Swadaya. Jakarta
- Baehaki, A., Lestari D.S., dan Romadhoni, A.R. 2015. Hidrolisis Protein Ikan Patin Menggunakan Enzim Papain dan Aktivitas Antioksidan Hidrolisatnya. *Jurnal PHPI*. 18(3): 230-240

- Bau, H.M., Vilaume, C., and Mejean, L. 2000. Effects of Soybean (Glycine max) Germination on Biologically Active Components, Nutritional Values of Seeds and Biological Characteristics. *Nahrung Food Journal*. 22(3): 2-6
- Benincasa, P., Falcinelli, B., Lutts, S., and Stagnari, F. 2019. Sprouted Grains. *Journal Nutrients*. 2-29
- Bernadeta, Ardiningsih, J., dan Silalahi, I.H. 2012. Penentuan Kondisi Optimum Hidrolisat Protein dari Limbah Ikan Ekor Kuning (*Caesio Cuning*) Berdasarkan Karakteristik Organoleptik. *Jurnal KK*. 1(1): 26-30
- Betty, D. S., & Tjutju, S. A. 2008. Bahan Ajar Penilaian Indera. Sumedang: Jurusan Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Industri Pertanian. Universitas Padjadjaran
- Beveridge, A.J. 1996. A Theoretical Study of The Active Sites of Papain and S195c Rat-Trypsin: Implication for The Low Reactivity of Mutant Serine Proteinases. *Journal Protein Sciences*. 5(1): 1355-1365
- Biben, H. A. 2012. Fitoestrogen: Khasiat Terhadap Sistem Reproduksi, Non Reproduksi dan Keamanan Penggunaannya. *Universitas Padjajaran*, 1-7. Retrieved from
- <http://biofarmaka.ipb.ac.id/phocadownloadpap/userupload/Info/2012/20120402 - Material from Prof. A Biben.pdf>
- Binoto, N.L., Rolan, S., dan Ikhsan, D. 2015. Hidrolisis Ampas Tebu secara Enzimatis Menggunakan *Trichoderma reesei*. *Jurnal Teknik Kimia*. 1(1):23-28

- Bougatef, A., Balti, R., Haddar, A., Jellouli, K., Souissi, N., Nasri, M. 2012. Antioxidant and Functional Properties of Protein Hydrolysates of Bluefin Tuna (*Thunnus Thynnus*) Head as Influenced by The Extent of Enzymatic Hydrolysis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering Journal*. 17(1): 841-852
- Budianto, A.K. 2009. *Dasar-Dasar Ilmu Gizi*. Edisi ke-2. Universitas Muhammadiyah Malang Pers. Malang
- Burhanuddin, B., & Riyanto, S. 2022. Perilaku Konsumen Muslim Indonesia Terhadap Perkembangan Produk Makanan dan Minuman Halal. *Jurnal Pendidikan Dan Kewirausahaan*. 10(2): 645-654
- Djamil, R., & Anelia, T. 2009. Penapisan Fitokimia Uji BSLT dan Uji Antioksidan Ekstrak Metanol beberapa Spesies Papilionaceae. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 7(2): 65-71.
- Dewi, S.P., Ekawati, A., dan Pratiwi, K. 2018. Pengaruh Lama Perkecambahan *Millet* (*Panicum Milliaceum*) terhadap Karakteristik *Flakes*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*. 7(4): 175-183
- Elygio, Y.D., Legowo A.M., dan Baari, A. 2016. Karakteristik *Curd* Berbahan Dasar Ekstrak Kacang Hijau (*Vigna Radiata*) dengan *Whey* Tahu Kedelai (*Glycine Max*) sebagai Bahan Penggumpal. *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*. 9(2): 33-39
- Eritha, T. 2006. Aplikasi Teknik Analisa *Focused Improvment* Dalam Usaha Mencapai *Zero Defect* Produk Bumbu Penyedap Rasa Di PT Unilever Indonesia. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor

- Febriani, C., Suparthana, P., dan Wiadnyani, A.A.I. 2019. Pengaruh Lama Fermentasi Kacang Merah (*Cajanus Cajan L.*) terhadap Karakteristik “Sere Undis”. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*. 8(2): 181-188
- Ferdiawan, N., Nurwantoro, dan Dwiloka, B. 2019. Pengaruh Lama Waktu Germinasi terhadap Sifat Fisik dan Sifat Kimia Tepung Kacang Tolo (*Vigna unguiculata L.*). *Jurnal Teknologi Pangan*. 3(2): 349-354
- Gandjar, I.G. dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis Edisi ke-1*. Pustaka Pelajar. Yogyakarta
- Hart, H. 1990. *Kimia Organik Suatu Bahan Kuliah Singkat*. Edisi ke-1. Erlangga. Jakarta
- Harmita. 2006. *Analisis Kuantitatif Bahan Baku dan Sediaan Farmasi Edisi ke-1*. Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia. Jakarta
- Harjadi, S.S. 1979. *Pengantar Agronomi*. Edisi ke-2. Gramedia. Jakarta
- Jayalangkara, 2017. .Kualitas Organoleptik Tablet Telur Pada Suhu Ruang Dengan Lama Penyimpanan Yang Berbeda. *Skripsi*. Fakultas Peternakan. Universitas Hasanuddin Makassar. Makassar
- Jayanti, E.T. 2019. Kandungan Protein Biji dan Tempe Berbahan Dasar Kacang-Kacangan Lokal (*Fabaceae*) Non-Kedelai. *Jurnal Ilmiah Biologi*. 7(1): 70-78
- Jinap S, Hajeb P. 2010. Glutamate. Its applications in food and contribution to health. *Appetite*. 55: 1-10

- Jubaidah, S., Nurhasnawati, H., dan Wijaya, H. 2016. Penetapan Kadar Protein Tempe Jagung (*Zea Mays L.*) dengan Kombinasi Kedelai (*Glycine Max (L.) Merrill*) secara Spektrofotometri Sinar Tampak. *Jurnal Ilmiah Manutung*. 2(1): 111-119
- Kemkes Indonesia. 2019. Hipertensi Penyakit Paling Banyak Diidap Masyarakat. <https://www.kemkes.go.id/article/view/19051700002/hipertensi-penyakit-paling-banyak-diidap-masyarakat.html>. Diakses pada 04 Maret 2021
- Khairi, E. dan Kanetro, B. 2014. Pengaruh Berbagai Kecambah Kacang-Kacangan terhadap Kadar Protein Terlarut dan Asam Amino Bebas Limbah Cair Isolasi Protein. *Jurnal Agri Sains*. 5(2): 102-108
- Khayatun, N., Mursiti, S., dan Harjono. 2017. Optimasi Preparasi Prekursor Bioetanol Limbah Mahkota Nanas Menggunakan Enzim Selulase Jamur Tiram. *Indonesian Journal of Chemical Sciences*. 6(3): 230-236
- Kurniaty, I., Febriyanti, Y., dan Septian, R. 2018. Isolasi Protein Biji Kelor (*Moringa Oleifera*) Menggunakan Proses Hidrolisis. *Jurnal Sains dan Teknologi*. 4(1): 1-6
- Litbangkes RI. 2014. Pola Makan Tinggi Garam Picu Hipertensi. <https://www.pusat2.litbang.kemkes.go.id/2012/03/07/pola-makan-tinggi-garam-picu-hipertensi/>. Diakses pada 04 Maret 2021
- Machin, A. 2012. Potensi Hidrolisat Tempe sebagai Penyedap Rasa Melalui Pemanfaatan Ekstrak Buah Nanas. *Jurnal Biosantifika*. 4(2): 71-78

- Maintang, Hanifa, A., dan Agustin, R. 2014. Potensi Kacang Merah sebagai Komponen Diversifikasi Pangan. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 7(1): 917-925
- Mandang, M. S. S., Mentang, F., Dien, H. A., Palenewen, J. C., Montolalu, R. I., & Pandey, E. V. 2022. Mutu Mikrobiologis dan Organoleptik Penyedap Rasa Alami Hasil Sampling Ikan Cakalang selama Penyimpanan. *Media Teknologi Hasil Perikanan*, 10(3): 165–170
- Martianingsih, N., Sudrajat, H.W., dan Darlian, L. 2016. Analisis Kandungan Protein Kecambah Kacang Hijau (*Phaseolus Radiatus L.*) terhadap Variasi Waktu Perkecambahan. *Jurnal AMPIBI*. 1(2): 38-42
- Michael, Gibney. 2009. Gizi Kesehatan Masyarakat. EGC. Jakarta
- Muchtadi, D. 1988. *Karbohidrat Pangan dan Kesehatan*. Alfabeta. Bandung
- Murray, R.K., Daryl, K.G., and Victor, W.R. 1951. *Harper's Illustrated Biochemistry*. a.b. Brahm U. Pendit. EGC Buku Kedokteran. Jakarta
- Naga, W.S., Adiguna, B., Retnoningtyas, E.S., dan Ayucitra, A. 2010. Koagulasi Protein Dari Ekstrak Biji Kecapir Dengan Metode Pemanasan. *Jurnal Widya Teknik*. 9(1): 1-11
- Ninomiya K. 1998. Natural occurrence. *Food Review International*. 14: 177–212
- Oktasari, T., Suparmi, dan Karnila, R. 2015. Pembuatan Isolat Protein Ikan Gurami (*Ospbronemus Gouramy*) dengan Metode pH Berbeda. *Jurnal JOM*. 2(1): 1-12

- Onyango, C.A., Ochanda, S.O., Mwasaru, M.A., Ochieng, J.K., Mathoko, F.N., and Kinyuru, J.N. 2013. Effects of Malting and Fermentation on Anti-Nutrient Reduction and Protein Digestibility of Red Sorghum, White Sorghum, and Pearl Millet. *Journal of Food Research*. Vol 2(1):42-44
- Prasetyo, R. 2014. Analisis Morfo-Sistematis Nama-Nama Cemilan Tradisional Berkolerasi dengan Sifat dan Bagian Tubuh Daerah Istimewa Yogyakarta. *Skripsi*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta
- Perdani, C., Mawarni, R. R., Mahmudah, L., & Gunawan, S. 2022. Prinsip-Prinsip Bahan Tambahan Pangan Yang Memenuhi Syarat Halal: Alternatif Penyedap Rasa Untuk Industri Makanan Halal. *Halal Research Journal*, 2(2): 96–111
- Permanasari, A.R., Yulistiani, F., Tsaqila M.A., Alami, D., dan Wibowo, A. 2018. Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Enzim Terhadap Produk Gula Reduksi pada Pembuatan Gula Cair dari Tepung Sorgum Merah secara Hidrolisis Enzimatis. *Jurnal Prosiding Teknik Kimia*. 1(1): 1-7
- PKHT IPB. 2018. Kacang Merah (*Cajanus cajan* (L) Millsp.). <https://pkht.ipb.ac.id/index.php/2018/06/05/kacang-merah-cajanus-cajan-l-mill-sp/>. Diakses pada 30 April 2021
- Praira, W. 2008. Identifikasi Gelatin dalam Beberapa Bentuk Obat Sediaan Tablet Menggunakan Metode Spektrofotometri. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor

- Praja, D.I. 2015. *Zat Aditif Makanan*. Penerbit Garudawacha. Yogyakarta
- Pratiwi, H., Yusasrini, N.L.A., dan Putra, N.K. 2018. Pengaruh pH Ekstraksi dan Rasio E/S terhadap Rendemen, Sifat Fisiko-Kimia, dan Fungsional Konsentrat Protein Kacang Merah (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). *Jurnal ITEPA*. 7(1): 1-11
- Prayudi, A., Yuniarti, T., dan Taryoto, A.H. 2019. Potensi Hasil Samping Industri Perikanan sebagai Sumber Bahan Baku Produk Penyedap Rasa Alami. *Jurnal Perikanan*. 1(2): 25-42
- Preeti S., Kumar, R., S.N. Sabapathy, dan A.S. Bawa. 2008. Functional and Edible Uses of Soy Protein Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Journal*. 7(2): 14-28
- Probosari, E. 2019. Pengaruh Protein Diet terhadap Indeks Glikemik. *Jurnal of Nutrition and Health*. 7(1): 33-40
- Purnama, R.C., Retnaningsih, A., dan Aprianti, I. 2019. Perbandingan Kadar Protein Susu Cair UHT *Full Cream* pada Penyimpanan Suhu Kamar dan Suhu Lemari Pendingin dengan Variasi Lama Penyimpanan dengan Metode Kjeldahl. *Jurnal Analis Farmasi*. 4(1): 50-58
- Puspawati, N.M., Dewi P.P., Bogoriani, N.W., dan Ariati, N.K. 2020. Produksi Hidrolisat Protein Antioksidan Melalui Hidrolisis Enzimatik Protein Kulit Ayam Broiler dengan Enzim Papain. *Jurnal Kimia*. 14(2): 206-212

- Putra, E.A. 2019. Pengaruh Konsentrasi Enzim Papain terhadap Hidrolisat Protein Ikan Tembakul (*Periophthalmus minutus*). *Jurnal Kelautan dan Perikanan*. 1(1): 1-13
- Putri, S., Ridla, M., dan Jayanegara, A. 2015. Fraksinasi dan Utilisasi Protein Sejumlah Kacang- Kacangan Lokal Menggunakan Metode *In-Vitro*. *Jurnal PPM IPB*. 1(1): 1-14
- Rahayu, A.D. dan Suharsi, T.K. 2015. Pengamatan Uji Daya Berkecambah dan Optimalisasi Substrat Perkecambahan Benih Kecipir (*Psophocarpus tetragonolobus L. (DC)*). *Jurnal Bul. Agrohorti*. 3(1): 18-27
- Refai, Hermansyah, H., dan Bianggo, D. 2011. Uji Efektivitas Biolarvasida Ekstrak Daun Pepaya (*Carica Papaya L.*) terhadap Kematian Larva Instar Nyamuk *Aedes Aegypti*. *Jurnal Kesehatan*. 1(11): 91-99
- Restiani, R. 2016. Hidrolisis secara Enzimatis Protein Bungkil Biji Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) Menggunakan Bromelain. *Jurnal Biota*. 1(3): 103-110
- Rosaini, H., Rasyid, R., dan Hagida, V. 2015. Penetapan Kadar Protein secara Kjeldahl Beberapa Makanan Olahan Kerang Remis (*Corbiculla Moltkiana Prime.*) dari Danau Singkarak. *Jurnal Farmasi Higea*. 7(2): 120-127
- Salem, H. A., Elsherbiny, N., & Alzahrani, S. 2022. Neuroprotective Effect of Morin Hydrate against Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) Induced by MSG and/or Protein Malnutrition in Rat Pups: Effect on Oxidative/Monoamines/Inflammatory Balance and Apoptosis. *Pharmaceuticals*, 15(8): 1012

- Sari, D.M., Andarwulan, N., dan Fardiaz, D. 2019. Profil Komposisi BTP Campuran, Pelabelan, dan Penggunaannya pada Industri Rumah Tangga Pangan (IRTP) di DKI Jakarta. *Jurnal Mutu Pangan*. 6(1):38-45
- Sastrohamidjojo, H. 2007. *Spektroskopi Edisi Ke-3*. Penerbit Liberty. Yogyakarta
- Saxena, K.B., Kumar, R.V., and Gowda, C.L.L. 2010. Vegetable Pigeon Pea. *Journal of Food Legumes*. 23(2): 91-98
- Scopes, R.K. 2013. *Protein Purification: Principles and Practice*. 1st Edition. Cengage Learning. Pennsylvania.
- Suantika, R., Suryaningsih, L., dan Gumilar, J. 2017. Pengaruh Lama Perendaman dengan Menggunakan Sari Jahe terhadap Kualitas Fisik (Daya Ikat Air, Keempukan, dan pH) Daging Domba. *Jurnal Ilmu Ternak*. 17(2): 67-72
- Suhartono dan Artika, W. 2017. Isolasi dan Uji Aktivitas Protease dari Aktinobakteri Isolat Lokal (AKJ-09) Aceh. *Jurnal BIOLEUSER*. 1(3): 116-120
- Sulieman, M., Etlayeb, M.M., and Babiker, E. 2008. Effect of Sprouting on Chemical Composition and Amino Acid Content of Sudanese Lentil Cultivars. *Journal of Applied Sciences*. 8(12): 2337-2340
- Wahjuni, S. 2014. *Dasar-Dasar Biokimia*. Udayana University Press. Denpasar
- Wardi, E.S., Nofiandi, D., dan Ali, H. 2019. Pembuatan Hidrolisat Protein Hati Ayam Pedaging (*Broiler*) dan Uji Aktivitas Antioksidannya. *Jurnal SCIENTIA*. 9(1): 101-108

- Wariyah, C.H. 2014. Pengaruh Kecambah Kacang terhadap Kadar Protein Terlarut dan Asam Amino Bebas dalam Isolasi Protein. *Jurnal Agri Sains*. 5(2): 102-114
- Wijana, S., Gadizza, C., dan Tiaraningtyas, R. 2018. Hidrolisis Protein Konsentrat Blondo Limbah Hasil Produk *Virgin Coconut Oil* (VCO) sebagai Bahan Baku Penyedap Makanan. *Jurnal Prosiding Seminar Nasional dan Call for Papers*. 2(1): 314-325
- Wiwata, O.K. 2019. Karakteristik dan Aktivitas Hambat *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE-1) Garam Peptida Berbasis Kombinasi Hidrolisat Dua Jenis Kacang. *Skripsi*. Universitas Jember. Jember
- Yamin, M. 2020. Mengenal Dampak Negatif Penggunaan Zat Adiktif pada Makanan terhadap Kesehatan Manusia. *Jurnal Pengabdian Magister Pendidikan IPA*. 3(2):163-170
- Yatno, Suparjo, dan Murni, R. 2018. Isolasi Protein dan Produksi Konsentrat Protein Daun (KPD) sebagai Suplemen Pakan Ternak. *Jurnal Pastura*. 7(2): 88-94
- Yazid, E., Lisda N., dan Oktaviani H.S. 2006. *Penuntun Praktikum Biokimia untuk Mahasiswa Analis*. Edisi ke- 1. ANDI. Yogyakarta.
- Yusriah dan Kuswytasari, D. 2013. Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease *Penicillium sp.* *Jurnal Sains dan Seni POMITS*. 2(1): 48-50

BIODATA PENULIS



Prof. Dr. Ir. Sri Wahjuni, M.Kes. dilahirkan di Surabaya pada Juni 1959, Menempuh Pendidikan sejak Sekolah dasar sampai Pasca Sarjana di Surabaya. Sejak tahun 1986 menjadi dosen pada Jurusan kimia F.MIPA Universitas dan pada Tahun 2019 menjadi guru besar pada Jurusan kimia F.MIPA Universitas Udayana. Sampai saat ini memiliki Publikasi 50 journal Nasional terakreditasi dan Internasional

berindeks Scopus diantaranya berjudul Analysis of the ability of *Coriandrum sativum* L. and *Mimosa pudica* L. leaves ethanol extract in lowering blood glucose and malondialdehyde (MDA) increased superoxide dismutase (SOD) in hyperglycaemic Wistar rats (<https://ijbs-udayana.org/index.php/ijbs/article/view/470>), Analysis of The Ability of Nano Ethanol Extract of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) Seeds To Reduce Blood Glucose Levels In Hyperglycemic Wistar Rats (<https://ejournal.uncen.ac.id/index.php/IJPI/article/download/3076/2341>) , dan Antioxidant activity of kecombrang flower (*Etlingera elatior*) methanol extract and identification of its compounds using LC-MS/MS (<https://ijbs-udayana.org/index.php/ijbs/article/view/480/473>). Selain jurnal, beberapa buku juga telah selesai ditulis dan terbit diantaranya Ekstrak Bawang Putih *Allium sativum* Sebagai Antidiabetik terhadap Tikus Putih ratus Novergicud yang Diinduksi Streptozotocin (<https://globaleksekitifteknologi.co.id/efektivitas-ekstrakbawangputih-allium-sativum-sebagaiantidiabetikterhadap-tikus-putih-rattus-norvegicus-yang-diinduksi-streptozotocin/>), dan Flavonoid yang Terkandung Pada Daun Srikaya (*Annona squamosa* Linn) Sebagai Antibakteri (). Selain aktif menulis jurnal dan buku, penulis juga aktif mengikuti dan menyajikan makalah di berbagai pertemuan Nasional dan Internasional diantaranya Pertemuan 7th International Conference on Sustainable Agriculture Food and Energy

tgl 18 – 21 Oktober 2019 di Phuket di Thailand memaparkan Green Mustard Ethanol Extract (*Brassica rapa* L) Leaf can Cell Damage (8-Hydroxy 2-dioxiguanosine) in The Wistar Rat Hyperglycemic. Pertemuan The 4th International Conference on Biosciences & Medical Engineering Malaysia secara OL menyajikan makalah Nano Extract Of *Coriandrum Sativum* L (Ketumbar) Decrease Malondialdehyde (MDA), Superoxide Dismutase (SOD) Blood Glucose In Wistar Rats Hyperglycemic tanggal 21–22 Juni 2022. Untuk penelitian terbaru beliau dapat dilihat pada link berikut ini dengan No. urut 17 <https://bit.ly/DataPublikasiDosen2023>