

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kedelai

Kedelai atau *Glycine max (L) Merr* termasuk familia *Leguminosae*, sub famili *Papilionaceae*, genus *Glycine max*, berasal dari jenis kedelai liar yang disebut *Glycine unriensis* (Samsudin, 1985). Menurut Ketaren (1986), secara fisik setiap kedelai berbeda dalam hal warna, ukuran dan komposisi kimianya. Perbedaan secara fisik dan kimia tersebut dipengaruhi oleh varietas dan kondisi dimana kedelai tersebut dibudidayakan. Biji kedelai tersusun atas tiga komponen utama, yaitu kulit, biji, daging (kotiledon), dan hipokotil dengan perbandingan 8:90:2. Sedangkan komposisi kimia kedelai adalah 40,5% protein, 20,5% lemak, 22,2% karbohidrat, 4,3 % serat kasar, 4,5% abu, dan 6,6% air (Synder and Kwon, 1987).



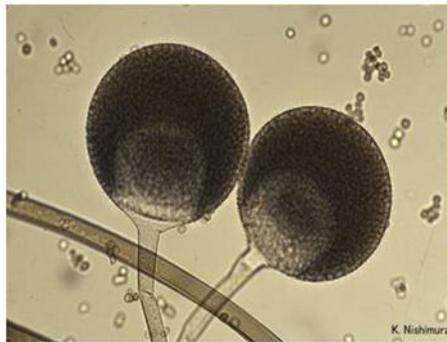
(Anonymous, 2010)

Gambar 2.1 Kedelai

Kedelai merupakan sumber gizi yang sangat penting. Menurut Astuti (2003) dalam Anonim (2009), komposisi gizi kedelai bervariasi tergantung varietas yang dikembangkan dan juga warna kulit maupun kotiledonnya. Kandungan protein dalam kedelai kuning bervariasi antara 31-48% sedangkan kandungan lemaknya bervariasi antara 11-21%. Antosianin kulit kedelai mampu menghambat oksidasi LDL kolesterol yang merupakan awal terbentuknya plak dalam pembuluh darah yang akan memicu berkembangnya penyakit tekanan darah tinggi dan berkembangnya penyakit jantung koroner.

2.2. Ragi (*Rhizopus Sp*)

Genera Rhizopus sp digunakan sebagai jamur utama dalam fermentasi tempe, pada starter tempe yang di jual komersial dengan merk tertentu dan secara umum digunakan sebagai starter pembuatan tempe mengandung jamur *Rhizopus oligosporus*. Dari sekian banyak mikroba yang terlibat para ahli bersepakat bahwa fakta membuktikan bahwa yang utama berperan dalam proses fermentasi adalah *Rhizopus oligosporus* (Babu, 2009).



(Anonymous, 2010)

Gambar 2.2. *Rhizopus Oligosporus*

Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Dewi dan Aziz (2011) yang melakukan isolasi *Rhizopus sp* dari inokulum ragi tempe pada sentra tempe di 4 desa di Kabupaten Banyumas, usar daur waru, usar daun jati dan usar daun pisang yang biasa digunakan dalam pembuatan tempe, diperoleh beberapa isolat jamur, dari 55 isolat yang diperoleh 19 isolat diidentifikasi sebagai *Rhizopus oligosporus*. Isolat jamur *Rhizopus sp* pada penelitian ini belum diidentifikasi sampai penentuan spesies, tetapi dari ciri-ciri koloni dengan miselium putih keabuan dan spora abu kehitaman, serta mempunyai hifa halus dengan sporangiosfor yang tidak terlalu panjang dan sporangium berbentuk bulat (globossa) maka sesuai dengan ciri-ciri *Rhizopus oligosporus* namun harus dipastikan dengan penelitian lebih lanjut. *Rhizopus sp* dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang bersifat antibakteri terhadap beberapa bakteri gram positif. Ekstrak tempe 1% dalam media BHI diantaranya dapat menghambat pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria innocua* dan *Listeria monocytogenes*, namun tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif *E.coli* dan *Salmonella enteritidis*. Namun pada penelitian penelitian dengan perlakuan yang

berbeda dapat menunjukkan aktivitas antibakteri berspektrum luas pada bakteri Gram positif dan Gram negatif *B. cereus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *Proteus vulgaris*, *S. aureus* dan *Salmonella typhi* (Roubous 2011). Penggunaan ekstrak tempe 1% yang dilakukan oleh Roubous (2011) tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* dan *Salmonella enteritidis* pada BHI dimungkinkan karena kandungan zat antimikroba terlarutnya sedikit sehingga tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri uji. Pada penelitian ini digunakan biakan jamur *Rhizopus sp* secara langsung yang diletakkan pada media agar yang telah diinokulasikan bakteri uji sehingga zat antibakteri yang dihasilkan oleh *Rhizopus sp* dapat terdifusi secara langsung terhadap bakteri uji sehingga sifat antagonis melawan bakteri uji dapat terlihat. Penggunaan *Rhizopus sp* secara langsung pada uji antagonis yang dilakukan berdasarkan pada kenyataan bahwa masyarakat Indonesia melakukan konsumsi tempe dalam jumlah yang cukup banyak, dan pada tempe tersebut tentu saja mengandung jamur *Rhizopus sp* dan produk-produk metabolit yang tersimpan pada substrat yang difermentasinya

2.3. Tempe

Tempe adalah salah satu makanan tradisional khas Indonesia. Di tanah air, tempe sudah lama dikenal selama berabad-abad silam. Makanan ini diproduksi dan dikonsumsi secara turun-temurun, khususnya di daerah Jawa Tengah dan sekitarnya. Tempe merupakan makanan yang terbuat dari biji kedelai atau beberapa bahan lain yang diproses melalui fermentasi oleh jamur *Rhizopus sp* dari apa yang secara umum dikenal sebagai “ragi tempe”. Lewat proses fermentasi ini, biji kedelai mengalami proses penguraian menjadi senyawa sederhana sehingga mudah dicerna. Kata “tempe” diduga berasal dari bahasa Jawa Kuno. Pada masyarakat Jawa Kuno terdapat makanan berwarna putih terbuat dari tepung sagu yang disebut *tumpi*. Makanan bernama *tumpi* tersebut terlihat memiliki kesamaan dengan tempe segar yang juga berwarna putih. Boleh jadi, ini menjadi asal muasal dari mana kata “tempe” berasal.

Indonesia merupakan negara produsen tempe terbesar di dunia dan menjadi pasar kedelai terbesar di Asia. Sebanyak 50% dari konsumsi kedelai Indonesia dijadikan untuk produksi tempe, 40% tahu, dan 10% dalam bentuk

produk lain seperti tauco, kecap dan lain lain. Konsumsi tempe rata-rata per orang per tahun di Indonesia saat ini diperkirakan mencapai sekitar 6,45 kg.

Umumnya, masyarakat Indonesia mengkonsumsi tempe sebagai panganan pendamping nasi, dalam perkembangannya, tempe diolah dan disajikan sebagai aneka panganan siap saji yang diproses dan dijual dalam kemasan. Kripik tempe, misalnya adalah salah satu contoh panganan populer dari tempe yang banyak dijual di pasar.

Tempe, sebagai makan dengan nilai kandungan gizi yang tinggi, sudah lama diakui. Sejumlah penelitian yang diterbitkan pada tahun 1940-an sampai dengan 1960-an menyimpulkan bahwa banyak tahanan Perang Dunia II pada zaman pendudukan Jepang di Indonesia berhasil terhindar dari disentri dan busung lapar karena tempe. Penelitian terhadap nilai gizi tempe terus dilakukan dan dari penelitian tersebut diperoleh hasil bahwa tempe mengandung elemen yang berguna bagi tubuh, yakni:

1. Asam Lemak

Proses fermentasi pada tempe meningkatkan derajat ketidakjenuhan terhadap lemak. Akibat proses ini, asam lemak tidak jenuh majemuk pada tempe meningkat jumlahnya. Asam lemak tidak jenuh majemuk pada tempe meningkat jumlahnya. Asam lemak tidak jenuh ini mempunyai efek penurunan terhadap kandungan kolesterol serum, sehingga dapat menetralkan efek negatif sterol di dalam tubuh.

2. Vitamin

Dua kelompok vitamin terdapat pada tempe, yaitu larut air (vitamin B kompleks) dan larut lemak (vitamin A, D, E, dan K). Tempe merupakan sumber vitamin B yang sangat potensial. Jenis vitamin yang terkandung dalam tempe antara lain vitamin B1, B2, asam pantotenat, asam nikotinat vitamin B6, dan B12. Vitamin B12 umumnya terdapat pada produk-produk hewani dan tidak dijumpai pada makanan nabati (sayuran, buah-buahan, dan biji-bijian), namun tempe mengandung vitamin B12 sehingga tempe menjadi satu-satunya sumber vitamin yang potensial dari bahan pangan nabati. Kenaikan kadar vitamin B12 paling mencolok pada pembuatan tempe. Kadar vitamin B12 dalam tempe berkisar antara 1,5 sampai 6,3 mikrogram per 100 gram tempe kering. Jumlah ini

telah dapat mencukupi kebutuhan vitamin B12 seseorang per hari. Dengan adanya vitamin B12 pada tempe, para vegetarian tidak perlu merasa khawatir akan kekurangan vitamin B12, sepanjang mereka melibatkan tempe dalam menu hariannya.

3. Mineral

Tempe mengandung mineral makro dan mikro dalam jumlah yang cukup. Jumlah mineral besi, tembaga, dan zink. Kapang tempe dapat menghasilkan enzim fitase yang akan menguraikan asam fitat (yang mengikat beberapa mineral) menjadi fosfor dan inositol. Dengan terurainya asam fitat, mineral-mineral tertentu (seperti besi, kalsium, magnesium, dan zink) menjadi lebih tersedia untuk dimanfaatkan tubuh.

4. Antioksidan

Di dalam tempe juga ditemukan suatu zat antioksidan dalam bentuk isoflavon yang sangat dibutuhkan tubuh untuk menghentikan reaksi pembentukan radikal bebas. Dalam kedelai terdapat tiga jenis isoflavon, yaitu daidzein, glisitein, dan genistein. Pada tempe, di samping ketiga jenis isoflavon tersebut juga terdapat antioksidan faktor II (6,7,4-trihidroksi isoflavon) yang mempunyai sifat antioksidan paling kuat dibandingkan dengan isoflavon dalam kedelai. Antioksidan ini disintesis pada saat terjadinya proses fermentasi kedelai menjadi tempe oleh bakteri *micrococcus luteus* dan *coreyne bacterium*. Penuaan (aging) dapat dihambat bila dalam makanan yang dikonsumsi sehari-hari mengandung antioksidan yang cukup. Karena tempe merupakan sumber antioksidan yang baik, konsumsinya dalam jumlah cukup secara teratur dapat mencegah terjadinya proses penuaan dini. Lebih lanjut, Universitas Carolina Utara, Amerika Serikat, meneliti tempe dan menemukan bahwa genestein dan fitoestrogen yang terdapat pada tempe ternyata dapat mencegah kanker prostat dan payudara.



(Anonymous,2010)

Gambar 2.3. Tempe

Tempe merupakan makanan hasil fermentasi tradisional berbahan baku kedelai dengan bantuan jamur *Rhizopus oligosporus*. Mempunyai ciri-ciri berwarna putih, tekstur kompak dan flavor spesifik. Warna putih disebabkan adanya miselia jamur yang tumbuh pada permukaan biji kedelai. Tekstur yang kompak juga disebabkan oleh miselia-miselia jamur yang menghubungkan antara biji-biji kedelai tersebut. Terjadinya degradasi komponen-komponen dalam keelai dapat menyebabkan terbentuknya flavor spesifik setelah fermentasi (Kasmidjo, 1990).

Pada tahun 1991, Departemen Kesehatan Republik Indonesia (sekarang Kementrian Kesehatan) juga melakukan penelitian terhadap kandungan gizi tempe. Hasil penelitian tersebut dipublikasikan dengan perincian sebagai berikut:

Tabel 2.1 Kandungan Gizi Pada Tempe

Zat Gizi	Satuan	Komposisi zat gizi 100 gram BDD	
		Kedelai	Tempe
Energi	(kal)	381	201
Protein	(gram)	40,4	20,8
Lemak	(gram)	16,7	8,8
Hidrat Arang	(gram)	24,9	13,5
Serat	(gram)	3,2	1,4
Abu	(gram)	5,5	1,6
Kalsium	(mg)	222	155
Fosfor	(mg)	682	326
Besi	(mg)	10	4
Karotin	(mkg)	31	34
Vitamin B1	(mg)	0,52	0,19
Air	(gram)	12,7	55,3
BDD*	(%)	100	100

(Komposisi Zat Gizi Pangan Indonesia Departemen Kesehatan RI Dir.Bin. Gizi Masyarakat dan Puslitbang Gizi, 1991)

*BDD = Berat yang dapat dimakan

2.4. SNI 3144:2009, Tempe Kedelai

Badan standarisasi Nasional (BSN) telah menerbitkan standar tempe, yakni: SNI 3144:2009, Tempe Kedelai SNI ini merupakan revisi dari SNI 01-3144-1998,

Tempe kedelai. SNI 3144:2009 dirumuskan oleh Panitia Teknis 67–04 Makanan dan minuman. Standar ini telah dibahas melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 27 November 2008 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, Lembaga IPTEK, dan instansi terkait lainnya.

SNI 3144:2009 menetapkan mengenai syarat mutu tempe kedelai. Sesuai dengan standar tersebut, syarat mutu tempe kedelai, dengan perincian sebagai berikut:

Tabel 2.2 Syarat Mutu Tempe Kedelai Menurut Standar Nasional
Indonesia 01-3144-1992

No.	Kriteria Uji	Satuan	Persyaratan
1.	Keadaan		
	1.1 Bau	-	Normal, khas
	1.2. Warna	-	Normal
	1.3. Rasa	-	Normal
2.	Kadar Air (b/b)	%	Maks. 65
3.	Kadar Abu (b/b)	%	Maks. 1,5
4.	Kadar Lemak (b/b)	%	Min. 10
5.	Kadar Protein (N x 6,25) (b/b)	%	Min. 16
6.	Kadar Serat Kasar (b/b)	%	Maks. 2,5
7.	Cemaran Logam		
	7.1. Kadmium (Cd)	Mg/kg	Maks. 0,2
	7.2. Timbal (Pb)	Mg/kg	Maks. 0,25
	7.3 Timah (Sn)	Mg/kg	Maks. 40
	7.4. Merkuri (Hg)	Mg/kg	Maks. 0,03
8.	Cemaran Arsen (As)	Mg/kg	Maks. 0,25
9.	Cemaran Mikroba		
	9.1. Bakteri coliform	APM/g	Maks. 10
	9.2. Salmonella sp.	-	Negatif/25 g

(Badan Standardisasi Nasional (BSN))

Berdasarkan tabel diatas dapat dilihat bahwa persyaratan untuk bau, warna dan rasa adalah normal. Besarnya kadar air, abu dan protein secara berturut- turut

yaitu maksimal 65% (b/b), maksimal 1,5% (b/b) dan minimal 20 % (b/b). sedangkan untuk cemaran mikroba *E.coli* maksimal 10.

Tempe juga mengandung *superoksida desmutase* yang dapat menghambat kerusakan sel dan proses penuaan. Dalam sepotong tempe, terkandung berbagai unsur yang bermanfaat, seperti protein, lemak, hidrat arang, serat, vitamin, enzim, daizein, genestein serta komponen antibakteri dan zat antioksidan yang berkhasiat sebagai obat, diantaranya genestein, daidzein, fitosterol, asam fitat, asam fenolat, lesitin dan inhibitor protease (Cahyadi, 2006).

Menurut Hidayat (2008), selain jenis tempe kedelai ada jenis tempe yang lain, yakni tempe leguminosa non kedelai dan tempe non leguminosa. Tempe leguminosa non kedelai diantaranya adalah tempe bengkok, tempe kecipir, tempe kedelai hitam, tempe lamtoro, tempe kacang hijau, tempe kacang merah, dan sebagainya. Sedangkan jenis tempe non leguminosa diantaranya tempe gandum, tempe sorghum, tempe campuran beras dan kedelai, tempe ampas tahu, tempe bongkrek, tempe ampas kacang, dan tempe tela.

2.5 Proses pembuatan Tempe

Proses pembuatan tempe melibatkan tiga faktor pendukung, yaitu bahan baku yang dipakai (kedelai), mikroorganisme (kapang tempe), dan keadaan lingkungan tumbuh (suhu, pH dan kelembaban). Dalam proses fermentasi tempe kedelai, substrat yang digunakan adalah biji kedelai yang telah direbus dan mikroorganisme yang digunakan berupa kapang antara lain *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer* (dapat terdiri dari atas kombinasi dua spesies atau ketiganya) dan lingkungan pendukung yang terdiri dari suhu 30°C, pH awal 6,8, kelembaban nisbi 70-80%. Selain menggunakan kapang murni, laru juga dapat digantikan sebagai starter dalam pembuatan tempe (Ferlina, 2009).

Ciri tempe yang “berhasil” adalah ada lapisan putih di sekitar kedelai dan pada saat di potong, tempe tidak hancur. Perlu diperhatikan agar tempe berhasil alat yang digunakan untuk membuat tempe sebaiknya dijaga kebersihannya. Meja kebersihan pada saat membuat tempe ini sangat diperlukan karena fermentasi tempe hanya terjadi pada lingkungan yang higienis. Menurut Hidayat (2008), gangguan pada pembuatan tempe diantaranya adalah tempe tetap basah,

jamur tumbuh kurang baik, tempe berbau busuk, ada bercak hitam dipermukaan tempe, dan jamur hanya tumbuh baik di salah satu tempat.

Proses Pembuatan tempe adalah sebagai berikut:

1. Pencucian dan Pembersihan

Tahap pencucian dan pembersihan merupakan tahap pertama dalam pengolahan tempe. Tahap ini bertujuan untuk menghilangkan kotoran-kotoran dan kontaminan lainnya seperti serangga, tanah, dan bahan asing lainnya. Biji kedelai yang digunakan untuk pengolahan tempe harus bersih, tidak tercampur dengan benda asing seperti kerikil, batu, dan biji lainnya, serta bentuk biji kedelai sebaiknya seragam. Penggunaan air pencuci yang bersih dengan jumlah yang cukup diharapkan dapat menghilangkan semua kotoran yang terdapat pada kedelai. Proses pencucian kedelai dapat dilakukan sekali atau berkali-kali bergantung pada kondisi awal kedelai sampai diperoleh kedelai bersih.

2. Pengupasan

Pengupasan merupakan salah satu tahap penting dalam proses pengolahan tempe. Kulit ari yang masih tersisa karena pengulitan yang tidak sempurna akan mengakibatkan inokulum tidak dapat tumbuh dengan baik. Metode pengupasan dapat dilakukan dengan cara kering atau cara basah. Metode pengupasan cara kering dilakukan sebelum proses perendaman kedelai dan dilakukan dengan menggunakan peralatan mekanis. Kedelai dipanaskan menggunakan oven pada suhu 93°C selama 10 menit, selanjutnya kedelai dikupas kulit arinya menggunakan aspirator atau gravitasi aspirator (Steinkraus *et al.* 1983). Metode ini sangat efisien dan hanya memerlukan tenaga kerja sedikit. Sebaliknya, pengupasan basah dilakukan setelah pencucian dan perendaman atau setelah pemasakan. Pengupasan dilakukan secara manual dengan tangan untuk memisahkan kulit ari dari kedelai, sehingga tidak diperlukan peralatan mekanis. Namun karena banyak menggunakan tenaga kerja, maka cara ini tidak cocok untuk produksi tempe skala besar.

3. Perendaman

Pada saat proses perendaman, biji kedelai akan mengalami proses hidrasi sehingga terjadi kenaikan kadar air biji kedelai. Beberapa peneliti menyebutkan kenaikannya dapat mencapai dua kali dari kadar air awal. Proses perendaman

dapat dilakukan pada suhu kamar (sekitar 30 °C) selama 12-15 jam (Fung dan Cozier-Dodson 2008). Fung dan Cozier-Dodson (2008), menyebutkan untuk memberikan kondisi asam, beberapa peneliti menambahkan asam laktat (<0.5%) atau asam asetat (<0.25%). Kondisi asam pada proses ini dapat menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk dan memberikan kondisi awal yang baik untuk pertumbuhan kapang tempe.

4. Perebusan

Perebusan dilakukan setelah perendaman. Tujuan perebusan ini selain melunakkan kedelai adalah untuk memusnahkan mikroorganisme kontaminan, menginaktifkan tripsin-inhibitor, menyebabkan protein terdenaturasi yang akan lebih mudah digunakan oleh kapang, dan membebaskan beberapa nutrisi yang diperlukan untuk fermentasi kapang. Perebusan harus dilakukan dengan jumlah air yang cukup agar kematangan biji kedelai merata. Bergantung pada jumlah kedelai yang direbus, perebusan dapat berlangsung 2 hingga 4 jam.

5. Penirisan, Pendinginan, dan Pengeringan

Tahap penirisan, pendinginan, dan pengeringan bertujuan untuk mengurangi kandungan air, menurunkan suhu, dan mengeringkan permukaan biji kedelai. Secara tradisional setelah proses perebusan biasanya kedelai ditiriskan dan disebar pada wadah (nampan) bambu. Winarno dan Reddy (1986), menyarankan menggunakan wadah berlubang untuk meniriskan kedelai setelah proses perebusan. Penirisan yang tidak sempurna akan memicu pertumbuhan bakteri sehingga dapat menyebabkan fermentasi gagal. Selanjutnya Winarno dan Reddy (1986), juga menyarankan bahwa kedelai sebaiknya didinginkan sampai mencapai suhu 38°C sebelum dilakukan inokulasi kapang.

6. Inokulasi

Penggunaan inokulum spora kapang (laru tempe) pada saat inokulasi memegang peranan penting pada keberhasilan produksi tempe. Penggunaan jenis dan jumlah laru berperan terhadap tempe yang dihasilkan. Penambahan laru tempe yang berlebihan akan mengakibatkan fermentasi tidak sempurna. Sebaliknya jika penambahan laru tempe kurang dapat mengakibatkan bakteri perusak tumbuh. Kondisi optimal pemberian laru tempe saat inokulasi adalah bila laru yang ditambahkan mengandung spora kapang sebanyak 6 log spora/100 gram kedelai

yang telah direbus (Wang *et al.* 1975). Studi yang dilakukan oleh Steinkraus *etal.* (1960) menyebutkan bahwa *R. oryzae* merupakan satu-satunya spesies kapang yang digunakan sebagai laru tempe, tetapi laporan berikutnya (Steinkraus *et al.* 1983) menyebutkan bahwa *R. oligosporus* juga merupakan spesies kapang lainnya sebagai laru tempe. Shurtleff dan Aoyagi (1979), melaporkan bahwa *R. oligosporus* adalah spesies kapang utama yang terdapat pada pengolahan tempe di Indonesia dan Amerika Utara. *Rhizopus oligosporus* memiliki aktivitas protease dan lipase yang baik untuk fermentasi tempe. Selain *R. oligosporus*, spesies kapang lain yang berperan dalam pengolahan tempe adalah *R. oryzae*, *R. chinensis*, dan *R. arrhizus*.

Steinkraus *et al.* (1983) menyarankan strain *Rhizopus* yang digunakan untuk pengolahan tempe harus memiliki karakteristik sebagai berikut ini.

- a. Tumbuh cepat pada suhu 32-35 °C
- b. Memiliki aktivitas proteolitik yang tinggi
- c. Memiliki aktivitas lipolitik
- d. Dapat menghasilkan antioksidan yang tinggi
- e. Berkemampuan untuk menghasilkan tempe dengan flavor, aroma, dan tekstur yang khas

7. Pengemasan

Kedelai yang sudah diinokulasi dan bercampur dengan laru tempe kemudian dikemas. Jenis pengemas yang digunakan pada pengolahan tempe dapat berupa daun pisang atau kantong plastik. Beberapa persyaratan bahan kemasan untuk fermentasi tempe adalah sebagai berikut ini (Fung dan Cozier-Dodson, 2008):

1. Permeabilitas terhadap oksigen cukup untuk pertumbuhan dan pembentukan miselium
2. Suhu di dalam kemasan dapat dikontrol
3. Kadar air kedelai dapat dijaga selama masa inkubasi
4. Tidak ada kontak air bebas dengan kedelai
5. Menjamin fermentasi tempe berlangsung dalam kondisi bersih dan baik

8. Inkubasi

Suhu, waktu dan kelembaban relatif (RH) saat inkubasi adalah tiga faktor penting yang dapat mempengaruhi proses fermentasi tempe. Faktor lainnya yang juga dapat mempengaruhi proses fermentasi tempe adalah ketersediaan oksigen yang diperlukan oleh laru tempe untuk tumbuh. Selama proses inkubasi terjadi proses fermentasi yang menyebabkan terjadinya perubahan komponen kimia pada biji kedelai. Fung dan Cozier-Dodson (2008), menyebutkan beberapa contoh penggunaan kombinasi suhu dan waktu inkubasi untuk proses fermentasi tempe yang diberi penambahan laru tempe sebanyak 6 log spora/100 gram substrat. Kondisi suhu dan waktu tersebut adalah sebagai berikut :

- a. 25 °C selama 80 jam
- b. 25-37 °C selama 20-50 jam
- c. 32 °C selama 20-22 jam
- d. 35-38 °C selama 15-18 jam

Pada skala *pilot plant*, proses fermentasi pada tempe dapat dilakukan dengan pengaturan kelembaban relatif sebesar 75-78% pada kondisi suhu 35-38°C selama 18 jam (Steinkraus *et al.* 1965)

Proses pembuatan tempe kedelai meliputi pencucian, perendaman, perebusan pengupasan kulit ari bisa dengan manual / mesin pengupas, pencucian, perebusan dalam waktu yang lama pendinginan, penambahan ragi serta pengemasan dan fermentasi. Tahapan yang sangat penting dalam proses pembuatan tempe yaitu perendaman, perebusan dan fermentasi. Pada proses fermentasi pembuatan tempe terjadi sebanyak dua kali, yang pertama pada saat perendaman kedelai di dalam air. Pada perendaman ini terjadi pembentukan asam-asam organik seperti halnya asam laktat, dan juga asam asetat yang disebabkan oleh adanya pertumbuhan bakteri. Hal ini juga menyebabkan kedelai dalam keadaan asam sehingga memungkinkan terjadinya fermentasi oleh jamur *Rhizopus sp.* Fermentasi yang kedua terjadi pada saat setelah pemberian ragi dan pengemasan. Pada proses fermentasi inilah terbentuk hifa yang akan mengikat satu sama lain sehingga menjadikan tekstur tempe menjadi kompak dan lunak serta menjadikan warna tempe menjadi putih. Pada saat fermentasi berlangsung terjadi aktivitas enzim dalam setiap jenis jamur yang berperan dalam pembuatan

tempe berbeda berdasarkan waktu fermentasi. Seperti halnya pada saat berlangsungnya aktivitas enzim amilase oleh jamur *Rhizopus oryzae* terjadi pada waktu fermentasi 0-12 jam dan paling tinggi pada saat 12 jam, sedangkan pada jamur *Rhizopus oligosporus* terjadi pada waktu fermentasi 12-24 jam.

2.6. Daun Suji (*Pleomele angustifolia*)

Daun suji digunakan sebagai bahan pewarna hijau pada makanan (Deasy, 2010) dan minuman (Puji, 2009). Selain memberikan pewarna hijau, daun suji memberikan aroma harum yang khas yang dapat meningkatkan selera konsumen untuk memakannya. Selain kaya akan klorofil yang sudah bermanfaat untuk kesehatan, daun suji juga mengandung banyak senyawa bioaktif yang memiliki sifat antioksidan. Senyawa bioaktif yang terkandung di dalam daun suji antara lain triterpenoid, alkaloid, flavonoid, tannin, terpenoid, saponin, polifenol, dan glikosida. Triterpenoid diketahui memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan senyawa triterpenoid ada dalam ekstrak daun suji tetapi dalam kadar rendah. Flavonoid dan tanin merupakan contoh senyawa fenolik yang memiliki aktivitas antioksidan karena kemampuannya mendonorkan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya kepada senyawa radikal (Catherine et al., 1996). Sedangkan saponin bertindak sebagai anti jamur dan antivirus serta diduga dapat menghambat radikal bebas (Firdiyani, Agustini & Ma'ruf, 2015). Saponin biasanya terdapat pada daun dan kulit batang tanaman dalam kadar sedang. Daun suji segar memiliki kadar air basah sebesar 73,25 % mengandung 37773,9 ppm klorofil yang terdiri atas 2524,6 ppm klorofil a dan 1250,3 ppm klorofil b (Aryanti, 2016). Klorofil daun suji berkhasiat untuk mengobati beriberi, disentri, keputihan dan kencing nanah serta akarnya berkhasiat untuk nyeri lambung dan penawar racun (Nuzul, 2016). Daun suji mengandung senyawa flavonoid dan terpenoid sehingga berkhasiat sebagai anti inflamasi atau anti radang (Khino, 2011).

Flavonoid berfungsi untuk :

1. melancarkan peredaran darah ke seluruh tubuh,
2. mengurangi kandungan kolesterol,
3. sebagai antioksidan, dan
4. mengurangi kadar resiko penyakit jantung (Ratnani, 2009).

Varietas daun suji antara lain varietas Minor dan Typica (Khino, 2011). Varietas yang digunakan adalah varietas Minor. Zat pewarna alami yang berpotensi untuk diekstrak oleh daun suji varietas Minor adalah klorofil (Sarngadi, 2015). Menurut Khino (2011), kandungan klorofil dalam daun suji varietas minor sekitar 2053,8 $\mu\text{g/g}$. 2.2. Klorofil atau pigmen utama tumbuhan banyak dimanfaatkan sebagai food supplement yang dimanfaatkan untuk membantu mengoptimalkan fungsi metabolic, system imunitas, detoksifikasi, meredakan radang (inflamatorik) dan menyeimbangkan system hormonal. Sumber klorofil paling nyata adalah sayuran hijau. Akan tetapi, lebih baik dikonsumsi dalam keadaan masih mentah. Proses pemanasan saat memasak merusak hampir semua kandungan klorofilnya (Al-Faqir, 2010) kehijauan daun menunjukkan jumlah klorofil yang dimiliki oleh tanaman. Pertumbuhan akan semakin baik apabila daun memiliki kandungan klorofil yang semakin tinggi.



(Anonymous, 2010)

Gambar 2.4. Daun Suji

2.7. Klorofil

Pada awal tahun 1782, seorang ilmuwan bernama Senebier menemukan suatu senyawa kimia berwarna hijau, yang kemudian pada tahun 1818 oleh Pelletier dan Caventou diberi nama pigmen hijau alami tumbuhan bernama klorofil. Penelitian lebih lanjut akan senyawa ini dilanjutkan oleh Berzellius dan Verdeil pada tahun 1839 dan 1851 yang berhasil mengisolasi pigmen klorofil dan menemukan struktur molekul antara pigmen klorofil ini dengan pigmen merah yang terdapat pada darah mamalia yaitu hemoglobin.

Klorofil merupakan sumber pewarna alami hijau utama saat ini dan telah lama dimanfaatkan secara tradisional. Meskipun telah berkembang beragam jenis pewarna sintetis yang memiliki kekuatan dan kestabilan yang tinggi, klorofil

masih terus dimanfaatkan sebagai pewarna alami dengan berbagai kelebihan dan kelemahannya baik untuk produk pangan maupun non pangan (Shahid et al., 2013). Kecenderungan masyarakat untuk semakin menggunakan pewarna alami disebabkan oleh faktor kesehatan. Telah banyak studi yang melaporkan adanya kaitan antara konsumsi pewarna sintetis dengan masalah kesehatan (Ghidouche et al., 2013). Di sisi lain, banyak penelitian yang membuktikan efek kesehatan dari konsumsi klorofil karena aktivitas antioksidan dan farmakologi lainnya (Jokopriyambodo & Rohman, 2014).

Di balik kelebihan yang dimiliki klorofil dalam fungsinya sebagai pewarna, ada banyak tantangan yang dihadapi dalam pemanfaatan klorofil sebagai pewarna dikarenakan stabilitasnya yang lemah. Klorofil rentan mengalami degradasi mutu warnanya karena faktor lingkungan maupun faktor enzimatik (Hortensteiner & Krautler, 2011). Selama proses pelayuan, pengolahan, maupun penyimpanan, senyawa kompleks klorofil-protein yang memberikan warna hijau sangat mudah berubah strukturnya menjadi senyawa feofitin yang kehilangan ion logam Mg. Feofitin yang merupakan senyawa turunan dari kompleks klorofil-protein tidak berwarna hijau (Pumilia et al., 2014). Klorofil stabil pada pH tinggi dan suhu rendah. Kondisi asam dan suhu yang tinggi mempercepat proses degradasi klorofil menjadi feofitin. Selama proses pengolahan, beberapa asam organik dari bahan akan keluar dan menyebabkan pH menjadi rendah. Hal ini akan semakin mempercepat degradasi klorofil (Singh et al., 2015).

2.8. Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Mukhriani, 2014). Ekstraksi dapat dilakukan dengan berbagai macam metode, salah satunya yaitu metode maserasi. Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia dengan menggunakan pelarut yang sesuai dengan beberapa kali pengadukan pada temperatur ruangan (Susanty & Fairus, 2016). Setelah proses ekstraksi dilakukan, senyawa dipisahkan pelarutnya. Pemisahan ini dilakukan agar memperoleh ekstrak dengan senyawa kita inginkan. Pemisahan ini menggunakan rotary evaporator. Rotary evaporator merupakan suatu alat yang berfungsi untuk memisahkan suatu larutan dari pelarutnya dengan proses

penguapan sehingga menghasilkan ekstrak dengan senyawa yang diinginkan. Kelebihan alat ini yaitu kerjanya cepat dan dapat memperoleh kembali pelarut yang digunakan dari hasil proses penguapannya (Sanjaya and Surakusumah,2014). Metode ekstraksi yang dapat digunakan dalam penelitian ini yaitu maserasi.

Maserasi merupakan metode ekstraksi tanpa pemanasan dimana hasilnya dipengaruhi oleh jenis pelarut serta waktu maserasi (Wijayanti, LPMK, KW, & NPE,2016). Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Kerugian utama dari metode maserasi ini adalah memakan banyak waktu, pelarut yang digunakan cukup banyak, dan besar kemungkinan beberapa senyawa hilang. Selain itu, beberapa senyawa mungkin saja sulit diekstraksi pada suhu kamar. Namun di sisi lain, metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil.

Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi proses ekstraksi yaitu:

a) Perlakuan pendahuluan

Perlakuan pendahuluan dapat berpengaruh terhadap rendemen dan mutu ekstrak yang dihasilkan. Perlakuan pendahuluan meliputi pengecilan ukuran dan pengeringan bahan.

b) Temperatur

Kelarutan bahan yang diekstraksi dan difusivitas akan meningkat dengan meningkatnya temperatur. Namun temperatur yang terlalu tinggi dapat merusak bahan yang diekstrak, sehingga perlu menentukan temperatur optimum.

c) Faktor pengadukan

Pengadukan dapat mempercepat pelarutan dan meningkatkan laju difusi solute. Pegerakan pelarut di sekitar bahan akibat pengadukan dapat mempercepat kontak bahan dengan pelarut dan memindahkan komponen dari permukaan bahan ke dalam larutan dengan jalan membentuk suspensi serta melarutkan komponen tersebut ke dalam media pelarut.

Untuk mencapai proses ekstraksi yang baik, pelarut yang digunakan harus

memenuhi kriteria sebagai berikut (Martunus & Helwani, 2005):

1. Kemampuan tinggi melarutkan komponen zat terlarut di dalam campuran.
2. Kemampuan tinggi untuk diambil kembali.
3. Perbedaan berat jenis antara ekstrak dan rafinat lebih besar.
4. Pelarut dan larutan yang akan di ekstraksi harus tidak mudah tercampur.

2.9 Antioksidan

Antioksidan adalah zat yang dapat mencegah atau memperlambat kerusakan sel akibat radikal bebas. Berdasarkan sumbernya, antioksidan dapat dibagi menjadi 2 yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Antioksidan alami merupakan senyawa antioksidan yang terdapat secara alami dalam tubuh sebagai mekanisme pertahanan tubuh normal maupun berasal dari asupan luar tubuh. Sedangkan antioksidan sintetik merupakan senyawa yang disintesis secara kimia. Salah satu sumber senyawa antioksidan adalah tanaman dengan kandungan senyawa polifenol yang tinggi (Ulfa, 2016). Secara umum ada 3 jenis antioksidan yang dapat ditemukan di alam, yaitu:

1. Enzim

Enzim merupakan jenis antioksidan yang tersusun dari protein dan berbagai mineral. Ketika berada dalam tubuh, enzim akan bersintesis. Dan agar enzim dapat berfungsi optimal, maka ia butuh rekan kerja berupa mineral seperti zat besi, tembaga, selenium, magnesium, serta zinc. Hal lain yang tak kalah penting untuk diketahui adalah, kualitas enzim yang diperoleh tubuh juga sangat tergantung dari kualitas makanan sumber protein yang kita konsumsi.

2. Vitamin

Dikarenakan tubuh manusia tidak bisa memproduksi vitamin sendiri, maka kita perlu mendapatkannya dari luar yaitu melalui makanan atau suplemen. Contoh antioksidan vitamin antara lain vitamin A, C, E, asam folat, serta beta karoten, yang masing-masing memiliki kegunaannya sendiri-sendiri.

3. Fitokemikal

Fitokemikal merupakan jenis antioksidan yang digunakan oleh tumbuhan untuk melindungi dirinya dari kerusakan akibat radikal bebas. Untungnya dari hasil pembuktian berbagai riset, kita juga bisa menikmati perlindungan tersebut saat mengonsumsi sumber pangan nabati. Hanya pastikan makanan yang dipilih

bukanlah hasil proses, karena makanan yang sudah melewati proses biasanya mengandung fitokemikal sedikit atau bahkan tidak sama sekali. Secara garis besar, fitokemikal terbagi menjadi 4 kategori yaitu karotenoid, flavonoid, polifenol, dan alil sulfida.

Radikal bebas yang biasa digunakan sebagai model dalam mengukur daya penangkapan radikal bebas adalah *1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl*(DPPH). DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang stabil sehingga apabila digunakan sebagai pereaksi dalam uji penangkapan radikal bebas cukup dilarutkan dan bila disimpan dalam keadaan kering dengan kondisi penyimpanan yang baik dan stabil selama bertahun-tahun. Nilai absorbansi DPPH berkisar antara 515-520 nm. (Ulfa, 2016).

Metode peredaman radikal bebas DPPH didasarkan pada reduksi dari larutan methanol, radikal bebas DPPH yang berwarna oleh penghambatan radikal bebas. Ketika larutan DPPH yang berwarna ungu bertemu dengan bahan pendonor elektron maka DPPH akan tereduksi, menyebabkan warna ungu akan memudar dan digantikan warna kuning yang berasal dari gugus pikril. (Cahyaningsih, 2019).

Aktivitas antioksidan dari ekstrak dinyatakan dalam persen penghambatannya terhadap radikal DPPH. Persentase penghambatan ini didapatkan dari perbedaan serapan antara absorbansi DPPH dalam metanol dengan absorbansi sampel yang diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm. Selanjutnya, persamaan regresi yang diperoleh dari grafik hubungan antara konsentrasi sampel dengan persen penghambatan DPPH digunakan untuk mencari nilai IC₅₀. Besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai IC₅₀, yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH (Adrianta, 2017).

Menurut Ariyanto (2006), tingkatan kekuatan antioksidan pada metode DPPH dapat dilihat pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3. Tingkatan Aktivitas Antioksidan pada Metode DPPH

Nilai	Tingkatan
IC50 < 50 µg/mL	Sangat kuat
IC50 50-100 µg/mL	Kuat
IC50 101-150 µg/mL	Sedang
IC50 > 150 µg/mL	Lemah

(Ariyanto, 2006)

DPPH memiliki keunggulan dimana metode analisisnya yang bersifat sederhana, cepat, mudah, dapat digunakan dalam sample jumlah kecil, sensitif terhadap sampel dengan konsentrasi yang kecil dan senyawa radikal DPPH yang digunakan bersifat relatif stabil dibanding metode lainnya. DPPH juga memiliki kekurangan yang mana DPPH hanya dapat dilarutkan dalam pelarut organik sehingga agak sulit untuk menganalisis senyawa yang bersifat hidrofilik (Cahyaningsih, 2019).