



**HIDROLISAT PROTEIN KACANG TUNGGAK (*Vigna unguiculata* L.  
Walp.) BERSIFAT MENGHAMBAT AKTIFITAS ANGIOTENSIN-I  
CONVERTING ENZYME (ACE-I)**

**SKRIPSI**

Oleh

**M BAZAR AHMADI  
NIM 131710101076**

**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN  
2018**



**HIDROLISAT PROTEIN KACANG TUNGGAK (*Vigna unguiculata* L.  
Walp.) BERSIFAT MENGHAMBAT AKTIFITAS ANGIOTENSIN-I  
CONVERTING ENZYME (ACE-I)**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Progran Studi Teknologi Hasil Pertanian (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Teknologi Pertanian

Oleh

**M BAZAR AHMADI  
NIM 131710101076**

**KEMENTRIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN  
2018**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT yang telah memberikan limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga saya mendapat kesempatan untuk hidup dan menuntut ilmu, beserta Nabi Muhammad SWA yang menjadi tauladan saya;
2. Bangsa dan Tanah Airku Indonesia;
3. Keluarga saya Bapak Kuswadi, Bapak Ali Mustofa dan Ibu Umi Sofiyah yang selalu menjadi orang tua sigap dalam segala hal. Doa dan bimbingan mereka selalu diberikan kepada saya;
4. Guru dan dosen yang telah mendidik dan memberikan ilmunya dengan tulus sedari taman kanak-kanak hingga di perguruan tinggi;
5. Keluarga besar Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember dan saudara seangkatan 2013 serta almamater Universitas Jember;
6. *Center for Development of Science and Technology (CDAST) Universitas Jember.*

**MOTTO**

“Sesungguhnya Allah tidak akan mengubah keadaan suatu kaum sebelum mereka mengubah keadaan diri mereka sendiri.” (terjemahan QS: Ar-Ra'd:11)<sup>\*)</sup>



---

\*) Departemen Agama Republik Indonesia. 1998. Al Qur'an dan Terjemahannya. Semarang: PT Kumudasmoro Grafindo.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : M Bazar Ahmadi

NIM : 131710101076

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul ” Hidrolisat Protein Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata* L. Walp.) Bersifat Menghambat Aktifitas *Angiotensin-I Converting Enzyme* (ACE-I)” adalah sungguh dilakukan sendiri di bawah koordinasi proyek penelitian dengan peneliti utama Prof. Dr. Ir. Tejasari, M.Sc, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada instansi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang saya junjung tinggi.

Dengan pernyataan ini saya buat sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 18 Juli 2018  
Yang menyatakan,

M Bazar Ahmadi  
131710101076

**SKRIPSI**

**HIDROLISAT PROTEIN KACANG TUNGGAK (*Vigna unguiculata* L.  
Walp.) BERSIFAT MENGHAMBAT AKTIFITAS ANGIOTENSIN-I  
CONVERTING ENZYME (ACE-I)**

Oleh

M Bazar Ahmadi  
NIM 131710101076

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Prof. Dr. Ir. Tejasari, M.Sc  
Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Ir. Sih Yuwanti, M.P

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Hidrolisat Protein Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata* L. Walp.) Bersifat Menghambat Aktifitas Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE-I)” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Rabu, 18 Juli 2018

Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

Prof. Dr. Ir. Tejasari, M.Sc  
NIP. 19610210198703002

Dr. Ir. Sih Yuwanti, M.P  
NIP. 196507081994032002

Tim Penguji

Ketua

Anggota

Dr. Ir. Herlina, M.P  
NIP. 196605181993022001

Dr. Bambang Herry, S.TP. M.Si  
NIP. 197505301999031002

Mengesahkan  
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian

Dr. Siswoyo Soekarno, S.TP., M.Eng.  
NIP. 196809231994031009



## RINGKASAN

**Hidrolisat Protein Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata* L. Walp.) Bersifat Menghambat Aktifitas Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE-I);** M Bazar Ahmadi, 131710101076; 2018; 55 halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.

Peptida bioaktif pada protein, yang tersusun atas 3-20 asam amino, memiliki aktivitas fungsional yang menguntungkan bagi kesehatan manusia. Peptida tersebut dapat menunjukkan aktivitas yang berbeda tergantung pada urutan asam amino penyusunnya, seperti aktivitas penghambatan ACE-I. Peptida tersebut dihasilkan dari proses hidrolisis secara enzimatis oleh *alcalase* dan *flavourzyme*. Kedua protease tersebut mampu memotong spesifik ikatan peptida sehingga menghasilkan peptida dengan urutan asam amino seperti Lys-Asp-Try-Arg-Leu atau Val-Thr-Pro-Ala-Leu-Arg yang memiliki kemampuan penghambatan ACE-I. Salah satu sumber protein nabati yang dapat digunakan untuk menghasilkan peptida tersebut adalah protein kacang tunggak. Pada penelitian ini protein kacang tunggak dihidrolisis menggunakan *alcalase* atau *flavourzyme* untuk menghasilkan peptida yang memiliki aktivitas penghambatan ACE-I. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kadar protein tepung kacang tunggak, ekstrak protein dan hidrolisat protein kacang tunggak, menentukan aktivitas penghambatan ACE-I hidrolisat protein kacang tunggak, menentukan derajat hidrolisis, serta kelarutan hidrolisat protein.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang terdiri atas 3 (tiga) tahapan yaitu: 1) ekstraksi protein kacang tunggak, 2) hidrolisis protein kacang tunggak, dan 3) analisis aktivitas penghambatan ACE-I hidrolisat protein, kadar protein tepung kacang tunggak, ekstrak dan hidrolisat proteinnya, derajat hidrolisis dan kelarutan hidrolisat. Data dianalisis menggunakan uji deskriptif dan disajikan dalam tabel, grafik dan histogram. Selain itu digunakan juga data



sekunder yang yang diperoleh dari beberapa referensi dan beberapa penelitian terkait.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan protein kacang tunggak sebesar 19,3 persen, dan 64,2 persen pada ekstrak proteinnya. Sementara itu, hidrolisat protein kacang tunggak terhidrolisi *alcalase* dan *flavourzyme* memiliki kandungan protein sebesar 59,2 persen dan 47,9 persen, secara berturut-turut. Protein kacang terhidrolisis *alcalase* dan *flavourzyme* menghasilkan derajat hidrolisis sebesar 49 persen dan 34 persen secara berturut-turut. Selain itu, hidrolisat ini juga mampu menghambat aktivitas ACE-I berturut-turut sebesar 80 persen pada penggunaan *alcalase* dan 77 persen pada *flavourzyme*. Hidrolisat protein kacang tunggak terhidrolisis *alcalase* paling larut pada pH 8 senilai 96 persen, lebih tinggi daripada kelarutan hidrolisat terhidrolisis *flavourzyme* senilai 86 persen. Hidrolisat protein kacang tunggak terhidrolisis *alcalase* dan *flavourzyme* dengan kelarutan terendah pada kedua hidrolisat terjadi pada pH 5 senilai 41 dan 34 persen.

## SUMMARY

**ACE-I Inhibitor Activity of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) Protein Hydrolysate from Enzymatic Process;** M Bazar Ahmadi, 131710101076; 2018; 55 pages; Department of Agricultural Products Technology, Faculty of Agricultural Technology, University of Jember.

Bioactive peptide in protein, those made up of 3-20 amino acids, have functional activity that is advantage to human health. The peptide may exhibit different activities depending on the sequence of amino acids, such as ACE-I inhibitor activity. These peptide can be produced from the enzymatic hydrolysis process using alcalase or flavourzyme. Both proteases are capable to cleaving specific peptide bonds to produce peptides with amino acid sequences such as Lys-Asp-Try-Arg-Leu or Val-Thr-Pro-Ala-Leu-Arg which have ACE-I inhibitor capability. One source of vegetable protein that can be used to produce the peptide is protein of cowpea. In this study the cowpea protein was hydrolyzed using alcalase or flavourzyme to produce ACE-I inhibitor peptides. The aim of this study is to Identify protein content in cowpea flour, protein extract and cowpea protein hydrolyzate, to determine ACE-I inhibition activity on cowpea protein hydrolyzate, to determine degree of hydrolysis, and solubility of protein hydrolyzate.

This study was carried out in three stages: 1) extraction of cowpea protein, 2) hydrolysis of cowpea protein, and 3) analysis of ACE-I inhibitory activity of protein hydrolyzete, total protein content of cowpea flour, extract and hydrolysate, degree of hydrolysis and hydrolysate solubility. Data were analyzed using descriptive test and presented in tables, graphs and histograms. In addition, secondary data are also obtained from several references and some related research.

The results showed that protein content in cowpea flour was 19.3 percent and 64.2 percent in protein extract. Meanwhile, protein content in hydrolysate prepared with alcalse and flavourzyme had 59.2 percent and 47.9 percent, respectively. Moreover, hydrolysis of cowpea proteins hydrolyzed with alcalase

and flavourzyme had 49 percent and 34 percent degree of hydrolysis, respectively. Cowpea protein hydrolyzed with alcalase and flavourzyme were able to inhibit ACE-I activity by 80 percent and 77 percent, respectively. Hydrolysis of cowpea proteins hydrolyzed with alcalase most soluble at at pH 8 was 96 percent, higher than the solubility of flavourzyme hydrolysate was 86 percent. Hydrolyzate of cowpea protein hydrolyzed alcalase and flavourzyme with the lowest solubility in both hydrolyzates occurs at pH 5 of 41 and 34 percent.



## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Hidrolisat Protein Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) Berpotensi Sebagai Penghambat ACE-I”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan Strata Satu (S1) pada Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Dengan selesainya penyusunan skripsi ini, penulis menyampaikan rasa terimakasih kepada semua pihak yang telah memberikan dukungan, bimbingan dan membantu dalam penyusunan skripsi ini, yang antara lain adalah sebagai berikut:

1. Dr. Siswoyo Soekarno, S.TP., M.Eng. selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
2. Dr. Ir. Jayus selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Jember;
3. Prof. Dr. Ir. Tejasari, M.Sc. selaku Dosen Pembimbing Akademik dan Dosen Pembimbing Utama yang telah memberi kepercayaan bagi saya ikut dalam Program Penelitian Hibah Kompetensi 2016-2017 serta membimbing dalam penyusunan skripsi;
4. Dr. Ir. Sih Yuwanti, M.P selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberi bimbingan dan bantuan dalam penyusunan skripsi;
5. Dr. Ir. Herlina, M.P dan Dr. Bambang Herry, S.TP. M.Si selaku penguji yang telah memberikan arahan dalam penyempurnaan skripsi;
6. Ayah Kandung Kuswadi, Ayah Tiri Ali Mustofa, Ibu Umi Sofiah, Adik Nur Kholim, Alivia Dewi terspesial, beserta keluarga besar yang selalu memberikan do'a dan dukungan serta telah mencurahkan segala perhatian selama ini;
7. Rekan penelitian HIKOM 2016 (Yuna Luki Afsari, Faiqotul Aulia, Nurdiana Agustina dan Yoshinta Puspitasari);

8. Seluruh teknisi laboratorium jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian dan Laboratorium CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*), Universitas Jember;
9. Teman-teman K-Hunter (Nena, Faiq, Entong, Qori, Hanip) serta teman-teman Kontrakkan Bidadari yang telah selalu memberikan hiburan saat suntuk;
10. Teman-teman FTP 2013 khususnya Keluarga Cemara THP A 2013 yang telah menemani studi, memberi dukungan, motivasi, serta pelajaran hidup bersama selama masa perkuliahan hingga pengerjaan skripsi; dan
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah memberikan do'a, dukungan, bantuan dan bimbingan selama pengerjaan skripsi.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini karena penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Semoga penelitian ini dapat memberikan manfaat bagi penulis dan dapat menambah wawasan pembaca.

Jember, Mei 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iii
HALAMAN MOTO .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN .....	viii
SUMMARY .....	x
PRAKATA .....	xii
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR TABEL .....	xvii
DAFTAR GAMBAR .....	xviii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xix
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Perumusan Masalah .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Tujuan .....</b>	<b>2</b>
<b>1.4 Manfaat .....</b>	<b>3</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Kacang Tunggak .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Enzime Protease .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3 Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE-I) .....</b>	<b>8</b>
<b>2.4 Hidrolisis Enzimatis Protein .....</b>	<b>9</b>
<b>2.5 Hidrolisat protein .....</b>	<b>11</b>
<b>2.6 Peptida Penghambat Angiotensin-I Converting         Enzyme (ACE-I) .....</b>	<b>12</b>



2.7 Derajat Hidrolisis .....	14
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>16</b>
3.1 Rancangan Penelitian .....	16
3.2 Rancangan Percobaan .....	16
3.3 Bahan dan Alat Penelitian .....	17
3.3.1 Bahan Penelitian .....	17
3.3.2 Alat Penelitian .....	17
3.4 Prosedur Analisis .....	18
3.4.1 Ekstraksi Protein Kacang Tunggak .....	18
3.4.2 Hidrolisis Protein Secara Enzimatis .....	20
3.4.3 Analisis Kadar Protein .....	22
3.4.4 Analisis Derajat Hidrolisi .....	24
3.4.5 Analisis Kelarutan .....	24
3.4.6 Uji Aktivitas Penghambatan ACE-I .....	24
3.5 Analisis Data .....	25
<b>BAB 4. PEMBAHASAN .....</b>	<b>26</b>
4.1 Kadar Protein Kacang Tunggak .....	26
4.2 Ekstrak Protein Kacang Tunggak .....	27
4.3 Kadar Protein dari Hidrolisat Protein Kacang Tunggak .....	29
4.4 Derajat Hidrolisis (DH) .....	30
4.5 Kelarutan Hidrolisat Protein Kacang Tunggak .....	32
4.6 Aktivitas Penghambatan ACE-I ( <i>Angiotensin     Converting Enzyme-I</i> ) .....	34
<b>BAB 5. PENUTUP .....</b>	<b>36</b>
5.1 Kesimpulan .....	36
5.2 Saran .....	36



<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	37
<b>LAMPIRAN</b> .....	44



**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1 Kandungan gizi utama kacang tunggak per 100 g .....	5
2.2 Komposisi asam amino protein kacang tunggak (g/100 g protein) ..	6
2.3 Contoh urutan asam amino pada peptida antihipertensi .....	13
4.1 Kadar protein kacang tunggak hasil penelitian dan referensi (wb) ...	26
4.2 Data kadar protein dari ekstrak protein kacang tunggak .....	28
4.3 Kadar protein pada hidrolisat protein hasil penelitian dan referensi .	29
4.4 Derajat hidrolisis protein kacang tunggak terhidrolisis <i>alcalase</i> dan <i>flavourzyme</i> terbanding kacang pada referensi .....	30
4.5 Aktivitas penghambatan ACE-I hidrolisat protein kacang tunggak terhidrolisis <i>alcalase</i> dan <i>flavourzyme</i> terbanding hidrolisat kacang referensi .....	34

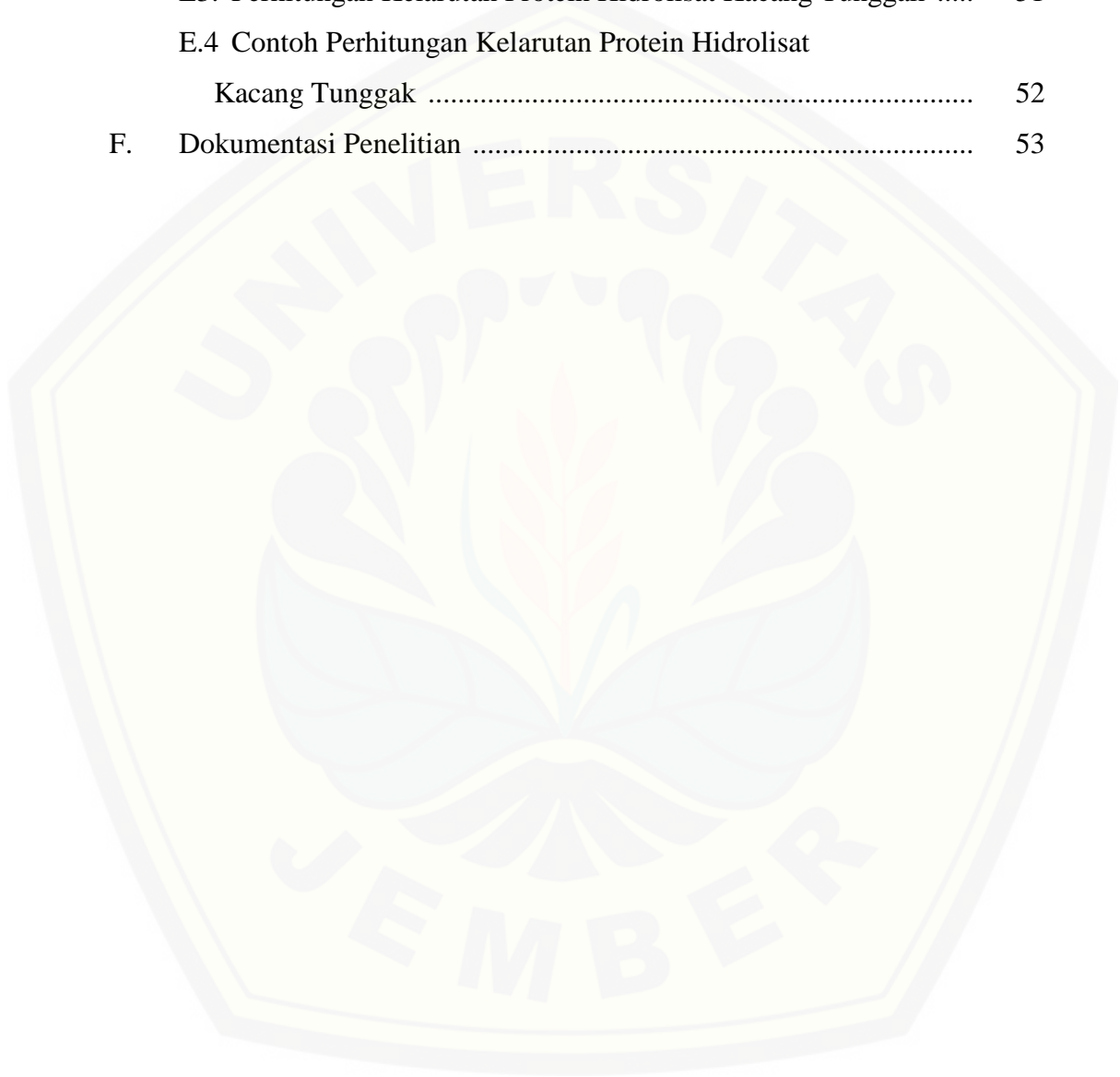
**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Kacang tunggak .....	4
2.2 Cara kerja hidrolisis protein dari jenis eksopeptidase dan Endopeptidase .....	8
2.3 Skema hidrlisis protein secara enzimatis .....	11
2.4 Skema penghambatan ACE-I .....	16
3.1 Rancangan percobaan .....	17
3.2 Penepungan kacang tunggak .....	18
3.3 Diagram alir proteses <i>defatting</i> .....	20
3.4 Ekstraksi protein kacang tunggak .....	21
3.5 Hidrolisis enzimatis ekstrak protein kacang tunggak .....	22
4.1 Kelarutan protein pada hidrolisat protein kacang hijau terhidrolisis enzim alcalase dan flavourzyme .....	32

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Data Dan Perhitungan Analisis Kadar Protein Kacang Tunggak .....	45
A.1 Data Analisis Kadar Protein Kacang Kratok .....	45
A.2 Perhitungan Analisis Kadar Protein Kacang Tunggak .....	45
A.3 Contoh Perhitungan Kadar Protein (% wb) Kacang Tunggak ..	45
B. Data dan Perhitungan Analisis Kadar Protein Ekstrak Protein dan Hidrolisat Protein Kacang Tunggak .....	46
B.1 Kurva Standar BSA ( <i>Bovine Serum Albumin</i> ) .....	46
B.2 Data Analisis Kadar Protein Ekstrak dan Hidrolisat Protein Kacang Tunggak .....	46
B.3 Perhitungan Analisis Kadar Protein Ekstrak dan Hidrolisat Protein Kacang Tunggak .....	47
B.4 Contoh Perhitungan Kadar Protein (% wb) .....	47
C. Data dan Perhitungan Analisis Derajat Hidrolisis .....	47
C.1 Data Analisis Derajat Hidrolisis Hidrolisat Protein Kacang Tunggak .....	47
C.2 Perhitungan Konsentrasi Protein Hidrolisat Protein Kacang Tunggak .....	48
C.3 Perhitungan Analisis Derajat Hidrolisis Hidrolisat Protein Kacang Tunggak .....	48
C.4 Contoh Perhitungan Derajat Hidrolisis .....	48
D. Data dan Perhitungan Uji Aktivitas Penghambatan ACE-1 Hidrolisat Protein Kacang Tunggak .....	49
D.1 Data Pengukuran Absorbansi Uji Penghambatan ACE-I Hidrolisat Protein Kacang Tunggak .....	49
D.2 Perhitungan Uji Penghambatan ACE-I Hidrolisat Protein Kacang Tunggak .....	49
D.3 Contoh Perhitungan Uji Penghambatan ACE-I .....	49
E. Data dan Perhitungan Uji Kelarutan Protein Hidrolisat	

Kacang Tunggak .....	50
E.1 Data Uji Kelarutan Protein Hidrolisat Kacang Tunggak .....	50
E.2 Perhitungan Konsentrasi Protein Hidrolisat	
Kacang Tunggak dalam NaOH .....	50
E3. Perhitungan Kelarutan Protein Hidrolisat Kacang Tunggak .....	51
E.4 Contoh Perhitungan Kelarutan Protein Hidrolisat	
Kacang Tunggak .....	52
F. Dokumentasi Penelitian .....	53



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Protein sangat dibutuhkan oleh semua makhluk hidup karena mempunyai fungsi utama yang kompleks dalam semua proses biologis dan mudah diserap oleh tubuh dalam bentuk peptida dan asam amino (Katili, 2009). Beberapa peptida pada protein juga mempunyai efek menguntungkan bagi kesehatan manusia seperti antihipertensi, dengan cara menghambat aktivitas ACE-I (*Angiotensin-I Converting Enzyme*). ACE-I dalam tubuh manusia mampu mengkonversi *angiotensin-I* yang merupakan *decapeptide* (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) menjadi *octapeptide* (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) atau *angiotensin-II*. *Angiotensin-II* merupakan vasokonstriktor yang sangat kuat dan mampu menaikkan tekanan darah (Ahmed dan Muguruma, 2010).

Peptida penghambat ACE-I memiliki ciri seperti mengandung asam amino hidrofobik dengan rantai samping didominasi asam amino alifatik seperti Ile, Gly, Leu dan Val pada ujung peptida, atau tripeptida yang memiliki dasar asam amino (Lys, Arg) atau prolin pada posisi keduanya (Leo dkk, 2009). Peptida ini akan berkompetisi dengan ACE-I, sehingga susunan protein ACE-I termodifikasi dan substrat (*angiotensin I*) tidak bisa berikatan dengan sisi enzim tersebut (Ryan dkk., 2011). Peptida penghambat ACE-I dapat dilepaskan dari protein induknya melalui proses hidrolisis enzimatis seperti menggunakan *alcalase* atau *flavourzyme* (Forghani dkk., 2012). Kedua protease tersebut memiliki kemampuan memotong ikatan peptida dengan spesifik. *Alcalase* dapat memotong ikatan peptida yang memiliki asam amino hidrofobik (Doucet dkk., 2003), sementara *flavourzyme* mampu memotong asam amino tunggal atau dipeptida dan spesifik dalam memotong ikatan peptida pada asam amino leusin yang terletak pada gugus amina (Fonseca dkk., 2016).

Peptida penghambat ACE-I pertama diisolasi dari bisa ular (Cheung dan Chushman, 1973). Setelah itu banyak sumber protein baik nabati maupun hewani yang diteliti seperti kacang hijau (Li dkk., 2005), daging merah (Arihara dkk,



2001), *chickpea* (Clemente dkk., 1999), teripang gama (Khirzin dkk, 2015), koro kratok dan buncis (Betancur-Ancona dkk., 2009). Kacang tunggak merupakan salah satu sumber protein yang belum sepenuhnya diteliti khususnya di Indonesia. Kacang ini mengandung protein sebesar 23 persen hingga 32 persen (Diouf, 2011) serta asam amino bersifat hidrofobik, seperti Ala, Gly, Leu, Val, Ile, Phe, Pro, Cys dan Met, membuat kacang ini berpotensi menghasilkan peptida penghambat ACE-I (Segura-Campos, dkk., 2013). Selain ketersediaanya yang melimpah, harga kacang tersebut juga murah sehingga dengan hidrolisis yang tepat maka dapat dihasilkan peptida dalam jumlah banyak pula (Aluko, 2015). Oleh karena itu perlu dilakukan pengujian lebih lanjut mengenai hidrolisis kacang tunggak secara enzimatik menggunakan *alcalase* dan *flavourzyme* untuk mendapatkan hidrolisat protein yang memiliki kemampuan penghambatan ACE-I.

## 1.2 Rumusan Masalah

Peptida dengan kemampuan menghambat aktivitas ACE-I dapat dihasilkan melalui proses hidrolisis enzimatik. Penggunaan *alcalase* atau *flavourzyme* pada proses hidrolisis mampu menghasilkan peptida dengan kemampuan penghambatan ACE-I karena kedua protease tersebut memotong ikatan peptida secara spesifik dan cenderung menghasilkan peptida dengan residu asam amino hidrofobik. Keberhasilan proses hidrolisis dapat diketahui dengan menghitung derajat hidrolisisnya (DH). Hidrolisat protein dari kacang tunggak dapat digunakan untuk menghasilkan peptida dengan kemampuan penghambatan ACE-I. Selain itu, proses hidrolisis juga mampu merubah sifat fisik seperti daya larut hidrolisat karena tereksposnya asam amino dengan gugus hidrofilik yang berada didalam protein.

## 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk:

1. Menentukan kadar protein kacang, ekstrak protein dan hidrolisat protein kacang tunggak;



2. Menentukan derajat hidrolisis protein dari hidrolisat protein kacang tunggak terhidrolisis *alcalase* dan *flavourzyme*;
3. Mengetahui persen aktivitas penghambatan ACE-I dari hidrolisat protein kacang tunggak terhidrolisis *alcalase* dan *flavourzyme*;
4. Menentukan kelarutan hidrolisat protein kacang tunggak terhidrolisis *alcalase* dan *flavourzyme*.

#### 1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi tentang pemanfaatan protein kacang sebagai bahan nutraseutikal antihipertensi;
2. Menambah temuan hidrolisat dengan kemampuan penghambatan ACE-I dari protein nabati.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kacang Tunggak

Kacang tunggak (*Vigna unguiculata* L. Walp.) yang diperkirakan berasal dari Afrika Barat ini sudah lama dibudidayakan di Indonesia dan merupakan kerabat kacang panjang (Kasno dan Winarto, 1998). Kacang ini banyak ditemui pada daerah tropis dan subtropis dan biasanya digunakan sebagai sumber protein untuk kebutuhan konsumsi manusia maupun pakan ternak (Freitas dkk., 2004). Selain mengandung protein yang cukup tinggi, kacang ini juga mudah untuk dibudidayakan dan harganya relatif terjangkau (Pagarra, 2011). Penggunaan kacang tunggak dalam industri makanan pun juga sudah banyak digunakan dikarenakan tidak terdapat kandungan yang membahayakan (Rangel dkk., 2004). Gamber kacang tunggak dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Kacang tunggak

Di Indonesia kacang tunggak dikenal dengan nama kacang tolo. Tanaman ini termasuk salah satu anggota famili leguminosae dengan sistematika sebagai berikut:

Kingdom : Plantae  
Divisio : Spermatophyta

Subdivisio : Angiospermae  
 Class : Dycotyledoneae  
 Ordo : Polypetalae  
 Famili : Leguminosae  
 Subfamili : Papilionaceae  
 Genus : Vigna  
 Spesies : *Vigna unguiculata* (Kasno dan Winarto, 1998).

Kacang tunggak mengandung protein sebesar 22,9 % (BKPPP, 2012), dimana juga terdapat senyawa globulin lebih dari 51% dari total protein dan albumin sekitar 45%. Pada globulin mengandung fraksi visilin dan berpotensi sebagai antimikroba (Freitas dkk., 2004). Isolat protein kacang tunggak memiliki banyak kegunaan diantaranya sebagai pelarut, emulsifier, dan foaming agen (Rangel dkk., 2004). Selain protein, kacang tunggak juga mengandung berbagai macam kandungan gizi lainnya seperti karbohidrat, lemak, vitamin, dan mineral. Kandungan gizi kacang tunggak per 100 g berat kering dapat dilihat pada Tabel 2.1 .

Tabel 2.1 Kandungan gizi utama kacang tunggak per 100 g berat kering

Kandungan	Jumlah
Kalori (kal)	339,1
Karbohidrat (g)	61,6
Serat (g)	3,7
Protein (g)	22,9
Lemak (g)	1,4
Vitamin A (SI)	30,0
Vitamin B1 (mg)	0,92
Vitamin C (mg)	2,0
Abu (g)	3,7
Kalsium (mg)	77,0
Fosfor (mg)	449,0
Besi (mg)	6,5
Air (g)	11,0

Sumber: BKPPP (2012).

Komponen protein pada kacang tunggak teakumulasi pada embrio dan kotiledon biji dan sebagian kecil terletak pada kulit biji. Protein kacang tunggak

mengandung asam amino seperti asam glutamat, asam aspartat, lisin, leusin, arginin, dan glisin yang memiliki efek antihipertensi (Vasdev dan Stuckless, 2010). Selain itu biji kacang tunggak juga mengandung beberapa asam amino esensial dan non esensial. Komposisi asam amino protein kacang tunggak per 100 g protein dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Komposisi asam amino protein kacang tunggak (g/100 g protein)

Jenis Asam amino		Singkatan tiga huruf	Jumlah
Hidrofobik	Alanin	Ala	6,63
	Sistein*	Cys	1,24
	Isoleusin*	Ile	4,49
	Leusin*	Leu	9,45
	Methionin*	Met	0,22
	Phenilalanin*	Phe	5,58
	Prolin	Pro	4,91
	Serin	Ser	6,65
	Triptophan*	Trp	0,27
	Tirosin*	Tyr	2,13
	Valin*	Val	5,46
Hidrofilik	Arginin	Arg	3,65
	Histidin*	His	3,45
	Asam aspartat	Asp	13,03
	Lisin*	Lys	6,50
	Treonin*	Thr	4,25
	Glisin	Gly	6,63
	Asam glutamat	Glu	15,56

\*= Asam amino esensial

Sumber: Mune dkk. (2013)

Kandungan gizi kacang tunggak dapat dipengaruhi oleh jenis, sifat genetik varietas, lingkungan tumbuhnya (cara budidaya) serta iklim tempat tumbuh. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kacang tunggak dengan genotip berbeda memiliki kandungan protein yang berbeda pula (Ddamulira dkk., 2015; Adeyemi dkk., 2012; Richard dkk., 2016). Tidak hanya kandungan proteinya, genotip yang berbeda pada kacang tunggak juga mempengaruhi komposisi asam aminonya seperti kandungan Val, Ile, dan Trp yang berbeda hingga 14 persen antar genotip (Carvalho dkk., 2012). Sementara itu pada penelitian Abebe dkk. (2005)

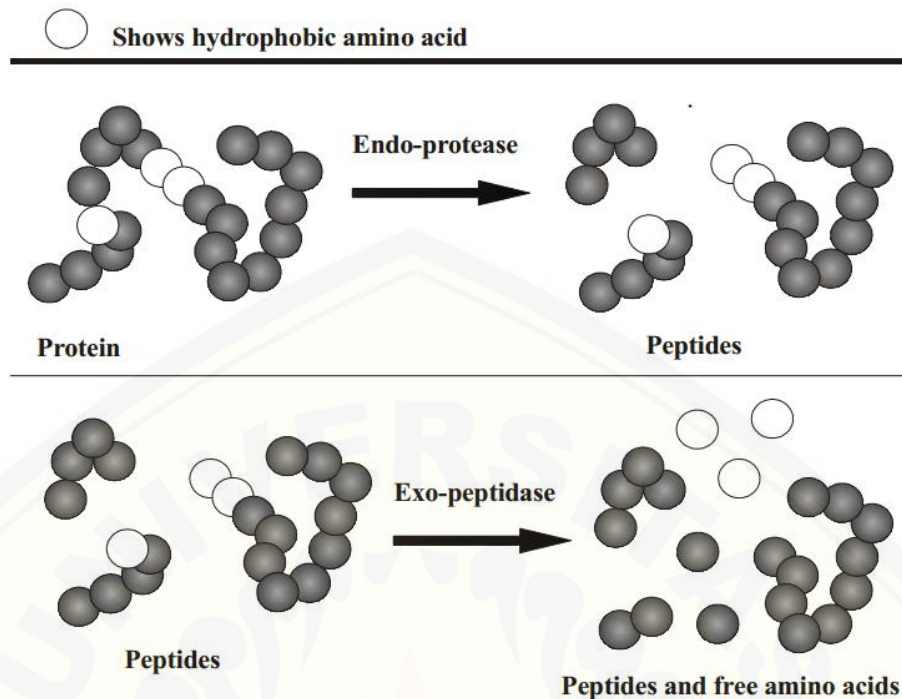
menunjukkan pengkondisian tanaman seperti penggunaan pupuk kompos mampu meningkatkan kandungan proteinya daripada tanpa penggunaan pupuk kompos. Selain penelitian Labanauskas (1981) menunjukkan pengkondisian *Water stress* pada kacang tunggak akan berpengaruh terhadap kandungan asam aminonya pula. kacang tunggak yang di beri perlakuan pengirigasian selama masa pembuahan (vegetatif) namun tidak pada masa pembungaan dan sebelum pemanenan akan menghasilkan kandungan Arg tinggi. Namun perlakuan ini akan menghasilkan Trp dan Glu rendah, rendemen benih rendah, dan kandungan N tinggi.

## 2.2 Protease

Protease merupakan enzim yang berperan sebagai katalisator dalam reaksi hidrolisis protein dengan bantuan air. Enzim ini dapat dihasilkan dari tanaman, hewan atau mikroba secara ekstraseluler ataupun intraseluler. Berdasarkan kemampuan katalitiknya enzim ini dibagi menjadi eksopeptidase dan endopeptidase. Eksopeptidase merupakan protease yang mampu memnghidrolisis protein dari ujung N-terminal (aminopeptidase), C-terminal (karboksipeptidase) atau spesifik pada dipeptida (hidrolase dipeptidase), sementara endopeptidase memotong rantai polipeptida pada ikatan peptida (Buhler dkk., 2012). Cara kerja eksopeptidase dan endopeptidase dapat dilihat pada Gambar 2.2.

*Alcalase* merupakan endopeptidase yang dihasilkan dari mikroorganisme *Bacillus licheniformis* dan banyak digunakan dalam hidrolisis protein untuk menghasilkan peptida fungsional, seperti peptida antihipertensi. *Alcalase* mampu memotong ikatan peptida yang memiliki asam amino hidrofobik pada C-terminal peptida (Doucet dkk., 2003). Pada penelitian Morais dkk. (2013) dapat diketahui penggunaan enzim *alcalase* pada semua konsentrat *whey protein* yang diuji menunjukkan aktifitas penghambatan ACE-I. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa pemilihan enzim protease tersebut sebagai penghidrolisis protein dapat menghasilkan hidrolisat peptida penghambat aktivitas ACE-I karena struktur peptida terhidrolisis dan menghasilkan senyawa yang diinginkan seperti memiliki residu asam amino hidrofobik.





Gambar 2.2 Cara kerja hidrolisis protein dari jenis eksopeptidase dan endopeptidase (Chaijamrus, 2002)

*Flavourzyme* merupakan protease yang berasal dari kapang *Aspergillus oryzae* dan mengandung endo- dan eksoprotease dengan kondisi hidrolisis optimum pada kisaran pH 5.0-7.0 dan suhu 50°C (Mirdhayati, 2015). Dimungkinkan sekitar 50% hidrolisat yang dihasilkan adalah dipeptida (Segura-Campos, dkk., 2013). Selain itu, *flavourzyme* cenderung memotong leusin yang terletak pada N-terminal (Fonseca dkk., 2016). Penggunaan *flavourzyme* pada hidrolisis dapat menghasilkan peptida yang bersifat antihipertensi. Untuk menghasilkan peptida tersebut enzim ini harus mampu memotong ujung C-terminal dari peptida yang besar.

### 2.3 Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE-I)

*Angiotensin-I converting enzyme* (ACE-I) atau kinase II merupakan ektoenzim yang memiliki peran dalam regulasi peredaran darah dalam sistem renin-angiotensin. Enzim ini terikat pada membran sel endothelial, epitel, epitel

syaraf, dan otak, terlarut dalam darah dan cairan tubuh (Brown dan Vaughan 1998). Untuk menghasilkan oktapeptida angiotensin II, ACE-I akan mengkatalisis pelepasan dipeptida histidil-leusin pada ujung C-terminal dari angiotensin I. Angiotensin II ini berpotensi sebagai vasoconstrictor (penyempit pembuluh) (Riordan, 2003) dan juga menghidrolisis serta menginaktivasi vasodilatory (pelebar pembuluh) bradikinin.

Peningkatan tekanan darah oleh sistem renin-angiotensin diawali dengan terhidrolisisnya ikatan peptida angiotensinogen oleh renin, pada urutan Leu dan Val untuk menghasilkan decapeptida berupa angiotensin I (Acharya dkk., 2003). Setelah itu, ACE-I akan memotong dipeptida pada angiotensin I menjadi angiotensin II yang berupa oktapeptida. Angiotensin II ini akan berikatan dengan reseptor pada dinding pembuluh darah untuk menyebabkan kontraksi pada pembuluh darah. Pada penderita hipertensi, terjadi peningkatan aktivitas renin dan/atau ACE-I, yang menyebabkan kadar angiotensin II meningkat dan menyebabkan kontraksi pembuluh darah yang berlebih sehingga tekanan darah naik (Aluko, 2015).

Selain itu angiotensin II juga berfungsi untuk sekresi aldosteron yang menyebabkan retensi sodium sehingga meningkatkan volume cairan ekstraseluler yang mengakibatkan salah satu faktor terjadinya hipertensi. Aldosteron merupakan hormon yang mampu membuat tubula distal nefron menyerap ion natrium ( $\text{Na}^+$ ) dan air, serta meningkatkan volume dan tekanan darah (Li dkk., 2004). Menurut Hansen dkk. (1995), selain merubah angiotensin I menjadi angiotensin II, ACE-I juga mampu mendegradasi bradikinin menjadi peptida inaktif sehingga bradikinin tidak dapat diubah dan tekanan darah naik. Apabila bradikinin diubah maka sintesis prostaglandin akan meningkat dan vasodilatasi akan terbentuk dan tekanan darah menurun.

## 2.4 Hidrolisis Enzimatis Protein

Hidrolisis enzimatis dapat memotong protein menjadi asam amino dan peptida dengan ukuran yang bervariasi dengan bantuan molekul air. Hal ini terjadi ketika terpotonnya ikatan kovalen peptida antara gugus amina dan karboksil pada

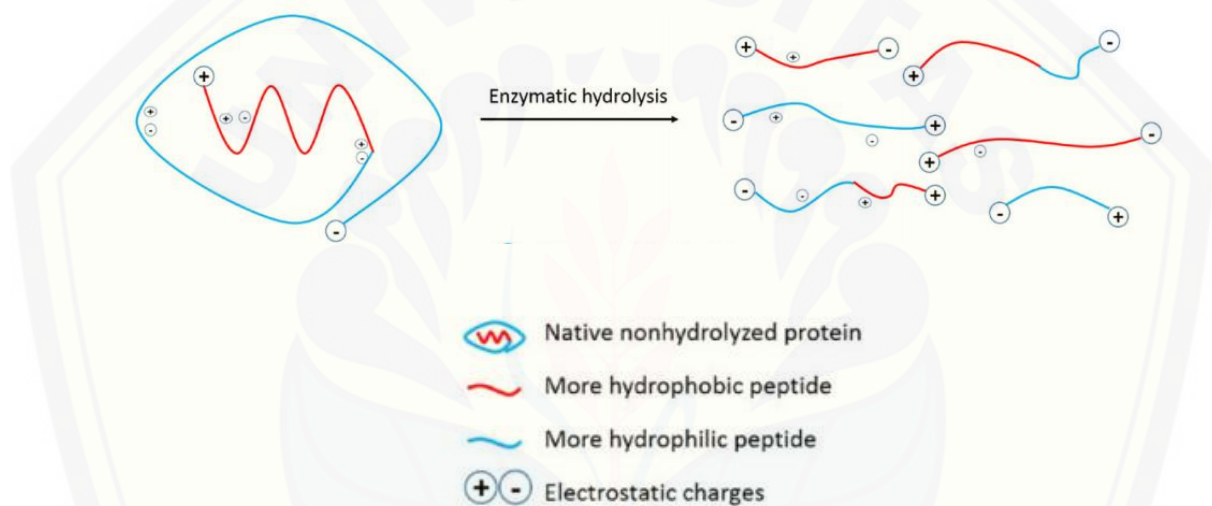


dua asam amino yang berdekatan yang dikatalis oleh peptidase. Tak hanya menurunnya berat molekul protein, proses ini juga mengakibatkan meningkatnya grup dengan kemampuan ionik dan meningkatnya kemampuan hidrofobik pada struktur protein. Efek ini berdampak pada kemampuan fungsional hidrolisat protein, tergantung pada kondisi hidrolisis yang digunakan seperti pH, temperatur, konsentrasi enzim dan substrat yang biasanya dijaga konstant atau terkontrol. Proses hidrolisis ini dapat dihentikan dengan cara inaktivasi enzim melalui pemanasan (Wouters dkk., 2016).

Penggunaan enzyme dalam hidrolisis protein harus memperhatikan temperatur dan pH spesifik tiap enzim protease. Penjagaan suhu agar tetap konstant dapat dilakukan dengan termometer dan untuk pengkondisian pH biasanya dapat dilakukan dengan penambahan alkali atau larutan asam. Hal ini dapat terjadi karena selama proses hidrolisis enzimatis proton yang terbebas dapat menurunkan pH yang dapat mengakibatkan inaktivasi enzim. Penggunaan satu enzim dalam proses hidrolisis perlu dijaga sesuai dengan kondisi optimumnya untuk menghasilkan hidrolisat yang diinginkan (Aluko, 2015). Proses hidrolisis dengan menggunakan lebih dari satu jenis enzim dapat dilakukan secara serempak jika kondisi optimum hidrolisisnya sama (Wang dkk., 2011). Tidak hanya itu lamanya proses hidrolisis perlu diperhatikan. Penggunaan waktu yang melebihi waktu optimum dapat menurunkan aktifitas hidrolisis protein karena kemungkinan beberapa peptida yang dihasilkan mengalami hidrolisis lebih lanjut menjadi potongan peptida inaktiv (Aluko, 2015).

Secara umum tidak ada protein atau enzyme spesifik yang dapat menghasilkan peptida antihipertensi, namun hidrolisis yang tepat akan menghasilkan peptida dalam jumlah banyak sehingga berpotensi untuk penggunaan komersial (Aluko, 2015). Sejauh ini beberapa variasi protein banyak digunakan untuk menghasilkan peptida antihipertensi seperti protein tanaman, hewan, dan biota laut. Selain itu enzim yang mampu menghasilkan peptida dengan ukuran kecil (<10 residu asam amino) pada proses hidrolisisnya akan menghasilkan efek antihipertensi yang lebih tinggi (Segura-Campos dkk, 2011).

Penelitian Segura-Campos dkk., (2011) menunjukkan protein kacang tunggak yang dihidrolisis menggunakan enzim *alcalase* atau *flavourzyme* memiliki sifat fungsional seperti antihipertensi. Akibat proses hidrolisis ini, tuktur asli protein dimana komponen hidrofobik berada didalam komponen hidrofilik, akan terhidrolisis menjadi peptida yang lebih kecil. Proses ini juga mengakibatkan peptida memiliki sifat hidrofobik, menurunya massa molekul protein dan pembebasan grub ionik (Wouters dkk., 2016). Skematis keseluruhan hidrolisis protein secara enzimatik dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Skema hidrlisis protein secara enzimatik (Wouters dkk., 2016).

## 2.5 Hidrolisat protein

Hidrolisat merupakan hasil dari protein yang sudah mengalami degradasi baik secara kimiawi, fermentasi maupun enzimatik dengan hasil akhir berupa senyawa protein yang lebih sederhana. Pengontrolan kondisi hidrolisis seperti pH, suhu dan waktu hidrolisis dapat menghasilkan hidrolisat protein yang berkualitas (Kristinsson, 2007). Hidrolisat dapat digolongkan menjadi dua fraksi berdasarkan karakteristiknya. Kategori pertama terdiri dari fraksi dengan kandungan asam amino tinggi, sementara kedua terdiri dari peptida bioaktif dengan urutan asam amino yang tidak aktif dalam molekul protein utuh dan menjadi aktif dalam hidrolisat setelah terhidrolisis enzimatik (Schaafsma, 2009). Produk akhir

hidrolisat dapat berupa cairan, pasta atau bubuk/tepung yang bersifat higroskopis. Hidrolisat protein yang berbentuk cair mengandung padatan sebanyak 20% sementara bentuk pasta mengandung 65% padatan (Hidayat, 2005).

Setelah proses hidrolisis, hidrolisat mungkin perlu proses lebih lanjut agar didapatkan hidrolisat yang lebih baik. Biasanya proses pasca hidrolisis yang dilakukan yaitu inaktivasi enzim dengan panas, ultrafiltrasi, dan penghilangan rasa pahit. Pengontrolan berat molekul hidrolisat protein merupakan langkah penting dalam pengembangan protein hidrolisat untuk penggunaan pangan. Penghilangan protein dan peptida dengan berat molekul yang tinggi dapat melalui ultrafiltrasi (Schaafsma, 2009).

Selain memiliki sifat fungsional, peptida pada hidrolisat juga memiliki *flavour* yang berbeda. Karakteristik rasa pada peptida sangat kompleks, namun menurut Kirimura dkk. (1969), rasa peptida dapat diklasifikasikan menjadi tiga golongan. Golongan pertama memiliki rasa asam seperti Ala-Asp dan Gly-Asp-Ser-Gly, golongan kedua pahit seperti Leu-Leu, Arg-Pro, dan Val-Val-Val, dan golongan ketiga tidak memiliki rasa seperti Lys-Glu, Phe-Phe, dan Gly-Gly-Gly-Gly.

## **2.6 Peptida Penghambat *Angiotensin-I Converting Enzyme* (ACE-I)**

Penghambatan ACE-I merupakan biomarker yang banyak diteliti terkait dengan efek antihipertensi dari peptida bioaktif bersumber bahan pangan. ACE-I sendiri dapat memotong berbagai substrat peptida dan memiliki kekhususan yang luas. Beberapa penelitian menunjukkan struktur dari peptida yang berpotensi menghambat aktivitas ACE-I pada tubuh adalah peptida dengan N-terminal mengandung residu asam amino hidrofobik, tersusun atas 2-12 asam amino. Selain itu, pada C-terminal peptida mengandung tripeptida, beresidu hidrofobik, memiliki rantai samping aromatik atau bercabang, memiliki asam amino Pro pada satu atau lebih pada tripeptida C-terminal, memiliki residu bermuatan positif pada posisi kedua, dan memiliki Arg, Lys, Tyr, pada C-terminal dari di- atau tripeptida (Norris dan FitzGerald, 2013).

Beberapa karakter peptida yang sudah terbukti memiliki aktivitas penghambatan ACE-I diantaranya adalah: peptida inhibitor ACE-I yang memiliki proline, tirosin atau triptofan pada ujung karboksil; asam amino hidrofobik dengan rantai samping didominasi alifatik seperti *glycine*, *isoleucine*, *leucine* dan *valine* pada ujung asam amino peptida; tripeptida yang memiliki dasar asam amino (*Lys*, *Arg*) atau prolin pada posisi keduanya (Leo dkk., 2009).

Menurut Cheung dkk. (1980), peptida dengan asam amino Pro, Phe atau Try pada ujung rantai C dan Val dan Ile pada ujung rantai N menunjukkan aktivitas penghambatan tinggi. Meskipun spesifikasi substrat tidak diketahui secara pasti, namun peptida yang mengikat ACE-I sangat dipengaruhi oleh urutan C-terminal dari tripeptida substrat. ACE-I cenderung berikatan dengan substrat atau inhibitor kompetitif yang mengandung residu asam amino hidrofobik (rantai samping aromatik atau bercabang) pada tiga posisi C-terminal. Selain itu C-terminal Lys atau Arg dengan muatan positif pada kelompok  $\epsilon$ -amino juga meningkatkan aktivitas penghambatan. Beberapa contoh urutan asam amino pada peptida antihipertensi bersumber bahan pangan nabati dapat dilihat pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Contoh urutan asam amino pada peptida antihipertensi

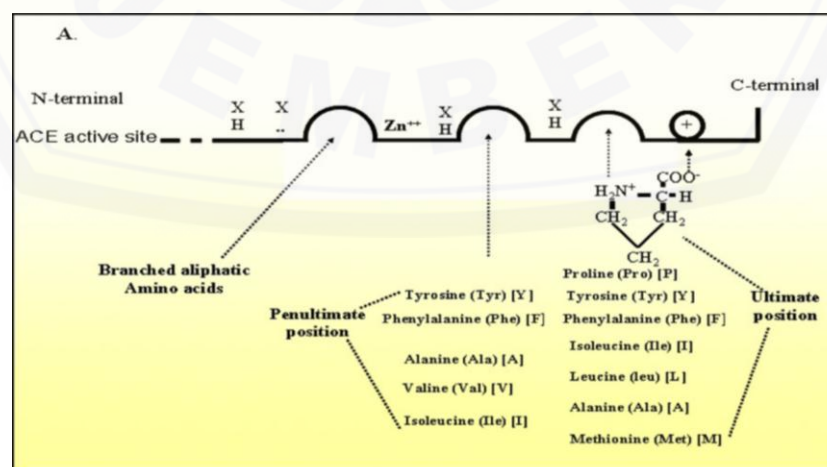
No	Urutan Peptida	Sumber Protein	Protease
1	Ile-His-Arg-Phe	Glutelin padi	<i>Chymotrypsin</i>
2	Met-Arg-Trp	Bayam	<i>Pepsin + Pancreatin</i>
3	Met-Arg-Trp-Arg-Asp	Bayam	<i>Pepsin + Pancreatin</i>
4	Ile-Ala-Tyr-Lys-Pro-Ala-Gly	Bayam	<i>Pepsin + Pancreatin</i>
5	Val-Asn-Pro	Padi	<i>Alcalase + Trypsin</i>
6	Val-Trp-Pro	padi	<i>Alcalase + Trypsin</i>
7	Ile-Tyr	<i>Rapeseed</i>	<i>Alcalse</i>
8	Val-Trp	<i>Rapeseed</i>	<i>Alcalse</i>
9	Arg-Ile-Tyr	<i>Rapeseed</i>	<i>Alcalse</i>
10	Trp-Tyr-Thr	Biji ganja	<i>Pepsin + Pancreatin</i>
11	Trp-Val-Tyr-Tyr	Biji ganja	<i>Pepsin + Pancreatin</i>
12	Ser-Val-Tyr-Thr	Biji ganja	<i>Pepsin + Pancreatin</i>
13	Ile-Arg-Leu-Ile-Ile-Val-Leu-Met-Pro-Ile-Leu-Met-Ala	Ganggang merah	<i>Papain</i>

Sumber: Aluko (2015).



Tripeptida pada C-terminal dengan konfigurasi asam amino L terbukti memiliki penghambatan lebih besar daripada konfigurasi D. Penelitian Maruyama dkk. (1987) menunjukkan tripeptida L-Val-Ala-Pro memiliki  $IC_{50}$  sebesar  $2 \mu M$ , sementara dalam bentuk D-Val-Ala-Pro meningkat menjadi  $550 \mu M$ . selain itu peningkatan  $IC_{50}$  juga terjadi pada L-Phe-Val-Ala-Pro, yang menunjukkan bahwa panjangnya rantai asam amino pada peptida mempengaruhi aktifitas penghambatan ACE-I (Murray dan Fitz, 2007). Tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian Wu dkk. (2006), pengujian model dipeptida mampu menghambat hingga 71,1 persen, sementara model tripeptida memiliki kekuatan penghambatan 43,3 persen. Selain itu, model dipeptida menunjukkan bahwa asam amino dengan rantai samping hidrofobik yang luas disukai oleh ACE-I sementara pada model tripeptida yaitu yang memiliki residu aromatik pada C-terminal, residu bermuatan positif pada posisi kedua, dan residu hidrofobik pada N-terminalnya.

Peptida penghambat ACE-I akan berikatan dengan ACE-I pada tubuh dan dipengaruhi oleh kehidrofobikan residu tripeptida pada C-terminalnya (Wilson dkk., 2011). Pada posisi pertama sisi aktif ACE-I lebih cenderung berikatan dengan asam amino dengan rantai samping alifatik bercabang. pada posisi kedua dari belakang sisi aktifnya enzim ini cenderung berikatan dengan asam amino alifatik, basa dan aromatik. Sementara itu, pada posisi terakhir lebih cenderung berikatan pada prolin dan beberapa asam amino alifatik. Sekema penghambatan ACE-I dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Sekema penghambatan ACE-I

## 2.7 Derajat Hidrolisis

Derajat Hidrolisis (DH) adalah persen ikatan peptida relatif ( $h$ ) yang dipotong berbanding total jumlah ikatan per unit berat ( $h_{\text{tot}}$ ) (Adler-Nissen, 1986). Persentase ikatan peptida yang terlepas akibat proses hidrolisis dinyatakan dengan derajat hidrolisis sehingga derajat hidrolisis dapat digunakan untuk memonitoring proses hidrolisis (Silvestre dkk., 2013). Penentuan derajat hidrolisis dapat dilakukan melalui beberapa metode analisis seperti metode *formol titration*; *o-phthaldialdehyde (OPA)*; *osmometry*; dan *soluble protein content in trichloroacetic acid* (Haslaniza dkk., 2010).

Prinsip dari *soluble protein content in trichloroacetic acid* adalah cairan hidrolisat ditambahkan TCA hingga konsentrasi 10 % (w/v) kemudian dianalisis kandungan proteinya. TCA akan memaksa protein untuk mengendap dengan cara mengasingkan protein yang terikat pada air. Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa sifat asam TCA penting dalam perubahan konformasi (bentuk) yang memicu protein untuk mengendap (Rajalingam dkk., 2009). Sementara itu peptida yang terhidrolisis akan terlarut pada TCA yang tidak mengendap (Montecalvo dkk., 1984).

Secara umum pengendapan protein dengan TCA dapat kategorikan menjadi beberapa golongan berdasarkan konsentrasi TCA yang digunakan. Pada konsentrasi TCA dibawah 5% (w/v) terjadi peningkatan keasaman sehingga jumlah protein yang mengendap mulai meningkat. Apabila konsentrasi TCA 5% sampai 45% (w/v) protein mengendap dalam jumlah maksimal. Sedangkan konsentrasi diatas 45% (w/v) akan mengakibatkan penurunan jumlah protein yang mengendap secara drastis dan pada konsentrasi diatas 60% (w/v) jumlah protein yang mengendap sangat sedikit (Rajalingam dkk., 2009).



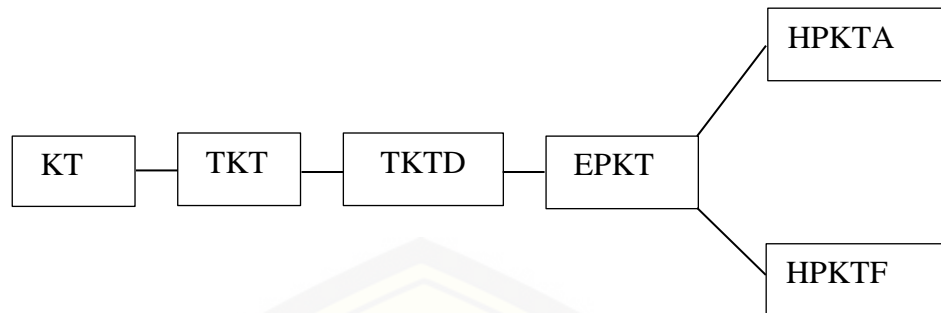
## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang terdiri atas 3 (tiga) tahapan yaitu: 1) ekstraksi protein kacang tunggak, 2) hidrolisis protein kacang tunggak, dan 3) analisis hidrolisat protein kacang tunggak. Analisis yang dilakukan terdiri dari analisis aktivitas penghambatan ACE-I hidrolisat protein kacang tunggak, kadar protein total kacang tunggak, kadar protein ekstrak dan hidrolisat protein kacang tunggak, derajat hidrolisis dan kelarutan hidrolisat protein. Penelitian tahap 1 dilakukan di Laboratorium Rekayasa Proses Hasil Pertanian, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember dan Laboratorium Divisi *Nutraceutical* dan *Pharmaceutical*, CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*), Universitas Jember. Tahap ke-2 dan ke-3 dilakukan di Laboratorium Divisi *Nutraceutical* dan *Pharmaceutical*, CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*), Universitas Jember. Pelaksanaan penelitian ini pada bulan Mei 2017 sampai September 2017.

### 3.2 Rancangan Percobaan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan perlakuan perbedaan jenis enzim protease yaitu *alcalase* dan *flavourzyme* pada proses hidrolisis protein kacang. Masing-masing perlakuan dilakukan pengukuran sebanyak enam kali dan data hasil penelitian dianalisis secara deskriptif. Rancangan percobaan secara skematis dapat dilihat pada Gambar 3.1. Parameter analisis yang diamati dari penelitian ini yaitu kadar protein total metode Kjeldahl (AOAC, 2001), kadar protein metode *Lowry* (Purwanto, 2014), derajat hidrolisis (Silvestre dkk., 2013), aktivitas penghambatan ACE-I (Li dkk., 2005) dan kelarutan hidrolisat Protein (Muhamyankaka dkk., 2013).



Gambar 3.1 Rancangan percobaan

## Keterangan:

KT : Kacang tunggak

TKT : Tepung kacang tunggak

TKTD : Tepung kacang tunggak *defatting*

EPKT : Ekstrak protein kacang tunggak

HPKTA : Hidrolisat protein kacang tunggak terhidrolisis *alcalase*HPKTF : Hidrolisat protein kacang tunggak terhidrolisis *flavourzyme***3.3 Bahan dan Alat Penelitian****3.3.1 Bahan Penelitian**

Bahan utama yang digunakan adalah kacang tunggak yang diperoleh dari Pasar Tanjung, Jember. Enzim yang digunakan meliputi *alcalase* 2.4L (2,4 U/g) (P4860 Sigma), *flavourzyme* 500L (500 U/g) (P6110 Sigma), HHL (Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucine) (H1635 Sigma) dan ACE-I dari paru-paru kelinci (2.0 units/mg protein) (A6778 Sigma). Bahan kimia yang digunakan antara lain n-heksan (Merck), NaOH (Merck), 1 M HCl (Mediss), K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Puslit Kimia LIPI), CuSO<sub>4</sub> (Puslit Kimia LIPI), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Puslit Kimia LIPI), MMB (Mediss), asam borat, *trichloroacetic acid* (TCA) (Merck), *bovine serum albumin* (BSA) (Sigma), *Lowry A (Folin-Ciocalteu)* (Merck) (larutan asam *phosphotungstat-phosphomolybdat*) dengan aquades 1:1), *Lowry B* (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% dalam NaOH 1 N, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 1%, sodium potassium tartarat 2%), sodium buffer borat pH 8,3, buffer solution pH 7 (Merck), aquades.

**3.3.2 Alat Penelitian**

Alat utama yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Freeze dryer* (CHRIST Alpha 1-2 LD plus), *shaking waterbath* (Stuart SBS40), sentrifuse (Tomy MRX-150 dan Hitachi CR21GIII), pH meter (Horiba F-51), LAF (Laminar

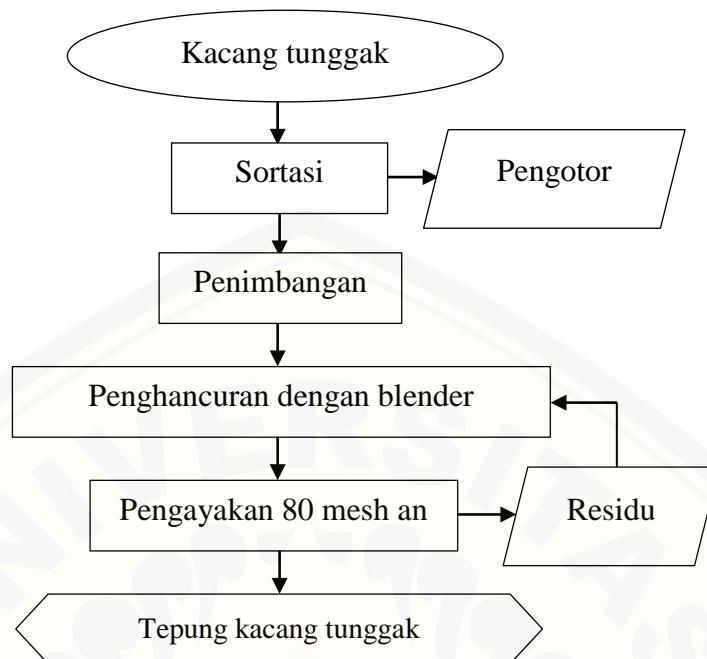
Air Flow) (Nuair), spektrofotometer (Hitachi tipe U-2900 UV-Vis), labu kjeldahl, destilator (BUTCHI K-355) dan buret. Alat lain yang digunakan meliputi blender kering, ayakan 80 mesh, termometer, plate stirer, magnetic stirer, timbangan analitik, vortex, mikropipet, mikropipet tip, pipet tetes dan alat-alat gelas.

### 3.4 Prosedur Analisis

#### 3.4.1 Ekstraksi Protein Kacang Tunggak

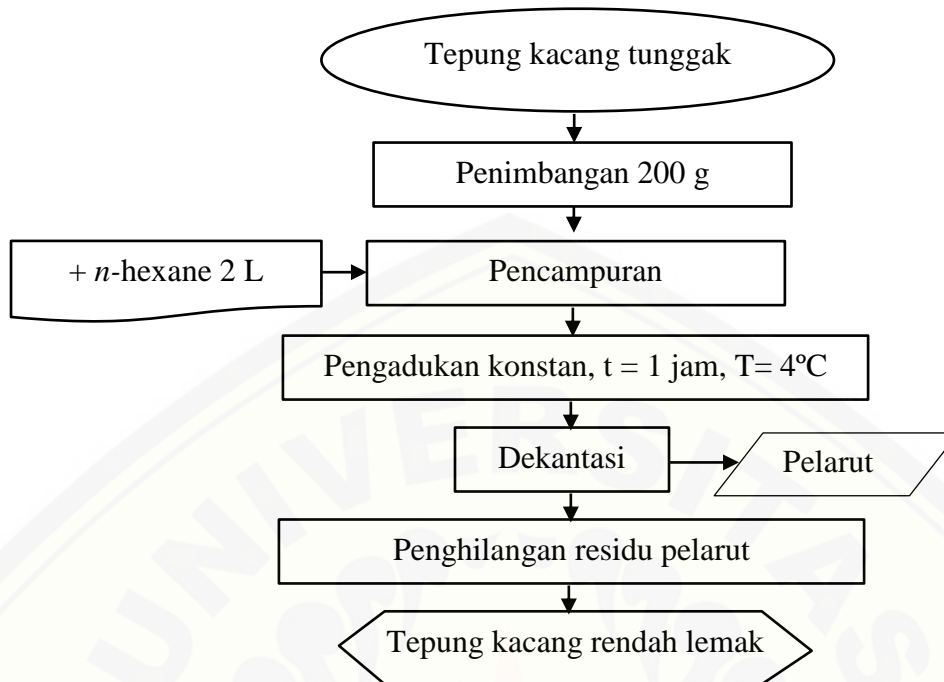
**Penepungan kacang tunggak.** Kacang tunggak dibersihkan dari pengotor seperti kerikil, ranting, atau biji kacang yang cacat. Selanjutnya biji kacang bersih dilakukan pengecilan ukuran menggunakan blender kering dan dilakukan pengayakan dengan ayakan 80 mesh untuk memperoleh ukuran tepung yang seragam. Tepung yang tak lolos selanjutnya dilakukan pengecilan ukuran lagi dan dilakukan pengayakan hingga lolos ayakan 80 mesh. Penepungan kacang tunggak dapat dilihat pada Gambar 3.2.

**Defatting.** Proses *defatting* dilakukan sesuai metode Viernes dkk. (2012). Proses ini bertujuan untuk menghilangkan lemak yang terdapat pada bahan sehingga mempermudah proses selanjutnya. Biji kacang yang sudah halus hasil pengayakan 80 mesh dilakukan penimbangan 100 gram. Selanjutnya tepung ditempatkan di *beaker glass* dan ditambahkan *n*-hexane 1 L (1:10 (w/v)) dan dilakukan *defatting* pada *cooling room* untuk menjaga suhu konstan 4°C selama 1 jam dengan pengadukan konstan. Setelah itu pelarut dihilangkan dengan dekantasi dan tepung dikering anginkan hingga kering dan aroma *n*-hexan hilang. Tepung rendah lemak selanjutnya disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan. Diagram alir proses *defatting* kacang tunggak dapat dilihat pada Gambar 3.3.



Gambar 3.2 Penepungan kacang tunggak

**Ekstraksi Protein.** Ekstraksi protein mengacu pada Salcedo-Chavez dkk. (2002) yang menggunakan prinsip presipitasi isoelektrik protein. Sebanyak 80 gram kacang tunggak rendah lemak diencerkan dengan menambahkan aquades 1:6 (w/v). Selanjutnya dilakukan pengaturan pH 11 dengan menambahkan 1 M NaOH. Setelah pH tercapai, dilakukan pengadukan dengan stirer secara konstan selama 2 jam pada suhu ruang. Pada kondisi basa tersebut protein kacang dapat larut. Setelah itu sampel disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit. Supernatan yang didapat selanjutnya dipresipitasi protein pada pH isoelektriknya (pH 4,5) dengan penambahan 1 N HCL dan pengadukan konstant hingga pH stabil. Setelah pH tercapai dilanjutkan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C untuk memisahkan protein dan sisa bahan-bahan terlarut. Endapan yang didapat selanjutnya dikeringkan dengan *freeze dryer* dan disimpan pada suhu 4°C untuk dilakukan analisis selanjutnya. Proses ekstraksi protein dapat dilihat pada Gambar 3.4.

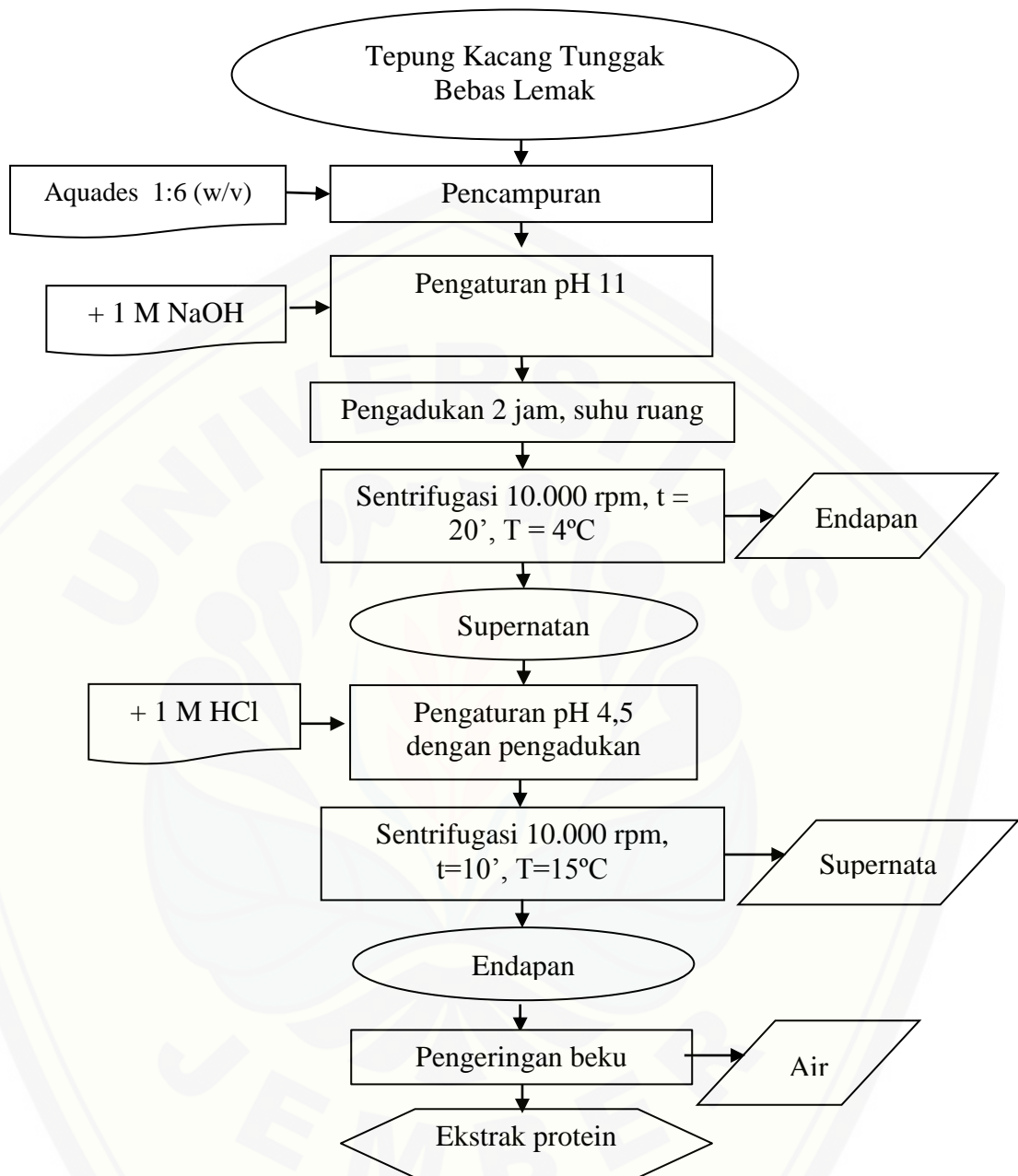


Gambar 3.3 Diagram alir proses *defatting*

#### 3.4.2 Hidrolisis Protein Secara Enzimatis (Segura-Campos dkk., 2013).

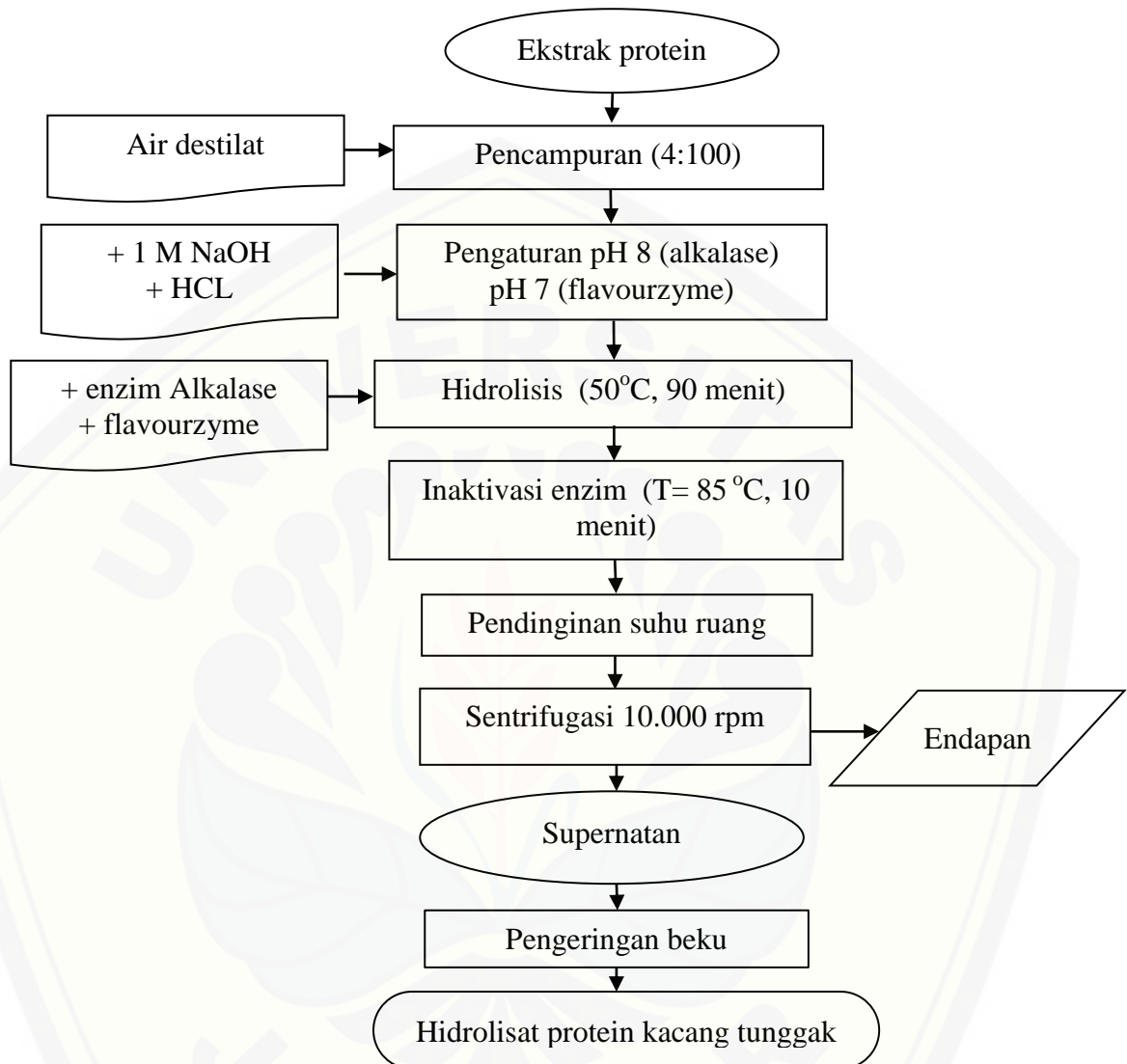
Sebanyak 4 gram ekstrak protein yang sudah kering disuspensikan dalam air distilat hingga volumenya 100 ml (4/100 w/v) dan dilakukan pengadukan dengan *stirrer*. Selanjutnya suspensi diatur pHnya pada suhu pH 8 untuk *alcalase* dan pH 7 untuk *flavourzyme* dengan menambahkan 1 M NaOH untuk selanjutnya suspensi diberi penambahan enzim. Proses hidrolisis enzimatis dilakukan selama 90 menit pada suhu 50°C dengan pengadukan konstan. Rasio enzim/substrat yang ditambahkan yaitu 1/10. Proses hidrolisis diakhiri dengan inaktivasi enzim menggunakan pemanasan selama 10 menit pada suhu 80°C selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C untuk memisahkan supernatan dengan endapan. Supernatan yang dihasilkan yaitu berupa hidrolisat protein yang mengandung campuran peptida dan asam amino, kemudian hasil tersebut disimpan pada suhu -20°C hingga digunakan lebih lanjut. Diagram alir hidrolisis enzimatis dapat dilihat pada Gambar 3.5.





Gambar 3.4 Ekstraksi protein kacang tunggak





Gambar 3.5 Hidrolisis enzimatis ekstrak protein kacang tunggak

### 3.4.3 Analisis Kadar Protein

Analisis kadar protein dilakukan dengan 2 cara yaitu: 1) Kadar protein metode Kjeldahl untuk tepung kacang; dan 2) kadar protein metode *Lowry* untuk ekstrak protein dan hidrolisat protein kacang tunggak.

**Metode Kjeldahl (AOAC, 2001).** Sampel berupa tepung kacang tunggak sebanyak 1 gram dimasukkan kedalam labu kjeldahl dan ditambahkan pula 7 g  $K_2SO_4$ , 0,8 g  $CuSO_4$ , dan 12 mL  $H_2SO_4$  pekat ke dalam labu tersebut. Selanjutnya

dilakukan proses destruksi menggunakan panas 420°C pada pada ruang asam selama  $\pm 1$  jam hingga larutan berwarna jernih. Setelah itu ditambahkan 80 ml aquades dan 50 ml NaOH 40% (w/w) dan dilakukan destilasi. Hasil destilasi ditampung pada erlenmeyer yang berisi 30 ml larutan H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1% dan indikator metil merah (MM) dan metil biru (MB) 2 tetes. Larutan kemudian dititrasikan menggunakan HCL 0,1 N hingga berubah warna, blanko yang digunakan adalah aquades 1 ml. Total N atau % protein sampel dihitung berdasarkan rumus berikut:

$$N\% = \frac{(ml\ HCL\ sampel - ml\ HCL\ blanko)}{berat\ sampel \times 10} \times N\ HCL \times 14,008$$

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

**Metode Lowry.** Analisis kadar protein dari ekstrak protein dan hidrolisat protein kacang tunggak dilakukan dengan metode *Lowry* berdasarkan Purwanto, (2014).. Sampel sebanyak 0.05 gram dilarutkan dengan aquades hingga 50 ml untuk mendapatkan larutan sampel dengan konsentrasi 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Reagen kompleks yang digunakan merupakan campuran 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dalam aquades, 1% CuSO<sub>4</sub> dalam aquades dan 2% Na-K-tatrat dalam aquades dengan perbandingan 100:1:1. Larutan sampel yang sudah dibuat selanjutnya dipipet sebanyak 0.1 ml dan ditambah 0.1 ml NaOH 2N untuk dihidrolisis pada waterbath selama 100°C selama 10 menit. Setelah didinginkan, ditambahkan reagen kompleks sebanyak 1 ml dan dibiarkan 10 menit pada suhu ruang setelah divorteks. Setelah itu ditambahkan 0.1 ml larutan Folin dan segera divorteks untuk selanjutnya didiamkan selama 20 menit. Warna biru yang terbentuk pada larutan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm untuk ditentukan konsentrasinya sesuai dengan hasil kurva standart yang didapat. Sebagai standart digunakan Bovine Serum Albumin (BSA) dengan konsentrasi 0 hingga 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Untuk persen protein pada bahan dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Protein} = \frac{\text{konsentrasi protein} \left( \frac{mg}{ml} \right) \times FP}{\text{Berat Sampel}} \times 100\%$$

#### 3.4.4 Analisis Derajat Hidrolisis (Silvestre dkk., 2013)

Derajat hidrolisis ditentukan dengan menghitung persen protein terlarut dalam 10 g% (w/v) *trichloroacetic acid* (TCA) berbanding dengan total protein sampel. Sebanyak 500 µl larutan hidrolisat dengan konsentrasi 1000 µg/ml dicampur dengan 500 µl larutan TCA dengan konsentrasi 20 g% untuk didapatkan larutan sampel dengan konsentrasi TCA 10 g%. Setelah itu larutan didiamkan selama 30 menit dan disentrifugasi pada 3000×g. Supernatan yang diperoleh selanjutnya dianalisis kadar protein terlarutnya menggunakan metode *Lowry* (Purwanto, 2014). Persentase derajat hidrolisis (DH) ditentukan dengan persamaan sebagai berikut:

$$\text{DH (\%)} = \frac{\text{Protein terlarut dalam 10 g\% TCA (mg)}}{\text{Total Protein (mg)}} \times 100 \%$$

#### 3.4.5 Kelarutan Protein Hidrolisat (Muhamyankaka dkk., 2013)

Kelarutan protein dari hidrolisat ditentukan dengan melarutkan sampel pada pH 3, 5, 7, 8, 9, 10, dan 11. Sampel sebanyak 0,05 gram dilarutkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 50 ml untuk selanjutnya ditambahkan 1 M NaOH dan 1 M HCL hingga mencapai pH yang ditentukan dan distirer selama 30 menit. Selanjutnya sampel disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Kadar protein sampel pada supernatan yang didapat ditentukan kadar proteinya dengan metode *Lowry* (Purwanto, 2014). Kadar protein total didapat dengan cara menghitung kadar protein sampel yang dilarutkan pada 0,2 M NaOH (1% b/v). Persen kelarutan protein pada hidrolisat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Kelarutan protein} = \frac{\text{kadar protein sampel}}{\text{kadar protein total}} \times 100\%$$

#### 3.4.6 Uji Aktivitas Penghambatan ACE-I (Li dkk., 2005)

Uji aktivitas penghambatan ACE-I berdasarkan metode Li dkk (2005). Sampel sebanyak 40 µl dengan konsentrasi 10 mg/ml ditambahkan 100 µl HHL (*Hip-His-Leu*) 5 mM dalam 0,1 M buffer borat pH 8,3 yang mengandung 300 mM NaCl dan campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Setelah

itu ditambahkan 10 µl enzim ACE-I dengan konsentrasi 100 mU/ml dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 150 µl HCl 1 N dan divortex hingga homogen. Selanjutnya ditambahkan 1,5 ml etil asetat untuk melarutkan asam hippurit yang dibebaskan dari *Hip-His-Leu* oleh ACE-I. Setelah itu larutan disentrifugasi dengan kecepatan 1000g selama 10 menit lalu diambil 1 ml supernatan yang mengandung etil asetat yang mengandung asam hippurit untuk diuapkan etil asetatnya. Penguapan etil asetat dilakukan dengan cara memanasi sampel pada air mendidih. Asam *hippuric* yang didapatkan selanjutnya diencerkan dengan menambahkan 3 ml aquades dan divorteks. Larutan yang terbentuk dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 228 nm, absorbansi yang didapat dimasukkan rumus berikut untuk mendapatkan tingkat % penghambatan ACE-I. Persen penghambatan ACE-I dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Aktivitas penghambatan ACE-I (\%)} = [(B - A)/(B - C)] \times 100$$

Keterangan:

A = nilai absorbansi dengan penambahan ACE-I dan sampel

B = nilai absorbansi kontrol (buffer menggantikan sampel)

C = nilai absorbansi blanko (HCL ditambahkan sebelum ACE-I)

### 3.6 Analisis Data

Data dianalisis menggunakan uji deskriptif dan disajikan dalam tabel dan grafik yang merupakan data primer dari kadar protein, derajat hidrolisis, uji aktivitas penghambatan ACE-I dan kelarutan protein hidrolisat. Selain itu digunakan juga data sekunder yang yang diperoleh dari beberapa referensi dan beberapa penelitian terkait. Data yang diperoleh dari analisis pengujian diolah dengan bantuan Microsoft Excel 2010.

## BAB 5 PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kacang tunggak sebagai bahan utama dalam penelitian ini memiliki kandungan protein 19,3 persen. Hasil dari ekstraksi protein kacang tersebut memiliki kandungan protein sebesar 64,2 persen. Selain itu, hidrolisat protein kacang tunggak terhidrolisis *alcalase* memiliki kadar protein sebesar 59,2 persen, lebih tinggi dari pada penggunaan *flavourzyme* (47,9%) pada proses hidrolisisnya.

Hidrolisis protein kacang tunggak secara enzimatis menggunakan *alcalase* dan *flavourzyme* menghasilkan derajat hidrolisis sebesar 49 persen dan 34 persen, secara berturut-turut. Sementara pada pengujian aktivitas ACE-I (*Angiotensin-I Converting Enzyme*) protein kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) terhidrolisis *alcalase* dan *flavourzyme* didapatkan hasil sebesar 80 persen dan 77 persen, secara berturut-turut. Hasil ini tergolong dalam kategori penghambatan yang tinggi karena memiliki nilai penghambatan lebih dari 50-60 persen dalam menghambat aktivitas ACE-I. Selain itu, hidrolisat protein kacang tunggak, baik yang terhidrolisis *alcalase* maupun *flavourzyme*, memiliki kelarutan tertinggi pada pH 8 dengan nilai 96 persen pada penggunaan *alcalase*, dan 86 persen pada penggunaan *flavourzyme*. Sementara itu pada pH 5 kedua hidrolisat memiliki kelarutan terendah (41 persen pada penggunaan *alcalase* dan 34 persen pada *flavourzyme*).

### 5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai identifikasi fraksi hidrolisat protein yang dihasilkan sehingga diketahui komponen spesifik yang mampu menghambat aktivitas ACE-I. Selain itu, perlu dikaji lebih lanjut tentang penerimaan konsumen terhadap hidrolisat protein kacang tunggak jika dijadikan produk untuk dikonsumsi.



**DAFTAR PUSTAKA**

- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 2001. *Official Method of Analysis*. Arlington, USA: The Association of Official Analytical Chemist, Inc.
- [BKPPP] Badan Ketahanan Pangan dan Penyuluhan Provinsi DIY. 2012. Data Kandungan Gizi Bahan Pangan dan Hasil Olahannya. <http://bkppp.bantulkab.go.id>. [Diakses pada 7 Oktober 2017].
- Abebe, G., B. Hattar, dan A. R. M. Al-Tawaha. 2005. Nutrient Availability as Affected by Manure Application to Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) on Calacarious Soils. *Journal Of Agriculture & Social Sciences* 1(1): 1-6.
- Acharya, K. R., E. D. Sturrock, J. F. Riordan, dan M. R. W. Ehlers. 2003. ACE Revisited: a New Target for Structure-Based Drug Design. *Nat. Rev.* 2: 891–902.
- Adeyemi, S., F. B. Lewu, P. O. Adebola, G. Bradley, dan A. I. Okoh. 2012. Protein Content Variation in Cowpea Genotypes (*Vigna unguiculata* L. Walp.) Grown in The Eastern Cape Province of South Africa as Affected by Mineralised Goat Manure. *African Journal of Agricultural Research* 7(35): 4943-4947.
- Adler-Nissen, J. 1986. *Enzymic Hidrolysis of Food Proteins*. London: Elsevier Applied Science.
- Ahhmed, A. M. dan M. Muguruma. 2010. A review of meat protein hydrolysates and hypertension. *Meat Science* 86(1): 110–118.
- Aluko, R. E. 2015. Antihypertensive Peptides from Food Proteins. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 6: 235–262.
- Aremu, M. O., S. S. Audu, dan B. L. Gav. 2017. Comparative Review of Crude Protein and Amino Acid Composition of Some Leguminous Seeds Grown in Nigeria. *International Journal of Sciences* 6(8): 87-97.
- Arihara, K., Y. Nakashima, T. Mulkai, S. Ishikawa, dan M. Itoh. 2001. Peptide Inhibitors for Angiotensin I-Converting Enzyme from Enzymatic Hydrolysates of Porcine Skeletal Muscle Proteins. *Meat Sci.* 57(3):319-324.
- Balti, R., A. Bougatef, N. E. Ali, D. Zekri, A. Barkia, dan M. Nasri. 2010. Influence of Degree Hydrolysis on Functional Properties and Angiotensin I-Converting Enzyme-Inhibitory Activity of Protein



- Hydrolysates from Cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-products. *J Sci Food Agric.* 90(12): 2006-2014.
- Betancur-Ancona, D., R. Martinez-Rosando, A. Corona-Cruz, A. Castellanos-Ruelas, M. E. Jaramillo-Flores, dan L. Chel-Guerrero. 2009. Functional Properties of Hydrolysates From *Phaseolus lunatus* Seeds. *International Journal of Food Science and Technology* 44(1): 128–137.
- Brown, N. J., dan D. E. Vaughan. 1998. Angiotensin converting enzyme inhibitors. *Circulation* 97(14): 1411-1420.
- Buhler, M., J. Limper, A. Muller, G. Schwarz, O. Simon, M. Sommer, dan W. Spring. 2012. *Enzymes in Animal Nutrition*. Germany: AWT (Arbeitsgemeinschaft für Wirkstoffe in der Tierernährung e.V).
- Carrera, C. S., C. M. Reynoso, G. J. Funes, M. J. Martinez, J. Dardanelli, dan S. L. Resnik. 2011. Amino Acid Composition of Soybean Seeds as Affected by Climatic Variables. *Pesq.agropec.bras., Brasilia* 46(12): 1576-1587.
- Carvalho, A. F. U., N. M. Sousa, D. F. Farias, L. C. B. Rocha-Bezerra, R. M. P. Silva, M. P. Viana, S. T. Gouveia, S. S. Sampaio, M. B. Sousa, G. P. G. Lima, S. M. Moraise, C. C. Barros, dan F. R. F. Filho. 2012. Utritional Ranking of 30 Brazilian Genotypes of Cowpeas Including Determination of Antioxidant Capacity and Vitamins. *Journal of Food Composition and Analysis.* 26: 81–88.
- Chaijamrus, S. 2002. Enzymatic Hydrolysis of Renewable Vegetable Proteins to Amino Acids (*Tesis*). Hannover: Universitat Hannover.
- Cheung, H. S., dan D. W. Cushman. 1973. Inhibition of Homogeneous Angiotensin Converting Enzyme of Rabbit Lung by Synthetic Venom Peptides of *Bothrops jararaca*. *Biochimica et Biophysica Acta* 293(2): 451–463.
- Cheung, H. S., F. L. Wang, M. A. Ondetti, E. F. Sabo, dan D. W. Cushman. 1980. Binding of Peptide Substrates and Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme. Importance of The COOH-terminal Dipeptide Sequence. *J Biol Chem.* 255(2): 401-407.
- Cheung, I. W. Y., S. Nakayama, M. N. K. Hsu, A. G. P. Samaranayaka, dan E. C. Y. Li-Chan. 2009. Angiotensin I-converting Enzyme Inhibitory Activity of hydrolysates from Oat (*Avena sativa*) Proteins by in Silico and in Vitro Analyses. *J. Agric. Food. Chem.* 57(19): 9234:9242.
- Clemente, A., J. Vioque, R. Sanchez-Vioque, J. Pedroche, dan F. Millan. 1999. Production of Extensive Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Protein Hydrolysates with Reduced Antigenic Activity. *J. Agric. Food Chem.* 47(9): 3776–3781.

- Ddamulira, G., C. A. F. Santos, P. Obuo, M. Alanyo, dan C. K. Lwanga. 2015. Grain Yield and Protein Content of Brazilian Cowpea Genotypes under Diverse Ugandan Environments. *American Journal of Plant Sciences* 6: 2074-2084.
- Diouf, D. 2011. Recent advances in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) [Walp.] “omics” research for genetic improvement. *African Journal of Biotechnology* 10(15): 2803-2810.
- Doucet, D., D. E. Otter, S. F. Gauthier, dan E. A. Foegeding. 2003. Enzyme-Induced Gelation of Extensively Hydrolyzed Whey Proteins by Alcalase: Peptide Identification and Determination of Enzyme Specificity. *J. Agric. Food Chem.* 51(21): 6300–6308.
- El-Jasser, A. S. H. 2011. Chemical and Biological Properties of Local Cowpea Seed Protein Grown in Gizan Region. *International Scholarly and Scientific Research & Innovation* 5(8): 466-472.
- Fonseca, R. A. S., C. M. Silva, G. R. Fernandes, dan C. Prentice. 2016. Enzymatic Hydrolysis of Cobia (*Rachycentron canadum*) Meat and Wastes Using Different Microbial Enzymes. *International Food Research Journal* 23(1): 152-160.
- Forghani, B., A. Ebrahimpour, J. Bakar, A. A. Hamid, Z. Hassan, dan N. Sari. 2012. Enzyme Hydrolysates from *Stichopus horrensas* a New Source for Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 12: 1-9.
- Freitas, R. L., R. T. Artur, dan B. F. Ricardo. 2004. Characterization of the Proteins from *Vigna unguiculata* Seeds. *J. Agric. Food Chem.* 52(6): 1682–1687.
- Frota, K. M. G., L. A. R. Lopes, I. C. V. Silva, dan J. A. G. Areas. 2017. Nutritional Quality of The Protein of *Vigna unguiculata* L. Walp and its Protein Isolate. *Revista Ciência Agronômica* 48(5): 792-798.
- Ghaly, A. E., dan F. N. Alkoaik. 2010. Extraction of Protein from Common Plant Leaves for Use as Human Food. *Am. J. Appl. Sci.* 7(3): 323-334.
- Gimenez, B., A. Aleman, P. Montero, dan M. C. Gomez-Guillen. 2009. Antioxidant and Functional Properties of Gelatin Hydrolysates Obtained from Skin of Sole and Squid. *Food Chem* 114(3): 976–983.
- Gotou, T., T. Shinoda, S. Mizuno dan N. Yamamoto. 2009. Purification and Identification of Proteolytic Enzymes from *Aspergillus oryzae* Capable of Producing The Antihypertensive Peptide *Ile-Pro-Pro*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107(6): 615–619.

- Hansen, K., U. Nyman, U. W. Smith, A. Adersen, L. Gudiksen, S. Rajasekharan, dan P. Pushpangadan. 1995. In vitro screening of traditional medicines for anti-hypertensive effect based on inhibition of the angiotensin converting enzyme (ACE). *J Ethnopharmacol* 48(1): 43-51.
- Hanslaniza, H., M. Y. Maskat, W. M. W. Aida, dan S. Mamot. 2010. The Effects of Enzyme Concentration, Temperature and Incubation Time on Nitrogen Content and Degree of Hydrolysis of Protein Precipitate from Cockle (*Anadara Granosa*) Meat Wash Water. *International Food Research Journal* 17(1): 147-152.
- He, R., A. Alashi, S. A. Malomo, A. T. Girgih, D. Chao, X. Ju, dan R. E. Aluko. 2013. Antihypertensive and Free Radical Scavenging Properties of Enzymatic Rapeseed Protein Hydrolysates. *Food Chem.* 141: 153–159.
- Hettiarachchy, N. S., dan U. Kalapathy. 1997. Solubility and Emulsifying Properties of Soy Protein Isolates Modified by Pancreatin. *Journal of Food Science* 62(6): 1110–1115.
- Hidayat, T. 2005. Pembuatan Hidrolisat Protein dari Ikan Selar Kuning (*Caranx leptolepis*) dengan menggunakan enzim papain. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Humiski, I. M. dan R. E. Aluko. 2007. Physicochemical and Bitterness Properties of Enzymatic Pea Protein Hydrolysates. *Journal of Food Science*. 72(8): 605-611.
- Kasno, A. dan A. Winarto. 1998. Kacang Tunggak. *Monograf Balitbang*. 3: 1-19
- Katili, A. S. 2009. Struktur dan Fungsi Protein Kalogen. *Jurnal Pelangi Ilmu* 2 (5): 19-29.
- Khalid, I. I., dan S. B. Elharadallou. 2013. Functional Properties of Cowpea (*Vigna Ungiculata L.Walp*), and Lupin (*Lupinus Termis*) Flour and Protein Isolates. *J Nutr Food Sci*. 3(6): 1-6.
- Khirzin, M. H., Sukarno, N. D. Yuliana, Y. N. Fawzya, dan E. Chasanah. 2015. Aktivitas Inhibitor Enzim Pengubah Angiotensin (ACE) dan Antioksidan Peptida Kolagen dari Teripang Gama (*Stichopus variegatus*). *JPB Kelautan dan Perikanan* 10(1): 27-35.
- Kirimura, J., A. Shimizu, A. Kimizuka, T. Ninomiya, dan N. Katsuya. 1969. The Contribution of Peptides and Amino Acids to the Taste of Foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 17(4): 689-695.
- Kristinsson, H. G. 2007. *Aquatic Food Protein Hydrolysates in: Shahidi F. Maximising the Value of Marine By-Product*. Boca Raton: CRC Pr.

- Labanauskas, C. K., P. Shouse, L. H. Stolzy, dan M. F. Handy. 1981. Protein and Free Amino Acids in Field-Grown Cowpea Seeds as Affected by Water Stress at Various Growth Stages. *Plant and Soil* 63: 355-368.
- Leo, F. D., S. Panarese, R. Gallerani, and L. R. Ceci. 2009. Angiotensin Converting Enzyme (ACE) dan Peptides: Production and Implementation of Functional Food. *Current Pharmaceutical Design* 15(31): 3622-3643.
- Li, G. H., G. W. Le, Y. H. Shi, dan S. Shrestha. 2004. Angiotensin I- Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Food Proteins and Their Physiological and Pharmacological Effects. *Nutrition Research* 24(7): 469 – 486.
- Li, G. H., G. W. Le, H. Liu dan Y. H. Shi. 2005. Mung-bean protein hydrolysates obtained with Alcalase® exhibit angiotensin I-converting enzymeinhibitory activity. *Food Science and Technology International* 11(4): 281-287.
- Lim, T. K. 2012. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 1, Fruits*. New York: Springer Science Business Media.
- Maruyama, S., H. Mitachi, H. Tanaka, N. Tomizuka, dan H. Suzuki. 1987. Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzymeinhibitors derived from casein. *Agricultural and Biological Chemistry* 51: 1581-1586.
- Mirdhayati, I. 2015. Karakterisasi Peptida Inhibitor *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) Hidrolisat Daging Kambing Kacang (*Capra aegagrus hircus linn*) dalam Potensinya sebagai Ingredien Pangan Fungsional. *Disertasi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Montecalvo, J., S. M. Constantinides, dan C. S. T. Yang. 1984. Enzymatic Modification of Fish Frame Protein Isolate. *Jurnal Of Food Science* 49(5): 1305-1309.
- Morais, H. A., M. P. C. Silvestre, V. D. M. Silva, M. R. Silva, A. C. S. Silva, dan J. N. Silveira. 2013. Correlation between the Degree of Hydrolysis and the Peptide Profile of Whey Protein Concentrate Hydrolysates: Effect of the Enzyme Type and Reaction Time. *American Journal of Food Technology*, 8(1): 1-16.
- Muhamyankaka, V., C. F. Shoemaker, M. Nalwoga, dan X. M. Zhang. 2013. Physicochemical Properties of Hydrolysates from Enzymatic Hydrolysis of Pumpkin (*Cucurbita moschata*) Protein Meal. *International Food Research Journal* 20(5): 2227-2240.



- Mune, M. A. M., S. R. Minka, I. L. Mbome. 2013. Chemical Composition and Nutritional Evaluation of a Cowpea Protein Concentrate. *Glo. Adv. Res. J. Food. Sci. Technol* 2(3): 35-43.
- Murray, B. A., dan G. R. J. Fitz. 2007. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Proteins: Biochemistry, Bioactivity, And Production. *Current Pharmaceutical Design* 13(8): 773-791.
- Mwasaru, M. A., K. Muhammad, J. Bakar, dan Y. B. C. Man. 1999. Effects of Isolation Technique and Conditions on The Extractability, Physicochemical and Functional Properties of Pigeonpea (*Cajanus cajan*) and Cowpea (*Vigna unguiculata*) Protein Isolates. *Food Chemistry* 67(4): 435-443.
- Norris, R. dan R. J. FitzGerald. 2013. *Antihypertensive Peptides from Food Proteins*. Dalam *Bioactive Food Peptide in Healh and Disease*. Editor Hernandez-Ledesma, B. dan C. Hsieh. Kroasia: Intech.
- Onwuliri, V. A., dan J. A. Obu. 2002. Lipids and Other Constituents of *Vigna unguiculata* and *Phaseolus vulgaris* Grown in Northern Nigeria. *Food Chemistry* 78(1): 1-7.
- Pagarra, H. 2011. Pengaruh Lama Perebusan Terhadap Kadar Protein Tempe Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*). *Bionature* 12(1): 15-20.
- Pedroche, J., M. M. Yust, J. Giron-Calle, M. Alaiz, F. Millan, dan J. Vioque. 2002. Utilisation of Chickpea Protein Isolates for Production of Peptides with Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82(9): 960-965.
- Purwanto, M. G. M. 2014. Perbandingan Analisa Kadar Protein Terlarut dengan Berbagai Metode Spektroskopi *UV-VISIBLE*. *Jurnal Sains dan Teknologi* 2 (7): 64-71.
- Rajalingam D., C. Loftis, J. J. Xu, and T. K. S. Kumar. 2009. Trichloroacetic Acid-Induced Protein Precipitation Involves the Reversible Association of a Stable Partially Structured Intermediate. *Protein Science* 18(5): 980-993.
- Rangel, A., K. Saraiva, P. Schwengber, M. S. Narciso, G. B. Domont, S. T. Ferreira dan C. Pedrosa. 2004. Biological Evaluation of a Protein Isolate From Cowpea (*Vigna unguiculata*) Seeds. *Food Chemistry* 87(4): 491-499.
- Richard, U. A., C. M. Idegba, I. E. Isaac, A. Ileleji, dan H. Bozeinghien. 2016. Seed Protein Content Variation in Cowpea Genotypes. *African Journal of Plant Breeding* 3(1): 143-147.

- Riordan, J. F. 2003. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biol* 4(8): 1-5.
- Rui, X., J. I. Boye, B. K. Simpson, dan S. O. Prasher. 2012. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Properties of *Phaseolus vulgaris* Bean Hydrolysates: Effects of Different and Enzymatic Digestion Treatments. *Food Research International*. 49(2): 739-746.
- Ryan, J. T., R. P. Ross, D. Bolton, G. F. Fitzgerald, dan C. Stanton. 2011. Bioactive Peptides from Muscle Sources: Meat and Fish. *Nutrients* 3(9): 765-791.
- Sabetha, E. T., A. T. Modi, dan L. G. Owoeye. 2015. Cowpea Crude Protein as Affected by Cropping System, Site and Nitrogen Fertilization. *Journal of Agricultural Science* 7(1): 224-234.
- Salcedo-Chaves, B., J. A. Osuna-Castro, F. Guevara-Lara, J. Dominguez-Dominguez dan O. Paredes-Lopez. 2002. Optimization of the Isoelectric Precipitation Method to Obtain Protein Isolates from Amaranth (*Amaranthus cruentus*) Seeds. *J. Agric. Food Chem*, 50(22): 6515–6520.
- Schaafsma, G. 2009. Safety of Protein Hydrolysates, Fractions There of and Bioactive Peptides in Human Nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition* 63(10): 1161–1168.
- Segura-Campos, M. R., L. A. Chel-Guerrero, dan D. A. Betancur-Ancona. 2011. Purification of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides from a Cowpea (*Vigna Unguiculata*) Enzymatic Hydrolysate. *Process Biochemistry* 46(4): 864–872.
- Segura-Campos, M. R., L. Espinosa-Garcia, L. A. Chel-Guerrero, dan D. A. Betancur-Acona. 2012. Effect of Enzymatic Hydrolysis on Solubility, Hydrophobicity, and *In Vivo* Digestibility in Cowpea (*Vigna unguiculata*). *International Journal of Food Properties*, 15(4): 770-780.
- Segura-Campos, M. R., F. P. Gonzales, L. C. Guerrero, dan D. Betancur-Ancona. 2013. *Vigna Unguiculata* as Source of Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory and Antioxidant Peptides. Dalam *Bioactive Food Peptide in Health and Disease*. Editor Hernandez-Ledesma, B. dan C. Hsieh. Kroasia: Intech
- Silvestre M. P. C., H. A. Morais, V. D. M. Silva, dan M. R. Silva. 2013. Degree of Hydrolysis and Peptide Profile of Whey Proteins Using Pancreatin. *J. Brazilian Soc. Food Nutr.* 38(3): 278-29.
- Torucco-Uco, J., L. Chel-Guerrero, A. Martinez-Alaya, G. Davila-Oritz, dan D. Betancur-Acona. 2009. Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory and Antioxidant Activities of Protein Hydrolysates from *Phaseolus lunatus*



- and *Phaseolus vulgaris* seeds. *Food Science and Technology* 42(10): 1597–1604.
- Vasdev, S., dan J. Stuckless. 2010. Antihypertensive Effects of Dietary Protein and Its Mechanism. *Int J Angiol* 19(1): 7-20.
- Viernes L. B. G., R. N. Garcia, M. A. O. Torio, dan M. R. N. Angelia. 2012. Antihypertensive Peptides from Vicilin, The Major Storage Protein of Mung Bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). *Journal of Biological Sciences* 12(7): 393-399.
- Walstra, P. 2003. *Physical Chemistry of Foods*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Wang, C., J. Tian, dan Q. Wang. 2011. ACE inhibitory and antihypertensive properties of apricot almond meal hydrolysate. *Eur. Food Res. Technol.* 232(3): 549–56.
- Wilson, J., M. Hayes, dan B. Carney. 2011. Angiotensin-I-Converting Enzyme and Prolyl Endopeptidase Inhibitory Peptides from Natural Sources with a Focus on Marine Processing By-Products. *Food Chemistry* 129:235–224.
- Wouters, A. G. B., I. Rombouts, E. Fierens, K. Brijis, dan J. A. Delcour. 2016. Relevance of the Functional Properties of Enzymatic Plant Protein Hydrolysates in Food Systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15(4): 786-800.
- Wu, J., R. E. Aluko, dan S. Nakai. 2006. Structural Requirements Of Angiotensin 1-Converting Enzyme Inhibitory Peptides: Quantitative Structure-Activity Relationship Study of Di- and Tripeptides. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 54 732-738.
- Yust, M.D., J. Pedroche, M. del Millán-Linares, J. M. Alcaide-Hidalgo, dan F. Millán. 2010. Improvement of Functional Properties of Chickpea Proteins by Hydrolysis with Immobilised Alcalase. *Food Chemistry* 122: 1212-1217.

LAMPIRAN

**A. Data Dan Perhitungan Analisis Kadar Protein Kacang Tunggak**

A.1 Data Analisis Kadar Protein Kacang Kratok

Sampel	Pengukuran Titrasi Sampel (ml)					
	1	2	3	4	5	6
TKT	22,3	22,6	22,2	22,2	22,6	22,1

A.2 Perhitungan Analisis Kadar Protein Kacang Tunggak

Sampel	Total Protein (%)						Rata-rata	STEDV
	1	2	3	4	5	6		
TKT	19,2	19,5	19,1	19,3	19,3	19,2	19,3	0,153

Keterangan:

TKT : Tepung kacang tunggak

A.3 Contoh Perhitungan Kadar Protein (% wb) Kacang Tunggak

Diketahui:

ml HCL TKT = 22,2 ml

ml HCL blanko = 0,3 ml

N HCL = 0,1 N

Berat molekul nitrogen = 14,01

Faktor konversi = 6,25

Berat sampel = 1 gram

Maka,

$$\%N = \frac{(ml\ HCL\ sampe - ml\ HCL\ blanko) \times N\ HCL \times 14,01}{berat\ sampel \times 1000} \times 100\%$$

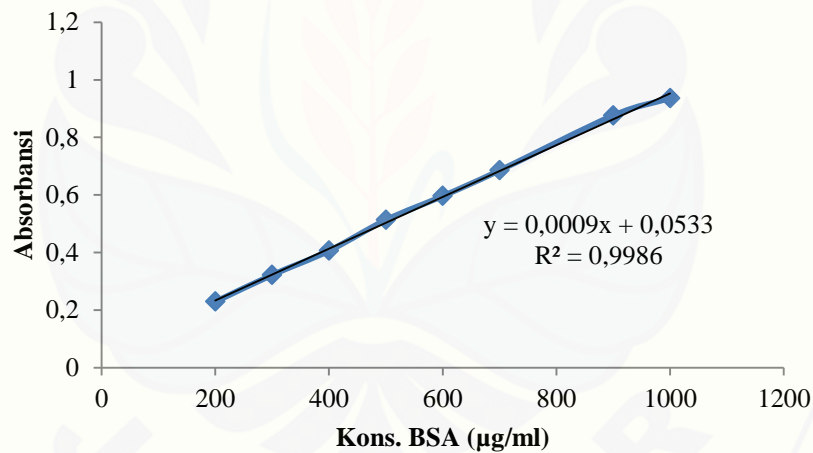
$$\begin{aligned} \%N &= \frac{(22,2 - 0,3) \times 0,1 \times 14,01}{1 \times 1000} \times 100\% \\ &= 3,07\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar protein (\% wb)} &= \%N \times \text{faktor konversi} \\ &= 3,07 \times 6,25 \\ &= 19,18\% \end{aligned}$$

## B. Data dan Perhitungan Analisis Kadar Protein Ekstrak Protein dan Hidrolisat Protein Kacang Tunggak

### B.1 Kurva Standar BSA (*Bovine Serum Albumin*)

Konsentrasi BSA ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbansi	Abs sampel-Abs blanko
Blanko	0,059	
200	0,288	0,229
300	0,381	0,322
400	0,465	0,406
500	0,572	0,513
600	0,655	0,596
700	0,744	0,685
900	0,935	0,876
1000	0,995	0,936



### B.2 Data Analisis Kadar Protein Ekstrak dan Hidrolisat Protein Kacang Tunggak

Sampel	Pengukuran Absorbansi					
	1	2	3	4	5	6
EPKT	0,631	0,623	0,632	0,627	0,637	0,638
HKTA	0,584	0,589	0,580	0,585	0,587	0,591
HKTF	0,488	0,497	0,479	0,485	0,480	0,480

### B.3 Perhitungan Analisis Kadar Protein Ekstrak dan Hidrolisat Protein Kacang Tunggak

Sampel	Kadar Protein (%)						Rata-Rata	STDEV
	1	2	3	4	5	6		
EPKT	64,189	63,300	64,300	63,744	64,856	64,967	64,226	0,639
HKTA	58,967	59,522	58,522	59,078	59,300	59,744	59,189	0,433
HKTF	48,300	49,300	47,300	47,967	47,411	47,411	47,948	0,768

Keterangan :

EPKT = Ekstrak Protein Kacang Tunggak

HKTA = Hidrolisat kacang tunggak terhidrolisis *alcalase*

HKTF = Hidrolisat kacang tunggak terhidrolisis *flavourzyme*

### B.4 Contoh Perhitungan Kadar Protein (% wb)

Persamaan kurva standart:  $y = 0,0009x + 0,0533$

Absorbansi = 0,631

Maka,

$$y = 0,0009x + 0,0533$$

$$0,631 = 0,0009x + 0,0533$$

$$x = \frac{0,631 - 0,0533}{0,0009}$$

$$x = 64,189 \mu\text{g/ml}$$

$$= 0,642 \text{ mg/ml}$$

$$\% \text{ protein} = \frac{x \times FP}{\text{mg sampel}} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,642 \times 50}{50} \times 100 \%$$

$$= 64,18 \%$$

## C. Data dan Perhitungan Analisis Derajat Hidrolisis

### C.1 Data Analisis Derajat Hidrolisis Hidrolisat Protein Kacang Tunggak

Sampel	Pengukuran Absorbansi					
	1	2	3	4	5	6
HKTA + TCA	0,165	0,161	0,207	0,189	0,177	0,199
HKTF + TCA	0,144	0,104	0,113	0,134	0,119	0,151
HKTA	0,584	0,589	0,580	0,585	0,587	0,591
HKTF	0,488	0,497	0,479	0,485	0,480	0,480

## C.2 Perhitungan Konsentrasi Protein Hidrolisat Protein Kacang Tunggak

Sampel	Pengukuran Konsentrasi Protein (mg/ml)						Rata-Rata
	1	2	3	4	5	6	
HKTA + TCA	0,124	0,120	0,171	0,151	0,137	0,162	0,144
HKTF + TCA	0,101	0,056	0,066	0,090	0,073	0,109	0,082
HKTA	0,589	0,595	0,585	0,590	0,593	0,597	0,591
HKTF	0,483	0,493	0,473	0,479	0,474	0,474	0,454

## C.3 Perhitungan Analisis Derajat Hidrolisis (DH) Hidrolisat Protein Kacang Tunggak

Sampel	Derajat Hidrolisis DH (%)						Rata-Rata	STDEV
	1	2	3	4	5	6		
HKTA	41,937	40,436	57,706	50,948	46,443	54,702	48,695	6,947
HKTF	42,036	23,498	27,669	37,402	30,450	45,280	34,389	8,550

Keterangan:

HKTA + TCA = Hidrolisat kacang tunggak terhidrolisis *alcalase* + *trichloroacetic acid*

HKTF + TCA = Hidrolisat kacang tunggak terhidrolisis *flavourzyme* + *trichloroacetic acid*

## C.4 Contoh Perhitungan Derajat Hidrolisis

Diketahui:

Absorbansi HKTA + TCA = 0,165

Konsentrasi total protein HKTA = 0,591 (mg/ml)

Konsentrasi HKTA + TCA :  $y = (0,0009x + 0,0533) \times 2$

$0,165 = (0,0009x + 0,533) \times 2$

$x = \left( \frac{0,165 - 0,533}{0,0009} \right) \times 2$

$x = 124 \mu\text{g/ml}$

$x = 0,124 \text{ mg/ml}$

Maka,

$$\% \text{ DH} = \frac{\text{Protein terlarut dalam 10 g\% TCA (mg)}}{\text{Total Protein (mg)}} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,124}{0,591} \times 100 \%$$

$$= 41,937 \%$$



### D. Data dan Perhitungan Uji Aktivitas Penghambatan ACE-1 Hidrolisat Protein Kacang Tunggak

#### D.1 Data Pengukuran Absorbansi Uji Penghambatan ACE-I Hidrolisat Protein Kacang Tunggak

Sampel	Pengukuran Absorbansi					
	1	2	3	4	5	6
B	0,447	0,464	0,484	0,462	0,449	0,474
CA	0,284	0,293	0,384	0,287	0,358	0,291
CF	0,285	0,317	0,270	0,301	0,279	0,267
AA	0,313	0,334	0,323	0,329	0,318	0,325
AF	0,337	0,342	0,329	0,341	0,349	0,345

#### D.2 Perhitungan Uji Penghambatan ACE-I Hidrolisat Protein Kacang Tunggak

Sampel	% Penghambatan						Rata-rata	STDEV
	1	2	3	4	5	6		
AA1	86,110	74,081	80,382	76,945	83,246	79,236	80,000	4,312
AF1	67,969	65,243	72,331	65,788	61,427	63,607	66,061	3,773

Keterangan :

A = ACE-I + sampel

B = Buffer sebagai pengganti sampel

C = Blanko (HCl ditambahkan sebelum ACE-I)

AA = ACE-I + sampel yang dihidrolisis dengan *alcalase*

AF = ACE-I + sampel yang dihidrolisis dengan *flavourzyme*

CA = Blanko sampel yang dihidrolisis dengan *alcalase*

CF = Blanko sampel yang dihidrolisis dengan *flavourzyme*

#### D.3 Contoh Perhitungan Uji Penghambatan ACE-I

Diketahui:

Abs. B = 0,463

Abs. CA = 0,289

Abs. AA = 0,313

Maka,

$$\begin{aligned}
 \% \text{ penghambatan AA1} &= \left( \frac{\text{Abs.B} - \text{Abs.AA}}{\text{Abs.B} - \text{Abs.CA}} \right) \times 100\% \\
 &= \left( \frac{0,463 - 0,313}{0,463 - 0,289} \right) \times 100\% \\
 &= 86,110 \%
 \end{aligned}$$

## E. Data dan Perhitungan Uji Kelarutan Protein Hidrolisat Kacang Tunggak

### E.1 Data Uji Kelarutan Protein Hidrolisat Kacang Tunggak

Sampel	pH	Pengukuran Absorbansi					
		1	2	3	4	5	6
HKTA+ NaOH		0,555	0,560	0,557	0,565	0,556	0,559
HKTF + NaOH		0,444	0,445	0,441	0,439	0,438	0,437
HKTA	3	0,477	0,475	0,459	0,471	0,464	0,481
	5	0,295	0,309	0,303	0,303	0,305	0,293
	7	0,489	0,492	0,489	0,487	0,495	0,488
	8	0,543	0,539	0,541	0,537	0,538	0,545
	9	0,471	0,478	0,480	0,476	0,485	0,487
	10	0,457	0,456	0,451	0,457	0,455	0,452
HKTF	11	0,429	0,424	0,424	0,427	0,421	0,422
	3	0,354	0,353	0,363	0,361	0,359	0,352
	5	0,223	0,232	0,232	0,228	0,226	0,221
	7	0,374	0,369	0,371	0,371	0,368	0,368
	8	0,382	0,384	0,379	0,378	0,383	0,378
	9	0,357	0,354	0,341	0,353	0,352	0,345
	10	0,344	0,339	0,338	0,348	0,339	0,338
	11	0,337	0,328	0,338	0,335	0,341	0,345

### E.2 Perhitungan Konsentrasi Protein Hidrolisat Kacang Tunggak dalam NaOH

Sampel	Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )						Rata-Rata	SD
	1	2	3	4	5	6		
HKTA + NaOH	491,89	497,44	494,11	503,00	493,00	496,33	495,96	4,02
HKTF + NaOH	368,56	369,67	365,22	363,00	361,89	360,78	364,85	3,62

## E3. Perhitungan Kelarutan Protein Hidrolisat Kacang Tunggak

Sampel	pH	% Kelarutan						Rata-Rata	SD
		1	2	3	4	5	6		
HKTA	3	81,704	81,256	77,904	80,121	78,792	64,099	77,313	6,631
	5	31,763	44,067	42,723	42,723	43,171	40,482	40,821	4,592
	7	84,393	85,065	84,393	83,944	85,737	84,168	84,617	0,665
	8	96,490	95,594	96,042	95,146	95,370	96,938	95,930	0,691
	9	80,360	81,928	82,376	81,480	83,496	83,944	82,264	1,320
	10	77,224	76,999	75,879	77,224	76,775	76,103	76,701	0,578
HKTF	11	70,951	69,830	69,830	70,503	69,158	69,382	69,942	0,676
	3	73,607	73,302	76,348	75,739	75,129	72,998	74,520	1,402
	5	33,712	32,002	36,453	35,235	34,626	33,103	34,189	1,587
	7	79,697	78,175	78,784	78,784	77,870	77,870	78,530	0,705
	8	82,134	82,743	81,220	80,916	82,438	80,916	81,728	0,810
	9	74,520	73,607	69,648	73,302	72,998	70,866	72,490	1,884
	10	70,561	69,039	68,734	71,780	69,039	68,734	69,648	1,248
	11	68,430	65,689	68,734	67,821	69,648	70,866	68,531	1,751

Keterangan :

- HKTA = Hidrolisat kacang tunggak terhidrolisis *alcalase*  
 HKTF = Hidrolisat kacang tunggak terhidrolisis *flavourzyme*  
 HKTA+NaOH = HKTA (1%) dalam 2M NaOH  
 HKTF+NaOH = HKTF (1%) dalam 2M NaOH

## E.4 Contoh Perhitungan Kelarutan Protein Hidrolisat Kacang Tunggak

Diketahui :

$$\text{Kurva standar } y = 0,0009x + 0,0533$$

$$\text{Abs HKTA pH 3 U1} = 0,477$$

$$\text{Kons. HKTA+NaOH} = 495,96 \mu\text{g/ml}$$

Maka,

Kons. HKTA pH 3 U1 :

$$y = 0,0009x + 0,0533$$

$$x = \frac{y-0,0533}{0,0009}$$

$$x = \frac{0,477-0,0533}{0,0009}$$

$$x = 470,778 \mu\text{g/ml}$$

$$\begin{aligned} \text{\% kelarutan HKTA} &= \frac{\text{Kons. HKTA pH 3 U1}}{\text{Kons.HKTA+NaOH}} \times 100\% \\ &= \frac{470,778}{495,96} \times 100\% \\ &= 81,704 \% \end{aligned}$$

**F. Dokumentasi Penelitian**



Kacang Tunggak



Tepung Kacang Tunggak



Proses Penepungan Kacang



Tepung Defatting Kacang Tunggak

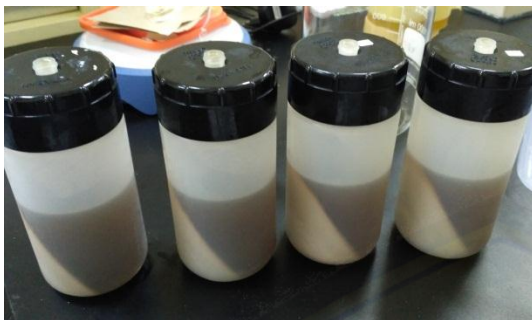


Pengaturan pH



Sentrifugasi





Hasil Sentrifugasi



*Freeze drying*



Ekstrak Protein Kacang Tunggak



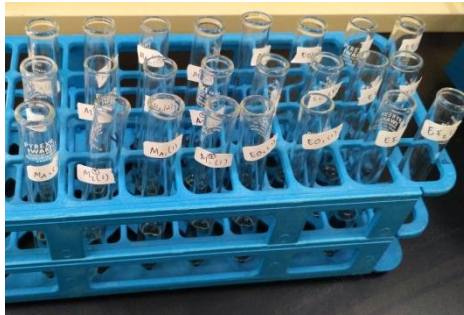
Hidrolisis Enzimatis



Proses Sentrifugasi



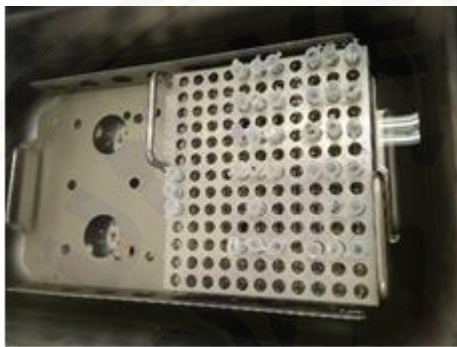
Pengenceran Sampel



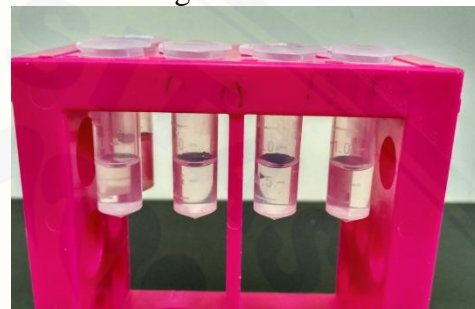
Pengujian *Lowry*



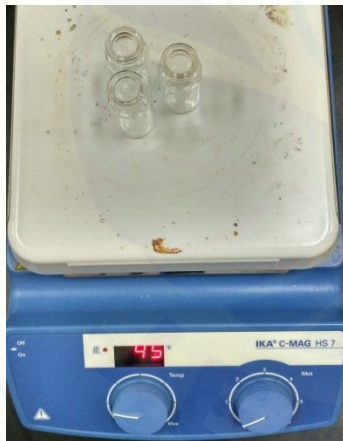
Pengambilan ACE



Inkubasi ACE-I dengan Sampel



Hasil Sentrifugasi Sampel ACE



Penguapan Etil Asetat



Pembacaan Panjang Gelombang