



**ANALISIS ANTIHIPERTENSI HIDROLISAT PROTEIN
KEDELAI EDAMAME KERING BEKU DAN KERING OVEN**

SKRIPSI

Oleh
Yoshinta Puspitasari
131710101058

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**ANALISIS ANTIHIPERTENSI HIDROLISAT PROTEIN
KEDELAI EDAMAME KERING BEKU DAN KERING OVEN**

SKRIPSI

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

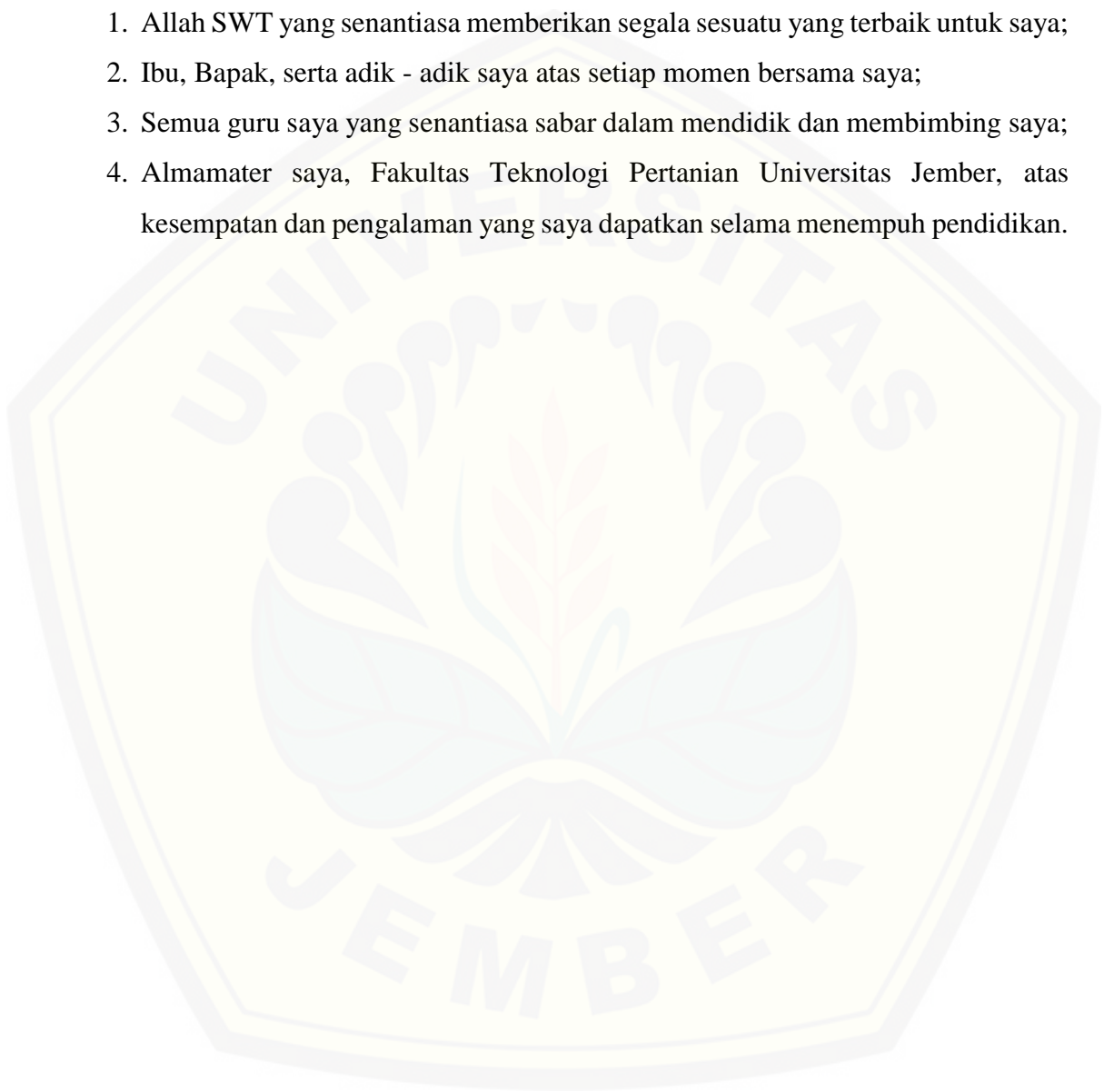
Oleh
Yoshinta Puspitasari
131710101058

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

PERSEMBAHAN

Karya tulis ini saya persembahkan kepada :

1. Allah SWT yang senantiasa memberikan segala sesuatu yang terbaik untuk saya;
2. Ibu, Bapak, serta adik - adik saya atas setiap momen bersama saya;
3. Semua guru saya yang senantiasa sabar dalam mendidik dan membimbing saya;
4. Almamater saya, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember, atas kesempatan dan pengalaman yang saya dapatkan selama menempuh pendidikan.



MOTO

“Manusia hanyalah butiran debu pada alam semesta. Tidak ada hal yang patut dibanggakan maupun dibandingkan. Menjadi pribadi yang lebih baik adalah hal yang perlu kita usahakan”



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Yoshinta Puspitasari

NIM : 131710101058

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah skripsi berjudul “**Analisis Antihipertensi Hidrolisat Protein Kedelai Edamame Kering Beku dan Kering Oven**” adalah sungguh dilakukan sendiri dibawah koordinasi Proyek Penelitian Hibah Kompetitif Tahun Ajaran 2017 dengan peneliti utama Prof. Dr. Ir. Tejasari, M.Sc. serta hasil *International Visiting Research* di Prefectural University of Hiroshima, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan 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, 05 Juni 2018

Yang menyatakan,

Yoshinta Puspitasari
NIM 131710101058

SKRIPSI

**ANALISIS ANTIHIPERTENSI HIDROLISAT PROTEIN
KEDELAI EDAMAME KERING BEKU DAN KERING OVEN**

oleh
Yoshinta Puspitasari
NIM 131710101058

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Prof. Dr. Ir. Tejasari, M.Sc.
Dosen Pembimbing Anggota : Ir. Wiwik Siti Windrati, M.P.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Analisis Antihipertensi Hidrolisat Protein Kedelai Edamame Kering Beku dan Kering Oven” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember pada:

hari/tanggal : Kamis, 05 April 2018

tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,

Ketua Jurusan THP,

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

NIP. 196102101987032002

Dr. Ir. Jayus

NIP. 196805161992031004

Tim Penguji

Ketua

Anggota

Dr. Ir. Sih Yuwanti M.P.

NIP. 196507081994032002

Dr. Puspita Sari S.TP., M.Ph.

NIP. 197203011998022001

Mengesahkan

Dekan

Fakultas Teknologi Pertanian

Universitas Jember

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

NIP. 196809031994031009

RINGKASAN

Analisis Antihipertensi Hidrolisat Protein Kedelai Edamame Kering Beku dan Kering Oven; Yoshinta Puspitasari, 131710101058; 2018; 68 halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Hipertensi yang merupakan kondisi kenaikan tekanan darah di atas normal adalah faktor risiko utama penyakit kardiovaskular, penyebab kematian utama di dunia. Tindakan pencegahan ataupun penanggulangan hipertensi akan efektif dalam penurunan risiko penyakit tersebut, salah satunya adalah dengan mengonsumsi antihipertensi. Antihipertensi yang mampu menurunkan tekanan darah memiliki mekanisme penghambatan terhadap *Angiotensin I-converting enzyme (ACE)*. Salah satu komponen pangan yang diketahui berpotensi dalam pencegahan penyakit hipertensi adalah protein jenis tertentu dan produk hidrolisanya. Hidrolisat protein dapat didapatkan dari jenis kacang - kacangan yang memiliki kandungan protein cukup tinggi, diantaranya adalah edamame (*Glycine Max (L.) Merr.*).

Rancangan penelitian menggunakan penelitian eksperimental dengan satu variasi perlakuan, yaitu metode pengeringan. Proses pembuatan hidrolisat protein diawali dengan proses pengeringan edamame, yaitu pengeringan beku dan pengeringan oven, yang kemudian dilakukan analisis kadar protein tepung edamame. Tepung edamame dari kedua perlakuan dilakukan proses penghilangan kandungan lemak dan ekstraksi protein dilanjutkan dengan proses hidrolisis dengan suhu 50°C selama 1 jam dengan penambahan enzim alkalase sebanyak 1 persen dari berat ekstrak protein. Hidrolisat basah yang diperoleh kemudian dilakukan pengeringan beku dan dilakukan analisis derajat hidrolisis, kadar protein hidrolisat, profil berat molekul protein, dan aktivitas penghambatan hipertensi.

Pengujian kadar protein tepung edamame dilakukan untuk mengetahui kandungan protein dalam tepung edamame yang akan digunakan sebagai bahan baku pembuatan hidrolisat protein. Pengukuran kadar protein digunakan sebagai referensi dan acuan untuk pembuatan hidrolisat protein dan analisis yang berkaitan dengan kadar protein awal bahan. Dua perlakuan edamame yang digunakan dalam

penelitian ini adalah edamame kering beku dan kering oven. Kadar protein edamame diukur menggunakan metode kjeldahl. Kadar protein tepung edamame kering beku dan edamame kering oven secara berturut - turut adalah sebesar 32,8 dan 33,4 persen (bb).

Derajat hidrolisis merupakan presentasi ikatan peptida terpotong terhadap jumlah total ikatan per berat unit. Prinsip pengukuran derajat hidrolisis adalah pengukuran kadar nitrogen yang terlarut dalam larutan asam trikloroasetat (TCA) setelah komponen yang tidak terlarut mengalami pengendapan akibat proses sentrifugasi. Derajat hidrolisis protein edamame kering beku dan protein edamame kering oven secara enzimatik menggunakan enzim alkalase memiliki nilai secara berturut - turut adalah sebesar 35 dan 44 persen.

Hidrolisat protein merupakan sumber protein alami yang didapatkan dari proses hidrolisis menggunakan asam, basa, maupun enzim. Pada proses hidrolisis, terjadi proses modifikasi karakteristik fungsional yang dipengaruhi oleh tingkat hidrofobisitas bagian rantai non polar pada protein, derajat hidrolisis, serta tipe enzim proteolitik yang digunakan (Shahidi dan Botta, 1994). Kadar protein hidrolisat edamame kering beku dan kering oven secara berturut - turut adalah sebesar 79 dan 86,6 persen.

Penentuan berat molekul protein hidrolisat edamame dilakukan menggunakan metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel*). Pengukuran berat molekul dilakukan untuk mengetahui fraksi protein hidrolisat protein edamame setelah proses hidrolisis menggunakan alkalase. Alkalase memutus ikatan peptida protein edamame, sehingga berat molekul hidrolisat lebih kecil apabila dibandingkan dengan berat molekul sebelum tahapan hidrolisis. Analisis SDS-PAGE menunjukkan bahwa fraksi berdasarkan berat molekul protein dari hidrolisat protein edamame dengan perbedaan metode pengeringan menghasilkan tiga pita subunit utama, yaitu 17, 8,7 dan 3,9 kDa dengan pola komponen protein yang hampir identik.

Penghambatan ACE dapat mencegah terbentuknya angiotensin II yang menyebabkan terjadinya hipertensi. Hidrolisat protein edamame kering beku 1.000 µg/ml mampu menghambat aktivitas ACE (*Angiotensin-I Converting Enzyme*)

sebesar 77 persen, sedangkan hidrolisat protein edamame kering oven 1.000 $\mu\text{g/ml}$ sebesar 46 persen. Nilai IC_{50} dari konsentrasi protein pada hidrolisat edamame kering beku dan kering oven secara berturut - turut adalah sebesar 464,6 $\mu\text{g/ml}$ dan 1.445,5 $\mu\text{g/ml}$ dengan konsentrasi protein sebesar 51,7 $\mu\text{g/ml}$ dan 151,2 $\mu\text{g/ml}$. Hidrolisat protein edamame dari kedua perlakuan memiliki potensi untuk diaplikasikan sebagai nutrasetikal baik dalam penghambatan maupun penanganan hipertensi.



SUMMARY

Antihypertensive Analysis of Freeze and Oven Dried Edamame Protein Hydrolysate; Yoshinta Puspitasari, 131710101058; 2018; 68 pages; Department of Agricultural Product Technology, Faculty of Agricultural Technology, University of Jember.

*Hypertension is a condition of blood pressure increase above normal which is the main risk factor for cardiovascular diseases, the leading cause of death in the world. Prevention or medication of hypertension will be effective in decreasing the risk of the disease, one of it is the consumption of antihypertensive. Antihypertensive that can lower blood pressure have a mechanism of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition. Certain types of protein and hydrolysis products are known having important functions outside the primary metabolic functions, one of it is the potential in preventing hypertension. Protein hydrolysate can be obtained from beans with high protein content, one of them is edamame (*Glycine Max (L.) Merr.*).*

The experimental design in this research using experimental research with one variation of treatment, which is drying method. The process of making protein hydrolysate began with edamame drying, freeze and oven drying treatment, then conducted protein content analysis. The next process were defatting and protein extraction continued with hydrolysis process in 50°C for an hour with alcalase addition (1% of extract protein weight). The wet hydrolysate then subjected to drying process with freeze drier. Edamame hydrolysate then conducted analysis include degree of hydrolysis, hydrolysate protein content, protein molecular weight profile, and hypertensive inhibition activity.

Edamame flour protein content analysis was done to determine the protein content in edamame flour that used as material in protein hydrolysate making. Edamame flour protein content was used as reference in protein hydrolysate making and further analysis that related with protein content of material. Two treatment of edamame that used in in this research were freeze and oven dried

edamame flour. The protein content of edamame flour was measured by kjeldahl method. The protein content of freeze and oven dried edamame flour respectively were 32.8 and 33.4 percent (wb).

Degree of hydrolysis is percentage of cut peptide bond compare to bond total per unit weight. The principle of DH is measurement of soluble nitrogen content in TCA after insoluble component precipitated after centrifugation. Degree of hydrolysis freeze dried and oven dried edamame enzymatically using alcalase respectively were 35 and 44 percent.

Protein hydrolysate is natural protein source that obtained from hydrolysis using acid, base, or enzyme. In hydrolysis, there is functional character modification affected by non-polar chain hydrophobicity, degree of hydrolysis and protease enzyme type that used. Soluble protein content of freeze dried and oven dried edamame hydrolysate were 79 and 86.6 percent.

Determination of edamame hydrolysate molecular weight was done by SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel) Method. Molecular weight measurement was done to know the molecular weight of edamame protein hydrolysate after hydrolysis with alcalase use. Alcalase cut the peptide bond of edamame protein so the molecular weight of hydrolysate were smaller than before hydrolysis. SDS-PAGE analysis showed that fraction based on molecular weight protein of edamame protein hydrolysate with different drying method produced three major subunits bands, i.e., 17, 8.7, and 3.9 kDa with patterns of protein constituents were almost identical.

ACE inhibition can prevent angiotensin II formation that can stimulate hypertensive. Freeze dried edamame protein hydrolysate 1,000 µg/ml could inhibit 77 percent ACE (Angiotensin-I Converting Enzyme) activity, oven dried edamame protein hydrolysate 1,000 µg/ml could inhibit 46 percent. IC₅₀ value of freeze and oven dried edamame hydrolysate protein concentration respectively were 464.6 µg/ml and 1,445.5 µg/ml with protein concentration 51.7 µg/ml and 151.2 µg/ml. Edamame protein hydrolysate from both treatment had potential application as nutraceuticals in prevention or treatment of hypertension.

PRAKATA

Segala puji kehadiran Allah SWT, yang telah memberikan rahmat, karunia, dan hidayah-Nya sehingga saya diberi kelancaran dalam menyelesaikan skripsi yang berjudul “Analisis Antihipertensi Hidrolisat Protein Kedelai Edamame Kering Beku dan Kering Oven”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

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 Utama, yang telah meluangkan waktu dan pikiran guna memberikan bimbingan dan pengarahan demi kemajuan, penyelesaian penelitian, dan penulisan skripsi ini;
4. Ir. Wiwik Siti Windrati, M.P., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu dan pikiran dengan sabar guna memberikan bimbingan dan pengarahan demi kemajuan, penyelesaian penelitian, dan penulisan skripsi ini;
5. Dr. Yuli Wibowo S.TP., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang senantiasa membimbing, memberikan pengarahan dan motivasi kepada saya selama perkuliahan;
6. Dr. Ir. Sih Yuwanti, M.P. dan Dr. Puspita Sari S.TP., M.Ph., selaku tim penguji yang telah memberikan saran dan evaluasi demi perbaikan skripsi ini;
7. Yukihiro Yamamoto, PhD dari Prefectural University of Hiroshima, yang telah membimbing dan memberi pengarahan selama penelitian dan penulisan laporan penelitian;
8. Bapak Ibu teknisi Laboratorium di Fakultas Teknologi Pertanian dan Laboratorium CDAST, Universitas Jember;

9. Rekan tim penelitian, Nurdiana Agustina, Faiqotul Aulia, Yuna Luki Afsari, dan M. Bazar Ahmadi;
10. Teman - teman seperjuangan, Niken Riris Dayinta, Amalia Dyah Arumsari, Faranita Lutfia Normasari, dan Lia Zakiata Faidza atas pengertian, kesabaran, dan motivasi yang diberikan kepada saya;
11. Seluruh pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Saya menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih belum sempurna, oleh karena itu dengan kerendahan hati, saya mengharap kritik dan saran yang bersifat membangun dari pembaca guna membangun ke arah yang lebih sempurna. Besar harapan semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan di masa mendatang.

Jember, Juni 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	xi
PRAKATA	xiii
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
BAB 1. PENDAHULUAN	01
1.1 Latar Belakang	01
1.2 Rumusan Masalah	03
1.3 Tujuan Penelitian	03
1.4 Manfaat Penelitian	03
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	04
2.1 Antihipertensi	04
2.2 Peptida sebagai Antihipertensi	05
2.3 Hidrolisis Protein	06
2.4 Alkalase	08
2.5 Derajat Hidrolisis	09
2.6 Hidrolisat Protein	10
2.7 Edamame	11

2.8 Pengeringan	13
2.9 Penentuan Aktivitas Penghambatan ACE	15
BAB 3. METODE PENELITIAN	17
3.1 Bahan dan Alat	17
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	18
3.3 Pelaksanaan Penelitian	18
3.4 Prosedur Analisis	23
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	28
4.1 Kadar Protein Tepung Edamame	28
4.2 Derajat Hidrolisis	29
4.3 Kadar Protein Hidrolisat	31
4.4 Profil Berat Molekul Hidrolisat	32
4.5 Aktivitas Penghambatan ACE	34
BAB 5. PENUTUP	39
5.1 Kesimpulan	39
5.2 Saran	39
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN	46

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Nilai IC ₅₀ Aktivitas Penghambatan ACE	37



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Reaksi katalisa protease dalam menghidrolisis ikatan peptida protein	08
2.2 Biji edamame	11
2.3 Reaksi Hidrolisis HHL oleh ACE	16
3.1 Diagram alir persiapan sampel	20
3.2 Diagram alir penghilangan kandungan lemak tepung edamame	21
3.3 Diagram alir ekstraksi protein edamame	22
3.4 Diagram alir hidrolisis enzimatis protein edamame	23
4.1 Kadar protein tepung edamame kering beku dan kering oven	28
4.2 Derajat hidrolisis protein edamame kering beku dan kering oven	30
4.3 Kadar protein terlarut hidrolisat protein edamame	31
4.4 Hasil elektroforesis hidrolisat protein edamame	33
4.5 Aktivitas penghambatan ACE berdasarkan konsentrasi hidrolisat	35
4.6 Aktivitas penghambatan ACE berdasarkan konsentrasi protein	35

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A.1 Kadar protein tepung edamame metode kjeldahl	46
A.2 Derajat hidrolisis	47
A.3 Kadar protein hidrolisat metode Lowry	50
A.4 Profil berat molekul protein SDS-PAGE	52
A.5 Aktivitas penghambatan ACE	53
B.1 Bahan kimia pada analisis kadar protein metode kjeldahl	60
B.2 Bahan kimia pada analisis derajat hidrolisis	60
B.3 Bahan kimia pada analisis kadar protein terlarut metode lowry	60
B.4 Bahan kimia pada SDS-PAGE	61
B.5 Bahan kimia pada analisis aktivitas penghambatan ACE	62
C.1 Bahan baku berupa edamame	64
C.2 Tahapan pengeringan beku dan pengeringan oven	64
C.3 Tahapan penepungan dan penghilangan kandungan lemak	64
C.4 Tahapan ekstraksi protein	65
C.5 Pengujian pH kelarutan dan pH isoelektrik	65
C.6 Tahapan ekstraksi dan hidrolisis protein	65
C.7 Pengujian kadar protein edamame	66
C.8 Pengujian derajat hidrolisis dan kadar protein	66
C.9 Tahapan analisis SDS-PAGE	67
C.10 Pengujian aktivitas penghambatan ACE	67

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hipertensi yang merupakan kondisi seseorang dengan tekanan darah sistolik ≥ 140 mmHg atau tekanan darah diastolik ≥ 90 mmHg adalah faktor risiko utama penyakit kardiovaskular, penyebab kematian utama di dunia (PAHO, 2017). Menurut WHO, jumlah penderita hipertensi diperkirakan akan terus meningkat seiring dengan peningkatan jumlah penduduk. Tindakan pencegahan ataupun penanggulangan hipertensi akan efektif dalam penurunan risiko penyakit tersebut (MacMahon *et al.*, 1990), salah satunya adalah dengan mengonsumsi antihipertensi. Kini telah banyak produk antihipertensi yang beredar, namun kebanyakan produk tersebut merupakan produk sintesis yang memberikan efek samping seperti batuk dan ruam pada kulit (Mundi dan Aluko, 2014).

Antihipertensi yang mampu menurunkan tekanan darah memiliki mekanisme penghambatan terhadap *Angiotensin I-converting enzyme* (ACE). Penghambatan ACE dapat mencegah perubahan decapeptida angiotensin I menjadi oktapeptida angiotensin II yang dapat meningkatkan tekanan darah. Kunci utama pada sistem renin-angiotensin tersebut adalah pengaturan regulasi tekanan darah arteri dan garam, serta pengaturan keseimbangan air (Soffer, 1976). Salah satu komponen pangan yang diketahui berpotensi dalam pencegahan penyakit hipertensi adalah protein jenis tertentu dan produk hidrolisanya.

Biopeptida merupakan peptida alami yang aktif akibat proses proteolisis (Quist, 2005). Peptida dapat diperoleh melalui sintesis kimiawi ataupun sintesis enzimatis. Selama ini, penelitian mengenai peptida penghambat ACE cenderung mengarah pada sumber hewani, seperti kasein, otot tuna, *bonito* (Yamamoto, 1997), serta produk kedelai terfermentasi seperti kecap, pasta kedelai, natto, dan tempe. Biopeptida dengan kemampuan penghambatan ACE kemungkinan juga dapat dibuat dari sumber protein lain. Salah satu pangan yang merupakan sumber protein adalah edamame.

Edamame atau kedelai sayur merupakan sumber protein yang memiliki potensi untuk dijadikan bahan baku pembuatan antihipertensi. Edamame mengandung protein yang relatif tinggi, yaitu sebesar 38 - 40 g per 100 g (bk) (Santana *et al.*, 2012). Selain itu, penelitian terdahulu menunjukkan bahwa peptida bioaktif dari edamame memiliki kemampuan penghambatan ACE. Kandungan protein pada edamame yang berpotensi untuk diproduksi menjadi peptida dengan kemampuan pengahambatan ACE yang baik perlu dijaga kualitasnya. Untuk menjaga kualitas protein pada edamame tersebut, diperlukan proses persiapan bahan yang baik pula.

Edamame dalam bentuk segar rentan untuk disimpan terkait kandungan airnya yang cukup tinggi. Edamame kering akan lebih mudah untuk diproses dan disimpan dalam waktu lama. Pengeringan merupakan metode yang umum digunakan sebagai teknik pengawetan (Mechlouch *et al.*, 2012 dan Sachin *et al.*, 2010). Di antara beberapa proses pengeringan, pengeringan beku menghasilkan produk dengan kualitas tinggi namun membutuhkan biaya produksi yang relatif tinggi (Litvin *et al.*, 1998). Di sisi lain, pemanasan dengan udara panas umum digunakan pada produksi pangan, namun suhu yang cukup tinggi memungkinkan penurunan kualitas produk yang dihasilkan (Trisnawati *et al.*, 2014).

Penggunaan metode pengeringan yang berbeda memungkinkan untuk menghasilkan produk kering dengan kualitas yang berbeda pula. Pengeringan beku merupakan metode pengeringan dengan mekanisme sublimasi yang terjadi pada suhu di bawah titik beku (Akers *et al.*, 1987), sedangkan pengeringan oven memiliki mekanisme penguapan kandungan air dari bahan (Sachin *et al.*, 2010). Protein hasil pengeringan beku memiliki kapasitas pengikat air / minyak, kestabilan suhu, struktur β -turn dan gulungan acak lebih tinggi, dengan lebih sedikit struktur β -sheet (Zhao *et al.*, 2013). Protein hasil pengeringan oven cenderung terinaktivasi atau terdenaturasi akibat panas maupun tegangan yang menyebabkan kerusakan struktur sekunder (α -helix, β -sheet, dan gulungan acak) dan tersier yang tidak dapat kembali (Ameri dan Maa, 2006). Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perbedaan metode pengeringan terhadap kemampuan antihipertensi hidrolisat protein edamame. Aktivitas penghambatan ACE dari

hidrolisat protein edamame diharapkan mampu menambah pengetahuan dan dapat dikembangkan menjadi salah satu alternatif antihipertensi.

1.2 Rumusan Masalah

Kandungan protein pada edamame memiliki potensi untuk diproduksi menjadi peptida dengan kemampuan penghambatan ACE yang baik. Permasalahan yang timbul dalam produksi hidrolisat protein dengan potensi antihipertensi dari edamame adalah belum diketahuinya pengaruh perbedaan metode pengeringan terhadap potensi antihipertensi hidrolisat protein edamame.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh metode pengeringan terhadap kadar protein tepung edamame, derajat hidrolisis, kadar protein hidrolisat, profil berat molekul protein hidrolisat, dan aktivitas penghambatan ACE.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diharapkan dari penelitian ini yaitu:

1. Meningkatkan pemanfaatan edamame sebagai sumber antihipertensi
2. Memberikan informasi tentang pengaruh perbedaan metode pengeringan edamame terhadap kemampuan antihipertensi hidrolisat protein

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Antihipertensi

Hipertensi merupakan kondisi peningkatan tekanan darah yang melebihi batas normal, yaitu tekanan darah sistolik ≥ 140 mmHg dan tekanan darah diastolik ≥ 90 mmHg. Hipertensi merupakan penyakit penyebab kematian nomor tiga terbesar setelah stroke dan tuberkulosis (Riskesdas, 2007). Terdapat dua jenis hipertensi, yaitu hipertensi primer dan sekunder. Adapun penyebab dari hipertensi primer adalah faktor gaya hidup yang kurang sehat, sedangkan penyebab hipertensi sekunder adalah hasil patogenesis organ berbeda. Secara umum, faktor risiko penyebab hipertensi adalah usia, jenis kelamin, riwayat keluarga, genetik, kebiasaan merokok, konsumsi garam yang terlalu tinggi, konsumsi lemak jenuh, konsumsi alkohol, obesitas, kurangnya aktivitas fisik, dan *stress* (World Health Day, 2013).

Salah satu penyebab hipertensi adalah konsumsi garam secara berlebihan yang mengakibatkan pengeluaran hormon natriouretik melebihi batas normal, secara tidak langsung dapat meningkatkan tekanan darah dalam tubuh. Kandungan garam yang tinggi di dalam tubuh dapat menyebabkan gangguan fungsi ginjal karena natrium tidak dapat dikeluarkan oleh ginjal. Natrium bersifat mengikat air, sehingga akan menyebabkan peningkatan volume darah. Gangguan berupa peningkatan tekanan darah memiliki kaitan dengan fungsi ACE di dalam tubuh (Rui *et al.*, 2013).

Angiotensin I-converting enzyme (ACE) merupakan enzim yang dapat mengubah angiotensin I (*Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu*) menjadi angiotensin II (*Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe*) yang memiliki peran penting dalam pengaturan tekanan darah. ACE mengonversi angiotensin I dengan memotong dipeptida pada bagian C-terminal menjadi Angiotensin II yang bersifat vasokonstriktor kuat. Angiotensin II memiliki kemampuan dalam peningkatan aktivitas sistem saraf simpatik dan dapat merangsang produksi aldosteron. Pada umumnya, antihipertensi yang beredar pada masyarakat merupakan produk sintesis

berupa captopril, enalapril, lisinopril dan ramipril. Penggunaan produk antihipertensi sintetis memiliki berbagai efek samping seperti diare, alergi, batuk, hilangnya sensasi pada lidah, ruam pada kulit dan efek samping lainnya (Mundi dan Aluko, 2014).

2.2 Peptida Bersifat Antihipertensi

Peptida yang masih tergabung membentuk suatu protein tidak memiliki sifat bioaktif (Hernandez-Ledeshma dan Hsieh, 2013). Namun, ketika peptida tersebut terlepas dari struktur utamanya, peptida tersebut dapat memberikan efek fisiologis seperti antimikroba, antioksidan, antitrombotik, anti-hipertensi, imunomodulator dan lain - lain. Karakteristik biopeptida dalam fungsi fisiologisnya tergantung pada dua faktor, yaitu urutan asam amino primer dalam protein dan spesifisitas enzim yang menghidrolisis protein tersebut. Perbedaan susunan antar biopeptida satu dengan lainnya juga dapat menyebabkan perbedaan sifat biokimia dan sifat biologisnya (Hernandez-Ledeshma dan Hsieh, 2013).

Pada umumnya, penghambat ACE berbasis protein turunan pangan mengandung 2 - 15 residu asam amino yang memiliki berat molekul relatif rendah (Li *et al.*, 2005). Peptida yang memiliki C-terminal lebih mampu berinteraksi dan mudah terikat dengan ACE, seperti tripeptida yang memiliki 2 C-terminal pada dua sisi peptida (Tsai *et al.*, 2008). Tripeptida dengan sisi asam amino yang memiliki rantai samping berupa rantai samping bersifat hidrofobik, seperti rantai samping aromatik maupun rantai samping bercabang telah dinyatakan mampu dalam menghambat ACE. Peptida dengan sifat hidrofobik memiliki mekanisme penghambatan ACE melalui ikatan, baik pada sisi aktif C-terminal dan N-terminal ACE, sedangkan peptida dengan sifat hidrofilik hanya dapat mengikat pada sisi aktif C-terminal ACE (Turner & Hopper, 2002). Contoh asam amino dengan rantai samping bercabang yang bersifat hidrofobik adalah prolin, valin, leusin, dan alanin, sedangkan contoh asam amino dengan rantai sisi aromatik adalah fenilalanin, tirosin, dan triptofan. Dalam kacang-kacangan, terdapat fraksi protein legumin dan albumin dalam jumlah yang cukup tinggi yang dapat menghasilkan aktivitas penghambatan ACE yang baik. Beberapa contoh urutan residu peptida yang telah

dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan ACE tinggi adalah Arg - Lys, Val - Ala - Pro, Phe - Val - Ala - Pro, dan Try - Phe - Trp - Leu.

Aktivitas penghambatan ACE meningkat seiring pemotongan (*cut-off*) berat molekul (Wu dan Ding, 2002). Peptida dengan ukuran kecil memiliki kerentanan rendah untuk dihidrolisis oleh protease lambung (Wu dan Ding, 2002). Diketahui pula bahwa penghambatan ACE umum terjadi pada peptida dengan kandungan prolin atau residu asam amino aromatis, arginin merupakan asam amino yang telah diselidiki untuk hipertensi.

Peptida turunan dari protein kedelai pertama yang teridentifikasi memiliki sifat penghambat ACE mengandung asam dikarboksilat (asam aspartat) pada N-terminus (Wu dan Ding, 2002). Residu N-terminus paling diharapkan adalah yang memiliki cabang asam amino berupa Val dan Ile, sedangkan residu karboksi-terminus yang paling diharapkan adalah triptofan, tirosin, prolin, atau fenilalanin. ACE memiliki sedikit afinitas untuk substrat atau penghambat kompetitif dengan COOH-terminal asam dikarboksilat.

2.3 Hidrolisis Protein

Protein merupakan sumber asam amino yang terdiri dari unsur C, H, O, dan N, terkadang mengandung S, P, dan Fe (Winarno, 1986). Molekul protein tersusun dari sejumlah asam amino yang saling berikatan oleh suatu ikatan yang disebut dengan ikatan peptida. Ikatan peptida merupakan ikatan yang menghubungkan asam amino melalui reaksi gugusan karboksil asam amino yang satu dengan gugusan amino dari asam amino yang lain. Ikatan peptida yang seperti itu merupakan ikatan tingkat primer. Dua molekul asam amino yang saling berikatan disebut dengan ikatan dipeptida, tiga molekul asam amino yang saling berikatan disebut tripeptida dan lebih banyak lagi asam amino yang saling berikatan disebut dengan polipeptida.

Dalam keadaan natural, peptida tidak dalam kondisi aktif karena masih terikat pada molekul protein (Korhonen *et al.*, 1998). Peptida dengan aktivitas biologis dapat didapatkan selama pencernaan enzimatik atau proses pengolahan (Korhonen *et al.*, 1998). Proses hidrolisis merupakan proses pemecahan suatu

molekul menjadi senyawa-senyawa lebih sederhana dengan bantuan molekul air (Nielsen, 1997). Terdapat beberapa jenis hidrolisis, seperti hidrolisis dengan larutan asam, hidrolisis dengan larutan alkali, hidrolisis dengan peleburan alkali baik menggunakan air atau tanpa air pada temperatur tinggi, serta hidrolisis secara enzimatik menggunakan enzim sebagai katalisator.

Hidrolisis protein adalah proses pemecahan ikatan peptida dari protein menjadi komponen-komponen yang lebih sederhana seperti peptida dan asam amino (Haslaniza *et al.*, 2010). Selama hidrolisis, terjadi beberapa perubahan pada protein, yaitu meningkatnya kelarutan karena bertambahnya kandungan NH_3^+ dan COO^- , berkurangnya berat molekul protein atau polipeptida, serta rusaknya globular protein (Nielsen, 1997). Secara umum, metode hidrolisis enzimatik biasa digunakan dalam memproduksi peptida antihipertensi. Hidrolisis enzimatik terkontrol diketahui merupakan metode yang lebih baik dibandingkan hidrolisis kimiawi karena mampu mempertahankan kualitas protein tanpa merusak susunan asam amino protein (Wu dan Ding, 2002). Menurut Ariyani *et al.* (2003), hidrolisis dengan asam maupun basa dapat merusak sebagian asam amino dan menghasilkan senyawa beracun seperti lisin dan alanin. Selain itu, hidrolisis enzimatik mampu menghasilkan hidrolisat kaya akan peptida dengan ukuran kecil (Wu dan Ding, 2002), yang diketahui sebagai ukuran peptida dengan aktivitas penghambatan ACE yang baik.

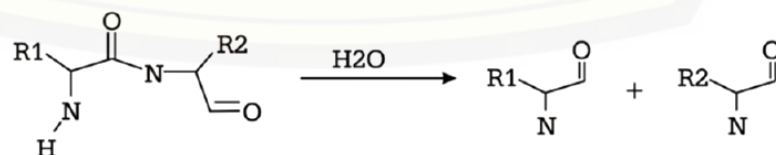
Proses hidrolisis diawali dengan tahapan pengecilan ukuran. Pada kondisi tertentu, substrat dihancurkan sehingga diperoleh peptida maupun asam amino. Faktor yang mempengaruhi kecepatan hidrolisis secara enzimatik adalah suhu, waktu, pH, inhibitor, serta konsentrasi enzim dan substrat. Pada suhu dan pH ekstrim, kecepatan hidrolisis mengalami peningkatan seiring penurunan kestabilan ikatan peptida, namun enzim proteolitik memiliki efek lebih drastis terhadap kecepatan hidrolisis (Quist, 2005). Peningkatan konsentrasi enzim akan meningkatkan volume hidrolisat protein yang bersifat tidak larut menjadi senyawa nitrogen yang bersifat larut. Hasil dari hidrolisis protein secara enzimatik pada ekstrak protein adalah berupa hidrolisat protein. Hidrolisis oleh enzim pada protein dapat mempengaruhi karakteristik peptida yang dihasilkan, seperti berat molekul,

distribusi muatan arus listrik, titik isoelektrik, kelompok ionisasi asam dan basa, indeks hidrofilik dan hidrofobik dari peptida yang dihasilkan (Agyei, *et al.*, 2016).

Hidrolisis enzimatis dengan kondisi pH 9,0, menghasilkan peptida dengan aktivitas penghambatan ACE optimum, sedangkan kondisi suhu di atas 60°C dan kondisi pH < 5 dan > 10 menghasilkan peptida dengan aktivitas penghambatan ACE yang rendah. Selama proses hidrolisis, sistein dan metionin akan hancur menjadi beberapa tingkatan (Gehrke *et al.*, 1985). Hasil hidrolisis substrat kemudian dapat distabilkan pada pH rendah melalui penambahan asam (Hernandez-Ledesma dan Heish, 2013).

2.4 Alkalase

Protease merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis sehingga protein dapat didegradasi menjadi peptida - peptida dan asam amino. Protease dapat memecah protein dengan bantuan air sehingga dikelompokkan dalam enzim hidrolase. Protease dapat dihasilkan dari mikroba secara ekstraseluler ataupun intraseluler, hewan, ataupun tumbuhan. Dalam sistem penamaan enzim, protease dibagi menjadi 2, yaitu endopeptidase dan eksopeptidase. Endopeptidase memotong ikatan yang berada di dalam molekul, sementara eksopeptidase efektif untuk memotong molekul yang besar dan tersusun atas rantai panjang menjadi fragmen yang kecil. Eksopeptidase menghidrolisis protein dari ujung N-terminal (aminopeptidase), C-terminal (karboksipeptidase) atau spesifik pada dipeptida (hidrolase dipeptidase) (Kusnandar, 2010). Secara umum, reaksi katalisa protease dalam menghidrolisis ikatan peptida protein dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Reaksi katalisa protease dalam menghidrolisis ikatan peptida protein (Winarno, 1993)

Dalam hidrolisis enzimatis, diperlukan enzim protease yang paling sesuai dan optimum dalam memproduksi peptida antihipertensi. Alkalase merupakan enzim protease alkalin komersial untuk penggunaan industri serta telah dikaji dalam hidrolisis plasma, albumin, kasein, gelatin, dan beberapa protein nabati untuk memproduksi penghambat ACE. Alkalase merupakan endoproteinase yang didapatkan dari hasil fermentasi *Bacillus licheniformis*. Alkalase termasuk ke dalam jenis endopeptidase, yaitu enzim yang dapat memotong ikatan peptida dari rantai tengah, dengan spesifitas memecah ikatan peptida pada substrat yang memiliki asam amino hidrofobik, seperti fenilalanin, triptofan, leusin, isoleusin, valin, prolin, dan metionin pada gugus terminal karboksil (Markland dan Smith, 1971).

Penggunaan alkalase memiliki suhu optimal antara 55 °C - 70 °C dan pH 6,5 - 8,5 (Quist, 2005). Karakter dari asam amino hidrofobik adalah memiliki cita rasa yang lebih sedikit pahit. Alkalase merupakan enzim yang mampu mencapai derajat hidrolisis dan menghasilkan peptida dengan aktivitas penghambatan ACE tertinggi pada berbagai lama waktu hidrolisis (Chiang *et al.*, 2006). Menurut Chiang *et al.* (2006), kondisi optimal alkalase untuk hidrolisis enzimatis selama 1 jam dalam memproduksi peptida penghambat ACE adalah pada kondisi $E/S = 0,01$, suhu = 50°C, pH = 9,0.

2.5 Derajat Hidrolisis

Derajat hidrolisis merupakan parameter umum yang digunakan untuk menggambarkan hasil proses dan indikator keberhasilan proses hidrolisis (Nielsen, 2001). Pengendalian proses hidrolisis diperlukan karena daya hidrolitik suatu enzim dapat bervariasi berdasarkan sumber dan substrat yang digunakan. Tingginya derajat hidrolisis menunjukkan bahwa peptida atau asam amino yang terbentuk semakin banyak, sehingga menghasilkan protein hidrolisat dengan berat molekul lebih rendah.

Derajat hidrolisis dapat dipengaruhi oleh konsentrasi enzim, waktu hidrolisis, serta jenis enzim yang digunakan (Haslaniza *et al.*, 2010). Peningkatan derajat hidrolisis disebabkan oleh peningkatan peptida dan asam amino yang

terlarut dalam TCA akibat pemutusan ikatan peptida selama hidrolisis (Hanslaniza *et al.*, 2010). Secara umum, pengendapan protein dengan TCA dapat dikelompokkan 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 berkisar antara 5 - 45% (w/v), protein akan mengendap dalam jumlah maksimal. Akan tetapi, apabila konsentrasi TCA lebih dari 45% (w/v), maka akan terjadi penurunan jumlah protein yang mengendap secara drastis dan pada konsentrasi diatas 60% (w/v), jumlah protein yang mengendap sangat sedikit (Rajalingam *et al.*, 2009). Selain itu, nilai derajat hidrolisis yang lebih tinggi pada alkalase turut mengindikasikan semakin tingginya aktivitas penghambatan ACE (Chiang *et al.*, 2006).

2.6 Hidrolisat Protein

Hidrolisat protein merupakan hasil penguraian protein berupa peptida sederhana dan asam amino yang dihasilkan melalui proses hidrolisis, baik oleh enzim, asam, maupun basa yang memberikan efek positif bagi kesehatan (Shahidi dan Zhong, 2008). Hidrolisat protein dapat berbentuk cair, pasta atau tepung dan bersifat higroskopis. Faktor-faktor yang mempengaruhi karakteristik hidrolisat protein adalah suhu, waktu, pH, konsentrasi, dan perbandingan enzim dengan protein selama proses hidrolisis protein, sedangkan warna, bau, rasa, dan tingkat kerusakan asam amino dipengaruhi oleh kemurnian protein dari bahan baku, kondisi, serta bahan penghidrolisis yang digunakan. Hidrolisis sempurna akan menghasilkan hidrolisat yang terdiri dari campuran 18 - 20 jenis asam amino.

Peptida merupakan fragmen - fragmen atau potongan protein spesifik yang terdiri atas 1 sampai 12 asam amino beserta ikatan peptida (Espitia *et al.*, 2012). Karakteristik peptida bioaktif dalam fungsi fisiologisnya tergantung pada dua faktor, yaitu urutan asam amino primer dalam protein dan spesifisitas enzim yang menghidrolisis protein tersebut. Urutan asam amino dalam biopetida tersusun secara pasti atau diketahui susunannya. Perbedaan susunan antar biopeptida satu

dengan yang lainnya juga dapat menyebabkan perdaan sifat biokimia dan sifat biologisnya (Hernandez-Ledeshma dan Hsieh, 2013).

2.7 Edamame

Kedelai sayur atau lebih dikenal sebagai edamame merupakan tanaman dengan nama spesies *Glycine max* (L.) Merr. Edamame merupakan jenis kedelai yang dipanen ketika bijinya masih hijau, kaya akan sukrosa dan klorofil (Dwevedi dan Kayastha, 2011). Gambar biji edamame yang diperoleh di kota Jember dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Biji edamame

Adapun klasifikasi tanaman edamame adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Phylum	: Tracheophyta
Class	: Magnoliopsida
Ordo	: Fabales
Familia	: Fabaceae (Leguminosae)
Genus	: <i>Glycine</i>
Species	: <i>Glycine max</i> (L.) Merr

Pada Prefektur Iwate (IDA, 1990), edamame mutu A harus memenuhi 90 persen polong atau lebih dengan dua atau tiga biji. Polong harus dalam bentuk sempurna, sepenuhnya hijau, dan tidak menunjukkan kecacatan atau bintik. Edamame mutu B harus memenuhi 90 persen atau lebih polong dengan dua atau tiga biji, namun dapat berwarna lebih terang dari hijau, dan beberapa polong dapat sedikit berbintik, terluka, berbentuk tidak sempurna, pendek, atau memiliki biji

kecil. Pada kedua mutu, polong tidak diperkenankan terlalu matang, terjangkit penyakit, rusak akibat serangga, berbiji satu, berbentuk tidak sempurna, kekuningan, terbagi, berbintik, atau mentah.

Seperti kedelai pada umumnya, biji edamame kaya akan protein dan nutrisi. Edamame mengandung protein yang relatif tinggi, yaitu sebesar 38 - 40 g per 100 g (bk) (Santana *et al.*, 2012). Edamame merupakan sumber karbohidrat, protein, serat, asam amino, peptida bioaktif, asam lemak omega-3, serta mikronutrien seperti zat besi, asam folat, magnesium, serta komponen fitokimia seperti isoflavon (0,1 - 3,0%), sterol (0,23 - 0,46%), dan saponin (0,17 - 6,16%). Pada saat dipanen, edamame memiliki kandungan *trypsin*-inhibitor dan oligosakarida tak dapat dicerna yang lebih rendah, namun lebih banyak kandungan vitamin dibandingkan kedelai pada umumnya (Konovsky, 1994). Biji dengan ukuran besar memiliki nutrisi protein superior, namun riset terkini menyimpulkan biji yang lebih besar memiliki kandungan lemak lebih tinggi dan lebih rendah protein dibandingkan dengan biji dengan ukuran kecil. Sekitar 90 persen komponen protein terlarut biji kedelai adalah globulin, dan lebih dari 70 persen globulin adalah glycinin (G) (11S globulin) dan β -conglycinin (β c) (7S globulin). Glisinin relatif kaya akan asam amino (metionin dan sistein) (3 - 4,5%) (Nielsen *et al.*, 1989). Kandungan nutrisi pada edamame tersebut memiliki potensi dalam mereduksi risiko penyakit tidak menular seperti hipertensi, hiperkolestrolamia, penyakit jantung, stroke, dan diabetes.

Dalam keadaan cukup hijau, penanganan paska panen memberikan pengaruh besar pada kualitas dan cita rasa. Kebutuhan untuk pendinginan cepat tidak dapat terlalu ditekankan. Produk segar dapat bertahan pada suhu ruangan selama 24 jam atau lebih sebelum penjualan dan penggunaan. Masuda *et al.* (1989) menemukan bahwa edamame beku dari Taiwan sering memiliki sukrosa (1,7% vs. 1,1%) dan asam amino (alanin 30 mg vs. 16 mg/100 g berat segar) daripada edamame segar di Jepang. Kedua edamame tersebut lebih rendah apabila dibandingkan dengan puncak panen (2,9% sukrosa dan 297 mg alanin). Pendinginan cepat (*blanching* dan pembekuan) diperlukan untuk memperlambat aktivitas enzim dan mengurangi penurunan kualitas. Untuk edamame beku,

blanching penting untuk menghentikan oksidasi asam lemak menjadi cita rasa yang tidak diinginkan. Dua komponen penting pada cita rasa edamame adalah manis dan gurih. Cita rasa manis ditentukan oleh kandungan sukrosa dan rasa gurih kemungkinan disebabkan oleh asam amino seperti asam glutamat (Masuda *et al.*, 1989).

2.8 Pengerinan

Pengerinan merupakan salah satu aspek penting dalam pengolahan pangan dan umum digunakan sebagai teknik pengawetan (Mechlouch *et al.*, 2012 dan Sachin *et al.*, 2010). Ketika dikeringkan, protein lebih sensitif pada pemanasan dan tekanan, meski demikian secara kimiawi produk hasil pengerinan akan lebih stabil dan memiliki daya simpan lebih lama (Haque dan Adhikari, 2015). Pengerinan protein dapat memicu beberapa tekanan yang mampu mendenaturasi protein dengan memodifikasi struktur protein (Joshi *et al.*, 2011).

2.8.1 Pengerinan Beku

Pengerinan beku merupakan metode pengerinan yang biasa digunakan untuk mengeringkan isolat protein pada laboratorium penelitian dan industri farmasi (Maltesen dan Weert, 2008). Prinsip teknologi pengerinan beku adalah pembekuan diikuti pengerinan, melalui mekanisme sublimasi yang terjadi pada suhu di bawah titik beku (Akers *et al.*, 1987). Prinsip utama pada pengerinan beku adalah proses sublimasi, di mana kandungan air dalam bentuk padat (es) secara langsung dikonversi menjadi uap tanpa melalui bentuk cairan. Sublimasi air dapat terjadi pada tekanan dan suhu di bawah 4.579 mm Hg dan 0.0099°C (Chien dan Yiew, 1981). Bahan yang akan dikeringkan harus dalam bentuk beku terlebih dahulu dan diletakkan pada vakum bertekanan tinggi untuk menghangatkan sehingga cairan beku yang menyublim hanya meninggalkan padatan atau komponen kering (Lieberman *et al.*, 1989).

Tahapan pada pengerinan beku dimulai dari persiapan sampel, diikuti pembekuan, pengerinan primer, dan pengerinan sekunder untuk menghasilkan produk dengan kandungan kelembapan yang diinginkan (Jeff, 2009). Tekanan uap

pada air meningkat dengan kenaikan pada suhu selama pengeringan primer. Suhu pengeringan primer harus dijaga setinggi mungkin, namun tetap di bawah suhu kritis untuk mencegah hilangnya struktur. Suhu kritis tersebut merupakan suhu yang memiliki tujuan untuk meruntuhkan komponen amorf. Selama pembekuan, Kristal es mulai memisah hingga larutan menjadi terkonsentrasi maksimal. Pada pendinginan lanjutan, terjadi fase pemisahan larutan dan es (Adams dan Irons, 1993).

Pada metode pengeringan beku tidak terjadi proses gelatinisasi, karamelisasi, dan denaturasi (Hariyadi, 2013). Menurut Haque dan Adhikari (2015), pengeringan beku lebih disarankan untuk larutan protein. Protein yang mengalami pengeringan beku mendapatkan lebih sedikit pengaruh dari suhu dibandingkan dengan pengeringan jenis lain. Proses konversi larutan protein menjadi bubuk kering tergolong kompleks, hal tersebut dikarenakan tingkat sensitifitas terhadap panas, terutama ketika masih dalam bentuk larutan (Abdul-Fattah *et al.*, 2007). Pengeringan beku produk isolat protein menghasilkan produk dengan kelarutan protein, aktivitas emulsi, dan daya buih yang lebih rendah dibandingkan dengan *spray drying*. Namun, produk isolat protein hasil pengeringan beku memiliki kapasitas pengikat air / minyak, kestabilan suhu, dan mengandung lebih banyak struktur β -turn dan lebih sedikit β -sheet dan gulungan acak yang lebih tinggi (Zhao *et al.*, 2013).

2.8.2 Pengeringan Oven

Pengeringan oven merupakan metode pengeringan konvensional yang umum digunakan pada industri pangan. Metode pengeringan oven memanfaatkan udara panas dan bekerja dengan cara menguapkan kandungan air dari bahan (Sachin *et al.*, 2010). Penggunaan oven untuk pengeringan produk membutuhkan waktu yang relatif lama dan menyebabkan penurunan kualitas pada produk kering (Trisnawati *et al.*, 2014). Perlakuan panas dapat memicu terjadinya denaturasi protein, reduksi sebagian atau inaktivasi alfa amilase dan gelatinisasi sebagian pada pati (Schlauri, 1999).

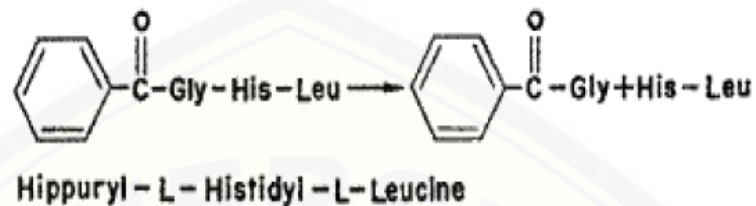
Pada kenaikan suhu, molekul protein menjadi fleksibel dan terjadi tabrakan antar molekul yang akan meningkatkan kemungkinan terjadinya denaturasi protein (Haque dan Adhikari, 2015). Denaturasi merupakan perubahan atau modifikasi terhadap struktur sekunder, tersier, dan kuartener terhadap molekul protein tanpa terjadinya pemecahan ikatan - ikatan kovalen. Denaturasi dapat pula diartikan sebagai proses terpecahnya ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, ikatan garam, dan terbukanya lipatan molekul (Winarno, 1997). Denaturasi dapat dipengaruhi oleh faktor fisik (panas atau suhu dan pengadukan) dan kimia (adanya garam, solven organik, asam, basa dan perubahan pH). Denaturasi dapat bersifat *irreversible* atau *reversible*. Denaturasi akan bersifat *reversible* apabila protein disimpan pada suhu di bawah 0°C, kemudian dilakukan peningkatan suhu sehingga protein kembali aktif. Denaturasi akan bersifat *irreversible* apabila dilakukan pemanasan pada suhu 60°C (Sugiyono, 2004).

Menurut penelitian terdahulu, cukup banyak jumlah protein terinaktivasi atau terdenaturasi akibat panas maupun tegangan yang berasal dari udara. Tegangan tersebut menyebabkan kerusakan struktur sekunder (α -helix, β -sheet, dan gulungan acak) dan tersier yang tidak dapat kembali (Ameri dan Maa, 2006). Panas dan tegangan terkait dehidrasi yang terjadi selama proses pengeringan dapat mendenaturasi atau menginaktivasi sebagian atau keseluruhan protein, termasuk fungsi enzimatis akibat perubahan struktur (Wolkers *et al.*, 1998). Gulungan protein yang terbuka memicu interaksi yang dapat menyebabkan agregasi, koagulasi, dan presipitasi (Pelerigne dan Gasparetto, 2005). Denaturasi protein dapat secara tidak langsung diukur dengan memantau perubahan beberapa karakteristik protein, seperti kehilangan kelarutan, peningkatan hidrofobisitas, peningkatan proteolisis, dan kehilangan resistensi pada enzim proteolisis serta kehilangan aktivitas biologi (Cleland *et al.*, 1993).

2.9 Penentuan Aktivitas Penghambatan ACE

Pengujian aktivitas penghambatan ACE bertujuan untuk mengetahui aktivitas penghambatan peptida terhadap enzim ACE yang dinyatakan dalam bentuk persen penghambatan. Pengukuran efek penghambatan aktivitas ACE

dilakukan dengan penggunaan substrat *Hippuryl-Histidyl-Leusin* (HHL). Prinsip dari metode ini adalah terbentuknya asam hipurat (HA) dan His-Leu (HL) yang terbentuk dari reaksi antara *Hippuryl-Histidyl-Leusin* (HHL) dan ACE. Reaksi terbentuknya His-Leu (HL) dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Reaksi Hidrolisis HHL oleh ACE (Rui, 2012)

Dalam aktivitas penghambatan ACE, terdapat 2 jenis mekanisme, yaitu mekanisme yang bersifat kompetitif dan non kompetitif. Inhibitor kompetitif mampu masuk dan berinteraksi dengan molekul enzim ACE sehingga membentuk *dead-end complex* atau molekul substrat berikatan atau tidak (Wijasekara *et al.*, 2011). *Angiotensin I-converting enzyme* (ACE) lebih dapat mengikat suatu substrat atau inhibitor kompetitif yang mengandung asam amino hidrofobik pada C-terminal tripeptida (Tsai *et al.*, 2008). Biopeptida yang bersifat hidrofobik memiliki mekanisme penghambatan ACE dengan cara melakukan ikatan baik pada sisi aktif C-terminal dan N-terminal ACE, sedangkan peptida hidrofilik hanya dapat mengikat pada sisi aktif C-terminal ACE (Turner dan Hopper, 2002). Selain itu C-terminal pada lisin dan arginin yang merupakan rantai dengan muatan positif juga mampu menghambat aktivitas ACE dengan mekanisme ikatan ionik dengan sisi aktif ACE.

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Bahan dan Alat

3.1.1. Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah edamame kualitas I yang diperoleh dari PT. Mitra Tani Dua Tujuh, Jember. Enzim alkalase 2.4L (2,4 U/g) (P4860) didapatkan dari Sigma (Singapura). Bovine serum albumin (BSA), hippury-L-histidyl-L-leucine (HHL), dan L-Carnosine didapatkan dari Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Jepang). Reagen fenol didapatkan dari Kishida Chemical Co. Ltd. (Osaka, Jepang). Prestained XL Ladder didapatkan dari BioDynamics Laboratory Inc. (Jepang). DynaMarker Protein MultiColor Stable, *Low Range* didapatkan dari Apro Science (Jepang). Ez Apply, Ez Run, dan Ez Stain Aqua didapatkan dari ATTO Corp. (Tokyo, Jepang). Bahan kimia yang digunakan antara lain akuades, asam borat, 3,6 M asam fosforat, *bromophenol blue*, *coomassie brilliant blue*, CuSO_4 , 1 M HCl (Mediss), n-heksan (Merck), K_2SO_4 , Na_2CO_3 , NaOH (Merck), 0,2% ortho-phthalaldehyde, *sodium tartrate*, *trichloroacetic acid* (TCA) (Merck).

3.1.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pengering beku (CHRIST Alpha 1-2 LD plus), *macro* dan *micro refrigerated centrifuge* (Tomy MRX-150 dan Hitachi CR21GII), *varioskan flash* (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), spektrofotometer (Hitachi tipe U-2900 UV-Vis), pH meter (Horiba F-51), LAF (*Laminar Air Flow*) (Nuair), destilator (BUTCHI K-355), labu kjeldahl, oven, dan buret. Alat lain yang digunakan meliputi *water bath*, *blender*, neraca analitik, *magnetic stirrer*, *hotplate*, *vortex*, loyang, ayakan 80 mesh, *erlenmeyer*, *beaker glass*, termometer, mikro pipet, mikro pipet tip, tabung reaksi, pipet tipis, dan spatula.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian tahap pertama dilakukan di Laboratorium Kimia dan Biokimia Pangan dan Hasil Pertanian dan Laboratorium Rekayasa Proses Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember, sedangkan tahap dua dan tiga dilakukan di CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*) Universitas Jember dan *Laboratory of Lipid Biotechnology, Lipid Chemistry, and Food Chemistry, Food Microscopic Analysis*, dan *Food Processing Laboratory* Prefectural University of Hiroshima. Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret 2017 sampai Desember 2017.

3.3 Pelaksanaan Penelitian

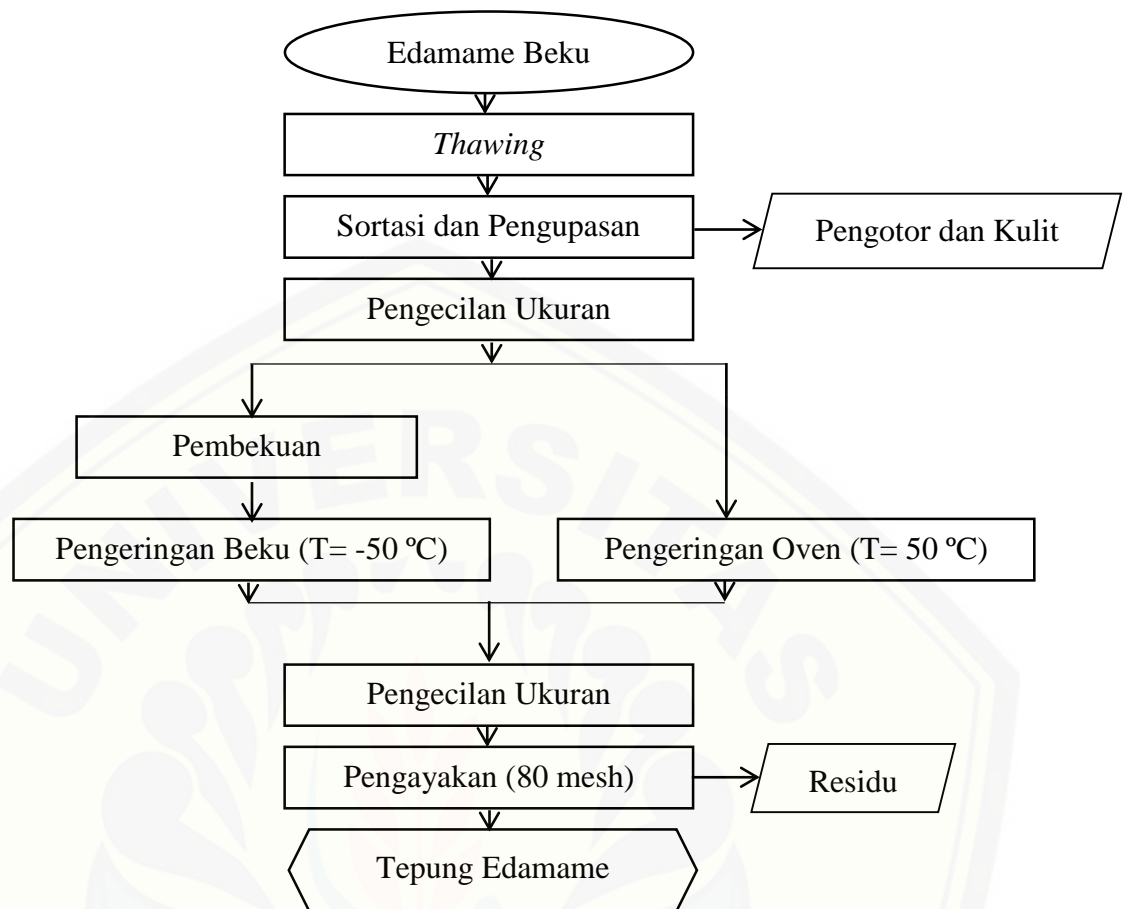
Penelitian dilaksanakan dalam empat tahapan, yaitu 1) preparasi tepung edamame rendah lemak 2) ekstraksi protein edamame 3) hidrolisis protein edamame 4) karakterisasi tepung dan hidrolisat protein kedelai edamame. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) menggunakan perlakuan perbedaan pengeringan, yaitu pengeringan beku dan pengeringan oven pada proses pembuatan tepung. Hidrolisat protein edamame yang diperoleh dari penelitian ini, selanjutnya dianalisis untuk mengetahui sifat dan potensinya sebagai antihipertensi. Variabel yang diamati pada penelitian ini, yaitu kadar protein total metode Kjeldahl (AOAC, 2001), derajat hidrolisis (Silvestree *et al.*, 2013), kadar protein metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951), fraksi berdasar berat molekul protein hidrolisat (Laemlli, 1970), dan aktivitas penghambatan ACE (Ishiguro *et al.*, 2012).

3.3.1 Preparasi Tepung Edamame Rendah Lemak

Persiapan edamame kering beku. Persiapan edamame kering beku diawali dengan melakukan *thawing* terlebih dahulu untuk memudahkan proses pengupasan kulit edamame. Kemudian, dilakukan sortasi dan pengupasan kulit dengan tujuan untuk menghilangkan pengotor dan kulit edamame. Selanjutnya, dilakukan pengecilan ukuran menggunakan pisau untuk memperluas permukaan edamame yang akan memudahkan tahapan pengeringan. Setelah itu, dilakukan

pembekuan kembali sebagai persiapan tahapan pengeringan beku. Setelah beku, dilakukan pengeringan menggunakan pengering beku pada suhu -50°C selama 24 jam. Setelah kering, sampel kering beku dilakukan pengecilan ukuran menggunakan *blender* dan dilanjutkan dengan pengayakan menggunakan ayakan 80 mesh untuk memperoleh partikel tepung yang seragam. Sampel disimpan pada suhu -20°C untuk digunakan pada tahap penelitian lanjutan.

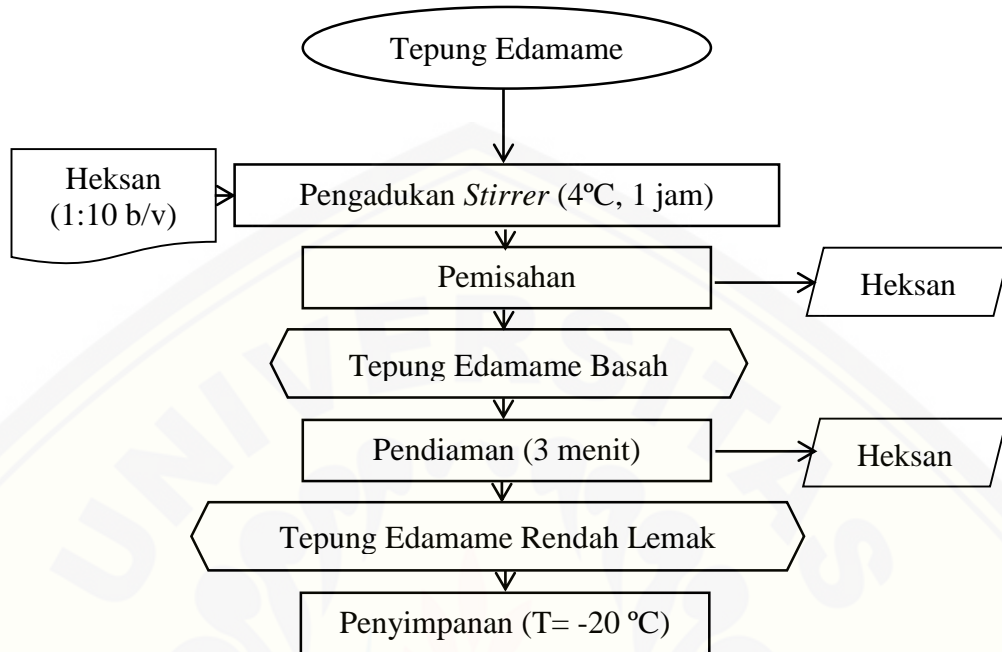
Persiapan edamame kering oven. Persiapan edamame kering oven diawali dengan melakukan *thawing* terlebih dahulu untuk memudahkan proses pengupasan kulit edamame. Kemudian, dilakukan sortasi dan pengupasan kulit dengan tujuan untuk menghilangkan pengotor dan kulit edamame. Selanjutnya, dilakukan pengecilan ukuran menggunakan pisau untuk memperluas permukaan edamame yang akan memudahkan tahapan pengeringan. Setelah itu, dilakukan pengeringan menggunakan pengering oven pada suhu 50°C selama 24 jam. Setelah kering, sampel kering oven dilakukan pengecilan ukuran menggunakan *blender* dan dilanjutkan dengan pengayakan menggunakan ayakan 80 mesh untuk memperoleh partikel tepung yang seragam. Sampel disimpan pada suhu -20°C untuk digunakan pada tahap penelitian lanjutan. Diagram alir persiapan sampel dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Diagram alir persiapan sampel

Penghilangan Kandungan Lemak. Metode penghilangan kandungan lemak dilakukan berdasarkan modifikasi metode yang dilakukan Viernes *et al.* (2012). Penghilangan kandungan lemak dilakukan menggunakan pelarut berupa heksan dengan perbandingan 1:10 (b/v) selama satu jam pada ruang pendingin, dengan pengadukan konstan menggunakan *magnetic stirrer*. Campuran yang dihasilkan kemudian dipisahkan dengan cara menuangkan heksan yang telah digunakan pada wadah lain dan meratakan tepung edamame pada loyang dengan tujuan untuk mempermudah tahapan penguapan heksan. Tepung edamame tersebut dilakukan pendiaman selama 3 menit pada ruang asam dengan tujuan untuk menghilangkan residu heksan. Tepung edamame yang telah dihilangkan kandungan lemaknya disimpan pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hingga digunakan pada tahap penelitian

selanjutnya. Diagram alir penghilangan kandungan lemak tepung edamame dapat dilihat pada Gambar 3.2.

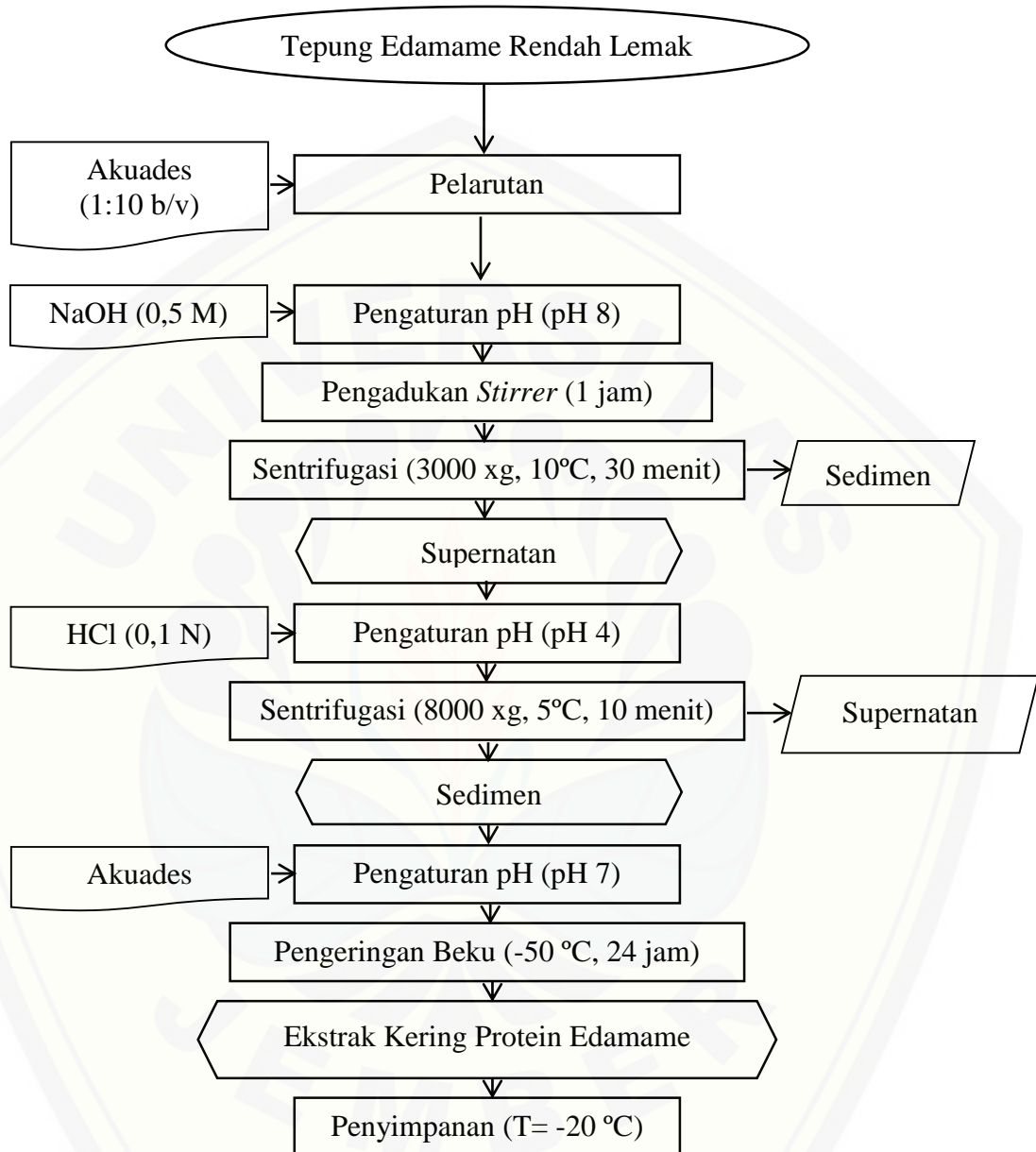


Gambar 3.2 Diagram alir penghilangan kandungan lemak tepung edamame

3.3.2 Ekstraksi Protein

Metode ekstraksi protein edamame dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan Wani *et al.* (2015) dengan modifikasi. Tepung edamame yang telah dihomogenkan dilarutkan ke dalam akuades dengan perbandingan 1:10 (b/v), kemudian dilakukan pengaturan pH hingga mencapai pH 8 menggunakan NaOH (0,5 M). Larutan tersebut kemudian dilakukan pengadukan konstan menggunakan *magnetic stirrer* selama satu jam. Setelah selesai, larutan tersebut disentrifugasi pada kecepatan 3000 xg selama 30 menit pada suhu 10 °C, sedimen yang didapatkan merupakan pati sedangkan supernatan yang didapatkan dilakukan pengaturan pH menjadi 4 menggunakan HCl (0,1 N) untuk mengendapkan protein. Protein didapatkan dengan sentrifugasi pada 8000 xg selama 10 menit pada suhu 5°C diikuti dengan penghilangan supernatan. Ekstrak yang didapatkan dicuci dengan akuades dan dilarutkan dengan akuades kembali diikuti dengan pengaturan pH menjadi 7. Kemudian larutan tersebut dikeringbekukan menggunakan pengering beku. Ekstrak

protein yang didapatkan disimpan pada suhu -20°C hingga digunakan pada tahapan selanjutnya. Diagram alir ekstraksi protein edamame dapat dilihat pada Gambar 3.3.

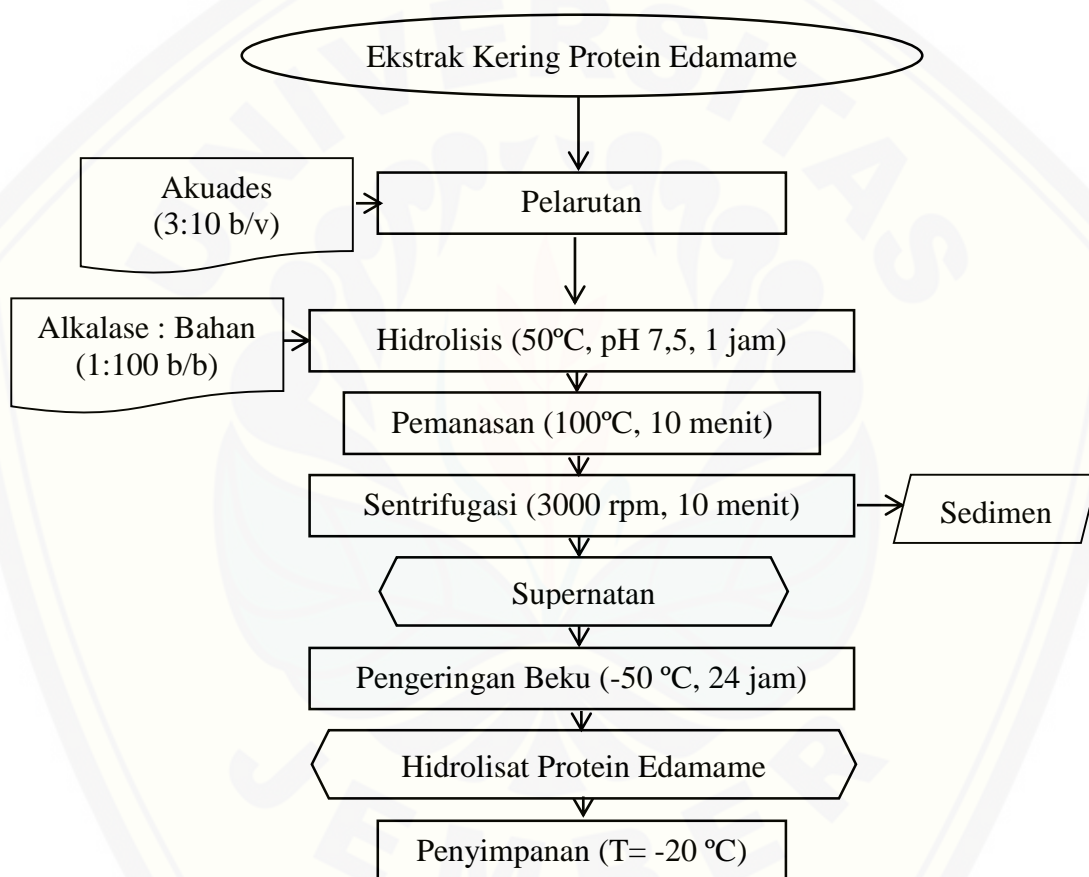


Gambar 3.3 Diagram alir ekstraksi protein edamame

3.3.3 Hidrolisis Protein Edamame

Proses hidrolisis enzimatis ekstrak protein edamame dilakukan berdasarkan modifikasi metode yang dilakukan Chiang *et al.* (2006). Sebanyak 3% (b/v) ekstrak protein yang telah dipersiapkan sebelumnya dan 1% alkalase (b/b ekstrak protein) direaksikan pada suhu 50°C , pH: 7,5, selama 1 jam. Sampel yang

telah direaksikan tersebut segera dipanaskan pada *boiling water bath* selama 10 menit, dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 3000 rpm pada sebuah *micro sentrifuge* selama 10 menit. Supernatan yang didapatkan digunakan untuk tahapan selanjutnya. Supernatan tersebut dikeringbekukan menggunakan pengering beku. Hidrolisat protein yang didapatkan disimpan pada suhu -20°C hingga digunakan pada tahapan selanjutnya. Diagram alir hidrolisis enzimatis protein edamame dapat dilihat pada Gambar 3.4.



Gambar 3.4 Diagram alir hidrolisis enzimatis protein edamame

3.4 Prosedur Analisis

3.4.1 Analisis Kadar Protein Metode Kjeldahl

Analisis kadar protein total dilakukan dengan metode Kjeldahl (AOAC, 2001). Sebanyak 1 g tepung edamame dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl. Selanjutnya, dilakukan penambahan 7 g K_2SO_4 , 0,8 g CuSO_4 , dan 12 ml H_2SO_4

pekat ke dalam labu tersebut. Kemudian, dilakukan pemanasan dalam ruang asam selama 60 menit, dilanjutkan dengan pendinginan selama 10 - 20 menit. Setelah dingin, dilakukan penambahan akuades hingga volume total sebesar 80 ml. Selanjutnya, dilakukan penambahan NaOH 40% (w/w) sebanyak 50 ml dan dilakukan distilasi hingga diperoleh distilat sebanyak 150 ml. Distilat yang dihasilkan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dengan 30 ml H₃BO₃ 1% (w/v) yang telah diberi indikator campuran. Distilat yang diperoleh dilakukan titrasi dengan larutan standar berupa HCl 0,1 M hingga warna ungu muda tercapai. Larutan blanko dengan bahan berupa akuades diberikan perlakuan yang sama. Presentase kadar protein total dapat diperoleh dengan perhitungan sebagai berikut.

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

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

3.4.2 Analisis Kadar Protein Metode Lowry

Penentuan kadar protein terlarut hidrolisat dilakukan dengan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Sebanyak 0,5 ml larutan hidrolisat protein dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dilakukan penambahan 2,5 ml reagen Lowry B dan dilakukan pendiaman selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan penambahan 250 µl reagen Lowry A. Setelah penambahan tersebut dilakukan pemvortexan dan pendiaman selama 30 menit. Pembacaan nilai absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 750 nm. Data absorbansi diplotkan pada kurva standar BSA untuk menghitung kadar proteinnya.

Larutan standar protein dibuat dengan menimbang 2500 µg (2,5 mg) BSA (*Bovine Serum Albumin*) yang kemudian dilarutkan dengan 10 ml akuades sehingga diperoleh larutan stok BSA dengan konsentrasi 250 µg/ml. Larutan stok dengan konsentrasi 1 mg/ml diambil sebanyak 0,1 ml; 0,2 ml; 0,4 ml; 0,6 ml; 0,8 ml; dan 1,0 ml. Larutan BSA dengan berbagai konsentrasi tersebut diambil sebanyak 0,5 ml yang kemudian direaksikan dengan reagen Lowry B sebanyak 2,5 ml dan dilakukan pendiaman selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan penambahan 250 µl reagen

Lowry A. Setelah penambahan tersebut dilakukan pemvortexan dan pendiaman selama 30 menit. Pembacaan nilai absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 750 nm. Presentase kadar protein dapat diperoleh dengan perhitungan sebagai berikut.

$$\% \text{ Protein} = \frac{\text{konsentrasi protein}}{\text{mg protein}} \times 100\%$$

3.4.3 Analisis Derajat Hidrolisis

Persen derajat hidrolisis dianalisa menggunakan metode Silvestree *et al.*, (2013). Derajat hidrolisis merupakan presentasi ikatan peptida terpotong terhadap jumlah total ikatan per berat unit. Penentuan DH dilakukan dengan pengendapan *trichloroacetic acid* (TCA) 20% untuk menghasilkan 10% fraksi protein terlarut dan 10% fraksi tidak larut. Sebanyak 500 µl hidrolisat dilakukan penambahan dengan 500 µl TCA 20%, dilanjutkan dengan pemvortexan dan inkubasi (suhu 4°C, 30 menit). Kemudian campuran tersebut dilakukan sentrifugasi (3000 g, 20 menit). Kandungan protein terlarut dan protein total dianalisis berdasarkan metode Lowry *et al.* (1951) dengan penggunaan *bovine serum albumin* (BSA) sebagai standar. Perhitungan derajat hidrolisis dapat ditentukan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{DH (\%)} = \frac{\text{Protein terlarut 10\% TCA}}{\text{Total kandungan protein}} \times 100 \%$$

3.4.4 Analisis Profil Berat Molekul Protein Hidrolisat

Analisis SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis*) dilakukan menggunakan metode yang dilakukan oleh Laemmli (1970). Analisis SDS-PAGE peptida dilakukan pada perangkat elektroforesis gel. Analisis dilakukan dengan e-PAGE® (E-TI5S, ATTO Corp., Tokyo, Jepang) konsentrasi 15%. Pemisahan hidrolisat dengan SDS-PAGE dilakukan dengan arus listrik 30 V selama 125 menit. Berat molekul hidrolisat diperkirakan dengan marker

protein, Prestained XL LadderDynaMarker (10 - 250 kDa) dan Protein MultiColor Stable, Low Range (1,7 - 46,3 kDa). Protein yang terpisah diwarnai dengan comassie brilliant blue selama 30 menit dan dibersihkan hingga pita yang terbentuk dapat terlihat.

3.4.5 Analisis Aktivitas Penghambatan ACE

Pengujian aktivitas penghambatan ACE dilakukan berdasarkan modifikasi metode yang dilakukan oleh Ishiguro *et al.* (2012). Hidrolisat protein dilarutkan dalam akuades dengan konsentrasi 0,1, 0,2, 0,5, dan 1,0 mg/ml. Sebagai kontrol positif, digunakan *L-Carnosine*. Sebanyak 50 μ l sampel diletakkan pada sebuah 96-well black quartz micro plate dengan 100 μ l 0,01 U/ml ACE dan diinkubasi pada 37°C selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan 25 μ l 25 mM Hippuryl-L-histidyl-L-leucine pada 0,1 M buffer HEPES yang mengandung 0,3 M NaCl (pH 8.3). Setelah inkubasi pada 37°C selama 40 menit, reaksi dihentikan dengan penambahan 100 μ l 0,5 M NaOH. Sebanyak 10 μ l 0,2% o-phthaldialdehyde pada methanol ditambahkan, diikuti dengan penambahan 15 μ l 3,6 M asam fosfat 15 menit kemudian. Absorbansi diukur menggunakan variaskan flash (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Penentuan absorbansi dilakukan pada panjang gelombang *extension 360 emission 460*. Perhitungan aktivitas penghambatan ACE (%) ditentukan sebagai berikut.

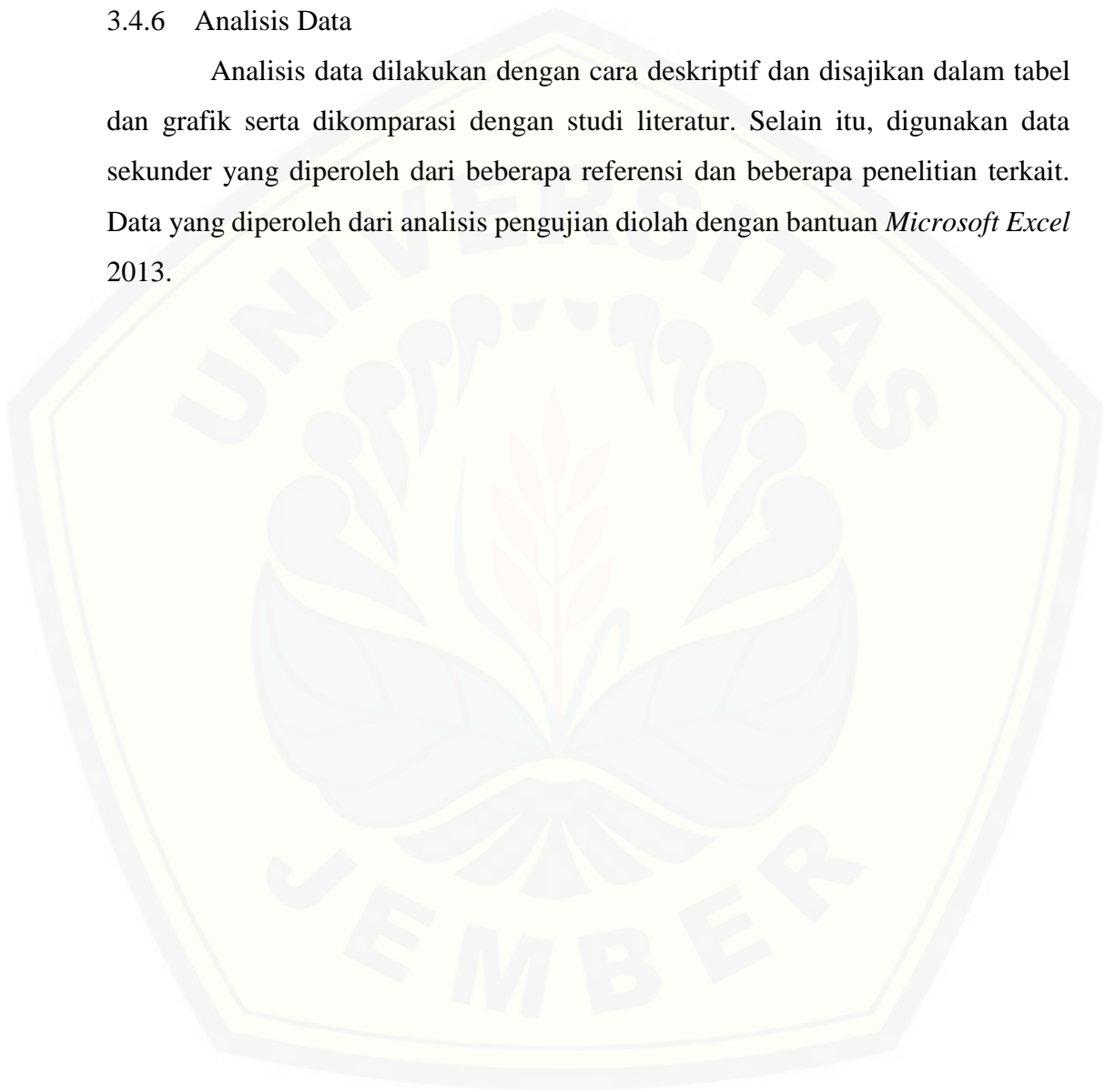
$$\text{Penghambatan (\%)} = [1 - (S - S_B) / (C - C_B)] \times 100$$

Di mana S adalah sampel yang diberi ACE, S_B adalah sampel yang diberi akuades sebagai pengganti ACE (*blank*), C adalah kontrol berupa akuades yang diberi ACE, dan C_B adalah kontrol berupa akuades yang diberi akuades sebagai pengganti ACE (*blank*). Setelah didapatkan presentase penghambatan dari masing - masing konsentrasi, persamaan $y = a (\ln) x + b$ ditentukan dengan perhitungan secara regresi logaritmik dimana x adalah konsentrasi (mg/ml) dan y adalah persen penghambatan (%). Persamaan tersebut digunakan untuk mencari nilai IC_{50} (*Inhibitor Concentration 50%*) dari masing - masing sampel dengan menyatakan

nilai y sebesar 50 dan nilai x yang akan diperoleh sebagai nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menyatakan besarnya konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat aktivitas ACE sebesar 50%.

3.4.6 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan cara deskriptif dan disajikan dalam tabel dan grafik serta dikomparasi dengan studi literatur. Selain itu, digunakan data sekunder yang diperoleh dari beberapa referensi dan beberapa penelitian terkait. Data yang diperoleh dari analisis pengujian diolah dengan bantuan *Microsoft Excel* 2013.



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan protein tepung edamame tergolong tinggi, yaitu sebesar 32,8 persen untuk perlakuan pengeringan beku dan 33,4 persen untuk perlakuan pengeringan oven. Derajat hidrolisis protein edamame kering beku adalah sebesar 35 persen dan edamame kering oven sebesar 44 persen. Hidrolisat protein edamame kering oven memiliki kadar protein lebih tinggi (86,6 %) dibandingkan dengan edamame kering beku (79 %).

Analisis SDS-PAGE menunjukkan bahwa fraksi berdasarkan berat molekul protein dari hidrolisat protein edamame dengan perbedaan metode pengeringan menghasilkan tiga pita subunit utama, yaitu 17, 8,7 dan 3,9 kDa dengan pola komponen protein yang hampir identik. Hidrolisat protein edamame kering beku 1.000 µg/ml mampu menghambat aktivitas ACE (*Angiotensin-I Converting Enzyme*) sebesar 77 persen, sedangkan hidrolisat protein edamame kering oven 1.000 µg/ml sebesar 46 persen. Nilai IC₅₀ dari hidrolisat protein edamame kering beku dan kering oven secara berturut-turut adalah sebesar 464,6 µg/ml dan 1.445,5 µg/ml dengan konsentrasi protein sebesar 51,7 µg/ml dan 151,2 µg/ml. Hidrolisat protein edamame dari kedua perlakuan memiliki potensi untuk diaplikasikan sebagai nutrasetikal dalam penghambatan hipertensi.

5.2 Saran

Ditinjau dari penelitian yang telah dilakukan, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan jenis asam amino peptida dari hidrolisat bersumber protein edamame. Selain itu, diperlukan pula pengujian aktivitas penghambatan ACE-I (*Angiotensin-I Converting Enzyme*) dari setiap fraksi hidrolisat protein edamame.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdul-Fattah, A.M, D.S. Kalonia, M.J. Pikal. 2007. The Challenge of Drying Method Selection for Protein Pharmaceuticals: Product Quality Implications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 96 (8): 1886 - 1915.
- Adams, G.D. dan L.I. Irons. 1993. Some Implications of Structural Collapse during Freeze Drying using *Erwinia Caratovora* I-Asparaginase as a Model. *J. Chem. Biotechnol.* 58: 71 - 76.
- Agyei, D., C.M. Ongkudon, C.Y. Wei, A.S. Chan, dan M.K. Danquah. 2016. Bioprocess Challenges to the Isolation and Purification of Bioactive Peptides. *Food and Bioproducts Processing*. 98: 244 - 256.
- Akers, M.J., A.L. Fites, dan R.L. Robinson. 1987. Types of Parenteral Administration. *Journal of Parenteral Science and Technology*. 41: 88 - 95.
- Alberts B., A. Johnsons, J. Lewis, M. Raf, K. Roberts, dan P. Walter. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science.
- Ameri, M. dan Y.F. Maa 2006. Spray Drying of Biopharmaceuticals: Stability and Process Considerations. *Drying Technology*. 24: 763 - 768.
- AOAC. 2001. AOAC Official Method 2001.11: Protein (Crude) in Animal Feed, Forage (Plant Tissue), Grain, and Oilseeds. AOAC International.
- Ariyani, F., M. Saleh, Tazwir dan N. Hak. 2003. Optimasi Proses Produksi Hidrolisat Protein Ikan dari Mujahir (*Oreochromis mossambicus*). *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. Vol. (9): 11 - 21.
- Belkaaloul K., Checroun A., Ait- Abdesalam A., Saidi D., Khereuo O. 2010. Growth, Acidification and Proteolysis Performance of Teo Co-cultures (*Lactobacillus plantarum*- *Bifidobacterium longum* and *Streptococcus thermophilus*). *African Journal of Biotechnology*. 9 (10): 1463 - 1469.
- Chiang, Wen-Dee, T. May-June, T. Zong-Yao, T. Tsun-Chung. 2006. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitor Derived from Soy Protein Hydrolysate and Produced by Using Membrane Reactor. *Food Chemistry*. 98: 725 - 732.
- Chien dan W. Yiew. 1981. Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications. *Indian Journal of Pharmaceutical Science and Technolgy*. 35: 106 - 118.

- Cleland, J.L., M.F. Powell, dan S.J. Shire. 1993. The Development of Stable Protein Formulations: A Close Look at Protein Aggregation, Deamidation, and Oxidation.
- Dwevedi, Alka dan Kayastha, Arvind M. 2011. Soybean: A Multifaceted Legume with Enormous Economic Capabilities. *Soybean - Biochemistry, Chemistry, and Physiology*. 11: 165 - 200.
- Espitia, S., A. Coimbra, dan C. Medeiros. 2012. Bioactive Peptides: Synthesis, Properties, and Applications in the Packaging and Preservation of Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 11 : 187 - 204.
- Gehrke, C.W., L.L. Wall, J.S. Absheer, F.E. Kaiser, dan R.W. Zumwalt. 1985. Sample Preparation for Chromatography of Amino Acids: Acid Hydrolysis of Proteins. *Journal of Association of Official Analytical Chemistry*. 68: 811 - 821.
- Guang, C. dan R.D. Phillips. 2009. Plant Food-derived Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides. *J. Agric. Food Chem.* 57: 5113 - 5120.
- Hanafusa, N. 1969. *Freezing and Freeze-Drying of Microorganisms*. Baltimore: University Park Press.
- Haque, M. Amdadul dan Adhikari, Benu. 2015. *Drying and Denaturation of Proteins in Spray Drying Process*. Melbourne: Research Gate.
- Hariyadi, Purwiyatno. 2013. Freeze Drying Technology: For Better Quality and Flavor of Dried Products. *Foodreview Indonesia*. Vol. VIII No. 2 Februari 2013.
- Haslaniza, H., M.Y. Maskat, W.M. Wan Aida, 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. *Int. Food Res J.* 17: 147152.
- Hawab, H.M. 2004. *Pengantar Biokimia Edisi Revisi*. Bogor: Bayumedia Publishing.
- Hermiastuti, M. 2013. "Analisis Kadar Protein dan Identifikasi Asam Amino pada Ikan Patin (*Pangasius djambal*)". *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Hernandez-Ledesma, B. dan C-C Hsieh. 2013. *Bioactive Food Peptide in Health and Disease*. Intech. www.intechopen.com.
- IDA. 1990. *Iwate-ken Seikabutsu to Shukka Kikaku Shido Hikkei*. Morioka: Iwate-ken Department of Agriculture.

- Ishiguro, Koji, Y. Sameshima, T. Kume, K. Ikeda, J. Matsumoto dan M. Yoshimoto. 2012. Hypotensive Effect of a Sweet Potato Protein Digest in Spontaneously Hypertensive Rats and Purification of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides. *Food Chemistry*. 131: 774 - 779.
- Jeff, S.J. 2009 Basic Cycle Development Techniques for Lyophilized Products. 35: 126 - 128.
- Joshi, M., B. Adhikari, P. Aldred, *et al.* 2011. Physicochemical and Functional Properties of Lentil Protein Isolates Prepared by Different Drying Methods. *Food Chemistry*. 129 (4): 1513 - 1522.
- Karaki, H., K. Doi, S. Sugano, H. Uchiwa, R. Sugai, dan U. Murakami. 1990. Antihypertensive Effect of Tryptic Hydrolysate of Milk Casein in Spontaneously Hypertensive Rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 96C2: 367 - 371.
- Konovsky, J., T.A. Lumpkin, dan D. McClary. 1994. *Edamame: The Vegetable Soybean*. Washington: Washington State University.
- Korhonen, H., A. Pihlanto-Leppälä, P. Rantamäki dan T. Tupasela. 1998. Impact of Processing on Bioactive Proteins and Peptides. *Trends in Food Science and Technology*. 9: 307 - 319.
- Kusnandar, Feri. 2010. *Kimia Pangan: Komponen Pangan*. Jakarta: PT. Dian Rakyat.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680 - 685.
- Li, G.H., Y.H. Shi, H. Liu, dan G.W. Le. 2005. Mung-bean Protein Hydrolysates Obtained with Alcalase Exhibit Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity. *Food Science and Technology*. 11 (4): 281 - 287.
- Liberman, H.A., L. Lachman, dan B.J. Schwartz. 1989. *Pharmaceutical Dosage Form: Parenterals*. Marcel Dekker Publisher.
- Litvin S., C.H. Mannheim, dan J. Miltz. 1998. *Journal Food Engineering*. 36: 103 - 111.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 193: 265 - 275.
- Maltesen, M.J. dan van de Weert, M. 2008. Drying Methods for Protein Pharmaceuticals. *Drug Discovery Today: Technoogies*. 5 (2 - 3): e81 - e88.

- Markland, F.S. dan E.L. Smith. 1971. *Subtilisins: Primary Structure, Chemical and Physical Properties*. New York: Academic Press.
- Masuda, R., K. Hashizume, dan K. Kaneko. 1989. Effect of Holding Time before Freezing on the Constituents and the Flavour of Frozen Green Soybeans. *Nihon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 35: 763 - 770.
- Mechlouch, R.F., W. Elfalleh., M. Ziadi., H. Hannachi., M. Chwikhi., A.B. Aoun., I. Elakesh, dan F. Cheour. 2012. Effect of Drying Methods on the Physicochemical Properties of Tomato Variety Rio Grande. *Int. J. F. Eng.* 8: Iss. 2, Art. 4. DOI: 10.1515/1556-3578.2678.
- Mundi dan Aluko. 2012. Physicochemical and Functional Properties of Kidney Bean Albumin and Globulin Protein Fractions. *Food Research International*. 48 : 299 - 306.
- Nielsen, N.C., C.D. Dickinson, dan T.J. Cho. *et al.* 1989. Characterization of the Glycinin Family in Soybean. *Plant Cell*. 1: 313 - 328.
- Nielsen, P. M. 1997. *Functionality of Protein Hydrolysates*. New York.
- Nielsen P. M., D. Petersen D., dan C. Dambmann. 2001. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Food Science*. 66 (5): 642 - 646.
- Pan American Health Organization (PAHO). 2017. *World Hypertension Day 2017: Know Your Numbers*. <http://www.paho.org> (diakses tanggal 12 April 2018)
- Pelegrine, D.H.G. dan Gasparetto, C.A. 2005. Whey Protein Solubility as Function of Temperature and pH. *LWT - Food Science and Technology*. 38: 77 - 80.
- Purwanto, Maria Goretti M. 2014. Perbandingan Analisa Kadar Protein Terlarut dengan Berbagai Metode Spektroskopi UV-Visible. *Jurnal Ilmiah Sains dan Teknologi*. 07: 1 - 71.
- Quist, Ekuwa Enyonam. 2005. *Peanut (Arachis hypogaea L.) as a Source of Antihypertensive and Antimicrobial Peptides*. Ghana: University of Ghana.
- Rajalingam, D. Loftis C., Jiashou J. Xu dan Thallapuranam K.S.K. 2009. Theichloroacetic Acid-Induced Protein Precipitation Involves The Reversible Association of a Stable Partially Structured Intermediate. *Department of Chemistry and Biochemistry, University of Arkansas*. Vol 18: 980 - 993.

- Rui, X., S. Boye J.I., B.K. Prasher dan S. O. 2012. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Properties of *Phaseolus vulgaris* Bean Hydrolysates: Effects of Different Thermal and Enzymatic Digestion Treatments. *Food Research International*. 49 : 739 - 746.
- Sachin, V., C.L. Jangam Low, dan A.S. Mujumdar. 2010. Drying of Food, Vegetables, and Fruits. Volume 1. ISBN: 978-981-08-6759-1.
- Santana, A.C., M.C. Carrao-Panizzi, J.M.G. Mandarino, R.S. Leite, J.B.D. Silvia dan E.I. Ida. 2012. Effect of Harvest at Different Times of Day on The Physical and Chemical Characteristics of Vegetable-type Soybean. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. Vol. 32 (2): 351 - 356.
- Sari, Wahyu Eka. 2011. Aktivitas Antihipertensi Aktinomiset Endofit Asal Tanaman Panganan dan Belimbing Wuluh. Bogor: IPB.
- Schlauri, M. 1999. Altering Flow Quality by Heat Treatment. *Getreide Mehl und Brot*. 53: 308 - 309.
- Shahidi F. dan Zhong Y. 2008. Bioactive Peptides. *Journal of AOAC International*. 91: 914 - 931.
- Silvestre, M.P.C., H.A. Morais, V.D. Silva, M.R. Silva, dan Grau. 2013. Degree of Hydrolysis and Peptide Profile of Whey Proteins Using Pancreatin. *Journal Brazilian Society and Food Nutrition*. 38 (3): 278 - 290.
- Sugiyono. 2004. *Buku Kimia Pangan*. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta.
- Tang, C. 2007. Functional Properties and In Vitro Digestibility of Buckwheat Protein Products: Influence of Processing. *Journal of Food Engineering*. 82(4): 568 - 576.
- Trisnawati, Wayan, K. Suter, K. Suastika, dan N. Kencana Putra. 2014. Pengaruh Metode Pengeringan Terhadap Kandungan Antioksidan, Serat Pangan dan Komposisi Gizi Tepung Labu Kuning. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan* 3: 4.
- Tsai, J.S., T.J. Chen, B.S. Pan, S.D. Gong, dan M.Y. Chung. 2008. Antihypertensive Effect of Bioactive Peptides Produced by Protease Facilitated Lactic Acid Fermented of Milk. *Food Chemistry*. 106: 552 - 558.
- Turner, A. J., dan N. M. Hooper. 2002. The Angiotensin Converting Enzyme Gene Family, Genomics and Pharmacology. *Trends in Pharmacological Science*. 23: 177 - 183.

- Viernes, L.B.G., R.N. Garcia, M.A.O. Torio, dan M.R.N. Angelia. 2012. Antihypertensive Peptides from Vicilim, the Major Storage Protein of Mung Bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). *Journal of Biological Sciences* 12. (7): 393-399.
- Wani, Idrees Ahmed, D.S. Sogi, U.S. Shivhare dan B.S. Gill. 2015. Physico-chemical and Functional Properties of Native and Hydrolyzed Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Protein Isolates. *Food esearch International*. 76: 11 -18.
- Wijasekara, I., Z. Qian Ryu, D.H. Ngo, dan S.K. Kim. 2011. Purification and Identification of Antihypertensive Peptides from Seaweed Pipefish (*Syngnathus schelegeli*) Muscle Protein Hydrolysates. *Food Research International*. 44: 703 - 707.
- Winarno. 1997. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: PT. Gramedia.
- Winarno, F.G. 1986. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Wolkers, W.F., M.G. Van Kilsdonk, F.A. Hoekstra. 1998. Dehydration-induced Conformational Changes of Poly-L-Lysine as Influenced by Drying Rate and Carbohydrates. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1425: 127 - 136.
- World Health Organization (WHO). 2013. *A Global Brief on Hipertension*. http://ish-world.com/downloads/pdf/global_brief_hypertension.pdf (diakses tanggal 31 Januari 2018)
- Wu, Jianping dan Ding, Xiaolin. 2002. Characterization of Inhibition and Stability of Soy-protein-derived Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides. *Food Research International*. 35: 367 - 375.
- Yamamoto, N. 1997. Antihypertensive Peptides Derived from Food Proteins. *Biopolymer*. 43: 129 - 134.
- Zhao, Q., X. Hua, S. Cordelia, D.C. Xiao, H. Shengfang, R. Xia, Z. Qiang, dan S. Wenjing. 2013. Effects of Spray Drying and Freeze Drying on the Properties of Protein Isolate from Rice Dreg Protein. *Food Bioprocess Technol*. 6: 1759 - 1769.

LAMPIRAN A. DATA HASIL ANALISIS

A.1 Kadar protein tepung edamame metode kjeldahl (AOAC, 2001)

1. Analisa : sampel : 1 g
 blanko : 1 ml akuades
 M HCl : 0,1 M
 ml titrasi blanko : 0,3 ml

2. Rumus perhitungan :

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

$$\% \text{ Protein} = \% N \times 6,25$$

Tabel A.1.1 Hasil pengukuran kadar protein (bb)

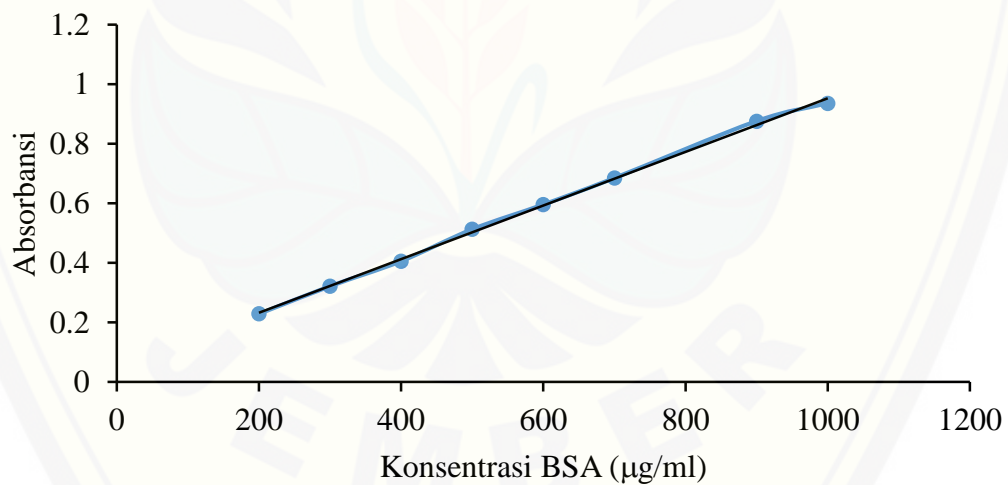
Sam pel	Ulan gan	ml Titrasi	ml Bla nko	ml Titrasi – Blanko	% N	% Protei n	Rerata Perlakuan (%)	SD
TE KB	1	36,7	0,3	36,4	5,10	31,87	32,78	0,97
	2	38,9	0,3	38,6	5,41	33,80		
	3	37,6	0,3	37,3	5,23	32,66		
TE KO	1	38	0,3	37,7	5,28	33,01	33,36	0,84
	2	39,5	0,3	39,2	5,49	34,32		
	3	37,7	0,3	37,4	5,24	32,75		

A.2 Derajat hidrolisis (Silvestree *et al.*, 2013)

1. Analisa : sampel : 250 μ l
 TCA : 20%
 pelarutan : 0,05 g/50 ml
2. Data absorbansi BSA

Tabel A.2.1 Hasil pengukuran absorbansi BSA

BSA (μ g/ml)	Absorbansi	Blanko	Abs - Blanko
200	0,288	0,059	0,229
300	0,381	0,059	0,322
400	0,465	0,059	0,406
500	0,572	0,059	0,513
600	0,655	0,059	0,596
700	0,744	0,059	0,685
900	0,935	0,059	0,876
1000	0,995	0,059	0,936



Gambar A.2.1 Kurva standar BSA

Persamaan kurva standar : $Y = 0,0009 x + 0,0533$; $R^2 = 0,9986$

Konsentrasi protein = $((\text{absorbansi} - 0,0533) : 0,0009)$

3. Data absorbansi derajat hidrolisis

Tabel A.2.2 Hasil pengukuran absorbansi derajat hidrolisis

Sampel	Ulangan	Abs	Blanko	Abs - Blanko	Konsentrasi (µg/ml)	Rerata Analisa (µg/ml)
EPEKB	1	0,486	0,059	0,427	415,22	384,85
	2	0,451	0,059	0,392	376,33	
	3	0,439	0,059	0,38	363,00	
	1	0,449	0,059	0,39	374,11	
	2	0,416	0,059	0,357	337,44	
	3	0,418	0,059	0,359	339,67	
EPEKO	1	0,343	0,059	0,284	256,33	262,26
	2	0,352	0,059	0,293	266,33	
	3	0,35	0,059	0,291	264,11	
	1	0,404	0,059	0,345	324,11	
	2	0,38	0,059	0,321	297,44	
	3	0,39	0,059	0,331	308,56	
HPEKB + TCA 10%	1	0,208	0,059	0,149	106,33	117,81
	2	0,224	0,059	0,165	124,11	
	3	0,223	0,059	0,164	123,00	
	1	0,228	0,059	0,169	128,56	
	2	0,227	0,059	0,168	127,44	
	3	0,253	0,059	0,194	156,33	
HPEKB + TCA 10%	1	0,214	0,059	0,155	113,00	110,41
	2	0,213	0,059	0,154	111,89	
	3	0,208	0,059	0,149	106,33	
	1	0,208	0,059	0,149	106,33	
	2	0,248	0,059	0,189	150,78	
	3	0,26	0,059	0,201	164,11	

4. Rumus perhitungan :

$$\% \text{ DH} = \frac{\text{protein terlarut 10\% TCA}}{\text{total kandungan protein}} \times 100\%$$

Tabel A.2.3 Hasil pengukuran derajat hidrolisis

Sampel	Ulangan	% DH	Rerata (%)	SD
KB	1	30,61	34,92	6,09
	2	39,22		
KO	1	42,10	43,69	2,25
	2	45,29		

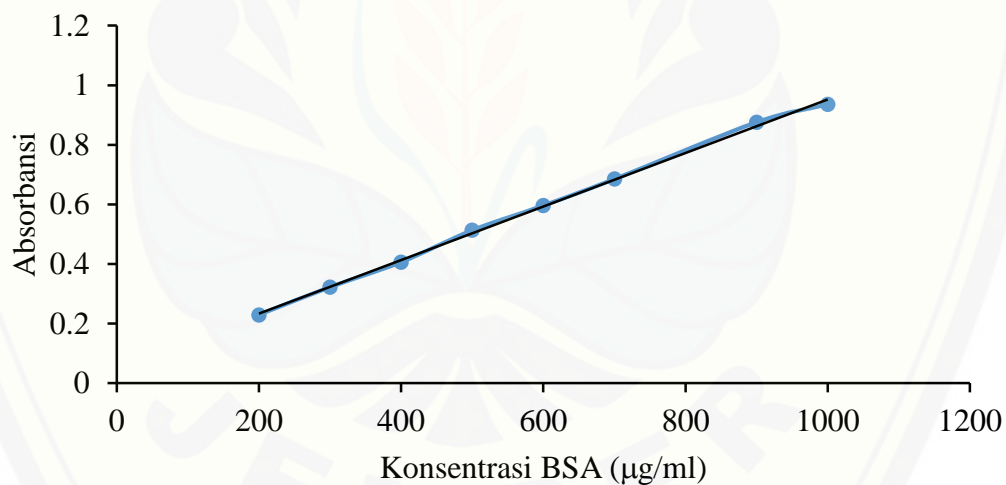


A.3 Kadar protein hidrolisat metode lowry (Lowry *et al.*, 1951)

1. Analisa : sampel : 250 μ l
 pelarutan : 0,05 g/50 ml
2. Data absorbansi BSA

Tabel A.3.1 Hasil pengukuran absorbansi BSA

BSA (μ g/ml)	Absorbansi	Blanko	Abs - Blanko
200	0,288	0,059	0,229
300	0,381	0,059	0,322
400	0,465	0,059	0,406
500	0,572	0,059	0,513
600	0,655	0,059	0,596
700	0,744	0,059	0,685
900	0,935	0,059	0,876
1000	0,995	0,059	0,936



Gambar A.3.1 Kurva standar BSA

Persamaan kurva standar = $Y = 0,0009 x + 0,0533$; $R^2 = 0,9986$

Konsentrasi protein (μ g / ml) = $((\text{absorbansi} - 0,0533) : 0,0009)$

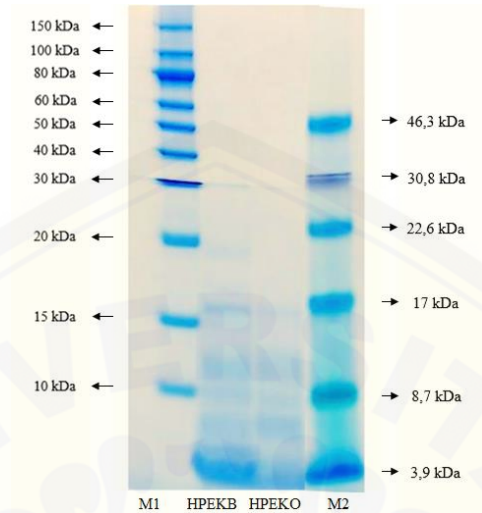
3. Data absorbansi kadar protein terlarut

Tabel A.3.2 Hasil pengukuran absorbansi kadar protein terlarut

Sampel	Ulangan	Ulangan Analisa	Abs	Blanko	Abs - Blanko	Konsentrasi $\mu\text{g/ml}$	Konsentrasi (mg / mg)	Rerata Analisa
H P E K B	1	1	0,775	0,059	0,716	736,33	0,736	0,736
		2	0,928	0,059	0,869	906,33	0,906	
		3	0,912	0,059	0,853	888,56	0,889	
	2	1	0,871	0,059	0,812	843,00	0,843	0,843
		2	0,894	0,059	0,835	868,56	0,869	
		3	0,863	0,059	0,804	834,11	0,834	
H P E K O	1	1	0,826	0,059	0,767	793,00	0,793	0,793
		2	0,854	0,059	0,795	824,11	0,824	
		3	0,861	0,059	0,802	831,89	0,832	
	2	1	0,957	0,059	0,898	938,56	0,939	0,939
		2	0,96	0,059	0,901	941,89	0,942	
		3	0,955	0,059	0,896	936,33	0,936	

Tabel A.3.3 Hasil pengukuran kadar protein terlarut hidrolisat

Sampel	Ulangan	Kadar Protein Terlarut (%)	Rerata (%)	SD
KB	1	73,6	79,0	0,08
	2	84,3		
KO	1	79,3	86,6	0,10
	2	93,9		

A.4 Profil berat molekul protein SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Gambar A.4.1 Hasil uji elektroforesis SDS-PAGE pada hidrolisat protein edamame

Keterangan : M₁ = Prestained XL Ladder (10 - 250 kDa)
M₂ = DynaMarker Protein MultiColor Stable Low Range (1,7 - 46,3 kDa)
HPEKB = Hidrolisat edamame kering beku
HPEKO = Hidrolisat edamame kering oven

A.5 Aktivitas penghambatan ACE (Ishiguro *et al.*, 2012 Modifikasi)

1. Analisa : sampel / *L-carnosine* : 50 μl
 buffer substrat : 25 μl HHL 25 mM dalam HEPES
 pH 8,3
 ACE : 10 mU/ml
 NaOH 1 N : 50 μl
 0,2% ortho-phtalaldehyde : 10 μl
 3,6 asam fosforat : 15 μl
 λ : *extension 360 emission 460*

2. Rumus perhitungan :
 Penghambatan (%) = $[1 - (S - S_B) / (C - C_B)] \times 100$

Di mana S adalah sampel yang diberi ACE, S_B adalah sampel yang diberi akuades sebagai pengganti ACE (*blank*), C adalah kontrol berupa akuades yang diberi ACE, dan C_B adalah kontrol berupa akuades yang diberi akuades sebagai pengganti ACE (*blank*).

3. Data absorbansi, hasil pengukuran, dan kurva penghambatan ACE

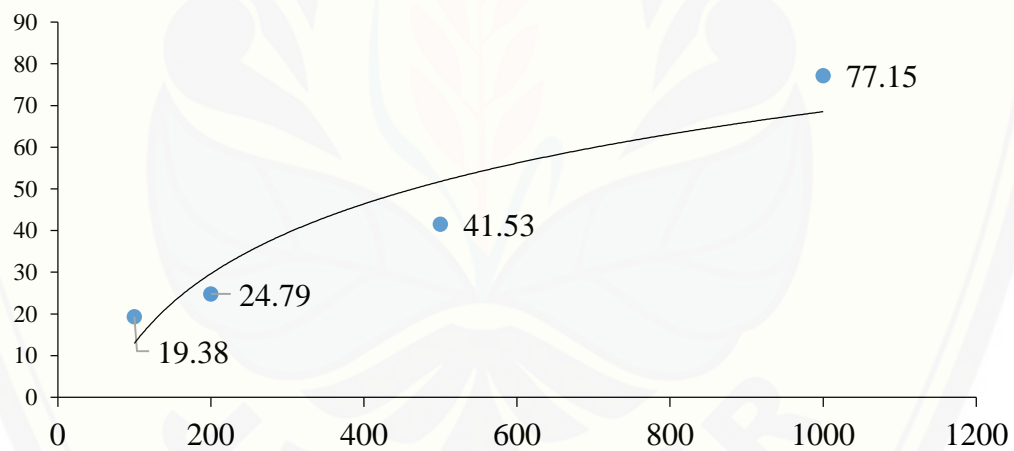
Tabel A.5.1 Data absorbansi aktivitas penghambatan ACE oleh HPEKB

Ulangan	Kontrol (C)	Sampel (S)			
		100 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	1.000 $\mu\text{g/ml}$
1	147,6	130,1	135,7	127,5	57,25
2	154,8	143,4	118,7	95,2	33,73
3	160,43	109,2	103	71,77	52,49

Ulangan	Kontrol <i>Blank</i> (C_B)	Sampel <i>Blank</i> (S_B)			
		100 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	1.000 $\mu\text{g/ml}$
1	1,703	2,518	6,125	7,474	13,7
2	4,432	5,652	5,233	10,71	11,65
3	3,598	9,239	5,283	11,34	14,58
C - C_B	151,03				

Tabel A.5.2 Hasil pengukuran aktivitas penghambatan ACE oleh HPEKB

Konsentrasi Hidrolisat	Konsentrasi Protein	Ulangan	% Penghambatan	Rerata (%)	SD
100 µg/ml	11,13 µg / ml	1	15,53	19,38	12,95
		2	8,80		
		3	33,81		
200 µg/ml	22,26 µg / ml	1	14,21	24,79	10,55
		2	24,87		
		3	35,30		
500 µg/ml	55,66 µg / ml	1	20,53	41,53	19,85
		2	44,06		
		3	59,99		
1.000 µg/ml	111,31 µg / ml	1	71,17	77,15	7,37
		2	85,38		
		3	74,90		

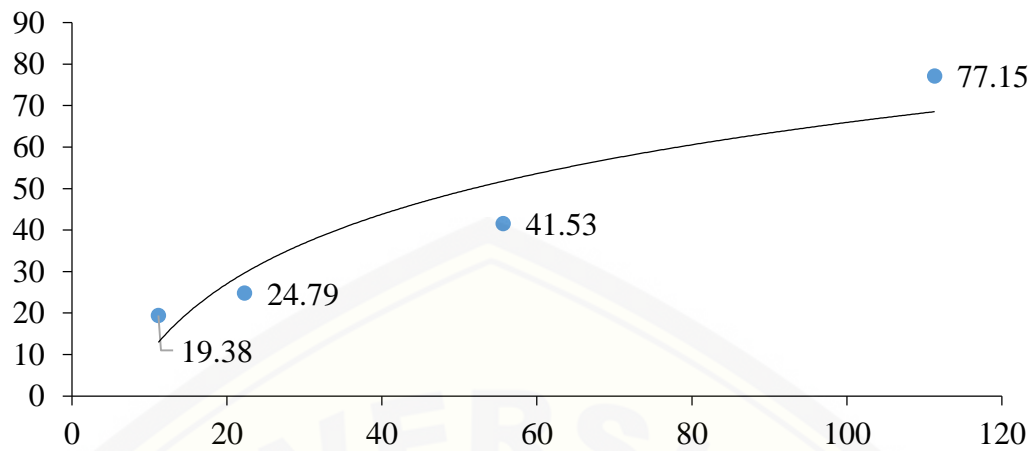


Gambar A.5.1 Kurva aktivitas penghambatan ACE oleh HPEKB (berdasarkan konsentrasi hidrolisat)

Persamaan kurva standar : $Y = 24,155 \ln (x) - 98,388$; $R^2 = 0,8797$

IC_{50} = EXP (50 + 98,388) : 24,155

Nilai IC_{50} dari HPEKB = 464,56 µg / ml konsentrasi hidrolisat



Gambar A.5.2 Kurva aktivitas penghambatan ACE oleh HPEKB (berdasarkan konsentrasi protein)

Persamaan kurva standar : $Y = 24,155 \ln(x) - 45,307$; $R^2 = 0,8797$

IC_{50} = EXP (50 + 45,307) : 24,155

Nilai IC_{50} dari HPEKB = 51,71 $\mu\text{g} / \text{ml}$ konsentrasi protein

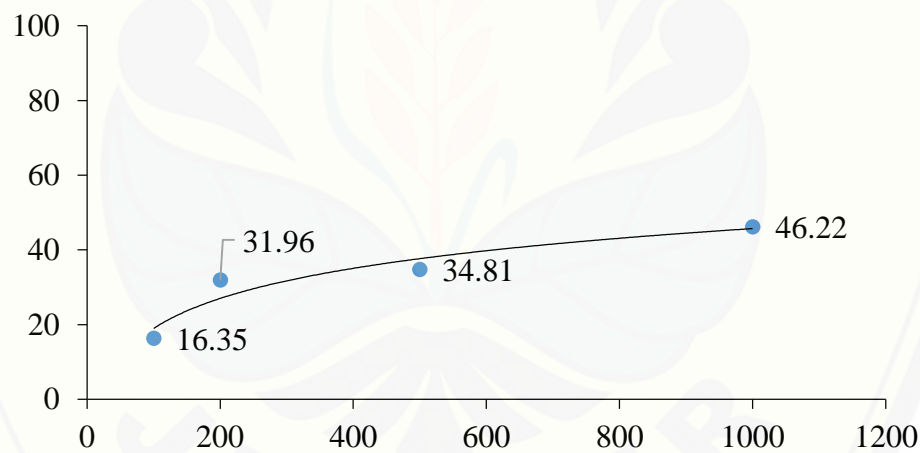
Tabel A.5.3 Data absorbansi aktivitas penghambatan ACE oleh HPEKO

Ulangan	Kontrol (C)	Sampel (S)			
		100 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	1.000 $\mu\text{g/ml}$
1	130,2	138,7	103,3	105,2	105,2
2	130,7	131,9	103,6	104,5	96,82
3	188,3	108,4	106,7	95,2	62,25

Ulangan	Kontrol Blank (C _B)	Sampel Blank (S _B)			
		100 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	1.000 $\mu\text{g/ml}$
1	3,092	4,571	5,511	6,176	10,86
2	2,389	3,081	3,941	5,279	8,558
3	3,272	2,914	4,446	6,337	7,96
C - C _b		146,82			

Tabel A.5.4 Hasil pengukuran aktivitas penghambatan ACE oleh HPEKO

Konsentrasi Hidrolisat	Konsentrasi Protein	Ulangan	% Penghambatan	Rerata (%)	SD
100 µg/ml	10,46 µg / ml	1	8,64	16,35	10,38
		2	12,26		
		3	28,15		
200 µg/ml	20,92 µg / ml	1	33,39	31,96	1,53
		2	32,12		
		3	30,35		
500 µg/ml	52,31 µg / ml	1	32,55	34,81	4,04
		2	32,42		
		3	39,47		
1.000 µg/ml	104,62 µg / ml	1	35,74	46,22	14,70
		2	39,88		
		3	63,02		

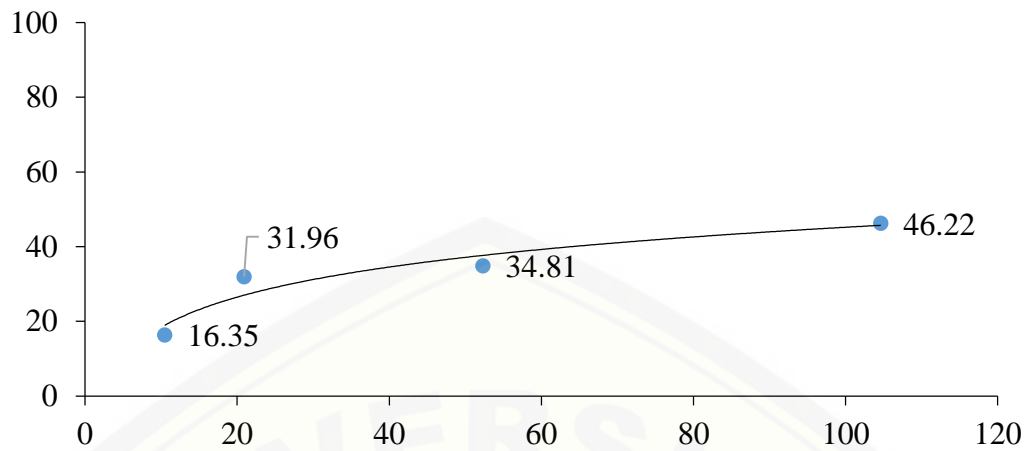


Gambar A.5.3 Kurva aktivitas penghambatan ACE oleh HPEKO (berdasarkan konsentrasi hidrolisat)

Persamaan kurva standar : $Y = 11,624 \ln(x) - 34,579$; $R^2 = 0,9129$

IC_{50} = $EXP(50 + 34,579) : 11,624$

Nilai IC_{50} dari HPEKO = 1.445,54 µg / ml konsentrasi hidrolisat



Gambar A.5.4 Kurva aktivitas penghambatan ACE oleh HPEKO (berdasarkan konsentrasi protein)

Persamaan kurva standar : $Y = 11,624 \ln(x) - 8,3389$; $R^2 = 0,9129$

IC_{50} = EXP (50 + 8,3389) : 11,624

Nilai IC_{50} dari HPEKO = 151,23 $\mu\text{g} / \text{ml}$ konsentrasi protein

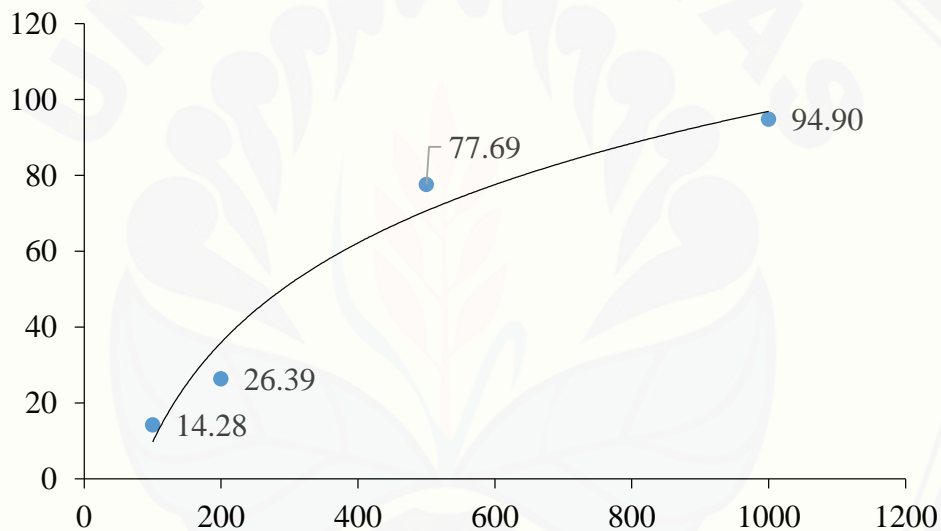
Tabel A.5.5 Data absorbansi aktivitas penghambatan ACE oleh *L-Carnosine*

Ulangan	Kontrol (C)	Sampel (S)			
		100 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	1.000 $\mu\text{g/ml}$
1	113,5	111	99,84	33,22	16,01
2	125,1	94,35	79,16	32,5	14,09

Ulangan	Kontrol <i>Blank</i> (C _B)	Sampel <i>Blank</i> (S _B)			
		100 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	1.000 $\mu\text{g/ml}$
1	4,096	4,24	4,955	6,881	8,826
2	4,927	4,326	5,046	7,625	9,568
C - C _B		114,79			

Tabel A.5.6 Hasil pengukuran aktivitas penghambatan ACE oleh *L-Carnosine*

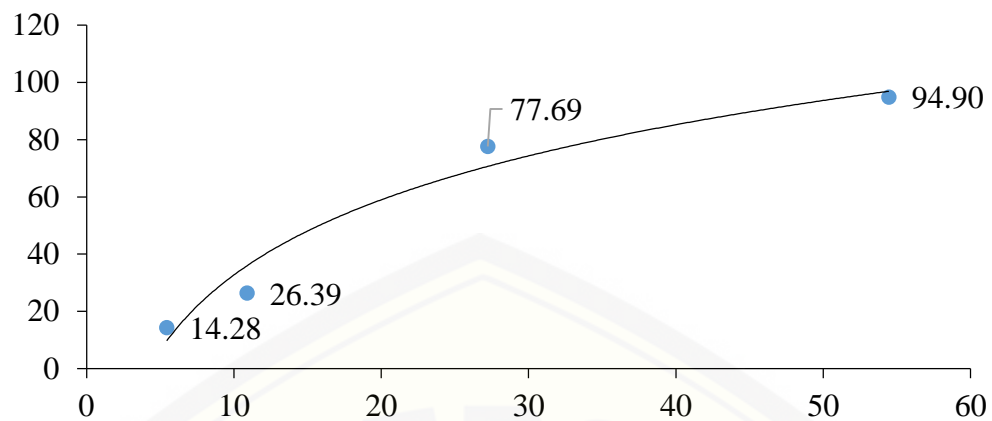
Konsentrasi Hidrolisat	Konsentrasi Protein	Ulangan	% Penghambatan	Rerata (%)	SD
100 µg/ml	5,45 µg / ml	1	6,99	14,28	14,28
		2	21,57		
200 µg/ml	10,89 µg / ml	1	17,34	26,39	12,80
		2	35,43		
500 µg/ml	27,23 µg / ml	1	77,05	77,69	0,90
		2	78,33		
1.000 µg/ml	54,46 µg / ml	1	93,74	94,90	1,64
		2	96,06		

Gambar A.5.5 Kurva aktivitas penghambatan ACE oleh *L-Carnosine* (berdasarkan konsentrasi hidrolisat)

Persamaan kurva standar : $Y = 37,88 \ln(x) - 164,74$; $R^2 = 0,9637$

IC_{50} = EXP (50 + 164,74) : 37,88

Nilai IC_{50} dari *L-Carnosine* = 289,73 µg / ml konsentrasi hidrolisat



Gambar A.5.6 Kurva aktivitas penghambatan ACE oleh *L-Carnosine* (berdasarkan konsentrasi protein)

Persamaan kurva standar : $Y = 37,88 \ln(x) - 54,494$; $R^2 = 0,9637$

IC_{50} = $EXP(50 + 54,494) : 37,88$

Nilai IC_{50} dari *L-Carnosine* = $15,78 \mu\text{g} / \text{ml}$ konsentrasi protein

LAMPIRAN B. BAHAN KIMIA

B.1 Bahan kimia pada analisis kadar protein metode kjeldahl (AOAC, 2001)

1. NaOH 40%

Pembuatan larutan NaOH 40% dilakukan dengan cara melarutkan 40 gram NaOH dengan akuades dalam labu takar 100 ml hingga batas tera.

2. HCl 0,1 N

Pembuatan larutan HCl 0,1 N dilakukan dengan cara melarutkan 0,83 ml HCl dengan akuades dalam labu takar 100 ml hingga batas tera. Peneraan dilakukan dalam ruang asam.

B.2 Bahan kimia pada analisis derajat hidrolisis (Silvestree *et al.*, 2013)

1. TCA 20%

Pembuatan larutan TCA 20% dilakukan dengan cara melarutkan 20 gram TCA dengan akuades dalam labu takar 100 ml hingga batas tera. Larutan TCA digunakan pada analisis derajat hidrolisis.

B.3 Bahan kimia pada analisis kadar protein terlarut metode lowry (Lowry *et al.*, 1951)

1. Reagen Lowry A

Reagen Lowry A dipersiapkan dengan pencampuran reagen folin dengan akuades dengan perbandingan sebesar 1:1.

2. Reagen Lowry B

Reagen Lowry B dipersiapkan dengan pencampuran larutan 2% Na₂CO₃ (dalam 0,1 N NaOH), 1% CuSO₄, dan 2% *sodium tartrate* dengan perbandingan 100:1:1.

3. Kurva standar BSA

Pembuatan kurva standar BSA diawali dengan membuat larutan induk yaitu larutan BSA 250 µg/ml. Sebanyak 2,5 mg BSA dilarutkan dengan 10 ml akuades. Kemudian larutan induk diambil sejumlah volume sebagai berikut.

Tabel B.3.1 Pembuatan kurva standar BSA

$\mu\text{g/ml}$	25	50	100	150	200	250
250 $\mu\text{g/ml}$ BSA (ml)	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
akuades (ml)	0,9	0,8	0,6	0,4	0,2	0

B.4 Bahan kimia pada analisis profil berat molekul protein SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

1. AE-1410 EzRun

EzRun merupakan *buffer* elektroforesis untuk elektroforesis gel SDS poliakrilamida. Komponen dalam pembuatan *buffer* adalah 30,3 g Tris, 144.1 g *Glycine*, dan 10 g SDS. Komponen tersebut dilarutkan menggunakan air distilat sebanyak 1 L untuk membuat *stock* sebanyak 10 kali penggunaan. Komposisi dalam satu larutan adalah 25 mM Tris, 192 mM *glycine*, dan 1,1% (w/v) SDS. Pertama - tama, dilakukan pelarutan komponen dengan 1 l air distilat. Ketika akan digunakan dilakukan pelarutan 10 tingkat larutan *stock* dengan air distilat.

2. AE-1340 EzStain AQUa

EzStain AQUa merupakan reagen berupa larutan asam dengan pH 2.0 atau lebih rendah yang digunakan untuk membersihkan pita protein pada gel poliakrilamida. Pertama - tama, dilakukan penuangan 50 ml EzStain AQUa pada sebuah wadah yang dapat digunakan pada *microwave*. Selanjutnya, gel yang telah dielektroforesis direndam pada larutan yang telah dipersiapkan, dilakukan penutupan wadah dengan *plastic wrap*. Gel tersebut dimasukkan pada *microwave* hingga tampak butiran air pada *wrap*. Setelah selesai, dilakukan agitasi selama 30 - 60 menit. Pita terlihat dalam beberapa menit, dilakukan pembilasan menggunakan air distilat.

3. AE-1430 EzApply

EzApply merupakan reagen yang digunakan untuk preparasi (reduksi kelompok SH dan penambahan SDS) sampel protein seperti ekstrak sel kasar untuk SDS-PAGE. Komponen dari EzApply adalah 100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 2% SDS (w/v), 20% sukrosa (w/v), 0,06% *bromophenol blue* (BPB), dan 100 mM DTT (dilarutkan pada 5 mL EzApply) . EzApply dicampurkan dengan sampel dengan perbandingan 1:1. Pertama - tama dilakukan *thawing* EzApply beku pada suhu ruang. Selanjutnya,

dilakukan penambajan 5 mL EzApply pada botol yang mengandung DTT kristal. Kemudian, dilakukan pencampuran DTT yang telah ditambahkan EzApply dengan sampel pada perbandingan 1:1 dan dilakukan perebusan selama 5 menit. Selanjutnya sampel siap digunakan untuk gel elektroforesis dengan SDS-PAGE.

B.5 Bahan kimia pada analisis aktivitas penghambatan ACE (Ishiguro *et al.*, 2012 Modifikasi)

1. Larutan ACE 10 U/ml

Pembuatan larutan ACE 10 U/ml dilakukan dengan cara melarutkan 100 μ l larutan *stock* ACE 100 U/ml dengan akuades 900 μ l.

2. Larutan Hippuriyl-L-histidyl-L-leucine 25 mM

Pembuatan larutan Hippuriyl-L-histidyl-L-leucine 25 mM dilakukan dengan cara melarutkan 50,1 mg HHL dengan 4 ml HEPES yang mengandung 0,3 M NaCl (pH 8.3).

3. Larutan o-phthaldialdehyde 0,2%

Pembuatan larutan o-phthaldialdehyde 0,2% dilakukan dengan cara melarutkan 8 g o-phthaldialdehyde dengan 4 ml metanol. Larutan *stock* disimpan dalam botol berwarna gelap.

4. Larutan sampel hidrolisat protein edamame

Hidrolisat protein edamame dilakukan pengenceran beberapa konsentrasi untuk menghitung nilai IC_{50} . Pembuatan larutan hidrolisat protein diawali dengan pembuatan larutan induk 1 mg/ml. Sebanyak 1 mg hidrolisat protein dilarutkan dengan 1 ml akuades. Kemudian larutan induk diambil sejumlah volume sebagai berikut.

Tabel B.5.1 Pembuatan larutan hidrolisat protein

mg/ml	0,1	0,2	0,5	1,0
1 mg/ml hidrolisat (μ l)	40	80	200	800
akuades (μ l)	360	320	200	0

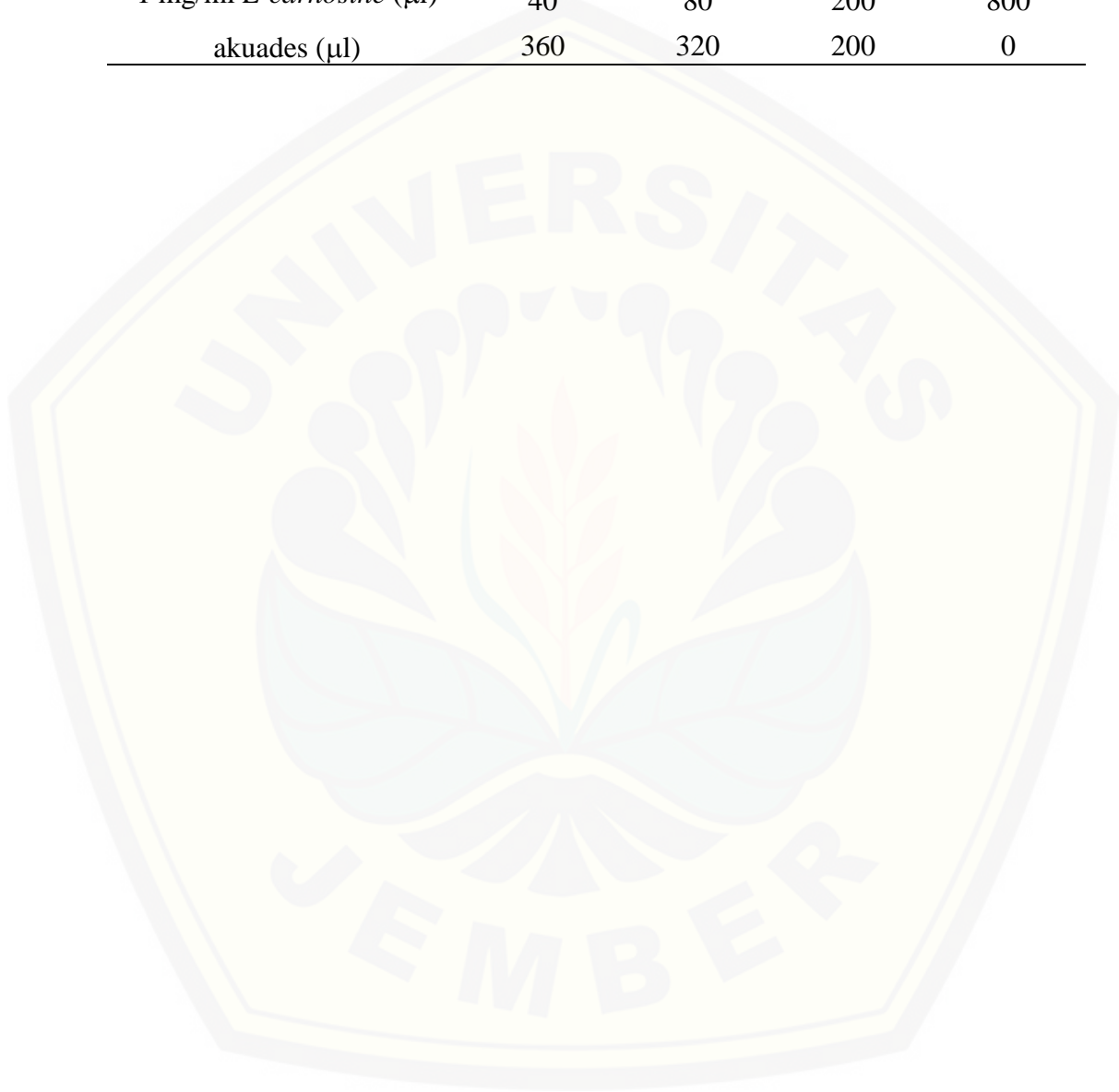
5. Larutan standar *L-carnosine*

Standar berupa *L-carnosine* dilakukan pengenceran beberapa konsentrasi untuk menghitung nilai IC_{50} . Pembuatan larutan hidrolisat protein diawali dengan

pembuatan larutan induk 1 mg/ml. Sebanyak 1 mg *L-carnosine* dilarutkan dengan 1 ml akuades. Kemudian larutan induk diambil sejumlah volume sebagai berikut.

Tabel B.5.2 Pembuatan larutan *L-carnosine*

mg/ml	0,1	0,2	0,5	1,0
1 mg/ml <i>L-carnosine</i> (μ l)	40	80	200	800
akuades (μ l)	360	320	200	0



LAMPIRAN C. DOKUMENTASI

C.1 Bahan baku berupa edamame



Bahan baku berupa edamame



Biji edamame

C.2 Tahapan pengeringan beku dan pengeringan oven



Pengeringan beku edamame



Pengeringan oven edamame

C.3 Tahapan penepungan dan penghilangan kandungan lemak



Pengecilan ukuran edamame kering

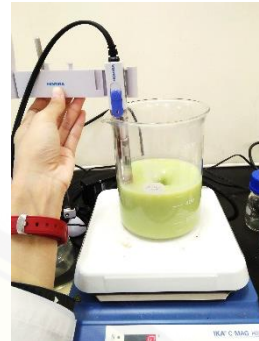


Tahapan penghilangan kandungan lemak tepung edamame

C.4 Tahapan ekstraksi protein

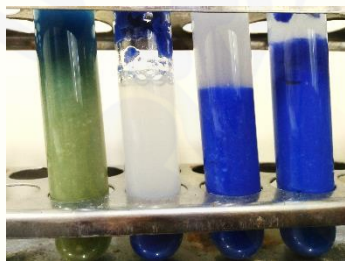


Tepung edamame tanpa lemak

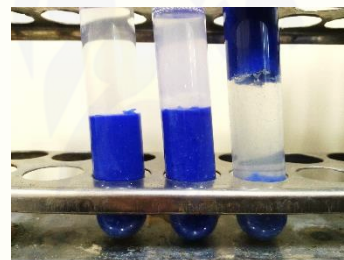


Pengaturan pH larutan

C.5 Pengujian pH kelarutan dan pH isoelektrik



Pengujian pH kelarutan protein



Pengujian pH isoelektrik protein

C.6 Tahapan ekstraksi dan hidrolisis protein



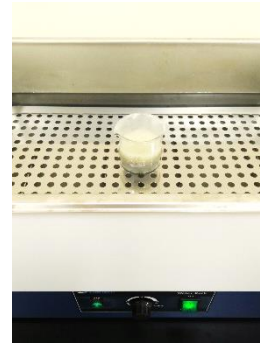
Sentrifugasi pengendapan protein



Penambahan enzim alkalase



Pengaturan suhu selama hidrolisis



Inaktivasi enzim

C.7 Pengujian kadar protein edamame

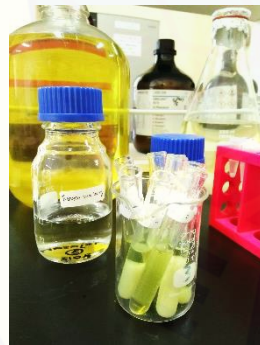


Tahapan destruksi

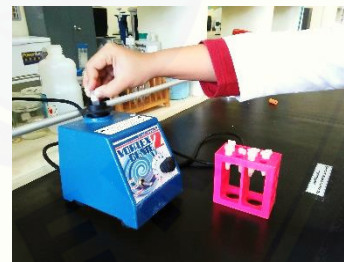


Hasil titrasi HCl

C.8 Pengujian derajat hidrolisis dan kadar protein terlarut



Persiapan pengujian metode lowry



Pemvortexan sampel



Pendiaman sampel

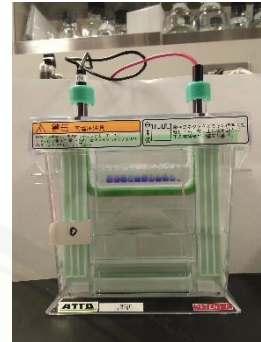


Pengukuran absorbansi

C.9 Tahapan analisis SDS-PAGE



Denaturasi sampel

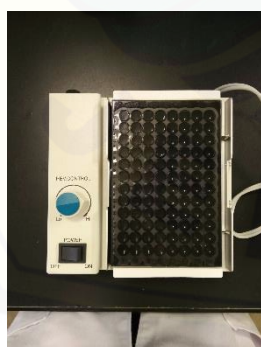


SDS-PAGE



Protein marker

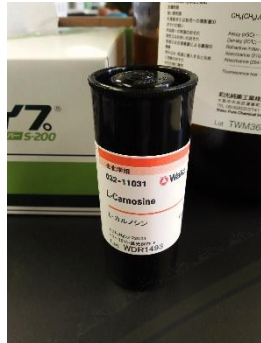
C.10 Pengujian aktivitas penghambatan ACE



Shaker



Inkubasi sampel



Standar aktivitas penghambatan ACE



Pengukuran absorbansi

