

Aktivitas Antioksidan dan Karakterisasi Profil Fraksi Peptida Susu Tempe **Antioxidant Activity and Characterization of Tempeh Milk Peptides Fraction Profile**

Diana Lestari^{1a}, Rania Kalyana¹, Dionysius Subali²

¹Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Biosains, Teknologi dan Inovasi, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jl. Raya Cisauk Lapan, Tangerang, Banten, Indonesia, 15345

²Program Studi Bioteknologi, Fakultas Biosains, Teknologi dan Inovasi, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jl. Raya Cisauk Lapan, Tangerang, Banten, Indonesia, 15345

^aKorespondensi : Diana Lestari, E-mail: diana.lestari@atmajaya.ac.id

Diterima: 05 - 03 - 2026 , Disetujui: 30 - 04 - 2026

ABSTRACT

Tempeh can be used to make exercise drinks to recover body condition after workout. However, which fraction with the best antioxidant activity is still not discovered yet. Fractionation can separate peptides by molecular weight, purify, and concentrate it. Therefore, this research objective was to fractionate peptides into different fractions, to analyze protein concentration and molecule weight of the fractions, to compare antioxidant activity using DPPH and ABTS methods from peptides fractions, and to determine IC₅₀ value from peptides fraction that had the best antioxidant activity. The fractionation process was done to 3 hours hydrolyzed peptides using bromelain enzyme with the highest antioxidant activity. The fractionation process divided samples into four fractions and the >300 kDa fraction had the highest protein concentration with the value of 62,1 mg/mL. 3-hours hydrolyzed peptides formed 5 bands while its fractions formed 1-4 bands in molecular weight analysis. <5 kDa fraction showed 2,9%/mg protein as the highest antioxidant activity value using DPPH and ABTS methods showed 3%/mg protein. IC₅₀ value in both methods showed peptide fraction classified as having low antioxidant activity.

Keywords: antioxidant, bioactive peptides, tempeh, ultrafiltrated fractions.

ABSTRAK

Tempe dapat dimanfaatkan dalam pembuatan produk minuman olahraga untuk pemulihan kondisi tubuh pasca olahraga. Namun, penelitian mengenai minuman olahraga tersebut masih belum diketahui secara lebih lanjut mengenai fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan terbaik. Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan peptida berdasarkan berat molekul, memurnikan, dan mengkonsentrasikan. Maka dari itu penelitian ini memiliki tujuan yaitu memisahkan peptida menjadi fraksi-fraksi, menguji konsentrasi protein dan berat molekul dari fraksi-fraksi yang diperoleh, membandingkan nilai aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan ABTS dari fraksi peptida, dan menentukan nilai IC₅₀ dari fraksi peptida yang memiliki aktivitas antioksidan terbaik. Proses fraksinasi dilakukan terhadap sampel dengan aktivitas antioksidan terbaik yaitu hidrolisis selama 3 jam dengan enzim bromelain. Hasil fraksinasi peptida didapatkan 4 fraksi dengan nilai konsentrasi tertinggi pada fraksi >300 kDa sebesar 62,1 mg/mL. Pada analisis berat molekul, peptida hidrolisat 3 jam membentuk 5 band sedangkan fraksi-fraksinya membentuk 1-4 band. Aktivitas antioksidan terbaik ditunjukkan pada fraksi <5 kDa metode DPPH sebesar 2,9%/mg protein dan ABTS sebesar 3%/mg protein. Nilai IC₅₀ dari kedua metode ini menunjukkan fraksi peptida tergolong dalam aktivitas antioksidan lemah.

Kata kunci: antioksidan, fraksi ultrafiltrasi, peptida bioaktif, tempe

PENDAHULUAN

Tempe merupakan salah satu pangan yang mengandung protein tinggi dan berpotensi menghasilkan peptide bioaktif yang memiliki aktivitas antioksidan. Susu tempe menjadi salah satu produk olahan tempe yang telah banyak diteliti sebagai pangan Fungsional (Ng, 2026; Novianti et al., 2019). Hal ini menjadikan susu tempe dapat dimanfaatkan dalam pembuatan produk minuman olahraga untuk pemulihan kondisi tubuh pasca olahraga. Jauhari et al., (2014) melakukan analisis terhadap minuman antioksidan untuk pemulihan pasca olahraga berbasis peptide bioaktif susu tempe. Hasil yang didapatkan adalah komposisi 100 mL peptide yang diinkubasi selama 3 jam kemudian ditambahkan dengan gula sebanyak 10 g, NaCl sebanyak 0,0653 g, dan KCl sebanyak 0,0125 g memiliki aktivitas antioksidan yang terbaik. Namun, penelitian ini masih belum diketahui secara lebih lanjut mengenai fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan terbaik.

Fraksinasi merupakan salah satu proses yang mampu untuk memisahkan peptide berdasarkan berat molekul, memurnikan peptide dari pengotor, dan mengkonsentrasikan peptide. Dengan melakukan fraksinasi, aktivitas antioksidan pada peptide bioaktif dapat meningkat (Kim et al., 2019). Fraksi pada peptide bioaktif dapat dipisahkan melalui beberapa metode seperti metode ultrafiltrasi menggunakan *Molecular Weight Cut Off* (MWCO) dan *Size Exclusion Chromatography* (SEC). Pada metode SEC, ukuran molekul yang lebih kecil akan terperangkap pada fase diam berupa *porous beads* sedangkan molekul yang berukuran besar akan melewati kolom dan keluar lebih cepat (Phongthai & Rawdkuen, 2019). Pemisahan berat dan ukuran molekul menggunakan MWCO akan memisahkan berat molekul berdasarkan ukuran *membrane cut-off*. Molekul yang lebih besar daripada membran akan terjebak sedangkan molekul yang lebih kecil akan melewati membran. Yang membedakan antara dua metode ini adalah MWCO lebih murah, cepat, dan praktis (Fadel et al., 2020).

Tidak semua ukuran fraksi peptide memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang baik. Menurut Dong et al., (2017), fraksi peptide yang memiliki aktivitas antioksidan terbaik adalah fraksi dengan ukuran molekul yang kecil dengan ukuran fraksi sebesar <3 kDa. Untuk menentukan hal tersebut, dapat dilakukan uji antioksidan dengan beberapa metode seperti DPPH dan ABTS. Kedua metode ini memiliki reaksi yang berbeda terhadap jenis asam amino. DPPH lebih reaktif terhadap asam amino yang bersifat hidrofobik sedangkan ABTS lebih reaktif terhadap asam amino yang bersifat hidrofilik (Shahi et al., 2020).

Identifikasi terhadap profil dan aktivitas antioksidan fraksi peptide dari peptide bioaktif susu tempe perlu dilakukan. Oleh karena itu, terdapat beberapa tujuan pada penelitian ini yaitu memisahkan peptide menjadi fraksi-fraksi, menguji konsentrasi protein dan berat molekul dari fraksi-fraksi yang diperoleh, membandingkan nilai aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan ABTS dari fraksi peptide, dan menentukan nilai IC50 dari fraksi peptide yang memiliki aktivitas antioksidan terbaik.

MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fakultas Biosains, Teknologi, dan Inovasi, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya. Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Folin-Ciocalteu (Merck), *Bovine Serum Albumine* (BSA) (Merck), Biuret (Merck), 1,1-*diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH) (SMART-LAB), 2,2'-*azino-bis* (3-*ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid*) (ABTS) (Sigma Aldrich), etanol (SMART-LAB), metanol (SMART-LAB), *Potassium persulfate* (K2S2O8) (Sigma Aldrich), *low range protein ladder* (LMW) d(PageRuler™), gliserol (Merck), β -merkaptotanol (Merck), Coomassie brilliant blue G-250 (Merck), Tris(Merck), asam asetat glasial (SMART-LAB), *Ammonium persulfate* (APS) (Merck), TEMED (HIMEDIA), akrilamida (Merck), bis-akrilamida (HIMEDIA). Adapun alat yang digunakan seperti *waterbath shaker* GFL (Inggris), inkubator Memmert (Jerman), *Microplate reader* INNO

(Korea Selatan), elektroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell dan Bio-Rad (Amerika Serikat), dan *membrane weight cut-off* (MWCO) ultrafiltrasi Satorius (Jerman).

Pembuatan Tepung Tempe

Tempe yang digunakan adalah tempe dengan bungkus daun pisang yang didapatkan dari Kios L8/9 di Pasar Modern Intermoda BSD. Tempe dicacah kemudian dikeringkan dengan metode *freeze dry* pada suhu -80°C selama 3 hari. Hasilnya di-*blender* dan diayak menggunakan ayakan dengan ukuran 80 *mesh* (Jauhari et al., 2014).

Pembuatan Ekstrak Nanas

Pembuatan ekstrak nanas dilakukan dengan Nanas Madu Pemalang matang yang didapatkan dari Pasar Modern Intermoda. Ekstrak nanas diambil menggunakan *juicer* kemudian disaring. Ekstrak nanas yang diperoleh memiliki aktivitas enzim 0,02 U/mL.

Ekstraksi dan Hidrolisis Peptida Tempe

Hidrolisis peptida bioaktif didasari metode yang dilakukan mengacu Agustina et al. (2018) dan Khanifah (2018) dengan modifikasi. Pembuatan susu tempe dilakukan dengan mencampurkan tepung tempe dan air 1:8 (b/b). Susu tempe kemudian dilarutkan dengan ekstrak nanas dengan perbandingan 1:2 (b/b). Campuran sampel dibuat sebanyak 200 mL. Selama proses hidrolisis, Proses inkubasi sampel untuk aktivasi enzim dilakukan pada suhu 50°C menggunakan *waterbath*. Variasi waktu perlakuan yang digunakan adalah 0,1,2,3,4,5, dan 24 jam. Inaktivasi enzim dilakukan pada suhu 80°C selama 8 menit. Seluruh hidrolisat disentrifugasi dengan kecepatan 4000 xg kemudian hasil supernatan diambil untuk analisis berikutnya.

Ultrafiltrasi

Hidrolisat dengan aktivitas antioksidan terbaik dipisahkan menjadi beberapa fraksi menggunakan beberapa ukuran MWCO yaitu 300 kDa, 30 kDa, dan 5 kDa. Proses ultrafiltrasi dilakukan secara bertahap mulai dari ukuran MWCO terbesar hingga terkecil. Adapun penyebutan untuk hasil ultrafiltrasi adalah retentat dan permeat. Retentat merupakan sampel yang tidak berhasil melewati membran sedangkan permeat merupakan sampel yang berhasil melewati membran (Tamam et al., 2019).

Uji Konsentrasi Protein

Uji konsentrasi protein dilakukan pada peptida hidrolisat sebelum dan sesudah difraksinasi. Metode yang digunakan untuk uji konsentrasi protein adalah metode Lowry dari Hassanein et al. (2015). Pada uji konsentrasi protein dibagi dalam dua tahap yaitu pembuatan kurva standar Bovine Serum Albumin (BSA) dan pengujian sampel. Pembuatan kurva standar BSA dilakukan dengan melarutkan 20 mg BSA dalam 20 mL akuades. BSA dibuat menjadi beberapa konsentrasi yaitu 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, dan 1 mg/mL. Pengukuran dilakukan dengan mereaksikan 1,2 mL BSA dari masing-masing konsentrasi. Kemudian ditambahkan reagen biuret sebanyak 6 mL, di-vortex, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Lalu ditambahkan 0,3 mL Folin-Ciocalteu, di-vortex, dan diinkubasi kembali pada suhu ruang selama 30 menit. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 650 nm. Adapun penggunaan akuades sebagai blanko. Konsentrasi protein didapat dengan menghitung absorbansi sampel ke persamaan regresi dari kurva standar BSA.

Uji Antioksidan

Uji antioksidan dilakukan terhadap peptida hidrolisat sebelum dan sesudah difraksinasi dengan metode DPPH dan metode ABTS. Metode DPPH mengacu pada Matuszewska et al. (2018). Larutan DPPH 0.2 mM dalam etanol dengan konsentrasi 0.2 mM. Uji antioksidan dilakukan dengan mereaksikan sampel dengan larutan DPPH 0,2 mM masing-masing sebanyak 4 mL. Blanko dan kontrol positif yang digunakan secara berturut-turut adalah campuran etanol dan asam askorbat 100 ppm yang direaksikan dengan 4 mL larutan DPPH.

Sampel, kontrol positif, dan blanko diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dalam kondisi gelap. Absorbansi dibaca dengan microplate reader pada panjang gelombang 517 nm.

Metode ABTS yang mengacu pada Wahyono et al. (2018). Larutan ABTS 7,4 mM disiapkan dengan melarutkan 0,203 g dalam 50 mL akuades dan Potassium persulfate (K₂S₂O₈) disiapkan dengan melarutkan 0,035 g dalam 50 mL akuades. Kedua larutan stok dicampurkan dengan perbandingan 1:1 (v/v) kemudian disimpan dalam ruangan gelap selama 12 sampai 16 jam sebelum digunakan. Larutan stok ABTS diambil 1,5 mL dan ditera pada labu ukur 25 mL dengan etanol untuk mendapatkan larutan ABTS+. Pengujian sampel dilakukan dengan 150 µL sampel yang direaksikan dengan larutan 2850 µL ABTS+ dan diinkubasi pada suhu ruang selama 7 menit. Blanko dan kontrol positif yang digunakan secara berturut-turut adalah etanol dan asam askorbat 100. Keduanya diberi perlakuan yang sama dengan sampel. Pembacaan absorbansi terhadap sampel, kontrol positif, dan blanko dilakukan pada panjang gelombang 734 nm.

Data yang diperoleh dari kedua metode tersebut disajikan berupa data aktivitas antioksidan pada sampel fraksinasi disajikan berupa %RSA sampel dan %RSA per mg protein. Perhitungan aktivitas antioksidannya dihitung menggunakan rumus (1):

$$\% \text{ RSA} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\% \quad (1)$$

Nilai IC₅₀ diukur dengan mempersiapkan sampel dengan aktivitas antioksidan terbaik dibuat dalam beberapa konsentrasi yaitu 400, 800, 1600, 3200, 6400, dan 12800 ppm berdasarkan konsentrasi proteinnya. % inhibisi dihitung dan dibuat grafik untuk mendapatkan persamaan regresi linear.

Analisis Berat Molekul

Berat molekul dari sampel sebelum dan sesudah difraksinasi dianalisis menggunakan metode Tricine SDS-PAGE yang telah dimodifikasi (Jiang et al., 2016). Buffer sampel yang digunakan adalah SDS 12% (b/v), merkaptoetanol 6% (v/v), gliserol 30% (b/v), coomasie blue G-250 0,05%, dan 150 mM Tris/HCl (pH 7). Larutan AB-3 dipersiapkan dengan melarutkan 48 g akrilamida dan 1,5 g bisakrilamida di dalam 100 mL air.

Tabel 1. Komposisi *buffer* anoda, *buffer* katoda, dan *buffer* gel

		Buffer anoda (10x)	Buffer katoda (10x)	Buffer gel (3x)
Tris	g	121	121	6,3
<i>Tricine</i>	g	-	179	-
HCl	mL	10	-	4,5
SDS	g	-	10	0,3
pH		8,9	8,25	8,45
Volume akhir	L	1	1	0,1

Komposisi pembuatan *buffer* anoda, *buffer* katoda, dan *buffer* gel terdapat pada Tabel 1. Komposisi Gel penahan (*stacking gel*), *spacer gel*, dan gel pemisah (*separating gel*) terdapat dalam Tabel 2. Jumlah sampel yang di *inject* kedalam masing-masing sumur sebanyak 10 µL dan marker sebanyak 5 µL.

Tabel 2. Komposisi gel pemisah, *spacer gel*, dan gel penahan

	Satuan	<i>Separating Gel</i> (10%)	<i>Stacking Gel</i> (4%)	<i>Spacer Gel</i> (16%)
Larutan AB-3	mL	3	1	6
<i>Buffer gel</i> (3x)	mL	5	3	10
Gliserol	g	1,5		3
Penambahan air hingga volume	mL	15	12	30
APS (10%)	μ L	100	120	150
TEMED	μ L	10	12	15

Analisis statistik

Analisis data menggunakan software *IBM SPSS Statistics*. Setiap pengujian dilakukan duplo dan dianalisis menggunakan one way ANOVA dengan uji lanjut lanjut Turkey dengan taraf nyata 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsentrasi Protein Peptida Hidrolisat

Perlakuan hidrolisis peptida menggunakan enzim bromelain menunjukkan konsentrasi protein tertinggi pada sampel peptida hidrolisat 3 jam. Sampel ini memiliki konsentrasi protein dengan nilai 17,7 mg/mL (Tabel 3). Nilai tersebut berbeda nyata terhadap hidrolisat peptida 0-2 jam, 24 jam, dan tepung tempe. Konsentrasi protein terendah dimiliki oleh susu tempe dengan nilai 7,9 mg/mL yang berbeda nyata dengan semua perlakuan inkubasi yang menunjukkan proses hidrolisis secara signifikan menaikkan konsentrasi protein dari susu tempe. Hal ini sesuai dengan pernyataan Ghribi et al. (2015), semakin lama enzim aktif untuk memecah ikatan peptida pada protein akan membuat ukuran partikel lebih kecil. Partikel yang berukuran kecil lebih mudah larut sehingga saat diukur menggunakan metode Lowry menghasilkan nilai yang lebih tinggi. Susu tempe tidak diberikan perlakuan enzimatik dan pemanasan sehingga protein masih berukuran besar dan cenderung sulit larut. Hal ini membuat konsentrasi protein sangat kecil dan berbeda nyata dengan hidrolisat lainnya.

Tabel 3. Konsentrasi protein pada sampel hidrolisat peptida dan susu tempe

Sampel	Konsentrasi Protein (mg/mL)
Peptida 0 jam	10,6 \pm 0,2 ^b
Peptida 1 jam	11,2 \pm 0,2 ^b
Peptida 2 jam	14,1 \pm 0,3 ^c
Peptida 3 jam	17,7 \pm 0,8 ^d
Peptida 4 jam	17,4 \pm 0,8 ^d
Peptida 5 jam	17,6 \pm 0,5 ^d
Peptida 24 jam	10,2 \pm 0,2 ^b
Susu tempe	7,9 \pm 0,5 ^a

Hasil konsentrasi protein pada peptida hidrolisat 24 jam mengalami penurunan secara nyata. Menurut Shahbal et al. (2023) proses hidrolisis pada protein dapat membuka ikatan peptida sehingga dapat meningkatkan jumlah bagian yang dapat berikatan dengan air yang bersifat ionik dan polar. Semakin kecil susunan asam amino yang berikatan akan meningkatkan keberadaan bagian-bagian hidrofilik sehingga lebih mudah untuk larut dalam air. Namun, jika proses hidrolisis dilakukan terlalu lama dapat merusak bagian hidrofilik sehingga menurunkan konsentrasi protein terlarut.

Aktivitas Antioksidan Peptida Hidrolisat

Analisis terhadap sampel hidrolisis peptida secara enzimatik juga dilakukan terhadap aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dan ABTS. Berdasarkan Tabel 4, aktivitas antioksidan terendah dengan metode DPPH terdapat pada peptida hidrolisat 2 jam dengan nilai 17,0%. Sedangkan aktivitas antioksidan tertinggi ditunjukkan pada peptida hidrolisat 3 jam dengan nilai 43,1%. Nilai tersebut berbeda nyata terhadap peptida hidrolisat 0-2 jam, kontrol positif, serta sampel susu tempe. Nilai IC50 dari perlakuan terbaik memiliki hasil sebesar 416,5 µg/mL, artinya aktivitas antioksidan sampel tergolong lemah (Sukweenadhi et al. 2020).

Tabel 4. Aktivitas antioksidan dengan metode DPPH pada sampel hidrolisat peptida dan susu tempe

Sampel	% Inhibisi
Peptida 0 jam	19,6 ± 4,5 ^{ab}
Peptida 1 jam	19,2 ± 7,2 ^{ab}
Peptida 2 jam	17,0 ± 4,6 ^a
Peptida 3 jam	43,1 ± 6,7 ^c
Peptida 4 jam	37,8 ± 5,1 ^{bc}
Peptida 5 jam	36,6 ± 10,9 ^{bc}
Peptida 24 jam	35,8 ± 10,3 ^{abc}
Susu tempe	19,0 ± 2,5 ^{ab}
Kontrol positif	96,4 ± 0,1 ^d

Selain itu, adapun hasil pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode ABTS ditampilkan pada Tabel 5. Aktivitas antioksidan tertinggi ada pada peptida hidrolisat 3 jam sebesar 78,5%. Nilai ini menunjukkan adanya perbedaan nyata dengan peptida hidrolisat 0 jam dan susu tempe. Disamping itu, susu tempe menunjukkan aktivitas antioksidan paling rendah sebesar 61,4%. Peptida hidrolisat 3 jam dianalisis nilai IC50-nya dan didapatkan nilai sebesar 6.604,3 µg/mL, artinya aktivitas antioksidan sampel tergolong lemah (Sukweenadhi et al., 2020).

Tabel 5. Aktivitas antioksidan dengan metode ABTS pada sampel hidrolisat peptida dan susu tempe

Sampel	% Inhibisi
Peptida 0 jam	67,4 ± 3,0 ^{ab}
Peptida 1 jam	73,9 ± 6,7 ^{bc}
Peptida 2 jam	75,2 ± 3,5 ^{bc}
Peptida 3 jam	78,5 ± 2,8 ^c
Peptida 4 jam	75,0 ± 2,5 ^{bc}
Peptida 5 jam	75,6 ± 2,2 ^{bc}
Peptida 24 jam	76,8 ± 3,7 ^{bc}
Susu tempe	61,4 ± 3,9 ^a
Asam askorbat 100 ppm	77,2 ± 1,4 ^c

Adapaun hasil aktivitas antioksidan yang diukur menggunakan metode DPPH dan ABTS sama-sama menunjukkan hasil tertinggi pada peptida hidrolisat 3 jam. Berdasarkan Tabel 4, aktivitas antioksidan meningkat seiring bertambahnya waktu inkubasi dan meningkatnya konsentrasi protein (Tabel 3). Hal ini disebabkan semakin lama waktu inkubasi menyebabkan enzim lebih lama bekerja memotong makromolekul protein menjadi peptida. Potongan peptida menjadi aktif sehingga mampu memberikan sifat bioaktif seperti antioksidan. Tingginya jumlah peptida yang terbentuk selama hidrolisis mempengaruhi

peningkatan aktivitas antioksidan (Mohammadi et al., 2022). Namun, waktu hidrolisis diatas 3 jam tidak memiliki perbedaan nyata dengan waktu hidrolisis 3 jam karena diduga seluruh substrat protein sudah selesai dihidrolisis sehingga penambahan waktu tidak berdampak terhadap aktivitas antioksidan (Shahi et al., 2020).

Konsentrasi Protein Fraksi Peptida Hidrolisat dengan Ultrafiltrasi

Setelah didapatkan nilai aktivitas antioksidan tertinggi pada peptida terhidrolisis 3 jam, kemudian dilakukan proses ultrafiltrasi dan didapatkan hasil fraksi dengan ukuran <5 kDa, 5-30 kDa, 30-300 kDa, dan >300 kDa. Adapun hasil fraksinasi yang digunakan untuk analisis berat molekul yaitu retentat 300 kDa yang tersusun atas molekul >300 kDa, permeat 300 kDa yang tersusun atas molekul <301 kDa, retentat 30 kDa yang tersusun atas molekul berukuran 31-300 kDa, permeat 30 kDa yang tersusun atas molekul berukuran <30 kDa, retentat 5 kDa yang tersusun atas molekul berukuran 6-30 kDa, dan permeat 5 kDa tersusun atas molekul berukuran >5 kDa.

Konsentrasi protein tertinggi dari fraksi peptida hidrolisat terpilih yaitu 3 jam ditunjukkan pada sampel dengan ukuran molekul >300 kDa dengan nilai 62,1 mg/mL (Tabel 6). Nilai tersebut berbeda nyata terhadap ukuran molekul lainnya. Sedangkan konsentrasi protein terendah ditunjukkan pada fraksi <5 kDa dengan nilai 29,3 mg/mL. Nilai tersebut berbeda nyata terhadap sampel ukuran molekul lainnya. Menurut Deepchandi et al. (2020) ukuran molekul yang terlalu kecil sulit untuk berinteraksi dengan reagen folin-ciocalteau sehingga hasil pengukuran kadar proteinnya menjadi cenderung lebih rendah.

Tabel 6. Konsentrasi protein pada fraksi peptida hidrolisat 3 jam

Sampel	Konsentrasi Protein (mg/mL)
<5 kDa	29,3 ± 1,7 ^a
5-30 kDa	47,8 ± 2,8 ^b
30-300 kDa	53,2 ± 2,8 ^b
>300 kDa	62,1 ± 0,8 ^c

Aktivitas Antioksidan Fraksi Peptida Hidrolisat

Hasil aktivitas antioksidan fraksi peptida hidrolisat 3 jam ditunjukkan pada Tabel 7. Aktivitas antioksidan tertinggi menggunakan metode DPPH diperoleh pada sampel dengan ukuran molekul sebesar <5 kDa dengan nilai %RSA sebesar 83,4%. Nilai tersebut berbeda nyata dengan fraksi >300 kDa. Hasil fraksi <5 kDa yang paling tinggi ini juga ditunjukkan oleh nilai %RSA yang dihitung per mg protein. Hasil yang didapatkan sebesar 2,9% / mg protein dan nilai ini berbeda nyata terhadap seluruh perlakuan lainnya. Fraksi >300 kDa merupakan sampel dengan aktivitas antioksidan terendah dengan nilai %RSA sebesar 50,2%. Hasil ini sesuai dengan nilai %RSA yang dihitung per mg proteinnya. Nilai yang didapatkan sebesar 0,8% / mg protein. Nilai ini juga berbeda nyata terhadap seluruh perlakuan lainnya. Nilai IC50 yang didapatkan pada fraksi <5 kDa adalah 379,2 µg/mL, artinya aktivitas antioksidan sampel tergolong lemah (Sukweenadhi et al., 2020).

Tabel 7. Aktivitas antioksidan dengan metode DPPH pada fraksi peptida hidrolisat 3 jam

Sampel	% RSA	%RSA (%/ mg protein)
<5 kDa	83,4 ± 1,3 ^b	2,9 ± 0,0 ^a
5-30 kDa	75,4 ± 0,4 ^b	1,6 ± 0,0 ^b
30-300 kDa	55,1 ± 1,2 ^b	1,5 ± 0,0 ^b
>300 kDa	50,2 ± 4,3 ^a	0,8 ± 0,1 ^c

Selain itu, hasil pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode ABTS pada fraksi peptida hidrolisat 3 jam ditampilkan pada Tabel 8. Hasilnya menunjukkan fraksi <5 kDa memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dengan nilai %RSA sebesar 88,4%. Hasil ini berbeda

nyata dengan fraksi >300 kDa. Nilai %RSA yang dihitung per mg protein juga menunjukkan aktivitas antioksidan tertinggi pada fraksi <5 kDa dengan nilai sebesar 3,0% / mg protein. Nilai ini berbeda nyata terhadap sampel fraksi lainnya. Aktivitas antioksidan terendah ada pada fraksi >300 kDa dengan nilai %RSA sebesar 68,4%. Nilai %RSA yang dihitung per mg protein juga menunjukkan aktivitas antioksidan terendah pada fraksi >300 kDa dengan nilai sebesar 1,1% / mg protein. Nilai ini berbeda nyata terhadap sampel fraksi lainnya. IC50 pada fraksi <5 kDa didapatkan dengan nilai 6291,2 $\mu\text{g/mL}$, artinya aktivitas antioksidan sampel tergolong lemah (Sukweenadhi et al., 2020).

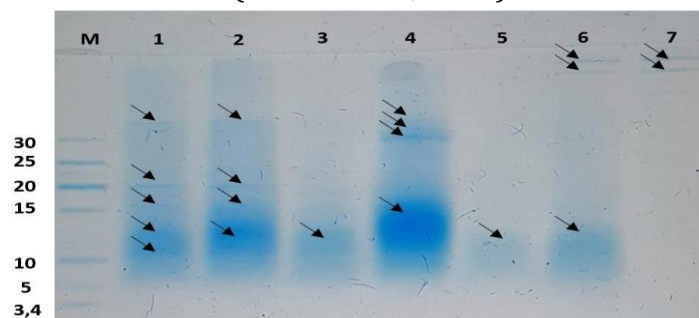
Tabel 8. Aktivitas antioksidan dengan metode ABTS pada fraksi peptida hidrolisat 3 jam

Sampel	% RSA	% RSA (% / mg protein)
<5 kDa	88,4 \pm 2,1 ^b	3,0 \pm 0,1 ^a
5-30 kDa	82,2 \pm 4,1 ^{ab}	1,7 \pm 0,1 ^b
30-300 kDa	83,9 \pm 5,9 ^{ab}	1,6 \pm 0,1 ^b
>300 kDa	68,4 \pm 3,8 ^a	1,1 \pm 0,1 ^c

Aktivitas antioksidan terbaik pada fraksi peptida hidrolisat 3 jam menggunakan metode DPPH dan ABTS ada pada fraksi <5 kDa. Hal ini sesuai dengan Dong et al. (2017) yaitu semakin kecil ukuran molekul peptida akan meningkatkan sistem oksidan-antioksidannya. Sifat oksidan-antioksidan yang baik pada dipengaruhi oleh asam amino hidrofobik, aromatik, atau mengandung gugus sulfur karena dapat menjadi donor elektron terhadap radikal bebas (Tadesse & Emire 2020). Berdasarkan Tabel 7 dan 8, semakin besar ukuran molekul akan memiliki aktivitas antioksidan yang cenderung lebih rendah. Hasil ini menandakan bahwa proses fraksinasi menggunakan MWCO mampu memisahkan, memurnikan, dan mengkonsentrasikan berdasarkan ukuran molekul sehingga peptida bioaktif bekerja lebih baik karena tidak ada gangguan dari pengotor (Kim et al., 2019).

Analisis Berat Molekul

Hasil profil peptida menggunakan tricine SDS-PAGE dilakukan terhadap fraksi sampel dengan aktivitas antioksidan terbaik. Pada Gambar 1, Hasil pita pada hidrolisat 3 jam memiliki pita sebanyak 5 pita dengan berat molekul 34,8 – 11,4 kDa. Sampel retentat 300 kDa membentuk 4 pita dengan ukuran berat molekul 14,4 – 34,8 kDa yang hampir sama dengan sampel peptida hidrolisat 3 jam. Hal ini menandakan proses fraksinasi kurang berhasil dan diduga karena keberadaan kerak tapis. Kerak tapis pada membran filter terbentuk dari molekul yang lebih besar yang tertahan di bagian membran. Hal ini menyebabkan molekul kecil tidak dapat melewati membran (Lestari et al., 2020).



Gambar 1. Profil peptida hidrolisat 3 jam (1), hasil ultrafiltrasi retentat dan permeat 300 kDa (2-3), retentat dan permeat 30 kDa (4-5), retentat dan permeat 5 kDa (6-7)

Pita yang terbentuk pada peptida hidrolisat peptida 3 jam dan retentat 300 kDa terbentuk pita pada ukuran 17-20 kDa yang diduga sebagai basic polypeptide. Adapun pita tebal yang terbentuk pada retentat 30 kDa pada ukuran 14,1 kDa. Pita yang tebal menunjukkan bahwa pada ukuran tersebut konsentrasi protein sangat tinggi (Rusdah et al., 2017). Pita diatas ukuran 30 kDa tidak dapat diukur dan digolongkan sebagai molekul besar.

Tabel 9. Hasil berat molekul pada sampel dengan elektroforesis SDS-PAGE

Membran <i>Cut-Off</i> Ultrafiltrasi	Berat Molekul (BM)
Hidrolisat peptida 3 jam	34,8 kDa
	20,4 kDa
	17,2 kDa
	14,0 kDa
	11,4 kDa
Retentat 300 kDa	34,8 kDa
	20,0 kDa
	17,2 kDa
	14,4 kDa
Permeat 300 kDa	13,1 kDa
Retentat 30 kDa	33,8 kDa
	32,0 kDa
	30,5 kDa
	14,1 kDa
Permeat 30 kDa	11,7 kDa
Retentat 5 kDa	>30 kDa
	>30 kDa
	13,7 kDa
Permeat 5 kDa	>30 kDa
	>30 kDa

KESIMPULAN

Proses fraksinasi yang dilakukan terhadap peptida terhidrolisis 3 jam oleh enzim bromelain menghasilkan 4 ukuran fraksi yaitu <5 kDa, 5-30 kDa, 30-300 kDa, dan >300 kDa. Hasil uji konsentrasi protein tertinggi ada pada fraksi >300 kDa yaitu sebesar 62,1 mg/mL. Pada analisis berat molekul, peptida hidrolisat 3 jam membentuk 5 pita protein sedangkan fraksi-fraksinya membentuk 1-4 pita. Adapun aktivitas antioksidan terbaik ditunjukkan oleh metode DPPH pada fraksi <5 kDa dengan nilai sebesar 2,9% / mg protein dan metode ABTS sebesar 3% / mg protein. Berdasarkan hasil yang didapatkan, metode DPPH memiliki pengujian lebih baik dibandingkan ABTS karena mampu berinteraksi dengan asam amino hidrofobik pada fraksi peptida bioaktif. Nilai IC50 fraksi peptida <5 kDa tergolong dalam aktivitas antioksidan lemah. Untuk itu, pada penelitian lebih lanjut, dapat digunakan metode RP-HPLC untuk meningkatkan kemurnian sampel sehingga aktivitas antioksidan dapat bekerja lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, R. K., Dieny, F.F., Rustanti, N., Anjani, G., & Afifah, D. N. (2018). Antioxidant activity and soluble protein content of tempeh gembus hydrolysate. *Hiroshima Journal of Medical Sciences*, 67, 1-7.
- Deepachandi, B., Weerasinghe, S., Andrahennadi, T. P., Karunaweera, N. D., Wickramaranchi, N., Soysa, P., & Siriwardana, Y. (2020). Quantification of soluble or insoluble fractions of leishmania parasite. proteins in microvolume applications: a simplification to standard lowry assay. *International Journal of Analytical Chemistry*, 1-8. DOI: 10.1155/2020/6129132.

- Dong, Z., Tian, G., Xu, Z., Li, M., Xu, M., Zhou, Y., & Ren, H. (2017). Antioxidant activities of peptide fractions derived from freshwater mussel protein using ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis. *Czech Journal of Food Sciences*, 35(4), 328-338. DOI: 10.17221/421/2016-CJFS.
- Fadel, M., Wyart, Y., & Moulin, P. (2020). An efficient method to determine membrane molecular weight cut-off using fluorescent silica nanoparticles. *Membranes*, 10(10), 1-14. DOI: 10.3390/membranes10100271.
- Ghribi, A.M., Gafsi, I. M., Sila, A., Blecker, C., Danthine, S., Attia, H., Bougatef, A., & Besbes, S. (2015). Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate. *Food Chemistry*, 187, 322-330. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.04.109.
- Hassanein, T. R., Prabawati, E. K., Puspitasari, M. D., & Gunawan-Puteri, M. D. P. T. (2015). Analysis of chemical and microbial changes during storage of overripe tempeh powder as seasoning material. *International Journal of Science Engineering*, 8(2), 131-134. DOI: 10.12777/ijse.8.2.131-134.
- Jauhari, M., Sulaeman, A., Riyadi, H., & Ekayantim I. (2014). Pengembangan formula minuman olahraga berbasis tempe untuk pemulihan kerusakan otot. *Agritech*, 34(3), 285-290. DOI: 10.22146/agritech.9456.
- Jiang, S., Liu, S., Zhao, C., & Wu, C. (2016). Developing protocols of tricine-sds-page for separation of polypeptides in the mass range 1-30 kDa with minigel electrophoresis system. *International Journal of Electrochemical Science*, 11, 640-649. [https://doi.org/10.1016/S1452-3981\(23\)15870-6](https://doi.org/10.1016/S1452-3981(23)15870-6)
- Khanifah, F. (2018). Analisis kadar protein total pada tempe fermentasi dengan penambahan ekstrak nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr). *Jurnal Nutrisia*, 20(1), 34-37.
- Kim, J. M., Liceaga, A. M., & Yoon, K. Y. (2019). Purification and identification of an antioxidant peptide from perilla seed (*Perilla frutescens*) meal protein hydrolysate. *Food Science & Nutrition*, 7, 1645-1655. DOI:doi.org/10.1002/fsn3.998.
- Lestari, D., Evan, J., S & uhartono, M. T. (2020). Fraksi peptida antioksidan dari kasein susu kambing. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 3(2), 188-196. DOI:10.6066/jtip.2020.31.2.188.
- Matuszewska, A., Jaszek, M., Stefaniuk, D., Ciszewski, T., & Matuszewski, L. (2018). Anticancer, antioxidant, and antibacterial activities of low molecular weight bioactive subfractions isolated from cultures of wood degrading fungus *Cerrena unicolor*. *Plos One*, 13(6), 1-14. DOI: 10.1371/journal.pone.0197044.
- Mohammadi, M., Salami, M., Yarmand, M., Emam-Djomeh, Z., & McClements, D.J. (2022). Production and characterization of functional bakery goods enriched with bioactive peptides obtained from enzymatic hydrolysis of lentil protein. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16, 3402-3409. DOI: 10.1007/s11694-022-01416-z.
- Ng, W. W. (2026). Susu Tempe Sebagai Pangan Fungsional Masa Depan: Tinjauan Potensi Nutrisi, Manfaat Kesehatan, dan Aplikasi Agroindustri. *Jurnal Agroindustri Pangan*, 5(1): 1-10.
- Novianti, Asmariyah, & Suriyati. (2019). Pengaruh Pemberian Susu Tempe Terhadap Kadar Haemoglobin Pada Ibu Hamil Tm III Di Kota Bengkulu. *Journal Of Midwifery*, 7(1): 23-29.

- Phongthai, S., & Rawdkuen, S. (2019). Fractionation and characterization of antioxidant peptides from rice bran protein hydrolysates stimulated by in vitro gastrointestinal digestion. *Cereal Chemistry*, 97(2), 316-325. DOI: 10.1002/cche.10247
- Rusdah, R., Suhartono, M.T., Palupi, N.S., & Ogawa, M. (2017). Tingkat kelarutan tempe dengan bobot molekul kecil pada berbagai jenis pelarut. *Agritech*, 37(3), 327-333. DOI:10.22146/agritech.10697.
- Shahbal, N., Jing, X., Bhandari, B., Dayananda, B., & Prakash, S. (2023). Effect of enzymatic hydrolysis on solubility and surface properties of pea, rice, hemp, and oat proteins: Implication on high protein concentrations. *Food Bioscience*, 53, 1-34. DOI:10.1016/j.fbio.2023.102515.
- Shahi, Z., Sayyed-Alangi, S.Z., & Najafian, L. (2020). Effects of enzyme type and process time on hydrolysis degree, electrophoresis bands and antioxidant properties of hydrolyzed proteins derived from defatted *Bunium persicum* Bioss. press cake. *Heliyon*, 6(2),1-10. DOI:10.1016/j.heliyon.2020.e03365.
- Sukweenadhi, J., Yunita, O., Setiawan, F., Kartini, Siagian, M.T., Danduru, A.P., & Avanti, C. (2020). Antioxidant activity screening of seven Indonesian herbal extract. *Biodiversitas*, 21(5), 2062-2067. DOI:10.13057/biodiv/d210532.
- Tadesse, S.A., & Emire, S.A. (2020). Production and processing of antioxidant bioactive peptides: A driving force for the functional food market. *Heliyon*, 6(8), 1-11. DOI:10.1016/j.heliyon.2020.e04765.
- Tamam, B., Syah, D., Suhartono, M.T., Kusuma, W.A., Tachibana, & Lioe, H.N. (2019). Proteomic study of bioactive peptides from tempe. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 128(2): 241-248. DOI:10.1016/j.jbiosc.2019.01.019.
- Wahyono, A., Kurniawati, E., Kasutjiningati, Park, K.H., & Kang, W.W. (2018). Optimasi proses pembuatan tepung labu kuning menggunakan response surface methodology untuk meningkatkan aktivitas antioksidannya. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 29(1), 29-38. DOI:10.6066/jtip.2018.29.1.29.