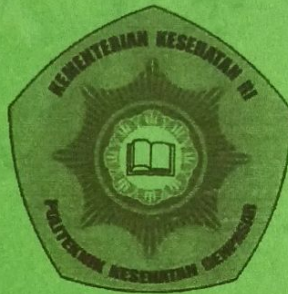


LAPORAN AKHIR
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI



AKTIVITAS ANTIHIPERTENSI TEMPE: TELAAH SECARA *IN VIVO*

Tahun ke -2 dari rencana 2 tahun

KETUA DAN ANGGOTA TIM

Dr. Badrut Tamam, STP, M.Biotech (NIDN 4017127001)

I Gst. Putu Sudita Puryana, STP, MP (NIDN 4010117401)

Dr. Ni Ketut Sutiari, SKM, MSi (NIDN 0026127703)

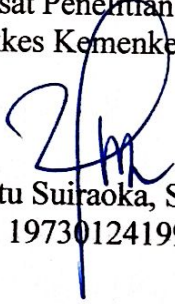
POLTEKKES KEMENKES DENPASAR

OKTOBER 2022

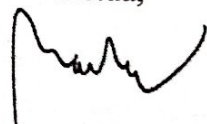
HALAMAN PENGESAHAN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI


Judul : Aktivitas Antihipertensi Tempe: Telaah secara *In Vivo*
Peneliti :
Nama Lengkap : Dr. Badrut Tamam, STP, M.Biotech
NIDN : 4017127001
Jabatan Fungsional : Lektor
Program Studi : Prodi Sarjana Terapan (STr) Gizi
Nomor Hp : 083114154698
Alamat Surel (email) : Badruttamam_70@yahoo.com
Anggota Peneliti (1)
Nama Lengkap : I Gst. Putu Sudita Puryana, STP, MP
NIDN : 4010117401
Program Studi : Prodi Sarjana Terapan (STr) Gizi
Perguruan Tinggi : Poltekkes Kemenkes Denpasar
Anggota Peneliti (2) :
Nama Lengkap : Dr. Ni Ketut Sutiari, SKM, MSi
NIDN : 0026127703
Program Studi : Ilmu Kesehatan Masyarakat
Perguruan Tinggi : Universitas Udayana Denpasar
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke-2 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 40.012.000
Biaya Keseluruhan : Rp 150.000.000

Mengetahui,
Kepala Pusat Penelitian dan Pengabmas
Poltekkes Kemenkes Denpasar,


Dr. I Putu Suraoka, S.ST., M.Kes.
NIP. 197301241995031001

Denpasar, 27 Oktober 2022
Ketua,


Dr. Badrut Tamam, STP, M.Biotech
NIP. 197012171992031001

Mengesahkan,
Plt. Direktur Poltekkes Kemenkes Denpasar 



SURAT PERNYATAAN KETUA PENELITI

Yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Dr. Badrut Tamam, STP, M.Biotech
NIDN/NIP : 4017127001/ 1970121719921001
Pangkat/Golongan : Penata TK I/ III d
Jabatan Fungsional : Lektor

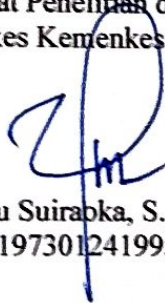
Dengan ini menyatakan bahwa laporan akhir penelitian saya dengan judul "Aktivitas Antihipertensi Tempe: Telaah secara InVivo" dengan skema Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi untuk Tahun Anggaran 2022 bersifat original dan belum pernah dibiayai oleh lembaga/sumber dana lain.

Bilamana dikemudian hari ditemukan ketidaksesuaian dengan pernyataan ini, maka saya bersedia dituntut dan diproses dengan ketentuan yang berlaku dan mengembalikan seluruh biaya penelitian yang sudah diterima ke kas Negara.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan sesungguhnya dan dengan sebenar-benarnya.

Mengetahui,

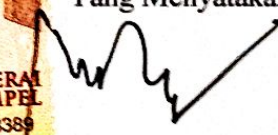
Kepala Pusat Penelitian dan Pengabmas
Poltekkes Kemenkes Denpasar,



Dr. I Putu Suirapka, S.ST., M.Kes.
NIP. 197301241995031001

Denpasar, 27 Oktober 2022

Yang Menyatakan,



Dr. Badrut Tamam, STP, M.Biotech
NIP. 197012171992031001

Mengesahkan,

Direktur Poltekkes Kemenkes Denpasar,



Gusti Ayu Marhaeni, SKM., M.Biomed
NIP. 196512311986032008

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Hipertensi adalah salah satu faktor pencetus utama terjadinya penyakit jantung koroner, stroke dan penyakit ginjal tahap akhir (Zhang *et al.*, 2006). Hipertensi diindikasikan sebagai peningkatan tekanan darah di atas normal (140/90 mmHg). Di antara proses yang terkait dengan hipertensi, *angiotensin I converting enzyme* (ACE) memiliki peran penting dalam mengatur tekanan darah. Peran pengaturan tekanan darah dari ACE adalah karena ACE memicu perubahan angiotensin I menjadi angiotensin II yang merupakan agen penyebab penyumbatan pembuluh darah (*vasoconstrictor*) dan sekaligus menginaktivasi bradykinin yang merupakan agen pembuka pembuluh darah (*vasodilator*). Kondisi inilah yang menyebabkan peningkatan tekanan darah dan pencetus penyakit jantung koroner.

Salah satu produk fermentasi asli Indonesia yang akhir-akhir ini banyak diteliti dan memiliki bioaktivitas antihipertensi adalah Tempe. Senyawa di dalam Tempe yang memiliki peran penting dalam proses penghambatan ACE (*ACE inhibitor*) adalah peptida bioaktif. Peptida bioaktif merupakan fragmen protein yang terdiri atas 2-20 asam amino hasil hidrolisis enzim proteolitik, yang memiliki bioaktivitas tertentu diantaranya sebagai antihipertensi, antidiabetik, anticancer, antihiperkolesterol, antimikroba, antitrombotik, *immunomodulatory* dan lain-lain. Pembentukan peptida bioaktif pada Tempe merupakan hasil fermentasi kedelai (*Glycine max L*) dengan memanfaatkan berbagai mikroorganisme (kapang, terutama jenis *Rhizopus sp.*, bakteri dan khamir). Beberapa peptida bioaktif berberat molekul rendah (< 1 kDa) pada Tempe telah diprediksi sekuen peptidanya dan diduga memiliki aktivitas antihipertensi melalui analisis *in silico* (Tamam *et al.*, 2019). Penelitian sebelumnya juga telah membuktikan bahwa Tempe yang diproduksi memanfaatkan mikroorganisme jenis kapang *Rhizopus oligosporus* sifat fungsional peptida tempe hasil hidrolisis enzim *endopeptidase* (*pronase*, trypsin, Glu C. protease, protease plasma dan protease membran *kidney*) dari *R. oligosporus* NRRI, 2710 menghasilkan peptida

antihipertensi, antitrombotik, aktif permukaan, dan antioksidan (Gibbs *et al.*, 2004). Beberapa produk fermentasi kedelai yang lain juga telah dilaporkan memiliki sifat antihipertensi adalah *doenjang* (Korea), *douchi* (China), *natto* (Japan), dan *thua nao* (Thailand) (Dajanta *et al.*, 2011; Shin and Jeong, 2015; Wang *et al.*, 2016). Produk kecap yang difermentasi oleh *Aspergillus sojae* menghasilkan peptida antihipertensi *Gly-Tyr*, *Ala-Phe*, *Val-Pro*, *Ala-Ile*, dan *Val-Gly*. Fermentation of miso using *Aspergillus oryzae* produced two antihypertensive peptides: Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro (24).

Fermentasi kedelai menjadi Tempe memiliki peran esensial dalam menghasilkan senyawa bioaktif. Jenis kapang yang dilaporkan hadir dalam produksi Tempe, menurut di antaranya *Rhizopus oligosporus*, *R. oryzae*, *R. arrhizus*, *R. stolonifer*, *R. microsporus*, *R. rhizopodiformis*, *R. chinensis* dan terkadang *Mucor sp.* (Astuti *et al.*, 2000; Nout and Kiers, 2005). Di samping kapang, mikroorganisme lain seperti bakteri asam laktat dan khamir ikut terlibat dalam proses fermentasi kedelai menjadi Tempe (Nurdini *et al.*, 2015). Selama fermentasi kedelai tersebut, terjadi perubahan-perubahan fisik, dan biokimia di dalam Tempe. Beberapa perubahan biokimia yang terjadi adalah peningkatan beberapa senyawa gizi dan bioaktif yaitu protein terlarut, folat, vitamin B₁₂, *tocopherol* (vitamin E), isoflavon bebas, *superoxide dismutase* (SOD) dan peptida bioaktif. Di samping itu, terjadi penurunan zat anti gizi di antaranya adalah asam fitat, oligosakarida, *trypsin inhibitor* dan tannin (Egounlety and Aworh, 2003; Mo *et al.*, 2013).

Genotipe berbagai varietas kedelai berbeda-beda. Perbedaan genotipe antar varietas kedelai berpengaruh terhadap komposisi asam amino penyusun protein kedelai tersebut (Herman, 2014). Penggunaan kedelai lokal dan impor sering menjadi bahan perhatian. Kedelai impor umumnya memiliki biji yang lebih besar dan memiliki warna lebih pucat dan lebih seragam ukurannya. Adapun kedelai lokal adalah kedelai asli Indonesia yang berukuran lebih kecil, ukurannya tidak seragam, dan warnanya agak sedikit cerah. Penelitian sebelumnya (tahun 2021) mengungkap bahwa Tempe dari kedelai lokal memiliki kandungan asam amino yang terbanyak yaitu L-Serin, L-Asam glutamat, L-Fenilalanin, L-Isoleusin,

L-Valin, L-Alanin, L-Arginin, Glisin, L-Asam Aspartat, L-Leusin, L-Tirosin, L-Prolin, L-Treonin, dan L-Histidin, dibandingkan tempe dari kedelai hitam dan impor. Kehadiran asam amino dengan gugus aromatik dan alifatik seperti Pro (P), Phe (F) atau Tyr (Y) pada atom C-terminal serta Val (V) dan Ile (I) pada atom N terminal dikaitkan dengan penghambatan enzim ACE (*Angiotensin I-Converting Enzyme*) atau sifat antihipertensi.

B. Rumusan Masalah

Dari uraian di atas, permasalahan yang akan dijawab melalui penelitian di tahun 2022 ini adalah:

1. Bagaimana kandungan proximat tepung tempe dari kedelai lokal?
2. Bagaimana aktivitas antihipertensi tepung kedelai lokal secara *in vivo*?

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

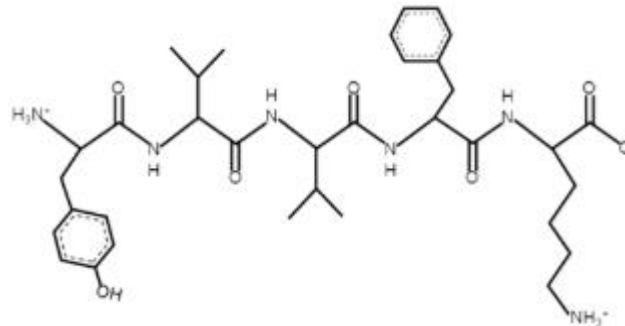
A. Peptida Bioaktif

Peptida adalah rantai asam amino yang terjalin melalui ikatan kovalen yaitu ikatan peptida. Ikatan peptida terbentuk dengan cara pelepasan molekul air (proses dehidrasi) dari gugus-karboksil suatu asam amino dan gugus amino dari asam amino yang lain. Pembentukan ikatan peptida ini adalah salah satu contoh dari reaksi kondensasi di dalam makhluk hidup. Setiap unit asam amino di dalam suatu peptida disebut sebagai residu karena merupakan bagian yang tertinggal setelah kehilangan atom hidrogen dari gugus aminonya dan ion hidroksil dari gugus karboksilnya. Dua residu asam amino yang terjalin dengan ikatan peptida membentuk dipeptida. Jika tiga residu asam amino yang terjalin dengan dua ikatan peptida membentuk tripeptida, demikian juga apabila ada empat atau lima asam amino penyusunnya maka disebut tetrapeptida atau pentapeptida. Seringkali apabila beberapa asam amino berikatan melalui ikatan peptida disebut sebagai oligopeptida, sedangkan apabila asam amino berjumlah banyak saling berikatan melalui ikatan peptida disebut sebagai polipeptida (Nelson and Cox 2000).

Peptida bioaktif didefinisikan sebagai fragmen protein dengan sekuen asam amino yang memiliki aktifitas biologis, seperti antioksidan, antihipertensi, antitrombotik, anti-adipogenik, antimikroba, anti-inflamasi, dan efek immunomodulator (de Castro and Sato, 2015). Peptida bioaktif tersebut memiliki 2-20 residu asam amino, meskipun ada juga yang melaporkan lebih dari 20 residu asam amino (Ryan *et al.*, 2011), dengan berat molekul kurang dari 6.000 Da. Bioaktifitas peptida bioaktif ditentukan terutama didasarkan atas komposisi dan sekuen asam aminonya (de Castro and Sato, 2015).

Mellander di tahun 1950 dianggap yang pertama kali berperan dalam mempelajari peptida bioaktif saat Mellander berhasil menghidrolisis protein kasein menjadi peptida bioaktif untuk meningkatkan kalsifikasi tulang bagi bayi baru lahir yang menderita *rachitis* (de Castro and Sato, 2015). Sejak saat itulah, beragam bioaktifitas peptida bioaktif mulai diidentifikasi. Menurut database yang

terdapat pada *Biopep* dan *BioPD* (*Bioactive Peptida Databases*), jumlah peptida bioaktif telah tercatat lebih dari 1200 (Singh, Vij and Hati, 2014).



Gambar 2: Contoh struktur primer peptida antihipertensi (*Tyr-Val-Val-Phe-Lys*) dari protein kedelai *glycinin* (<http://www.tulane.edu/~biochem/WW/PepDraw/>)

Peptida bioaktif dapat diperoleh dari sumber protein nabati maupun hewani. Dari sumber protein nabati, umumnya peptida bioaktif berasal dari biji-bijian seperti gandum, beras, jagung, oat, dan rye, serta dari kacang-kacangan seperti kedelai, *peas* dan *chickpeas*. Di antara sumber protein nabati tersebut, kedelai adalah bahan yang paling banyak dipelajari sebagai sumber peptida bioaktif (Ortiz-Martinez, Winkler and Garcia-Lara, 2014). Beberapa peptida bioaktif dari kedelai telah berhasil diisolasi dan telah menunjukkan sifat fungsional dan aktifitas fisiologis yang potensial seperti antihipertensi, hipokolesterolemia, antiobesitas, antioksidan, dan antikanker (Wang and De Mejia, 2006). Adapun yang berasal dari sumber protein hewani, daging, susu, telur dan ikan juga sudah banyak yang dipelajari sebagai penghasil peptida bioaktif (de Castro and Sato, 2015).

Menurut Sanjukta and Rai (2016), peptida bioaktif itu tidak aktif di dalam sekuen *parent* protein. Peptida tersebut akan aktif jika dikeluarkan dari *parent* proteinnya melalui hidrolisis enzimatik selama fermentasi dan pencernaan gastrointestinal. Dibandingkan dengan protein, peptida memiliki keunggulan dalam pencernaan maupun pemanfaatannya. Menurut penelitian ilmu gizi modern, sebagian besar protein yang dicerna oleh tubuh manusia terdekomposisi menjadi peptida-peptida kecil, terdiri atas 2-7 residu asam amino di dalam saluran

pencernaan, kemudian peptida-peptida tersebut diserap secara langsung. Jumlah protein yang diubah menjadi asam amino di dalam saluran pencernaan sangat sedikit (Clemente, 2000). Penelitian lainnya menunjukkan bahwa laju absorpsi peptida yang berasal dari hidrolisat protein lebih cepat dibandingkan dengan asam amino bebas, dan konsumsi energi dalam mengasimilasi peptida lebih rendah dibandingkan mengasimilasi asam amino (Schaafsma, 2009).

B. Sifat Biologis Peptida Bioaktif

Beberapa peptida memiliki aktifitas biologis yang bermanfaat bagi kesehatan manusia. Peran fungsional dari peptida tersebut antara lain adalah antihipertensi, antioksidan, antimikroba, antitrombotik, antiadipogenik (antiobesitas), antikanker, aktifitas opioid, antihiperkolesterol, *immunomodulator* dan antidiabet (kencing manis) (Nakahara *et al.*, 2010; Capriotti *et al.*, 2015). Beberapa kondisi penyakit yang dapat diatasi oleh peptida bioaktif antara lain adalah penyakit jantung koroner (iskemik), stroke, hipertensi, kanker, obesitas dan osteoporosis (Gilani, Xiao and Lee, 2008; Boelsma and Kloek, 2009).

Hipertensi adalah penyakit yang berhubungan dengan penyakit kardiovaskuler, seperti aterosklerosis, kardio infark dan stroke. *Angiotensin I converting enzyme* (ACE) berperan penting dalam regulasi tekanan arteri karena enzim tersebut mengkatalisis perubahan *angiotensin* I (bentuk inaktif) menjadi *angiotensin* II (*vasoconstrictor*) dan menginaktifasi bradykinin (*vasodilator*). Penghambatan terhadap ACE dapat menyebabkan penurunan tekanan darah. ACE *inhibitor* sintesis seperti *captopril* dan *enalapril* sering digunakan untuk mengatasi hipertensi dan penyakit lainnya yang berkaitan dengan penyakit jantung. Hanya saja, ACE *inhibitor* sintesis tersebut ternyata menimbulkan berbagai efek samping antara lain batuk, pengecapan yang berubah, gatal, dan angiodema (Sheih *et al.* 2009).

Beberapa jenis peptida bioaktif yang mampu menghambat ACE telah diisolasi dari hidrolisat protein dan produk fermentasi. Dua jenis peptida yaitu *Ala-Pro* dan *Phe-Ala-Pro* memiliki struktur yang analog dengan *captopril* dan *enalapril* (Castro and Sato, 2015). Protein telur (ovalbumin) setelah pencernaan

pepsin menghasilkan ovokinin yaitu oktapeptida (*Phe-Arg-Ala-His-Pro-Phe-Leu*) yang memiliki kemampuan menghambat ACE. Setelah pencernaan dengan kemotrypsin pada ovalbumin, dapat menghasilkan 2-7 fragmen dari ovokinin (Matoba *et al.* 1999).

Mekanisme aksi dari peptida antihipertensi terkait dengan kehadiran asam amino aromatik dan alifatik seperti *Pro*, *Phe* dan *Tyr* pada C-terminal dan *Val* dan *Ile* pada N-terminal (Wijesekara, *et al.* 2011). Keberadaan asam amino hidrofobik (*Tyr*, *Phe*, *Trp*, *Ala*, *Ile*, *Val*, *Met*) atau asam amino bermuatan positif (*Arg* dan *Lys*) dan juga *Pro* pada posisi C terminal dari peptida penghambat ACE menunjukkan afinitas yang lebih baik dengan ACE (Haque and Chand, 2008; Sanjukta and Rai (2016).

C. Peptida Bioaktif dari Pangan Fermentasi Kedelai

Fermentasi adalah cara yang efisien untuk memproduksi peptida bioaktif. Peptida bioaktif dapat dihasilkan oleh aktifitas mikroorganisme dari pangan terfermentasi atau melalui enzim yang berasal dari mikroorganisme tersebut (Korhonen and Pihlanto, 2003).

Mikroorganisme yang terlibat dalam fermentasi kedelai, kacang-kacangan, beras dan gandum berasal dari spesies kapang seperti *Aspergillus oryzae* dan *Aspergillus sojae* yang merupakan tradisi lama dalam menghasilkan produk fermentasi. Enzim protease dan peptidase dari strain *Bacillus* dan *Rhizopus* telah menunjukkan kemampuan hidrolisis protein kedelai menjadi peptida aktif. Peptida-peptida yang dihasilkan umumnya memiliki aktifitas biologis seperti antioksidan dan antihipertensi (Hati *et al.* 2014).

Peptida antihipertensi yang mengandung asam amino *Ala*, *Phe* dan *His* telah diisolasi dari kedelai yang difermentasi oleh *Bacillus natto* (produk *natto* dari Jepang) dan produk *chunggugjang* (dari Korea) yang difermentasi oleh *Bacillus subtilis* (Korhonen and Pihlanto 2003). Peptida antihipertensi (peptida *His-His-Leu*) juga ditemukan di pasta kedelai (Shin *et al.* 2001) dan kecap (Okamoto *et al.* 1995). Nakahara *et al.* (2010) melaporkan kecap kedele yang difermentasi *Aspergillus sojae* telah menghasilkan peptida antihipertensi yaitu

Gly-Tyr, Ala-Phe, Val-Pro, Ala-Ile dan *Val-Gly*. Demikian juga Inoue *et al* (2009) melaporkan fermentasi *miso* menggunakan kapang *Aspergillus oryzae* yang menghasilkan dua peptida antihipertensi yaitu peptida *Val-Pro-Pro* dan *Ile-Pro-Pro*. Wang *et al.* (2005) telah mengidentifikasi beberapa peptida antihipertensi, seperti *Val-Ala-His-Ile-Asn-Val-Gly-Lys* atau *Tyr-Val-Trp-Lys* dari kedelai yang difermentasi dengan *Bifidobacterium natto* atau *Bacillus subtilis*. Tsai *et al.* (2006) telah memfermentasi susu kedelai dengan beberapa strain bakteri asam laktat seperti *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Str. thermophilus* and *B. longum*. Peptida yang dihasilkan memiliki sifat fungsional antihipertensi. Vallabha and Tiku (2014) mengungkapkan bahwa peptida *Leu-Ile-Val-Thr-Lys* dan *Leu-Ile-Val-Thr* yang dihasilkan oleh protein kedelai yang difermentasi *Lactobacillus casei spp. pseudoplantarum* telah menunjukkan aktivitas penghambatan ACE 1 sebagai antihipertensi.

Nakahara *et al.* (2010) telah membuat *seasoning* yang diperkaya peptida yang disebut sebagai *fermented soybean seasoning* (FSS) dengan cara memodifikasi proses *brewing* pada pembuatan kecap. FSS memiliki konsentrasi total peptida 2,7 kali lipat lebih tinggi dibandingkan dengan kecap biasa, dan konsentrasi peptida antihipertensi juga lebih tinggi dibandingkan kecap biasa.

Gibbs *et al.* (2004) melaporkan telah memproduksi peptida bioaktif dari *natto* (menggunakan *Bacillus subtilis*) di dalam cawan petri dan tempe (menggunakan *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710) di dalam cawan petri. Peptida yang dihasilkan memiliki aktifitas *ACE inhibitor*, antitrombotik, *surface tension* dan antioksidan. Kesemua peptida yang dihasilkan berasal dari *glycinin*, Adapun *-conglycinin* lebih stabil terhadap serangan enzim proteolitik bahkan dengan banyak enzim. Senyawa glikoprotein, fosfoprotein, dan senyawa termodifikasi lainnya yang mengandung jumlah ikatan disulfida tinggi diduga lebih sulit terhidrolisis. Protease di dalam *strain Bacillus* dan *Rhizopus* hanya dapat memotong protein kedelai menjadi peptida-peptida besar (Gibbs *et al.* 2004).

Fermentasi kedelai juga menghasilkan peptida dengan sifat-sifat antioksidan pada dua produk fermentasi yaitu *natto* dan *tempe* (Wang *et al.* 2008). *Natto* yang difermentasi oleh *B. Subtilis* telah menunjukkan aktifitas *radical scavenging*

dan efek penghambatan terhadap oksidasi LDL (*low density lipoprotein*) secara *in vitro* (Iwai *et al.* 2002). Demikian juga *Sufu*, produk kedelai asli China yang difermentasi secara tradisional oleh *A. Oryzae* menunjukkan aktifitas DPPH *radical-scavenging* yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak *tofu* yang tidak difermentasi (Huang *et al.* 2011).

D. Purifikasi dan Identifikasi (Karakterisasi) Peptida Bioaktif

Beberapa metode purifikasi telah dilaporkan digunakan dalam memproduksi peptida bioaktif. Teknik kromatografi diantara yang paling banyak digunakan, seperti *high performance liquid chromatography* (HPLC) dan *ultra high pressure liquid chromatography* (UHPLC) (Singh *et al.* 2014). *Reversed phase* HPLC (RP-HPLC) dapat digunakan untuk memisahkan peptida berdasarkan hidrofobitasnya. *Hydrophilic interaction liquid chromatography* (HILIC) digunakan untuk pemisahan substansi hidrofilik. *Gel electrophoresis* dan *ultrafiltration* digunakan sebagai teknik pendukung untuk analisis komposisi struktur dan kimia peptida (Roblet *et al.* 2012).

Mass spectrometry telah banyak dilaporkan untuk identifikasi profil protein dan produk hidrolisis berupa peptida. *Electrospray ionization* dan *matrix assisted laser desorption/ionization* (MALDI-TOF) adalah jenis teknik *mass spectrometry* yang sering digunakan dalam identifikasi dan karakterisasi peptida bioaktif. *Liquid chromatography–mass spectrometry* telah umum digunakan dalam identifikasi sekuen peptida (Singh *et al.* 2014).

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

A. Tujuan

Tujuan umum penelitian ini adalah menelaah aktivitas antihipertensi tepung Tempe yang diproduksi dari kedelai lokal secara *in vivo*. Secara khusus dapat dijabarkan sebagai berikut:

1. Memproduksi tepung Tempe dari kedelai lokal.
2. Menguji proksimat tepung Tempe dari kedelai lokal, meliputi karbohidrat, protein, lemak, kadar abu, kadar air dan serat.
3. Menguji aktivitas antihipertensi tepung Tempe dari kedelai lokal secara *in vivo*.

C. Manfaat

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah:

1. Mengembangkan khasanah ilmu pengetahuan tentang tempe dari kedelai lokal.
2. Berkontribusi dalam pengembangan potensi Tempe sebagai sebagai pangan fungsional, khususnya sebagai antihipertensi.
3. Mensosialisasikan Tempe sebagai produk asli Indonesia yang kaya akan gizi dan bioaktif, khususnya peptida bioaktif, ke taraf internasional.

BAB IV

METODE PENELITIAN

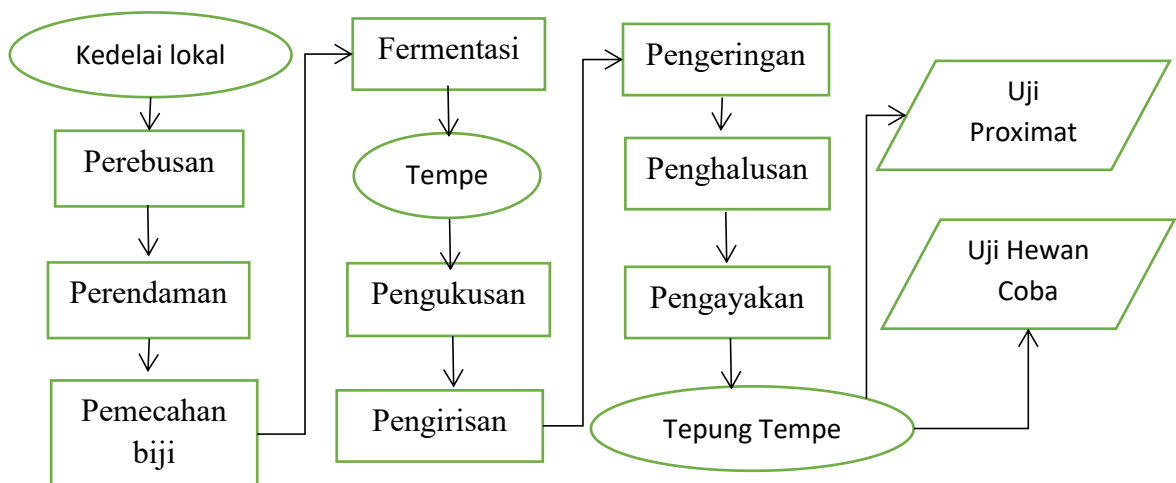
A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan hewan coba tikus (*in vivo*) dengan rancangan percobaan menggunakan rancangan acak kelompok (RAK). Penelitian ini memiliki lima perlakuan dan setiap perlakuan memiliki 5 ekor hewan tikus. Lima perlakuan itu dijelaskan pada Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1. Perlakuan penelitian dan deskripsinya

Perlakuan	Deskripsi
Normal	Tikus tanpa perlakuan apapun (normal)
kontrol -	Tidak ada pemberian kaptopril 2,5 mg/kgbb
kontrol +	Pemberian kaptopril 2,5 mg/kgbb
P1	Pemberian tepung Tempe kedelai lokal konsentrasi 1 g/200g bb/hari
P2	Pemberian tepung Tempe kedelai lokal konsentrasi 2 g/200g bb/hari
P3	Pemberian tepung Tempe kedelai lokal konsentrasi 3 g/200g bb/hari

B. Bagan Alir Penelitian



Gambar 4: Bagan alir penelitian

C. Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian di laboratorium Pengolahan Pangan di Jurusan Gizi, Politeknik Kesehatan Denpasar, Laboratorium Analisis Pangan Fakultas Teknologi Pangan dan Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG) UGM Yogyakarta. Waktu pelaksanaan penelitian pada bulan Maret-Oktober 2021.

D. Populasi dan Sampel

Populasi dari penelitian ini adalah Tepung kacang kedelai lokal. Sampel penelitian ini adalah Tepung kacang kedelai lokal yang diperlakukan sesuai tahapan penelitian.

E. Instrument Penelitian dan Teknik Pengumpulan Data

Penelitian ini menggunakan instrumen laboratorium yang digunakan untuk pengujian proximat dan uji hewan coba seperti Sphygmomanometer-S2 version 6,90 (alat untuk mengukur tekanan darah tikus) dari Jerman.

F. Analisis Data

Data yang sudah terkumpul dari hasil eksperimen selanjutnya dianalisis dengan menggunakan *analysis of variance* (ANOVA). Perbedaan $P < 0,05$ dianggap sebagai signifikan.

G. Etika Penelitian

Penelitian ini memperhatikan dan menghormati prinsip-prinsip etika terhadap hak-hak subyek. Dasar etika yang diterapkan dalam penelitian ini adalah *respect for persons* (menghormati harkat dan martabat), *beneficence* (tidak merugikan) dan *justice* (adil).

BAB V

HASIL DAN LUARAN YANG DIPAKAI

A. Hasil

1. Analisa Proximat

Hasil analisa proximat terhadap tepung tempe kedelai lokal tersaji pada Tabel 2 di bawah ini.

Tabel 2. Hasil analisa proximat pada tepung tempe kedelai lokal

No	Zat Gizi	Satuan	Tepung tempe
1	Karbohidrat	%	12,2
2	Protein	%	51,25
3	Lemak	%	29,06
4	Kadar abu	%	1,26
5	Kadar air	%	6,22
6	Serat	%	8,25

Hasil analisa proximat menunjukkan bahwa kadar protein tepung tempe kedelai lokal sangat tinggi yaitu lebih dari setengah dari total zat-zat gizi di dalam tepung tempe (51,25%). Kadar serat tepung tempe kedelai lokal juga relatif tinggi yaitu 8,25%.

2. Pengujian dengan hewan coba

a. Berat badan tikus

Perlakuan	BB 1 (27 juni)	BB 2 (4 juli)	BB 3 (11 juli)	BB 4 (18 juli)	BB 5 (25 juli)	BB 6 (1 Agust)	BB 6 (9 Agust)	Perub BB (g)	% kenaikan
Normal	190,4	196,4	202,8	209,2	213,8	220,6	226,4	36	18,91
kontrol -	177	183,6	188,8	193,8	200	206,4	215,2	38,2	21,58
kontrol +	175,2	181,8	186,8	192,6	198,6	204,6	211,8	36,6	20,89
P1	179,4	185,8	190,6	196	202,2	208,4	216	36,6	20,40
P2	181,2	187,4	192,4	197,4	203,2	209,6	216,8	35,6	19,65
P3	175	181,8	187,4	192	197,8	203,6	211	36	20,57

Perubahan berat badan tikus dapat dilihat pada Tabel 3.

Selama masa penelitian, berat badan tikus mengalami peningkatan secara signifikan. Rata-rata peningkatan berat tikus sebesar 36,5 g (20,3%) selama kurun 40 hari penelitian. Tidak ada perbedaan kenaikan berat badan tikus di antara perlakuan.

b. Tekanan darah tikus

Tekanan darah tikus selama penelitian dapat dilihat pada Tabel 4 di bawah ini.

Perlakuan	Tensi 2 (4 juli)	Tensi 5 (25 juli)	perubahan setelah induksi (%)	Tensi 6 (9 Agust)	perubahan setelah treatment (%)
Normal	82,6	82,4	-0,24	82,8	0,49
kontrol -	85,8	191,4	123,08	194,6	1,67
kontrol +	88,2	190,4	115,87	98,2	-48,42
P1	86	189,6	120,47	120,6	-36,39
P2	86,2	186,6	116,47	112,4	-39,76
P3	85	188,4	121,65	101,2	-46,28

Tekanan darah tikus pada awal penelitian rata-rata sebesar 85,6 mmHg, setelah 3 pekan diinduksi dengan prednison 1,5 mg/kg dan NaCl 2,5%, terjadi peningkatan tekanan darahnya lebih dari 119%. Kemudian, setelah 2 pekan diperlakukan dengan konsumsi captopril untuk kelompok kontrol positif terjadi penurunan tekanan darah sangat signifikan yaitu 98 mmHg. Tekanan darah pada kelompok kontrol negatif masih menunjukkan nilai tertinggi yaitu 194,6 mmHg. Kelompok perlakuan dengan tepung tempe menunjukkan penurunan dari sebelumnya, masing-masing untuk perlakuan 1, 2 dan 3 adalah 120,6; 112,4; 101,2 mmHg.

c. *Heart rate* (detak jantung/denyut nadi)

Heart rate tikus selama penelitian dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Heart rate tikus percobaan setelah induksi dan perlakuan

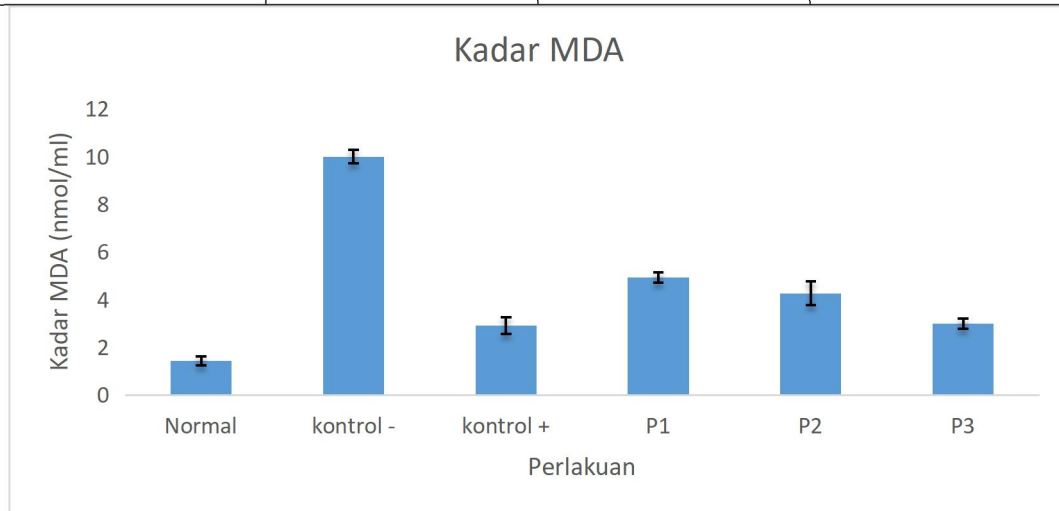
Perlakuan	Heart rate (4 juli) (bpm)	Heart rate 5 (25 juli) (bpm)	Perubahan setelah induksi (%)	Heart rate 6 (9 Agust) (bpm)	Perubahan setelah treatment (%)
Normal	247	246,6	-0,16	246,6	0,00
kontrol -	248,8	387,4	55,71	387,6	0,05
kontrol +	250,4	387,2	54,63	262,6	-32,18
P1	250,2	385,2	53,96	287,2	-25,44
P2	250	387,4	54,96	284,2	-26,64
P3	252,4	386,6	53,17	268,2	-30,63

Rerata *heart rate* tikus sebelum perlakuan adalah 249,8 bpm. Setelah induksi dengan prednison 1,5 mg/kg dan NaCl 2,5% selama 3 pekan, terjadi peningkatan *heart rate* menjadi 386,76 bpm, lebih dari 50% dari nilai awal. Perlakuan 1, 2 dan 3 menurunkan *heart rate* sekitar 30%. Penurunan tertinggi terjadi pada perlakuan 3, diikuti perlakuan 2 dan 1. Penggunaan kaptopril (kontrol positif) sebanyak 2,5 mg/kg menurunkan *heart rate* hingga 32%, tidak begitu jauh dari perlakuan 3.

A. Kadar MDA

Tabel 6. kadar MDA tikus pada berbagai perlakuan

Perlakuan	MDA 6 (9 Agust)	SD	SE
Normal	1,43	0,19	0,09
kontrol -	10,00	0,28	0,12
kontrol +	2,92	0,35	0,15
P1	4,93	0,21	0,10
P2	4,27	0,50	0,22
P3	3,00	0,22	0,10



Kadar MDA pada tikus Normal berada pada kisaran 1,43. Induksi prednison 1,5 mg/kg dan NaCl 2,5% selama 3 pekan meningkatkan kadar MDA hingga 10,0. Pemberian tepung tempe mampu mengurangi peningkatan kadar MDA pada tikus coba yaitu masing-masing pada perlakuan 1, 2 dan 3 (4,93; 4,27 dan 3,00). Pemberian kaptopril 2,5 mg/kg mampu menurunkan MDA hingga 2,92.

3. ACE 2

Tabel 7 kadar ACE2 pada setiap perlakuan

Perlakuan	ACE 2; 6 (9 Agust)	SD	SE
Normal	14,96	0,41	0,18
kontrol -	22,15	0,39	0,17

kontrol +	17,02	0,12	0,05
P1	19,12	0,29	0,13
P2	17,99	0,10	0,04
P3	17,57	0,12	0,05

Kadar ACE2 pada tikus Normal berada pada kisaran 14,96. Induksi prednison 1,5 mg/kg dan NaCl 2,5% selama 3 pekan (kontrol negatif) meningkatkan kadar ACE2 hingga 22,15. Pemberian tepung tempe kedelai organik mampu mengurangi peningkatan kadar ACE2 pada tikus coba yaitu masing-masing pada perlakuan 1, 2 dan 3 (19,12; 17,99 dan 17,57). Pemberian kaptopril 2,5 mg/kg (kontrol positif) mampu menurunkan ACE2 hingga 17,02.

4. Total lipid

A. Triglicerida

Perlakuan	Triglicerida (mg/dl)	SD	SE
Normal	73,16725979	1,98	0,88
kontrol -	123,99	2,95	1,32
kontrol +	93,67	2,39	1,07
P1	101,35	3,85	1,72
P2	102,78	3,09	1,38
P3	106,33	3,04	1,36

Kadar Triglicerida pada tikus Normal berada pada kisaran 73,17 mg/dl. Induksi prednison 1,5 mg/kg dan NaCl 2,5% selama 3 pekan (kontrol negatif) meningkatkan kadar Triglicerida hingga 123,99. Pemberian kaptopril 2,5 mg/kg (kontrol positif) mampu mempertahankan kadar Triglicerida pada kisaran 93,67 mg/dl. Pemberian tepung tempe kedelai organik setelah induksi prednison 1,5 mg/kg dan NaCl 2,5% selama 3 pekan mampu menjadikan kadar Triglicerida pada tikus coba masih terkontrol di bawah dari perlakuan kontrol negatif, yaitu masing-masing pada perlakuan 1, 2 dan 3 (101,35; 102,78 dan 106,33 mg/dl).

B. HDL

Perlakuan	HDL (mg/dl)	SD	SE
Normal	74,31	3,38	1,51
kontrol -	32,36	1,94	0,87
kontrol +	49,92	2,61	1,17
P1	47,48	2,34	1,05
P2	44,23	2,20	0,98
P3	45,85	3,04	1,36

Kadar HDL pada tikus Normal berada pada kisaran 74,31 mg/dl. Induksi prednison 1,5 mg/kg dan NaCl 2,5% selama 3 pekan (kontrol negatif) menurunkan kadar HDL hingga 32,36 mg/dl. Pemberian kaptopril 2,5 mg/kg (kontrol positif) juga menurunkan kadar HDL, tapi di atas kontrol negatif yaitu pada kisaran 49,92 mg/dl. Pemberian tepung tempe kedelai organik setelah induksi prednison 1,5 mg/kg dan NaCl 2,5% selama 3 pekan juga menurunkan kadar HDL pada tikus coba yaitu masing-masing pada perlakuan 1, 2 dan 3 (47,48; 44,23 dan 45,85 mg/dl).

C. LDL

Perlakuan	LDL (mg/dl)	SD	SE
Normal	26,67	1,69	0,75
kontrol -	70,77	1,69	0,75
kontrol +	46,30	2,28	1,02
P1	49,52	5,12	2,29
P2	52,45	1,98	0,89
P3	50,40	3,04	1,36

Kadar LDL pada tikus Normal berada pada kisaran 26,67 mg/dl. Induksi prednison 1,5 mg/kg dan NaCl 2,5% selama 3 pekan (kontrol negatif) meningkatkan kadar LDL hingga 70,77 mg/dl. Pemberian kaptopril 2,5 mg/kg (kontrol positif) meningkatkan kadar LDL, tapi di bawah kontrol negatif yaitu pada kisaran 46,30 mg/dl. Pemberian

tepung tempe kedelai organik setelah induksi prednison 1,5 mg/kg dan NaCl 2,5% selama 3 pekan juga meningkatkan kadar LDL pada tikus coba yaitu masing-masing pada perlakuan 1, 2 dan 3 (49,52; 52,45 dan 50,40 mg/dl).

D. Kolesterol

Perlakuan	Kolesterol (mg/dl)	SD	SE
Normal	89,47	2,04	0,911
kontrol -	152,93	3,79	1,696
kontrol +	112,51	2,52	1,126
P1	127,07	3,14	1,403
P2	121,98	2,58	1,153
P3	117,59	2,04	0,911

Kadar Kolesterol pada tikus Normal berada pada kisaran 89,47 mg/dl. Induksi prednison 1,5 mg/kg dan NaCl 2,5% selama 3 pekan (kontrol negatif) meningkatkan kadar Kolesterol hingga 152,93 mg/dl. Pemberian kaptopril 2,5 mg/kg (kontrol positif) meningkatkan kadar Kolesterol, tapi di bawah kontrol negatif yaitu pada kisaran 112,51 mg/dl. Pemberian tepung tempe kedelai organik setelah induksi prednison 1,5 mg/kg dan NaCl 2,5% selama 3 pekan juga meningkatkan kadar LDL pada tikus coba yaitu masing-masing pada perlakuan 1, 2 dan 3 (127,07; 121,98 dan 117,59 mg/dl).

BAB VI

RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Tahap berikutnya yang akan dilakukan adalah pengolahan dan analisa data, dari hasil pengujian proximat serta uji dengan hewan coba (*in vivo*). Pengujian proximat meliputi karbohidrat, protein, lemak, abu, serat dan air, sedangkan pengujian dengan hewan coba meliputi MDA, ACE 2, dan total lipid (trigliserida, HDL dan LDL).

Pengolahan dan analisa data dirampungkan dalam waktu satu pekan. Selanjutnya mempersiapkan untuk publikasi pada jurnal ilmiah internasional bereputasi.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Hasil analisa proximat menunjukkan bahwa kadar protein tepung tempe kedelai lokal sangat tinggi yaitu lebih dari setengah dari total zat-zat gizi di dalam tepung tempe (51,25%). Kadar serat tepung tempe kedelai lokal juga relatif tinggi yaitu 8,25%.
2. Rata-rata peningkatan berat tikus sebesar 36,5 g (20,3%) selama kurun 40 hari penelitian. Tidak ada perbedaan kenaikan berat badan tikus di antara perlakuan.
3. Tekanan darah pada kelompok kontrol negatif masih menunjukkan nilai tertinggi yaitu 194,6 mmHg. Kelompok perlakuan dengan tepung tempe menunjukkan penurunan dari sebelumnya, masing-masing untuk perlakuan 1, 2 dan 3 adalah 120,6; 112,4; 101,2 mmHg.
4. Setelah induksi dengan prednison 1,5 mg/kg dan NaCl 2,5% selama 3 pekan, terjadi peningkatan *heart rate* menjadi 386,76 bpm, lebih dari 50% dari nilai awal. Perlakuan 1, 2 dan 3 menurunkan *heart rate* sekitar 30%. Penurunan tertinggi terjadi pada perlakuan 3, diikuti perlakuan 2 dan 1. Penggunaan kaptopril (kontrol positif) sebanyak 2,5 mg/kg menurunkan *heart rate* hingga 32%, tidak begitu jauh dari perlakuan 3.
5. MDA, ACE2 dan total lipid (trigliserida, HDL, LDL, dan total kolesterol) dari hewan coba tikus telah teridentifikasi.

B. Saran

Perlu dilanjutkan dengan pengolahan dan analisa data.

DAFTAR PUSTAKA

- Astuti, M. *et al.* (2000) 'Tempe , a nutritious and healthy food from Indonesia', *Asia Pasific Journal of Clinical Nutrition*, 9(May), pp. 322–325.
- Boelsma, E. and Kloek, J. (2009) 'Lactotripeptides and antihypertensive effects: a critical review', *The British journal of nutrition*, 101(6), pp. 776–786. doi: 10.1017/S0007114508137722.
- Capriotti, A. L. *et al.* (2015) 'Journal of Food Composition and Analysis Identification of potential bioactive peptides generated by simulated gastrointestinal digestion of soybean seeds and soy milk proteins', *journal of food composition and analysis*, 44, pp. 205–213. doi: 10.1016/j.jfca.2015.08.007.
- de Castro, R. and Sato, H. H. (2015) 'Biologically active peptides : Processes for their generation , puri fi cation and identi fi cation and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries', *Food Research International*. Elsevier B.V., 74, pp. 185–198. doi: 10.1016/j.foodres.2015.05.013.
- Clemente, A. (2000) 'Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition', *Trends in Food Science & Technology*, 11(7), pp. 254–262. doi: 10.1016/S0924-2244(01)00007-3.
- Dajanta, K. *et al.* (2011) 'Free-amino acid profiles of thua nao, a Thai fermented soybean', *Food Chemistry*, 125, pp. 342–347. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.09.002.
- Egounlety, M. and Aworh, O. C. (2003) 'Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Ha', *Journal of Food Engineering*, 56(2–3), pp. 249–254. doi: 10.1016/S0260-8774(02)00262-5.
- Gibbs, B. F. *et al.* (2004) 'Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food', *Food Research International*, 37, pp. 123–131. doi: 10.1016/j.foodres.2003.09.010.
- Gilani, G., Xiao, C. and Lee, N. (2008) 'Need for accurate and standardized determination of amino acids and bioactive peptides for evaluating protein quality and potential health effects of foods and dietary supplements', *Journal of AOAC International*, 91(4), pp. 894–900.
- Herman, E. M. (2014) 'Soybean seed proteome rebalancing', *Frontiers in Plant Science*, 5(437), pp. 1–8. doi: 10.3389/fpls.2014.00437.
- Mo, H. *et al.* (2013) 'Effect of soybean processing on content and bioaccessibility of folate, vitamin B12 and isoflavones in tofu and tempe', *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 141(3), pp. 2418–2425. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.05.017.

- Nakahara, T. *et al.* (2010) 'Antihypertensive effect of peptide-enriched soy sauce-like seasoning and identification of its angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances', *Journal of Agricultural and food chemistry*, 58(2), pp. 821–827. doi: 10.1021/jf903261h.
- Nout, M. J. R. and Kiers, J. L. (2005) 'Tempe fermentation, innovation and functionality: Update into the third millenium', *Journal of Applied Microbiology*, 98(4), pp. 789–805. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02471.x.
- Nurdini, A. L. *et al.* (2015) 'Microbial growth dynamics during tempe fermentation in two different home industries', *International Food Research Journal*, 22(4).
- Ortiz-Martinez, M., Winkler, R. and Garcia-Lara, S. (2014) 'Preventive and therapeutic potential of peptides from cereals against cancer', *J Proteomics*, 5(111), pp. 165–183. doi: 10.1016/j.jprot.2014.03.044.
- Ryan, J. *et al.* (2011) 'Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish', *Nutrients*, 3, pp. 765–791. doi: 10.3390/nu3090765.
- Sanjukta, S. and Rai, A. K. (2016) 'Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits', *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, 50, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.tifs.2016.01.010.
- Schaafsma, G. (2009) 'Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition', *European journal of clinical nutrition*, 63(10), pp. 1161–1168. doi: 10.1038/ejcn.2009.56.
- Shin, D. and Jeong, D. (2015) 'Korean traditional fermented soybean products: Jang', *Journal of Ethnic Foods*. Elsevier Ltd, 2(1), pp. 2–7. doi: 10.1016/j.jef.2015.02.002.
- Singh, B. P., Vij, S. and Hati, S. (2014) 'Functional significance of bioactive peptides derived from soybean', *Peptides*. doi: 10.1016/j.peptides.2014.01.022.
- Tamam, B. *et al.* (2019) 'Proteomic study of bioactive peptides from Tempe', *Journal of Biosciences and Bioengineering*, 128(2), pp. 241–248. doi: 10.1016/j.jbiosc.2019.01.019.
- Wang, H. *et al.* (2016) 'Changes of Composition and Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)-inhibitory activity during Douchi fermentation', *International Journal of Food Properties*, 19(11), pp. 2408–2416. doi: 10.1080/10942912.2015.1040122.
- Wang, W. and De Mejia, E. G. (2006) 'A New Frontier in Soy Bioactive Peptides that May Prevent Age-related Chronic Diseases', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4(4), pp. 63–78. doi: 10.1111/j.1541-4337.2005.tb00075.x.

Zhang, Y. *et al.* (2006) 'Prehypertension, diabetes, and cardiovascular disease risk in a population-based sample: the Strong Heart Study', *Hypertension*, 47(3), pp. 410–414. doi: 10.1161/01.HYP.0000205119.19804.08.

Lampiran 1.

INSTRUMEN PENELITIAN

No	Kegiatan	Instrumen yang digunakan
1	Pembuatan Tepung Tempe	Dehidrator, grinder, ayakan
2	Uji Proximat	Karbohidrat : Spektrofotometer Protein : Metode Kjeldahl Lemak : Metode Soxlet Kadar abu : gravimetri Kadar air : gravimetri Kadar serat : gravimetri
3	Pengukuran berat badan	Digital
4	Pengukuran tensi meter	Menggunakan alat Sphygmomanometer S-2, versi 6.90, buatan Germany.
5	Uji MDA	Metode TBARs
6	Uji total lipid	LDL = metode fotometrik Trigliserida = GPO enzymatic fotometrik test Kolesterol = metode CHOD-PAP enzymatic fotometrik test
7	ACE	Metode= Rat ACE2 (Angiotensin Converting enzyme) Elisa kit

SK Penelitian

 **KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA**
DIREKTORAT JENDERAL TENAGA KESEHATAN
POLITEKNIK KESEHATAN DENPASAR
Alamat : Jalan Sanitasi No. 1, Sideloknya, Denpasar
Telp : (0361) 710447, Faksimili : (0361) 710448
Laman (Website) : <http://www.poltekkes-denpasar.ac.id/>
Email : info@poltekkes-denpasar.ac.id



KEPUTUSAN DIREKTUR POLTEKES KEMENIKES DENPASAR
NOMOR : HK.02.03/P.3M/237/V 2022

TENTANG
SUSUNAN TIM PENELITI
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI DENGAN JUDUL
AKTIVITAS ANTIHIPERTENSITEMPE TELAAH IN VITRO DAN IN VIVO

DENGAN RAHMAT TUHAN YANG MAHA ESA
DIREKTUR POLTEKES KEMENIKES DENPASAR


Menimbang :

- a. bahwa dalam rangka melaksanakan Tri Dharma Perguruan Tinggi dan meningkatkan mutu pendidikan di Poltekkes Kementerian Kesehatan perlu dikembangkan pendidikan bagi civitas akademika Poltekkes Kemenikes Denpasar;
- b. bahwa sebagai Pelaksanaan dari Keputusan Menteri Negara Koordinator Bidang Pengawasan Pembangunan dan Pendayagunaan Aparatur Negara nomor 38/Kepu/MK.V/Aspan/819/99 Tanggal 24 Agustus 1999 dipandang perlu untuk membentuk Tim Peneliti Dasar Unggulan Perguruan Tinggi dengan Judul Aktivitas Antihipertensi Tempe Telaah In Vitro dan In Vivo, yang ditetapkan dengan suatu surat keputusan;
- c. bahwa untuk maksud tersebut di atas perlu ditetapkan nama-nama seperti yang tercantum dalam surat keputusan ini yang dianggap cakap dan memenuhi syarat-syarat yang diperlukan untuk diserahkan tugas dimaksud.


Mengingat :

- 1. Undang-Undang RI Nomor 20 Tahun 2003 Tentang Sistem Pendidikan Nasional;
- 2. Undang-Undang RI Nomor 14 Tahun 2005 Tentang Guru Dan Dosen
- 3. Undang-Undang RI Nomor 12 Tahun 2012 Tentang Pendidikan Tinggi;
- 4. Undang-Undang RI Nomor 36 Tahun 2014 Tentang Tenaga Kesehatan;
- 5. Undang-Undang Nomor 6 Tahun 2021 tentang Anggaran Pendapatan dan Belanja Negara Tahun Anggaran 2022
- 6. Peraturan Pemerintah RI Nomor 39 Tahun 1995 Tentang Pendidikan Dan Pengembangan Kesehatan;
- 7. Peraturan Pemerintah RI Nomor 37 Tahun 2009 Tentang Dosen;
- 8. Peraturan Pemerintah RI Nomor 41 Tahun 2009 Tentang tunjangan profesi guru dan dosen, tunjangan khusus guru dan dosen serta tunjangan kehormatan professor;
- 9. Peraturan Pemerintah RI Nomor 4 Tahun 2014 Tentang Penyelenggaraan Pendidikan Tinggi Dan Pengelolaan Perguruan Tinggi;
- 10. Peraturan Menteri Pendayagunaan Aparatur Negara dan Reformasi Birokrasi Nomor 17 Tahun 2013 sebagaimana telah diubah dengan Peraturan Menteri Pendayagunaan Aparatur Negara dan Reformasi Birokrasi Nomor 46 Tahun 2013 tentang Perubahan atas Peraturan Menteri Pendayagunaan Aparatur Negara dan Reformasi Birokrasi Nomor 17 Tahun 2013 tentang Jabatan Fungsional Dosen dan Angka Kreditnya;
- 11. Peraturan Menteri Pendidikan Nasional RI Nomor 47 Tahun 2009 tentang Sertifikasi Pendidik Untuk Dosen;
- 12. Peraturan Bersama Menteri Pendidikan dan Kebudayaan RI dan Kepala Badan Kepegawaian Negara Nomor 4/V/MPB/2014 dan Nomor 24 Tahun 2014 tentang Ketentuan Pelaksanaan Jabatan

Persetujuan Kaji Etik



KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA
BADAN PENGEMBANGAN DAN PEMBERDAYAAN
SUMBER DAYA MANUSIA KESEHATAN
POLITEKNIK KESEHATAN DENPASAR
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK)
Alamat : Jl. Saritasi No 1 Sidakarya Denpasar Selatan
Telp : (0361) 710447 Faksimili : (0361) 710448
Laman (website) : www.poltekkes-denpasar.ac.id



PERSETUJUAN ETIK / ETHICAL APPROVAL
Nomor : LB.02.03/EA/KEPK/ 0564 /2022

Yang bertandatangan di bawah ini Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Poltekkes Denpasar, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian, dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul :

Aktivitas Antihipertensi Tempe: Telaah Secara In Vivo



yang mengikutsertakan manusia sebagai subyek penelitian, dengan Ketua Pelaksana/Peneliti Utama :

Dr. Badrut Tamam, STP, M.Biotech

LAIK ETIK. Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol dengan masa maksimum selama 1 (satu) tahun

Pada akhir penelitian, peneliti menyerahkan laporan akhir kepada KEPK-Poltekkes Denpasar. Dalam pelaksanaan penelitian, jika ada perubahan dan/atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kaji etik penelitian (amandemen protokol)

Denpasar, 14 Juni 2022
Ketua,



Dr. Ni Komang Yuni Rahyani, S.Si.T., M.Kes

Lampiran 4.

Hasil Pengolahan Data Sementara

1. Analisa proximat tepung tempe organik

No	Zat Gizi	Satuan	Tepung tempe
1	Karbohidrat	%	12,2
2	Protein	%	51,25
3	Lemak	%	29,06
4	Kadar abu	%	1,26
5	Kadar air	%	6,22
6	Serat	%	8,25

2. Pengujian dengan hewan coba

a. Berat tikus

Perlakuan	BB 1 (27 juni)	BB 2 (4 juli)	BB 3 (11 juli)	BB 4 (18 juli)	BB 5 (25 juli)	BB 6 (1 Agust)	BB 6 (9 Agust)	Perubahan BB (g)	% kenaikan
Normal	190,4	196,4	202,8	209,2	213,8	220,6	226,4	36	18,91
kontrol -	177	183,6	188,8	193,8	200	206,4	215,2	38,2	21,58
kontrol +	175,2	181,8	186,8	192,6	198,6	204,6	211,8	36,6	20,89
P1	179,4	185,8	190,6	196	202,2	208,4	216	36,6	20,40
P2	181,2	187,4	192,4	197,4	203,2	209,6	216,8	35,6	19,65

P3	175	181,8	187,4	192	197,8	203,6	211	36	20,57
----	-----	-------	-------	-----	-------	-------	-----	----	-------

C. Tekanan darah

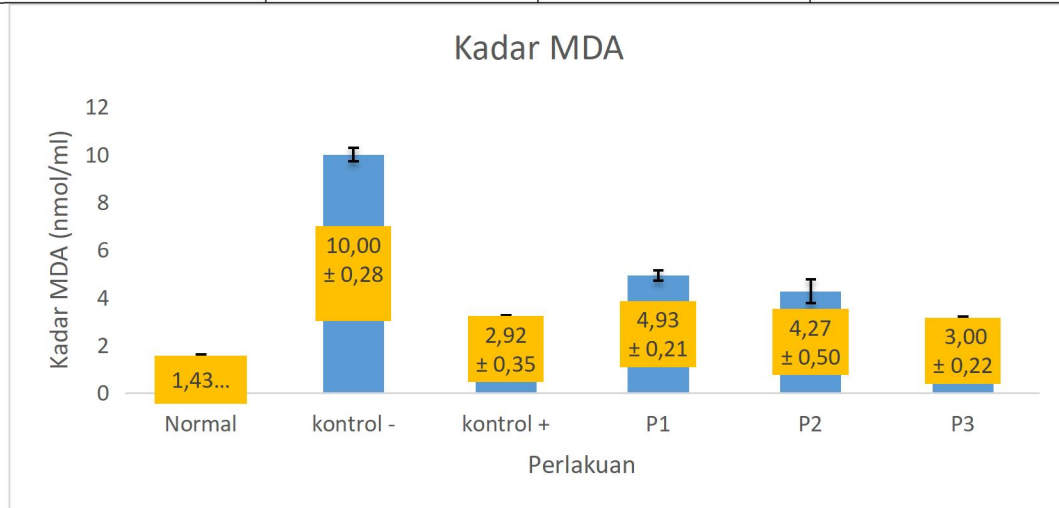
Perlakuan	Tensi 2 (4 juli)	Tensi 5 (25 juli)	perubahan setelah induksi (%)	Tensi 6 (9 Agust)	perubahan setelah treatment (%)
Normal	82,6	82,4	-0,24	82,8	0,49
kontrol -	85,8	191,4	123,08	194,6	1,67
kontrol +	88,2	190,4	115,87	98,2	-48,42
P1	86	189,6	120,47	120,6	-36,39
P2	86,2	186,6	116,47	112,4	-39,76
P3	85	188,4	121,65	101,2	-46,28

c.Laju jantung (*heart rate*)

Perlakuan	Heart rate 2 (4 juli)	Heart rate 5 (25 juli)	Perubahan setelah induksi (%)	Heart rate 6 (9 Agust)	Perubahan setelah treatment (%)
Normal	247	246,6	-0,16	246,6	0,00
kontrol -	248,8	387,4	55,71	387,6	0,05
kontrol +	250,4	387,2	54,63	262,6	-32,18
P1	250,2	385,2	53,96	287,2	-25,44
P2	250	387,4	54,96	284,2	-26,64
P3	252,4	386,6	53,17	268,2	-30,63

d. Kadar MDA

Perlakuan	MDA 6 (9 Agust)	SD	SE
Normal	1,43	0,19	0,09
kontrol -	10,00	0,28	0,12
kontrol +	2,92	0,35	0,15
P1	4,93	0,21	0,10
P2	4,27	0,50	0,22
P3	3,00	0,22	0,10



e. ACE 2

Perlakuan	ACE 2; 6 (9 Agust)	SD	SE
Normal	14,96	0,41	0,18
kontrol -	22,15	0,39	0,17
kontrol +	17,02	0,12	0,05
P1	19,12	0,29	0,13
P2	17,99	0,10	0,04

P3	17,57	0,12	0,05
----	-------	------	------

f. Total lipid

1. Trigliserida

Perlakuan	Trigliserida	SD	SE
Normal	73,16725979	1,98	0,88
kontrol -	123,99	2,95	1,32
kontrol +	93,67	2,39	1,07
P1	101,35	3,85	1,72
P2	102,78	3,09	1,38
P3	106,33	3,04	1,36

2.HDL

Perlakuan	Trigliserida	SD	SE
Normal	74,31	3,38	1,51
kontrol -	32,36	1,94	0,87
kontrol +	49,92	2,61	1,17
P1	47,48	2,34	1,05
P2	44,23	2,20	0,98
P3	45,85	3,04	1,36

3.LDL

Perlakuan	Trigliserida	SD	SE
-----------	--------------	----	----

Normal	26,67	1,69	0,75
kontrol -	70,77	1,69	0,75
kontrol +	46,30	2,28	1,02
P1	49,52	5,12	2,29
P2	52,45	1,98	0,89
P3	50,40	3,04	1,36

4.Kolesterol

Perlakuan	Trigliserida	SD	SE
Normal	89,47	2,04	0,911
kontrol -	152,93	3,79	1,696
kontrol +	112,51	2,52	1,126
P1	127,07	3,14	1,403
P2	121,98	2,58	1,153
P3	117,59	2,04	0,911

Lampiran 5.

Laporan Realisasi Keuangan Tahap I

No	Komponen	Honor /jam (Rp)	Waktu (jam)	Waktu (hari)	jumlah (orang)	Honor (Rp)
1	Honorarium					5.290.000
	a. Pembantu Peneliti/Perekayasa;	25.000	5	30	1	3.750.000
	b. Koordinator Peneliti/Perekayasa;					0
	c. Sekretariat Peneliti/Perekayasa;					0
	d. Pengolah Data;	1540000	1	1	1	1540000
	e. Petugas survey					0
	f. Pembantu Lapangan/Lab	0	0	0	0	0
	Komponen	Jumlah	satuan		harga satuan	biaya
2	Belanja Barang Non Operasional					28990000
	Bahan laboratorium (pengujian in vivo):					16740000
	Mencit jantan dan betina dewasa	100	ekor		40.000	4.000.000
	pakan mencit	75	kg		25.000	1.875.000
	Tissue	1	bks		22.000	22.000

masker	4	ktk		60.000	240.000
Handschoen	3	ktk		180.000	540.000
underpad	10	lbr		180.000	1.800.000
kapiler hematokrit	3	bh		120.000	360.000
sprit 1 cc terumo	3	bh		100.000	300.000
alkohol swab	3	bks		25.000	75.000
alkohol 70%	3	ltr		55.000	165.000
tabung darah	100	btl		2.000	200.000
kapas	5	bks		10.000	50.000
sekam padi	3	kg		50.000	150.000
obat antihamil tikus	5	ppl		100.000	500.000
safety box	5	ktk		50.000	250.000
NaCl 0,9%	3	ltr		25.000	75.000
perawatan tikus	1	pkt		500.000	500.000
Analisis Proximat	2	paket		1.500.000	3000000
captopril	1	box		50.000	50.000
prednison	1	btl		250.000	250.000
Uji tekanan darah tikus	16	sample		150.000	2.400.000
Alat tulis kantor (ATK) (dirinci)					650000
Kertas A4	4	rim		40.000	160.000
Kertas Label	3	bh		5.000	15000
Spidol	5	bh		5.000	25000

	Kontainer plastik	3	bh		50.000	150000
	Tinta printer	2	pkt		150.000	300000
	materai	4	lbr		10000	40000
	Konsumsi/bahan makanan (dirinci)					360000
	Kedelai lokal	5	kg		40.000	200.000
	kedelai impor	5	kg		12.000	60.000
	kedelai hitam	5	kg		20.000	100.000
	Bahan cetakan (dirinci)					0
	-					
	Dokumentasi (dirinci)					350000
	Photo	1	cd		50.000	50000
	Video	1	pkt		500.000	500.000
	Spanduk (dirinci)					0
	-					
	Biaya fotocopy (dirinci)					740000
	Penggandaan dan jilid proposal penelitian	4	ex		40000	160000

	<i>Penggandaan dan jilid protokol penelitian</i>	4	ex		30000	120000
	<i>Penggandaan dan jilid laporan kemajuan penelitian</i>	2	ex		30000	60000
	<i>Penggandaan dan jilid laporan akhir</i>	8	ex		50000	400000
	Publikasi					10150000
	HAKI	1	jenis		400.000	400000
	Publikasi Jurnal internasional	1	artikel		6.000.000	6.000.000
	Biaya penyusunan buku	30	bh		75.000	2.250.000
	Komponen	Honor /jam(Rp)	Waktu (jam)	Waktu (hari)	jumlah (orang)	Honor (Rp)
3	Belanja Honor Output Kegiatan					0
	a. Honor tidak tetap terkait dengan output					0
	Honor penyuluh non					0

	PNS					
	Honor Tim Pelaksana Kegiatan					0
	b. Honor Output Kegiatan insidentil					0
	Komponen	Jumlah	satuan		harga satuan	biaya
4	Belanja Barang Non Operasional Lainnya					0
						0
						0
						0
	Komponen	Jumlah	satuan		harga satuan	biaya
5	Belanja Sewa					2000000
	Sewa Gedung					0
	Sewa ruangan					0
	Sewa Laboratorium	1	pkt		2.000.000	2000000
	Komponen	Honor /jam(Rp)	Waktu (jam)	Waktu (hari)	jumlah (orang)	Honor (Rp)
6	Belanja Jasa Profesi					0
	Narasumber					0
	Praktisi					0
	Pakar					0

	Komponen	Tujuan	frekuensi		Biaya	Jumlah
7	Belanja Perjalanan					4930000
	a. Belanja perjalanan biasa (dirinci)					0
	b. Belanja perjalanan dalam kota (dirinci)					0
	transport ke lab tikus	12	ppl		75.000	900.000
	c. Belanja perjalanan paket meeting dalam kota (dirinci)					0
	d. Perjalanan paket meeting luar kota (dirinci)					4030000
	Transport pesawat seminar/conference	1	or	1	3.230.000	3.630.000
	Transport darat seminar/conference	2	trip	2	100.000	400000
	e. Perjalanan luar negeri (dirinci)					0
						0
	JUMLAH					40.012.000

Lampiran 6.

Bukti Luaran yang Didapatkan

The screenshot displays the author dashboard for the HAYATI Journal of Biosciences. The page title is "Nutritional Aspects and Amino Acid Profiles of Tempe Flour from Local, Imported and Black Soybean Relating to the Functional Properties" by Badrut Tamam, IGP Sudita Puryana, Ni Ketut Sutiari, and Suratih Suratih. The submission ID is 44185. The dashboard includes a "Submission Library" and "View Metadata" section. Under "Submission Files", there is a file named "badrut_tamam, Full text_Hayati Bioscience_Badrut Tamam.docx" with ID 195563-1, dated November 14, 2022. The "Pre-Review Discussions" section shows a comment from "badrut_tamam" on 2022-11-14 09:09 AM. The browser address bar shows the URL "journal.lipb.ac.id/index.php/hayati/authorDashboard/submission/44185".

Lampiran 7.

Artikel Ilmiah (draft, status submission atau reprint)

NUTRITIONAL ASPECTS AND AMINO ACID PROFILES OF TEMPE FLOUR FROM LOCAL, IMPORTED AND BLACK SOYBEAN RELATING TO THE FUNCTIONAL PROPERTIES

Tamam B.^{1*}, Puryana IGBP.¹, Sutiari NK.², Suratiah³

¹ Nutrition Department, Polytechnic of Health in Denpasar

² Community Health Science Study Program, Medicine Faculty, Udayana University in Bali

³ Nursing Department, Polytechnic of Health in Denpasar

*Corresponding author, tel: 083114154698, email: badruttamam@poltekkes-denpasar.ac.id

Abstract. Soybean (*Glycine max L*) is a type of legumes that is rich in protein, fat, vitamins, minerals and fiber. The nutritional value of soybeans and the amino acid profiles of the processed product of fermented soybean (Tempe) need to be studied. Soybean and Tempe flour from black soybean, local soybean (Anjasmoro variety) and imported soybean (USA soybean) were analyzed proximately including carbohydrates (spectrophotometric method), protein (Kjeldahl method), fat (Soxletation method), fiber (gravimetric method), and water content (gravimetric method). The amino acid profile of Tempe flour was measured by UPLC and LC/MS/MS methods. Local soybeans had the highest protein content (45.19%), followed by black soybeans and imported soybeans (36.87% and 35.95%, respectively). The protein content of local soybean Tempe flour was the highest (45.83%) compared to other soybean Tempe flour. The fiber content of local and black soybean Tempe flour (14.79% and 13.81%, respectively) was higher than that of imported Tempe. Amino acid profiles test of black soybean Tempe flour, local soybean and imported soybean showed that the amino acids L-Glutamic Acid, L-Arginine, L-Leucine and L-Aspartic Acid had the highest amounts compared to other amino acids, ranging from 30-75 thousand ppm. This shows that various soybeans affect the amino acid composition of the soybean protein. The amino acid content of Tempe from local soybeans is higher than the amino acid content of tempe from black and imported soybeans. This may influence the functional properties of the amino acids or peptides generated, such as antihypertensive and antimicrobial properties. Continuous research in *in vitro* and *in vivo* should be conducted to explore the functional properties of Tempe flour from local soybean.

Keywords: Amino acid, Nutrition, Soybean, Tempe

1. Introduction

Soybean (*Glycine max L*) is a type of legumes that is rich in protein, fat, vitamins, minerals and fiber. Soybean is widely consumed by world's population. This can be processed into various processed foods, including soy milk, tofu, Tempe, soy cheese, soy yogurt, miso and others (Capriotti et al 2015).

Soybean fermentation into Tempe has an essential role in producing bioactive compounds. Types of molds reported to be present in Tempe production,

according to *Rhizopus oligosporus*, *R. oryzae*, *R. arrhizus*, *R. stolonifer*, *R. microsporus*, *R. rhizopodiformis*, *R. chinensis* and sometimes *Mucor sp.* (Astuti et al 2000; Nout & Kiers 2005). In addition to molds, other microorganisms such as lactic acid bacteria and yeasts are also involved in the process of fermenting soybeans into tempeh (Nurdini et al 2015). During the soybean fermentation, physical and biochemical changes occur in Tempe. Some of the biochemical changes that occur are the increase in several nutritional and bioactive compounds, namely soluble protein, folate, vitamin B12, tocopherol (vitamin E), free isoflavones, superoxide dismutase (SOD) and bioactive peptides. In addition, there was a decrease in anti-nutritional substances including phytic acid, oligosaccharides, trypsin inhibitors and tannins (Egounlety et al 2003; Mo et al 2013).

There are different genotypes of soybean varieties. Genotype differences between soybean varieties affect the amino acid composition of the soybean protein (Herman, 2014). Organic and non-organic soybeans or often called local and imported soybeans are often the subject of attention. Imported soybeans generally have larger, more similar and whitish seeds. Meanwhile, local soybeans are native Indonesian soybeans which are smaller in size and there is no genetic modification process

The aims of this study were 1) to investigate nutritional contents of soybean and Tempe flour (containing carbohydrate, protein, fat, ash, fiber and moisture content) and 2) to evaluate amino acid profiles of Tempe flour. Soybean and Tempe flour used were derived from local, import and black soybean.

Materials and Method

Materials

There were three soybean varieties (local, imported and black soybean) used in this research. The local soybean variety was Anjasmoro and the black soybean variety was Malika. Meanwhile, the imported soybean was from USA (Bola brand). All chemical used in this research were analytical reagents.

Methods

Procedures of Tempe production from three different Soybean are similar (Fig 1), including cleaning, boiling, soaking, dehulling, blanching, inoculating, incubating and harvesting. In addition, Tempe flour was made from slicing of Tempe, oven drying 70°C, crushing, and sieving.

Proximate analysis included carbohydrate (spectrofotometry method), protein (Kjeldahl method), fat (Soxletation method), ash (gravimetry method), moisture (gravimetry method) and fiber (gravimetry method). All amino acid profiles were measured using UPLC (18-5-17/MU/SMM-SIG), except for L-Sistein and L-Metionin using LC/MS/MS (18-12-38/MU/SMM-SIG).

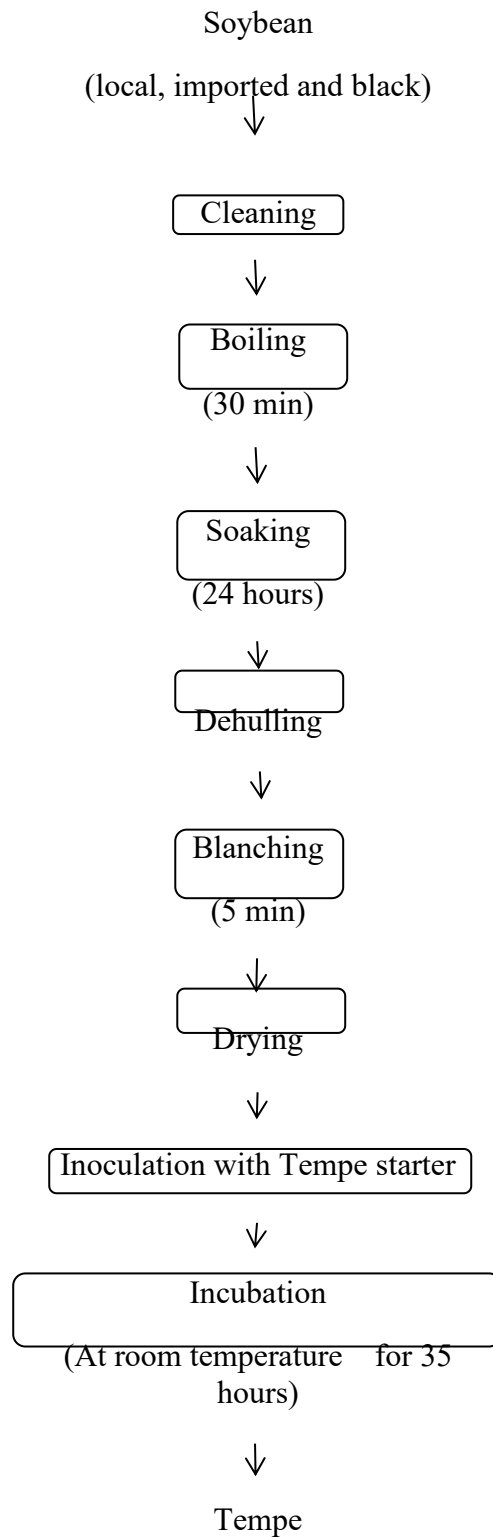


Fig 1. Procedure of Tempe production

Results and Discussion

Table 1 shows that among the three types of soybeans (black soybeans, local soybeans and imported soybeans), local soybeans have the highest protein content with an average of 45.19%. Meanwhile, black soybeans and imported soybeans have protein content of 36.87% and 35.95%, respectively. The content of carbohydrates, fat, ash and moisture content of the three types of soybeans are similar. The fiber content of imported soybeans is higher than other soybeans, which is 19.48%.

Table 1. Proximate analysis of different varieties of soybean

No	nutrition content	unit	black soybean	local soybean	imported soybean
1	Carbohydrate	%	31,99 ^a	29,75 ^a	30,50 ^a
2	Protein	%	36,87 ^a	45,19 ^b	35,95 ^a
3	Fat	%	29,99 ^a	31,41 ^a	31,79 ^a
4	Ash	%	4,67 ^a	4,60 ^a	5,56 ^a
5	Moisture	%	12,6 ^a	12,29 ^a	11,71 ^a
6	Fiber	%	15,4 ^a	15,18 ^a	19,48 ^b

Note: The same superscript letters identify no difference among the groups.

Table 2 shows that the protein content of Tempe flour from local soybean is still higher (45.83%) than other soybean Tempe flour, although statistically not significantly different from black soybean Tempe flour and imported soybean Tempe (43.81% and 43.65%, respectively). The fiber content of Tempe flour from local and black soybean (14.79% and 13.81%, respectively) was higher than of imported Tempe. Meanwhile, the content of other nutrients such as carbohydrates, fat, ash, and moisture is relatively the same among Tempe flour from black soybean, local and imported soybeans.

Table 2. Proximate analysis of Tempe flour from different soybean varieties

No	nutrition content	unit	Tempe flour from black soybean	Tempe flour from local soybean	Tempe flour from imported soybean
1	Carbohydrate	%	28,97 ^a	27,07 ^a	33,22 ^a
2	Protein	%	43,81 ^a	45,83 ^a	43,65 ^a

3	Fat	%	17,35 ^a	17,84 ^a	21,75 ^a
4	Ash	%	3,67 ^a	2,63 ^a	1,81 ^a
5	Moisture	%	9,52 ^a	11,47 ^a	12,56 ^a
6	Fiber	%	13,81 ^b	14,79 ^b	11,81 ^a

Note: The same superscript letters identify no difference among the groups.

There are many local soybean varieties in Indonesia (approximately 70 varieties) cultivated in Indonesia. The advantages of Anjasmoro soybeans include having large seeds with a weight per 100 seeds of 14.8-15.3 grams, so that it has potential raw material for processed soybean products such as Tempe (Laksono et al 2019). On the other hand, local soybean as a raw material for Tempe is not uniform in shape of seeds, and the epidermis is difficult to peel off when washing and takes longer when steamed. The Anjasmoro soybean variety also has condition like other local soybeans. Differences in nutritional concentrations of soybean possibly are due to genotypic variations and (or) environmental conditions under which the soybeans were grown.

Tempe is an indigenous Indonesian fermented soybean product rich in nutritive components. During fermentation microorganisms generates several vital bioactive components and decrease anti-nutrition agents. Biochemical changes are also present during soybean fermentation to Tempe, which are beneficial for human health, such as increase in soluble protein, folate, vitamin B12, tocopherols, free isoflavones and superoxide dismutase (SOD), and decrease in lipid, phytic acid, oligosaccharides, trypsin inhibitor and tannins (Nout & Kiers, 2015; Egounlety & Aworh, 2003).

Protein, fat and carbohydrate content of Tempe is not much different from that of soybeans. However, the digestive enzymes produced by the Tempe mold make the protein, fat and carbohydrates in Tempe easier to digest in the body compared to the protein found in soybeans. Therefore, soybean Tempe is an excellent source of nutrition for all ages (Astawan, 2013).

Table 3 shows the amino acid profiles of black soybean, local soybean and imported soybean Tempe. Amino acids of L-Glutamic acid, L-Arginine, L-Leucine and L-Aspartic acid dominate the presence of amino acids in the three types of soybeans, accounting from 30-75 thousand ppm. The amino acids of L-methionine and L-cystine had the lowest content compared to other types of amino acids in the other three Tempe flour, ranging from 3-13 thousand mg/kg.

Table 3. Amino acid profiles of Tempe flour from different soybean varieties

No	Asam amino	unit	Soybean varieties		
			black	local	imported
1	L-Serin	ppm	31330,39	34021,52	28173,53

2	L-Asam glutamat	ppm	69759,03	74381,73	55663,18
3	L-Fenilalanin	ppm	37242,72	47247,64	38950,56
4	L-Isoleusin	ppm	24882,43	25956,14	21703,30
5	L-Valin	ppm	25632,55	25766,88	22263,35
6	L-Alanin	ppm	21024,74	21122,12	18772,64
7	L-Arginin	ppm	43447,36	49031,13	42987,41
8	Glisin	ppm	25511,41	27335,88	22831,92
9	L-Lisin	ppm	23776,38	20950,04	17282,30
10	L-Asam Aspartat	ppm	38891,68	40936,84	32341,96
11	L-Leusin	ppm	40569,68	42015,19	35199,32
12	L-Tirosin	ppm	20674,71	24407,66	22374,27
13	L-Prolin	ppm	24343,58	25737,15	20274,55
14	L-Threonin	ppm	25199,16	26894,44	22521,86
15	L-Histidin	ppm	17309,83	19339,05	17901,65
16	L-Sistin	ppm	13592,06	12745,41	7381,29
17	L-Metionin	ppm	3296,90	3191,47	2963,44

The amino acid content of Tempe from local soybeans (T2) is higher than the amino acid content of tempe from black and imported soybeans, namely the amino acids L-Serine, L-Glutamic Acid, L-Phenylalanine, L-Isoleucine, L-Valine, L-Alanine, L-Arginine, Glycine, L-Aspartic Acid, L-Leucine, L-Tyrosine, L-Proline, L-Threonine, and L-Histidine. The Tempe from black soybeans (T1) contains the amino acids L-Lysine, L-Cystine and L-Methionine which is higher than others.

The presence of amino acids with aromatic and aliphatic groups, such as Pro (P), Phe (F) or Tyr (Y) at the C-terminal atom and Val (V) and Ile (I) at the N-terminal atomic position is thought to be associated with ACE (Angiotensin 1-Converting Enzyme) inhibitor or anti-hypertensive (Wijesekara et al, 2011). In addition, amino acids that have hydrophobic characters such as Try (Y), Phe (F), Trp (W), Ala (A), Ile (I), Val (V), and Met (M) as well as positively charged amino acids such as Arg(R) and Lys(K) show good affinity with ACE (Sanjukta & Rai, 2016). The role of bioactive peptides as antioxidants is thought to be due

to the presence of the amino acids Tyr (Y), Trp (W), Met (M), Lys (K) and Cys (C) which have the ability to reduce Fe³⁺ ions to Fe²⁺ and bind (chelate) Fe²⁺ and Fe²⁺ ions. Cu²⁺ (Carrasco-Castilla et al 2012). Meanwhile, aromatic amino acids that have phenol, indole and imidazole groups such as Trp, Tyr, Phe, His can act as electron donors and efficiently capture radical compounds (Duan et al 2014).

The antimicrobial role of bioactive peptides is thought to be due to the hydrophobicity of these peptides. Peptides that have high hydrophobicity contain amino acid sequences that are rich in Gly (G) and Leu (L). Meanwhile, the presence of amino acid residues Arg (R) which has a cation group is reported to play an important role as an antimicrobial because it can interact with bacterial cell walls (Amadou et al 2013). Nonetheless, The mechanism of action of antimicrobial peptides is not clear considering the large number of antimicrobials that have been discovered (Dashper et al 2007). Tempe contains bioactive peptides (protein fragments composed by amino acids) that acts as antihypertensive, anti-oxydant, anti microbial and anti-cancer properties (Tamam et al 2020).

CONCLUSION

The Differences of nutrition contents in soybean are possibly due to genotypic variations and environmental conditions, in turns this influences nutritional concentrations and amino acid profiles the soybean product, such as Tempe. Local soybeans have the highest protein content, whereas fiber content of imported soybeans is higher than other soybeans. In addition, Tempe from local soybeans has the highest content of protein and fiber compounds. Amino acids of L-Glutamic acid, L-Arginine, L-Leucine and L-Aspartic Acid were found to be more abundant than other amino acids in the three types of soybeans. Tempe from local soybeans contains the most amino acids, namely L-Serine, L-Glutamic Acid, L-Phenylalanine, L-Isoleucine, L-Valine, L-Alanine, L-Arginine, Glycine, L-Aspartic Acid, L-Leucine, L-Tyrosine, L-Proline, L-Threonine, and L-Histidine. Tempe from black soybeans has the highest content of several amino acids, namely L-Lysine, L-Cystine and L-Methionine. Tempe from imported soybean (T3) has the lowest amino acid content. The presence of amino acids influences the bioactivities of peptides, such as antihypertensive and antimicrobial properties.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Ministry of Health of the Republic of Indonesia, Polytechnic of Health Denpasar through Basic Nominated Research Scheme in 2021 (Grant no. DP.02.01/P.02/PPK/4361/2021).

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to declare.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors conducted the experiment, wrote and revised the manuscript. All authors also agreed to the final version of this manuscript.

REFERENCES

- Capriotti, A.L., Caruso, G., Cavaliere, C., Saperi, R., Ventura, S., Chiozzi, R.Z., Lagana, A., 2015. Identification of potential bioactive peptidas generated by simulated gastrointestinal digestion of soybean seeds and soy milk proteins. *J Food Compost Anal.* 44, 205–13.
- Astuti, M., Meliala, A., Dalasis, F.S., Wahlqvist, M.L., 2000. Tempe, a nutrition and healthy food from Indonesia: Review Article. *Asia Pac J Clin Nutr.* 322–25.
- Nout, M.J.R., Kiers, J.L., 2005. Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millennium. *J. Appl. Microbiol.* 98(4), 789–805.
- Nurdini, A.L., Nuraida, L., Suwanto, A., Suliantari, 2015. Microbial growth dynamics during tempe fermentation in two different home industries. *Int. Food Res. J.* 22(4), 1668-74.
- Egounlety, M., Aworh, O.C., 2003. Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms). *J. Food Eng.* 56(2–3), 249–54.
- Moa, H., Kariluoto, S., Piironen, V., Zhu, Y., Sanders. M., Vincken, J.P., Rooijackers, J.W., Nout, M.J.R., 2013. Effect of soybean processing on content and bioaccessibility of folate, vitamin B12 and isoflavones in tofu and tempe. *Food Chem.* 141(3), 2418–25.
- Herman, E.M., 2014. Soybean seed proteome rebalancing. *Front. Plant Sci.* 5(437), 1–8
- Laksono, A.S., Marniza, Rosalina, Y., 2019. Karakteristik Mutu Tempe Kedelai Lokal Varietas Anjasmoro Dengan Variasi Lama Perebusan Dan Penggunaan Jenis Pengemas. *J Agr* 9 (1), 8-18.
- Astawan, M., Wresdiyati, T., Widowati, S., Bintari, S. H., Ichsani, N., 2013. Physico-chemical Characteristics and Functional Properties of Tempe Made from Different Soybeans Varieties. *J. Pangan.* 22(3), 241–252.
- Wijesekara, I., Qian, Z., Ryu, B., Ngo, D., Kim, S., 2011. Purification and identification of antihypertensive peptidas from seaweed pipefish (*Syngnathus schlegeli*) muscle protein hydrolysate. *Food Res. Int.* 44 (3), 703–07.
- Sanjukta, S., Rai, A.K., 2016. Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits. *Trends Food Sci. Technol.* 50, 1–10.

- Carrasco-Castilla, J., Hernández-Álvarez, A.J., Jiménez-Martínez, C., Jacinto-Hernández, C., Alaiz, M., Girón-Calle, J., 2012. Antioxidant and metal chelating activities of *Phaseolus vulgaris* L var. Jamapa protein isolates, phaseolin and lectin hydrolysates. *Food Chem.* 131, 1157-64.
- Duan, X., Ocen, D., Wu, F., Li, M., Yang, N., Xu, J., 2014. Purification and characterization of a natural antioxidant peptide from fertilized eggs. *Food Res Int.* 56, 18-24.
- Amadou, I., Le, G.W., Amza, T., Sun, J., Shi, Y.H., 2013. Purification and characterization of foxtail millet-derived peptides with antioxidant and antimicrobial activities. *Food Res Int.* 51, 422-28.
- Dashper, S.G., Liu, S.W., Reynolds, E.C., 2007. Antimicrobial peptides and their potential as oral therapeutic agents. *Int. J Pep Res Ther.* 13(4), 505-16.
- Tamam, B., Syah, D., Suhartono, M.T., Kusuma, W.T., Tachibana, S., Lioe, H.S., 2020. Proteomic Study of Bioactive Peptides from Tempe. *J. Biosci. Bioeng.* 128(2), 241-48.