



**PENGARUH PENAMBAHAN TEPUNG DAUN KELOR
(*Moringa oleifera*) PADA FERMENTASI TEMPE TERHADAP
KADAR FLAVONOID DAN ANTIOKSIDAN**

Skripsi

Disusun sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
Program Studi Biologi

oleh:

Dwike Puji Lestari

4411419029

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
SEMARANG, 2023**

PERSETUJUAN PEMBIMBING

PERSETUJUAN PEMBIMBING

Skripsi berjudul “Pengaruh Penambahan Tepung Daun Kelor (*Moringa oleifera*) pada Fermentasi Tempe terhadap Kadar Flavonoid dan Antioksidan” yang disusun oleh

Nama : Dwiki Puji Lestari
NIM : 4411419029
Prodi : Biologi

telah disetujui untuk diajukan ke sidang ujian skripsi.

Semarang, 7 Agustus 2023

Pembimbing



Prof. Dr. Siti Hamina Bintari, M.S.
NIP. 196008141987102001

PENGESAHAN

PENGESAHAN

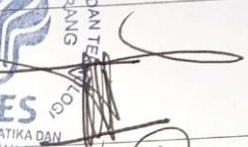


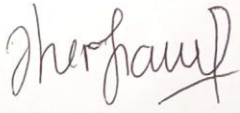
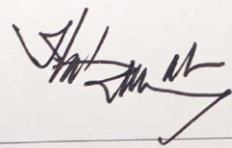
Skripsi berjudul "Pengaruh Penambahan Tepung Daun Kelor (*Moringa oleifera*) pada Fermentasi Tempe terhadap Kadar Flavonoid dan Antioksidan" yang disusun oleh

Nama : Dwiki Puji Lestari

NIM : 4411419029

Prodi : Biologi

telah dipertahankan dalam ujian Skripsi S1 pada hari Kamis, tanggal 10/08, tahun 2023.

Tim Penguji	
Ketua Penguji Prof. Dr. Edy Cahyono, M. Si. NIP. 196412051990021001	
Sekretaris Dr. Dewi Mustikaningtyas, S. Si., M. Si. Med. NIP. 198003112005012003	
Penguji 1 Prof. Dr. Wiwi Isnaeni, M.S. NIP. 195808021985032001	
Penguji 2 Dr. Dra. Lina Herlina, M. Si. NIP. 196702071992032001	
Penguji 3/Pembimbing Prof. Dr. Siti Harnina Bintari, M.S. NIP. 196008141987102001	

PERNYATAAN

PERNYATAAN

Skripsi berjudul “Pengaruh Penambahan Tepung Daun Kelor (*Moringa oleifera*) pada Fermentasi Tempe terhadap Kadar Flavonoid dan Antioksidan” merupakan karya ilmiah asli dan bukan hasil plagiasi dari karya ilmiah orang lain. Pendapat atau temuan orang lain yang dikutip di dalam skripsi ini telah ditulis berdasarkan kode etik ilmiah.

Semarang, 7 Agustus 2023

Yang Menyatakan



Dwike Puji Lestari

NIM. 4411419029

MOTTO DAN PERSEMBAHAN

MOTTO

“Bukankah Kami telah melapangkan dadamu (Muhammad)? Dan Kami pun telah menurunkan bebanmu darimu, yang memberatkan punggungmu, dan Kami tinggikan sebutan (nama)mu bagimu. Maka sesungguhnya beserta kesulitan ada kemudahan, sesungguhnya beserta kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain), dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap” (Q.S. Al-Insyirah: 1-8)

“You have to choose to live”

- Matt Haig, “How to Stop Time”

“Tidak ada sehelai daun pun yang gugur yang tidak diketahuinya (Q.S. Al-An’am: 59)

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan kepada kedua orangtua tercinta, keluarga, serta semua pihak yang senantiasa memberikan kasih sayang tak terbatas, doa, serta dukungan kepada penulis. Terimakasih atas segala motivasi yang telah diberikan sehingga penulis terus memiliki keyakinan untuk tidak mudah menyerah ketika menemukan kesukaran.

ABSTRAK

Lestari, Dwike Puji. 2023. Pengaruh Penambahan Tepung Daun Kelor (*Moringa oleifera*) pada Fermentasi Tempe terhadap Kadar Flavonoid dan Antioksidan. Skripsi, Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Semarang. Pembimbing. Prof. Dr. Siti Harnina Bintari, M.S.

Kata kunci: tempe, tepung daun kelor, fermentasi tempe, kadar flavonoid, kadar antioksidan

Salah satu makanan olahan fermentasi yang sarat mengandung flavonoid dan antioksidan adalah tempe. Tepung daun kelor ditambahkan sebagai fortifikan pada tempe untuk meningkatkan kadar flavonoid dan antioksidan. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh pemberian tepung daun kelor pada tempe terhadap kadar flavonoid dan angka antioksidan. Metode pada penelitian ini adalah penelitian eksperimen Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 2 faktor, yaitu penambahan tepung daun kelor konsentrasi 0%; 0,5%; 1%; dan 1,5% dengan waktu fermentasi 0 Jam, 24 Jam, 36 jam, dan 48 Jam. Uji flavonoid dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Uji secara kualitatif menggunakan pereaksi NaOH 10%, Wilstater, dan Bate Smite-Metcalf kemudian diamati perubahan warna. Uji secara kuantitatif kadar flavonoid dilakukan dengan penambahan senyawa $AlCl_3$ kemudian diukur absorbansi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 425 nm. Uji antioksidan menggunakan metode penambahan DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*) kemudian diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis panjang gelombang 517nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa berdasarkan uji flavonoid secara kualitatif, sampel positif senyawa flavonoid ditandai adanya perubahan warna. Penambahan tepung daun kelor pada tempe dalam penelitian ini berpengaruh terhadap kadar flavonoid dan antioksidan tempe. Kadar flavonoid tertinggi diperoleh pada perlakuan penambahan tepung daun kelor 1% pada fermentasi jam ke-36 sebesar 12.238 mg/L. Berdasarkan uji antioksidan, diperoleh kadar tertinggi pada perlakuan penambahan tepung daun kelor 1,5% pada fermentasi jam ke-24 sebesar 72,06 %.

ABSTRACT

Lestari, Dwiki Puji. 2023. The Effect of Addition Moringa Leaf Powder (*Moringa oleifera*) to Tempeh Fermentation on Flavonoids and Antioxidant Levels. Thesis, Department of Biology. Faculty of Mathematics and Natural Science. Semarang State University. Supervisor: Prof. Dr. Siti Harnina Bintari, M.S.

Keywords: tempeh, moringa leaf powder, tempe fermentation, flavonoid content, antioxidant content

One of the processed fermented foods that is good in flavonoids and antioxidants is tempeh. Moringa leaf flour is added as a fortifier to tempeh to increase flavonoid and antioxidant content. The aim of this research was to determine the effect of giving Moringa leaf flour to tempeh on flavonoid and antioxidant content. The method in this research is a Completely Randomized Design (CRD) experimental research with 2 factors, namely the addition of 0% concentration of Moringa leaf flour; 0.5%; 1%; and 1.5% with fermentation times of 0 hours, 24 hours, 36 hours and 48 hours. Flavonoid tests were carried out qualitatively and quantitatively. Qualitative test using 10% NaOH, Wilstater, and Bate Smite-Metcalf reagents then observed the color change. Quantitative testing of flavonoid levels was carried out by adding the $AlCl_3$ compound and then measuring its absorption using a UV-Vis Spectrophotometer at a wavelength of 425 nm. The antioxidant test used the DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) addition method and then the absorption was measured using a UV-Vis Spectrophotometer with a wavelength of 517nm. The results of the research showed that based on qualitative flavonoid tests, positive flavonoid compound samples were marked by a color change. The addition of Moringa leaf flour to tempeh in this study had an effect on tempeh's flavonoid and antioxidant levels. The highest flavonoid levels were obtained in the treatment with the addition of 1% Moringa leaf flour in the 36th jam fermentation, amounting to 12,238 mg/L. Based on the antioxidant test, the highest level was obtained in the treatment with the addition of 1.5% Moringa leaf flour in the 24th jam fermentation, amounting to 72.06%.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah senantiasa melimpahkan rahmat-Nya sehingga penulis diberikan kemudahan dan kelancaran dalam menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Penambahan Tepung Daun Kelor (*Moringa oleifera*) pada Fermentasi Tempe terhadap Total Flavonoid dan Angka Antioksidan”, sebagai salah satu syarat menyelesaikan Program Sarjana (S1) Jurusan Biologi di Universitas Negeri Semarang. Sholawat serta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW semoga kelak kita semua diberikan syafaatnya di yaumul akhir nanti.

Dalam penyusunan skripsi ini, tidak terlepas dari semua dukungan, doa, bimbingan, serta dorongan dari berbagai pihak sehingga penulis dapat mengerjakan hingga menamatkan skripsi ini dengan baik. Untuk itu dengan segala hormat penulis ucapkan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Siti Harnina Bintari, M.S., selaku dosen pembimbing, yang telah memberikan ilmu, arahan, dan bimbingan serta dorongan sehingga penyusunan skripsi ini dapat penulis selesaikan dengan baik
2. Prof. Dr. Wiwi Isnaeni, M.S., selaku dosen penguji 1 yang telah memberikan ilmu dan arahan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik
3. Dr. Dra. Lina Herlina, M.Si., selaku dosen penguji 2 yang telah memberikan ilmu dan arahan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik
4. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang yang telah melimpahkan ilmu, wawasan, bimbingan, semangat serta motivasi selama penulis menempuh pendidikan di Universitas Negeri Semarang ini
5. Teknisi Laboratorium Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan bimbingan serta arahan kepada penulis
6. Bapak dan Ibu selaku orangtua tercinta yang senantiasa memberikan kasih sayang tak terbatas, doa-doa terbaik, dukungan, serta arahan dan dorongan dengan tanpa lelah dan tanpa pamrih
7. Segenap keluarga yang telah memberikan dukungan serta doa terbaik

8. Kepada Mbak Fitri, Mbak Berlina, dan kakak tingkat jurusan biologi yang telah memberikan ilmu, arahan, bantuan, dan dukungan
9. Laila Uyun dan Kholifatur Rosyidah sebagai sahabat sekaligus teman seperbimbingan terimakasih atas waktu, loyalitas, serta semangat dan dukungan yang telah diberikan
10. Teman-teman seperjuangan di Lab selama mengerjakan penelitian di Laboratorium Riset Jurusan Biologi Universitas Negeri Semarang
11. Teman-teman seperjuangan Rombel Biologi B 2019 terimakasih telah menjadi teman-teman terbaik dan telah mengukir kenangan baik selama menempuh pendidikan di Universitas Negeri Semarang ini
12. Terimakasih penulis juga sampaikan kepada berbagai pihak yang telah membantu selama menempuh pendidikan dan menyelesaikan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu per-satu.

Semoga segala kebaikan serta kemurahan hati yang telah diberikan memperoleh balasan terbaik dari Allah SWT. Penulis menyadari bahwa pada penuliasn skripsi ini tidak terlepas dari segala kekurangan, oleh karena itu apabila terdapat kritik, saran, serta masukan akan secara terbuka penulis terima sehingga dapat menjadi pembelajaran kepada penulis untuk masa mendatang.

Akhir kata, penulis berharap agar skripsi yang telah penulis susun dapat memberikan manfaat serta menambah gagasan kepada pembaca.

Semarang, 7 Agustus 2023

Dwike Puji Lestari

NIM. 4411419029

DAFTAR ISI

	Halaman
PERSETUJUAN PEMBIMBING	ii
PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN.....	iv
MOTTO DAN PERSEMBAHAN.....	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
PRAKATA.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Batasan Penelitian	4
1.5. Manfaat Penelitian	5
1.5.1 Manfaat Teoritis	5
1.5.2 Manfaat Praktis	5
1.6. Keaslian Penelitian.....	6
BAB II KAJIAN PUSTAKA.....	8
2.1. Tinjauan Pustaka	8
2.2. Landasan Teori.....	9
2.2.1. Tempe	9
2.2.2. <i>Moringa oleifera</i>	11
2.2.3. Flavonoid	13
2.2.4. Radikal Bebas dan Antioksidan	15
2.2.5. Prinsip Pemeriksaan Flavonoid dan Antioksidan	19
2.3. Kerangka Berpikir.....	23
2.4. Hipotesis	24
BAB III METODE PENELITIAN	25
3.1. Pendekatan dan Desain Penelitian	25
3.1.1. Jenis Penelitian.....	25

3.1.2.	Desain Penelitian.....	25
3.2.	Lokasi Penelitian.....	25
3.3.	Sampel dan Populasi.....	26
3.4.	Variabel Penelitian.....	26
3.4.1.	Variabel Independen (bebas)	26
3.4.2.	Variabel Dependen (terikat).....	26
3.4.3.	Variabel Kendali	26
3.5.	Bahan dan Alat Penelitian.....	27
3.5.1.	Alat.....	27
3.5.2.	Bahan	28
3.6.	Prosedur Penelitian	28
3.6.1.	Pembuatan Tempe yang diberi Tepung Daun Kelor.....	29
3.6.2.	Pembuatan Ekstrak Tempe.....	31
3.6.3.	Uji Flavonoid secara Kualitatif dan Kuantitatif	31
3.6.4.	Uji Kadar Antioksidan	33
3.7.	Teknik dan Instrumen Pengukuran Data.....	34
3.8.	Teknik Analisis dan Penafsiran Data	34
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....		35
4.1	Flavonoid	35
4.1.1.	Uji Flavonoid secara Kualitatif	35
4.1.2.	Uji Flavonoid secara Kuantitatif	40
4.2.	Antioksidan	42
BAB V PENUTUP.....		45
5.1	Simpulan	45
5.2	Saran	45
DAFTAR PUSTAKA.....		46
LAMPIRAN.....		Error! Bookmark not defined.

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Tempe tanpa tepung daun kelor dan tempe tepung daun kelor.....	9
2.2 Daun <i>Moringa oleifera</i>	12
2.3 Tepung/serbuk daun kelor.....	13
2.4 Struktur Umum Flavonoid	14
2.5 Struktur Flavonoid golongan Isoflavon	14
2.6 Reaksi pembentukan genistein aglikon oleh β - glukosidase	19
2.7 Reaksi senyawa flavonoid dengan pereaksi NaOH10%.....	20
2.8 Reaksi senyawa flavonoid dengan pereaksi Bate Smite-Metchalf.....	20
2.9 Reaksi senyawa flavonoid dengan pereaksi Wilstater.....	21
2.10 Reaksi senyawa pembentukan kompleks Kuersetin-AlCl ₃	21
2.11 Reaksi DPPH dengan antioksidan.....	22
3.1 Alur Penelitian	29
3.2 Skema produksi tempe	30
4.1 Kurva Baku Kuersetin	43
4.2 Kadar flavonoid tempe variasi konsentrasi tepung daun kelor dan lama waktu fermentasi.....	44
4.3 Kadar flavonoid tempe variasi konsentrasi tepung daun kelor dan lama waktu fermentasi	47

DAFTAR TABEL

	Halaman
1.1 Penelitian terdahulu	6
3.1 Rancangan percobaan pada penelitian	25
3.2 Alat-alat penelitian	27
3.3 Bahan-bahan penelitian	28
3.4 Teknik dan instrument pengukuran data	35
4.1 Hasil pemeriksaan sampel tempe dan flavonoid secara kualitatif.....	37

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. SK Pembimbing.....	59
2. SK Penguji.....	60
3. Hasil Perhitungan dan Analisis Kadar Flavonoid.....	61
4. Hasil Perhitungan dan Analisis Kadar Flavonoid.....	67
5. Dokumentasi Penelitian.....	71

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Radikal bebas merupakan atom atau molekul dengan satu atau lebih elektron bebas yang tidak stabil dan sangat reaktif (Soeksamto *et al.*, 2007). Radikal bebas cenderung akan menarik elektron molekul lain untuk mencapai stabilitas. Ketika terpapar ke sel-sel tubuh, radikal bebas dapat menimbulkan kerusakan biomolekul dengan merusak integritas lipid, protein, dan DNA, menyebabkan stress oksidatif dan memicu munculnya berbagai penyakit degeneratif hingga kanker (Arnanda & Nuwarda, 2019). Kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas dapat dipulihkan tubuh, namun kerusakan parah seperti putusnya rantai DNA hingga mengenai gen tertentu sulit diperbaiki dan dapat merubah sistem pembelahan sel yang dapat memicu berbagai penyakit terutama kanker (Khaira, 2010). Salah satu penyakit yang disebabkan paparan radikal bebas, misalnya kanker, adalah penyakit yang sangat berbahaya dan merupakan penyebab utama kasus kematian di dunia yang mencapai hampir 10 juta kasus kematian pada tahun 2020 (World Health Organization, 2022).

Upaya untuk mencegah atau mengurangi risiko munculnya penyakit yang disebabkan paparan radikal bebas adalah melalui konsumsi makanan tinggi antioksidan. Antioksidan bertindak sebagai pendonor elektron sehingga elektron tidak berpasangan pada molekul radikal bebas menjadi berpasangan, stabil, dan dapat menghentikan kerusakan pada sel tubuh (Arnanda & Nuwarda, 2019). Terdapat banyak sumber antioksidan alami, salah satunya berasal dari tumbuhan, seperti sayuran atau buah-buahan, serta dapat berasal dari makanan olahan. Pada tumbuhan, sifat antioksidan alami diketahui berasal dari senyawa fitokimia fenolik dan flavonoid yang tersebar di seluruh bagian tumbuhan (Tungmunnithum *et al.*, 2018). Pada makanan olahan, senyawa antioksidan seperti dalam bentuk flavonoid diperoleh dari bahan dasar makanan tersebut yang mengandung flavonoid, atau dari proses olahan yang dapat memicu meningkatkan senyawa tersebut.

Kedelai mengandung senyawa flavonoid. Material utama pembuatan tempe ialah kedelai, namun, senyawa flavonoid pada tempe jauh lebih tinggi dibandingkan pada kedelai. Dari penelitian Dhurhania & Istantini (2021), diketahui bahwa kedelai

tanpa fermentasi memiliki total flavonoid 4,07 mgQE/100g, sedangkan tempe kedelai memiliki total flavonoid sebesar 183,48 mgQE/100g. Berdasarkan penelitian oleh Kurniadi *et al.* (2017), aktivitas metabolisme kapang dan bakteri yang terlibat selama proses fermentasi dapat menyebabkan peningkatan kandungan nutrisi pada tempe. Fermentasi kapang pada tempe membantu mengaktifkan komponen flavonoid golongan isoflavon kedelai dari bentuk glikon (daidzin dan genistin) menjadi aglikon (genistein dan daidzein) yang lebih mudah diserap oleh tubuh (Astawan 2013). Fermentasi juga meningkatkan flavonoid dalam bentuk genistein dan daidzein tersebut dibandingkan pada kedelai tanpa fermentasi (Riciputi *et al.*, 2016).

Menurut Yoon & Park (2014), flavonoid, salah satunya dari kelompok isoflavon, bermanfaat bagi kesehatan manusia oleh potensi antioksidan yang dimilikinya. Flavonoid dapat ditemukan pada tumbuhan, juga pada makanan olahan. Salah satu makanan olahan yang tinggi senyawa flavonoid adalah tempe. Tempe merupakan makanan olahan dari kedelai yang difermentasi menggunakan kapang *Rhizopus sp.* (Redi Aryanta, 2020). Fermentasi memicu kerusakan struktural dinding sel tumbuhan yang mengarah pada sintesis dan pembebasan berbagai senyawa bioaktif (Zhao *et al.*, 2021). Terdapat zat-zat bioaktif yaitu flavonoid golongan Isoflavon aglikon, peptida, asam amino bebas, dan asam gamma amino butirir dengan jumlah lebih besar dibandingkan pada kedelai yang tidak difermentasi (Aoki *et al.*, 2020; Kameda *et al.*, 2018). Dibandingkan dengan beberapa makanan kedelai fermentasi lainnya, secara signifikan tempe memiliki kadar flavonoid yang lebih tinggi (Haron *et al.*, 2016).

Flavonoid adalah senyawa fenolik yang memiliki sifat antioksidan (Zuraida *et al.*, 2017). Peningkatan flavonoid akan berbanding lurus dengan peningkatan aktivitas antioksidan (Astawan *et al.*, 2013). Pada penelitian Barus *et al.* (2019), kedelai tidak difermentasi memiliki angka antioksidan 43,04%, mengalami penurunan menjadi 42,78% dan 21,53% ketika perebusan dan perendaman, namun angka antioksidan meningkat setelah mengalami proses fermentasi menjadi tempe, yaitu 67,61%. Flavonoid golongan isoflavon pada tempe dapat menjadi antioksidan pelindung, yang mengurangi pembentukan radikal dan ROS (*reactive oxygen species*) (Yoon & Park, 2014).

Upaya dalam meningkatkan kandungan flavonoid dan antioksidan dapat dilakukan dengan menggabungkan dua bahan pangan tinggi flavonoid dan antioksidan. Oleh karena itu, pencegahan terjadinya akibat buruk dari paparan radikal bebas pada tubuh akan jauh lebih optimal. Penggabungan bahan pangan tinggi flavonoid dapat dilakukan dengan metode fortifikasi bahan pangan. Fortifikasi bahan pangan yaitu pemberian bahan-bahan tertentu pada produk pangan dengan tujuan untuk memaksimalkan kandungan zat gizi tertentu yang dapat memberikan manfaat kesehatan (World Health Organization, 2006). Kesadaran mengenai pentingnya kesehatan menyebabkan munculnya tren modifikasi bahan pangan pada masyarakat, salah satunya seperti pada fortifikasi bahan pangan (Olmedilla-Alonso *et al.*, 2013).

Bahan alami yang telah banyak digunakan sebagai bahan fortifikasi makanan karena tingginya nutrisi yang dimiliki adalah daun kelor (*Moringa oleifera*). Daun *Moringa oleifera* kaya fitokimia flavonoid, tanin, sterol, terpenoid, saponin, antrakuinon, alkaloid dan pereduksi gula hadir bersama dengan agen anti-kanker seperti glukosinolat, isothiocyanates, senyawa glikosida dan gliserol-1-9-octadecanoate (Berkovich *et al.*, 2013; Gopalakrishnan *et al.*, 2016). Berdasarkan Fachriyah *et al.* (2020), daun *Moringa oleifera* memiliki total flavonoid sebesar 10.477 mgQE/g, dan angka antioksidan sebesar 41,40%.

Kandungan flavonoid dan antioksidan dapat dioptimalkan dengan fortifikasi atau penambahan bahan alam daun *Moringa oleifera* pada pembuatan tempe. Penambahan bahan-bahan, salah satunya adalah penambahan tepung daun kelor pada tempe, dapat memberikan dampak positif dalam hal nutrisi juga kandungan flavonoid didalamnya (Bintari *et al.*, 2020). Melalui penelitian ini tepung daun kelor ditambahkan pada proses inokulasi/peragian dengan tujuan meningkatkan total flavonoid tempe serta meningkatkan aktivitas antioksidan tempe. Daun *Moringa oleifera* yang digunakan ialah dalam bentuk tepung (bubuk), karena bersifat lebih tahan lama dibandingkan dalam bentuk daun segar (Sinaga *et al.*, 2019). Berdasarkan latar belakang diatas, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh dari pemberian tepung daun kelor pada fermentasi tempe terhadap kadar flavonoid dan antioksidan.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana pengaruh penambahan tepung daun kelor (*Moringa oleifera*) pada fermentasi tempe terhadap kadar flavonoid?
2. Bagaimana pengaruh penambahan tepung daun kelor (*Moringa oleifera*) pada fermentasi tempe terhadap kadar antioksidan tempe?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Menguji pengaruh penambahan tepung daun kelor (*Moringa oleifera*) pada fermentasi tempe terhadap kadar Flavonoid
2. Menguji pengaruh penambahan tepung daun kelor (*Moringa oleifera*) pada fermentasi tempe terhadap kadar antioksidan tempe

1.4. Batasan Penelitian

Untuk mencegah adanya kesalahan dalam mendefinisikan penggunaan istilah dalam penelitian ini, digunakan penegasan beberapa istilah sebagai berikut:

1. Tepung Daun Kelor

Tepung daun kelor merupakan daun kelor yang telah mengalami proses pengeringan dan penggilingan serta pengayakan menjadi serbuk halus. Pada penelitian ini digunakan tepung daun kelor kemasan dengan merk dagang “Kelorina”

2. Fermentasi Tempe

Fermentasi tempe merupakan suatu proses fermentasi yang terjadi pada kedelai setelah diinokulasi menggunakan starter tempe *Rhizopus* sp.

3. Lama Waktu Fermentasi

Lama waktu fermentasi pada penelitian ini ditinjau dari setelah proses inokulasi atau peragian. Satuan waktu yang digunakan menggunakan satuan jam, yaitu 0 Jam, 24 Jam, 36 Jam, dan 48 Jam.

4. Kadar Flavonoid

Total flavonoid merupakan banyaknya kandungan senyawa flavonoid pada sampel tempe tepung daun kelor.

5. Angka Antioksidan

Angka antioksidan yaitu presentase kandungan antioksidan pada sampel tempe tepung daun kelor.

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat Teoritis

Manfaat teoritis penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh penambahan tepung daun kelor (*Moringa oleifera*) pada fermentasi tempe terhadap kadar Flavonoid
2. Memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh penambahan tepung daun kelor (*Moringa oleifera*) pada fermentasi tempe terhadap kadar antioksidan

1.5.2 Manfaat Praktis

Manfaat praktis penelitian ini adalah:

1. Informasi ilmiah dari penelitian dapat dijadikan acuan untuk diaplikasikan secara luas
2. Meningkatkan kesadaran kepada masyarakat untuk melakukan inovasi fortifikasi bahan pangan

1.6. Keaslian Penelitian

Tabel 1.1 Penelitian terdahulu

No	Penelitian Sebelumnya			Keterangan
	Judul dan Penulis	Penerbit	Variabel Bebas dan Variabel Terikat	
1.	Tempeh Antioxidant Activity using DPPH Method: Effect of Fermentation, Processing, and Microorganisms oleh Tati Barus, Novalin Novita itrasole, Noryawati Mulyono, dan Vivitri Dewi Prasasty	Journal of Food Engineering and Technology, 2019. 8(2):75-80	Variabel bebas penelitian ini yaitu variasi jenis tempe, tempe yang diproduksi menggunakan <i>Rhizopus sp</i> , <i>Bacillus sp</i> , dan <i>Klebsiella sp</i> , K110, kemudian juga tempe yang telah digoreng dan di kukus. Variabel terikat pada penelitian ini adalah aktivitas antioksidan yang dihasilkan masing-masing perlakuan menggunakan metode DPPH.	Penelitian ini menggunakan uji antioksidan metode DPPH
2.	The Potential Effect of High Flavonoid Soybean Diversification Product Through Tempe Flour Substituion oleh Siti Harnina Bintari, MF. Putri, D.D. Saputro Suwahyo, S. Parman, dan Sunyoto.	Journal of Physics: Conference Series	Variabel bebas penelitian ini yaitu variasi diversifikasi produk tempe berupa tepug tempe (TF), bakso tempe (TM), tempe coklat (CT), tempe kelor (TM), dan bawang tempe (TO). Variabel terikat pada penelitian ini yaitu kandungan antioksidan dan kandungan gizi masing-masing sampel.	Pengukuran kadar Flavonoid tempe kelor
3.	Analisis Kadar Flavonoid Total Tempe Kedela Secara Spektrofotometri Visibel oleh Crescentiana Emy Dhurhanian & Emi Istantini	Jurnal Media Farmasi Vo. 17. No 2: 72-88	Variabel bebas penelitian ini yaitu tempe kedelai dibandingkan terhadap biji kedelai. Variabel terikat penelitian ini yaitu kadar flavonoid pada tempe kedelai.	Pengukuran Flavonoid tempe menggunakan Spektrofotometer UV Vis
4.	Analisis Pengaruh Konsentras Ragi dan Waktu Fermentasi terhadap Nilai	Gunung Djati Conference	Variabel bebas penelitian yaitu perbedaan konsentrasi ragi dengan 3 variasi (1,5%, 2%, dan	Uji aktivitas antioksidan tempe

	Gizi dan Aktivitas Antioksidan Tempe Kedelai Kombinasi Kacang Roay (<i>Phaseolus lunatus</i>) oeh A.I. Padhilah Fauziah, Asep Supriadi, & Assyifa Junitasari	Series, vol. 15. Prosiding Seminar Nasional Kmia 2022	2,5%) dan variasi waktu fermentasi (42 jam, 48 jam, dan 54 jam). Variabel terikat yaitu nilai gizi, aktivitas antioksidan metode DPPH, dan organoleptic	metode DPPH berdasarkan variasi konsentrasi ragi dan variasi waktu ferementasi
5.	Pengaruh Penambahan Tepung Daun Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) terhadap Kadar Lemak, Protein, Aktivitas Antioksidan dan Warna pada Pembuatan Bakso Ayam oeh Ivela Tamara Zulmy	Sarjana Thesis, Universitas Brawijaya	Variael bebas penelitian ini aadalah penambahan tepung daun kelor variasi konsentrasi (0%, 1%, 2%, dan 3%) dalam 100% adonan bakso. Variabel terikat penelitian ini yaitu kadar lemak, kadar protein, aktivitas antioksidan, dan warna bakso ayam	Pengaruh penambahan tepung daun kelor variasi konsentrasi terhadap kadar lemak, kadar protein, aktivitas antioksidan, dan warna bakso ayam
6.	Efek Penambahan Tepung Daun Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) terhadap Karakterisik Organoleptik dan Aktivitas Atioksidan Budik oleh Elsabet Burga Janggu, Geertruida Margereth Sippahelut, Sulmiyati	Journal of Animal Science (2) 32-37 tahun 2023	Variabel bebas penelitian yaitu variasi konsentrasi penambahan tepung daun keor (1%, 2%, 3% dan 4%). Variabel terikat penelitian yaitu kualitas organoleptik dan aktivitas antioksidan budik	Pengaruh variasi konsentrasi penambahan tepung daun kelorpada kualitas organoleptik dan antioksidan budik
7.	Pengaruh penambahan Tepung Daun Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) terhadap Sifat Organoleptik dan Kimia Nugget Tempe oleh Exlesia Fininta Sinaga, Tineke M. Langi, dan Telje Koapaha	Jurnal Unsrat 2022	Variabel bebas penelitian yaitu variasi konsentrasi penambahan tepung daun kelor (0,5%; 1%; 1,5%; 2%; 2,5%). Variabel terikat yaitu kandungan antioksidan pada perlakuan paling diminati, kadar air, kadar protein, dan kadar lemak.	Adanya pengaruh tepung daun kelor variasi konsenrasi kelor terhadap kandungan antioksidan

Berdasarkan isi Tabel 1.1. , maka dilakukan penelitian pengaruh pemberian tepung daun kelor pada fermentasi tempe terhadap kadar flavonoid dan antioksidan, dengan variabel bebas yaitu variasi konsentrasi tepung daun kelor (0%; 0,5%; 1%; 1,5%) dan lama waktu fermentasi (0 jam, 24 jam, 36 jam, dan 48 jam).

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Pustaka

Pada penelitian sebelumnya, penambahan tepung daun kelor memberikan hasil uji antioksidan yang tinggi pada pembuatan makanan olahan misalnya bakso ayam, yaitu sebesar 96,59 $\mu\text{m/ml}$ pada penambahan tepung daun kelor konsentrasi 3% (Zulmy, 2018). Pada penelitian Sinaga *et al.* (2022), penambahan tepung daun kelor konsentrasi 1,5% pada nugget tempe menghasilkan nilai IC50 sebesar 99,70 ppm atau bersifat sebagai antioksidan kuat. Penambahan tepung daun kelor pada Budik, yaitu sosis yang berasal dari Timor, menghasilkan nilai antioksidan paling tinggi pada penambahan tepung daun kelor konsentrasi 3% dibandingkan pada konsentrasi 1% dan 2% (Janggu *et al.*, 2023). Hal tersebut menunjukkan peningkatan sifat antioksidan seiring dengan adanya penambahan tepung daun kelor.

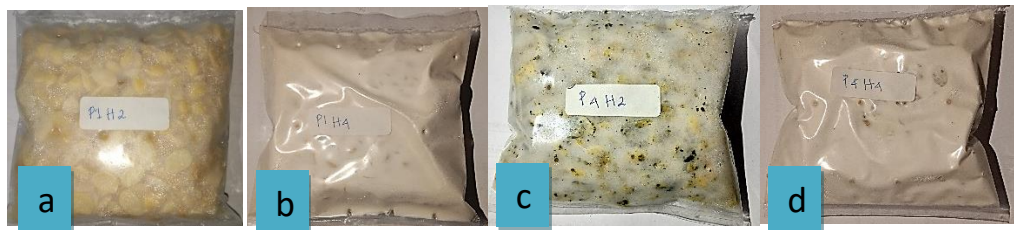
Penambahan tepung daun kelor pada fermentasi tempe dapat menambah nilai gizi pada tempe, misalnya dalam penelitian Suprihartini *et al.* (2021), seiring adanya peningkatan penambahan tepung daun kelor pada tempe, maka kadar vitamin C pada tempe dan kadar N-Amino akan semakin meningkat karena adanya penambahan nutrisi dari tepung daun kelor yang ditambahkan. Dalam penelitian Angelina *et al.* (2021), kandungan gizi seperti protein, serat, dan mineral pada beberapa produk pangan meningkat karena adanya penambahan bubuk daun kelor.

Berdasarkan penelitian Bintari *et al.* (2020), produk diversifikasi tempe, salah satunya yaitu penambahan tepung daun kelor pada tempe memberikan hasil tingginya kandungan flavonoid, yaitu sebesar 461,305 mg/100gr tempe dengan tanpa mengakibatkan perubahan negatif pada karakter fisik, tekstur, serta aroma pada tempe. Belum terdapat penelitian terdahulu mengenai pemeriksaan kadar flavonoid dan antioksidan tempe yang diberi tepung daun kelor berdasarkan perbedaan variasi konsentrasi dan waktu fermentasi.

2.2. Landasan Teori

2.2.1. Tempe

Tempe adalah makanan olahan dari kedelai yang difermentasi menggunakan kapang *Rhizopus*, terutama dari jenis *Rhizopus oligosporus* (Redi Aryanta, 2020). Kapang *Rhizopus* dengan didukung oleh kondisi lingkungan yang tepat akan membentuk benang-benang putih (hifa) melingkupi permukaan kedelai, membentuk rangkaian miselium kapang yang membalut kumpulan kedelai membentuk struktur tempe yang solid (Astawan *et al.*, 2013). Standar CODEX menggambarkan tempe sebagai makanan yang berbentuk kompak (solid), putih, berbentuk seperti kue, dibuat dari kedelai rebus yang dikupas kulitnya, dan difermentasi oleh *Rhizopus sp.* (Food and Agriculture Organization-World Health Organization, 2017). Berdasarkan standar tersebut, hanya *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae*, dan *Rhizopus stolonifer* yang diakui sebagai inokulan/starter tempe (Ahnna-Winarno *et al.*, 2021).



Gambar 2.1 Tempe tanpa tepung daun kelor (a: 24 jam, b: 48 jam) dan tempe tepung daun kelor 1,5% (c: 24 jam, d: 48 jam) (Dokumentasi pribadi)

Tempe merupakan sumber protein yang harganya relatif lebih murah dibandingkan bahan pangan sumber protein lain seperti daging, telur, dan ikan (Barus *et al.*, 2019). Protein tempe lebih mudah dimanfaatkan oleh tubuh karena protease *Rhizopus spp.* mampu menghidrolisis protein kedelai selama proses fermentasi berlangsung menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti asam amino dan peptida (Barus *et al.*, 2019).

Secara garis besar, tahap-tahapan penting dalam pembuatan tempe, adalah: pembersihan biji kedelai, perebusan/pengukusan, pengupasan kulit, inokulasi kapang, pembungkusan, dan fermentasi. Salah satu tahapan penting dalam proses pembuatan tempe yang menentukan kualitas tempe adalah proses fermentasi atau peragian. Proses peragian dilakukan dengan mencampurkan ragi

dengan kedelai, kemudian membungkusnya dalam plastik dan meletakkan kedelai yang sudah dicampur ragi tersebut di rak-rak penyimpanan/pemeraman. Pada tahap ini, dilakukan pemeraman kedelai selama 36-48 jam menggunakan laru atau kapang tempe (Redi Aryanta, 2020). Dalam proses penyimpanan saat fermentasi ini, tempe yang dihasilkan ditentukan juga oleh kondisi cuaca (suhu dan kelembaban) sekitarnya.

Tempe dengan kualitas yang baik harus memenuhi kualitas fisik dan kimia yang baik, dengan dapat diketahui dari wujudnya, bentuknya, dan nutrisi yang terkandung didalamnya (Jubaidah *et al.*, 2016). Berdasarkan SNI 33144, ciri-ciri tempe yang memiliki kualitas baik adalah memiliki aroma, serta wujud khas tempe: berwarna putih dan berbentuk solid, kemudian tanpa kontaminasi biologi maupun kimia. Kualitas tempe dapat ditentukan oleh berbagai faktor, baik faktor pra-inokulasi, atau selama proses fermentasi seperti aerasi, ketersediaan oksigen, suhu, pH, kualitas bahan baku, lama waktu fermentasi, dan pengemasan (Hasrudin & Pratiwi, 2015).

Selama proses pembuatan tempe, terjadi proses fermentasi oleh bantuan mikroorganisme maupun jamur yang terlibat. Fermentasi pada tempe merupakan fermentasi yang terjadi sebanyak 2 kali selama proses pembuatan tempe, yaitu fermentasi oleh aktivitas bakteri pada proses perendaman dan fermentasi oleh kapang pada saat setelah pemberian inokulan/ragi (Safitry *et al.*, 2021). Perkecambahan sporangiospora jamur dimulai beberapa jam setelah inokulasi, yang selanjutnya diikuti oleh berkembangnya hifa yaitu benang-benang halus berwarna putih kemudian akan membentuk kumpulan miselium berwarna putih pada permukaan kedelai putih (Suknia & Rahmani, 2020). Penetrasi miselium jamur sekitar 2 mm selama proses fermentasi menyebabkan adanya perubahan fisika dan kimia pada tempe oleh peranan enzim-enzim yang terbentuk (Ahn-an-Winarno *et al.*, 2021). Jamur yang tumbuh pada tempe tersebut dapat memproduksi beberapa enzim, misalnya enzim protease yang mampu menguraikan protein sehingga menjadi peptida pendek serta asam amino bebas, selain itu juga dihasilkan enzim lipase yang akan menguraikan lemak, serta memproduksi enzim amilase yang dapat menguraikan karbohidrat kompleks menjadi sederhana (Suknia & Rahmani, 2020). Pada jamur *Rhizopus oryzae*, aktivitas optimum enzim amylase yaitu pada waktu

fermentasi 12 jam, sedangkan pada *Rhizopus oligosporus*, aktivitas optimum terjadi pada waktu fermentasi 12-24 jam (Safitry *et al.*, 2021). Aktivitas enzim pada tempe memicu adanya perubahan kandungan nutrisi. Fermentasi pada tempe secara umum dapat meningkatkan kandungan nutrisi seperti protein, asam amino, antioksidan, serat kasar, kadar abu, dan vitamin, selain itu juga menurunkan antinutrien dan lemak (Ahn-an-Winarno *et al.*, 2021).

Kapang *Rhizopus sp.* pada tempe menghasilkan berbagai enzim yang mampu mengubah senyawa organik kompleks menjadi lebih sederhana. Enzim pada *Rhizopus sp* tersebut berperan penting dalam proses biotransformasi seperti memodifikasi metabolit primer dan sekunder yang dapat meningkatkan senyawa aktif seperti polifenol (Wang *et al.*, 2016), misalnya glukosidase yang dapat mengubah glikosida menjadi aglikon, menyebabkan terjadi peningkatan kandungan senyawa flavonoid, khususnya dalam bentuk isoflavon (Sulistiani *et al.*, 2014; Dhurhania & Istantini, 2021).

2.2.2. *Moringa oleifera*

Spesies kelor (*Moringa oleifera*) merupakan tanaman berasal dari Asia yang telah secara luas menyebar ke berbagai bagian dunia, terutama di negara-negara tropis seperti Malaysia, Indonesia, dan lainnya (Mallenakuppe *et al.*, 2019). *Moringa oleifera* dapat tumbuh didaerah tropis dan subtropis yang memiliki rentang suhu sekitar 25°C sampai 35°C dengan tanah berpasir atau lempung dan pH sedikit asam sampai sedikit basa dan curah hujan sekitar 250 mm- 3000 mm (Gopalakrishnan *et al.*, 2016).

Berdasarkan Abdel-Hameed (2015), tanaman Kelor (*Moringa oleifera*) tergolong tumbuhan perdu dengan tinggi mencapai 15 meter, memiliki batang pokok tunggal dengan beberapa cabang, dengan permukaan berwarna abu-abu pucat. Cabang pada tanaman kelor tersusun secara pinnulus, atau pada setiap cabang memiliki anak cabang, dst. Pucuk batang tanaman ini berbentuk meruak/terbuka berwarna kehijauan. Daun kelor berukuran kecil, memiliki rentang bentuk dari bulat telur, oval, hingga memanjang. bulat telur berukuran kecil.



Gambar 2.2 Daun *Moringa oleifera* (Wijayanti et al., 2023)

Setiap bagian dari pohon kelor (buah, biji, daun, bunga, kulit kayu, dan akar) memiliki banyak manfaat, dan secara tradisional dapat digunakan untuk berbagai tujuan, namun, bagian daun yang secara umum paling banyak digunakan (Mallenakuppe *et al.*, 2019). Daun *Moringa oleifera* kaya akan mineral seperti kalsium, kalium, seng, magnesium, besi dan tembaga. Vitamin seperti beta-karoten vitamin A, vitamin B seperti asam folat, piridoksin dan asam nikotinat, vitamin C, D dan E; hadir. Fitokimia seperti sebagai tanin, sterol, terpenoid, flavonoid, saponin, antrakuinon, alkaloid dan pereduksi gula hadir bersama dengan agen anti-kanker seperti glukosinolat, isothiocyanates, senyawa glikosida dan gliserol-1-9-oktadekanoat (Gopalakrishnan *et al.*, 2016).

Moringa oleifera mengandung berbagai flavonoid pada daun, akar, bunga, dan kulit biji (Abdel-Hameed, 2015). Daun *M. oleifera* yang dipanen di Afrika Selatan dan Namibia mengandung setidaknya 14 flavonoid berdasarkan UHPLC-ESI-q TOF-MS (Makita, Chimuka, Steenkamp, Cukrowska, & Madala, 2016). Sementara itu, 12 flavonoid diidentifikasi dalam daun *M. oleifera* yang dikumpulkan dari Afrika sub-Sahara berdasarkan HPLC-UV-MS (Coppin *et al.*, 2013). Perbedaan kandungan flavonoid daun *M. oleifera* yang diamati kemungkinan besar disebabkan oleh variasi lingkungan (Brunetti, George, Tattini, Field, & Davey, 2013; Fitriana *et al.*, 2016). Baru-baru ini, dilaporkan mengenai daun *M. oleifera* yang kaya akan senyawa fenolik seperti flavonoid, *gallic acid*, quercetin dan kaempferol sebagai aktivitas antioksidan (Santos et al, 2012; Jahan et al., 2018). Berdasarkan penelitian Fachriyah *et al.* (2020), daun *Moringa oleifera* memiliki total flavonoid sebesar 10.477 mgQE/g, dengan angka antioksidan sebesar 41, 40%. Dalam daun *Moringa oleifera* yang dikeringkan terdapat senyawa

Kuersetin, senyawa yang tergolong flavonoid, sebesar 100 mg/100g, dalam bentuk iso-quersetin atau isotriofolin (Lako *et al* 2007, Atawodi *et al* 2009)

Daun kelor dapat dikeringkan untuk didapatkan tepung daun kelor. Pengerinan dilakukan pada suhu rendah sehingga nutrisi daun kelor tidak rusak. Pengerinan daun kelor ditujukan untuk ketahanan produk, karena ketika daun kelor didiamkan pada waktu yang lama akan ditumbuhi jamur dan berakibat busuknya daun kelor. Menurut penelitian Adebayo (2010), kadar air yang rendah dengan activity of water (AW) yang tinggi akan menyebabkan tumbuhnya bakteri, sebaiknya mencari hubungan AW dibawah 0.7, sehingga bisa diketahui waktu dan suhu yang tepat. Apabila AW dibawah 0.7 maka tepung yang dihasilkan aman dan tidak terjadi pertumbuhan jamur dan lainnya.



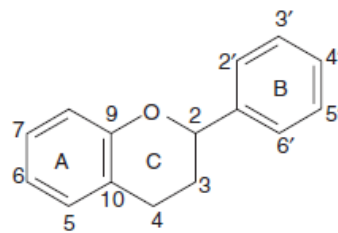
Gambar 2.3 Tepung/Serbuk Daun Kelor (Krisnadi, 2018)

2.2.3. Flavonoid

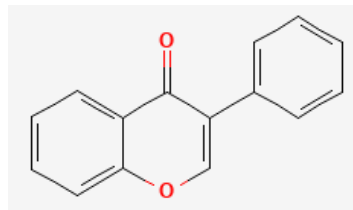
Pada tumbuhan, banyak ditemui senyawa fitokimia yang memiliki berbagai manfaat, salah satunya adalah senyawa golongan fenolik. Senyawa fenolik merupakan senyawa kimia yang diketahui memiliki berbagai bioaktivitas. Senyawa fenolik meliputi fenol sederhana, asam fenolik, kumarin, flavonoid, tanin, lignan, dan lignin (Kamboj *et al.*, 2015). Senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat secara melimpah pada tanaman. Senyawa fenolik diketahui memiliki aktivitas biokimia seperti antioksidan, antimutagen, dan antikanker (John *et al.*, 2013).

Flavonoid adalah salah satu senyawa metabolit sekunder golongan fenolik yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan untuk menangkal senyawa radikal bebas (Arnanda & Nuwarda, 2019). Senyawa flavonoid terdapat pada semua bagian tumbuhan (Chotimah, 2019). Flavonoid pada dasarnya memiliki kerangka yang terdiri dari 15 atom karbon oleh penggabungan atom C₆-C₃-C₆ hasil dari jalur

shikimat (McAlpine & Hochlowski, 1989). Berdasarkan pada Herbert (1995), biosintesis senyawa flavonoid diawali oleh senyawa fosfoenolpiruvat (senyawa hasil glikolisis) yang kemudian melalui jalur shikimat, lalu diperoleh fenilalanin. Fenilalanin akan menjadi bahan menuju jalur fenil propanoid yang kemudian menghasilkan 4-coumaryl-co. Senyawa 4-coumaryl-coA bersama malonyl-coA akan membentuk struktur flavonoid dalam bentuk khalkon.



Gambar 2.4. Struktur Umum Flavonoid (McAlpine & Hochlowski, 1989)



Gambar 2.5. Struktur Flavonoid golongan Isoflavon (PubChem NCBI)

Flavonoid bersifat antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas. Salah satu golongan flavonoid yang telah banyak ditemui adalah isoflavon. Sifat antioksidan pada flavonoid didasarkan karena adanya gugus hidroksil pada cincin aromatik pada senyawa flavonoid, yang dapat membantu penangkapan radikal bebas dengan cara melepas atom hidrogen untuk menstabilkan senyawa radikal bebas (Chotimah, 2019; Dewi, 2012). Flavonoid berbanding lurus dengan aktivitas antioksidan, yaitu semakin tinggi senyawa flavonoid pada suatu zat, semakin tinggi aktivitas antioksidan yang ditimbulkan (Erukainure, 2011).

Pada tumbuhan, flavonoid dapat menjadi pelindung terhadap gangguan eksternal seperti stress atau sinar ultraviolet, serta membantu penyerbukan karena dapat memproduksi warna pada bunga sehingga menarik serangga (vidak, 2015). Pada manusia, flavonoid memiliki manfaat yang beragam seperti mencegah diabetes, mencegah penyakit jantung, mencegah penyakit ginjal, antitumor,

mencegah pengeroposan tulang, hingga bersifat antibakteri serta antialergi (Chotimah, 2019).

2.2.4. Radikal Bebas dan Antioksidan

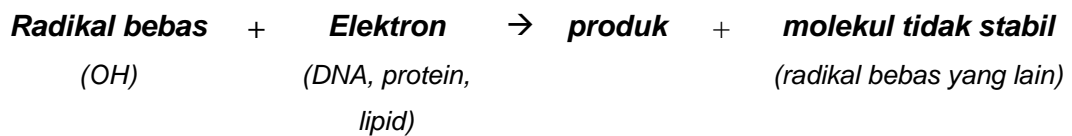
Radikal bebas atau ROS (*Reactive Oxygen Species*) adalah molekul kimia yang memiliki satu atau lebih elektron bebas (tidak berpasangan) yang cenderung akan menarik elektron dari atom atau senyawa yang lain. Berdasarkan penelitian Khaira (2010), radikal bebas dapat bersumber dari dalam tubuh (internal) atau berasal dari luar tubuh (eksternal). Aktivitas metabolisme tubuh seperti proses respirasi dapat menghasilkan energi namun juga hasil samping berupa radikal bebas atau ROS (*Reactive Oxygen Species*). Pada proses respirasi, zat-zat makanan yang teroksidasi oleh oksigen menghasilkan senyawa pengikat energi (ATP), juga terbentuk zat samping anion superoksida dan hidrosil radikal yang merupakan radikal bebas (ROS) (Lehninger, 1982; Khaira, 2010). Disamping itu, sumber radikal bebas eksternal dapat berasal dari berbagai bentuk seperti zat kimia (pestisida, obat anestesi, alkohol, obat kemoterapi), polusi udara, rokok, sinar UV, sinar X, dan sebagainya. Minyak goreng yang dipakai berkali-kali juga dapat memicu munculnya radikal bebas pada makanan yang digoreng oleh senyawa peroksida dan epoksida yang dihasilkan (Ketaren, 2005).

Kecenderungan molekul radikal bebas dalam menarik elektron molekul lain dapat menyebabkan adanya kerusakan bagi molekul sel yang diambil elektronnya dengan merusak integritas lipid, protein, dan DNA (Arnanda & Nuwarda, 2019). Ketidakseimbangan antara radikal bebas/oksidan dengan antioksidan didalam tubuh dapat memicu adanya stress oksidatif pada tubuh (Sinaga, 2016). Radikal bebas dapat menyebabkan gangguan pada tubuh seperti peradangan, osteoporosis, gangguan pencernaan, gangguan fungsi hati, perusakan saraf dan sel otak, meningkatkan LDL (*low density lipoprotein*) penyebab aterosklerosis atau jantung coroner (Khaira, 2010).

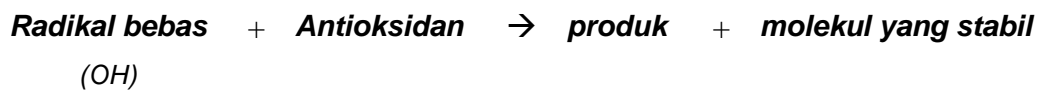
Tubuh membutuhkan antioksidan untuk menangkal radikal bebas karena antioksidan dapat mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa radikal bebas atau senyawa bersifat oksidan sehingga dapat menghambat dampak negatif dari oksidan (Sayuti & Yenrina, 2015). Tanpa adanya senyawa antioksidan, radikal bebas yang ada pada tubuh akan mengambil elektron dari molekul lain disekitarnya.

Hasil reaksi tersebut menghasilkan molekul yang juga tidak stabil kemudian kembali mengambil elektron dari molekul disekitarnya, dan seterusnya, yang memicu kerusakan sel. Namun, dengan adanya antioksidan, radikal bebas akan berikatan dengan senyawa antioksidan dan menjadi stabil. Berdasarkan Khaira (2010), reaksi radikal bebas tanpa antioksidan dan dengan antioksidan adalah sebagai berikut:

Reaksi tanpa antioksidan:



Reaksi dengan antioksidan:



Antioksidan dapat berasal dari sumber alami maupun sintetis, namun, antioksidan sintetis dapat memiliki potensi merugikan (Hani & Milanda, 2021). Antioksidan alami bersifat lebih aman dan dapat ditemukan dari tumbuhan yang ada disekitar. Terdapat berbagai fitokimia pada tumbuhan yang dapat menjadi antioksidan seperti senyawa golongan polifenol, flavonoid, vitamin C, vitamin E, dan β -karoten (Hernani, 2005). Tumbuhan seperti *Moringa oleifera* kaya akan fitokimia yang bersifat antioksidan, salah satunya berasal dari fitokimia jenis flavonoid. Selain secara langsung dari tumbuhan, antioksidan dapat ditemukan pada produk olahan misalnya tempe oleh kandungan flavonoid yang dimilikinya.

A. Antioksidan pada Tempe

Pada uji aktivitas antioksidan metode DPPH (2,2 difenil 1 picril hidrazil), kedelai diketahui memiliki aktivitas antioksidan sebesar 67,45%, sedangkan tempe kedelai memiliki aktivitas antioksidan sebesar 81,43% yang dibandingkan terhadap B-karoten 43,25%, vitamin C 75,62%, dan α -tokoferol 76,41% (Sulistiani *et al.*, 2014; Dhurhania & Istantini, 2021). Antioksidan tempe paling utama berasal dari senyawa flavonoid golongan isoflavon yang tinggi. Tempe dapat menjadi salah satu sumber isoflavon yang paling tersedia secara hayati dalam dibandingkan dengan makanan kedelai lainnya.

Makanan olahan kedelai, misalnya susu kedelai, tahu, dan tempe mengandung lebih banyak konsentrasi isoflavon dibandingkan dengan "generasi kedua" makanan kedelai, misalnya, hot dog berbahan dasar kedelai, burger, atau mie (John *et al.*, 2013). Di antara makanan olahan kedelai, isoflavon dalam makanan kedelai yang difermentasi, misalnya, miso dan tempe, ditemukan lebih tersedia dibandingkan untuk produk kedelai yang tidak difermentasi, misalnya, susu kedelai, dengan kadar isoflavon aglikon menjadi lebih tinggi, sedangkan dalam bentuk isoflavon glikosida seperti malonil glikosida kadarnya lebih rendah (John *et al.*, 2013). Fermentasi kapang pada tempe membantu mengaktifkan komponen flavonoid golongan isoflavon kedelai dari bentuk glikon (daidzin dan genistin) menjadi aglikon (genistein dan daidzein) yang lebih mudah diserap oleh tubuh (Astawan 2013). Fermentasi juga meningkatkan flavonoid dalam bentuk genistein dan daidzein tersebut dibandingkan pada kedelai tanpa fermentasi (Riciputi *et al.*, 2016). Dibandingkan dengan beberapa makanan kedelai fermentasi lainnya, tahu dan tempe mengandung kadar isoflavon secara signifikan yang lebih tinggi baik dalam keadaan mentah maupun dimasak (Haron *et al.*, 2016).

Salah satu senyawa utama dari tempe kedelai adalah flavonoid golongan isoflavon genistein yang berpotensi besar sebagai agen pencegah dan penghambat kanker (Atun, 2009). Lewidharti *et al.* (2015), melaporkan bahwa kandungan genistein tempe hasil fermentasi 0 - 9 hari menggunakan sampel kering bersifat fluktuatif. Suharto *et al.* (2010) melaporkan bahwa kandungan total isoflavon dalam ekstrak kedelai adalah 135,6 $\mu\text{g/g}$, sedangkan pada ekstrak tempe terdapat kandungan total isoflavon sebesar 153,9 $\mu\text{g/g}$ berat kering. Kapang *Rhizopus sp* pada tempe menghasilkan berbagai enzim yang mampu mengubah senyawa organik kompleks menjadi lebih sederhana, misalnya β -glukosidase yang dapat mengubah glikosida menjadi aglikon, menyebabkan terjadi peningkatan kandungan senyawa flavonoid, khususnya dalam bentuk isoflavon (Sulistiani *et al.*, 2014; Dhurhanian & Istantini, 2021).

B. Antioksidan pada Daun Kelor (*Moringa oleifera*)

Daun *M. oleifera* dapat digunakan sebagai sumber antioksidan (Fitriana *et al.*, 2016) yang dapat mencegah kerusakan sel akibat stress oksidatif (Mahmood *et al.*, 2010). Ekstrak daun kelor telah terbukti sebagai antioksidan yang baik

(Gopalakrishnan *et al.*, 2016). Aktivitas antioksidan pada *Moringa oleifera* disebabkan oleh senyawa flavonoid, karotenoid, fenolik, dan asam askorbat (Vergara-Jimenez *et al.*, 2017). Daun *M. oleifera* mengandung sumber alami polifenol yang berpotensi sebagai antioksidan (Fitriana *et al.*, 2016). Berdasarkan penelitian Fachriyah *et al.* (2020), daun *Moringa oleifera* memiliki total flavonoid sebesar 10.477 mgQE/g, dan kadar antioksidan sebesar 41, 40%. Pada penelitian Susanty *et al.* (2019), diperoleh nilai IC50 antioksidan sebesar 4,289 yang menunjukkan kadar antioksidan yang terkandung dalam daun *Moringa oleifera* sangat tinggi.

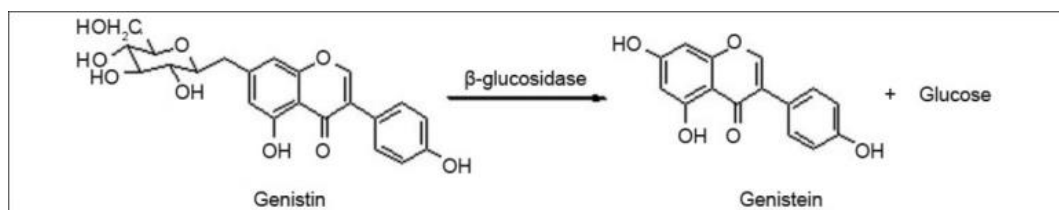
C. Antioksidan pada Tempe Daun Kelor

Fermentasi menggunakan kapang *Rhizopus*, misalnya *Rhizopus oligosporus*, dapat meningkatkan kadar protein melalui aktivitas enzim protease dan dapat menurunkan serat kasar (*crude fiber*) (Wattiheluw *et al.*, 2012), serta meningkatkan senyawa fenolik pada produk fermentasi (Aruben *et al.*, 2012). Flavonoid adalah salah satu senyawa senyawa fenolik, memiliki sifat antioksidan (Zuraida *et al.*, 2017). Peningkatan flavonoid akan berbanding lurus dengan peningkatan aktivitas antioksidan (Astawan *et al.*, 2013). *Rhizopus oligosporus* menghasilkan enzim β -glukosidase, selulase, dan xylanase yang berperan dalam biotransformasi proses pengubahan metabolit primer dan sekunder yang dapat meningkatkan komponen aktif salah satunya senyawa polifenol (Wang *et al.*, 2016).

Fermentasi *Rhizopus* dengan bahan alam seperti *Moringa oleifera* dapat menyebabkan adanya peningkatan senyawa pada substrat fermentasi. Berdasarkan penelitian Djonu *et al.* (2018), peningkatan total senyawa fenolik (Fenol, Flavonoid, dan Saponin) pada *Moringa oleifera* yang difermentasi menggunakan *Rhizopus oligosporus* disebabkan oleh aktivitas enzim yang mampu membentuk senyawa fenol. Total fenol tertinggi pada penelitian tersebut yaitu fermentasi di hari ke-6 4,73%, dibandingkan dengan total fenol *Moringa oleifera* tanpa pemberian *Rhizopus* yaitu 2,04%. Pada penelitian sebelumnya oleh Wang *et al.* (2016), peningkatan fenol disebabkan oleh adanya enzim β -glukosidase yang berperan dalam pemutusan ikatan glukosida untuk menghasilkan fenol pada substrat daun jambu biji. Enzim β -glukosidase adalah kunci untuk biokonversi dan peningkatan

senyawa fenolik selama proses fermentasi (Bhanja *et al.*, 2009; Daroit *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2008).

Fermentasi tempe yang diberi tepung daun kelor dapat memicu peningkatan senyawa flavonoid dan antioksidan oleh penggabungan 2 sumber senyawa flavonoid yaitu kedelai (Barus *et al.*, 2019) dan daun kelor (*Moringa oleifera*) menggunakan enzim β -glukosidase yang dihasilkan oleh kapang *Rhizopus sp* (Wang *et al.*, 2016). Enzim β -glukosidase dapat mengubah glikosida menjadi bentuk aglikonnya, menyebabkan terjadi peningkatan kandungan senyawa flavonoid, khususnya dalam bentuk isoflavon (Sulistiani *et al.*, 2014; Dhurhanian & Istantini, 2021).



Gambar 2.6. Reaksi pembentukan genistein aglikon (salah satu senyawa flavonoid) oleh enzim β -glukosidase (Pandit *et.al.*, 2011)

2.2.5. Prinsip Pemeriksaan Flavonoid dan Antioksidan

Pemeriksaan flavonoid dan antioksidan pada sampel dilakukan untuk mengetahui kadar flavonoid dan antioksidan tempe yang diberi tambahan tepung daun kelor masing-masing perlakuan.

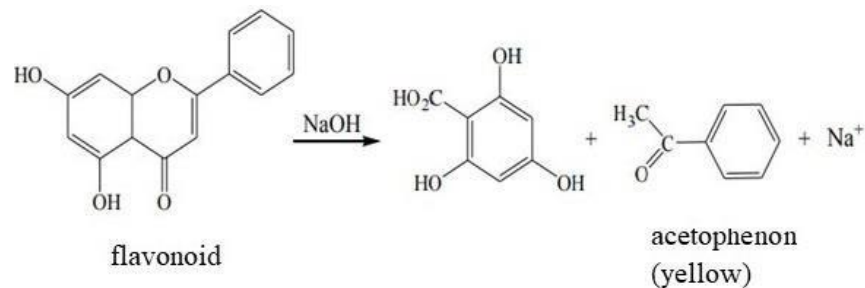
2.2.5.1. Pemeriksaan Flavonoid

Pemeriksaan flavonoid dapat dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Metode kualitatif yaitu menggunakan pereaksi yang ditambahkan pada bahan/zat yang akan diperiksa kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Setelah diketahui ada tidaknya kandungan flavonoid pada suatu bahan, kemudian dilakukan pemeriksaan dengan metode kuantitatif untuk bahan yang positif flavonoid.

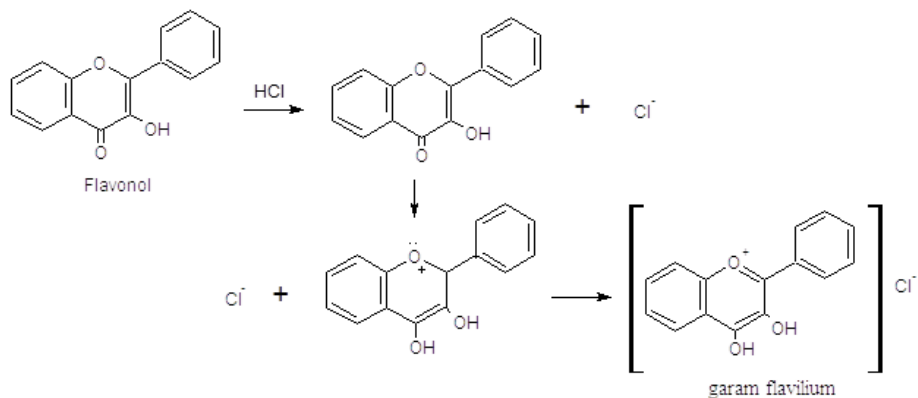
A. Prinsip Pemeriksaan Flavonoid Secara Kualitatif

Pemeriksaan Flavonoid secara kualitatif dapat dilakukan dengan menggunakan pereaksi NaOH 10%, pereaksi Wilstater, dan pereaksi Bate Smite-Metcalf (Ikalinus *et al.*, 2015). Ekstrak yang mengandung senyawa flavonoid

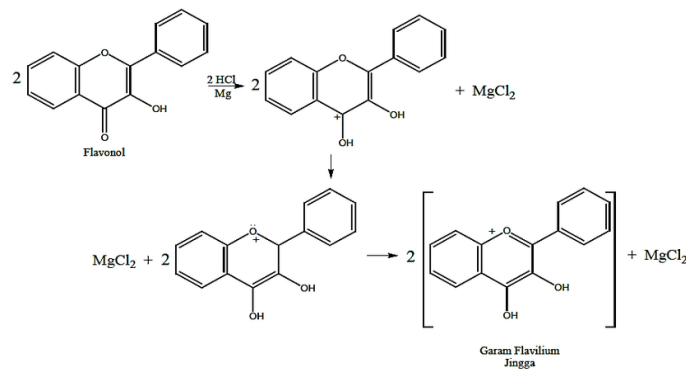
ditambah dengan basa kuat NaOH (natrium hidroksida), dapat menimbulkan reaksi dekomposisi flavonoid membentuk asetofenon warna kuning - coklat (Astutiningsih, 2021). Flavonoid, merupakan senyawa yang mengandung nucleus benzopiranone, dapat diidentifikasi menggunakan HCl pekat (pada uji Bate Smith-Metchalf), yaitu dengan dihasilkannya garam benzopyrylium atau juga disebut garam flavilium yang ditunjukkan adanya warna merah atau jingga (Achmad, 1986 dalam (Lindawati, 2018). Proses pemanasan dapat mempercepat reaksi tersebut. Pada uji Wilstater, penambahan HCl pekat dan serbuk Mg akan menimbulkan reaksi reduksi membentuk kompleks senyawa berwarna kuning/jingga-merah pada ekstrak yang mengandung flavonoid (Sudira *et al.*, 2019).



Gambar 2.7. Reaksi senyawa flavonoid dengan pereaksi NaOH 10% (Achmad, 1986)



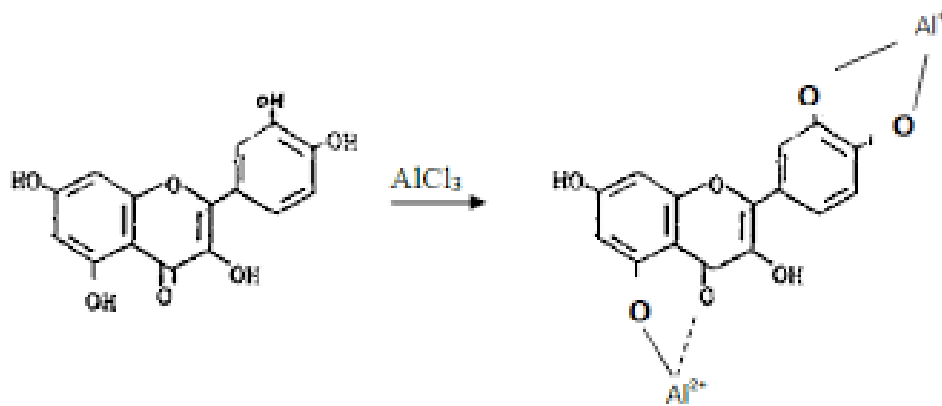
Gambar 2.8. Reaksi senyawa flavonoid dengan pereaksi Bate Smite-Metchalf (Achmad, 1986)



Gambar 2.9. Reaksi senyawa flavonoid dengan pereaksi Wilstater (Septyaningsih, 2010)

B. Prinsip Pemeriksaan Flavonoid Secara Kuantitatif

Pada penelitian ini, penentuan total senyawa flavonoid tempe yang diberi tambahan tepung daun kelor ditentukan berdasarkan pengukuran prinsip kalorimetri AlCl₃ menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Gugus keto atom C-4 dan gugus hidroksi atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari senyawa golongan flavon dan flavonol akan membentuk kompleks ketika direaksikan dengan AlCl₃ (Azizah *et al.*, 2014). Asam asetat ditambahkan untuk membentuk suasana asam sehingga gugus keto dan gugus hidroksi tersebut tetap stabil ketika bereaksi membentuk kompleks dengan AlCl₃ (Ipandi *et al.*, 2016).



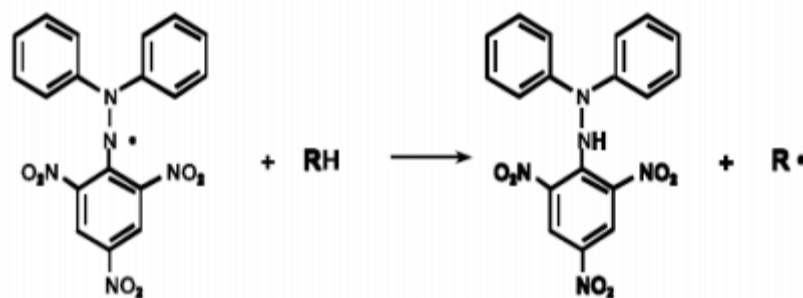
Gambar 2.10. Reaksi pembentukan kompleks Kuersetin-AlCl₃ (Azizah *et al.*, 2014)

Kuersetin digunakan sebagai larutan standar karena berdasarkan Azizah *et al.* (2014), kuersetin termasuk flavonoid jenis flavonol yang memiliki gugus keto pada atom C-4 dan gugus hidroksil pada atom C-3 dan C-5 yang bertetangga. Kemudian, sampel diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

sehingga diperoleh nilai absorbansi sampel. Nilai absorbansi sampel digunakan untuk mengetahui kadar flavonoid yang terkandung pada sampel menggunakan prinsip hukum Lambert-Beer. Semakin tingginya nilai absorbansi sampel, maka semakin tinggi pula nilai flavonoid yang terkandung pada sampel, atau disebut bersifat linear (Neldawati, 2013).

2.2.5.2. Prinsip Pemeriksaan Antioksidan

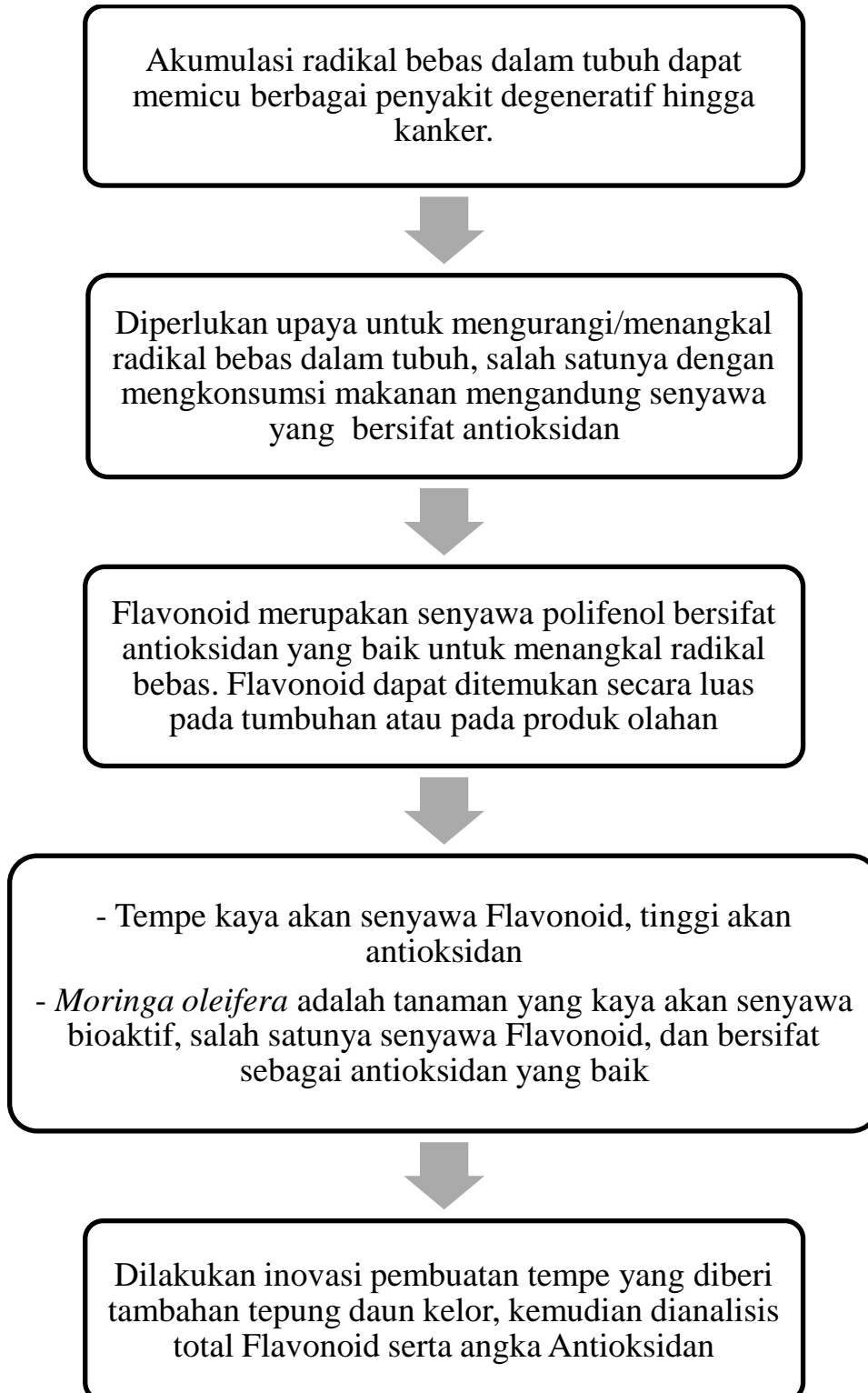
Berdasarkan penelitian oleh Erukainure (2011), besarnya Flavonoid berbanding lurus dengan aktivitas antioksidan. Senyawa flavonoid memiliki sifat antioksidan karena gugus hidroksi yang dimilikinya dapat menjadi pendonor elektron dengan baik (Aryal *et al.*, 2019). Untuk dapat diketahui nilai antioksidan pada sampel, dapat dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis. Pemeriksaan angka antioksidan diperlukan adanya pereaksi DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*). Pereaksi DPPH akan berperan sebagai radikal yang akan berikatan dengan antioksidan pada sampel. Antioksidan menetralkan radikal DPPH dengan cara mendonorkan atom hidrogennya terhadap radikal DPPH (Kurnia *et al.*, 2021). Pemeriksaan antioksidan pada spektrofotometer UV-Vis dilakukan untuk mendapatkan nilai absorbansi sampel sehingga dapat diketahui nilai pengikatan DPPH—Antioksidan yang menunjukkan kadar antioksidan pada sampel.



Gambar 2.11. Reaksi DPPH dengan antioksidan (Widyaningsih, 2010)

Larutan kuersetin yang ditambahkan dengan DPPH dapat berfungsi sebagai kontrol positif karena senyawa kuersetin termasuk golongan flavonoid, memiliki gugus hidroksil yang dapat berperan sebagai antioksidan sehingga dapat mendeteksi besarnya absorbansi DPPH dalam mereduksi antioksidan.

2.3. Kerangka Berpikir



2.4. Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah:

1. Penambahan tepung daun kelor (*Moringa oleifera*) pada fermentasi tempe berpengaruh dalam meningkatkan total Flavonoid dibandingkan kedelai tanpa fermentasi, dan tempe tanpa penambahan tepung daun kelor
2. Penambahan tepung daun kelor (*Moringa oleifera*) pada fermentasi tempe berpengaruh dalam meningkatkan antioksidan dibandingkan kedelai tanpa fermentasi, dan tempe tanpa penambahan tepung daun kelor

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Pendekatan dan Desain Penelitian

3.1.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan bahan baku utama kedelai, ragi, dan tepung daun kelor dengan teknologi fermentasi fortifikasi daun kelor. Tepung Daun Kelor ditambahkan pada proses inokulasi ragi/starter tempe, yaitu kapang *Rhizopus sp.* Dianalisis lama waktu fermentasi Tempe agar diketahui waktu (jam) tempe menghasilkan total flavonoid dan angka antioksidan tertinggi dari penelitian yang dilakukan.

3.1.2. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RALF) dengan 2 faktor, yaitu jenis perlakuan penambahan tepung daun kelor (P) yang terdiri atas 4 taraf: 0% (P₁), 0,5% (P₂), 1% (P₃), 1,5% (P₄) ; dan perlakuan lama waktu fermentasi yang terdiri atas 4 taraf: 0 Jam (H₁), 24 Jam (H₂), 36 Jam (H₃), 48 Jam (H₄). Percobaan ini meliputi 16 kombinasi perlakuan.

Tabel 3.1 Rancangan percobaan pada penelitian

	P1	P2	P3	P4
H1	P₁H₁ (0%; 0 Jam)	P₂H₁ (0,5%; 0 Jam)	P₃H₁ (1%; 0 Jam)	P₄H₁ (1,5%;0 Jam)
H2	P₁H₂ (0%; 24 Jam)	P₂H₂ (0,5%;24 Jam)	P₃H₂ (1%; 24 Jam)	P₄H₂ (1,5%;24 Jam)
H3	P₁H₃ (0%; 36 Jam)	P₂H₃ (0,5%;36 Jam)	P₃H₃ (1%; 36 Jam)	P₄H₃ (1,5%; 36 Jam)
H4	P₁H₄ (0%; 48 Jam)	P₂H₄ (0,5%;48 Jam)	P₃H₄ (1%; 48 Jam)	P₄H₄ (1,5%; 48 Jam)

3.2. Lokasi Penelitian

Proses pembuatan tempe dilakukan di CV Rumah Inovasi Tempe Sekar Sari. Proses pengujian Flavonoid dan Antioksidan dilaksanakan di Laboratorium Biologi

FMIPA UNNES. Waktu pelaksanaan penelitian yaitu pada Bulan Februari-Maret 2023.

3.3. Sampel dan Populasi

1. Subyek: Tempe yang diberi penambahan tepung daun kelor
2. Obyek: kadar flavonoid tempe, kadar antioksidan
3. Populasi: terhingga
4. Sampling: Secara Simple Random

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Independen (bebas)

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu,

1. Konsentrasi tepung daun kelor
2. Lama waktu fermentasi Tempe (Jam)

3.4.2. Variabel Dependen (terikat)

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu,

1. Kadar senyawa flavonoid
2. Kadar antioksidan

3.4.3. Variabel Kendali

Variabel kontrol pada penelitian ini yaitu,

1. Berat kedelai yang digunakan (200 gram masing-masing perlakuan)
2. Metode 2 kali perendaman dan 2 kali pemasakan
3. Suhu ruang

3.5. Bahan dan Alat Penelitian

3.5.1. Alat

Tabel 3.2 Alat-alat penelitian

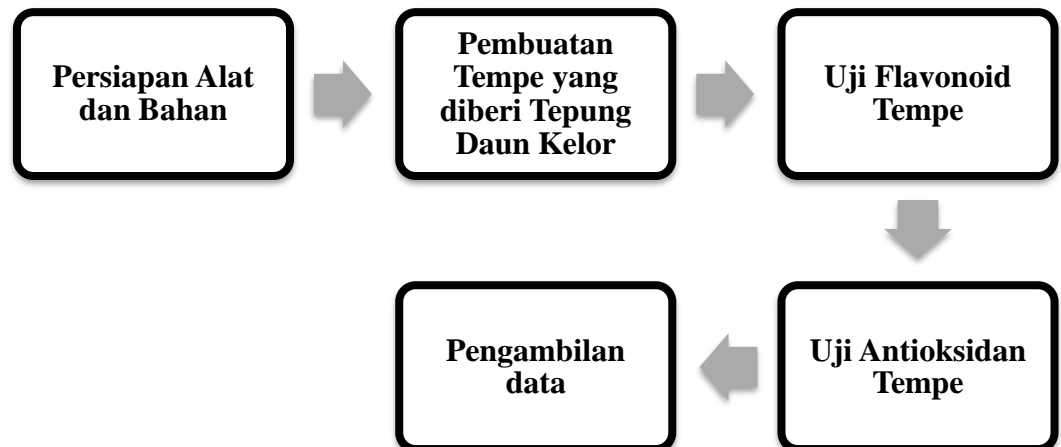
No.	Nama Alat	Spesifikasi	Fungsi
1.	Kompor	Kompor merk dagang <i>Rinnai</i> 2 tungku; ukuran 600 (P) x 365 (L) x 140 (T) bahan/material ceflon	Untuk proses pemasakan kedelai sehingga menjadi lebih lunak
2.	Panci	Merk dagang <i>Maspion</i> dengan diameter 22 cm, tinggi 26 cm; bahan aluminium tebal	Untuk proses pemasakan kedelai pada pembuatan tempe
3.	Neraca	Merk dagang <i>Kern</i>	Untuk menimbang bahan-bahan reagen dan ekstrak
4.	Blender	Merk dagang <i>Vitara VTR-106</i>	Untuk menghaluskan tempe kelor untuk dibuat ekstrak
5.	Rotary Evaporator	Merk dagang <i>IKA RV 10 Digital V</i>	Untuk menguapkan pelarut pada pembuatan ekstrak tempe
6.	Waterbath	Merk dagang <i>Cole Parmer Waterbath 12122-81 230 VAC 24L</i>	Untuk memanaskan tempe dalam pembuatan ekstrak tempe
7.	Pengaduk	-	Untuk mengaduk dalam pembuatan ekstrak tempe
8.	Inkubator	Inkubator merk dagang <i>Memmert INCOmed CO2</i> 108L; rentang temperature mencapai +50°C; 115V; eksterior 710×550×778mm; interior 560×400×480mm; muatan 70Kg	Untuk pengatur suhu saat
9.	Gelas Beker, Pipet Tetes, Tabung Reaksi	Merk dagang <i>Pyrex</i> . Gelas beker berbentuk silinder alas datar, pipet gelas dilengkapi penyedot karet; tabung reaksi terbuat dari kaca	Untuk melakukan uji reagen
10.	Spektrofotometer UV-Vis	Spektrofotometer UV-Vis Shimadzu UV mini-1280 serial number A12065402452 CD; panjang gelombang 190 s.d. 1100 nm; lebar pita gelombang 5 nm	Untuk menentukan kadar flavonoid dan aktivitas antioksidan tempe berdasarkan nilai absorbansi

3.5.2. Bahan

Tabel 3.3. Bahan-bahan penelitian

No.	Nama Bahan	Spesifikasi	Fungsi
1.	Kedelai sebanyak 200 gram x 32 = 320 gram	-	Untuk substrat fermentasi tempe
2.	Ragi tempe/starter tempe	-	Sebagai fermentor
3.	Tepung Daun Kelor (<i>Moringa oleifera</i>)	Merk dagang <i>Kelorina</i>	Untuk bahan fortifikasi pada fermentasi Tempe
4.	HCl, serbuk Mg, NaOH 10%	Merk dagang <i>Merck</i>	Sebagai reagen uji adanya senyawa Flavonoid tempe
5.	- 10 mL etanol - 1 mL AlCl ₃ 2% - 1 mL kalium asetat 120 mM.	-	Sebagai reagen sebelum proses analisis menggunakan Spektrofotometer UV-Vis
6.	Larutan DPPH	Merk dagang <i>Sigma aldrich</i>	Sebagai reagen untuk uji antioksidan
7.	Kuersetin	Merk dagang <i>Sigma</i>	Sebagai larutan pembanding untuk uji flavonoid dan antioksidan

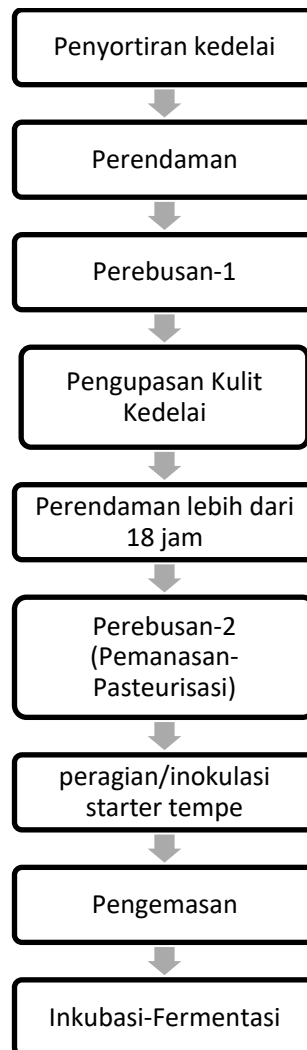
3.6. Prosedur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

3.6.1. Pembuatan Tempe yang diberi Tepung Daun Kelor

Proses pembuatan tempe mengadaptasi metode dari RITSS (Rumah Inovasi Tempe Sekar Sari). Proses pembuatan tempe meliputi tahap penyortiran kedelai, perendaman pertama, perebusan, pengupasan kulit kedelai, perendaman ke-2, perebusan ke-2, inokulasi/peragian, pengemasan, serta inkubasi/fermentasi (Bintari et al., 2020). Sebelum proses pembuatan tempe, dilakukan penyiapan bahan baku, yaitu kedelai dan ragi/starter tempe dengan kualitas yang baik.



Gambar 3.2. Skema Produksi Tempe (Bintari *et al.*, 2020)

Langkah pertama, dilakukan sortasi atau pemisahan kedelai kering dari batu kerikil, ranting, biji lain, dan benda-benda asing yang menempel pada kedelai. Selanjutnya kedelai dibersihkan dengan dilakukan pencucian agar bersih dari debu, kulit kedelai yang terkelupas, dan kotoran lainnya. Pengulangan proses pencucian

dapat dilakukan, bergantung dari kondisi kedelai. Kedelai yang telah dicuci kemudian dilakukan perendaman pertama selama kurang lebih 10-12 jam, untuk selanjutnya dilakukan proses perebusan kedelai. Perebusan kedelai dilakukan selama 30 menit dalam air mendidih (100°C) agar kedelai menjadi lunak dan kulit kedelai menjadi mudah terlepas. Perebusan kedelai setelah proses perendaman akan menghilangkan kontaminan biologi serta membantu melepaskan zat-zat yang diperlukan oleh kapang tempe selama proses fermentasi (Rahayu *et al.*, 2015). Kadar oligosakarida pada kedelai penyebab perut kembung juga akan berkurang selama proses perebusan (Ferreira *et al.*, 2011). Pengupasan kedelai dilakukan setelah perebusan pertama sehingga lebih mudah dilakukan. Berdasarkan standar CODEX, pengupasan kedelai diperlukan karena keberadaan kulit kedelai pada tempe yang telah jadi akan memicu timbulnya kontaminan (Food & Agriculture Organization-World Health Organization, 2017). Pengupasan kedelai dilakukan menggunakan alat pengupas kedelai.

Kemudian, dilakukan perendaman kedua selama sekitar 18-24 jam, kemudian dicuci kembali. Kondisi asam akan dihasilkan (mencapai pH 4,85) dapat menghambat pertumbuhan patogen penyebab pembusukan (Ahnan-Winarno *et al.*, 2021), selain itu, kondisi asam juga memungkinkan adanya pertumbuhan *Rhizopus sp* dengan baik nantinya karena kedelai bersifat lebih asam (Marsetyawan, 2012). Selanjutnya dilakukan perebusan/pemasakan kedua kedelai selama kurang lebih 15 menit, dilanjutkan penirisan kedelai ditunggu mendingin hingga mencapai suhu kamar selama 1-2 jam. Kedelai yang telah mencapai suhu ruang selanjutnya dilakukan inokulasi dengan diberi ragi tempe yang masih aktif. Penambahan ragi sebanyak 0,2% dari berat kedelai, yaitu 0,2 gram per 100 gram kedelai, dilakukan pencampuran hingga ragi tempe merata pada kedelai. Diberi tambahan tepung daun kelor masing-masing perlakuan, kemudian diaduk kembali hingga merata.

Setelah inokulasi dan penambahan tepung kedelai, selanjutnya dilakukan pengemasan menggunakan kemasan plastik tempe yang telah diberi lubang-lubang kecil untuk aerasi kapang tempe (Harahap *et al.*, 2018). Dilanjutkan proses pemeraman/fermentasi pada suhu sekitar 30-37°C dengan lama waktu fermentasi sesuai perlakuan. Fermentasi akan terjadi beberapa jam setelah proses inokulasi dan pengemasan. Pada proses fermentasi, benang-benang hifa *Rhizopus sp* akan

terbentuk dan menjalin kedelai satu sama lain, menjadikan kedelai memiliki struktur solid, lunak, dan memiliki warna putih (Safitry *et al.*, 2021)

3.6.2. Pembuatan Ekstrak Tempe

Sebanyak 200 gr tempe dihaluskan menggunakan blender, kemudian diekstraksi dalam waktu 24 jam menggunakan 200 mL etanol sekaligus disertai pengadukan. Ekstrak kemudian disaring. Residu hasil penyaringan diekstraksi kembali dengan cara yang sama selama 3x24 jam. Filtrat hasil penyaringan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C selama 30 menit. Proses ekstraksi juga dilakukan terhadap sampel dari masing-masing perlakuan.

3.6.3. Uji Flavonoid secara Kualitatif dan Kuantitatif

Uji flavonoid pada sampel bahan dilakukan dengan metode kualitatif dan metode kuantitatif. Metode kualitatif dilakukan untuk mengetahui suatu bahan mengandung senyawa flavonoid atau tidak. Pemeriksaan metode kuantitatif memiliki tujuan untuk mengetahui besarnya nilai flavonoid yang terkandung dalam suatu bahan.

a. Uji Flavonoid secara Kualitatif

Uji Flavonoid secara kualitatif dilakukan dengan menggunakan pereaksi yang ditambahkan pada sampel kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Berdasarkan (Ikalinus *et al.*, 2015), terdapat 3 pereaksi yang dapat digunakan untuk pemeriksaan adanya senyawa flavonoid: Pereaksi NaOH 10%, Pereaksi Wilstater, dan Pereaksi Bate Smite-Metcalf.

Untuk uji menggunakan pereaksi NaOH 10%, ekstrak ditambahkan dengan 1 mL etanol, kemudian ditambah 2-4 tetes pereaksi NaOH 10%, reaksi positif jika terjadi perubahan warna orange/jingga. Uji menggunakan pereaksi Wilstater yaitu, ekstrak dilarutkan dengan 1 mL etanol, kemudian ditambahkan 2-4 tetes HCl pekat ditambah serbuk Mg. Reaksi positif jika terjadi perubahan warna kuning/jingga. Kemudian, uji pereaksi Bate Smite-Metcalf, ekstrak dilarutkan dengan 1 mL etanol, kemudian ditambahkan 2-4 tetes HCl pekat kemudian dipanaskan. Reaksi positif jika berwarna jingga/merah. Sebagai pembanding, larutan kontrol positif dibuat dengan kuersetin dilarutkan menggunakan 1 mL etanol kemudian direaksikan dengan masing-masing pereaksi.

b. Uji Flavonoid secara Kuantitatif

Setelah diketahui ada tidaknya kandungan flavonoid pada sampel, kemudian dilakukan pemeriksaan dengan metode kuantitatif untuk bahan yang positif flavonoid. Pemeriksaan metode kuantitatif memiliki tujuan untuk mengetahui besarnya nilai flavonoid yang terkandung dalam suatu bahan. Metode kuantitatif dapat dilakukan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis dengan sebelumnya dilakukan preparasi sampel. Pemeriksaan kadar flavonoid berdasarkan penelitian Dhurhanian & Istantini (2020), diawali dengan langkah pembuatan larutan baku (10 ppm). Dipipet kuersetin 100 ppm sebanyak 1 mL kemudian ditambah 3 mL etanol; 0,2 mL AlCl₃ 10%; 0,2 mL KCH₃COO 1M, lalu ditambahkan dengan akuades hingga 10,0 mL.

Selanjutnya pembuatan larutan blanko, yaitu dipipet 3 mL etanol.; 0,2 mL AlCl₃ 10%; 0,2 mL KCH₃COO 1M, lalu ditambahkan dengan akuades hingga 10,0 mL. Kemudian dilakukan pengukuran *operating time*, yaitu diukur absorbansi larutan baku 10 ppm sehingga mendapatkan nilai absorbansi yang stabil. Setelah mendapatkan nilai absorbansi stabil, dilakukan pengukuran panjang gelombang maksimum dengan cara mengukur absorbansi larutan baku 10 ppm diukur panjang gelombang 400-500 nm.

Tahap selanjutnya yaitu pembuatan kurva baku. Dibuat larutan baku konsentrasi 6, 8, 10, 14 ppm, kemudian didiamkan 30 menit, lalu diukur masing-masing absorbansi pada panjang gelombang 425 nm. Langkah terakhir yaitu penetapan kadar flavonoid. Ekstrak tempe 0,05 mL, dilarutkan dengan etanol hingga 10 mL. Kemudian dipipet 4,0 mL ditambah dengan 3 mL etanol; 0,2 mL larutan AlCl₃ 10%; 0,2 mL KCH₃COO 1 M lalu ditambahkan dengan akuades hingga mencapai 10,0 mL. kemudian didiamkan 30 menit, lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 425 nm.

c. Analisis Kadar Senyawa Flavonoid

Kadar flavonoid dianalisis menggunakan persamaan regresi linier berdasarkan hasil data dari spektrofotometer UV-Vis. Data dihitung rata-rata kemudian ditetapkan sebagai hasil. Kadar flavonoid ditetapkan dengan satuan mg/L sampel.

$$Y = a + bX$$

Keterangan:

Y = % Inhibisi

a = Intercept (perpotongan garis di sumbu Y)

b = Slope (kemiringan)

X = Konsentrasi

3.6.4. Uji Kadar Antioksidan

Berdasarkan Erukainure (2011), besarnya Flavonoid berbanding lurus dengan aktivitas antioksidan. Untuk dapat diketahui nilai antioksidan pada sampel, dapat dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis. Pemeriksaan angka antioksidan diperlukan adanya pereaksi DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*). Pereaksi DPPH akan berperan sebagai radikal yang akan berikatan dengan antioksidan pada sampel.

Langkah awal, uji antioksidan sampel, yaitu, sebanyak 0,5 ml ekstrak kental tempe kelor dari masing-masing perlakuan, ditambah dengan etanol hingga 10 ml lalu dihomogenkan. Kemudian dilakukan analisis kadar antioksidan, masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 2 ml larutan sampel ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 ml larutan DPPH 50 ppm. Campuran dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 27°C. Nilai absorbansi sampel diukur dengan spektrofotometer UV - Vis pada panjang gelombang 517 nm (Tristantini et al., 2016).

Kadar antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase (%) inhibisi serapan DPPH dengan menggunakan rumus (Molyneux, 2004) :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(\text{Absorban blanko} - \text{Absorban sampel})}{\text{Absorban blanko}} \times 100\%$$

Keterangan:

1. Absorban blanko : Serapan radikal DPPH 50 ppm pada panjang gelombang maksimal (517 nm)
2. Absorban sampel : Serapan sampel dalam radikal DPPH 50 ppm pada panjang gelombang maksimal (517 nm).

3.7. Teknik dan Instrumen Pengukuran Data

Tabel 3.4 Teknik dan instrument pengukuran data

No	Variabel	Definisi Operasional	Teknik Pengambilan	Instrumen	Teknik Analisis
1.	Tepung Daun Kelor	Tepung Daun Kelor berasal dari tepung daun kelor jadi dengan merk dagang <i>Kelorina</i>	-	Wadah	Deskriptif Analisis
2.	Tempe tepung daun kelor	Pembuatan tempe yang diberi tambahan tepung daun kelor pada tahapan inokulasi	-	Wadah, Kompor, Panci, Inkubator	Deskriptif Analisis
3.	Kadar Flavonoid pada masing-masing perlakuan	Analisis total Flavonoid Tempe yang telah diberi perlakuan pemberian tepung daun kelor, menggunakan uji Absorbansi	Analisis secara kualitatif dan kuantitatif	Spektrofotometer UV-Vis	Deskriptif Analisis
4.	Kadar Antioksidan Tempe pada masing-masing perlakuan	Analisis Angka Antioksidan Tempe yang telah diberi perlakuan pemberian tepung daun kelor, menggunakan uji DPPH	Analisis secara kuantitatif	Spektrofotometer UV-Vis	Deskriptif Analisis

3.8. Teknik Analisis dan Penafsiran Data

Data yang diperoleh diuji terlebih dahulu normalitas dan homogenitasnya menggunakan Uji Shapiro-Wilk dan Uji Levene's Test. Jika data berdistribusi normal dan homogen selanjutnya dilakukan uji menggunakan ANAVA dua arah untuk mengetahui pengaruh perlakuan. Jika hasil F hitung $>$ F tabel atau nilai signifikan $<$ 0,05 , maka H_0 ditolak, mengindikasikan adanya pengaruh perlakuan terhadap variabel terikat, kemudian dilanjutkan dengan uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) pada taraf kepercayaan 95% untuk mengetahui perbedaan antara kombinasi perlakuan (Steel & Torrie, 1991).

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

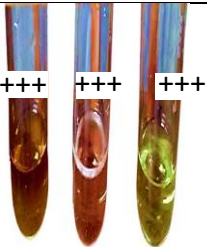


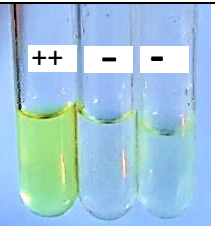


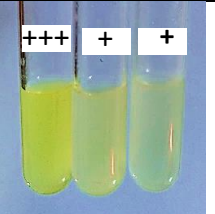
4.1 Flavonoid

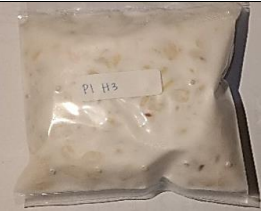
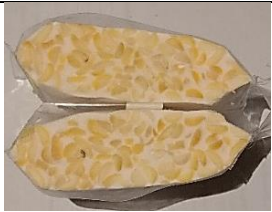
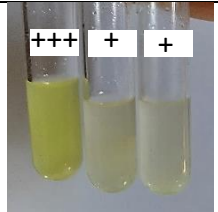


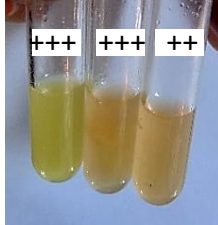


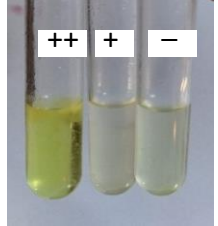
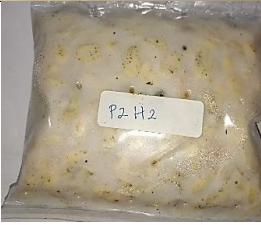

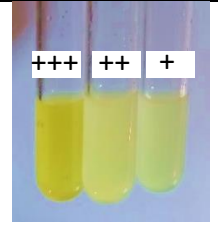
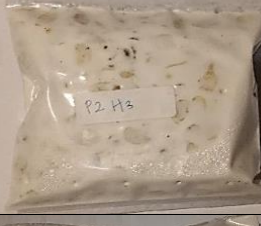

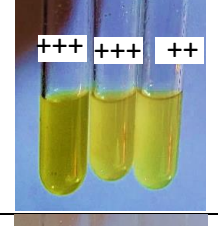

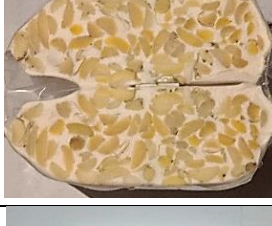
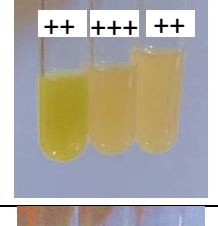


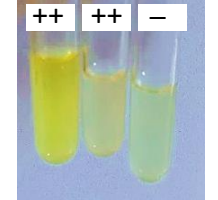
Berdasarkan pada laporan Arnanda & Nuwarda (2019), flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder golongan polifenol, memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang dapat menangkal senyawa radikal bebas. Pada penelitian ini, pemeriksaan flavonoid dilakukan secara kualitatif dan secara kuantitatif. Pemeriksaan flavonoid secara kualitatif dilakukan untuk mengetahui keberadaan senyawa flavonoid pada ekstrak sampel tempe yang diberi tambahan tepung daun kelor (*Moringa oleifera*). Pemeriksaan flavonoid secara kuantitatif dilakukan untuk mengetahui nilai kadar flavonoid pada sampel.



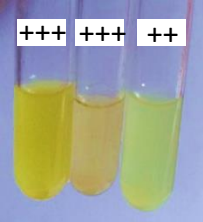
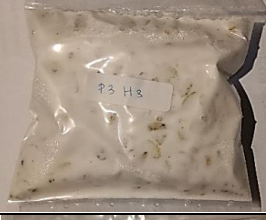


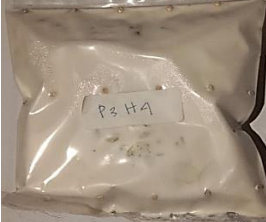

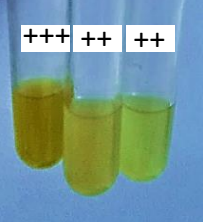


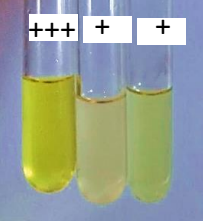


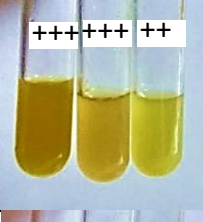


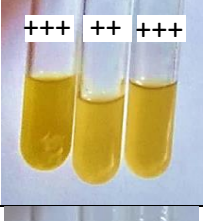
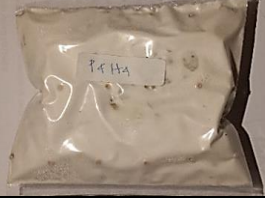

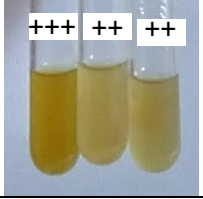
4.1.1. Uji Flavonoid secara Kualitatif

Data hasil pemeriksaan senyawa flavonoid ekstrak tempe yang diberi tambahan tepung daun kelor (*Moringa oleifera*) ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4. 1. Pemeriksaan sampel tempe dan flavonoid secara kualitatif

No	Perlakuan	Gambar Tempe		Uji NaOH10%, Wilstater, dan Bate Smite-Metcalfe
		Utuh	Dipotong Melintang	
1.	Kuersetin	-	-	 +++ +++ +++
2.	P₁H₁ (Tepung daun kelor 0%, fermentasi jam ke-0)			 ++ - -
3.	P₁H₂ (Tepung daun kelor 0%, fermentasi jam ke-24)			 +++ + +

<p>4. P₁H₃ (Tepung daun kelor 0%, fermentasi jam ke-36)</p>			
<p>5. P₁H₄ (Tepung daun kelor 0%, fermentasi jam ke-48)</p>			
<p>6. P₂H₁ (Tepung daun kelor 0,5%, fermentasi jam ke-0)</p>			
<p>7. P₂H₂ (Tepung daun kelor 0,5%, fermentasi jam ke-24)</p>			
<p>8. P₂H₃ (Tepung daun kelor 0,5%, fermentasi jam ke-36)</p>			
<p>9. P₂H₄ (Tepung daun kelor 0,5%, fermentasi jam ke-48)</p>			
<p>10. P₃H₁ (Tepung daun kelor 1%, fermentasi jam ke-0)</p>			

<p>11. P₃H₂ (Tepung daun kelor 1%, fermentasi jam ke-24)</p>			
<p>12. P₃H₃ (Tepung daun kelor 1%, fermentasi jam ke-36)</p>			
<p>13. P₃H₄ (Tepung daun kelor 1%, fermentasi jam ke-48)</p>			
<p>14. P₄H₁ (Tepung daun kelor 1,5%, fermentasi jam ke-0)</p>			
<p>15. P₄H₂ (Tepung daun kelor 1,5%, fermentasi jam ke-24)</p>			
<p>16. P₄H₃ (Tepung daun kelor 1,5%, fermentasi jam ke-36)</p>			
<p>17. P₄H₄ (Tepung daun kelor 1,5%, fermentasi jam ke-48)</p>			

Pada uji secara kualitatif terhadap sampel masing-masing perlakuan menunjukkan adanya perbedaan terhadap tekstur, kekompakan, serta pertumbuhan kapang *Rhizopus* pada sampel tempe. Pertumbuhan kapang *Rhizopus* cenderung lebih lambat pada sampel tempe tanpa tambahan daun kelor (P₁) dibandingkan pada sampel tempe yang diberi tambahan tepung daun kelor. Fermentasi ke 24 jam tempe tanpa tepung daun kelor (P₁H₂), terbentuk titik-titik uap air dan terjadi peningkatan suhu menjadi lebih hangat, pertumbuhan kapang *Rhizopus* belum terbentuk dengan baik, hifa yang terbentuk sangat tipis dan jarang, belum adanya kekompakan pada kedelai, dan tekstur kedelai padat. Pada fermentasi ke 36 jam (P₁H₃) terjadi peningkatan pertumbuhan *Rhizopus* dengan hifa terjalin melingkupi kedelai disertai peningkatan suhu dan kekompakan, dan tekstur kedelai menjadi lebih lunak. Pada fermentasi ke 48 jam (P₁H₄) terdapat adanya peningkatan hifa *Rhizopus* menjadi lebat dan berwarna putih pekat, tempe bersifat kompak, tekstur kedelai lunak.

Pertumbuhan kapang *Rhizopus* pada sampel tempe dengan tambahan tepung daun kelor cenderung lebih cepat dibandingkan sampel tempe tanpa tepung daun kelor. Pada waktu fermentasi 24 jam, sampel tempe yang diberi tambahan daun kelor 0,5%; 1%; dan 1,5% (P₂H₂, P₃H₂, P₄H₂) terjadi pertumbuhan kapang *Rhizopus* yang cukup baik disertai peningkatan suhu. Hifa yang terbentuk pada ketiga perlakuan tersebut terjalin dan kedelai cukup terlingkupi hifa namun renggang, dibandingkan pada perlakuan tanpa tepung daun kelor. Kekompakan sudah terbentuk meskipun tidak terlalu kuat, dan tekstur kedelai cenderung lebih lunak. Pada fermentasi 36 jam, pada ketiga perlakuan terdapat peningkatan pertumbuhan *Rhizopus* menjadi lebih lebat, tempe mulai terlihat berwarna putih dan kompak, serta tekstur menjadi lebih lunak. Pada fermentasi 48 jam, pertumbuhan *Rhizopus* sangat lebat, hifa sempurna melingkupi kedelai sehingga kedelai semakin kompak, dan tekstur kedelai lebih lunak dibandingkan sebelumnya. Pada irisan melintang sampel, terlihat adanya bitnik-bintik warna hijau tepung daun kelor, namun, pada fermentasi 48 jam, titik-titik warna hijau berkurang karena tepung daun kelor *Moringa oleifera* juga terfermentasi oleh *Rhizopus*. Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Djonu *et al.* (2018), daun *Moringa oleifera* dapat menjadi substrat fermentasi oleh *Rhizopus oligosporus* dan terjadi

biokonversi senyawa oleh adanya enzim-enzim yang dihasilkan kapang *Rhizopus* tersebut.

Hasil pemeriksaan flavonoid secara kualitatif menggunakan pereaksi NaOH10%, Wilstater, dan Bate Smite-Methcalfe ditunjukkan pada tabel. Senyawa flavonoid dengan NaOH10% dapat menimbulkan reaksi dekomposisi flavonoid membentuk asetofenon warna kuning-coklat (Astutiningsih, 2021). Pada uji Wilstater, penambahan HCl pekat dan serbuk Mg menghasilkan senyawa berwarna kuning/jingga-merah pada ekstrak yang mengandung flavonoid (Sudira et al., 2019). Flavonoid, direaksikan menggunakan HCl pekat (pada uji Bate Smith-Metchalf) menghasilkan garam flavilium ditunjukkan oleh warna kuning atau jingga (Achmad, 1986; Lindawati, 2018).

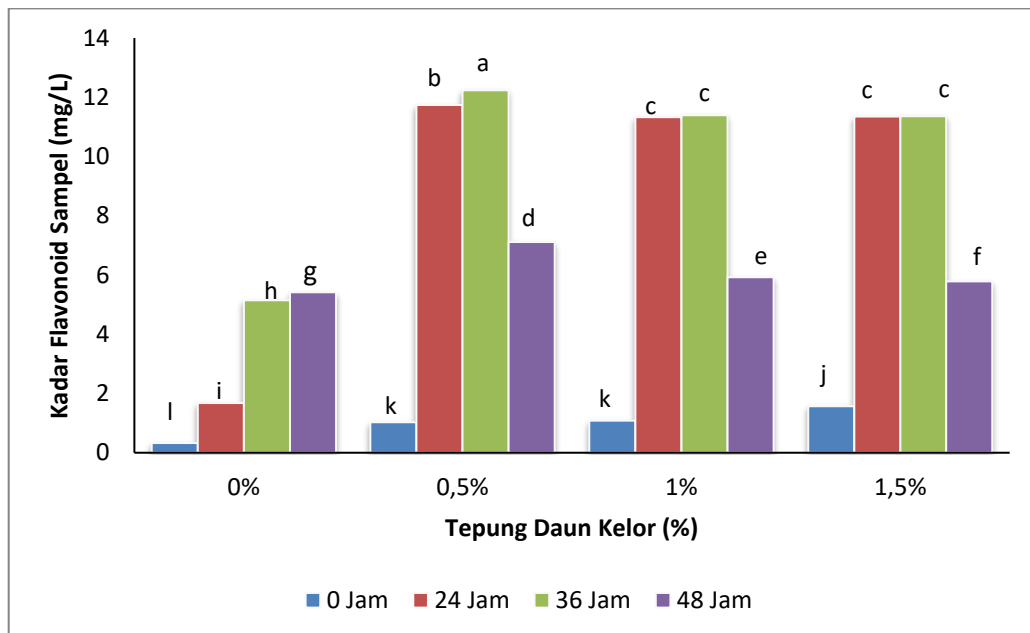
Pada tabel, ditunjukkan bahwa kontrol positif yaitu larutan kuersetin, menunjukkan perubahan warna menjadi jingga, merah, dan kuning pada pereaksi NaOH10%, Wilstater, dan Bate-Smith-Metchalf. Pada hasil pemeriksaan flavonoid secara kualitatif pada sampel, ditunjukkan adanya perubahan warna pada masing-masing sampel. Pada perlakuan fermentasi ke 0 sampel menunjukkan positif flavonoid namun bersifat sangat lemah, serta terdapat perbedaan antara masing-masing perlakuan konsentrasi, yaitu pada 0% (P_1H_1) yaitu ditunjukkan pada perubahan warna kuning hanya pada pereaksi NaOH10%, sedangkan pada konsentrasi 0,5%; 1%; dan 1,5% perubahan warna terjadi pada 2 hingga 3 pereaksi namun dengan warna yang lemah.

Pada uji kualitatif flavonoid sampel perlakuan fermentasi 24 jam konsentrasi 0%, 0,5% (P_2H_1 , P_2H_2) warna sedikit pekat, mengindikasikan flavonoid lemah, kemudian pada sampel konsentrasi 1%; dan 1,5% (P_2H_3 , P_2H_4) warna lebih pekat, mengindikasikan flavonoid kuat dengan nilai positif pada ketiga pereaksi. Pada sampel perlakuan fermentasi 36 jam konsentrasi 0% (P_3H_1) flavonoid bersifat lemah ditunjukkan oleh warna yang tidak terlalu pekat, sedangkan pada perlakuan 0,5%; 1%, 1,5% (P_3H_2 , P_3H_3 , P_3H_4) flavonoid bersifat kuat, dengan nilai positif di ketiga pereaksi ditunjukkan oleh kepekatan warna yang dihasilkan. Nilai paling baik pada perlakuan fermentasi 36 jam yaitu pada sampel konsentrasi 1% (P_3H_3) dan konsentrasi 1,5% (P_3H_4). Pada sampel perlakuan fermentasi 48 jam semua konsentrasi flavonoid tergolong kuat ditunjukkan oleh nilai positif di semua reaksi,

namun pada konsentrasi 0,5%; 1%; & 1,5% (P₂H₄; P₃H₄; P₄H₄) nilai positif menurun ditunjukkan adanya kepekatan warna yang menurun sedangkan pada konsentrasi 0% (P₁H₄) nilai positif naik ditunjukkan adanya kepekatan warna.

4.1.2. Uji Flavonoid secara Kuantitatif

Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum larutan kuersetin menggunakan Spektrofotometer UV-Vis diperoleh nilai absorbansi 425 nm. Persamaan regresi linear yang diperoleh yaitu $y = 0.0559x + 0.1124$. Penentuan kadar flavonoid masing-masing sampel berdasarkan nilai absorbansi dan persamaan regresi linear yaitu diperoleh nilai kadar flavonoid ditunjukkan sebagai berikut,



Gambar 4.2 Kadar flavonoid tempe variasi konsentrasi tepung daun kelor dan lama waktu fermentasi

Berdasarkan hasil analisis ANOVA dua arah (lampiran), diperoleh nilai signifikansi (p-value) <0,05 yaitu sebesar 0,000. Sehingga diketahui bahwa H₀ ditolak, dan H₁ diterima, yang berarti terdapat pengaruh antara variabel independen terhadap variabel dependen. Hal tersebut menunjukkan bahwa banyaknya konsentrasi tepung daun kelor dan lama waktu fermentasi tempe pada penelitian ini berpengaruh terhadap kadar flavonoid yang dihasilkan.

Dari gambar terlihat bahwa data kadar flavonoid terendah terdapat pada perlakuan P₁H₁ (konsentrasi tepung daun kelor 0% pada lama fermentasi 0 Jam) yaitu 0,323 mg/L (l). Flavonoid pada perlakuan tersebut memiliki kadar yang

rendah. Pada penelitian Barus *et al.* (2019) proses pemasakan pada pra-fermentasi tempe yaitu 2x perebusan menurunkan kadar flavonoid “bawaan” pada kedelai sehingga kadar flavonoid menjadi sangat rendah. Pada penelitian ini, pengaruh yang sama terjadi pada sampel dengan perlakuan fermentasi 0 jam, namun adanya penambahan tepung daun kelor dapat berpengaruh meningkatkan kadar flavonoid (Djonu *et al.* 2018). Proses pemasakan pra-fermentasi dan tanpa adanya penambahan tepung daun kelor (perlakuan P₁H₁) menyebabkan sampel tersebut memiliki kadar flavonoid paling rendah pada penelitian ini.

Kadar flavonoid tertinggi yaitu pada perlakuan P₂H₃ (penambahan tepung daun kelor 0,5%, pada lama fermentasi 36 jam), yaitu 12.238 mg/L (a). Kadar flavonoid meningkat setelah proses fermentasi karena proses fermentasi mempengaruhi perubahan senyawa tertentu (Barus *et al.* 2019). Berdasarkan laporan Yoneya (2009), tempe mencapai lama waktu fermentasi optimal yaitu pada 36 jam. Kapang *Rhizopus sp* pada fermentasi tempe dapat menghasilkan enzim β -glukosidase yang dapat mengubah glikosida menjadi bentuk aglikonnya, menyebabkan terjadi peningkatan kandungan senyawa flavonoid (Sulistiani *et al.*, 2014; Dhurhanian & Istantini, 2021). Sehingga, pembentukan flavonoid oleh *Rhizopus* paling optimal pada kondisi fermentasi 36 jam. Penambahan tepung daun kelor juga berpengaruh meningkatkan flavonoid pada sampel. *Rhizopus* dapat menyebabkan biokonversi senyawa pada daun kelor (*Moringa oleifera*) menjadi senyawa flavonoid oleh enzim β -glukosidase yang terdapat pada *Rhizopus* (Djonu *et al.* 2018).

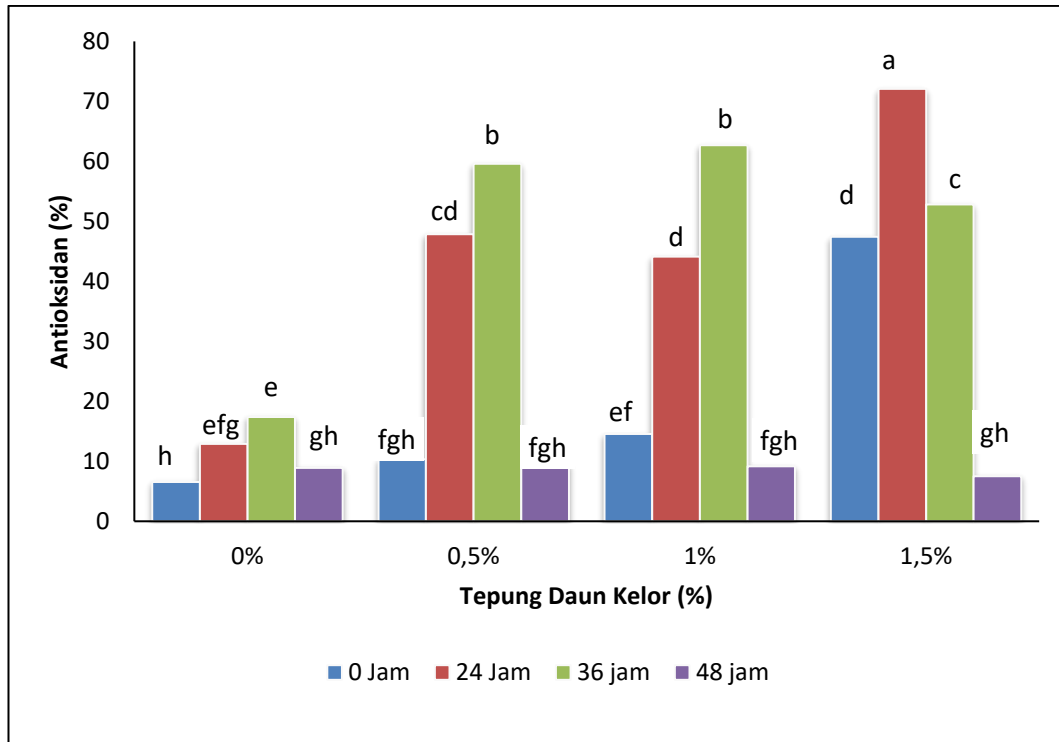
Pada sampel perlakuan lama waktu fermentasi 36 jam tanpa pemberian tepung daun kelor (P₁H₃), diperoleh kadar flavonoid yang lebih rendah yaitu 5,144 mg/L (g). Pada sampel perlakuan pemberian tepung daun kelor konsentrasi 1% (P₃H₃) dan 1,5% (P₄H₃) menghasilkan nilai cukup tinggi dengan pengaruh yang sama, yaitu diperoleh 11,397 mg/L (c) dan 11,36 mg/L (c). Nilai tersebut lebih rendah dibandingkan lama fermentasi P₂H₃. Penambahan tepung daun kelor dengan konsentrasi semakin tinggi menyebabkan pertumbuhan *Rhizopus* semakin cepat. Pertumbuhan *Rhizopus* yang cepat cenderung dapat menimbulkan adanya aktivitas oksidasi yang cukup tinggi pada kapang *Rhizopus*. Berdasarkan laporan Phaniendra *et al.* (2015), proses respirasi sel oleh mitokondria dapat menghasilkan hasil

samping senyawa radikal bebas berasal dari oksigen, yaitu ROS (reactive oxygen species). Flavonoid merupakan salah satu senyawa yang bersifat antioksidan, memiliki kemampuan berinteraksi dengan ROS melalui gugus fenolik aktif redoks yang dimilikinya, sehingga sel dapat terhindar dari stress oksidatif atau membuat sel secara metabolik lebih mampu menghadapinya (Speisky *et al.*, 2022). Hal tersebut juga menimbulkan adanya penurunan kadar flavonoid pada sampel perlakuan fermentasi 48 jam.

4.2 Antioksidan

Berdasarkan laporan Aryal *et al.* (2019), senyawa flavonoid memiliki sifat antioksidan karena gugus hidroksi yang dimilikinya dapat menjadi pendonor elektron dengan baik. Pada penelitian ini, dilakukan pengukuran antioksidan ekstrak tempe yang diberi tambahan tepung daun kelor dengan metode DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Antioksidan akan menetralkan radikal DPPH dengan cara mendonorkan atom hidrogennya terhadap radikal DPPH (Kurnia *et al.*, 2021). Larutan kuersetin yang ditambahkan dengan DPPH berfungsi sebagai kontrol positif karena senyawa kuersetin termasuk golongan flavonoid, memiliki gugus hidroksil yang dapat berperan sebagai antioksidan sehingga dapat mendeteksi besarnya absorbansi DPPH dalam mereduksi antioksidan.

Kadar antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase (%) inhibisi serapan DPPH dengan menggunakan rumus (Molyneux, 2004). Hasil pengukuran menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm (Tristantini *et al.*, 2016) yaitu diperoleh nilai absorbansi larutan kontrol dan absorbansi sampel sehingga diketahui kadar antioksidan sebagai berikut:



Gambar 4.3 Kadar antioksidan tempe variasi konsentrasi tepung daun kelor dan lama waktu fermentasi

Dari hasil analisis ANOVA dua arah (lampiran), diperoleh nilai signifikansi (p -value) $<0,05$ yaitu sebesar 0,000. Sehingga diketahui bahwa H_0 ditolak, dan H_1 diterima, yang berarti terdapat pengaruh antara variabel independen terhadap variabel dependen. Hal tersebut menunjukkan bahwa banyaknya konsentrasi tepung daun kelor dan lama waktu fermentasi tempe pada penelitian ini berpengaruh terhadap kadar antioksidan yang dihasilkan.

Berdasarkan gambar, data kadar antioksidan terendah terdapat pada perlakuan P_1H_1 (konsentrasi tepung daun kelor 0% pada lama fermentasi 0 Jam) yaitu 6.57 % (h). Proses pemasakan pada pra-fermentasi tempe yaitu 2x perebusan menurunkan kadar antioksidan yang ada pada kedelai sehingga kadar antioksidan menjadi rendah, kemudian antioksidan akan meningkat setelah proses fermentasi menjadi tempe (Barus *et al.*, 2019). Proses 2x pemasakan sebelum fermentasi tempe dan tanpa adanya penambahan tepung daun kelor (P_1H_1) menyebabkan kadar antioksidan sampel perlakuan tersebut paling rendah pada penelitian ini.

Kadar antioksidan tertinggi yaitu pada perlakuan P_4H_2 (penambahan tepung daun kelor 1,5%, pada lama fermentasi 24 jam), yaitu 72.06% (a). Penambahan tepung daun kelor pada tempe dapat meningkatkan kadar antioksidan. Flavonoid

merupakan salah satu jenis senyawa bersifat antioksidan. Antioksidan pada *Moringa oleifera* tidak hanya berasal dari senyawa flavonoid, namun dapat berasal dari berbagai senyawa lain. Pada moringa terdapat berbagai senyawa yang dapat berperan sebagai antioksidan seperti asam askorbat, flavonoid, fenolik, dan karotenoid (Penalver *et al.*, 2022). Semakin tinggi konsentrasi daun kelor yang ditambahkan menyebabkan semakin tinggi kadar senyawa yang bersifat antioksidan. Proses fermentasi oleh kapang *Rhizopus sp* pada tempe dapat meningkatkan antioksidan oleh adanya enzim yang berperan dalam biokonversi senyawa pada tempe. Pemberian tepung daun kelor dengan konsentrasi paling tinggi (1,5%) dengan adanya proses fermentasi (P₄H₂) menyebabkan sampel perlakuan tersebut memiliki kadar antioksidan paling tinggi pada penelitian ini. Namun kadar antioksidan menurun pada waktu fermentasi berikutnya (P₄H₃ dan P₄H₄). Terdapat proses oksidasi pada proses fermentasi tempe karena pertumbuhan *Rhizopus* yang sangat cepat pada sampel tersebut. Respirasi sel makhluk hidup oleh mitokondria, misalnya pada kapang *Rhizopus*, dapat menghasilkan hasil samping senyawa radikal bebas berasal dari oksigen, yaitu ROS (reactive oxygen species) (Phaniendra *et al.*, 2015), yang memanfaatkan antioksidan yang terbentuk. Berdasarkan penelitian oleh Phaniendra *et al.* (2015) juga dilaporkan bahwa radikal anion superoksida merupakan ROS yang banyak terbentuk oleh proses enzimatik, reaksi autooksidasi, dan reaksi transfer elektron non enzimatik dimana electron ditransfer ke molekul oksigen. Flavonoid, salah satu senyawa yang bersifat antioksidan, memiliki kemampuan berinteraksi dengan ROS melalui gugus fenolik aktif redoks yang dimilikinya, sehingga sel dapat terhindar dari stress oksidatif atau membuat sel secara metabolik lebih mampu menghadapinya (Speisky *et al.*, 2022). Hal tersebut juga menyebabkan terjadinya penurunan kadar antioksidan secara drastis pada perlakuan lama waktu fermentasi 48 jam.

BAB V

PENUTUP

5.1 Simpulan

1. Penambahan tepung daun kelor (*Moringa oleifera*) pada fermentasi tempe berpengaruh terhadap kadar flavonoid
2. Penambahan tepung daun kelor (*Moringa oleifera*) pada fermentasi tempe berpengaruh terhadap kadar antioksidan
3. Kadar flavonoid pada sampel tempe tanpa pemberian tepung daun kelor fermentasi 0 jam sebesar 0,323 mg/L dan kadar antioksidan sebesar 6,57%. Kadar flavonoid tertinggi diperoleh pada tempe perlakuan penambahan tepung daun kelor konsentrasi 1% pada waktu fermentasi 36 jam sebesar 12.238 mg/L. Kadar antioksidan tertinggi yaitu pada perlakuan penambahan tepung daun kelor konsentrasi 1,5% pada waktu fermentasi 24 jam sebesar 72,06 %.

5.2 Saran

Diperlukan penelitian mengenai uji kadar flavonoid dan antioksidan pada tempe dengan penambahan tepung daun kelor (*Moringa oleifera*) rentang variasi konsentrasi yang lebih banyak, mulai dari konsentrasi 0%, 1%, 2%, 3%, dan seterusnya untuk mengetahui kadar flavonoid dan antioksidan terbaik pada tempe yang diberi tambahan tepung daun kelor dan kualitas tempe yang dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S.A.1986.*Kimia Organik Bahan Alam*. Karunika: Jakarta.
- Adebayo, A. H., Zeng, G. Z., Fan, J. T., Ji, C. J., He, W. J., Zhang, Y. M., Akindahunsi, A. A., Kela, R., & Tan, N.H. (2010). Biochemical, Haematological and Histopathological Studies of Extract of *Ageratum conyzoides* L in *Sprague Dawleys* Rats. *J. Med. Plant Res.*, 4(21): 2264-2272
- Abdel-Hameed, Usama, K. (2015). Molecular Phylogenetics of Moringaceae Martinov with Emphasis on Ethnomedicinal Plant *Moringa oleifera* Lam. Grown in Egypt. *Scholars Academic Journal of Biosciences (SAJB)* 3(2A):139-142
- Ahnan-Winarno, A. D., Cordeiro, L., Winarno, F. G., Gibbons, J., & Xiao, H. (2021). Tempeh: A semicentennial review on its health benefits, fermentation, safety, processing, sustainability, and affordability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 1717–1767. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12710>
- Ansarullah, Alfia., Hardinsyah., Marliyati, Sri Anna., & Astawan Made. (2018). IPB Researchers Made Tempeh Beverage for Hypertension Patients. Diakses pada 13 Juli 2023, dari <https://ipb.ac.id/news/index/2018/01/ipb-researchers-made-tempeh-beverage-for-hypertension-patients/b899bf01383b6718059b1e15f89594dc>
- Aoki, H., Chuma, S., Iba, Y., Tashiro, H., Watanabe, N., & Oyama, H. (2020). Comparison of bioactive components in tempeh produced by three different rhizopus starters and immunomodulatory effect of tempeh on atopic dermatitis mice. *Food Science and Technology Research*, 26(5), 665–672. <https://doi.org/10.3136/fstr.26.665>
- Arnanda, Q. P., & Nuwarda, R. F. (2019). Penggunaan radiofarmaka teknisium-99M dari senyawa glutation dan senyawa flavonoid sebagai deteksi dini radikal bebas pemicu kanker. *Farmaka Suplemen*, 14(1), 1–15. <https://jurnal.unpad.ac.id/farmaka/article/download/22071/pdf>
- Aruben, N. W. (2012). Peningkatan konsentrasi senyawa fenol antioksidan dari dedak dengan cara fermentasi. Artikel Ilmiah Universitas Diponegoro.
- Astawan, M., Wresdiyati, T., Widowati, S., Bintari, S. H., & Ichsani, N. (2013). Karakteristik fisikokimia dan sifat fungsional tempe yang dihasilkan dari berbagai varietas kedelai. *Jurnal Pangan*, 22(3), 241–252.
- Astutiningsih, C. (2021). Isolasi dan Uji Penghambatan Alpa Amilase Senyawa Kuersetin Dari Buah Okra (*Abelmoschus esculentus* L) . *Jurnal Farmasi Sains dan Praktis* 7(3), 356–364.
- Atawodi S.E., Atawodi J.C., Idakwo G.A., Pfundstein B., Haubner R., Wurtele G., Bartsch H., Owen R.W.(2009). Evaluation of the polyphenol content and antioxidant properties of methanol extracts of the leaves, stem, and root barks

- of *Moringa oleifera* Lam. *J. Med. Food.* 2010;13:710–716. doi: 10.1089/jmf.2009.0057.
- Azizah, D. N., Kumolowati, E., & Faramayuda, F. (2014). Penetapan Kadar Flavonoid Metode AlCl₃ Pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.). *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi*, 2(2), 45–49. <https://doi.org/10.26874/kjif.v2i2.14>
- Barus, T., Titarsole, N. N., Mulyono, N., & Prasasty, V. D. (2019). Tempeh Antioxidant Activity using DPPH Method: Effects of Fermentation, Processing, and Microorganisms. *Journal of Food Engineering and Technology*, 8(2), 75–80. <https://doi.org/10.32732/jfet.2019.8.2.75>
- Berkovich, L., Earon, G., Ron, I., Rimmon, A., Vexler, A., & Lev-Ari, S. (2013). *Moringa Oleifera* aqueous leaf extract down-regulates nuclear factor-kappaB and increases cytotoxic effect of chemotherapy in pancreatic cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-212>
- Bintari, S. H., Putri, M. F., Saputro, D. D., Suwahyo, Parman, S., & Sunyoto. (2020). The potential effect of high flavonoid soybean diversification products through tempe flour substitution. *Journal of Physics: Conference Series*, 1567(3). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1567/3/032057>
- Chotimah, C. (2019). Uji total flavonoid dan aktivitas aktioksidan dan ekstrak daun dan kulit batang dadap serep (*Erythrina subumbrans* (Hassk.) Merr.) menggunakan pelarut yang berbeda. In *Skripsi Fakultas Sains Dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang* (Issue 9). <http://etheses.uin-malang.ac.id/17774/>
- Dhurhanian, C. E., & Istantini, E. (2021). Analisis Kadar Flavonoid Total Tempe Kedelai Secara Spektrofotometri Visibel. *Media Farmasi: Jurnal Ilmu Farmasi*, 17(2), 72. <https://doi.org/10.12928/mf.v17i2.19747>
- Djonu, Asriati., Andayani, Sri., Nursyam, Happy.(2018). Identification Of *Moringa Oleifera* Leaves Content Fermented By *Rhizopus Oligosporus*. *International Journal of Scientific & Technology Research*. Vol 7, Issue 4, April 2018
- Erukainure, O.L., Oke, O.V., & Ajiboye A.J. (2011). Nutritional Qualities and Phytochemical Constituents of *Clerodendrum Volubile*, A Tropical Nonconventional Vegetable. *International Food Research Journal*. 18(4)
- Fachriyah, E., Kusriani, D., Haryanto, I. B., Wulandari, S. M. B., Lestari, W. I., & Sumariyah, S. (2020). Phytochemical Test, Determination of Total Phenol, Total Flavonoids and Antioxidant Activity of Ethanol Extract of *Moringa* Leaves (*Moringa oleifera* Lam). *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*, 23(8), 290–294. <https://doi.org/10.14710/jksa.23.8.290-294>
- Fauziah, AI Padhilah. Supriadin, Asep., Junitasari, Assyifa.(2022). Analisis Pengaruh Konsentrasi Ragi dan Waktu Fermentasi terhadap Nilai Gizi dan Aktivitas Antioksidan Tempe Kedelai Kombinasi Kacang Roay (*Phaseolus*

lunatus L). Prosiding Seminar Nasional Kimia. Vol.15

- Ferreira, M. (2011). Changes in the Isoflavone Profile and in the Chemical Composition of Tempeh During Processing and Refrigeration. *Pesq Agropec Bras.* 46(11): 1555-1561
- Food and Agriculture Organization-World Health Organization.(2017). *Regional Standard for Tempe.* FAO-WHO Codex Alimentarius
- Gopalakrishnan, L., Doriya, K., & Kumar, D. S. (2016). Moringa oleifera: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science and Human Wellness*, 5(2), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.04.001>
- Hani, R. C., & Milanda, T. (2021). Review: Manfaat antioksidan pada tanaman buah di Indonesia. *Farmaka*, 18(1), 53–59.
- Haron, Hasnah., A,Ismail., Azlan, Azrina., Shahar, Suzana.(2009).Daidzein and Genestein Contents in Tempeh and Selected Soy Products. *Food Chemistry.* 115(4):1350-1356
- Ikalinus, R., Widyastuti, S. K., & Setiasih, N. L. E. (2015). Skrining fitokimia ekstrak Etanol kulit batang kelor (*Moringa oleifera*). *Indonesia Medicus Veterinus*, 4(1), 71–79. <https://ojs.unud.ac.id/index.php/imv/article/view/15445>
- Ipandi, I., Triyasmono, L., & Prayitno, B. (2016). Penentuan Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kajajahi (*Leucosyke capitellata* Wedd.). *Jurnal Pharmascience*, 5(1), 93–100.
- Jangu, Elisabet Burga., Sipahelut, Geertruida Margaret., Sulmiyati, S.(2023).Efek Penambahan Tepung Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Karakteristik Organoleptik dan Aktivitas Antioksidan Budik. *Journal of Animal Science (JAS)*. Vol. 8 No. 2 April 2023
- John, Biju., Reddy, VRK., CT, Sulaiman. (2013). Total Phenolics and Flavonoids in Selected Justicia Species. *Journal of Pharmacognosy.* 2(4): 51-52
- Jubaidah, S. et al.(2016). Penetapan Kadar Protein Tempe Jagung (*Zea mays* L .) Dengan Kombinasi Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill. *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 2(1),pp. 111–119
- Kamboj , A., et al. (2015). Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from Extract of *Terminalia bellerica*. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences.* 2(3): 201-215.
- Kameda, T., Aoki, H., Yanaka, N., Kumrungsee, T., & Kato, N. (2018). Production of isoflavone aglycone-enriched tempeh with *rhizopus stolonifer*. *Food Science and Technology Research*, 24(3), 493–499. <https://doi.org/10.3136/fstr.24.493>
- Ketaren, S. (2005). *Minyak dan Lemak Pangan*. Jakarta: UI Press

- Khaira, K. (2010). Menangkal radikal bebas dengan anti-oksidan. In *Jurnal Sainstek* (Vol. 2, pp. 183–187).
- Krisnadi, A.D. (2013). *Pengolahan Serbuk Daun Kelor*. Kelorina. Diakses pada 13 Juli 2023 dari <https://kelorina.com/pengolahan-serbuk-daun-kelor/>
- Kurnia, K., Yunus, M., & Herawati, N. (2021). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Rambut Jagung (*Zea mays* L.) dengan Menggunakan Metode 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). *Chemica: Jurnal Ilmiah Kimia Dan Pendidikan Kimia*, 22(2), 69. <https://doi.org/10.35580/chemica.v22i2.26210>
- Kurniadi, M., Andriani, M., Sari, I. I., Angwar, M., Nurhayati, R., Khasanah, Y., & Wiyono, T. (2017). Nutritional and sensory characteristics of sari tempe formulated from import soybean (glycine max). *AIP Conference Proceedings*, 1788(January), 3–10. <https://doi.org/10.1063/1.4968351>
- Lako J., Trenerry V.C., Wahlqvist M., Wattanapenpaiboon N., Sotheeswaran S., Premier R. (2007). Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chem.* 101:1727–1741. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.01.031
- Lehninger A.L. (1982). *Dasar-Dasar Biokimia, Jilid 2*. Jakarta: Erlangga
- Lindawati, N. Y. (2018). Determination of Total Flavonoid Level on Leaf Stalks Ethanol Extract of Taro (*Colocasia esculenta* [L.]Schott). *Jurnal Farmasi (Journal of Pharmacy)*, 1(1), 58–66. <https://doi.org/10.37013/jf.v1i1.65>
- Mahmood KT, Mugal T, and Ul Haq I.(2010). *Moringa oleifera*: a natural gift - A review. *J Pharm Sci Res.* 2010;2(11):775-781
- Mallenakuppe, R., Homabalegowda, H., Gouri, M. D., Basavaraju, P. S., & Chandrashekharaiyah, U. B. (2019). History, taxonomy and propagation of *Moringa oleifera*-A review. *SSR Institute of International Journal of Life Sciences*, 5(3), 2322–2327. <https://doi.org/10.21276/ssr-ijls.2019.5.3.7>
- McAlpine, J. B., & Hochlowski, J. E. (1989). Countercurrent chromatography. *Journal of Chromatography Library*, 43(C), 1–53. [https://doi.org/10.1016/S0301-4770\(08\)60392-9](https://doi.org/10.1016/S0301-4770(08)60392-9)
- Neldawati, R., Gusnedi. (2013). Analisis Nilai ABSorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid untuk Berbagai Jenis Daun Tanaman Obat. *Pillar of Physics*. Vol. 2: 76-83
- Nout, M.R.J., Kiers, J.L.(2005). Tempe Fermentation, Innovation and Functionality: Update Into the Third Millenium. *Journal Applied Microbiology International*. Vol 98(4). 789-805
- Nout, M.J.R., Martoyuwono, T.D., Bonne, P.C.J.,Odamtten, G.T.(1992). Hibiscus leaves for the manufacture of usar, a traditional inoculum for tempe. *J Sci Food Agric*, 58, 339-346

- Olmedilla-A, Begoña, F.J-Colmenero & F.J. Sánchez Muniz. (2013). Development and Assessment of Healthy Properties of Meat and Meat Product Designed as Functional Foods. *Meat Science*. 95(4): 919-930.
- Pandit, N.T. & Patravale, V.B.(2011). Design and Optimization of a Novel Method for Extraction of Genistein. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 73(2):184-192. <http://dx.doi.org/10.4103/0250-474X.91583>
- Penalver Rocio., Martinez-Zamora, L., Lorenzo, J.M., Ros, G., Nieto, G.(2022). Nutritional and Antioxidant Properties of Moringa oleifera Leaves in Functional Foods. *Foods*. 11(8): 1107.
- Phaniendra, A., Jestadi, D.B., dan Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J Clin Biochem*. 2015 Jan; 30(1): 11–26
- Rahayu, W. P., Pambayun, R., Santoso, U., Nuraida, L., & Ardiansyah. (2015). *Tinjauan ilmiah teknologi pengolahan tempe kedelai* (1st ed.). Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia (PATPI). <http://repository.bakrie.ac.id/774/1/B.1>. Monograf_Tinjauan ilmiah Proses Pengolahan Tempe.pdf
- Raja, R., M. Sreenivasulu, S., Vaishnavi, D. M. Navyasri, G. Samatha, S. Geethalakshmi. (2016). Overview an *Moringa oleifera*. *Research and Analysis Journal of Applied Research*. 2(9): 620-624.
- Redi Aryanta, I. wayan. (2020). Manfaat tempe untuk kesehatan. *Widya Kesehatan*, 2(1), 44–50. <https://doi.org/10.32795/widyakesehatan.v2i1.609>
- Riciputi, Y., Serrazanetti, D. I., Verardo, V., Vannini, L., Caboni, M. F., & Lanciotti, R. (2016). Effect of fermentation on the content of bioactive compounds in tofu-type products. *Journal of Functional Foods*, 27, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.041>
- Safitry, A., Pramadani, M., Febriani, W., Achyar, A., & Fevria Biologi, R. (2021). Uji Organoleptik tempe dari kacang kedelai (*Glycine max*) dan kacang merah (*Phaseolus vulgaris*). *Prosiding SEMNAS BIO, Inovasi Riset Biologi Dalam Pendidikan Dan Pengembangan Sumber Daya Lokal*, 358–368.
- Sayuti, K; Yenrina, R. (2015). *Antioksidan Alami dan Sintetik*. Andalas University Press: Padang
- Sinaga, F. A. (2016). Stress oksidatif dan status antioksidan pada aktivitas fisik maksimal. *Jurnal Generasi Kampus*, 9(2), 176–189. <https://jurnal.unimed.ac.id/2012/index.php/gk/article/view/7823>
- Sinaga, H., Purba, R. A., & Nurminah, M. (2019). Pengaruh penambahan tepung daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam pembuatan kue onde-onde ketawa menggunakan tepung mocaf. *JFLS*, 3(1), 29–37.
- Sinaga, E.F., Langi, Tineke M., Koapaha. (2022). Pengaruh Penambahan Tepung

Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Sifat Organoleptik dan Kimia Nugget Tempe. *Jurnal Unsrat*

- Soeksanto, A., Hapsari, Y., & Simanjuntak, P. (2007). Antioxidant content of parts of Mahkota dewa, *Phaleria macrocarpa* [Scheff] Boerl. (Thymelaceae). *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 8(2), 92–95. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d080203>
- Speisky, H., Shahidi, F., Camargo, A.C., & Fuentes, J.(2022). Revisiting the Oxidation of Flavonoids: Loss, Conservation or Enhancement of Their Antioxidant Properties. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Jan; 11(1): 133.
- Steel, R. G. D., and Torrie, T. H. (1991). *Prinsip dan Prosedur Statistik Suatu Pendekatan Biometrik*. Edisi kedua. terjemahan Bambang Sumantri. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta
- Sudira, I. W., Merdana, I. M., & Qurani, S. N. (2019). Preliminary Phitochemical Analysis Of Guava Leaves (*Psidium guajava* L.) Extract As Antidiarrheal In Calves. *Advances in Tropical Biodiversity and Environmental Sciences*, 3(2), 21. <https://doi.org/10.24843/atbes.2019.v03.i02.p01>
- Suknia, S. L., & Rahmani, T. P. D. (2020). Proses pembuatan tempe home industry berbahan dasar kedelai (*Glycine max* (L.) Merr) dan kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) di Candiwesi, Salatiga. *Southeast Asian Journal of Islamic Education*, 03(01), 59–76. <https://doi.org/10.21093/sajie.v3i1.2780>
- Tristantini, D., Ismawati, A., Pradana, B. T., & Gabriel, J. (2016). Pengujian Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH pada Daun Tanjung (*Mimusops elengi* L). *Universitas Indonesia*, 2.
- Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines*, 5(3), 93. <https://doi.org/10.3390/medicines5030093>
- Vergara-Jimenez, M., Almatrafi, M.M., Fernandez, M.L.(2017). Bioactive components in *Moringa oleifera* leaves protect against chronic disease. *Antioxidants. Basel*. 6(4):91-100. DOI: 10.3390/antiox6040091
- Wang, Y., Y. Gao, H. Ding, S. Liu, X. Han, J. Gui and D. Liu. (2016). Subcritical ethanol extraction of flavonoids from *Moringa oleifera* leaf and evaluation of antioxidant activity. *Journal Food Chemistry* 218 : 152–158
- Wattiheluw, M. J. (2012). Pengaruh Konsentrat Campuran Kohay dan Dedak Terfermentasi Dosis *Rhizopus oligosporus* terhadap Kadar Protein Kasar, Serat Kasar, dan Lemak Kasar. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 2(3)
- Wijayanti, H.N., Fadhilah, Y.N., Yuniarti, W.M., Lukiswanto, B.S., Arimbi, A., Suprihati, E., Kurnijasanti, A. (2023). " Protective Effect of *Moringa oleifera* Leaves Extract Against Gentamicin Induced Hepatic and Nephrotoxicity in

Rats. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, Vol. 37, No. 1, 2023 (129-135)

World Health Organization. (tanpa tahun). "Food Fortification". diakses tanggal 27 Juli 2023 pada https://www.who.int/health-topics/food-fortification#tab=tab_3

World Health Organization. (2022). "Cancer". diakses tanggal 10 Februari 2023 pada <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Yoon, G. A., & Park, S. (2014). Antioxidant action of soy isoflavones on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in exercised rats. *Nutrition Research and Practice*, 8(6), 618–624. <https://doi.org/10.4162/nrp.2014.8.6.618>

Zhao, Y. S., Eweys, A. S., Zhang, J. Y., Zhu, Y., Bai, J., Darwesh, O. M., Zhang, H. B., & Xiao, X. (2021). Fermentation affects the antioxidant activity of plant-based food material through the release and production of bioactive components. *Antioxidants*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/antiox10122004>

Zulmy, Ivelia Tamara. (2018). Pengaruh Penambahan Tepung Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Kadar Lemak, Protein, Aktivitas Antioksidan dan Warna pada Pembuatan Bakso Ayam. Sarjana thesis, Universitas Brawijaya

Zuraida, Z., Sulistiyani, S., Sajuthi, D., & Suparto, I. H. (2017). Fenol, Flavonoid, dan Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Kulit Batang Pulai (*Alstonia scholaris* R.Br). *Jurnal Penelitian Hasil Hutan*, 35(3), 211–219. <https://doi.org/10.20886/jphh.2017.35.3.211-219>