

Karakterisasi Aktivitas Fungsional Senyawa Bioaktif dari *Whey* Hasil Samping Produksi Tahu

[Characterization of Functional Activities of Bioactive Compounds from Tofu *Whey*]

Alfia Aretzy¹⁾, Elvira Syamsir²⁾, dan Azis Boing Sitanggang^{2,3)*}

¹⁾ Program Studi Ilmu Pangan, Sekolah Pascasarjana, IPB University, Bogor, Indonesia

²⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB University, Bogor, Indonesia

³⁾ South-East Asia Food & Agricultural Science and Technology (SEAFST) Center-LPPM, IPB University, Indonesia

Diterima 14 April 2021 / Disetujui 4 Juni 2022

ABSTRACT

Tofu whey is a by-product obtained during tofu production that contains proteins and peptides, soluble carbohydrates, soy isoflavone, and minerals. This research aimed to characterize the functional properties of whey protein from tofu through separation using membranes with different pore sizes. The permeate resulted from Whatman No. 3 filtration was subjected to acidity (pH) and protein content measurement, while its protein profile was characterized by SDS-PAGE electrophoresis. Additionally, this permeate was further sieved using ultrafiltration membranes with 30, 10, and 5 kDa cut-off. The corresponding filtrates were analyzed for antioxidant activity, isoflavone content, and ACE inhibitor activity. The tofu whey had a pH of 3.14, crude protein of 2 g/100 g sample, and soluble protein content of 1.47mg/mL. The separation of protein bands using SDS-PAGE showed that the dominant protein or peptides in tofu whey had molecular weights below 18 kDa. The use of ultrafiltration membranes could increase the bioactivity of permeates. The filtrate resulting from the smallest membrane cut-off (i.e., 5 kDa) had a higher antioxidant activity, isoflavone content, and ACE inhibitory activity.

Keywords: ACE inhibitor, antioxidant, bioactive peptide, isoflavone, whey

ABSTRAK

Whey tahu merupakan produk samping pengolahan tahu yang masih mengandung protein, gula sederhana, oligosakarida, mineral, dan isoflavon kedelai. Tujuan dari penelitian ini adalah mengkaraktirikan sifat fungsional dari whey tahu. Sampel yang dihasilkan dari penyaringan Whatman No. 3 diuji karakteristik derajat keasaman (pH) dan pengukuran kandungan protein, sedangkan profil protein dikarakterisasi dengan metode elektroforesis SDS-PAGE. Permeat selanjutnya disaring menggunakan membran ultrafiltrasi dengan cut-off sebesar 30, 10, dan 5 kDa. Filtrat yang dihasilkan digunakan untuk analisis aktivitas antioksidan, kandungan isoflavon dan aktivitas penghambatan kerja ACE. Whey tahu memiliki pH 3,14, kandungan protein kasar 2 g/100 g sampel, dan kandungan protein terlarut 1,47 mg/mL. Pemisahan pita protein menggunakan SDS-PAGE menunjukkan bahwa protein atau peptida dominan yang ada dalam whey tahu memiliki berat molekul di bawah 18 kDa. Penggunaan membran ultrafiltrasi dapat meningkatkan bioaktivitas permeat. Filtrat yang dihasilkan dari membran dengan cut-off yang paling kecil (5 kDa) memiliki aktivitas antioksidan, kandungan isoflavon dan aktivitas penghambatan kerja ACE yang tertinggi.

Kata kunci: ACE inhibitor, antioksidan, isoflavon, peptida bioaktif, whey

PENDAHULUAN

Tahu merupakan suatu produk yang dihasilkan dari proses pembentukan dadih susu kedelai yang banyak diminati dan mudah diperoleh di Indonesia. Proses pembentukan dadih tahu dikenal sebagai proses koagulasi. Jenis koagulan, konsentrasi dan

suhu koagulasi yang digunakan dapat memengaruhi hasil produksi tahu dan hasil samping produksinya yang berupa whey (Syah *et al.*, 2015; Sitanggang *et al.*, 2020a). Whey tahu adalah cairan bening berwarna kuning yang dihasilkan dari proses penyaringan dan pengepresan dadih susu kedelai. Pembuatan tahu yang menggunakan 1 kg kedelai dan ditambahkan 45 L air akan menghasilkan ±43,5 L whey tahu (Arinto *et al.*, 2013). Whey tahu yang dibuang tanpa pengolahan lanjut ke lingkungan akan menyebabkan

*Penulis Korespondensi:
E-mail: boing.lipan@apps.ipb.ac.id

terjadinya pengendapan zat-zat organik pada badan perairan, memicu terjadinya proses pembusukan dan perkembangan mikroorganisme patogen (Chua dan Liu, 2019).

Whey tahu masih memiliki banyak nutrisi seperti gula sederhana, oligosakarida, protein, peptida dan asam amino, isoflavon, serta berbagai mineral (Belén *et al.*, 2013). Isoflavon, saponin dan peptida yang merupakan beberapa jenis senyawa bioaktif masih terdapat pada *whey* tahu (Chua dan Liu, 2019). Hal inilah yang menjadikan *whey* tahu dapat dimanfaatkan sebagai salah satu sumber ingredien atau pangan fungsional. Pangan fungsional adalah pangan yang secara alami maupun yang telah melalui proses, mengandung suatu atau lebih senyawa yang berdasarkan kajian ilmiah dianggap mempunyai fungsi fisiologi yang bermanfaat bagi kesehatan (BPOM, 2011).

Senyawa isoflavon yang terdapat pada *whey* tahu termasuk senyawa polifenol dari golongan flavonoid. Isoflavon yang terkandung dalam *whey* kedelai sekitar 50 mg/L (Muthia *et al.*, 2017; Chua *et al.*, 2018). Adanya proses fermentasi dan hidrolisis mampu meningkatkan aktivitas senyawa bioaktif seperti antioksidan (Nabilatul *et al.*, 2014; Muthia *et al.*, 2017), isoflavon (Tu *et al.*, 2019), serta aktivitas dari peptida bioaktif terutama pada aktivitas penghambatan *Angiotensin-I-Converting Enzyme* (ACE) (Fung dan Liang, 2010). Efektivitas suatu peptida bioaktif dapat dilihat dari panjang rantai, jenis asam amino, urutan asam amino dan berat molekul peptida (Sitanggang *et al.*, 2018). Panjang rantai 7-25 asam amino (MW 800-3000 Da) lebih aktif dibandingkan dengan panjang rantai <7 residu asam amino (MW <700-800 Da) (Capriotti *et al.*, 2015). Peptida bioaktif dengan berat molekul di bawah 1 kDa, jenis asam amino penyusun dan posisi asam amino dalam struktur peptida merupakan faktor-faktor yang paling dominan memengaruhi aktivitas peptida. Sitanggang *et al.* (2020b) melaporkan bahwa penyaringan membran ultrafiltrasi (UF) pada ukuran 5 kDa memiliki aktivitas peptida bioaktif tertinggi dalam hal aktivitas antioksidan, penghambatan ACE dan aktivitas penghambatan α -glukosidase, sehingga dapat dikatakan bahwa penggunaan membran UF merupakan salah satu metode yang baik untuk memperoleh fraksi peptida bioaktif dengan ukuran berat molekul yang berbeda-beda. Penelitian ini bertujuan mengkaji potensi peptida bioaktif *whey* tahu yang telah mengalami proses separasi menggunakan membran ultrafiltrasi. Beberapa aktivitas biologis yang dikarakterisasi adalah aktivitas antioksidan dan aktivitas penghambat kerja ACE.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan untuk menghasilkan filtrat *whey* yakni Whatman No. 3 serta membran ultrafiltrasi (UF) terbuat dari polietersulfon (PES) dengan *molecular weight cut-off* (MWCO) sebesar 5, 10, dan 30 kDa (Microdyn-Nadir, Jerman). Beberapa reagen seperti reagen untuk pengujian protein, asam askorbat, tris-HCl (pH 7-9), N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, poliakrilamida, asam asetat glasial, asetonitril, isoflavon (daidzein dan genistein), Hipuril-I-histidil-I-leusin (HHL), sodium dodesil sulfat (SDS), etil asetat, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl didapatkan dari Merck KGaA (Darmstadt, Jerman). Sementara itu, ACE didapatkan dari Xi'An Zebang Biological Technology CO., LTD (Republik Rakyat Cina), dan protein *ladder* 10-245 kDa (PT 1st BASE, Singapura).

Persiapan sampel *whey* tahu

Penelitian ini diawali dengan penyaringan *whey* tahu dengan menggunakan kertas saring Whatman No. 3. *Whey* hasil penyaringan dianalisis karakteristik awalnya berupa pH dan kandungan protein (protein kasar dan terlarut), sementara profil proteinnya diidentifikasi menggunakan metode elektroforesis SDS-PAGE. Sebelum melakukan pengujian SDS-Page, terlebih dahulu sampel melewati proses *defatting* yang bertujuan menghilangkan gangguan berupa lemak yang mampu memengaruhi proses pergerakan protein. Selain itu, permeat disaring menggunakan membran UF berbagai ukuran yakni 30 kDa, 10 kDa dan 5 kDa *cut-off*. *Whey* lolos saring Whatman No. 3 dan membran UF dikarakterisasi aktivitas biologisnya, yakni dengan menguji aktivitas antioksidan, kandungan isoflavon (daidzein dan genistein) dan aktivitas penghambatan kerja ACE.

Analisis derajat keasaman

Sampel *whey* tahu dipipet sebanyak 10 mL, dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer dan diukur nilai pHnya. pH meter (Ohaus Starter 3100, USA) terlebih dahulu dikalibrasi dengan larutan penyangga pH 4,0 dan 7,0 (Nawangsari *et al.*, 2012).

Analisis proksimat kandungan protein kasar

Sampel diambil sebanyak 3 g, kemudian dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl. Sebanyak 5 g campuran K₂SO₄ dan HgO (20:1) ditambahkan 10 mL H₂SO₄ dan dimasukkan ke dalam labu destruksi. Labu destruksi dipanaskan menggunakan suhu awal 200-250°C sampai larutan tidak berasap lagi, lalu dilanjutkan dengan pemanasan pada suhu 300-400°C hingga larutan dalam labu destruksi telah jernih. Larutan hasil destruksi diencerkan dengan akuades dan ditambahkan larutan NaOH 45% sam-

pai larutan bersifat alkalis. Sampel didestilasi sampai volume residu hanya 1/3 dari volume awal (Muskitta dan Tuapattinaya, 2016). Hasil destilasi dilanjutkan dengan proses titrasi dengan larutan HCl 0.1 N sampai mencapai titik ekuivalen yang ditandai dengan warna keabu-abuan. Analisis kadar nitrogen dengan memperhitungkan V_{HCl} = volume HCl (mL) yang digunakan untuk titrasi; N_{HCl} = Normalitas HCl (0.1 N); W= berat sampel (g), dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\% N = \frac{V_{HCl} \text{ sampel} \times N_{HCl} \times 14}{W \text{ sampel}} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

Perhitungan kadar protein dilakukan menggunakan faktor konversi sebagai berikut:

$$\text{Kadar Protein } \left(\frac{g}{100 \text{ g bahan basah}}\right) = \% N \times \text{faktor konversi (6,25)} \dots\dots\dots (2)$$

Analisis kandungan protein Lowry

Protein terlarut yang terkandung dalam sampel dianalisis menggunakan metode Lowry. Sebelum dilakukan analisis, terlebih dahulu disiapkan reagen A (Na_2CO_3 2%-NaOH 0,1 N), reagen B ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,5%-Na.K.Tartarat 1%), reagen C dengan perbandingan antara A:B sebesar 60:1 dan reagen D yang terdiri dari Folin dan akuades dengan perbandingan 1:1. Sebanyak 4 mL sampel ditambahkan dengan 5.5 mL reagen C lalu divortex. Larutan didiamkan selama 15 menit pada suhu ruangan, lalu ditambahkan dengan reagen D sebanyak 0,5 mL, dan didiamkan kembali selama 30 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 650 nm menggunakan Genesys™ 140 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) (Susanti dan Hidayat, 2017). Konsentrasi protein (ppm, mg/mL) dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Konsentrasi (ppm)} = \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{Slop}} \times \text{faktor pengenceran} \dots\dots\dots (3)$$

$$\text{Kadar Protein (mg/mL)} = \frac{\text{konsentrasi}}{1000} \dots\dots\dots (4)$$

Identifikasi profil protein

Identifikasi profil protein pada *whey* tahu dilakukan dengan analisis *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) (Bio-Rad, Singapura). Kandungan lemak sampel terlebih dahulu dihilangkan dengan ekstraksi menggunakan heksana. Sebanyak 40 µL sampel hasil *defatting* dimasukkan ke dalam *microtube* dan ditambahkan 10 µL buffer. Campuran tersebut dididihkan selama 5

menit. Sebanyak 16 µL sampel dimasukkan ke dalam sumur (*well*). Konsentrasi yang digunakan dalam gel adalah 4% *stacking gel* dan 15% *separating gel*. Separasi dilakukan menggunakan tegangan 80 V selama 20 menit, dan kemudian dinaikkan sebesar 100 V (Sitanggung *et al.*, 2020b). Setelah proses selesai, gel dikeluarkan lalu dimasukkan ke dalam larutan pewarna dan digoyangkan menggunakan alat *rotary shakers*. Gel yang telah diwarnai drendam dalam air mendidih selama 10 menit. Mobilitas relatif sampel (R_f) dan perkiraan berat molekul (MW) protein atau peptida yang terpisah dihitung dengan persamaan sebagai berikut, dengan memasukkan a = koefisien mobilitas relatif; dan b = konstanta:

$$R_f = \frac{\text{jarak migrasi protein}}{\text{jarak migrasi pewarna protein}} \dots\dots\dots (5)$$

$$\text{Log (MW)} = a (R_f) + b \dots\dots\dots (6)$$

Pengukuran aktivitas antioksidan

Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH. Sebanyak 0,3 mL *whey* tahu ditambahkan dengan 0,7 mL akuabides, lalu divortex. Selanjutnya, 3 mL larutan DPPH 120 µM ditambahkan dan campuran dihomogenisasi (Sitanggung *et al.*, 2020c). Larutan yang telah homogen diinkubasi selama 30 menit. Setelah itu, absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 517 nm menggunakan Genesys™ 140 UV-Vis Spectrophotometer.

$$\% \text{Penghambatan} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\% \dots\dots\dots (7)$$

Pengukuran kandungan isoflavon: daidzein dan genistein

Sebanyak 10 mL *whey* ditambah 2 mL fase gerak, kemudian divortex. Sampel yang telah homogen disaring menggunakan membran 0,45 µm untuk dianalisis menggunakan HPLC 1200 Series MWD (Agilent, USA). Sampel dianalisis menggunakan kolom Symmetry C18 (250x4,6 mm, 5µm, Shimadzu Jepang) dengan fase gerak berupa campuran 0,1 % asam asetat: asetronitril (70:30 v/v) pada laju alir 1,0 mL/menit dan suhu kolom 40°C (Liu *et al.*, 2013). Setelah itu, kandungan isoflavon *whey* diukur menggunakan detektor ultraviolet pada panjang gelombang 260 nm.

$$\text{Total Isoflavon } \left(\frac{\mu g}{g}\right) = \frac{\text{area-intersep}}{\text{slop}} \times \text{bobot sampel} \dots\dots\dots (8)$$

Pengukuran aktivitas ACE inhibitor

Pengujian aktivitas penghambat kerja ACE dilakukan dengan cara 200 μ L larutan buffer substrat (6,7 mM hipuril-l-histidil-l-leusin dalam 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HE PES) dengan 300 mM NaCl pH 8,3) dicampurkan dengan 100 μ L permeal dan dipre-inkubasi pada 37°C selama 5 menit. Sebanyak 30 μ L enzim angiotensin (0,33 U/mL) ditambahkan untuk memulai reaksi. Setelah diinkubasi selama 20 menit pada suhu 37°C, reaksi enzimatik dihentikan dengan penambahan 3 mL HCl 1 N (Sitanggang *et al.*, 2020b). Asam hipurat yang terlepas akibat aksi dari ACE dihidrolisis dengan menggunakan 2,4 mL etil asetat, dan divorteks selama 2 menit. Sebanyak 1 mL lapisan bagian atas yang merupakan asam hipurat diambil dan dievaporasi pada suhu 120°C selama 30 menit. Sedimen yang tersisa kemudian dilarutkan dalam 1 mL akuades dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 228 nm menggunakan Genesys™ 140 UV-Vis Spectrophotometer. Persentase penghambatan dengan memasukkan a= Absorbansi larutan mengandung ACE tanpa sampel; b = Absorbansi larutan mengandung ACE yang telah diinaktivasi dengan HCl tanpa sampel; c= Absorbansi campuran ACE dan sampel; d= Absorbansi larutan mengandung ACE dan sampel yang telah diinaktivasi dengan HCl, dihitung sebagai berikut:

$$\text{Penghambatan (\%)} = \frac{(a-b)-(c-d)}{a-b} \times 100 \% \dots\dots\dots (9)$$

Analisis statistik

Data hasil pengujian dianalisis dengan *one-way* ANOVA dengan uji lanjut *Tukey*. Perangkat lunak statistik yang digunakan adalah SPSS 22.00 (IBM, AS).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik awal

Hasil analisis derajat keasaman (pH) *whey* tahu dapat dilihat pada Tabel 1. *Whey* tahu memiliki pH 4,13 yang termasuk kategori pH rendah (asam). Rendahnya aktivitas ion hidrogen pada suatu sampel ditandai dengan tingginya nilai pH yang terukur. Sebaliknya, sampel yang termasuk ke dalam pH rendah memiliki aktivitas ion hidrogen yang tinggi (Fatma *et al.*, 2012). Koagulan asam cuka yang digunakan oleh produsen menghasilkan *whey* dengan nilai pH yang rendah. Sifat asam yang dimiliki *whey* tahu mampu menurunkan pH dari suatu bahan yang menyebabkan terjadinya proses agregasi protein, sehingga membentuk gumpalan protein atau *curd* (Elygio *et al.*, 2016). Koagulasi protein yang baik terjadi ketika suatu koagulan mencapai titik pH isoelektrik. Oleh karena itu, kuantitas ion

hidrogen pada pH adalah faktor yang sangat memengaruhi proses (Maharani *et al.*, 2012).

Tabel 1. Karakteristik awal *whey* tahu
Table 1. Initial characteristics of *tofu whey*

Analisis (Analysis)	Hasil (Result)
Derajat keasaman (pH) (Degree of acidity (pH))	4.13±0.005
Protein kasar (g/100 g) (Crude protein (g/100 g))	2.0±0.025
Protein terlarut (mg/mL) (Soluble protein (mg/mL))	1.47±0.052

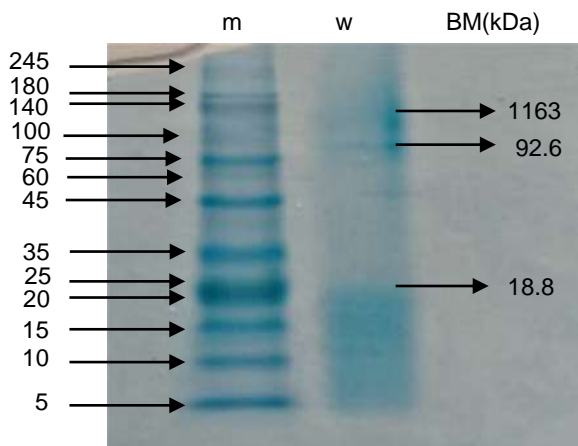
Whey tahu memiliki kandungan protein kasar sebesar 2 g/100 g sampel dan protein terlarut sebanyak 1,47 mg/mL. Hal ini menunjukkan tidak semua protein mengumpal dalam pembuatan tahu, dan akhirnya terbuang bersama dengan *whey*. Protein yang terkandung dalam *whey* tahu berkisar 0,1-0,8% (Chua dan Liu, 2019; Tu *et al.*, 2019). *Whey* keju memiliki kandungan protein sebesar 0,76-2,13% (Nursiwi *et al.*, 2015; Prastujati *et al.*, 2018; Cabral *et al.*, 2019). Kandungan protein pada *whey* dipengaruhi oleh karakteristik bahan baku, proses pengolahan dan koagulasi dalam pembentukan dadih. Andarwulan *et al.* (2018) melaporkan bahwa tahu yang dihasilkan dari berbagai jenis kedelai memiliki kandungan serta karakteristik yang berbeda-beda. Tingginya kadar protein kedelai menghasilkan tahu dengan kadar protein yang tinggi pula. Lama proses perendaman kedelai mampu menurunkan kandungan protein, karena adanya pelepasan ikatan struktur protein, sehingga komponen tersebut terlarut dalam air (Midayanto dan Yuwono, 2014).

Profil protein

Identifikasi profil protein pada sampel dilakukan dengan metode SDS-PAGE untuk melihat peptida-peptida yang terdapat pada filtrat *whey* tahu. Kurva standar *marker* yang diperoleh dari hubungan antara mobilitas elektroforetik (Rf) dengan nilai logaritma berat molekul (Log BM) *marker* digunakan untuk menentukan berat molekul yang terdapat pada sampel. Pemisahan protein dalam penelitian ini dilakukan pada gel poliakrilamida 15%. Berdasarkan hasil elektroforesis pada Gambar 1 dapat diketahui bahwa filtrat *whey* tahu memiliki tiga pita dengan berat molekul 116,3; 92,6; dan 18,8 kDa.

Jenis koagulan dan kandungan protein yang ada pada suatu sampel memiliki pengaruh terhadap tipe sub unit 11/7S pada sampel uji. Kedelai mengandung 70% sub unit 7S dan 11S. Sub unit 11 S terdiri dari asam dan basa, sedangkan sub unit 7S terdiri dari sub unit mayor yakni α' , α , dan β (Syah *et al.*, 2015). Sub unit 11S merujuk pada pita MW 14,4-44 kDa dan 7S pada pita 44-91 kDa. Dapat diketahui bahwa pita protein *whey* dengan berat molekul 18,8 kDa termasuk dalam kategori sub unit 11S,

sedangkan untuk pita protein 92,6 kDa termasuk dalam sub unit 7S.



Keterangan: m= marker protein; w= sampel; BM= berat molekul

Note: m= protein marker; w= sample; BM= molecular weight

Gambar 1. Hasil elektroforesis sampel whey tahu dengan metode SDS-PAGE

Figure 1. SDS-PAGE electrophoresis of tofu whey

Senyawa bioaktif

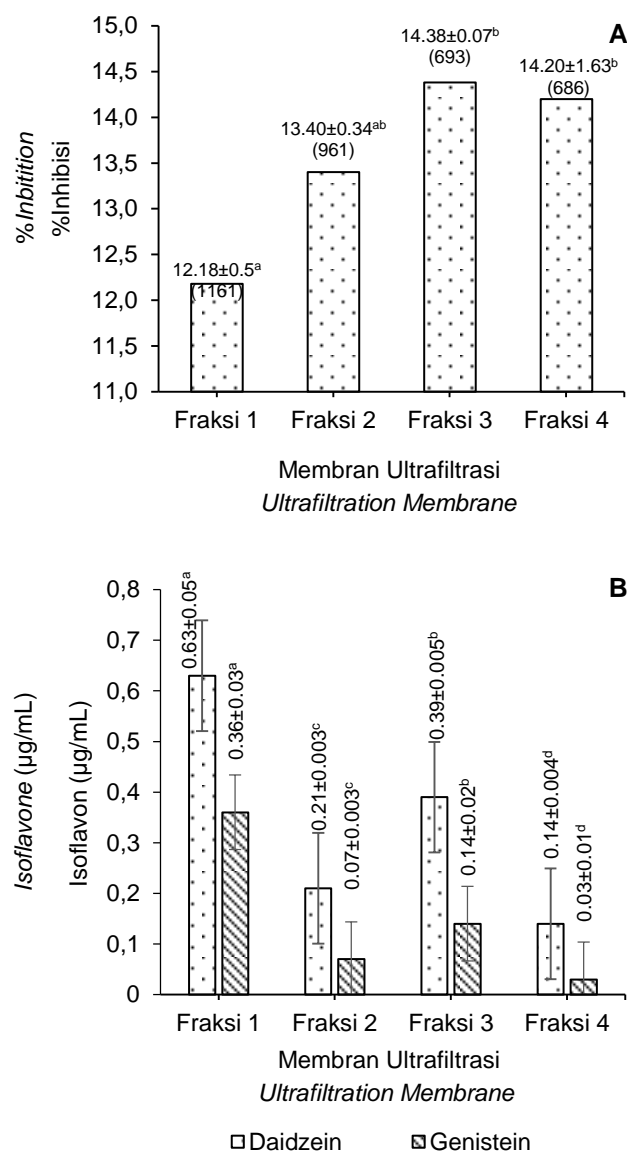
Aktivitas antioksidan pada whey tahu tanpa penyaringan maupun menggunakan penyaringan membran UF diuji dengan metode DPPH. Gambar 2a menunjukkan bahwa penyaringan menggunakan membran UF menghasilkan aktivitas penghambatan yang lebih tinggi dibandingkan tanpa penyaringan. Nilai penghambatan dengan penyaringan menggunakan Whatman No. 3 menghasilkan penghambatan sebesar 12,18%. Sementara itu, permeat dengan penyaringan menggunakan membran UF 30, 10, dan 5 kDa berturut-turut memiliki aktivitas penghambatan oksidasi sebesar 13,40; 14,38; dan 14,20%. Pada penelitian ini juga dilakukan pengujian nilai IC₅₀ antioksidan. Nilai IC₅₀ pada whey tahu tanpa dan maupun dengan penyaringan membran UF menunjukkan hasil penghambatan yang tergolong sangat lemah, yaitu dengan nilai IC₅₀ aktivitas antioksidan menggunakan Whatman No. 3 sebesar 1161 ppm, sedangkan whey dengan penyaringan membran UF 30, 10, dan 5 kDa berturut-turut sebesar 961, 693, dan 686 ppm. Hasil uji statistik dengan ANOVA menunjukkan bahwa tidak adanya perbedaan yang signifikan antara nilai aktivitas antioksidan dari permeat hasil penyaringan menggunakan membran 5, 10, dan 30 kDa ($p > 0,05$), akan tetapi, terdapat perbedaan yang signifikan terhadap whey tahu yang hanya disaring menggunakan Whatman No. 3. Hal ini membuktikan bahwa sifat antioksidan tergantung pada ukuran molekul, terutama untuk

peptida yang didapatkan pada permeat hasil penyaringan membran UF (Di Bernardini *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2014). Sitanggang *et al.* (2020b) menyatakan bahwa berat molekul peptida yang rendah mampu menghasilkan aktivitas biologis yang semakin tinggi. Selain itu, peptida yang terdapat pada permeat diduga terdiri dari asam amino aromatik (Y, H, W dan F), asam amino hidrofobik (Q, A, V dan L), dan sistein (C) (Sarmadi dan Ismail, 2010).

Berdasarkan hasil analisis menggunakan HPLC diketahui bahwa puncak kromatogram isoflavin (daidzein dan genistein) whey tahu berada pada menit ke 5 dan 11 (Gambar 3). Benedetti *et al.* (2016) melaporkan bahwa senyawa isoflavin Daidzein yang dimiliki whey tahu berkisar antara 0,47-1,31 µg/mg dan genistein sebesar 0,34-0,92 µg/mg. Kandungan daidzein dan genistein whey tahu dengan penyaringan menggunakan Whatman No. 3 sebesar 0,63 dan 0,36 µg/mL. Selain itu, whey tahu yang disaring menggunakan membran UF 30, 10 dan 5 kDa memiliki kandungan daidzein berturut-turut sebesar 0,21; 0,39; dan 0,14 µg/mL, serta kandungan genistein sebesar 0,07; 0,14; dan 0,03 µg/mL (Gambar 2b). Uji statistik menunjukkan bahwa ada perbedaan nyata kandungan daidzein dan genistein pada whey tahu baik yang dipisahkan menggunakan membran UF dan tanpa menggunakan membran UF ($p < 0,05$). Kandungan isoflavin permeat yang lolos dari penyaringan membran UF cenderung lebih kecil dibandingkan dengan hasil penyaringan dengan Whatman No. 3. Hal ini dapat diakibatkan penolakan komponen isoflavin oleh membran UF seperti yang dilaporkan oleh (Li *et al.*, 2012). Gambar 2a menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan di antara permeat hasil penyaringan membran UF tidak berbeda nyata. Di sisi lain, kandungan isoflavin dari permeat hasil penyaringan membran UF berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan tren menurun dengan semakin kecilnya cut-off dari membran UF yang digunakan. Hal ini menunjukkan bahwa, selain isoflavin, terdapat peptida bioaktif yang berkontribusi dalam aktivitas antioksidan permeat.

Rendahnya kandungan isoflavin dan antioksidan pada sampel disebabkan oleh kondisi persiapan kacang kedelai dan proses koagulasi tahu yang dapat memerangkap isoflavin ke dalam matriks protein yang telah membentuk curd (Singh *et al.*, 2014). Winarsi *et al.* (2010) menyatakan bahwa sampel yang memiliki kandungan isoflavin yang tinggi dihasilkan oleh bahan atau produk yang memiliki kandungan protein yang tinggi pula. Isoflavin merupakan senyawa yang cenderung larut dalam air, sehingga kandungan isoflavin pada whey tahu dapat terbuang selama pencucian dan perendaman kedelai. Kandungan isoflavin yang ada pada suatu bahan tergantung dari pelepasan isoflavin dan protein selama produksi. Oleh karena itu, jenis

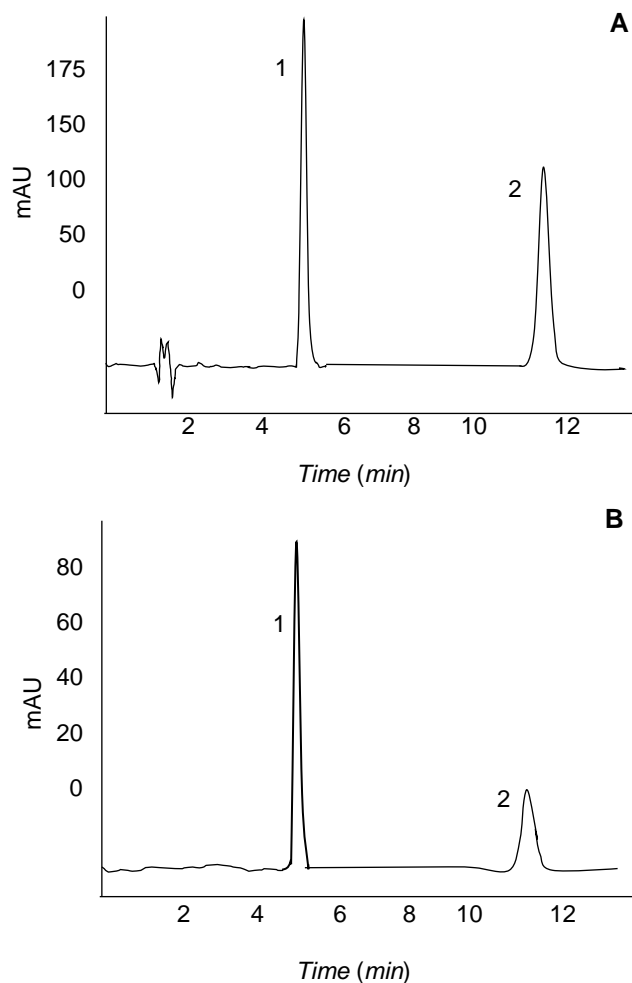
koagulasi dapat menghasilkan kandungan yang berbeda pula pada kandungan isoflavon (Kao *et al.*, 2004; Speroni *et al.*, 2010).



Keterangan: Angka yang berada dalam tanda kurung adalah angka aktivitas IC₅₀ antioksidan (ppm). Fraksi 1= filtrat dari Whatman No. 3; Fraksi 2, 3 dan 4= permeat dari membran UF berturut-turut 30, 10, dan 5 kDa; Huruf yang berbeda pada setiap fraksi menunjukkan data yang berbeda nyata (p<0,05)

Note: Value in the bracket is antioxidant activity IC₅₀ (ppm). Fraction 1= filtrate from Whatman No. 3; Fraction 2, 3 and 4= permeate from membranes UF 30, 10, and 5 kDa, respectively; Different letters for the same fraction show significantly different data (p<0.05)

Gambar 2. Aktivitas antioksidan (A) dan kandungan isoflavon (B) whey tahu
 Figure 2. Antioxidant activity (A) and isoflavone content (B) of tofu whey

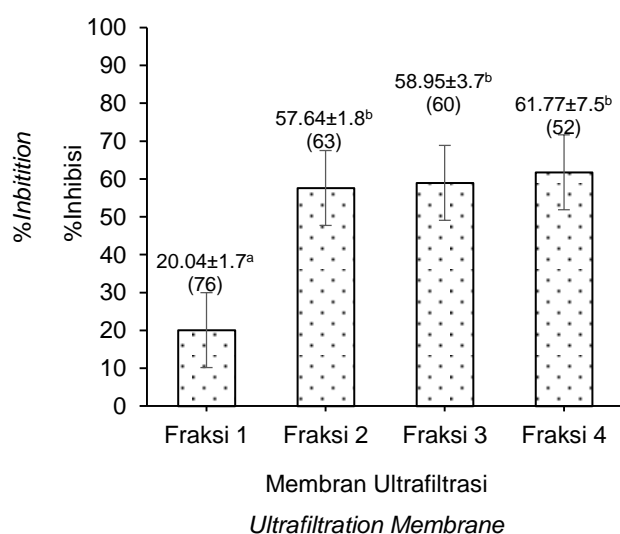


Gambar 3. Kromatogram isoflavon. Standar (A) dan Sampel (B). 1= daidzein, 2= genistein; mAU pada 260 nm
 Figure 3. Chromatogram of isoflavone standard (A) and sample (B). 1= daidzein, 2= genistein; mAU at 260 nm

Aktivitas antioksidan yang terdapat pada sampel dapat dipengaruhi oleh proses pemanasan karena proses ini dapat menyebabkan terjadinya peningkatan laju oksidasi dan degradasi (Nabilatul *et al.*, 2014). Berdasarkan hasil pengukuran yang ditampilkan pada Gambar 2a dan b, kandungan isoflavon tidak memiliki tren yang sama dengan aktivitas antioksidan, dan bahkan bersifat acak untuk permeat hasil penyaringan Whatman No. 3, dan membran UF 5, 10, dan 30 kDa. Hal ini dapat mengindikasikan bahwa peptida bioaktif atau protein berberat molekul kecil lainnya juga berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan.

Penggunaan membran UF dapat menghasilkan permeat yang memiliki peningkatan aktivitas ACE inhibitor. Aktivitas yang tertinggi terdapat pada membran 5 kDa, sedangkan aktivitas yang terendah dihasilkan oleh whey tahu dengan pemisahan meng-

gunakan Whatman No. 3. Gambar 4 menunjukkan bahwa nilai penghambatan kerja ACE dari permeat hasil penyaringan menggunakan Whatman No. 3 memiliki nilai penghambatan sebesar 20,04%. Sementara itu, permeat lolos saring dari membran UF 30, 10, dan 5 kDa memiliki nilai penghambatan ACE berturut-turut sebesar 57,64; 58,95; dan 57,64%. Hasil uji statistik dengan ANOVA menunjukkan bahwa ada perbedaan nyata diantara nilai penghambatan kerja ACE antara *whey* permeat tanpa dan dengan membran UF ($p < 0,05$). Pada penelitian ini, tidak didapatkan perbedaan yang signifikan atas penghambatan kerja ACE di antara permeat lolos saring 5, 10, dan 30 kDa ($p > 0,05$).



Keterangan: Angka yang berada dalam tanda kurung adalah angka aktivitas IC₅₀ ACE inhibitor (ppm). Fraksi 1= filtrat dari Whatman No. 3. Fraksi 2, 3 dan 4= permeat dari membran UF berturut-turut 30, 10 dan 5 kDa; Huruf yang berbeda pada setiap fraksi menunjukkan data yang berbeda nyata ($p < 0,05$)

Note: Value in the bracket is antioxidant activity IC₅₀ (ppm). Fraction 1= filtrate from Whatman No. 3; Fraction 2, 3 and 4= permeate from membranes UF 30, 10, and 5 kDa, respectively; Different letters for the same fraction show significantly different data ($p < 0.05$)

Gambar 4. Aktivitas IC₅₀ ACE inhibitor *whey* tahu
Figure 4. IC₅₀ ACE inhibitor of tofu *whey*

KESIMPULAN

Pengukuran IC₅₀ aktivitas ACE inhibitor memiliki nilai sebesar 76 ppm untuk *whey* tahu tanpa penyaringan menggunakan membran UF. Sementara itu, permeat lolos saring membran UF 30, 10, dan 5 kDa menghasilkan aktivitas berturut-turut sebesar 63, 60, dan 52 ppm. Hasil ini menunjukkan bahwa penggunaan membran UF mampu meningkatkan aktivitas biologis *whey tahu* terutama pada aktivitas

penghambatan kerja ACE. Aktivitas ACE inhibitor pada *whey* tahu tidak jauh berbeda dengan hidrolisat *whey* susu, fraksi dengan berat molekul <6, 6-10, dan >10 kDa memiliki aktivitas penghambatan sebesar 64,26; 51,54; dan 40,46% (Pan *et al.*, 2012). Peptida bioaktif dengan berat molekul rendah lebih memiliki aktivitas penghambatan kerja ACE yang lebih tinggi dibandingkan dengan yang berat molekul besar, umumnya berasal dari dipeptida hingga penta-peptida dengan berat molekul 150-800 Da (Zhang *et al.*, 2009). Oleh karena itu, penggunaan membran UF sangat efisien untuk meningkatkan aktivitas peptida bioaktif (Lassissi *et al.*, 2014). Hal ini didukung oleh penelitian Ratnayani *et al.* (2019) yang mengemukakan bahwa aktivitas ACE inhibitor tertinggi dimiliki oleh fraksi terkecil dan Mullally *et al.* (1997) menyatakan bahwa fraksinasi menggunakan membran UF 3 kDa menghasilkan permeat dengan aktivitas ACE inhibitor yang lebih tinggi.

Peningkatan aktivitas biologis permeat *whey* tahu terjadi seiring dengan mengecilnya ukuran pori membran UF yang digunakan dalam proses separasi. Pemisahan pita protein menggunakan SDS-PAGE menunjukkan bahwa protein atau peptida yang dominan di dalam *whey* tahu adalah yang memiliki berat molekul di bawah 18 kDa. *Whey* hasil penyaringan dengan membran UF 10 kDa menghasilkan aktivitas antioksidan dan kandungan isoflavin yang tertinggi. Permeat *whey* hasil penyaringan dengan membran UF 5 kDa menunjukkan aktivitas tertinggi sebagai ACE inhibitor. Berdasarkan kenaikan aktivitas biologis, penggunaan membran UF 10 kDa dapat dipilih sebagai *cut-off* membran UF yang terbaik yang dapat digunakan dalam memperoleh permeat *whey* tahu dengan aktivitas antioksidan dan penghambat kerja ACE yang optimum.

DAFTAR PUSTAKA

- Andarwulan N, Nuraida L, Adawiyah DR, Triana RN, Agustin D, Gitapratwi D. 2018. Pengaruh perbedaan jenis kedelai terhadap kualitas mutu tahu. *J Mutu Pangan* 5: 66-72.
- Arinto DJ, Paramastri HP, Soetrinanto D. 2013. Potensi air dadih (*whey*) tahu sebagai nutrisi dalam kultivasi *Chlorella* sp. untuk bahan baku pembuatan biodesel. *J Teknol Kimia Industri* 2: 233-242.
- Belén F, Benedetti S, Sánchez J, Hernández E, Auleda JM, Prudêncio ES, Petrus JCC, Raventós M. 2013. Behavior of functional compounds during freeze concentration of tofu *whey*. *J Food Eng* 116: 681-688. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.019>

- Benedetti S, Prudencio ES, Müller CMO, Verruck S, Mandarino JMG, Leite RS, Petrus JCC. 2016. Utilization of tofu *whey* concentrate by nanofiltration process aimed at obtaining a functional fermented lactic beverage. J Food Eng 171: 222-229. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.10.034>
- Di Bernardini R Di, Harnedy P, Bolton D, Kerry J, O'Neill E, Mullen AM, Hayes M. 2011. Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. Food Chem 124: 1296-1307. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.004>
- [BPOM] Badan Pengawasan Obat dan Makanan. 2011. Peraturan Kepala Badan Pengawasan Obat dan Makanan. Nomor: HK.00.05.5.1380 Tahun 2011 tentang Pengawasan Klaim dalam Label dan Iklan Pangan Olahan, Jakarta
- Cabral SR, de Brito de Azevedo BM, da Silva MP, Figueiredo AS, Martins APL, de Pinho MN. 2019. Optimization of cheese *whey* ultrafiltration/diafiltration for the production of beverage liquid protein concentrates with lactose partially removed. J Membr Sci Res 5: 171-177.
- Capriotti AL, Cavaliere C, Foglia P, Piovesana S, Samperi R, Chiozzi RZ, Laganà A. 2015. Development of an analytical strategy for the identification of potential bioactive peptides generated by *in vitro* tryptic digestion of fish muscle proteins. Anal Bioanal Chem 407: 845-854. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8094-z>
- Chua J-Y, Liu S-Q. 2019. Soy whey: More than just wastewater from tofu and soy protein isolate industry. Trends Food Sci Technol 91: 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.016>
- Chua J-Y, Lu Y, Liu S-Q. 2018. Evaluation of five commercial non-*Saccharomyces* yeasts in fermentation of soy (tofu) *whey* into an alcoholic beverage. Food Microbiol 76: 533-542. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.07.016>
- Dong S-Y, Zhao Y-H, Xu D-X, Liu Z-Y, Zeng M-Y. 2013. Assessing the antioxidant activity of the ultrafiltration fractions from silver carp protein hydrolysate by different antioxidant methods. J Aquat Food Prod Technol 22: 573-583. <https://doi.org/10.1080/10498850.2012.674088>
- Elygio YD, Legowo AM, Al-Baarri AN. 2016. Sifat protein karakteristik curd berbahan dasar ekstrak kacang hijau (*Vigna radiata*) dengan *whey* tahu kedelai (*Glycine max*) Sebagai bahan penggumpal. J Teknol Hasil Pertanian 9: 33-39.
- Fatma, Soeparno, Nurliyani, Hidayat C, Taufik M. 2012. Karakteristik whey limbah dangke dan potensinya sebagai produk minuman dengan menggunakan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051. Agritech 32: 352-361.
- Fung WY, Liong MT. 2010. Evaluation of proteolytic and ACE-inhibitory activity of *Lactobacillus acidophilus* in soy *whey* growth medium via response surface methodology. LWT-Food Sci Technol 43: 563-567. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.10.004>
- Kao TH, Lu YF, Hsieh HC, Chen BH. 2004. Stability of isoflavone glucosides during processing of soymilk and tofu. Food Res Int 37: 891-900. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.05.007>
- Lassissi TA, Hettiarachchy NS, Rayaprolu SJ, Kannan A, Davis M. 2014. Functional properties and Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of soy-*whey* proteins and fractions. Food Res Int 64: 598-602. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.015>
- Li B, Wu ZQ, Dong LY, Li L. 2012. Purification of soybean isoflavones from soy sauce residue by ultrafiltration. Adv Mater Res 581-582: 1184-1188. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.581-582.1184>
- Liu W, Zhang HX, Wu ZL, Wang YJ, Wang LJ. 2013. Recovery of isoflavone aglycones from soy *whey* wastewater using foam fractionation and acidic hydrolysis. J Agric Food Chem 61: 7366-7372. <https://doi.org/10.1021/jf401693m>
- Maharani A, Kurniawati D, Aryanti N. 2012. Pengaruh jenis agen pengendapan alami terhadap karakteristik tahu. J Teknol Kimia Industri 1: 528-533.
- Midayanto DN, Yuwono SS. 2014. Penentuan atribut mutu tekstur tahu untuk direkomendasikan sebagai syarat tambahan dalam standar nasional Indonesia. J Pangan Agroind 2: 259-267.
- Mullally MM, Meisel H, FitzGerald RJ. 1997. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. Int Dairy J 7: 299-303. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(97\)00018-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00018-6)
- Muskitta M, Tuapattinaya PMJ. 2016. Analisis kadar protein pada acoroides milk berdasarkan suhu dan lama penyimpanan. Biopendix 2: 133-139. <https://doi.org/10.30598/biopendixvol2issue2page133-139>
- Muthia KNS, Sarjono PR, Aminin ALN. 2017. Aktivitas antioksidan dan antibakteri produk fermentasi susu kedelai dan whey tahu menggunakan bakteri asam laktat komersial. J Kimia Sains Apl 20: 9-12. <https://doi.org/10.14710/jksa.20.1.9-12>

- Nabilatul RLA, Wahyuningsih D, Hidayah WW, Aminin ALN. 2014. Jelly fermented soy whey as antioxidants source of alternative functional food. *J Sains Matematika* 22: 67-71.
- Nawang Sari DN, Legowo AM, Mulyani S. 2012. Kadar laktosa, keasaman dan total bahan padat whey fermentasi dengan penambahan jus kacang hijau. *J Apl Teknol Pangan* 1: 12-14.
- Nursiwi A, Utami R, Andriani M, Sari AP. 2015. Fermentasi whey limbah keju untuk produksi kefir oleh kefir grains. *J Teknol Hasil Pertanian* 8: 37-45. <https://doi.org/10.20961/jthp.v0i0.12794>
- Pan D, Cao J, Guo H, Zhao B. 2012. Studies on purification and the molecular mechanism of a novel ACE inhibitory peptide from whey protein hydrolysate. *Food Chem* 130: 121-126. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.011>
- Prastujati AU, Hilmi M, Khirzin MH. 2018. Pengaruh konsentrasi starter terhadap kadar alkohol, pH, dan total asam tertitrasi (TAT) whey kefir. *J Ilmu Peternakan Terapan* 1: 63-69. <https://doi.org/10.25047/jipt.v1i2.893>
- Ratnayani K, Suter IK, Antara NS, Putra INK. 2019. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity of peptide fraction of germinated pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). *Indonesian J Chem* 19: 900-906. <https://doi.org/10.22146/ijc.37513>
- Sarmadi BH, Ismail A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* 31: 1949-1956. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>
- Singh A, Adak S, Karmakar S, Banerjee R. 2014. Impact of processing condition on nutraceutical potency of soy whey hydrolysate. *J Food Qual* 37: 403-414. <https://doi.org/10.1111/jfq.12117>
- Singh BP, Vij S, Hati S. 2014. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides* 54: 171-179. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.01.022>
- Sitanggang AB, Alexander R, Budijanto S. 2020a. The utilization of bilimbi (*Averrhoa bilimbi*) and lime (*Citrus aurantifolia*) juices as natural acid coagulants for tofu production. *J Food Sci Technol* 57: 4660-4670. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04503-5>
- Sitanggang AB, Lesmana M, Budijanto S. 2020b. Membrane-based preparative methods and bioactivities mapping of tempe-based peptides. *Food Chem* 329: 127193. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127193>
- Sitanggang AB, Sinaga WSL, Wie F, Fernando F, Krusong W. 2020c. Enhanced antioxidant activity of okara through solid state fermentation of GRAS fungi. *Food Sci Technol* 40: 178-186. <https://doi.org/10.1590/fst.37218>
- Sitanggang AB, Sudarsono S, Syah D. 2018. Pendugaan peptida bioaktif dari susu terhidrolisis oleh protease tubuh dengan teknik in silico. *J Teknol Industri Pangan* 29: 93-101. <https://doi.org/10.6066/jtip.2018.29.1.93>
- Speroni F, Milesi V, Añón MC. 2010. Interactions between isoflavones and soybean proteins: Applications in soybean-protein-isolate production. *LWT-Food Sci Technol* 43: 1265-1270. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.03.011>
- Susanti R, Hidayat E. 2017. Profil protein susu dan produk olahannya. *J MIPA* 39: 98-106.
- Syah D, Sitanggang AB, Faradilla RF, Trisna V, Karsono Y, Septianita DA. 2015. The influences of coagulation conditions and storage proteins on the textural properties of soy-curd (tofu). *CYTA-J Food* 13: 259-263. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.948071>
- Tu C, Tang S, Azi F, Hu W, Dong M. 2019. Use of kombucha consortium to transform soy whey into a novel functional beverage. *J Funct Foods* 52: 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.024>
- Winarsi H, Purwanto A, Dwiyantri H. 2010. Kandungan protein dan isoflavon pada kedelai dan kecambah kedelai. *J Biota* 15: 186-193. <https://doi.org/10.24002/biota.v15i2.2696>
- Zhang F, Wang Z, Xu S. 2009. Macroporous resin purification of grass carp fish (*Ctenopharyngodon idella*) scale peptides with *in vitro* angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory ability. *Food Chem* 11: 387-392. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.015>