

**KORELASI LAMA WAKTU OZONISASI TERHADAP LAJU
PENGENDAPAN, KADAR PROTEIN TERLARUT, AROMA,
DAN VITAMIN B12 PADA SARI TEMPE**

SKRIPSI

Oleh

SYEKHA HUMAIRA SAYYIDATUS SYAR'IYAH



**PROGRAM STUDI S-1 TEKNOLOGI PANGAN
FAKULTAS PETERNAKAN DAN PERTANIAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2025**

KORELASI LAMA WAKTU OZONISASI TERHADAP LAJU
PENGENDAPAN, KADAR PROTEIN TERLARUT, AROMA,
DAN VITAMIN B12 PADA SARI TEMPE

Oleh

SYEKHA HUMAIRA SAYYIDATUS SYAR'IYAH
NIM : 23020121130069

Salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Teknologi Pangan pada Program Studi S-1 Teknologi Pangan
Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro

PROGRAM STUDI S-1 TEKNOLOGI PANGAN
FAKULTAS PETERNAKAN DAN PERTANIAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2025

LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Syekha Humaira Sayyidatus Syar'iyah
N I M : 23020121130069
Program Studi : S1 Teknologi Pangan

dengan ini menyatakan sebagai berikut:

1. Skripsi yang berjudul: **Korelasi Lama Waktu Ozonisasi terhadap Laju Pengendapan, Kadar Protein Terlarut, Aroma, dan Vitamin B12 pada Sari Tempe** dan penelitian yang terkait dengan skripsi ini merupakan karya penulisan saya sendiri.
2. Setiap ide atau kutipan dari karya orang lain berupa publikasi atau bentuk lainnya dalam skripsi ini, telah diakui sesuai dengan standar prosedur disiplin ilmu.
3. Penulis juga mengakui bahwa skripsi ini dapat dihasilkan berkat bimbingan dan dukungan penuh dari Pembimbing yaitu: **Dr. Sri Mulyani, S.Pt., M.P. dan Ahmad Ni'matullah Al-Baarri S.Pt., M.P., Ph.D.**

Apabila di kemudian hari dalam skripsi ini ditemukan hal-hal yang menunjukkan telah dilakukannya kecurangan akademik, maka penulis bersedia gelar sarjana yang telah penulis dapatkan ditarik sesuai dengan ketentuan dari Program Studi S-1 Teknologi Pangan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro.

Semarang, (September 2025)

Penulis.



(Syekha Humaira Sayyidatus Syar'iyah)

Mengetahui,

Pembimbing Anggota

Pembimbing Utama

Dr. Sri Mulyani, S.Pt., M.P..

Ahmad N. Al-Baarri, S.Pt., M.P., Ph.D.

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Judul Skripsi : KORELASI LAMA WAKTU OZONISASI
TERHADAP LAJU PENGENDAPAN, KADAR
PROTEIN TERLARUT, AROMA, DAN
VITAMIN B12 PADA SARI TEMPE

Nama Mahasiswa : SYEKHA HUMAIRA SAYYIDATUS
SYAR'IAH

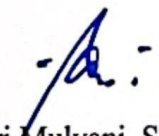
Nomor Induk Mahasiswa : 23020121130069

Program Studi/Departemen : S-1 TEKNOLOGI PANGAN

Fakultas : PETERNAKAN DAN PERTANIAN

Telah disidangkan di hadapan Tim Penguji
dan dinyatakan lulus pada tanggal ...**24 SEP 2025**

Pembimbing Utama


Dr. Sri Mulyani, S.Pt., M.P.

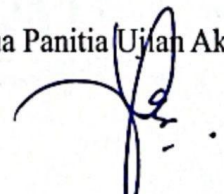
Pembimbing Anggota


Ahmad N. Al-Baarri, S.Pt., M.P., Ph.D.

Ketua Program Studi


Ahmad N. Al-Baarri, S.Pt., M.P., Ph.D.

Ketua Panitia Ujian Akhir Program


Dr. Bhakti Etza Setiani, S.Pt., M.Sc.

Dekan


Prof. Sugiharto, S.Pt., M.Sc., Ph.D.

Ketua Departemen


Ahmad N. Al-Baarri, S.Pt., M.P., Ph.D.

RINGKASAN

SYEKHA HUMAIRA SAYYIDATUS SYAR'YAH. 23020121130069. 2025. Korelasi Lama Waktu Ozonisasi terhadap Laju Pengendapan, Kadar Protein Terlarut, Aroma, dan Vitamin B12 pada Sari Tempe. (Pembimbing: **SRI MULYANI** dan **AHMAD NI'MATULLAH AL-BAARRI**).

Sari tempe termasuk minuman nabati hasil fermentasi kedelai yang memiliki nilai gizi tinggi, terutama protein. Proses fermentasi juga meningkatkan kelarutan protein sehingga sari tempe lebih mudah dicerna. Namun, sari tempe memiliki aroma khas langu dan adanya endapan yang terbentuk dapat mempengaruhi kualitas fisik produk. Ozon sebagai oksidator kuat dapat mengoksidasi senyawa organik dalam sari tempe sehingga berpotensi mengubah karakteristik fisik dan kimianya. Ozon berbentuk gas yang terdiri dari 3 atom oksigen yang memiliki bau tajam. Ozon bersifat tidak stabil dan dapat terdekomposisi menjadi O_2 dan O^* . Dekomposisi ozon dapat membentuk OH radikal dan mengoksidasi senyawa pada sari tempe. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui korelasi antara laju pengendapan, kadar protein terlarut, aroma langu, dan vitamin B12 dengan lama waktu ozonisasi yang berbeda. Penelitian ini dilaksanakan di UPT Laboratorium Terpadu, Laboratorium Rekayasa Pangan dan Hasil Pertanian Universitas Diponegoro serta Laboratorium Saraswanti Indo Genetch, Semarang.

Penelitian dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 4 perlakuan dan 5 kali pengulangan sehingga diperoleh 20 unit percobaan. Perlakuan yang digunakan adalah variasi lama waktu ozonisasi 0 menit (kontrol), 2 menit, 4 menit, dan 6 menit dengan pemanasan $70^\circ C$. Sampel disimpan pada *chiller* $\pm 4-5^\circ C$ dan diuji laju pengendapan, kadar protein terlarut, aroma langu, dan vitamin B12. Data hasil penelitian parameter laju pengendapan dan kadar protein terlarut dianalisis menggunakan *GraphPad Prism* analisis korelasi Pearson, sedangkan parameter aroma langu dianalisis menggunakan *GraphPad Prism* analisis korelasi Spearman. Parameter vitamin B12 dianalisis secara deskriptif.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin lama waktu ozonisasi maka laju pengendapan semakin cepat dan aroma langu semakin hilang. Kadar protein terlarut sari tempe cenderung stabil seiring lamanya waktu pengozonan. Oleh karena itu, waktu ozonisasi 6 menit merupakan perlakuan yang terbaik untuk mendapatkan pengendapan yang maksimal, aroma langu minimal, dan protein terlarut yang masih dalam keadaan stabil. Vitamin B12 sari tempe tidak terdeteksi pada ozonisasi 0 menit dan 6 menit.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Korelasi Lama Waktu Ozonisasi Terhadap Laju Pengendapan, Kadar Protein Terlarut, Aroma, dan Vitamin B12 pada Sari Tempe". Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini tidak dapat diselesaikan tanpa adanya dukungan dari seluruh pihak yang terlibat di dalamnya. Penulis menyadari tanpa adanya doa, dukungan, bimbingan, serta motivasi dari berbagai pihak, penulis akan mengalami kesulitan untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Keluarga penulis, yaitu Bapak Moch Mirza Hidayat dan Ibu Dini Iswandari selaku orang tua penulis, Mochammad Naufal Mirza selaku kakak penulis serta segenap keluarga besar yang senantiasa telah memberikan dukungan moral, material, dan doa sehingga penulis dapat menjalankan perkuliahan dan menyelesaikan skripsi dengan baik.
2. Prof Sugiharto S.Pt., M.Sc., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro yang telah memberikan izin dan kesempatan bagi penulis untuk melaksanakan penelitian dan penulisan skripsi untuk memperoleh gelar sarjana.
3. Dr. Sri Mulyani, S.Pt., M.P. selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah memberikan bimbingan, arahan, saran, dan motivasi serta semangat kepada penulis agar dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi dengan baik.
4. Bapak Ahmad Ini'matullah Al-Baarri, S.Pt., M.P., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Utama, Dosen Wali, Ketua Departemen Pertanian, serta Ketua Program Studi S-1 Teknologi Pangan Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro yang telah memberikan bimbingan, arahan, saran, motivasi, serta pengalaman berharga kepada penulis agar dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi dengan baik.

5. Prof. Ir. Anang Mohamad Legowo, M.Sc., Ph.D., dan Bapak Masagus Haidir Tamimi S.T.P., M.Sc. selaku Dosen Penguji serta dan Ibu Dr. Bhakti Etza Setiani, S.Pt., M.Sc selaku Dosen Panitia yang telah memberikan arahan, saran, serta masukan kepada penulis dalam pelaksanaan sidang akhir skripsi dengan baik.
6. Seluruh dosen, tenaga pendidik, dan staff administrasi Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, terutama Program Studi S-1 Teknologi Pangan yang telah membantu penulis selama masa perkuliahan.
7. Sahabat-sahabat penulis, Widya Rakhma, Merinda Tri Wardani, Dewi Fadhillah, Nasywa Sita, dan Haajid Azzakah yang telah hadir sebagai teman dalam suka dan duka, kebersamai penulis semenjak di awal perkuliahan hingga akhir penulisan skripsi ini. Terima kasih telah hadir sebagai penyemangat di saat penulis berada dalam titik terendahnya.
8. Widya Rakhma selaku rekan penelitian penulis yang telah berjuang bersama dan selalu memberi dukungan, kebersamai, dan membantu selama penelitian hingga penyusunan skripsi.
9. Teknisi UPT Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, yaitu Mbak Ailsa dan Mbak Tika yang telah memberikan bimbingan, arahan, dan motivasi kepada penulis selama penelitian hingga penyusunan skripsi.
10. Kak William Arthur Leo yang telah memberikan ilmu dan bersedia meluangkan waktunya untuk membimbing dan mengarahkan penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi dengan baik.
11. Sahabat-sahabat penulis yaitu Vika, Ulik, Dian, Rani, Widya, Nasheila, Cantika, Ayuni yang telah memberikan kekuatan, menjaga kewarasan, dan dukungan serta motivasi.
12. Vika Nur Aprilianto Putri dan Aulia Nur Azizah selaku sahabat penulis yang telah kebersamai, memberikan motivasi, semangat, sebagai pendengar keluh kesah dan senantiasa menguatkan penulis ketika mulai meragukan diri sendiri.

13. Seluruh teman-teman Program Studi S-1 Teknologi Pangan FPP angkatan 2021 yang telah memberikan bantuan kepada penulis selama masa perkuliahan.
14. Seluruh pihak yang telah membantu secara langsung maupun tidak langsung dalam penyusunan skripsi ini, yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan dan penulisan skripsi ini masih belum sempurna baik dari segi materi maupun penyajiannya. Oleh karena itu, kritik dan saran dari pembaca sangat dibutuhkan sebagai bahan evaluasi dan perbaikan bagi penulis kedepannya. Penulis berharap semoga tugas akhir berupa skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak

Semarang, September 2025

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR ILUSTRASI.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Kedelai.....	5
2.2. Tempe.....	7
2.3. Sari Tempe.....	9
2.4. Teknologi Pengolahan <i>Non-Thermal</i>	11
2.5. Teknologi Ozon.....	12
2.6. Laju Pengendapan.....	13
2.7. Protein Terlarut.....	15
2.8. Aroma.....	15
2.9. Vitamin B12 (<i>Cyanocobalamin</i>)	16
BAB III. MATERI DAN METODE.....	19
3.1. Materi Penelitian.....	19
3.2. Metode Penelitian.....	20
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	Error!
Bookmark not defined.	
4.1. Laju Pengendapan.....	Error!
Bookmark not defined.	

4.2. Protein Terlarut.....	Error!
Bookmark not defined.	
4.3. Aroma Langu.....	Error!
Bookmark not defined.	
4.4. Vitamin B12.....	Error!
Bookmark not defined.	
BAB V. SIMPULAN DAN SARAN.....	Error!
Bookmark not defined.	
5.1 Simpulan.....	
Error! Bookmark not defined.	
5.2	
Saran.....	Error
! Bookmark not defined.	
DAFTAR PUSTAKA.....	Error!
Bookmark not defined.	
LAMPIRAN.....	Error!
Bookmark not defined.	
RIWAYAT HIDUP.....	
Error! Bookmark not defined.	

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Tabel 1. Nilai Gizi Sari Tempe, Susu Kedelai dan Susu Sapi.....	10
2. Tabel 2. Pedoman Derajat Korelasi.....	21
3. Tabel 3. Analisis Korelasi Waktu Ozonasi dengan Laju Pengendapan..... Bookmark not defined.	Error!
4. Tabel 4. Analisis Korelasi Waktu Ozonasi dengan Protein Terlarut..... Bookmark not defined.	Error!
5. Tabel 5. Analisis Korelasi Waktu Ozonasi dengan Aroma Langu..... Bookmark not defined.	Error!
6. Tabel 6. Analisis Vitamin B12 pada Waktu Ozonisasi 0 dan 6 menit..... Bookmark not defined.	Error!

DAFTAR ILUSTRASI

Nomor	Halaman
1. Ilustrasi 1. Kacang Kedelai.....	5
2. Ilustrasi 2. Rata-rata Konsumsi Tempe per Kapita Setiap Minggu.....	7
3. Ilustrasi 3. Tempe.....	8
4. Ilustrasi 4. Diagram Alir Proses Ozonisasi Sari Tempe.....	23
5. Ilustrasi 5. Grafik Laju Pengendapan 0, 2, 4, 6 menit Pengozonean.....	Error! Bookmark not defined.
6. Ilustrasi 6. Grafik Kadar Protein Terlarut 0, 2, 4, 6 menit Pengozonean.....	Error! Bookmark not defined.
7. Ilustrasi 7. Grafik Aroma Langu 0, 2, 4, 6 menit Pengozonean.....	Error! Bookmark not defined.

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Lampiran 1. Data Hasil Pengujian Laju Pengendapan..... Bookmark not defined.	Error!
2. Lampiran 2. Output GraphPad Prism Laju Pengendapan..... Bookmark not defined.	Error!
3. Lampiran 3. Data Hasil Pengujian Protein Terlarut..... Bookmark not defined.	Error!
4. Lampiran 4. Output <i>GraphPad Prism</i> Protein Terlarut..... Bookmark not defined.	Error!
5. Lampiran 5. Data Hasil Pengujian Aroma Langu..... Bookmark not defined.	Error!
6. Lampiran 6. Formulir Uji Organoleptik..... Bookmark not defined.	Error!
7. Lampiran 7. Output <i>GraphPad Prism</i> Aroma Langu..... Bookmark not defined.	Error!
8. Lampiran 8. Data Hasil Uji Vitamin B12..... Bookmark not defined.	Error!

9. Lampiran 9. Dokumentasi Penelitian.....	Error!
--	---------------

Bookmark not defined.

10. Lampiran 10. Dokumentasi Sari Tempe.....	Error!
--	---------------

Bookmark not defined.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia menjadi salah satu pasar kedelai terbesar di Asia yang mencapai nilai konsumsi lebih dari 50% dari volume pasar Asia sebagai akibat dari konsumsi produk olahan kedelai yang sangat populer oleh masyarakat Indonesia, yang berupa tempe. Selain sebagai konsumen kedelai, Indonesia juga merupakan produsen kedelai dengan produksi yang relatif stabil. Tidak dapat dipungkiri, tempe merupakan makanan khas masyarakat Indonesia untuk segala usia. Berdasarkan data Badan Standardisasi Nasional tahun 2023, Indonesia menjadi produsen tempe terbesar di dunia dengan produksi tempe mencapai 2,4 juta ton per tahun. Rata-rata konsumsi per kapita seminggu di Indonesia konsumsi tempe naik sebesar 2,14% pada tahun 2023, tetapi mengalami penurunan sebesar 4,90% pada tahun 2024 (BPS, 2024). Meskipun terdapat sedikit penurunan dari tahun sebelumnya, tempe tetap gemari oleh masyarakat dan tidak pudar seiring dengan perkembangan jaman. Tempe juga termasuk sumber protein yang mudah diperoleh dan memiliki harga yang terjangkau.

Pengolahan tempe dapat diolah menjadi produk minuman berupa sari tempe yang lebih mudah dicerna karena bahan utama yang digunakan dalam pembuatannya melewati proses fermentasi terlebih dahulu sehingga mudah diserap oleh tubuh. Proses fermentasi menyebabkan adanya degradasi senyawa kompleks protein yang terdapat pada kedelai menjadi peptide, yaitu olipeptida, dipeptida, dan tripeptida (Supriyanto *et al.*, 2022). Sari tempe memiliki kekurangan yaitu beraroma langu khas tempe dan terdapat endapan yang tidak terlarut sehingga dapat mempengaruhi kualitas fisik sari tempe.

Teknologi ozonisasi sebagai metode pengolahan *non-thermal* yang tersusun dari tiga atom oksigen (O_3) yang dapat diaplikasikan dalam industri pangan. Badan pengawas seperti FDA (*Food and Drug Administration*) menyatakan bahwa ozon termasuk dalam kategori GRAS atau *Generally Recognized as Safe* karena sifatnya yang tidak stabil sehingga dapat terurai menjadi oksigen (O_2) ke udara (Panebianco *et al.*, 2021). Ozon mampu berperan sebagai desinfektan dan bahan pengoksidasi yang dapat menghancurkan dinding sel bakteri sehingga jumlah mikroba dalam pangan tereduksi (Rangel *et al.*, 2022). Selain itu, dekomposisi ozon dapat membentuk radikal hidroksil yang menyebabkan peristiwa oksidasi senyawa organik menjadi senyawa yang lebih sederhana (Cinthyia *et al.*, 2019). Oksidasi tersebut menyebabkan komponen dalam sari tempe mengalami denaturasi yang menyebabkan terbentuknya agregat, senyawa padatan terlarut dapat berubah menjadi sedimen yang tidak larut. Proses degradasi senyawa organik pada sari tempe menyebabkan adanya agregat. Hal ini dikarenakan adanya interaksi

hidrofobik dari senyawa organik oleh proses ozonasi sehingga menyebabkan agregasi serta menurunkan solubilitasnya (Fauzi *et al*, 2023).

Ozon (O_3) akan terdekomposisi menjadi O_2 dan O^* atau *singlet oxygen*. *Singlet oxygen* inilah yang akan mengoksidasi senyawa organik maupun anorganik di dalam sari tempe (Kristanti dan Desy, 2012). Ozon bersifat sebagai oksidator kuat karena menghasilkan radikal hidroksil, sehingga ozon termasuk salah satu dari ROS atau *Reactive Oxygen Species* (Sari *et al.*, 2013). *Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan radikal bebas atau ion yang sangat reaktif karena memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan, sehingga mudah bereaksi dengan komponen senyawa lainnya (Li Robert *et al.*, 2016).

Perlakuan ozon berisiko menyebabkan peningkatan radikal bebas yang dapat menyebabkan stres oksidatif dan merusak komponen sel seperti protein, karbohidrat, lemak, dan DNA. Kerusakan DNA mampu memicu timbulnya berbagai penyakit serius, termasuk kanker (Hikmah dan Hardiany, 2022). Vitamin B12 dalam produk digunakan sebagai kofaktor enzim dalam metabolisme di dalam tubuh. Vitamin B12 berperan dalam metabolisme metionin, yang merupakan prekursor sistein, yaitu salah satu asam amino penyusunan glutathion. Glutathion berfungsi sebagai antioksidan yang mampu mereduksi radikal bebas, sehingga berperan dalam melindungi sel dari kerusakan oksidatif.

Teknologi ozon dinilai dapat memberikan pengaruh pada aroma produk pangan. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan dari Ton *et al.*, (2022) yang menggunakan teknik ozonisasi sehingga aroma *off flavor* yang timbul dapat

berkurang. Menurut penelitian Haryono (2022) teknologi ozon dan penggunaan gelombang ultrasonik berpengaruh terhadap nilai rendemen biodiesel minyak biji kapuk. Selain itu, menurut penelitian Fauzi *et al.*, (2023) teknologi ozon mampu mengoksidasi protein sehingga terdenaturasi dan terbentuklah agregat. Selain itu, ozon memiliki risiko dalam peningkatan radikal bebas. Vitamin B12 dalam produk dibutuhkan dalam tubuh untuk penyusunan glutathione yang nantinya mampu mereduksi radikal bebas. Oleh karena itu, peneliti bermaksud untuk melakukan penelitian terkait hal tersebut.

1.2. Tujuan dan Manfaat Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui korelasi atau hubungan lama waktu ozonisasi terhadap laju pengendapan, aroma langu, kadar protein terlarut, dan kadar vitamin B12 pada minuman sari tempe. Sedangkan, manfaat dari penelitian ini yaitu untuk memperoleh produk lokal minuman nabati berbahan dasar tempe tinggi nutrisi yang dapat dijadikan alternatif diversifikasi produk pangan pengganti susu sapi yang dapat dikonsumsi oleh penderita *lactose intolerance* sebagai pangan fungsional dan bermanfaat bagi tubuh.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kedelai

Kedelai (*Glycine mas*) merupakan salah satu tanaman dengan famili legum dan termasuk jenis kacang-kacangan yang memiliki kandungan protein cukup tinggi. Kedelai banyak digunakan sebagai bahan dasar produk fermentasi seperti tempe dan tahu yang menjadi sumber protein murah dan mudah didapat oleh masyarakat. Kedelai relatif mudah untuk ditanam karena bukan termasuk tanaman yang bergantung pada iklim tertentu, tentunya dengan memperhatikan kelembaban, suhu, cahaya, dan jarak tanam, maka kedelai dapat tumbuh dengan baik (Fanggidae *et al.*, 2020). Pemilihan varietas unggul dan teknik budidaya yang tepat dapat meningkatkan hasil panen secara signifikan.



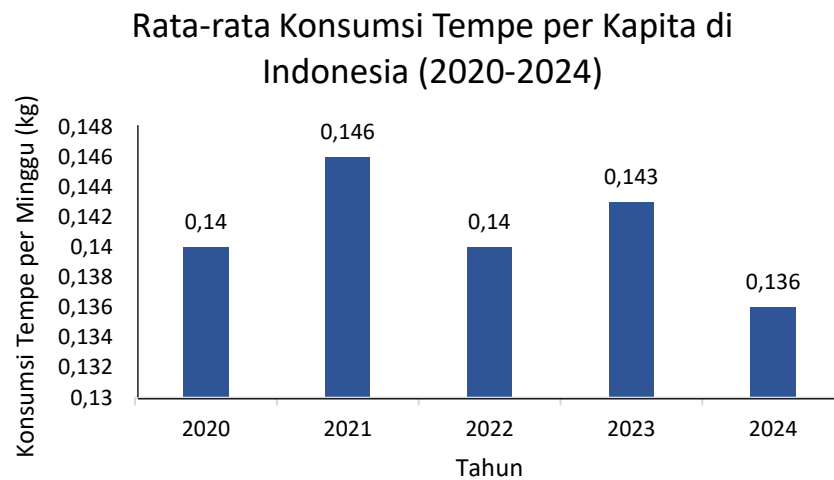
Ilustrasi 1. Kacang Kedelai

Sumber: Genpi.co (2025)

Menurut Saputra (2019) tempe memiliki klasifikasi sebagai berikut: Kingdom Plantae, Subkingdom Cormobionta, Divisi Spermatophyta, Subdivisi Angiospermae, Kelas Archichlamydae, Ordo Rosales, Subordo Legummosinae, Famili Leguminosae, Subfamili Papilionaceae, Tribe Phaseoleae, Subtribe Phaseolinae (Glycininae), Genus *Glycine*, dan Spesie *Glycine max* L.

Kacang kedelai menjadi salah satu sumber protein karena 40% dari nutrisinya adalah protein, sisanya adalah air, lemak, serat, gula, dan berbagai senyawa lainnya (Amorta dan Nurhidajah, 2020). Kedelai juga mengandung senyawa antioksidan berupa isoflavon yang mampu menangkal radikal bebas, contohnya seperti menghambat kinerja pada enzim tirosin kinase yang memicu timbulnya tumor hingga kanker (Yulfianti *et al.*, 2018). Selain itu, kedelai juga dapat menurunkan obesitas serta cocok untuk diet karena memiliki kandungan protein tinggi yang membuat rasa kenyang lebih cepat dan lama (Fathimah dan Mulyati, 2015). Produk olahan kedelai cukup beragam, seperti kecap, tauco, tempe, tahu, serta berbagai produk lainnya.

2.2. Tempe



Ilustrasi 2. Rata-rata Konsumsi Tempe per Kapita Setiap Minggu
Sumber: Badan Pusat Statistik (2024)

Berdasarkan Ilustrasi 2 menunjukkan rata-rata konsumsi tempe per kapita di Indonesia selama periode 2020 hingga 2024. Rata-rata konsumsi per minggu mengalami fluktuasi, dengan nilai tertinggi mencapai 0,146 kg pada tahun 2021 dan penurunan terendah sebesar 0,136 kg pada tahun 2024. Pada tahun 2020 hingga 2023, konsumsi tempe tercatat stabil di angka 0,14 per minggu, sedangkan pada tahun 2024 konsumsi tempe mengalami sedikit penurunan menjadi 0,136 kg. Meskipun terdapat sedikit penurunan, tempe tetap menjadi sumber protein nabati yang populer dan banyak diminati karena keterjangkauannya serta nilai gizi yang tinggi, sehingga kemungkinan konsumsi tempe akan terus bertahan dan bahkan mengalami peningkatan kembali di masa mendatang.



Ilustrasi 3. Tempe
Sumber: Lukyani (2022)

Tempe merupakan olahan fermentasi dari kedelai menggunakan kapang dengan genus *Rhizopus*, yaitu *Rhizopus oligosporus* dan *Rhizopus oryzae*. (Sine dan Soetato, 2018). Jenis inokulum dalam fermentasi tempe sangat mempengaruhi kualitas produk akhir yang dihasilkan, diikuti dengan lamanya waktu fermentasi serta suhu dan kelembaban yang sesuai. *Rhizopus oligosporus* merupakan inokulum yang baik untuk fermentasi tempe karena dapat menghasilkan antibiotik berupa glikoprotein yang berperan penting dalam sistem imun (Mambang *et al.*, 2014).

Pengolahan fermentasi kedelai menjadi tempe dapat meningkatkan daya cerna. Hal ini dikarenakan adanya enzim protease yang mampu memecah protein dan senyawa antigizi yang terikat dengan protein sehingga kandungan protein kasar akan menurun dan meningkatkan daya cernanya (Rahayu *et al.*, 2021). Daya cerna protein yang tinggi menyebabkan penyerapan asam amino yang tinggi, sedangkan apabila daya cernanya rendah maka penyerapan asam amino juga menjadi rendah lalu keluar melalui feses (Fitri *et al.*, 2023).

Kapang tempe ditunjukkan dengan adanya miselium berwarna putih (kumpulan hifa) yang memproduksi berbagai enzim seperti enzim protease lipase, dan amilase (Suknia dan Rahmani, 2020). Tempe mengandung berbagai nutrisi seperti protein, zat besi, natrium, antioksidan seperti isoflavon, dan vitamin B12, A, D, E, serta K (Aryanta, 2023). Namun, tidak semua tempe mengandung vitamin B12. Pembentukan vitamin B12 pada tempe dikarenakan adanya bakteri *Klasiella pneumoniae*, bukan dari hasil fermentasi kapang *Rhizopus sp.* (Zhang *et al.*, 2019). Berbagai nutrisi yang dimiliki tempe hasil fermentasi membuatnya menjadi produk fungsional yang bermanfaat bagi tubuh.

Tempe dapat meningkatkan hemoglobin bagi penderita anemia, sebagai pangan anti diabetes, dapat mencegah penyakit jantung koroner, kanker payudara, kanker prostat, menjaga pencernaan, peredaran darah, dan pernapasan (Kristiadi dan Lunggani, 2022). Sifat sensoris yang dimiliki tempe dapat mengurangi tingkat kesukaan konsumen. Tempe memiliki aroma langu, sehingga dibutuhkan perlakuan untuk meningkatkan daya terima oleh konsumen.

2.3. Sari Tempe

Sari tempe atau yang disebut juga susu tempe merupakan salah satu minuman olahan nabati yang memiliki kandungan gizi tidak kalah dari susu hewani (Ariyanto *et al.*, 2015). Kandungan serat pada sari tempe dapat memperlancar saluran pencernaan. Selain itu, aman dikonsumsi bagi penderita *lactose intolerance* karena tidak mengandung laktosa yang dapat menyebabkan gangguan pencernaan seperti kembung nyeri perut, hingga diare (Nurizah, 2019). Menurut penelitian dari

Suryani *et al* (2010) perbedaan nilai gizi antara sari tempe atau susu tempe, susu kedelai, dan susu sapi tertera pada Tabel 1 adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Nilai Gizi Sari Tempe, Susu Kedelai dan Susu Sapi per 100 g

Nilai Gizi	Sari Tempe	Susu Kedelai	Susu Sapi
Energi (cal)	55,54	41,00	51,00
Air (g)	86,23	87,00	88,33
Protein (g)	2,14	3,50	3,20
Lemak (g)	1,82	2,50	3,50
Karbohidrat (g)	7,65	5,00	4,30
Abu (%)	0,15	-	-
Serat Kasar (%)	2,01	-	-

Berdasarkan Tabel 1, nilai gizi sari tempe tidak jauh berbeda dengan susu kedelai dan susu sapi. Nilai gizi protein pada sari tempe lebih rendah dibandingkan susu kedelai karena adanya proses fermentasi pada tempe yang menyebabkan adanya pemecahan protein menjadi peptida dan asam amino yang mudah larut dalam air (Khanifah, 2013). Hal ini menyebabkan tingginya daya cerna pada sari tempe. Kadar lemak sari tempe yang lebih rendah dibandingkan susu kedelai dan susu sapi dapat digunakan untuk diet yang menyehatkan. Selain itu, terdapat serat kasar (*dietary fiber*) yang merupakan jenis karbohidrat yang tidak dapat dicerna, sehingga akan dibawa melewati usus dan merangsang pergerakan usus sehingga membantu melancarkan sistem pencernaan (Barber *et al.*, 2020).

2.4. Teknologi Pengolahan *Non-Thermal*

Pengolahan *non-thermal* merupakan pengolahan pada industri pangan yang dilakukan dengan tanpa menggunakan panas atau suhu yang rendah. Tujuan dari pengolahan *non-thermal* ini yaitu untuk mempertahankan kualitas pangan seperti pada nilai gizi yang umumnya menurun pada proses pengolahan termal menggunakan panas tinggi (Nabilah dan Oktaviani, 2024). Pengolahan *thermal* dapat merusak beberapa bahan pangan terutama pada kandungan gizi seperti polifenol pada tempe yang sensitif terhadap panas (Safwa *et al.*, 2024). Meskipun menggunakan suhu rendah, teknologi *non-thermal* ini telah terbukti efektif melawan mikroorganisme dan menonaktifkan enzim, sehingga mampu melindungi bahan pangan dari pembusukan. Teknologi pengolahan *non-thermal* juga dinilai lebih ramah lingkungan dan hemat energi karena dapat mengurangi penggunaan panas dalam prosesnya.

Beberapa pengolahan *non-thermal* menurut Safwa *et al* (2024) yaitu *ultrasound*, *Pulsed Electric Field* (PEF), *High Pressure Processing* (HPP), dan *Cold Plasma*. Teknologi *ultrasound* sebagai pengolahan *non-thermal* dibagi menjadi dua yaitu intensitas rendah dan tinggi. Gelombang *ultrasound* intensitas rendah atau tinggi memiliki frekuensi karakteristik lebih besar dari 100kHz dan intensitasnya dibawah 1W/cm² yang kemudian menghasilkan energi yang dapat merusak dinding sel mikroorganisme (Bhargava *et al.*, 2021). *Pulsed Electric Field* (PEF) menggunakan listrik bertegangan tinggi dengan durasi yang sangat singkat dan dialirkan pada bahan pangan yang berada di antara dua elektroda

(Priyanto *et al.*, 2023). *High Pressure Processing* (HPP) menggunakan tekanan hidrostatik yang sangat tinggi yang dapat menyebabkan kerusakan membran, denaturasi protein, dan gangguan metabolisme mikroba (Brenario *et al.*, 2025). Salah satu komponen teknologi hasil dari *cold plasma* adalah ozon (Ardhana, 2020). Ozon sebagai teknologi pengolahan *non-thermal* akan mengoksidasi mikroorganisme patogen, jamur, dan bakteri sehingga mampu memperpanjang umur simpan bahan pangan tanpa meninggalkan residu berbahaya (Farizha *et al.*, 2022).

2.5. Teknologi Ozon

Ozon merupakan teknologi berupa gas yang terdiri dari 3 atom oksigen (O_3) dengan sifatnya yang tidak stabil sehingga dapat berubah menjadi menjadi molekul yang stabil yaitu O_2 dengan cara oksidasi (Haifan, 2017). Hal ini menunjukkan bahwa ozon aman terhadap bahan makanan dan dijuluki *green technology* karena hasil akhirnya tidak meninggalkan residu dan dapat terdekomposisi menjadi oksigen tanpa mencemari lingkungan. Teknologi ozon juga menjadi alternatif metode sanitasi yang dapat diterapkan dalam berbagai bidang seperti pengolahan air minum, penanganan limbah, sterilisasi alat dan bahan mentah hingga pengawetan pangan (Hartoyo dan Rachma 2022).

Teknologi ozon dapat mengurangi ketergantungan pada pengawet berbahan kimia, sehingga dinilai lebih menyehatkan. Ozon dapat menginaktivasi mikroorganisme seperti *E.Coli* dan *B. Cereus* sehingga membuat bahan makanan memiliki masa simpan yang lebih lama (Farizha *et al.*, 2022). Aplikasi ozonisasi

sebagai pengolahan *non-thermal* sebelumnya telah dilakukan pada berbagai produk, salah satunya pada susu segar dimana ozonisasi digunakan untuk menginaktivasi bakteri *E. Coli* dan *Bacillus sp.* dengan mempertahankan komponen bioaktifnya (Suryaningsih *et al.*, 2022). Ozon juga digunakan dalam pengolahan *water treatment* pada air minum sebagai disinfektan untuk menginaktivasi bakteri *E. Coli* dan *Coliform* (Jannah *et al.*, 2021). Selain itu, teknologi ozon juga berperan dalam penghilangan bau oleh mikroorganisme dan senyawa organik (deodorasi), penghilangan zat pewarna organik (dekolorasi), serta dapat menguraikan senyawa organik dan mengoksidasi logam berat (degradator) pada bahan pangan (Sefvia, 2024).

Lama paparan ozon yang diaplikasikan ke bahan pangan harus disesuaikan. Hal ini dikarenakan paparan ozon yang terlalu lama dapat menyebabkan kerusakan pada produk hingga pada kesehatan (Sari *et al.*, 2023). Paparan ozon yang terlalu singkat juga dapat menyebabkan ketidakefektifan dalam menginaktivasi mikroorganisme. Lama paparan ozon yang sesuai, mampu memperpanjang masa simpan pada bawang tanpa adanya penurunan kualitas (Toti *et al.*, 2018). Kerusakan lapisan kutikula pada jaringan epidermis dapat terjadi apabila terlalu lama terpapar ozon, tetapi efektif dalam membunuh mikroba sehingga memperpanjang kesegaran bawang putih (Liu *et al.*, 2021).

2.6. Laju Pengendapan

Laju pengendapan atau *rate sedimentation* merupakan kecepatan atau laju partikel padatan dalam suatu larutan atau suspensi yang mengalami proses

pemisahan dari fase cair ke fase padat dengan ditandai oleh terbentuknya endapan (Rumbino dan Abigael, 2020). Endapan merupakan bagian padatan suatu larutan yang tidak mudah larut dalam air, sedangkan cairan bening di atasnya disebut dengan supernatan. Pembentukan endapan dapat dilakukan secara fisik (sedimentasi), kimia (presipitasi), dan biologi (Sasmito *et al.*, 2019).

Proses pengendapan secara fisik (sedimentasi) dilakukan dengan gaya gravitasi pada partikel padatan yang tersuspensi di dalam cairan (Rumbino dan Abigael, 2020). Partikel-partikel tersebut akan turun ke dasar seiring berjalannya waktu tanpa melalui reaksi kimia baru, contohnya seperti pengendapan lumpur dalam air. Proses pengendapan dengan reaksi kimia (presipitasi) bergantung pada kelarutan zat, suhu, dan konsentrasi ion, sehingga endapan akan terbentuk ketika dua zat yang larut dalam air bereaksi membentuk senyawa tidak larut dalam air (Sartifa *et al.*, 2022). Proses pengendapan biologi merupakan proses yang melibatkan peran mikroorganisme dalam pembentukan endapan (Putri *et al.*, 2020).

Ozonisasi mampu mengoksidasi protein sehingga akan menghasilkan agregat atau endapan yang lebih banyak. Hal ini dikarenakan protein mengalami penurunan solubilitas sehingga terbentuklah agregat dalam bentuk partikel yang besar. Reaksi ozon dapat memecah ikatan peptida sehingga terjadi *crosslinking* pada protein dan adanya modifikasi asam amino. Asam amino tersebut kemudian teroksidasi lalu menyebabkan denaturasi protein dan menurunkan solubilitasnya (Fauzi *et al.*, 2023). Selain itu, ozon dapat memecah lemak, karbohidrat, dan senyawa organik berat lainnya menjadi senyawa yang lebih sederhana (Krisnawati *et al.*, 2014).

2.7. Protein Terlarut

Protein terlarut adalah protein sederhana yaitu oligopeptida yang memiliki rantai pendek dengan kelarutan yang tinggi dan mudah diserap oleh tubuh (Mardhika *et al*, 2020). Analisis kadar protein terlarut dilakukan untuk mengetahui kadar protein yang larut dan dapat diserap oleh tubuh dari minuman sari tempe. Protein terlarut dalam sari tempe mudah dicerna oleh tubuh yang terbentuk dari proses hidrolisis protein selama fermentasi tempe oleh kapang *Rhizopus oligosporus* (Rahayu *et al.*, 2021). Asam amino polar yang berinteraksi dengan lingkungan berair memiliki gugus rantai samping (gugus R) bersifat hidrofilik sehingga mudah larut dalam air. Asam amino polar tersebut seperti serin, asam aspartat, asam glutamat, dan tirosin, sedangkan asam amino bersifat hidrofobik yaitu diantaranya adalah glisin, leusin, isoleusin, fenilalanina, dan triptofan (Rusdah *et al.*, 2017).

2.8. Aroma

Aroma merupakan salah satu atribut organoleptik, dinilai dengan indra penciuman yang dapat menentukan mutu dari suatu produk sebagai tolak ukur penerimaan konsumen. Tempe memiliki aroma khas yang disebabkan oleh fermentasi. Aroma langu merupakan salah satu ciri khas yang kurang disukai dari tempe bagi sebagian orang, terutama pada produk olahan sari tempe ataupun bubuk. Degradasi senyawa seperti lemak dan adanya asam amino menyebabkan adanya aroma khas langu pada tempe (Liuspiani *et al*, 2020).

Aroma langu tersebut dihasilkan dari enzim lipoksigenase yang bersumber dari kedelai kemudian berinteraksi dengan asam lemak tak jenuh yang mengandung gugus cis, cis-1,4-pentadiena. Asam lemak tak jenuh tersebut diantaranya adalah asam linoleat, asam oleat, asam arakidonat, dan lain sebagainya (Shafira, 2020). Reaksi oksidasi tersebut menghasilkan senyawa hidroperoksida yang terurai menjadi asam, keton, dan aldehid yang termasuk senyawa volatil (Christianni, 2015). Menurut Sururi *et al* (2009), tempe memiliki senyawa volatil berupa pentanal yang merupakan aldehid alifatik yang berperan dalam pembentukan aroma.

2.9. Vitamin B12 (*Cyanocobalamin*)

Vitamin B12 dikenal juga sebagai *cyanocobalamin* yang larut dalam air dan merupakan sumber esensial bagi berbagai fungsi biologis dalam tubuh manusia (Polak *et al.*, 2021). Vitamin B12 memiliki peran yang cukup penting dalam pembentukan sel darah merah, menjaga kesehatan sistem saraf, serta sebagai pendukung dalam proses metabolisme energi dan sintesis DNA serta RNA (Amani, 2022). Tubuh manusia tidak dapat memproduksi vitamin B12 secara mandiri karena hanya dapat disintesis oleh mikroorganisme tertentu (Salsabila, 2020). Menurut Pinasti *et al* (2020), proses fermentasi pada tempe dapat meningkatkan asam folat dan membentuk vitamin B12 yang tidak terdapat dalam produk nabati lainnya. Menurut Wolkers-Rooijackers *et al* (2018), produk fermentasi kedelai yang mampu menghasilkan vitamin B12 sebesar 0,7 µg/100g

adalah tempe. Namun, pembentukan vitamin B12 pada tempe dikarenakan adanya bakteri *Klasiella pneumoniae* (Zhang *et al.*, 2019).

Ozon menghasilkan OH radikal yang termasuk salah satu ROS atau *Reactive Oxygen Species* yang merupakan radikal bebas dan mudah bereaksi dengan komponen senyawa lainnya (Sari *et al.*, 2013). Risiko peningkatan radikal bebas dalam produk dapat terjadi, kemudian pada tubuh dapat menyebabkan stres oksidatif dan merusak berbagai sel seperti protein, karbohidrat, lemak, dan DNA yang dapat menyebabkan penyakit serius termasuk kanker (Hikmah dan Hardiany, 2022). Vitamin B12 berperan sebagai kofaktor enzim dalam proses metabolik. Hal tersebut cukup penting sebagai pendukung supaya enzim tersebut dapat melakukan reaksi kimia dalam memetabolisme tubuh, sehingga mampu mereduksi radikal bebas secara langsung. Terdapat dua enzim, yaitu metionin sintase (MS) dan metilmalonil-CoA mutase (MCM) (Offringa *et al.*, 2021).

Enzim metionin sintase (MS) terletak pada sitoplasma yang berperan dalam metabolisme metionin, yaitu mengubah homosistein menjadi metionin dengan bantuan vitamin B12 dalam bentuk metilkobalamin. Sedangkan pada enzim metilmalonil-CoA Mutase terletak pada mitokondria yang berperan dalam metabolisme asam amino rantai cabang seperti isoleusin, valin, metionin, dan treonin. Enzim MCM menggunakan vitamin B12 dalam bentuk adenosilkobalamin berubah menjadi suksinil-CoA (Mascarenhas *et al.*, 2022).

Metionin hasil dari bantuan vitamin B12 dalam bentuk metilkobalamin merupakan prekursor yang digunakan dalam sintesis glutathione. Hal ini sesuai dengan pendapat Espe *et al* (2023) bahwa metionin merupakan prekursor untuk sistein, yaitu satu dari tiga asam amino penyusun glutathione. Glutathione dapat disebut juga sebagai glutathione tereduksi yang mempunyai gugus sulfhidril (-SH) dan merupakan tripeptida yang terdiri dari asam glutamat, sistein, dan glisin yang mampu mereduksi radikal bebas secara langsung (Insani *et al.*, 2020).

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilakukan pada Desember 2024 – April 2025. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Rekayasa Pangan dan Hasil Pertanian dan Unit Pelayanan Teknis Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Semarang, serta Laboratorium Saraswanti Indo Genetech yang berlokasi di Banyumanik, Semarang. Materi dan metode yang digunakan dalam penelitian ini dijelaskan sebagai berikut.

3.1. Materi Penelitian

Materi penelitian mencakup bahan dan alat. Bahan yang digunakan untuk pembuatan sari tempe yaitu tempe kedelai yang berumur 48 jam, diperoleh dari produsen tempe X di Kota Semarang serta air mineral. Bahan yang digunakan untuk pengujian adalah etanol 70%, akuades, *Coomassie Brilliant Blue* (CBB), Bovine Serum Albumin (BSA), asam fosfor 85%, dan larutan standar vitamin B12. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *ozone generator* (VOCOSO *Ozone Generator Sterilizer*, China), ruang *ozone liquid layer*, blender (Philips, Belanda), timbangan analitik, talenan, pisau, alat kukus, kompor listrik, erlenmeyer, gelas ukur, gelas beker (Pyrex, Indonesia), *waterbath* (FAITHFUL), *aluminium foil*, saringan, sendok, baskom, botol plastik, label, *vortex*, spektrofotometer UV-Vis

(Shimadzu, Jepang), *chiller* (Modena, Italia), pipet, tisu dapur, dan sarung tangan lateks.

3.2. Metode Penelitian

Metode penelitian mencakup rancangan penelitian, prosedur penelitian, pengujian parameter, dan analisis data yang diperoleh dari hasil penelitian. Urutan metode penelitian diuraikan sebagai berikut

3.2.1. Rancangan Percobaan

Penelitian ini dilakukan mengacu pada Suharyono *et al* (2011) disertai percobaan awal dengan mempertimbangkan bau ozon yang ditimbulkan sehingga diperoleh 4 perlakuan yaitu kontrol atau P₀ (0 menit), P₁ (2 menit), P₂ (4 menit), dan P₃ (6 menit). Perlakuan tersebut dilakukan sebanyak 5 ulangan sehingga diperoleh 20 percobaan. Hubungan antara lama waktu pengozonan dengan laju pengendapan dan kadar protein terlarut dianalisis menggunakan korelasi *Pearson*, sedangkan hubungan antara lama waktu pengozonan dengan aroma langu menggunakan korelasi *Spearman r*. Hubungan antara lama waktu pengozonan dengan vitamin B12 dijelaskan secara deskriptif berdasarkan literatur terdahulu.

Metode matematika yang digunakan untuk analisis korelasi Pearson yaitu:

$$r = \frac{n\sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{n\sum X^2 - (\sum X)^2} \sqrt{n\sum Y^2 - (\sum Y)^2}}$$

Keterangan :

r : Koefisien korelasi *Pearson*

n : Jumlah sampel

X : Lama waktu pengozonan

Y : Parameter (Laju pengendapan dan kadar protein terlarut)

Model matematika yang digunakan untuk analisis korelasi Spearman yaitu:

$$r_s = 1 - \frac{6\sum d^2}{n(n^2 - 1)}$$

Keterangan :

r_s : Koefisien korelasi Spearman

n : Jumlah sampel

d : Selisih dalam rangking

Hasil nilai r berada pada interval $-1 \leq r \leq 1$. Nilai r ini menunjukkan tingkat hubungan seperti yang tertera pada tabel 2 berikut.

Tabel 2. Pedoman Derajat Korelasi

Interval Koefisien	Tingkat Korelasi
0,000 – 0,199	Sangat Lemah
0,200 – 0,399	Lemah
0,400 – 0,599	Cukup Kuat
0,600 – 0,799	Kuat
0,800 – 1,000	Sangat Kuat

Hipotesis yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut:

H_0 : Lama waktu ozonisasi tidak memiliki hubungan terhadap laju pengendapan, kadar protein terlarut, aroma, dan vitamin B12.

H_1 : Lama waktu ozonisasi memiliki hubungan terhadap laju pengendapan kadar protein terlarut, aroma, dan vitamin B12

Secara statistik, hipotesis empiris di atas dapat dijabarkan sebagai berikut:

H_0 : $r = 0$

H_1 : $r \neq 0$

(= simbol yang menunjukkan kuatnya hubungan)

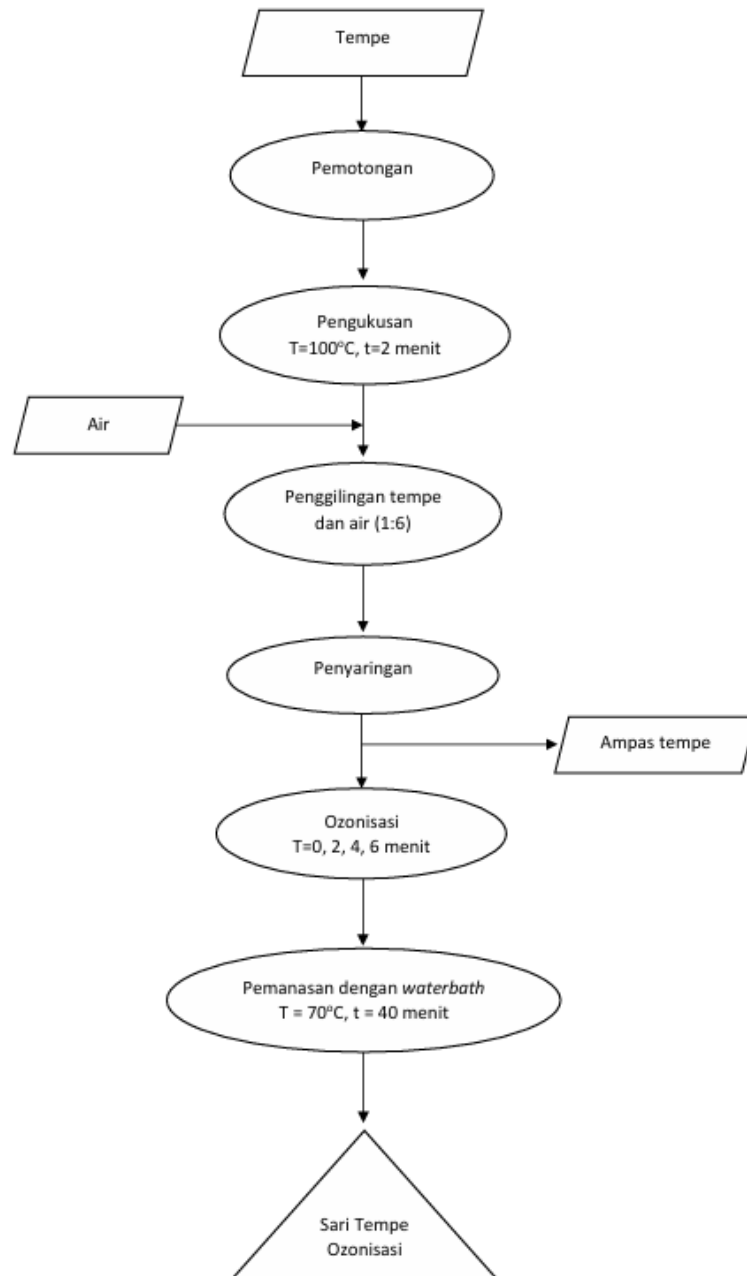
Kriteria pengujian analisis statistic yang digunakan adalah sebagai berikut:

$P \leq 0,05$ berarti H_0 ditolak dan H_1 diterima

$P > 0,05$ berarti H_0 diterima dan H_1 ditolak

3.2.2. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan terdiri dari tahapan pembuatan minuman sari tempe dan tahapan ozonisasi sari tempe. Pembuatan sari tempe melalui beberapa tahap yang diantaranya adalah pemotongan, penimbangan, pengukusan, dan pencampuran. Tahapan ozonisasi sari tempe diantaranya perlakuan ozonisasi kontrol atau 0 menit (P_0), 2 menit (P_1), 4 menit (P_2), dan 6 menit (P_3), serta pemanasan menggunakan *waterbath*. Tahapan tersebut dapat dilihat pada Ilustrasi 4.



Ilustrasi 4. Diagram Alir Proses Ozonisasi Sari Tempe

3.2.3. Pengujian Parameter

Pengujian parameter yang dilakukan pada penelitian ini yaitu karakteristik fisik, sensori, dan kimia. Uji karakteristik fisik yang dilakukan adalah nilai endapan. Pengujian karakteristik sensori yang dilakukan adalah pengujian pada aspek aroma. Pengujian karakteristik kimia yang dilakukan mencakup kadar protein terlarut dan kadar vitamin B12.

3.2.3.1. Laju Pengendapan. Metode pemisahan padatan dengan cairan mengacu pada Setiyadi *et al* (2013) dan Anggraeni (2013) yang dimodifikasi. Metode yang digunakan adalah metode sedimentasi (gaya gravitasi). Mekanisme sedimentasi dilakukan dengan menuangkan suspensi ke dalam gelas ukur 100 mL sebagai sampel dan dihomogenkan terlebih dahulu sebelum pengukuran. Sampel diobservasi setiap 2 jam dengan penyimpanan di dalam *chiller* bersuhu $\pm 10^{\circ}\text{C}$. Seiring dengan berjalannya waktu, partikel-partikel padatan dalam minuman sari tempe akan mengalami proses pengendapan karena aliran yang selalu menuju ke tempat yang lebih rendah. Sampel diamati dan diukur ketinggian batas antara padatan dan supernatan hingga tidak berubah secara signifikan.

3.2.3.2. Kadar Protein Terlarut. Pengujian terhadap kadar protein terlarut mengacu pada He (2011) di dalam Putra *et al* (2024) dengan menggunakan metode Bradford. Pembuatan reagen Bradford diawali dengan melarutkan *Coomassie Brilliant Blue* G-250 ke dalam 50 mL etanol dan ditambahkan 85% H_3PO_4 atau asam fosfat. Larutan asam secara perlahan dimasukkan ke dalam 850 mL H_2O , kemudian disimpan ke dalam *chiller* $\pm 4-5^\circ\text{C}$. Pembuatan larutan standar menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan rentang antara 5 – 100 μL protein. Sampel protein kemudian diencerkan sebanyak 5 – 100 μL per 30 μL . Sampel protein tersebut kemudian ditambahkan sebanyak 30 μL larutan standar. Sediakan dua tabung, tabung pertama untuk larutan standar ditambah dengan 30 μL H_2O . Tabung kedua untuk sampel. Kedua tabung tersebut ditambahkan masing masing 1,5 mL reagen Bradford dan diinkubasi selama 5-10 menit. Pengukuran protein terlarut dilakukan dengan absorbansi 595nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

3.2.3.3. Aroma. Pengujian organoleptik terhadap aroma dilakukan dengan uji rangking yang mengacu pada metode Safitri dan Swarastuti (2013) menggunakan 25 panelis tidak terlatih. Pengujian ini menggunakan atribut aroma langu. Uji rangking aroma langu menggunakan skala uji skor 1 (sangat tidak langu), 2 (tidak langu), 3 (langu), 4 (sangat langu). Pengujian sampel dilakukan dengan pemberian form penilaian kepada panelis dengan 3 digit angka secara acak. Panelis kemudian diminta untuk mengurutkan sampel dari aroma yang sangat langu hingga sampel yang sangat tidak langu.

3.2.3.4. Vitamin B12. Pengujian terhadap kadar vitamin B12 mengacu pada Hioe *et al* (2020) dan Xiang Nan *et al* (2015) dengan metode LC-MS/MS (*Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*). Preparasi sampel dilakukan dengan membuat 7 titik konsentrasi dan dimasukkan ke dalam *vial amber* sebanyak 2 mL, kemudian diencerkan menggunakan pelarut standar. Sampel ditimbang sesuai porsi pengujian ke dalam tabung *falcon* 50 mL dan ditambahkan pelarut ekstraksi, kemudian dilakukan *vortex* dan sonikasi. Larutan disentrifugasi dan dimurnikan menggunakan SPE (*Solid Phase Extraction*). Cairan hasil SPE dievaporasi dengan nitrogen evaporator. Residu dilarutkan kembali dengan pelarut baru, kemudian di *vortex*. Larutan tersebut disaring dan diinjeksikan ke dalam sistem LC-MS/MS

3.2.4. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengujian sari tempe meliputi data laju pengendapan, kadar protein terlarut, aroma, dan vitamin B12. Data yang diperoleh dari hasil pengujian pada parameter laju pengendapan, kadar protein terlarut, dan aroma diolah menggunakan *Graphpad prism* 10.1.2 untuk dianalisis korelasi sehingga diketahui hubungan lama waktu ozonisasi terhadap parameter uji yang disajikan dalam bentuk grafik dan tabel. Apabila signifikansi korelasi yang diperoleh $p < 0,05$ maka dapat dikatakan signifikan, tetapi jika signifikansi korelasi diperoleh $p > 0,05$ maka dapat dikatakan tidak signifikan. Analisis data vitamin B12 dilakukan secara deskriptif yang diperkuat dengan studi pustaka.