

**ANALISIS KORELASI LAMA WAKTU OZONISASI TERHADAP
KARAKTERISTIK FISIKOKIMIA PADA SARI TEMPE
SELAMA PENYIMPANAN**

SKRIPSI

Oleh

WIDYA RAKHMA PUSPANDINGTYAS



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

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tempe termasuk dalam salah satu makanan khas Indonesia yang diperoleh dari hasil fermentasi kedelai dengan bantuan kapang *Rhizopus sp.* Tempe dikenal sebagai sumber protein nabati, rendah lemak jenuh, kaya akan kalsium, dan mengandung berbagai vitamin, terutama vitamin B₁₂ (Aryanta, 2023). Berdasarkan data BPS (2023) rata-rata konsumsi tempe di Indonesia pada tahun 2023 adalah 0,143 kg per kapita per minggu dan mengalami kenaikan sebesar 2,14 % dari tahun sebelumnya, serta produksi tempe dapat mencapai 2,4 juta ton per tahun. Data tersebut mencerminkan tempe sebagai salah satu sumber protein nabati utama dalam pola konsumsi masyarakat Indonesia. Namun, tempe memiliki masa simpan singkat, tekstur mudah melunak, dan aroma langu sehingga perlu pengolahan lebih lanjut untuk meningkatkan mutu dan penerimaan saat dikonsumsi. Salah satu inovasi olahan tempe yang belakangan ini dikembangkan adalah minuman sari tempe sebagai pilihan minuman fungsional.

Minuman sari tempe dapat dikategorikan sebagai susu nabati atau alternatif susu dan saat ini tren konsumsi alternatif susu mengalami peningkatan peminat sehingga minuman sari tempe memiliki potensi pasar yang luas untuk dikembangkan. Menurut data EIBN atau European Union Indonesia Business Network tahun 2019, penjualan alternatif susu dari tahun 2013 hingga 2019 terus meningkat di Indonesia. Keinginan konsumen untuk memilih susu nabati didasari oleh kepedulian terhadap lingkungan yakni keyakinan bahwa pembuatan susu

nabati menghasilkan emisi karbon yang lebih rendah dibandingkan susu hewani, alasan lainnya yaitu pola konsumsi vegetarian, harga, dan kesehatan bagi penderita *lactose intolerance* (Adhitjan *et al.*, 2024). Minuman sari tempe juga memiliki efek fungsional lainnya, penelitian sebelumnya menyatakan susu tempe pada ibu hamil efektif sebagai tambahan nutrisi pencegah anemia (Yuniwati, 2014) dan menurunkan tekanan darah pada penderita hipertensi serta hiperkolesterolemia (Ansarullah *et al.*, 2017). Minuman sari tempe diproses melalui pemanasan untuk meningkatkan stabilitas fisikokimia dan mencegah pembusukan. Namun, suhu tinggi pada proses pemanasan dapat mengakibatkan berkurangnya sebagian kandungan nutrisi. Pemanasan saat pembuatan tempe dan pasteurisasi sari tempe menyebabkan kadar protein sari tempe berkurang, kadar protein sari tempe menjadi lebih rendah dibandingkan sari kedelai. Proses pemanasan juga tidak dapat menghilangkan bau langu tempe yang kurang disukai (Abdullah dan Asriati, 2016). Pemrosesan berbasis non-termal telah banyak diteliti untuk menggantikan pemanasan konvensional (Bocker dan Silva, 2022). Ozon merupakan salah satu sterilisasi non-termal, metode ozonisasi dinilai potensial untuk dikembangkan karena aman, prospektif, dan ramah lingkungan (Hartoyo dan Rachma, 2022).

Ozonisasi termasuk dalam pemrosesan berbasis non-termal dan termasuk zat GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Ozon merupakan senyawa tersusun dari tiga atom oksigen (O_3). Ozonisasi memiliki sifat oksidatif kuat dan disinfektan yang dapat mereduksi jumlah mikroba dalam pangan tanpa meninggalkan residu kimia yang berbahaya. Sifat oksidatif ozon dimanfaatkan dalam beberapa aplikasi seperti untuk tujuan sanitasi dan memperpanjang umur simpan melalui mekanisme inaktivasi mikroba. Ozonisasi telah diaplikasikan dalam pengolahan minuman

seperti jus buah, air mineral, susu nabati, dan lainnya. Berdasarkan penelitian pada jus jeruk kinnow yang dilakukan Iqbal *et al.* (2022) proses ozonisasi menghasilkan jus jeruk kinnow yang memiliki tingkat stabilitas fisikokimia cukup baik selama penyimpanan. Penelitian sebelumnya mengenai ozonisasi pada minuman kedelai telah dilakukan oleh Anam *et al.* (2020) yang menyatakan ozonisasi mampu mengurangi jumlah mikroba dan meningkatkan nilai fisikokimia pada susu kedelai. Ozon sebagai bioaktif oksidator dan disinfektan dapat menghancurkan dinding sel bakteri dan memodifikasi protein serta karbohidrat (Rangel *et al.*, 2021).

Penggunaan ozon pada pangan perlu memperhatikan konsentrasi dan mekanisme ozonisasi karena ozon bersifat oksidator kuat yang efektif menonaktifkan mikroorganisme tetapi juga mampu mengoksidasi komponen biomolekul pangan. Konsentrasi ozon berlebihan dan paparan langsung dapat berpotensi merusak kualitas nutrisi dan sifat sensori pangan melalui oksidasi lipid dan protein, sehingga pengendalian dosis dan waktu kontak menjadi krusial dalam aplikasi pangan. Sari tempe memiliki kandungan protein dan lemak yang tinggi, keberadaan ozon sebagai oksidator dapat mengakibatkan reaksi oksidasi pada komponen lemak dan protein yang dapat menimbulkan perubahan sifat sensori. Menurut Indriza *et al.* (2025) semakain lama waktu paparan ozon pada susu kedelai dapat menurunkan viskositas dan *whiteness index*. Pengaruh yang dihasilkan oleh teknologi ozon pada minuman berbasis kedelai dan pangan lainnya membuat peneliti tertarik untuk mengaplikasikan metode ozon pada minuman sari tempe dengan tujuan mendukung diversifikasi pengolahan tempe sebagai pangan lokal serta mengetahui pengaruh ozonisasi terhadap stabilitas karakteristik fisik dan kandungan protein minuman sari tempe selama penyimpanan. Pemberian ozon

sebagai pemrosesan non-termal pada minuman sari tempe diharapkan dapat menjaga kesegaran produk dan meminimalkan perubahan kualitas fisik maupun kandungan nutrisi.

1.2 Tujuan dan Manfaat

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui korelasi perlakuan ozonisasi yang diberikan pada minuman sari tempe terhadap karakteristik fisikokimia produk selama penyimpanan. Manfaat dari penelitian ini adalah menghasilkan produk minuman sari tempe dengan stabilitas karakteristik fisikokimia yang baik tanpa menggunakan proses pemanasan tinggi dan bahan tambahan pangan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tempe

Tempe merupakan pangan lokal hasil fermentasi kedelai (*Glycine max L.*). Tempe kedelai difermentasi menggunakan ragi yang mengandung kapang dengan genus *Rizopus sp.*, seperti *R. oligosporus* dan *R. Oryzae* (Fadhilah *et al.*, 2024). Bagian berwarna putih pada tempe kedelai merupakan miselium *R. oligosporus* yang tersusun atas hifa yang memiliki lapisan ganda fosfolipid, glikoprotein, melanin dan kitin pada dinding selnya (Kustyawati *et al.*, 2014). Proses pengolahan tempe melalui tahap pencucian kedelai, perebusan pertama, pengupasan kulit ari, pengasaman dengan cara direndam, perebusan kedua, penirisan air, inokulasi dengan ragi tempe, pengemasan, dan fermentasi (Bukhari, 2022). Proses fermentasi tempe oleh mikroorganisme menghasilkan enzim protease yang berfungsi menguraikan protein, lemak, dan karbohidrat sehingga lebih mudah dicerna, reaksi yang terjadi meliputi degradasi protein menjadi asam amino bebas dan peptida dengan berat molekul rendah. Fermentasi juga dapat meningkatkan kadar padatan terlarut, protein terlarut, asam amino bebas, asam lemak bebas, dan vitamin B₁₂ pada tempe (Tamam, 2022). Tempe juga dapat berperan sebagai antioksidan karena mengandung komponen isoflavon. Fermentasi meningkatkan pembentukan senyawa isoflavon golongan aglikon (Yudiono, 2023). Isoflavon dalam golongan aglikon seperti daidzein, genestein dan faktor-2. Komposisi kimia tempe diperlihatkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Kimia Tempe Kedelai

Komposisi	Jumlah
Air (g)	8
Protein (g)	34,9
Lemak (g)	18,1
Karbohidrat (g)	34,8
Serat kasar (%)	4,3
Abu (%)	4,5
Kalsium (mg)	227
Fosfor (mg)	585
Zat besi (mg)	8

Sumber: Dalimunthe *et al.* (2021)

Tempe kedelai merupakan salah satu makanan fungsional karena mengandung antioksidan dan nutrisi lain yang bermanfaat bagi tubuh. Komponen zat besi, vitamin B₁₂, dan asam folat dalam tempe berperan dalam pembentukan hemoglobin (Pinasti *et al.*, 2020). Namun, umur simpan tempe relatif pendek dan kualitas tempe menurun seiring lama waktu penyimpanan karena aktivitas metabolisme dari kapang. Tempe memiliki umur simpan selama 2 hari pada suhu ruang dan pada suhu 5 °C bertahan hingga 13 hari (Purwanto dan Welianan, 2018). Pengolahan tempe menjadi berbagai jenis masakan dapat meningkatkan mutu tempe. Namun, proses pemasakan tempe dengan panas tinggi dapat menurunkan kandungan nutrisi. Menurut Sundari *et al.* (2015) pengolahan tempe dengan penggorengan menyebabkan penurunan kadar komposisi kimia dan zat gizi. Eksplorasi tentang pengolahan tempe diperlukan untuk mengoptimalkan pemanfaatan tempe.

2.2 Sari Tempe

Sari tempe merupakan produk diversifikasi tempe yang dikembangkan sebagai alternatif minuman berbasis kedelai dengan manfaat fungsional. Sari tempe diproses menggunakan tambahan air dan diekstrak sari atau cairan dari tempe. Proses ini memungkinkan ekstraksi komponen gizi dalam tempe dan padatan yang larut air (Purri dan Rafiony, 2019). Sari tempe mengandung zat antioksidan yang dapat membantu menangkal radikal bebas dalam tubuh (Andiniyati *et al.*, 2023). Komposisi nilai gizi minuman sari tempe ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi Nilai Gizi Minuman Sari Tempe

Nilai Gizi	Jumlah
Energi (Kalori)	55,54
Air (g)	88,23
Protein (g)	2,14
Lemak (g)	1,82
Karbohidrat (g)	7,65
Abu (%)	0,15
Serat Kasar (%)	2,01

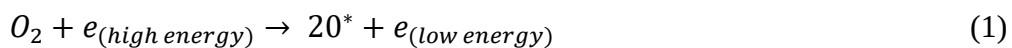
Sumber: Direktorat Gizi Departemen Kesehatan RI dalam Suryani *et al.* (2010)

Prinsip pengolahan sari tempe melalui tahapan pemotongan, pengukusan, penghancuran, penyaringan, pemanasan, dan penambahan BTP. Secara umum, sari tempe memiliki karakteristik mirip dengan sari kedelai. Sari tempe memiliki karakteristik fisik berwarna putih kekuningan, beraroma langu, dan *mouthfeel* berpasir. Pemanasan pada sari tempe mengakibatkan perubahan warna menjadi kuning karena protein terdenaturasi dan tidak terbentuk emulsi protein. Sari tempe menghasilkan aroma langu yang kurang disukai (Abdullah dan Asriati, 2016). Aroma langu tempe berasal dari senyawa volatil yang dihasilkan dari hidrolisis lemak dan protein oleh aktivitas proteolitik dan lipolitik (Kusumawati *et al.*, 2020). Sari tempe memiliki sifat cair dan ringan tetapi keberadaan partikel halus dari residu

tempe menimbulkan *mouthfeel gritty* atau berpasir. Mengurangi bau langu tempe dan tekstur berpasir dapat dilakukan dengan melakukan perlakuan khusus dalam proses pengolahan sari tempe.

2.3 Ozonisasi

Ozonisasi adalah suatu metode sterilisasi non-termal menggunakan gas ozon. Ozon ditemukan pada tahun 1840 oleh Schoenbein, tetapi pada saat itu aplikasi untuk pengolahan makanan belum dikembangkan. Ozon (O_3) adalah molekul gas yang merupakan bentuk fisik berbeda dari oksigen yakni oksigen tri-atom yang bersifat oksidatif kuat dan berbau tajam (Isyuniarto *et al.*, 2015). Ozon dapat terbentuk secara alami melalui penyerapan cahaya. Ozon juga dapat dibangkitkan dalam sebuah reaktor melalui proses tumbukan molekul oksigen dengan elektron. Reaktor ozon dapat berbentuk *Dielectric Barrier Discharge Plasma (DBDP)*, *Corona Discharge* (Nur *et al.*, 2017). Metode ozonisasi dalam penelitian ini menggunakan alat berupa ruang ozonisasi *liquid layer*. Mekanisme ozonisasi dilakukan dengan mengalirkan ozon dan sari tempe secara bersamaan pada alat *liquid layer* tanpa adanya paparan ozon terhadap sari tempe secara langsung. Reaksi kimia pembentukan ozon dapat dijelaskan sebagai berikut.



Ozon dapat mengalami dekomposisi konsentrasi selama ozonisasi karena adanya interaksi antar senyawa. Waktu paruh ozon tergantung pada pH, intensitas cahaya, suhu, dan senyawa organik maupun anorganik (Abdi *et al.*, 2017). Ozon bersifat relatif stabil di udara tetapi sangat tidak stabil ketika berada dalam air

sehingga terurai dalam waktu singkat di dalam air. Ozon tidak dapat disimpan sehingga harus diproduksi secara kontinu. Ozon menghasilkan oksigen ketika sudah terurai sehingga produk yang melalui proses ozonisasi tergolong aman (Prabha *et al.*, 2015). Reaksi ozon dapat terjadi secara langsung maupun tidak langsung tergantung kondisi dan keberadaan inisiator (Asiah *et al.*, 2017).

Penelitian sebelumnya mengenai pemanfaatan ozon untuk pengolahan pangan telah banyak dilakukan. Penelitian terdahulu oleh Anam *et al.* (2020) menggunakan ozonisasi untuk susu kedelai, ozonisasi dengan variasi waktu satu hingga 15 menit memberikan perubahan terhadap nilai pH dan *total dissolve solid* serta dapat mengeliminasi jumlah mikroba. Teknologi ozon terbukti efektif dalam memerangi mikroorganisme patogen, mengurangi aroma tidak diinginkan, dan mengawetkan produk. Ozonisasi juga dapat diaplikasikan pada produk susu menggunakan ozon generator yang memanfaatkan oksigen (Listiana *et al.*, 2022). Ozon mampu mengoksidasi senyawa organik maupun anorganik dalam larutan. Pengaplikasian ozon untuk produk pertanian memiliki kelebihan pada waktu paparan yang singkat, termasuk zat GRAS (*Generally Recognized as Safe*), residu minimum, dan biaya operasional cenderung rendah (Sari *et al.*, 2021).

Ozon dapat berperan sebagai disinfektan dan bahan pengoksidasi. Ozon sebagai disinfektan mengurangi pertumbuhan mikroorganisme dan membantu pengawetan bahan pangan (Sefvia, 2024). Ozon sebagai bahan pengoksidasi mampu mengeliminasi warna, rasa, dan bau yang dihasilkan oleh material organik maupun anorganik yang reaktif terhadap oksidasi (Hartoyo dan Rachma, 2022). Sifat ozon tersebut dapat membantu mengurangi bau langu sari tempe dan partikel-partikel residu tempe yang kurang dikehendaki.

2.4 Nilai pH

Nilai pH (*potential of hydrogen*) merupakan tingkat atau derajat keasaman untuk menyatakan nilai keasamaan atau basa suatu senyawa. Nilai pH menunjukkan ukuran asam atau basa larutan, berkisar antara 0 hingga 14, dengan 7 sebagai netral. Angka di bawah 6-7 menandakan keasaman, sedangkan di atasnya menunjukkan sifat basa (Kuo *et al.*, 2020). Nilai pH dapat menjadi salah satu indikator kesegaran produk. Berdasarkan SNI 01-3830-1995 syarat pH minuman kedelai adalah antara 6,5 – 7,0. Nilai pH terlalu rendah dapat menandakan larutan mengalami penurunan kualitas atau jumlah mikroba meningkat.

2.5 *Total Dissolved Solid (TDS)*

Total dissolved solid (TDS) merupakan total unsur mineral atau bahan-bahan yang terlarut dalam suatu larutan (Adrianto *et al.*, 2020). Komponen dalam TDS dapat berupa zat organik maupun zat anorganik yang larut dalam air. Nilai TDS yang tinggi menandakan semakin banyak komponen yang terlarut dalam air atau terjadi interaksi antar senyawa (Widyawati *et al.*, 2019). Pengukuran TDS berbasis konduktivitas dengan TDS meter dapat mengukur total zat terlarut terutama garam atau mineral yang terionisasi. Penelitian terdahulu mengenai susu nabati oleh Kljusurić *et al.*, (2015) menyatakan TDS dapat digunakan sebagai salah satu indikator stabilitas pada susu berbasis gandum (*barley*), dalam sistem koloid seperti susu berbasis nabati dapat terjadi perubahan distribusi zat terlarut (ion, mineral, garam, asam amino, dan lainnya) dan nilai konduktivitas larutan berubah.

2.6 Tingkat Kecerahan (L^*)

Perubahan warna produk dapat menjadi indikator stabilitas dan tingkat penerimaan. Pengujian warna memiliki prinsip mengukur perbedaan warna pada permukaan produk. Kualitas fisik produk sari tempe dapat dilihat dari warna termasuk tingkat kecerahan (Rahayu *et al.*, 2021). Tingkat kecerahan produk dapat diukur dengan melihat nilai L^* atau *lightness*. Perubahan kualitas dan adanya proses pemanasan yang menimbulkan reaksi Maillard dapat merubah kemampuan reflektansi cahaya yang mempengaruhi warna (Astawan *et al.*, 2024). Menurut Kwok *et al.* (1999) pada minuman berbasis kedelai, nilai kecerahan (L^*) menurun seiring semakin tingginya suhu pemanasan yang diberikan yakni pada rentang suhu 80-140 °C karena terjadi reaksi Maillard, perubahan warna yang terjadi dapat diidentifikasi oleh parameter CIELAB. Nilai *Lightness* mempresentasikan tingkat terang atau gelap yang ditunjukkan dalam skala angka 0-100, semakin tinggi nilai maka warna produk semakin cerah.

2.7 Protein Terlarut

Kandungan protein dalam tempe merupakan salah satu komponen penting. Protein merupakan makromolekul yang tersusun dari rantai asam amino dan antar rantainya dihubungkan oleh ikatan peptida. Protein terlarut merupakan fraksi protein yang larut dalam fase cair dan dapat tetap berada pada supernatan larutan. Protein pada pangan nabati umumnya memiliki daya cerna lebih rendah dari protein nabati karena terlindungi oleh dinding sel, tetapi pemanasan atau kondisi asam dapat mendenaturasi protein (Probosari, 2019). Denaturasi protein terjadi ketika titik isoelektrik berubah dan protein mengalami tingkat kelarutan terendah saat

mencapai titik isoelektrik. Protein dapat terurai karena beberapa faktor seperti oksidasi, degradasi pH larutan, suhu, dan kelembaban (Aprillanda *et al.*, 2019). Pemrosesan menggunakan termal ringan hingga non-termal dikatakan dapat mengurangi efek kerusakan pada protein (Harjanti dan Kusumaningrum, 2021).

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari hingga April 2025. Penelitian dilakukan di UPT Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Semarang.

3.2 Materi Penelitian

Bahan yang digunakan dalam pembuat minuman sari tempe adalah tempe kedelai dengan lama waktu fermentasi 48 jam yang diperoleh dari produsen tempe di Kota Semarang dan air mineral. Bahan yang digunakan untuk pengujian adalah etanol 95%, akuades, Coomassie Brilliant Blue (CBB), asam fosfor 85%, dan Bovine Serum Albumin (BSA).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah ozon generator (VOSOCO Ozone Generator Water Sterilizer, China) dengan kapasitas 2 gram/jam dan sumber ozon berasal dari udara kering atau oksigen, *blender* (Phillips, Belanda), alat berupa ruang ozonisasi *liquid layer* yang dikembangkan oleh Laboratorium Plasma Universitas Diponegoro, pH meter (Senz Tranz Instruments, Singapore), colorimeter (Chromameter CR 230 AM501, China), TDS meter (TDS meter Ezdo 8200), selang silikon, panci, timbangan analitik, talenan, pisau, alat kukus, kompor listrik, erlenmeyer, gelas ukur, gelas beaker, *waterbath* (FAITHFUL DK-98-IIA, China), *aluminium foil*, saringan, sendok, baskom, botol plastik, label, vortex mixer, kertas saring, spektrofotometer UV-Vis, botol kaca gelap, termometer,

plastik *zip lock*, kertas HVS, sarung tangan lateks, pipet tetes, tisu dapur, dan lemari pendingin (Modena, Italia).

3.3 Metode Penelitian

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

3.3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian terdiri dari 4 perlakuan dan dilakukan dengan 5 ulangan yang dianalisis secara deskriptif menggunakan analisis *pearson correlation*. Perlakuan yang diberikan yaitu perbedaan lama waktu ozonisasi pada sari tempe selama 0, 2, 4, dan 6 menit. Sari tempe setelah diberikan perlakuan dikemas dalam kemasan botol dan disimpan dalam lemari pendingin pada suhu dingin ($\pm 4^{\circ}\text{C}$). Sampel disimpan selama 15 hari dengan dilakukan pengujian setiap 5 hari sekali yakni pada hari ke-0, 5, 10 dan 15 untuk parameter nilai pH, TDS, Lightness, dan stabilitas protein.

Hipotesis empiris yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut.
H0: lama penyimpanan tidak memiliki korelasi terhadap nilai pH, total dissolved solid (TDS), tingkat kecerahan (L^*), dan kadar protein terlarut sari tempe yang diberikan perlakuan.

H1: lama penyimpanan memiliki korelasi terhadap nilai pH, total dissolved solid (TDS), tingkat kecerahan (L^*), dan kadar protein terlarut sari tempe yang diberikan perlakuan.

Kriteria penerimaan hipotesis adalah sebagai berikut.

Jika $p < 0,05$ maka H_0 ditolak dan H_1 diterima

Jika $p > 0,05$ maka H_0 diterima dan H_1 ditolak

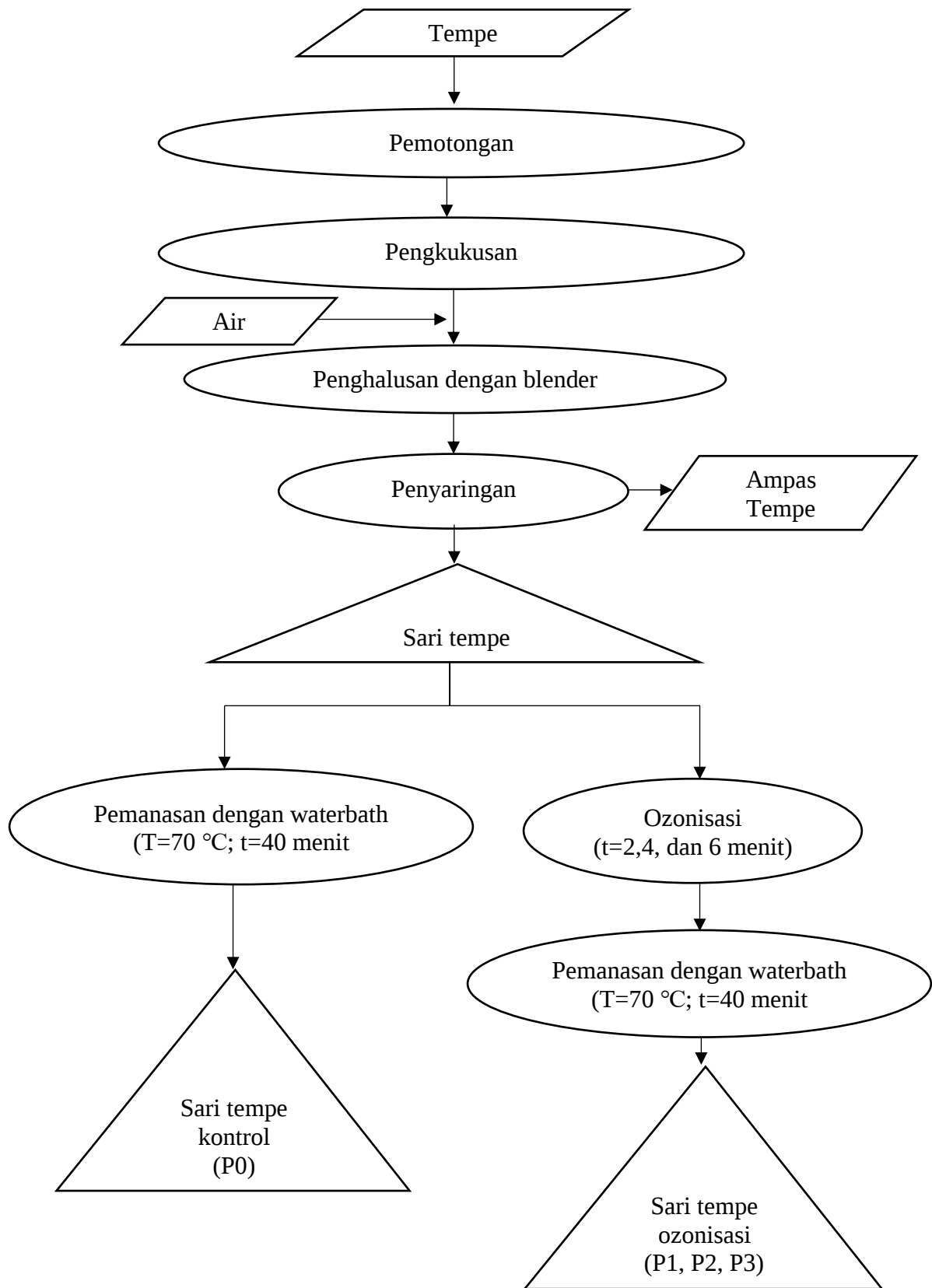
3.3.2 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan meliputi pembuatan minuman sari tempe, ozonisasi minuman sari tempe, dan pasteurisasi.

3.3.2.1 Pembuatan Sari Tempe. Proses pembuatan sari tempe mengacu pada metode Sa'roni dan Triastuti (2021) dengan sedikit modifikasi. Pembuatan sari tempe menggunakan tempe yang telah difermentasi selama 48 jam. Tempe yang telah dipilih kemudian ditimbang menggunakan timbangan analitik. Tempe dipotong berbentuk dadu dengan ukuran sekitar $1,5 \text{ cm} \times 1,5 \text{ cm}$, kemudian dikukus menggunakan panci dan alat kukus pada suhu 100°C selama 20 menit. Setelah dikukus, selanjutnya tempe dihancurkan menggunakan *blender* selama 3 menit dengan menambahkan air, perbandingan tempe dengan air adalah 1:6. Setelah proses *blender* hingga tempe menjadi halus selanjutnya disaring menggunakan saringan untuk mendapatkan sari tempe.

3.3.2.2 Ozonisasi Sari Tempe. Ozonisasi pada sari tempe dilakukan menggunakan alat ozon generator dan alat berupa ruang ozonisasi *liquid layer*. Tahap awal proses ozonisasi dilakukan dengan menyambungkan selang dari ozon generator ke saluran inlet ozon pada alat ozonisasi *liquid layer*, kemudian kemiringan alat *liquid layer* diatur sesuai kebutuhan, pada penelitian ini kemiringan diatur hingga 10° . Sari tempe dituangkan ke dalam alat ruang *liquid layer* melalui bagian corong dari alat *liquid layer*. Waktu ozonisasi dapat disesuaikan dengan mengatur kemiringan

peralatan. Kemiringan peralatan *liquid layer* pada sudut 10° dapat mengalirkan 100 ml sari tempe dengan waktu 30 detik, sehingga dilakukan pengulangan hingga mencapai perlakuan variasi waktu ozonisasi yang diinginkan. Setelah itu, sari tempe dimasukkan dalam botol kaca 100 ml dan dipanaskan menggunakan *waterbath* dengan suhu 70 °C selama 40 menit. Minuman sari tempe didiamkan hingga mencapai suhu ruang dan ditutup rapat, kemudian disimpan dalam lemari pendingin pada suhu ± 4 °C. Diagram alir prosedur penelitian dapat dilihat pada Ilustrasi 1.



Ilustrasi 1. Diagram Alir Prosedur Pembuatan Sari Tempe yang Diberi Perlakuan Ozonisasi

3.3.3 Pengujian Parameter

Parameter pengujian yang digunakan pada penelitian ini meliputi nilai pH, nilai TDS, Tingkat kecerahan, dan kadar protein terlarut.

3.3.3.1 Uji Nilai pH. Pengujian nilai pH atau tingkat keasaman mengacu pada AOAC (2012) yaitu pengukuran menggunakan alat pH meter. Alat pH meter dikalibrasi menggunakan buffer pH 4,0 dan pH 7,0 terlebih dahulu, selanjutnya elektroda dibilas dengan aquades dan diseka dengan tisu. Pengujian menggunakan sampel sebanyak 20 mL, pengukuran dilakukan dengan mencelupkan elektroda ke dalam sampel dan dibiarkan hingga dihasilkan pembacaan angka yang stabil.

3.3.3.2 Uji *Total Dissolved Solid* (TDS). Pengujian *total dissolved solid* (TDS) menggunakan alat TDS meter mengacu pada Islam *et al.*, (2017). Nilai TDS diukur berdasarkan konduktivitas ionik dalam larutan. Sampel dituangkan dalam gelas ukur sebanyak 20 ml, kemudian bagian *electrode shield* dicelupkan ke dalam sampel dan tekan tombol power untuk mulai pembacaan. Tunggu hingga angka hasil analisis TDS stabil.

3.3.3.3 Uji Tingkat Kecerahan (L*). Pengukuran tingkat kecerahan (L*) menggunakan alat colorimeter yang mengacu pada Budirahayu *et al.* (2020). Alat colorimeter mampu mengidentifikasi tingkat kecerahan secara kuantitatif berupa ruang warna L* yang memiliki rentang nilai 0 (hitam) hingga 100 (putih). Alat dikalibrasi dengan menembakkan sensor di atas plat standar hitam dan putih. Sampel dituangkan dalam *ziplock* bening, kemudian bagian sensor colorimeter ditempelkan pada permukaan sampel lalu tombol *enter* ditekan dan hasil pengukuran nilai L* yang tertera pada bagian layar dicatat.

3.3.3.4 Kadar Protein Terlarut. Uji kadar protein menggunakan Metode Bradford yang mengacu pada metode penelitian Hadinoto dan Syukroni (2019). Tahap pertama adalah pembuatan larutan stok reagen Bradford, sebanyak 0,025 g Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 dilarutkan dalam 12,5 mL etanol pa 95% dan ditambahkan dengan 25 mL asam fosfor (H_3PO_4) 85%. Larutan asam tersebut ditambahkan secara bertahap ke dalam 212,5 mL air (H_2O) lalu disaring menggunakan kertas saring. Setelah proses pencampuran selesai, larutan stok pekat disimpan dalam botol gelap dan ditempatkan pada kulkas dengan suhu $\pm 4^\circ\text{C}$. Stok pekat reagen Bradford yang digunakan untuk analisa perlu dilakukan 5 kali pengenceran.

Tahap berikutnya mencakup pembuatan larutan standar Bovine Serum Albumin (BSA) dan kurva standar. BSA sebanyak 20 mg dilarutkan dengan 20 mL aquades dan dihomogenkan. Selanjutnya pembuatan standar protein menggunakan BSA dengan konsentrasi 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/mL. Setiap larutan standar diambil 60 μL lalu dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi dan ditambahkan 3 mL reagen Bradford pada masing-masing tabung. Larutan divortex dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan pada absorbansi 595 nm menggunakan spektrofotometer, didapat kurva standar dan persamaan regresi untuk mengukur protein. Pengukuran protein sampel dilakukan dengan mencampurkan 60 μL sampel dan 3 mL reagen Bradford, kemudian didiamkan selama 10 menit dan ukur absorbansi. Nilai absorbansi sampel dimasukkan ke dalam rumus persamaan regresi berikut.

$$y=ax+b.$$

Keterangan:

y = absorbansi sampel

a = slope

b = intersep

x = konsentrasi protein pada sampel

3.3.4 Analisis Data

Analisis data yang diperoleh berupa hasil pengujian parametrik meliputi pH, *total dissolved solid* (TDS), tingkat kecerahan (L*), dan kadar protein dianalisis menggunakan *software* GraphPad Prism 10.4.2 untuk dihitung nilai rata-rata dan standar deviasinya, kemudian diolah dalam bentuk grafik. Hasil data tersebut dianalisis secara deskriptif kuantitatif. Setelah itu, dilakukan uji korelasi *pearson* untuk mengetahui hubungan antara lama penyimpanan pada suhu dingin terhadap nilai pH, *total dissolved solid*, tingkat kecerahan (L*), dan stabilitas protein. Apabila hasil koefisien korelasi (r) mendekati angka +1 diartikan memiliki korelasi positif atau sempurna yang kuat dan apabila mendekati nilai -1 maka memiliki korelasi negatif atau terbalik yang kuat, jika dihasilkan nilai r mendekati 0 maka korelasi sangat lemah atau tidak terdapat korelasi. Berdasarkan ketentuan signifikansi pada *pearson correlation*, jika diperoleh signifikansi $p < 0,05$ maka diartikan memiliki korelasi dan jika diperoleh signifikansi $p > 0,05$ maka diartikan tidak memiliki korelasi. Panduan untuk menentukan interpretasi koefisien korelasi disajikan pada Tabel 3. Rumus perhitungan koefisien korelasi adalah sebagai berikut.

$$r_{xy} = \frac{n\Sigma XY - (\Sigma X)(\Sigma Y)}{\sqrt{n\Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}\sqrt{n\Sigma Y^2 - (\Sigma Y)^2}}$$

Keterangan dari simbol dalam rumus di atas yakni r: koefisien korelasi *pearson*; n: jumlah sampel; X: lama penyimpanan; Y: parameter pada sampel yang diberi perlakuan

Tabel 3. Interpretasi Nilai Koefisien Korelasi (Nilai r)

Nilai r	Keterangan
0,00 – 0,199	Sangat lemah
0,20 – 0,399	Lemah
0,40 – 0,599	Cukup kuat
0,60 – 0,799	Kuat
0,80 – 1,000	Sangat kuat

Sumber: Hidayat *et al.* (2018)