

## Penambahan pigmen alami yang disalut tepung agar untuk meningkatkan kekuatan antioksidan pada tempe

*The addition of natural pigments coated with agar powder to increase the antioxidant power of tempeh*

Aditya Surya Pinasti<sup>1)\*</sup>, Anggara Mahardika<sup>2)</sup>, Lusiawati Dewi<sup>1)</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Biologi, Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga, Jawa Tengah

<sup>2</sup>Program Studi Teknologi Pangan, Universitas Nasional Karangturi, Semarang, Jawa Tengah

\*Email korespondensi : aditsoerya@gmail.com

### Informasi Artikel:

Dikirim: 08/06/2021; disetujui: 15/09/2021; diterbitkan: 29/09/2021

### ABSTRACT

*Background: Tempeh is a traditional Indonesian food that has a relatively low antioxidant activity. The addition of natural pigments is one solution to increase the antioxidant activity of tempeh. However, natural pigments are very susceptible to damage due to environmental factors, so it is necessary to coat with certain materials, such as agar powder to protect the pigments from damage. Research purposes: The aim of the study to analyze the effect of adding natural pigments coated with agar powder on the antioxidant strength of tempeh. Method: The sample used was tempeh with the addition of pigment powder uncoated and coated with 2%, 3%, 4% of agar, and tempeh without the addition of pigments as control. The antioxidant activity strength was analyzed using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) method at fermentation time of 0 and 48 hours. Results and Discussion: The results showed that the addition of pigments and fermentation time were able to significantly increase the antioxidant strength of tempeh compared to control where the IC<sub>50</sub> value of the control at 0 hours of fermentation was 166,45±38,58 mg/ml which changed to 69,45±3,49 mg/ml after 48 hours of fermentation. Antioxidant activity were stronger in tempeh with addition of pigment where IC<sub>50</sub> value of tempeh with uncoated pigments, coated pigments with 2%, 3%, and 4% of agar were 23,53±5,46 mg/ml, 21,91±6,02 mg/ml, 21,53±6,03 mg/ml, and 29,69±11,04 mg/ml, respectively. Nevertheless, the antioxidant activity strength from all treatments were considered as weak (IC<sub>50</sub>>200 µg /ml). Conclusion: The addition of pigments uncoated and coated with agar powder and fermentation time were able to increase the antioxidant strength of tempeh. Coating treatment is also able to maintain the pigment color from degradation in the fermentation process.*

**Keywords:** *agar, antioxidant, fermentation, pigment*

### ABSTRAK

Latar belakang: Tempe merupakan makanan tradisional Indonesia yang mengandung antioksidan dengan aktivitas lemah. Salah satu solusi untuk meningkatkan kekuatan antioksidan pada tempe adalah dengan penambahan pigmen alami. Salah satu solusi untuk meningkatkan kekuatan antioksidan pada tempe adalah dengan penambahan pigmen alami. Akan tetapi, pigmen alami sangat rentan terhadap kerusakan akibat faktor lingkungan sehingga perlu dilakukan pelapisan dengan bahan tertentu untuk melindungi pigmen dari kerusakan, salah satunya menggunakan tepung agar. Tujuan penelitian:

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh penambahan pigmen alami yang disalut tepung agar terhadap kekuatan antioksidan pada tempe. Metode: Sampel yang digunakan adalah tempe dengan penambahan pigmen tidak disalut tepung agar, disalut tepung agar 2%, 3%, 4%, dan kontrol merupakan tempe tanpa penambahan pigmen. Kekuatan antioksidan dianalisis dengan metode DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl) pada waktu fermentasi 0 dan 48 jam. Hasil dan pembahasan: Penambahan pigmen dan waktu fermentasi perlakuan mampu meningkatkan kekuatan antioksidan tempe secara signifikan dibandingkan kontrol dimana nilai  $IC_{50}$  kontrol pada fermentasi 0 jam sebesar  $166,45 \pm 38,58$  mg/ml mengalami perubahan menjadi  $69,45 \pm 3,49$  mg/ml setelah fermentasi 48 jam, sementara pada tempe dengan penambahan pigmen secara langsung sebesar  $23,53 \pm 5,46$  mg/ml, dan pada penambahan pigmen dilapisi tepung agar 2%, 3%, dan 4%, berturut-turut  $21,91 \pm 6,02$  mg/ml,  $21,53 \pm 6,03$  mg/ml,  $29,69 \pm 11,04$  mg/ml. Meskipun demikian, aktivitas kekuatan antioksidan pada tempe berbagai perlakuan masih tergolong lemah ( $IC_{50} > 200$   $\mu$ g/ml). Kesimpulan: Penambahan pigmen dengan maupun tidak disalut tepung agar dan waktu fermentasi dapat meningkatkan kekuatan antioksidan pada tempe, serta mampu mempertahankan warna pigmen dari degradasi pada proses fermentasi.

**Kata kunci** : agar, antioksidan, fermentasi, pigmen

## PENDAHULUAN

Tempe dikenal sebagai makanan asli Indonesia berupa produk fermentasi kacang kedelai oleh *Rhizopus* sp. Diketahui sejak tahun 1700-an, masyarakat Jawa Tengah sudah memproduksi dan mengonsumsi tempe sebagai makanan sehari-hari (Astuti *et al.*, 2000). Tempe termasuk bahan pangan fungsional yang merakyat karena disamping memberikan fungsi gizi dasar bagi seluruh kalangan masyarakat, tempe juga memiliki kandungan senyawa antioksidan. Senyawa ini berperan untuk mencegah terjadinya kerusakan struktur sel maupun jaringan dengan cara menetralkan radikal bebas berlebih. Kehadiran radikal bebas berlebih dapat menyebabkan timbulnya penyakit degeneratif dan memicu patogenesis berbagai penyakit seperti kardiovaskular, hipertensi, diabetes (Saefudin *et al.*, 2013). Radikal bebas terbentuk akibat aktivitas metabolisme tubuh, serta dapat berasal dari paparan lingkungan seperti asap kendaraan, asap rokok, dan sinar-UV (Sailaja Rao *et al.*, 2011). Akan tetapi, sebagai salah satu bahan pangan fungsional yang merakyat, aktivitas antioksidan pada tempe masih tergolong lemah. Hal ini dibuktikan dengan penelitian Chang *et al.* (2009), dimana aktivitas antioksidan yang terkandung dalam tempe

memiliki nilai  $IC_{50} > 200$   $\mu$ g /ml yang tergolong ke dalam kriteria antioksidan lemah (Ervina *et al.*, 2016). Oleh karena itu, penambahan bahan nabati kaya antioksidan menjadi salah satu alternatif untuk meningkatkan kekuatan antioksidan pada tempe sehingga kebutuhan antioksidan dapat tercukupi melalui konsumsi tempe.

Penambahan bahan nabati untuk meningkatkan kekuatan antioksidan pada tempe sudah pernah dilakukan oleh Cempaka *et al.* (2018) dengan penambahan dedak (*rice bran*) dengan rasio 6:4 (kedelai:dedak). Penambahan bahan tersebut terbukti mampu meningkatkan kadar antioksidan berupa senyawa fenolik pada tempe mentah dari  $65,88 \pm 0,65$  mgGAE/100 gr berat basah menjadi  $110,05 \pm 21,98$  mgGAE/100 gr berat basah. Meskipun demikian, penambahan dedak pada tempe menyebabkan warna, aroma, rasa, dan tekstur tempe menjadi kurang disukai oleh panelis. Selain itu, pemberian bahan mengandung antioksidan secara langsung pada tempe memungkinkan antioksidan akan terpapar langsung oleh faktor lingkungan yang dapat merusak aktivitasnya seperti suhu tinggi, oksidasi, pH, dan paparan cahaya (Puspita dan Samalukang, 2017).

Penggunaan tepung agar sebagai media dalam penyalutan pigmen untuk

mempertahankan aktivitas antioksidan sampai sejauh ini belum pernah dilakukan. Akan tetapi, tepung agar telah banyak digunakan dalam imobilisasi enzim seperti penelitian yang telah dilakukan oleh Rehman *et al.* (2014) dalam imobilisasi enzim pendegradasi pektin dari *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21. Imobilisasi pektinase dalam agar mampu meningkatkan ketahanan suhu optimum enzim dari 45°C menjadi 50°C. Penelitian lain yang dilakukan oleh Kalita *et al.* (2020) juga menggunakan tepung agar dalam imobilisasi enzim fosfatase asam. Imobilisasi fosfatase asam dalam agar juga meningkatkan ketahanan suhu optimum enzim dari 55°C menjadi 60°C.

Sumber antioksidan dapat diperoleh dari pigmen alami yang berasal dari setiap bagian tumbuhan seperti daun, bunga, buah, batang, kulit, dan akar (Saefudin *et al.*, 2013). Pada penelitian ini, angkak, pandan, dan kunyit digunakan sebagai pigmen alami yang akan ditambahkan pada tempe. Penambahan pigmen pada tempe akan memberikan tambahan kandungan antioksidan sekaligus memberikan warna pada tempe sehingga membuat tampilan tempe menjadi lebih menarik. Pigmen alami tersebut akan diserbukkan menjadi serbuk pigmen. Serbuk ini selanjutnya akan dilapisi dengan tepung agar membentuk struktur *beads* (manik-manik) melalui proses penyalutan yang bertujuan untuk melindungi senyawa antioksidan pada pigmen alami terhadap kerusakan akibat faktor lingkungan. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh penambahan pigmen alami yang disalut tepung agar terhadap kekuatan antioksidan pada tempe.

## METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan antara lain, angkak, kunyit, dan pandan diperoleh di sekitar pasar Kota Salatiga, akuades, air, es batu, tepung agar semi *refined*, kalium klorida (Derajat Pro Analisis, Merck, Jerman), kedelai rebus, ragi tempe

(RAPRIMA, Indonesia), etanol 70% (Derajat Teknis, Bratachem, Indonesia), reagen DPPH/2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (Derajat Pro Analisis, Sigma Aldrich, Jerman).

### Alat

Alat yang digunakan antara lain, dehidrator (Maksindo, LT-85, Indonesia), *herba grinder* (Maksindo, MKS-ML 100, Indonesia), neraca analitik dengan ketelitian 0,01 gr (Shimadzu, TX 323L, Jepang), statif, spatula, termometer batang, *hotplate* (Thermolyne, Nouva II, Amerika Serikat), *magnetic stirrer* (Thermolyne, 846720-26, Amerika Serikat), gelas beker (Pyrex, Inggris), erlenmeyer (Pyrex, Inggris), tabung reaksi (Pyrex, Inggris), *disposable syringe* 50 ml *without needle* (One Med, Indonesia), selang *waterpass* 5 mm, botol kaca, aluminium foil, plastik *ziplock*, tusuk gigi, *freezer* (LG, GN-V04RL, Indonesia), *centrifuge* (Hettich Centrifugen, EBA 20, Jerman), kuvet kuarsa, spektrofotometer UV-VIS (Genesyes10S UV-VIS, USA).

### Metode/ pelaksanaan

Pembutan serbuk pigmen khusus untuk kunyit dan pandan mengacu pada Paciulli *et al.* (2016) dengan modifikasi. Kunyit, dan pandan dibersihkan dan dipotong-potong. Kemudian, dilakukan proses *thermal blanching* dengan mencelupkan bahan mentah dalam air mendidih selama 15 detik dengan tujuan untuk menginaktifkan enzim pendegradasi, selanjutnya didinginkan dalam air es selama  $\pm 5$  menit dan dikeringkan dengan dehidrator pada suhu 60°C selama 10 jam 30 menit. Bahan yang telah kering kemudian ditepungkan menggunakan *grinder*.

Penyalutan serbuk pigmen mengacu pada metode imobilisasi enzim oleh Sharma *et al.* (2014) dengan modifikasi. Tepung agar dilarutkan dalam akuades dengan konsentrasi 3% (w/v) dan dididihkan sambil diaduk hingga homogen. Larutan diturunkan suhunya hingga 60°C untuk mengurangi paparan panas kemudian serbuk manis ditambahkan dengan konsentrasi 5% (w/v) dan dihomogenkan. Selanjutnya, larutan

dicetak dengan *syringe* yang dimodifikasi dengan selang *waterpass*, direndam air es untuk menurunkan suhu dan mempercepat koagulasi. *Beads* yang telah terkoagulasi direndam ke dalam larutan KCl 0,7 M kemudian dikeringkan menggunakan dehydrator pada suhu 40°C selama 8 jam 30 menit. *Beads* semanis yang sudah kering kemudian dipotong-potong  $\pm 3$  mm.

Pembuatan tempe dilakukan dengan menginokulasikan ragi tempe sebanyak 0,5% (w/w) pada kedelai yang sudah direbus. *Beads* pigmen dicampurkan pada kedelai yang sudah diberi ragi dengan konsentrasi 5% (w/w) dan dimasukkan ke dalam plastik *ziplock* masing-masing sebanyak 60 gr, kemudian dilubangi dan difermentasi selama 48 jam pada suhu ruang. Kontrol yang digunakan adalah tempe tanpa penambahan *beads* pigmen dan sebagai pembanding digunakan tempe dengan tidak disalut tepung agar dengan konsentrasi 2,5% w/w (dalam 5% w/w *beads* pigmen kering terkandung 2,5% serbuk pigmen).

Analisis kekuatan antioksidan pada tempe dilakukan dengan metode DPPH. Sampel tempe yang telah difermentasi selama 48 jam diambil masing-masing 5 gr. Sampel dihaluskan dan diekstraksi secara maserasi dengan etanol 70% selama 3 jam. Ekstrak selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 4.000 rpm pada suhu ruang (25°C) selama 15 menit dan diambil supernatnya. Ekstrak tempe yang diperoleh dibuat seri pengenceran 20 mg/ml, 40 mg/ml, 60 mg/ml, dan 80 mg/ml. Kemudian, kekuatan antioksidan pada tempe dianalisis dengan magacu pada penelitian Hashim *et al.* (2018) dengan modifikasi. Sebanyak 3 ml ekstrak sampel tempe diambil kemudian dimasukkan dalam botol kacadan ditambahkan 1 ml larutan DPPH (50 ppm) dan dihomogenkan. Kemudian, OD awal diukur pada panjang gelombang 520 nm, selanjutnya dibiarkan untuk bereaksi selama 30 menit. Setelah 30 menit, sampel diukur OD akhirnya. Blangko disiapkan dengan mengganti sampel dan DPPH dengan etanol 70%. Persentase peluruhan DPPH dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{OD awal} - \text{OD akhir}}{\text{OD awal}} \times 100$$

Kurva regresi dibuat dari hasil perhitungan. Persamaan regresi linier yang didapat digunakan untuk menghitung konsentrasi IC<sub>50</sub>.

### Analisis data

Analisis statistik dilakukan dengan Uji *Repeated Measurements* untuk mengetahui ada tidaknya interaksi antarperlakuan penambahan pigmen dan waktu fermentasi terhadap kekuatan antioksidan tempe. Jika hasil menunjukkan adanya interaksi, maka dilanjutkan dengan Uji Posthoc Tukey.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

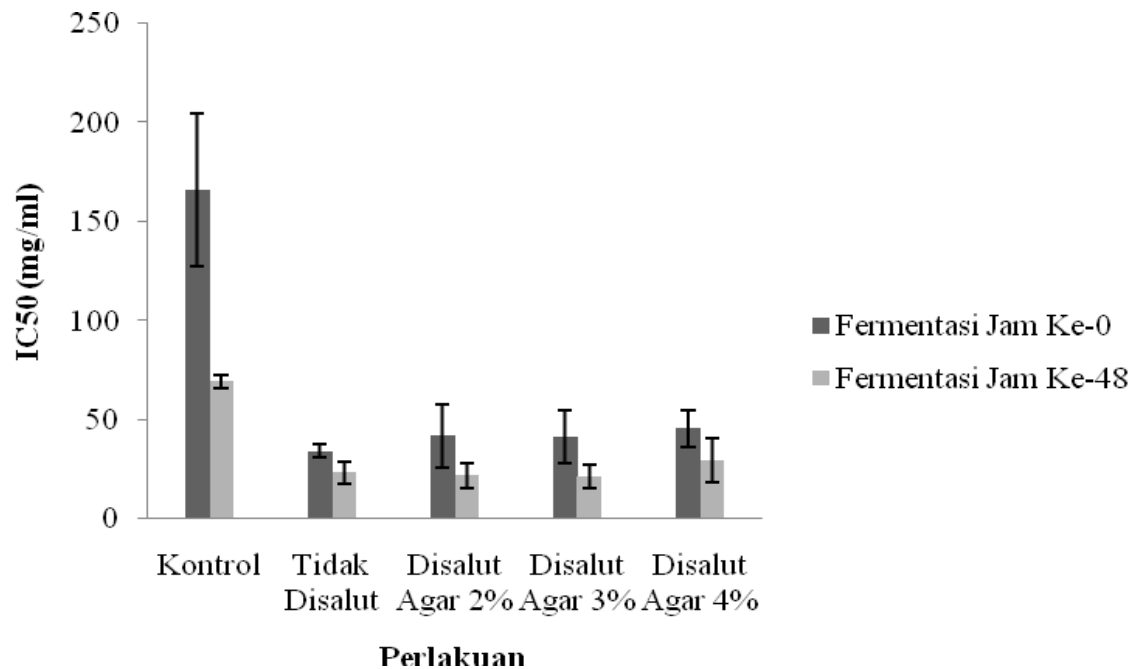
IC<sub>50</sub> menunjukkan konsentrasi suatu senyawa yang dapat menonaktifkan 50% dari kekuatan radikal bebas DPPH dimana semakin rendah nilai IC<sub>50</sub> yang diperoleh pada suatu senyawa maka semakin kuat kekuatan antioksidannya, sebaliknya jika semakin tinggi nilai IC<sub>50</sub> yang diperoleh pada suatu senyawa maka semakin lemah kekuatan antioksidannya (Egarani *et al.*, 2020).

### Pengaruh penambahan pigmen berbagai perlakuan dan waktu fermentasi terhadap kekuatan antioksidan pada tempe

Gambar 1 menunjukkan bahwa penambahan pigmen alami dengan berbagai perlakuan baik disalut maupun tidak disalut tepung agar terbukti mampu meningkatkan kekuatan antioksidan pada tempe secara signifikan terhadap kontrol, dimana tempe dengan penambahan pigmen berbagai perlakuan memiliki kekuatan antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan kontrol baik pada fermentasi jam ke-0 maupun ke-48. Hal ini dapat terjadi karena pigmen alami yang berasal dari tumbuhan memiliki aktivitas antioksidan (Saefudin *et al.*, 2013). Gambar 1 juga menunjukkan bahwalama waktu fermentasi mempengaruhi peningkatan kekuatan antioksidan pada tempe. Pada gambar 1 terlihat bahwa terjadi pola penurunan setelah fermentasi selama 48 jam. Pola penurunan ini menunjukkan bahwa

fermentasi selama 48 jam menyebabkan peningkatan kekuatan antioksidan pada tempe. Hal ini berhubungan dengan aktivitas hidrolitik dari enzim  $\beta$ -glukosidase yang diproduksi oleh kapang tempe *Rhizopus* sp. dimana selama proses fermentasi, isoflavon glukosid yang terkandung pada tempe akan

diubah menjadi isoflavon aglikon yaitu daidzein, genistein, glisitei, dan 6,7,4 trihidroksiisoflavon yang memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan isoflavon glukosid yang akan meningkat sebanyak 6,5 kali setelah 22 jam proses fermentasi (Widoyo *et al.*, 2015).



Gambar 1. Kekuatan antioksidan pada tempe kontrol dan tempe berbagai perlakuan dengan lama waktu fermentasi 0 dan 48 jam

#### Pengaruh penambahan pigmen berbagai perlakuan dan waktu fermentasi terhadap kriteria kekuatan antioksidan pada tempe

Tabel 1 menunjukkan bahwa kekuatan antioksidan pada tempe masih tergolong lemah meskipun telah ditambahkan pigmen dengan berbagai perlakuan. Antioksidan sangat kuat memiliki nilai  $IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$ , kuat  $IC_{50} = 50-100 \mu\text{g/ml}$ , medium  $IC_{50} = 100-150 \mu\text{g/ml}$ , dan lemah  $> 151-200 \mu\text{g/ml}$  (Ervina *et al.*, 2016). Sedangkan seluruh sampel tempe yang dibuat memiliki nilai  $IC_{50} > 200 \mu\text{g/ml}$ . Hal ini disebabkan karena metode penyalutan pigmen alami yang digunakan melibatkan panas sehingga paparan panas selama proses

penyalutan memungkinkan terjadinya penurunan kekuatan antioksidan pada pigmen. Berdasarkan Puspita dan Samalukang (2017), pigmen alami sangat rentan terhadap kerusakan akibat faktor lingkungan seperti suhu tinggi. Paparan panas berasal dari proses pencairan tepung agar yang membutuhkan suhu  $85-95^{\circ}\text{C}$  untuk mencapai titik lelehnya dan terkoagulasi pada suhu  $32-45^{\circ}\text{C}$  (Rhein-Knudsen *et al.*, 2015) sehingga dalam proses penyalutan suhu diturunkan hingga mencapai  $60^{\circ}\text{C}$  dan dijaga tetap konstan. Terpaparnya pigmen pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$  selama proses penyalutan memungkinkan terjadinya penurunan kekuatan antioksidan.

Table 1. Kriteria kekuatan antioksidan pada tempe kontrol dan tempe berbagai perlakuan dengan lama waktu fermentasi 0 dan 48 jam

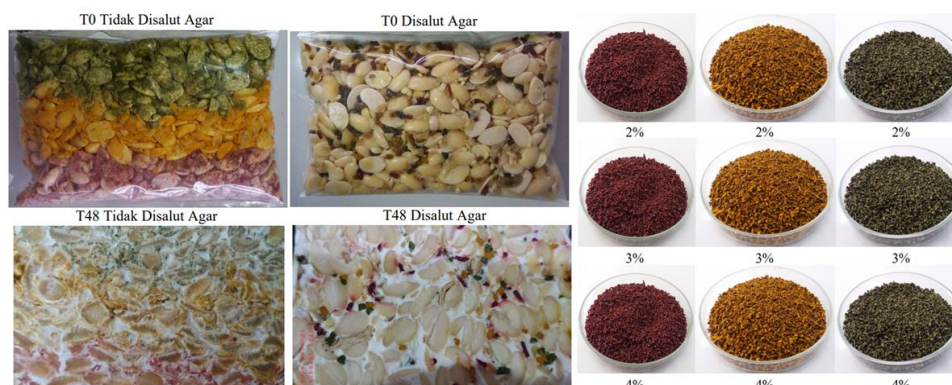
Waktu Fermentasi (Jam)	Perlakuan	Nilai $IC_{50}$ (mg/ml)	Kriteria Kekuatan Antioksidan
0	Kontrol	166,45±38,58	Lemah
	Tidak Disalut	34,46±3,00	Lemah
	Disalut Agar 2%	41,93±15,56	Lemah
	Disalut Agar 3%	41,41±13,19	Lemah
	Disalut Agar 4%	45,63±9,48	Lemah
48	Kontrol	69,45±3,49	Lemah
	Tidak Disalut	23,53±5,46	Lemah
	Disalut Agar 2%	21,91±6,02	Lemah
	Disalut Agar 3%	21,53±6,03	Lemah
	Disalut Agar 4%	29,69±11,04	Lemah

Keterangan: Kriteria berdasarkan Ervina *et al.* (2016), antioksidan sangat kuat memiliki nilai  $IC_{50} < 50$  µg/ml, kuat  $IC_{50} = 50-100$  µg /ml, medium  $IC_{50} = 100-150$  µg /ml, dan lemah  $> 151-200$  µg /ml.

### Pengaruh penyalutan dengan tepung agar terhadap warna pigmen

Gambar 2 menunjukkan perlakuan penyalutan pigmen dengan tepung agar mampu mempertahankan warna pigmen dibandingkan dengan tidak disalut tepung agar. Pada gambar 2 terlihat bahwa warna tempe dengan penambahan pigmen dengan tidak disalut tepung agar tampak mengalami pemudaran setelah fermentasi selama 48 jam, sedangkan warna pigmen dengan disalut tepung agar tampak tidak mengalami perubahan warna. Hal ini dapat terjadi karena tepung agar sebagai penyalut pigmen merupakan karbohidrat kompleks yang diperoleh dari rumput laut bergenus *Gelidium* dan *Gracilaria* (Barros *et al.*, 2013) yang memungkinkan pigmen dengan disalut tepung agar akan lebih sulit dicerna oleh kapang tempe dibandingkan dengan

tidak disalut sehingga menyebabkan kapang hanya tumbuh dan mencerna bagian permukaan *beads* pigmen. Penambahan pigmen dengan tidak disalut tepung agar juga akan menerima paparan langsung oleh panas yang dihasilkan dari proses fermentasi tempe. Menurut Nout dan Kiers (2005), selama proses fermentasi tempe, terjadi peningkatan suhu mencapai 40-50°C, sehingga dapat diasumsikan bahwa pigmen dengan tidak disalut tepung agar akan terpapar langsung oleh suhu 40-50°C selama ±48 jam. Selama proses fermentasi tempe, juga dihasilkan gas CO<sub>2</sub> (Nout dan Kiers, 2005) yang dapat berikatan dengan radikal bebas peroxynitrite (OONO-) membentuk nitroso peroxocarboxylate (ONOOCO<sub>2</sub>-) dan asam peroxynitrous (ONOOH) yang bersifat sangat reaktif (Phaniendra *et al.*, 2015).



Gambar 2. Perbandingan warna pigmen tidak dan disalut tepung agar pada tempe pada lama waktu fermentasi 0 dan 48 jam (kiri) dan *beads* pigmen berbagai konsentrasi (kanan) (Dokumen Pribadi, 2021)

## KESIMPULAN

Penambahan pigmen baik disalut dan tidak disalut tepung agar terbukti mampu meningkatkan kekuatan antioksidan secara signifikan terhadap kontrol tetapi masih tergolong sebagai kriteria antioksidan lemah. Perlakuan pigmen dengan disalut tepung agar mampu melindungi pigmen dari degradasi akibat proses fermentasi yang ditunjukkan oleh warna *beads* pigmen pada tempe yang tampak tidak mengalami perubahan warna. Waktu fermentasi juga berpengaruh terhadap kekuatan antioksidan pada tempe dimana hasil fermentasi selama 48 jam terjadi peningkatan kekuatan antioksidan yang ditandai dengan menurunnya nilai IC<sub>50</sub> pada semua sampel tempe. Oleh karena itu, pada penelitian lanjutan disarankan untuk menggunakan bahan dan metode penyalutan yang tidak melibatkan paparan panas secara langsung pada sumber antioksidan yang digunakan.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada semua pihak yang telah mendukung terlaksananya penelitian ini, serta Fakultas Biologi dan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga, Jawa Tengah yang telah memberikan wadah untuk melaksanakan penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

- Astuti, M., Eng, B., Meliala, A., & Med, B. (2000). Tempe, a nutritious and healthy food from Indonesia. *Asia Pacific J Clin Nutr*, 9(4), 322–325. <https://doi.org/10.1046/j.1440-6047.2000.00176.x>
- Barros, F. C.N., da Silvaa, D. C., Sombra, V. G., Maciel, J. S., Feitosa, J. P.A., Freitas, A. L.P., & de Paula, R. C. M. (2013). Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J Agardh). *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 598–603. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.009>
- Cempaka, L., Eliza, N., Ardiansyah, A., Handoko, D. D., & Astuti, R. M. (2018). Proximate Composition, Total Phenolic Content, and Sensory Analysis of Rice Bran Tempeh. *Makara Journal of Science*, 22(2). <https://doi.org/10.7454/mss.v22i2.9616>
- Chang, C. T., Hsu, C. K., Chou, S. T., Chen, Y. C., Huang, F. S., & Chung, Y. C. (2009). Effect of fermentation time on the antioxidant activities of tempeh prepared from fermented soybean using *Rhizopus oligosporus*. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(4), 799–806. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01907>
- Egarani, G. R., Kasmiyati, S., & Kristiani, E. B. K. (2020). The Antioxidant Content and Activity of Various Plant Organs of Kitolod ( *Isotoma longiflora* ). *Journal of Biology & Biology Education*, 12(3), 297–303.
- Ervina, M., Nawu, Y. E., & Esar, S. Y. (2016). Comparison of in vitro antioxidant activity of infusion, extract and fractions of Indonesian Cinnamon (*Cinnamomum burmannii*) bark. *International Food Research Journal*, 23(3), 1346–1350.
- Hashim, N., Tai, C. W., Wen, H. X., Ismail, A., & Kong, K. W. (2018). Current Research in Nutrition and Food Science Comparative Evaluation of Antioxidant Properties and Isoflavones of Tempeh Fermented in Two Different Wrapping Materials. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 6(2).
- Kalita, T., Sangma, S. D., Bez, G., & Ambasht, P. K. (2020). Immobilization of Acid Phosphatase in Agar-agar and Gelatin: Comparative Characterization. *Journal of Scientific Research*, 64(02), 192–200. <https://doi.org/10.37398/jsr.2020.640227>
- Nout, M. J. R., & Kiers, J. L. (2005). Tempe

- fermentation, innovation and functionality: Update into the third millenium. *Journal of Applied Microbiology*, 98(4), 789-805. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02471.x>
- Paciulli, M., Medina-Meza, I. G., Chiavaro, E., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2016). Impact of thermal and high pressure processing on quality parameters of beetroot (*Beta vulgaris* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 68, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.029>
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Ind J Clin Biochem*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Puspita, D., & Samalukang, Y. (2017). Termostabilitas Antosianin dari Buah *Basella rubra* yang Dimikroenkapsulasi. *Jurnal Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian*, 12(2), 29–38.
- Rehman, H. U., Aman, A., Zohra, R. R., & Qader, S. A. U. (2014). Immobilization of pectin degrading enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21 using agar-agar as a support. *Carbohydrate Polymers*, 102(1), 622–626. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.073>
- Rhein-knudsen, N., Ale, M. T., & Meyer, A. S. (2015). Seaweed Hydrocolloid Production: An Update on Enzyme. *Marine Drugs*, 13(6), 3340-3359. <https://doi.org/10.3390/md13063340>
- Saefudin, Marusin, S., & Chairul. (2013). Aktivitas Antioksidan pada Enam Jenis Tumbuhan *Sterculiaceae*. *Jurnal Penelitian Hasil Hutan*, 31(2), 103–109.
- Sailaja Rao, P., Kalva, S., Yerramilli, A., & Mamidi, S. (2011). Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. *Free Radicals and Antioxidants*, 1(4), 2–7. <https://doi.org/10.5530/ax.2011.4.2>
- Sharma, M., Sharma, V., & Majumdar, D. K. (2014). Entrapment of  $\alpha$ -Amylase in Agar Beads for Biocatalysis of Macromolecular Substrate. *International Scholarly Research Notices*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/936129>
- Widoyo, S., Handajani, S., & Nandariyah. (2015). Pengaruh lama fermentasi terhadap kadar serat kasar dan aktivitas antioksidan tempe beberapa varietas kedelai. *Biofarmasi*, 13(2), 59–65. <https://doi.org/10.13057/biofar/f130203>