

Produksi Hidrolisat Protein Kacang Koro Benguk dengan Aktivitas Penghambat Kerja Enzim Pengkonversi Angiotensin melalui Kombinasi Fermentasi dan Hidrolisis Enzimatik

[Production of Protein Hydrolysate of Mucuna Bean as Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibitor through a Combination of Fermentation and In-vitro Proteolysis]

Tesy Pratami¹⁾, Azis Boing Sitanggang^{1,2)}, dan Christofora Hanny Wijaya^{1)*}

¹⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pangan, IPB University, Bogor, Indonesia

²⁾ South-East Asia Food & Agricultural Science and Technology (SEAFST) Center, IPB University, Bogor, Indonesia

Diterima 12 Juni 2022 / Disetujui 2 November 2022

ABSTRACT

Mucuna bean (Mucuna pruriens L.) is a legume having high protein content which has the potential as a source of bioactive peptides. One of the bioactive peptides is an angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor, thus, mucuna beans might be used as a potential source of antihypertensive compounds. This study aimed to increase the functionality of proteins from mucuna beans as ACE inhibitors using a combination of fermentation and enzymatic hydrolysis followed by membrane filtration. The mucuna beans were fermented for 0, 24, 48, 96, and 144 h. The highest ACE inhibitory activity of 54.37%, was obtained by fermentation of the beans at 48 h, with a protein content of 20.82 mg/mL. The 48 h fermented mucuna beans were further hydrolyzed using alcalase or neutrase and subsequently filtered with UF membranes having 20, 10 and 5 kDa cut-off. The enzymatic hydrolysis followed by membrane filtration increased the ACE inhibitory activity of mucuna beans. The neutrase hydrolysates resulting from 5 kDa membrane filtration showed the best ACE inhibitory activity (62.96% with a protein content of 10.39 mg/mL). A combination of fermentation and enzymatic hydrolysis followed by filtration using UF-membrane was able to produce ACE inhibitory peptides from mucuna beans. The potential of mucuna beans peptides as ACE inhibitors was due to the presence of negatively charged amino acid residues such as Asp and Glu, positively charged amino acids such as Arg and Lys, and hydrophobic amino acids such as Val, Leu, Ala, and Ile.

Keyword: ACE inhibitor, bioactive peptide, membrane filtration, *Mucuna pruriens*, protein hydrolysate

ABSTRAK

Kacang koro benguk (*Mucuna pruriens L.*) merupakan salah satu kacang-kacangan dengan kandungan protein tinggi yang berpotensi sebagai sumber peptida bioaktif. Salah satu peptida bioaktif adalah penghambat ACE (*angiotensin-converting enzyme*) sehingga kacang koro benguk dapat digunakan sebagai bahan pangan fungsional antihipertensi yang potensial. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan fungsionalitas protein dari kacang koro benguk sebagai penghambat ACE dengan menggunakan pendekatan kombinasi fermentasi dan hidrolisis enzimatik, dilanjutkan dengan pemisahan menggunakan membran filtrasi. Kacang koro benguk difermentasi pada 0, 24, 48, 96, dan 144 jam. Aktivitas penghambatan ACE tertinggi sebesar 54,37% diperoleh dari kacang koro benguk yang difermentasi pada 48 jam dengan kandungan protein sebesar 20,82 mg/mL. Tempe koro benguk fermentasi 48 jam selanjutnya dihidrolisis menggunakan enzim alkalase atau neutrase, dan kemudian dipisahkan menggunakan membran ultrafiltrasi (UF) dengan MWCO (*molecular weight cut-off*) 20, 10 dan 5 kDa. Hidrolisis enzimatik dan pemisahan membran meningkatkan aktivitas penghambatan ACE dari kacang koro benguk. Hidrolisat neutrase hasil pemisahan membran 5 kDa menunjukkan aktivitas penghambatan ACE terbaik (62,96% dengan kandungan protein 10,39 mg/mL). Kombinasi fermentasi dan hidrolisis enzimatik yang dilanjutkan dengan pemisahan menggunakan membran UF mampu menghasilkan peptida penghambat ACE. Potensi peptida kacang koro benguk sebagai penghambat ACE disebabkan oleh adanya residu asam amino yang bermuatan negatif seperti Asp dan Glu, positif seperti Arg dan Lys, dan hidrofobik seperti Val, Leu, Ala dan Ile.

Kata kunci: hidrolisat protein, kacang koro benguk, membran ultrafiltrasi, penghambat ACE, peptida bioaktif

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

PENDAHULUAN

Hipertensi atau tekanan darah tinggi merupakan penyakit gangguan sistem peredaran darah akibat adanya kenaikan tekanan darah di atas 140/90 mmHg. Hipertensi dapat meningkatkan risiko berkembangnya penyakit kardiovaskular seperti penyakit jantung, dan stroke (Daliri *et al.*, 2018). Prevalensi hipertensi di Indonesia adalah sebesar 34,1% pada orang dewasa beumur ≥ 18 tahun (Kemenkes, 2019). Menurut *World Health organization* (WHO) (2019), sebanyak 1,13 Milyar orang di dunia menderita hipertensi, dan angka ini diperkirakan naik menjadi 1,5 Milyar orang pada tahun 2025.

Angiotensin converting enzyme (ACE) berperan dalam pengendalian tekanan darah melalui sistem renin angiotensin. ACE mengkatalis perubahan angiotensin I menjadi angiotensin II (vasokonstriktor), dan menginaktivkan *bradykinin* (vasodilator) yang menyebabkan peningkatan tekanan darah (Aluko, 2015). Penggunaan jangka panjang obat antihipertensi sintetik memberikan efek samping seperti batuk, ruam kulit, dan gangguan rasa (Ko *et al.*, 2012). Tingginya prevalensi hipertensi dan efek samping obat antihipertensi sintetik mendorong dilakukannya penelitian untuk mendapatkan senyawa antihipertensi alami dari bahan pangan. Protein dan peptida bioaktif dapat menjadi alternatif senyawa inhibitor ACE alami yang aman, tidak menimbulkan efek samping, dan memberikan manfaat gizi tambahan sebagai sumber asam amino esensial (Zarei *et al.*, 2019).

Kacang koro benguk (*Mucuna pruriens* L.) termasuk kacang-kacangan famili *Fabaceae* (polong-polongan) yang pemanfaatannya masih sebatas untuk konsumsi sebagai sayuran dan pembuatan tempe (Mulyani *et al.*, 2016). Kacang koro benguk mengandung protein yang cukup tinggi (26,75%) dibandingkan dengan kacang koro kratok (*Phaseolus lunatus* L.) (20,76%), dan koro komak (*Dolichus lablab* L.) (21,37%) (Purwanti *et al.*, 2019; Rahayu *et al.*, 2019). Berdasarkan kandungan tersebut, kacang koro benguk memiliki potensi sebagai sumber peptida bioaktif (Sitanggang *et al.*, 2021a). Beberapa penelitian melaporkan bahwa hidrolisis enzimatik langsung dari kacang koro benguk menghasilkan peptida bioaktif yang berfungsi sebagai antihipertensi melalui penghambatan ACE (Segura-Campos *et al.*, 2013; Herrera-Chalé *et al.*, 2014; Chel-Guerrero *et al.*, 2017; Tuz dan Campos 2017). Meskipun demikian, hingga saat ini penelitian terkait produksi dan karakterisasi peptida bioaktif penghambat ACE, serta karakteristik asam amino dari hidrolisat tempe koro benguk belum banyak dilaporkan.

Peptida bioaktif dari *parent* protein dapat diproduksi melalui fermentasi mikroba, dan hidrolisis enzimatik (Singh *et al.*, 2014), maupun kombinasi keduanya (Sitanggang *et al.*, 2020a). Produksi peptida bioaktif melalui kombinasi antara fermentasi dan hidro-

lisis enzimatik, serta diikuti pemisahan menggunakan membran UF yang dilakukan oleh Sitanggang *et al.* (2020a), menghasilkan bioaktivitas hidrolisat tempe kedelai lebih baik dibandingkan dengan hanya difermentasi. Kombinasi fermentasi dan hidrolisis enzimatik diharapkan dapat meningkatkan fungsionalitas peptida kacang koro benguk sebagai penghambat ACE (Sitanggang *et al.*, 2021b).

Kacang koro benguk dapat diolah menjadi tempe melalui fermentasi. Selama proses fermentasi, mikroba memproduksi enzim proteolitik yang akan mendegradasi protein menjadi peptida dengan berat molekul rendah yang berpotensi memiliki sifat bioaktif, termasuk kemampuan sebagai penghambat ACE (Puspitojati *et al.*, 2019a). Lama fermentasi memengaruhi pelepasan peptida bioaktif, sehingga kondisi proses harus dioptimalkan untuk mendapatkan peptida dengan aktivitas spesifik (Jakubczyk *et al.*, 2017).

Hidrolisis enzimatik memotong protein secara spesifik yang dapat menghasilkan peptida dengan sifat fungsional yang diharapkan (Chalamaiah *et al.*, 2015). Jenis enzim yang berbeda akan menghasilkan bioaktivitas peptida yang berbeda pula. Pada penelitian ini, proses hidrolisis dilakukan menggunakan enzim alkalase dan neutrase untuk melihat potensi enzim komersil dalam menghasilkan peptida penghambat ACE dari kacang koro benguk. Alkalase dan neutrase merupakan golongan endopeptidase yaitu enzim yang memotong protein dari bagian dalam molekul dan dari ujung rantai polipeptida (Mótyán *et al.*, 2013), sehingga diharapkan dapat meningkatkan peluang untuk memperoleh peptida bioaktif.

Tahap lanjutan dalam produksi peptida bioaktif adalah pemisahan. Pemisahan menggunakan membran ultrafiltrasi dapat memisahkan peptida berdasarkan berat molekulnya (Wan Mohtar *et al.*, 2014). Membran ultrafiltrasi efektif digunakan untuk menghasilkan peptida dengan berat molekul rendah dan aktivitas yang tinggi (Hong *et al.*, 2019). Dengan demikian, penelitian ini bertujuan meningkatkan fungsionalitas peptida kacang koro benguk sebagai penghambat ACE melalui kombinasi proses fermentasi kacang koro benguk menjadi tempe dan hidrolisis enzimatik, diikuti separasi menggunakan membran ultrafiltrasi (UF).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu kacang koro benguk putih yang diperoleh dari Pasar Beringharjo, Kota Yogyakarta, laru tempe (Raprima, KOPTI, Indonesia), enzim alkalase (6000 U/mL, Novozyme, Denmark), dan neutrase (11000 U/mL, Novozyme, Denmark), enzim angiotensin (0,33 U/mL) (Xi'An Saina Biological Technology Co., Ltd., China).

Pembuatan tempe koro benguk

Pembuatan tempe koro benguk mengacu pada metode Rahayu *et al.* (2019) dengan modifikasi. Kacang koro benguk yang telah disortir direndam dengan air (perbandingan kacang dan air 1:3 (b/v)) selama 24 jam, kemudian kacang koro benguk direbus (*steam jacket*, Gardners, New Delhi, India) dengan perbandingan kacang dan air 1:7 b/v pada suhu 90-95°C, tekanan 2-3 bar, selama 90 menit. Setelah itu, kacang koro benguk rebus direndam kembali (perbandingan kacang-air 1:5 b/v) selama 48 jam. Kacang koro benguk yang telah direndam, dipecah menggunakan mesin pemecah biji (KOPTI, Bogor, Indonesia) menjadi dua bagian, dikupas kulitnya, kemudian dicuci dan ditiriskan. Setelah ditiriskan, kacang koro benguk dikukus (*steamer*) selama 15 menit, kemudian didinginkan. Selanjutnya kacang koro benguk diberi ragi (2 g/kg kacang koro benguk) secara merata, dan dikemas menggunakan plastik (450 g kacang koro benguk/plastik) yang diberi lubang berjarak 2x2 cm. Proses fermentasi dilakukan pada suhu 25°C, dengan perlakuan waktu fermentasi selama 0, 24, 48, 96, dan 144 jam.

Tempe koro benguk dipotong dengan ukuran 3x0,5x0,5 cm dan dikeringkan menggunakan *cabinet dryer* (Terara Seisakusho C. Ltd. No 4-60SP, Jepang) pada suhu 70°C selama 5 jam. Tempe yang sudah kering kemudian dihaluskan menggunakan *pin disc mill* (FFC 23 Agrowindo-Maksindo, Indonesia) dan diayak menggunakan ayakan 80 mesh. Selanjutnya, tepung tempe koro benguk dengan berbagai waktu fermentasi dianalisis aktivitas penghambatan ACE, kadar protein kasar, kadar protein terlarut, derajat hidrolisis, total fenolik, kapasitas antioksidan, dan warna. Tempe koro benguk dengan waktu fermentasi terbaik berdasarkan aktivitas inhibitor ACE tertinggi akan digunakan dalam produksi peptida bioaktif.

Produksi hidrolisat tepung tempe koro benguk

Tepung tempe koro benguk dengan waktu fermentasi terbaik dihidrolisis dengan enzim neutrase dan alkalase (Sitanggang *et al.*, 2020 dengan modifikasi), masing-masing dilakukan pada suhu 50°C selama 4 jam dengan kecepatan pengadukan 200 rpm. Perbandingan enzim dan substrat adalah 1:10 b/v, dan perbandingan substrat dan bufer fosfat 0,01 M pH 7,4 adalah 5% b/v. Hidrolisis dihentikan dengan pemanasan pada suhu 90°C selama 20 menit. Hidrolisat kemudian disaring dengan kertas Whatman No 43, dan separasi dilanjutkan dengan membran UF MWCO 5, 10, dan 20 kDa (Microdyn-Nadir GmbH, Jerman), pada kondisi vakum dengan sistem operasi *dead-and*. Empat fraksi hidrolisat yang diperoleh yaitu hidrolisat yang berukuran >20 kDa (penyaringan kertas Whatman No. 43 diameter 90 mm), lolos 20, 10, dan 5 kDa, dianalisis kadar protein terlarut, total fenolik, kapasitas antioksidan dan aktivitas penghambatan ACE. Hidrolisat dengan nilai aktivitas peng-

hambatan ACE tertinggi dari masing-masing enzim dan ukuran MWCO membran dianalisis nilai IC₅₀ penghambatan ACE serta diidentifikasi komposisi asam aminonya.

Pengukuran kadar protein

Analisis kadar protein kasar menggunakan metode Kjeldahl (AOAC 2012). Kadar protein terlarut diuji menggunakan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951) dengan standar protein standar BSA (*Bovine Serum Albumin*) (Sigma-Aldrich, Inc., Singapore).

Analisis derajat hidrolisis

Analisis derajat hidrolisis dilakukan dengan metode titrasi formol (Morais *et al.*, 2013). Derajat hidrolisis protein dihitung menggunakan persamaan berikut ini:

Derajat Hidrolisis (%) =

$$\frac{\text{Am N (asam amino-nitrogen)}}{\text{TN (total nitrogen)}} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

Total nitrogen dihitung berdasarkan metode Kjeldahl. Asam amino-nitrogen diperoleh menggunakan metode titrasi formol. Pereaksi formaldehida dibuat dengan cara 25 mL formaldehida diencerkan menggunakan etanol 50% hingga mencapai volume 250 mL. Sampel dilarutkan dalam akuades dengan perbandingan 1:10 (b/v). Larutan sampel dinetralkan dengan NaOH 3 M hingga pH 8,0 dan diaduk menggunakan *waterbath shaker* pada suhu 50°C selama 2 jam. Selanjutnya, sebanyak 5 mL sampel ditambahkan 2-3 tetes indikator fenolftalein dan 5 mL pereaksi formaldehida. Hasil pencampuran sampel dititrasi menggunakan NaOH 0,01 M hingga muncul warna merah jambu. Bahan kimia NaOH dan formaldehida diperoleh dari grade *pro-analysis* (Merck, Jerman). Kandungan asam amino-nitrogen (Am N) dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut, dengan V_{NaOH}= Volume NaOH, M_{NaOH}= Molaritas NaOH yang digunakan (0,01 M), BM N= Berat molekul nitrogen (14):

Am N (mg/g Sampel)=

$$\frac{V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{NaOH}} \times \text{BM N} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{Berat sampel (g)}} \dots\dots (2)$$

Analisis warna

Pengukuran warna tepung tempe koro benguk dilakukan terhadap tingkat kecerahan atau nilai *Lightness* (L*) menggunakan *chromameter* (Konica Minolta CR 310, Amerika Serikat) (İçöz *et al.*, 2007 dengan modifikasi). Pengukuran dilakukan dengan cara meletakkan sampel pada wadah sampel uji, kemudian permukaan sampel diratakan dengan sendok, selanjutnya sampel dianalisis dengan meletak-

kan *measuring head* untuk mengidentifikasi nilai L^* , a^* , dan b^* Hunter.

Analisis berat molekul protein metode SDS-PAGE

Penentuan berat molekul protein tepung tempe koro benguk dilakukan dengan metode SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Prosedur persiapan sampel berdasarkan mengacu pada metode Mujoo *et al.* (2003). Sebanyak 50 mg tepung tempe koro benguk bebas lemak dilarutkan dalam 500 μ L Tris-HCl (pH 8,4), dan diinkubasi pada suhu 80°C selama 1 jam. Setelah itu, sampel disentrifus pada 12.000 rpm selama 25 menit. Supernatan dikumpulkan, sedangkan residu proses kembali dilarutkan dalam Tris-HCl hingga 3 kali. Seluruh supernatan digabung dan ditambahkan bufer sampel dengan perbandingan 1:1 (v/v), kemudian dipanaskan pada suhu 95°C selama 10 menit.

Sebanyak 10 μ L larutan sampel dan 10 μ L protein marker diinjeksikan ke dalam sumur yang mengandung 15% gel pemisah dan 3% gel penahan. Elektroforesis (PerfectBlue™ dual gel system Twin S, VWR Peqlab, Jerman) dijalankan pada tegangan 35-50 mA, dan 70 Volt selama 15 menit dan 170 Volt selama 60 menit. Setelah proses selesai, gel diwarnai dengan larutan pewarna dan digoyangkan selama 60 menit menggunakan *shaker*, lalu direndam dengan larutan peluntur selama 60 menit. Selanjutnya, direndam dengan asam asetat 5% selama 15-30 menit. Marker protein yang digunakan berbobot 10-250 kDa. Berat molekul protein pada sampel diperoleh dengan aplikasi *PhotoCapt Mw* (Vilber Lourmat, Marne-La-Vallee, Perancis).

Analisis total fenolik

Analisis total fenolik mengacu pada kavitha (2018) dengan modifikasi. Sebanyak 1 mL sampel dicampur dengan 0,25 mL reagen Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Inc., Singapura) dan 0,5 mL Na_2CO_3 15% (Merck Milipore, Jerman) serta ditambahkan akuades sebanyak 8,25 mL. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Absorbansi diukur pada 765 nm menggunakan spektrofotometer (Genesys™ 140/150 Vis/UV-Vis, Amerika Serikat). Total fenolik dihitung berdasarkan kurva standar menggunakan asam galat, dan dinyatakan sebagai mg *gallic acid equivalent* (GAE)/mL sampel.

Analisis kapasitas antioksidan metode ferric reducing antioxidant power (FRAP)

Pengujian kapasitas antioksidan diawali dengan menyiapkan pereaksi FRAP (Iamsaard *et al.*, 2020) yaitu mencampurkan 300 mM bufer asetat (pH 3,6), 10 mM tris piridil triazin (TPTZ) (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) dalam 40 mM HCl, dan 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) dengan perbandingan 10:1:1 (v/v/v). Sebanyak 0,15 mL sampel ditambahkan 4,5 mL pereaksi FRAP, dan

didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 598 nm menggunakan spektrofotometer (Genesys™ 140/150 Vis/UV-Vis, Amerika Serikat). Hasil pengukuran dihitung dengan persamaan kurva standar asam askorbat dan dinyatakan dalam mg *ascorbic acid equivalent antioxidant capacity* (AEAC)/mL sampel.

Uji aktivitas penghambatan ACE

Uji aktivitas penghambatan ACE mengacu pada Guo *et al.* (2009). Uji aktivitas ACE dilakukan dengan cara mencampurkan sebanyak 200 μ L larutan bufer substrat (6,7 mM *hippuryl-L-histidyl-L-leucine* atau HHL dalam 50 mM HEPES buffer dengan 300 mM NaCl pH 8,3) dengan 100 μ L hidrolisat protein dan di pre-inkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan sebanyak 30 μ L enzim angiotensin (0,33 U/mL) untuk memulai reaksi. Setelah diinkubasi selama 20 menit pada suhu 37°C, reaksi enzimatik tersebut kemudian dihentikan dengan penambahan 3 mL HCl 1 N. Asam hipurat yang terlepas akibat aksi dari enzim angiotensin dihidrolisis dengan menggunakan 2,4 mL etil asetat kemudian divorteks selama 2 menit. Lapisan bagian atas yang merupakan asam hipurat diambil sebanyak 1 mL dan dievaporasi pada suhu 120°C selama 30 menit. Sedimen yang tersisa kemudian dilarutkan dalam 2,5 mL akuades dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 228 nm (Spektrofotometer Genesys™ 140/150 Vis/UV-Vis, Amerika Serikat). Aktivitas penghambatan ACE dihitung menggunakan persamaan berikut: (dengan a= absorbansi larutan mengandung ACE tanpa sampel, b= absorbansi larutan mengandung ACE yang telah diinaktivasi dengan HCl tanpa sampel; c= absorbansi campuran ACE dan sampel, dan, d= absorbansi larutan mengandung ACE dan sampel yang telah diinaktivasi dengan HCl).

Aktivitas Penghambatan ACE (%) =

$$\frac{(a-b)-(c-d)}{(a-b)} \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

Nilai *inhibition concentration* 50 (IC_{50}) diperoleh dari kurva hubungan antara aktivitas penghambatan ACE (%) dengan konsentrasi protein (mg/mL) menggunakan aplikasi *GraphPad Prism 9.2.0* (GraphPad Software, Inc., California) yang didasarkan pada *best fit value*.

Analisis komposisi asam amino

Analisis komposisi asam amino total (diukur setelah hidrolisis dengan HCl 6 M) mengikuti Sitanggung *et al.* (2020b) untuk hidrolisat tepung tempe koro benguk hasil metode preparatif terbaik dilakukan oleh PT. Saraswanti Indo Genetech, Bogor, Indonesia, menggunakan metode yang dikembangkan secara internal (18-5-17/MU SMM-SIG, UPLC).

Analisis data

Data karakteristik tepung dan hidrolisat tepung tempe koro benguk dianalisis dengan *One-Way ANOVA* dengan uji lanjut Duncan ($p < 0,05$). Data IC_{50} dianalisis dengan *Independent-samples-t-test*. Analisis data menggunakan aplikasi SPSS IBM 25. Hasil dinyatakan sebagai rata-rata \pm SD.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Waktu fermentasi terbaik

Waktu fermentasi terbaik kacang koro benguk diperoleh pada 48 jam dengan nilai aktivitas penghambatan ACE sebesar 54,37% (Tabel 1). Hasil ini sesuai dengan penelitian Rizkaprilisa *et al.* (2020), fermentasi kacang koro benguk selama 48 jam menghasilkan aktivitas penghambatan ACE sekitar 50%. Aktivitas penghambatan ACE ditemukan selama tahap awal fermentasi dan terus meningkat saat fermentasi berlangsung. Namun, fermentasi yang lebih lama menyebabkan penurunan aktivitas penghambatan ACE. Hal ini dapat disebabkan oleh hidrolisis peptida penghambat ACE menjadi asam amino bebas. Bentuk asam amino bebas memiliki aktivitas penghambatan kerja ACE yang lebih rendah dibandingkan dengan bentuk peptidanya (Puspitojati *et al.*, 2019b).

Kadar protein, derajat hidrolisis, total fenolik, dan kapasitas antioksidan meningkat selama fermentasi, namun menurunkan kecerahan tepung tempe koro benguk (Tabel 1). Hal ini dapat disebabkan oleh aktivitas enzim ekstraseluler (protease, lipase, karbohidratase) yang dihasilkan selama fermentasi, yang dapat mendegradasi senyawa-senyawa kompleks berbasis makromolekul menjadi senyawa yang lebih sederhana (Sharma *et al.*, 2020). Hasil analisis berat molekul protein tepung tempe koro benguk (Gambar

1) mengonfirmasi bahwa terjadi degradasi protein berbobot molekul besar selama fermentasi tempe koro benguk. Pita protein untuk berat molekul besar semakin tipis seiring dengan meningkatnya lama fermentasi. Hasil ini sejalan dengan penelitian Sitanggang *et al.* (2020a) bahwa pita protein tempe kedelai dengan berat molekul >35 kDa semakin menipis dengan bertambahnya lama fermentasi. Pola perubahan berat molekul protein yang sama juga dilaporkan oleh Rahayu *et al.* (2019), fermentasi kacang koro benguk menghasilkan protein berbobot molekul rendah (<25 kDa) yang berpotensi memiliki sifat bioaktif.

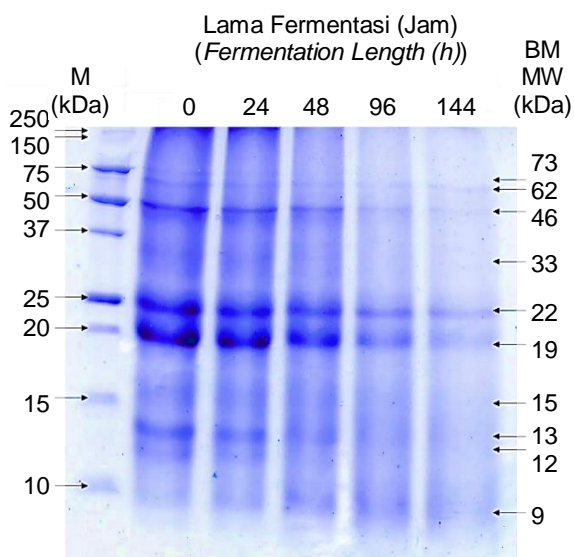
Kadar protein terlarut

Tepung tempe koro benguk dengan lama fermentasi 48 jam dihidrolisis menggunakan enzim alkalase (HA) dan neutrase (HN). Hidrolisat yang dihasilkan memiliki beberapa karakteristik diantaranya kadar protein terlarut, total fenolik, kapasitas antioksidan, aktivitas penghambatan ACE, dan kandungan asam amino. Kandungan protein terlarut dalam hidrolisat alkalase dan neutrase masing-masing berkisar antara 9,1-19,8 dan 10,4-16,4 mg/mL. Hidrolisat HA lebih banyak mengandung protein terlarut dengan berat molekul >20 kDa, dan HN lebih banyak mengandung protein terlarut <20 kDa. Perbedaan kadar protein terlarut ini dapat disebabkan oleh perbedaan aktivitas hidrolitik enzim. Alkalase termasuk golongan serin endopeptidase yang memiliki serin pada sisi aktifnya, dan neutrase merupakan metalloprotease yang membutuhkan ion logam sebagai kofaktor dalam aktivitas katalitiknya (Ramakrishnan *et al.*, 2013). Hasil ini sesuai dengan penelitian Xu *et al.* (2021), hidrolisat protein dari kacang gude yang dihidrolisis dengan enzim yang berbeda (alkalase dan bromelin) menghasilkan kadar protein yang berbeda pula.

Tabel 1. Karakteristik tepung tempe koro benguk
Table 1. Characteristics of koro benguk tempe flour

Parameter	Lama Fermentasi (jam) (<i>Fermentation Length (h)</i>)				
	0	24	48	96	144
Penghambatan ACE (%) (<i>ACE inhibition (%)</i>)	31.84 \pm 0.18 ^a	42.72 \pm 0.46 ^b	54.37 \pm 0.92 ^c	32.36 \pm 1.83 ^a	42.23 \pm 0.23 ^b
Kadar protein kasar (% bk) (<i>Crude protein content (% dw)</i>)	30.82 \pm 0.02 ^a	30.73 \pm 0.29 ^a	33.77 \pm 0.56 ^b	38.46 \pm 0.23 ^c	40.63 \pm 0.42 ^d
Kadar protein terlarut (mg/mL) (<i>Soluble protein content (mg/mL)</i>)	1.07 \pm 0.58 ^a	9.51 \pm 0.29 ^b	20.82 \pm 1.16 ^c	27.82 \pm 1.16 ^d	37.08 \pm 0.87 ^e
Derajat hidrolisis (%) (<i>Degree of hydrolysis (%)</i>)	7.35 \pm 0.16 ^a	13.53 \pm 0.24 ^b	45.28 \pm 0.96 ^c	56.00 \pm 0.20 ^d	69.43 \pm 0.32 ^e
Total fenolik (mg GAE/g bk) (<i>Total phenolics (mg GAE/g dw)</i>)	13.12 \pm 0.07 ^a	14.65 \pm 0.89 ^a	19.88 \pm 0.17 ^b	25.28 \pm 0.34 ^c	30.51 \pm 0.99 ^d
Kapasitas antioksidan (mg AEAC/g bk) (<i>Antioxidant capacity (mg AEAC/g dw)</i>)	15.94 \pm 0.84 ^a	18.99 \pm 0.70 ^b	15.66 \pm 0.30 ^a	18.03 \pm 0.75 ^b	18.36 \pm 0.52 ^b
Warna (Nilai L*) (<i>Color (L* value)</i>)	70.31 \pm 2.62 ^a	70.39 \pm 0.82 ^a	67.83 \pm 2.30 ^{ab}	64.27 \pm 1.84 ^{bc}	61.37 \pm 1.57 ^c

Keterangan: Data dalam satu baris dengan huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$)
Note: Data in one row with different letters indicates a significant difference ($p < 0.05$)



Keterangan: M= Marker protein, BM= Berat molekul
 Note: M= Protein marker, MW= Molecular weight

Gambar 1. Profil berat molekul protein tepung tempe koro bengkuk

Figure 1. Molecular weight profile of proteins from koro bengkuk tempeh flour

Kadar protein terlarut hidrolisat tepung tempe koro bengkuk menurun setelah dipisahkan menggunakan membran UF. Hal ini menunjukkan bahwa masih terdapat protein dengan berat molekul tinggi (≥ 20 kDa) sehingga ketika dipisahkan, protein dengan berat molekul yang lebih besar dari MWCO membran akan tertahan pada permukaan membran (Wan Mohtar *et al.*, 2014). Pemisahan hidrolisat dengan membran UF yang dilaporkan oleh Herrera-Chalé *et al.* (2014), menunjukkan bahwa penggunaan MWCO membran UF yang lebih kecil dapat menolak protein dengan ukuran yang lebih besar, sehingga kandungan protein pada permeat lebih rendah.

Kadar protein tertinggi tidak selalu menghasilkan aktivitas penghambatan ACE tertinggi pula. Berdasarkan Gambar 2A dan 2D, kadar protein tertinggi kedua hidrolisat tepung tempe koro bengkuk dimiliki oleh hidrolisat fraksi >20 kDa. Namun, aktivitas penghambatan ACE justru paling rendah. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa penghambat ACE dari hidrolisat tepung tempe koro bengkuk merupakan protein dengan berat molekul rendah. Temuan ini serupa dengan penelitian Tuz dan Campos (2017), hidrolisat kacang koro bengkuk dengan kadar protein yang tinggi tidak menghasilkan aktivitas penghambatan ACE yang tertinggi.

Total fenolik

Penurunan kandungan total fenol (Gambar 2B) hidrolisat tepung tempe koro bengkuk setelah proses pemisahan menggunakan membran ultrafiltrasi diduga disebabkan oleh adsorpsi komponen fenolik pada

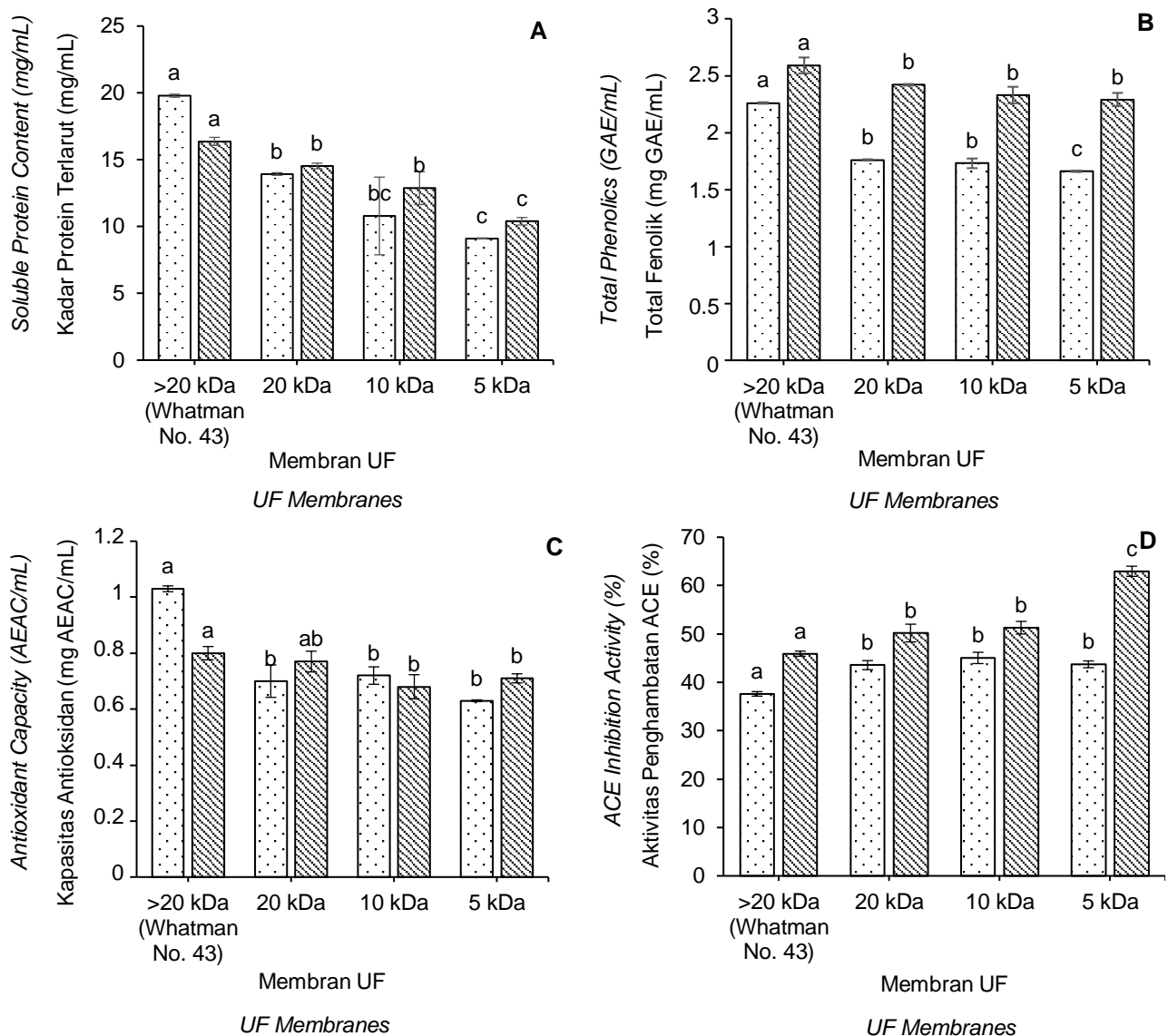
permukaan membran sehingga terjadi penolakan senyawa fenolik oleh membran UF (Mnif *et al.*, 2017). Sitanggang *et al.* (2021b) juga melaporkan bahwa terjadi penolakan senyawa fenolik dari hidrolisat tempe kedelai oleh membran 10 kDa yang menyebabkan kandungan total fenolik pada permeat lebih kecil daripada substrat.

Senyawa fenolik dapat berikatan dengan protein membentuk kompleks protein-fenolik melalui ikatan kovalen maupun ikatan non-kovalen (Aydemir dan Yemencioğlu, 2013). Proses hidrolisis enzimatis mampu memecah kompleks protein-fenolik yang menghasilkan peptida dan senyawa fenolik bebas (Chen *et al.*, 2021). Hidrolisis tepung tempe koro bengkuk dengan enzim alkalase dan neutrase menghasilkan kandungan total fenolik yang berbeda. Hal ini diduga disebabkan oleh perbedaan aktivitas hidrolitik enzim yang berperan dalam pelepasan senyawa fenolik. Temuan ini sesuai dengan hasil penelitian Ee *et al.* (2019), hidrolisat dari biji bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang dihidrolisis dengan protease yang berbeda menghasilkan kandungan total fenolik yang berbeda. Menurut Yun dan Park (2018), kandungan total fenolik pada hidrolisat dipengaruhi oleh jenis protease, konsentrasi, dan waktu hidrolisis.

Selain berperan sebagai antioksidan (Koley *et al.*, 2018), senyawa fenolik juga dapat berfungsi sebagai penghambat ACE (Al Shukor *et al.*, 2013). Kandungan total fenolik dan kapasitas antioksidan hidrolisat tertinggi terdapat pada hidrolisat fraksi >20 kDa, sedangkan aktivitas penghambatan ACE tertinggi terdapat pada hidrolisat <20 kDa yaitu fraksi 10 dan 5 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa fenolik mungkin berpengaruh terhadap kapasitas antioksidan hidrolisat tepung tempe koro bengkuk, tetapi tidak berpengaruh pada aktivitas penghambatan ACE.

Kapasitas antioksidan

Kapasitas antioksidan tertinggi dari kedua hidrolisat tepung tempe koro bengkuk terdapat pada hidrolisat fraksi >20 kDa. Berdasarkan hasil tersebut diduga komponen yang aktif sebagai antioksidan banyak terkandung pada hidrolisat dengan berat molekul tinggi (>20 kDa). Hasil ini sesuai penelitian Mosquera *et al.* (2015) bahwa berat molekul hidrolisat protein mempengaruhi aktivitas antioksidan. Peptida rantai panjang dengan berat molekul lebih tinggi, lebih banyak mengandung gugus pereduksi daripada peptida rantai pendek sehingga berpengaruh terhadap nilai kapasitas antioksidan (Girgih *et al.*, 2011). Aguilar *et al.* (2018) melaporkan bahwa aktivitas antioksidan tertinggi hidrolisat kacang buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) terdapat pada hidrolisat dengan berat molekul tinggi (30 kDa), dan menyatakan bahwa campuran peptida dengan berat molekul yang berbeda memberikan kontribusi lebih pada aktivitas antioksidan daripada masing-masing fraksi.



Keterangan: Grafik batang dengan pola yang sama dengan huruf yang berbeda pada setiap grafik batang menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$); □ Alkalase, ▨ Neutrase
 Note: Different letters on bar graphs with the same pattern show significant differences ($p < 0.05$); □ Alcalase, ▨ Neutrase

Gambar 2. Karakteristik hidrolisat tepung tempe koro benguk
 Figure 2. Characteristics of the hydrolysates of koro benguk tempeh flour

Berdasarkan kandungan total fenolik dan protein terlarut antara hidrolisat HA dan HN tidak menunjukkan perbedaan, namun terdapat perbedaan pada nilai kapasitas antioksidan (Gambar 2A-2C). Hasil ini menunjukkan bahwa kapasitas antioksidan hidrolisat tepung tempe koro benguk tidak sepenuhnya dipengaruhi oleh kandungan total fenolik maupun protein terlarut, tetapi dapat dipengaruhi oleh keberadaan peptida dan komposisi asam amino penyusun peptida yang dihasilkan selama hidrolisis (Sbroggio *et al.*, 2016). Zou *et al.* (2016) melaporkan bahwa aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh berat molekul, kompo-

sisi asam amino, sekuens, struktur, dan hidrofobisitas peptida.

Aktivitas penghambatan ACE

Aktivitas penghambatan ACE tertinggi ditemukan pada hidrolisat HA fraksi 10 kDa, dan hidrolisat HN fraksi 5 kDa (Gambar 2D) dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar 0,34 dan 0,15 mg protein/mL ($p < 0,05$). Hasil ini sesuai dengan penelitian Sitanggang *et al.* (2020a) yang menyatakan bahwa peptida dengan berat molekul kecil lebih bersifat lebih aktif. Menurut García-Moreno *et al.* (2015) peptida

penghambat kerja ACE biasanya tersusun atas 2-12 asam amino. Peptida dengan berat molekul besar sulit masuk kedalam sisi aktif ACE, sedangkan peptida dengan berat molekul kecil lebih mudah berikatan dengan sisi aktif enzim ACE, dan dapat mengganggu aktivitas katalitik ACE sehingga menghambat konversi angiotensin I menjadi angiotensin II (Lee dan Hur, 2019; He *et al.*, 2021).

Kombinasi antara proses fermentasi dan hidrolisis enzimatik serta pemisahan menggunakan membran UF menghasilkan aktivitas penghambatan ACE hidrolisat tepung tempe koro benguk yang lebih kecil dibandingkan dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Segura-Campos *et al.* (2013) dan Chel-Guerrero *et al.* (2017) (Tabel 2). Nilai IC₅₀ hidrolisat tepung tempe koro benguk juga lebih kecil dibandingkan hidrolisat kedelai (Rayaprolu *et al.*, 2015), dan tempe koro kratok (Pertiwi *et al.*, 2019), yang dapat disebabkan oleh perbedaan jenis enzim yang digunakan, jenis *parent* protein dan kondisi operasi hidrolisis (Ciau-Solis *et al.*, 2018). Semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin besar aktivitas penghambatan ACE.

Aktivitas penghambatan ACE dapat berasal dari senyawa fenolik dan antioksidan (Al Shukor *et al.*, 2013; Sorriento *et al.*, 2018). Pada penelitian ini, kandungan total fenolik dan kapasitas hidrolisat tepung tempe koro benguk tertinggi berasal dari hidrolisat fraksi >20 kDa, sedangkan aktivitas penghambatan ACE tertinggi merupakan fraksi <20 kDa yaitu fraksi 10 dan 5 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas penghambatan ACE dari hidrolisat tepung tempe koro benguk dominan tidak berasal dari senyawa fenolik maupun antioksidan, akan tetapi didominasi oleh peptida yang dihasilkan selama hidrolisis.

Aktivitas penghambatan ACE yang tinggi mengindikasikan bahwa hidrolisat kacang koro benguk yang dihasilkan melalui kombinasi proses fermentasi dan hidrolisis enzimatik berpotensi sebagai sumber senyawa antihipertensi, namun perlu dilakukan uji *in vivo* untuk membuktikan peranan dari peptida yang dihasilkan. Bila dibandingkan dengan beberapa penelitian sebelumnya (Segura-Campos *et al.*, 2013; Herrera-Chalé *et al.*, 2014; Tuz dan Campos, 2017), yang sebagian besar menggunakan enzim pencernaan (pepsin dan pankreatin) dalam menghasilkan hidrolisat kacang koro benguk, enzim protease komersil yang digunakan dalam penelitian ini juga mampu menghasilkan peptida bioaktif dari hidrolisat tepung tempe koro benguk dengan aktivitas penghambatan ACE yang potensial. Adanya peningkatan aktivitas penghambatan ACE kacang koro benguk setelah difermentasi selama 48 jam dan hidrolisis dengan enzim neutrase, serta diikuti pemisahan menggunakan membran ultrafiltrasi MWCO 5 kDa menunjukkan bahwa metode preparatif tersebut mampu meningkatkan fungsionalitas kacang koro benguk.

Komposisi asam amino

Hasil analisis komposisi asam amino hidrolisat tepung tempe koro benguk disajikan pada Tabel 3. Hidrolisat HA fraksi 10 kDa dan HN fraksi 5 kDa mengandung asam amino hidrofobik seperti Val, Leu, Ala dan Ile, asam amino bermuatan negatif seperti Asp dan Glu, asam amino bermuatan positif seperti Arg dan Lys, dan asam amino aromatik seperti Phe dan Tyr.

Tabel 2. Perbandingan nilai IC₅₀ antara hidrolisat tepung tempe koro benguk dengan bahan pangan lain
 Table 2. Comparison of IC₅₀ values between hydrolysates of koro benguk tempe flour and other food ingredients

Bahan Pangan (Food)	Enzim (Enzyme)	IC ₅₀ Penghambatan ACE (mg/mL) (IC ₅₀ of ACE inhibition (mg/mL))	Referensi (Reference)
Kacang koro benguk (<i>Mucuna pruriens</i>) (Koro benguk nut)	Pepsin (<i>Pepsin</i>)	2.63	Segura-Campos <i>et al.</i> (2013)
	Pankreatin (<i>Pancreatin</i>)	4.30	
Kacang koro benguk (<i>Mucuna pruriens</i> . L) (Koro benguk nut)	Alkalase-Flavourzyme (<i>Alcalase- Flavourzyme</i>)	0.59-0.99	Chel-Guerrero <i>et al.</i> (2017)
Kedelai (<i>Soybeans</i>)	Alkalase (<i>Alcalase</i>)	0.56	Rayaprolu <i>et al.</i> (2015)
Tempe koro kratok (<i>Phaseolus lunatus</i> L.) (Koro kratok tempe)	Pepsin-Pankreatin (<i>Pepsin-Pancreatin</i>)	0.59	Pertiwi <i>et al.</i> (2019)
Tempe koro benguk (Koro benguk tempe)	Alkalase (<i>Alcalase</i>)	0.34±0.11 ^a	Hasil penelitian (<i>Research</i>)
	Neutrase (<i>Neutrase</i>)	0.15±0.04 ^b	

Keterangan: Data hasil penelitian dalam satu kolom dengan huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$)

Note: Research data in one column with different letters shows a significant difference ($p < 0.05$)

Tabel 3. Komposisi asam amino hidrolisat tepung tempe koro benguk
 Table 3. Amino acid composition of hydrolysates from koro benguk tempeh flour

Asam Amino (Amino Acids)	Hidrolisat Alkalase Fraksi 10 kDa	Hidrolisat Neutrase Fraksi 5 kDa
	(Alcalase Hydrolysate Fraction 10 kDa)	(Neutrase Hydrolysate Fraction 5 kDa)
	(mg/100 g Hidrolisat) (mg/100 g Hydrolysate)	
Alanin (Ala) ^a	55.20	62.64
Glisin (Gly) ^a	55.72	47.74
Valin (Val) ^a	65.07	67.60
Leusin (Leu) ^a	89.15	92.30
Isoleusin (Ile) ^a	58.79	63.42
Prolin (Pro) ^a	53.33	49.19
Fenilalanin (Phe) ^c	66.58	53.91
Metionin (Met) ^a	tt (nd)	0.93
Sistein (Cys) ^e	tt (nd)	tt (nd)
Triptofan (Trp) ^c	13.66	12.92
Asam aspartat (Asp) ^b	149.04	128.36
Asam glutamat (Glu) ^b	139.48	128.01
Arginin (Arg) ^d	67.38	49.79
Lisin (Lys) ^d	71.71	83.84
Histidin (His) ^d	28.89	22.59
Serin (Ser) ^e	68.80	58.49
Threonin (Thr) ^e	65.94	58.10
Tirosin (Tyr) ^c	73.98	60.58
Total	1122.72	1040.39

Keterangan: ^aAsam amino hidrofobik, ^bAsam amino muatan negatif, ^cAsam amino aromatik, ^dAsam amino muatan positif, ^easam amino hidrofilik, tidak terdeteksi (tt)

Note: ^aHydrophobic amino acids, ^bNegatively charged amino acids, ^cAromatic amino acids, ^dPositively charged amino acids, ^eHydrophilic amino acids, not detected (nd)

Aktivitas penghambatan ACE dari peptida dipengaruhi oleh komposisi asam amino penyusunnya (Paiva *et al.*, 2017). Menurut Hernández-Ledesma *et al.* (2011), peptida yang mengandung residu asam amino Tyr, Phe, Trp, dan Pro pada terminal-C menunjukkan aktivitas penghambatan ACE. Adanya residu asam amino bermuatan positif seperti Lys dan Arg pada terminal-C, dan asam amino alifatik seperti Ile dan Val juga dapat berpotensi sebagai penghambat ACE. Selain itu, tiga asam amino hidrofobik pada terminal-C juga menentukan aktivitas penghambatan ACE (Segura-Campos *et al.*, 2013). Aluko *et al.* (2015) mengungkapkan bahwa peptida yang mengandung residu asam amino bermuatan negatif diketahui dapat mengkelat atom seng (Zn) yang merupakan kofaktor ACE. Pengikatan atom Zn oleh peptida dapat mengurangi bioavailabilitas Zn yang menyebabkan penurunan aktivitas katalitik ACE. Bila ditinjau dari profil asam amino (asam amino total) pada penelitian ini (Tabel 3), menunjukkan bahwa keberadaan asam amino muatan negatif, positif dan hidrofobik dalam hidrolisat tepung tempe koro benguk dapat berperan sebagai kontributor untuk aktivitas penghambatan ACE yang dihasilkan.

KESIMPULAN

Kombinasi fermentasi dan hidrolisis enzimatis yang dilanjutkan dengan pemisahan menggunakan membran UF mampu menghasilkan peptida peng-

hambat ACE. Kombinasi fermentasi kacang koro benguk selama 48 jam dan hidrolisis dengan enzim neutrase, diikuti dengan pemisahan menggunakan membran ultrafiltrasi MWCO 5 kDa mampu menghasilkan peptida bioaktif sebagai penghambat ACE yang lebih aktif yaitu sebesar 62,96%. Potensi peptida dari tempe koro benguk sebagai penghambat ACE disebabkan oleh adanya residu asam amino bermuatan negatif seperti Asp dan Glu, positif seperti Arg dan Lys, dan hidrofobik seperti Val, Leu, Ala dan Ile yang terlihat dari profil asam amino total.

DAFTAR PUSTAKA

- Aguilar JGS, Cason VG, de Castro RJS. 2018. Improving antioxidant activity of black bean protein by hydrolysis with protease combinations. *Int J Food Sci Technol* 54: 34-41. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13898>
- Al Shukor N, Van Camp J, Gonzales GB, Staljanssens D, Struijs K, Zotti MJ, Raes K, Smaghe G. 2013. Angiotensin-converting enzyme inhibitory effects by plant phenolic compounds: A study of structure activity relationships. *J Agric Food Chem* 61: 11832-11839. <https://doi.org/10.1021/jf404641v>

- Aluko RE. 2015. Antihypertensive peptides from food proteins. *Annu Rev Food Sci Technol* 6: 235-262. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015520>
- Aluko RE, Girgih AT, He R, Malomo S, Li H, Offengenden M, Wu J. 2015. Structural and functional characterization of yellow field pea seed (*Pisum sativum* L.) protein-derived antihypertensive peptides. *Food Res Int* 77: 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.029>
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 2012. Official methods of analysis of AOAC international. 19th Edition. Washington DC (US): AOAC International.
- Aydemir LY, Yemenicioglu A. 2013. Are protein-bound phenolic antioxidants in phenolic unseen part of iceberg?. *J Plant Biochem Physiol* 1: 1-4. <https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000118>
- Chalamaiah M, Jyothirmayi T, Diwan PV, Dinesh KB. 2015. Antioxidant activity and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) roe (egg). *J Food Sci Technol* 52: 5817-5825. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1714-6>
- Chel-Guerrero L, Galicia-Martínez S, Acevedo-Fernández JJ, Santaolalla-Tapia J, Betancur-Ancona D. 2017. Evaluation of hypotensive and antihypertensive effects of velvet bean (*Mucuna pruriens* L.) Hydrolysates. *J Med Food* 20: 37-45. <https://doi.org/10.1089/jmf.2016.0080>
- Chen H-J, Dai F-J, Chen C-Y, Fan S-L, Zheng J-H, Huang Y-C, Chau C-F, Lin Y-S, Chen C-S. 2021. Evaluating the antioxidants, whitening and anti-aging properties of rice protein hydrolysates. *Molecules* 26: 1-16. <https://doi.org/10.3390/molecules26123605>
- Ciau-Solís NA, Acevedo-Fernández JJ, Betancur-Ancona D. 2018. *In vitro* renin-angiotensin system inhibition and *in vivo* antihypertensive activity of peptide fractions from Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *J Sci Food Agric* 98: 781-786. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8543>
- Daliri EB-M, Lee BH, Kim J-H, Oh D-H. 2018. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein isolates fermented by *Pediococcus pentosaceus* SDL1409. *LWT-Food Sci Technol* 93: 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.026>
- Ee K-Y, Khoo L-Y, Ng W-J, Wong F-C. 2019. Effects of Bromelain and trypsin hydrolysis on the phytochemical content, antioxidant activity, and antibacterial activity of roasted butterfly pea seeds. *Processes* 7: 1-13. <https://doi.org/10.3390/pr7080534>
- García-Moreno PJ, Espejo-Carpio FJ, Guadix A, Guadix EM. 2015. Production and identification of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from mediterranean fish discards. *J Funct Foods* 18: 95-105. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.062>
- Girgih AT, Udenigwe CC, Aluko RE. 2011. *In vitro* antioxidant properties of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate fractions. *J Am Oil Chem Soc* 88: 381-389. <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1686-7>
- Guo Y, Pan D, Tanokura M. 2009. Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey protein using response surface methodology. *Food Chem* 114: 328-333. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.041>
- He Z, Liu G, Qiao Z, Cao Y, Song M. 2021. Novel angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides isolated from rice wine lees: Purification, characterization, and structure-activity relationship. *Front Nutr* 8: 1-12. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.746113>
- Hernández-Ledesma B, del Mar Contreras M, Recio I. 2011. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv Colloid Interface Sci* 165: 23-35. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.11.001>
- Herrera-Chalé FG, Ruiz-Ruiz JC, Acevedo Fernández JJ, Betancur Ancona DA, Segura-Campos MR. 2014. ACE inhibitory, hypotensive and antioxidant peptide fractions from *Mucuna pruriens* proteins. *Process Biochem* 49: 1691-1698. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.06.021>
- Hong G-P, Min S-G, Jo Y-J. 2019. Anti-oxidative and anti-aging activities of porcine by-product collagen hydrolysates produced by commercial proteases: Effect of hydrolysis and ultrafiltration. *Molecules* 24: 1104. <https://doi.org/10.3390/molecules24061104>
- Iamsaard S, Arun S, Burawat J, Yannasithinon S, Tongpan S, Bunsueb S, Lapyuneyong N, Choowong-in P, Tangsriskakda N, Chaimontri C, Sukhorum W. 2020. Evaluation of antioxidant capacity and reproductive toxicity of aqueous extract of Thai *Mucuna pruriens* seeds. *J Integr Med* 18: 265-273. <https://doi.org/10.1016/j.joim.2020.03.003>
- İçöz D, Sumnu G, Sahin S. 2007. Color and texture development during microwave and conventional baking of breads. *Int J Food Prop* 7: 201-213. <https://doi.org/10.1081/JFP-120025396>
- Jakubczyk A, Karaś M, Złotek U, Szymanowska U. 2017. Identification of potential inhibitory peptides of enzymes involved in the metabolic syn-

- drome obtained by simulated gastrointestinal digestion of fermented bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *Food Res Int* 100: 489-496. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.046>
- Kavitha K. 2018. Evaluation of total phenols, total flavonoids, antioxidant, and anticancer activity of mucuna pruriens seed extract. *Asian J Pharm Clin Res* 11: 242-246. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i3.22999>
- [Kemenkes] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2019. Laporan Nasional RISKESDAS 2018. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Kementerian Kesehatan RI. Jakarta.
- Ko S-C, Lee J-K, Byun H-G, Lee S-C, Jeon Y-J. 2012. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from enzymatic hydrolysates of *Styela clava* flesh tissue. *Process Biochem* 47: 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.10.005>
- Koley TK, Maurya A, Tripathi A, Singh BK, Singh M, Bhutia TL, Tripathi PC, Singh B. 2018. Antioxidant potential of commonly consumed underutilized leguminous vegetables. *Int J Veg Sci* 25: 362-372. <https://doi.org/10.1080/19315260.2018.1519866>
- Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat* 227: 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lee SY, Hur SJ. 2019. Purification of novel angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef myofibrillar proteins and analysis of their effect in spontaneously hypertensive rat model. *Biomed Pharmacother* 116: 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109046>
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Mnif A, Mouelhi M, Hamrouni B. 2017. Understanding of phenolic compound retention mechanisms on PES-UF membrane. *Turkish J Chem* 41: 813-825. <https://doi.org/10.3906/kim-1611-64>
- Morais HA, Silvestre MPC, Silveira JN, Silva ACS, Silva VDM, Silva MR. 2013. Action of a pancreatin and an *Aspergillus oryzae* protease on whey proteins: Correlation among the methods of analysis of the enzymatic hydrolysates. *Brazilian Arch Biol Technol* 56: 985-995. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000600014>
- Mosquera M, Giménez B, Ramos S, López-Caballero ME, del Carmen Gómez-Guillén M, Montero P. 2015. Antioxidant, ACE-inhibitory, and antimicrobial activities of peptide fractions obtained from dried giant squid tunics. *J Aquat Food Prod Technol* 25: 444-455. <https://doi.org/10.1080/10498850.2013.819543>
- Mótyán JA, Tóth F, Tózsér J. 2013. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules* 3: 923-942. <https://doi.org/10.3390/biom3040923>
- Mujoo R, Trinh DT, Ng PKW. 2003. Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture. *Food Chem* 82: 265-273. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00547-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00547-2)
- Mulyani L, Kartadarma E, Fitrianiingsih SP. 2016. Manfaat dan kandungan kacang kara benguk (*Mucuna pruriens* L.) sebagai obat herbal. *Prosiding Farmasi*. Volume ke-2. 351-357.
- Paiva L, Lima E, Neto AI, Baptista J. 2017. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity, antioxidant properties, phenolic content and amino acid profiles of *Fucus spiralis* L. Protein hydrolysate fractions. *Mar Drugs* 15: 311. <https://doi.org/10.3390/md15100311>
- Pertiwi MGP, Marsono Y, Indrati R. 2019. *In vitro* gastrointestinal simulation of tempe prepared from koro kratok (*Phaseolus lunatus* L.) as an angiotensin-converting enzyme inhibitor. *J Food Sci Technol* 57: 1847-1855. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04219-1>
- Purwanti E, Prihanta W, Permana TI. 2019. Karakterisasi kandungan protein berbagai aksesori koro lokal sebagai upaya penggalan sumber pangan fungsional. *Proceeding Biol Educ Conf* 16: 172-175.
- Puspitojati E, Cahyanto MN, Marsono Y, Indrati R. 2019a. Production of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides during the fermentation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) tempe. *Pakistan J Nutr* 18: 464-470. <https://doi.org/10.3923/pjn.2019.464.470>
- Puspitojati E, Indrati R, Cahyanto MN, Marsono Y. 2019b. Formation of ACE-inhibitory peptides during fermentation of jack bean tempe inoculated by *usar Hibiscus tiliaceus* leaves starter. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. International Conference on Food Science and Technology. 2019 Nov 28-29. Semarang, Indonesia. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/292/1/012022>
- Rahayu NA, Cahyanto MN, Indrati R, Mada UG, No JF. 2019. Pola perubahan protein koro benguk (*Mucuna pruriens*) selama fermentasi tempe menggunakan inokulum raprima. *AgriTech* 39: 128-135. <https://doi.org/10.22146/agritech.41736>

- Ramakrishnan V, Ghaly AE, Brooks MS, Budge SM. 2013. Enzymatic extraction of amino acids from fish waste for possible use as a substrate for production of jadomycin. *Enzym Eng* 2: 1-9.
- Rayaprolu S, Hettiarachchy N, Horax R, Satchithanandam E, Chen P, Mauromoustakos A. 2015. Amino acid profiles of 44 soybean lines and ACE-I inhibitory activities of peptide fractions from selected lines. *J Am Oil Chem Soc* 92: 1023-1033. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2655-y>
- Rizkaprilisa W, Marsono Y, Indrati R. 2020. Bioactive peptide tempe made from *Mucuna pruriens* (L) DC as an inhibitor of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) in a digestion simulation. *Prev Nutr Food Sci* 25: 93-97. <https://doi.org/10.3746/pnf.2020.25.1.93>
- Sbroggio MF, Montilha MS, Ribeiro V, Figueiredo G De, Georgetti SR, Kurozawa LE. 2016. Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. *Food Sci Technol* 36: 375-381. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.000216>
- Segura-Campos MR, Tovar-Benitez T, Chelguerrero L, Betancur-Ancona D. 2013. Functional and bioactive properties of Velvet bean (*Mucuna pruriens*) protein hydrolysates produced by enzymatic treatments. *J Food Meas Charact* 8: 61-69. <https://doi.org/10.1007/s11694-013-9165-0>
- Sharma R, Garg P, Kumar P, Bhatia SK, Kulshrestha S. 2020. Microbial fermentation and its role in quality improvement of fermented foods. *Fermentation* 6: 1-20. <https://doi.org/10.3390/fermentation6040106>
- Singh BP, Vij S, Hati S. 2014. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides* 54: 171-179. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.01.022>
- Sitanggang AB, Lesmana M, Budijanto S. 2020a. Membrane-based preparative methods and bioactivities mapping of tempe-based peptides. *Food Chem* 329: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127193>
- Sitanggang AB, Putri JE, Palupi NS, Hatzakis E, Syamsir E, Budijanto S. 2021a. Enzymatic preparation of bioactive peptides exhibiting ace inhibitory activity from soybean and velvet bean: A systematic review. *Molecules* 26: 1-14. <https://doi.org/10.3390/molecules26133822>
- Sitanggang AB, Sinaga WSL, Wie F, Fernando F, Krusong W. 2020b. Enhanced antioxidant activity of okara through solid state fermentation of GRAS fungi. *Food Sci Technol* 40: 178-186. <https://doi.org/10.1590/fst.37218>
- Sitanggang AB, Sumitra J, Budijanto S. 2021b. Continuous production of tempe-based bioactive peptides using an automated enzymatic membrane reactor. *Innov Food Sci Emerg Technol* 68: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102639>
- Sorriento D, De Luca N, Trimarco B, Iaccarino G. 2018. The antioxidant therapy: New insights in the treatment of hypertension. *Front Physiol* 9: 1-11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00258>
- Tuz MAO, Campos MRS. 2017. Purification of *Mucuna pruriens* (L) peptide fractions and evaluation of their ACE inhibitory effect. *Biocatal Agric Biotechnol* 10: 390-395. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.05.001>
- Wan Mohtar WAAQI, Hamid AA, Abd-Aziz S, Muhamad SKS, Saari N. 2014. Preparation of bioactive peptides with high angiotensin converting enzyme inhibitory activity from winged bean [*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC] seed. *J Food Sci Technol* 51: 3658-3668. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0919-1>
- [WHO] World Health Organization. 2019. Hypertension. <https://www.who.int/news-room/fact-sheet/s/detail/hypertension> [03 September 2020].
- Xu X, Qiao Y, Shi B, Dia VP. 2021. Alcalase and bromelain hydrolysis affected physicochemical and functional properties and biological activities of legume proteins. *Food Struct* 27: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2021.100178>
- Yun YR, Park SH. 2018. Antioxidant activities of brown teff hydrolysates produced by protease treatment. *J Nutr Heal* 51: 599-606. <https://doi.org/10.4163/jnh.2018.51.6.599>
- Zarei M, Abidin NBZ, Auwal SM, Chay SY, Haiyee ZA, Sikin AM, Saari N. 2019. Angiotensin converting enzyme (ACE) peptide interactions: Inhibition kinetics, in silico molecular docking and stability study of three novel peptides generated from palm kernel cake proteins. *Biomolecules* 9: 1-12. <https://doi.org/10.3390/biom9100569>
- Zou T-B, He T-P, Li H-B, Tang H-W, Xia E-Q. 2016. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules* 21: 1-14. <https://doi.org/10.3390/molecules21010072>