

Efek Inokulasi Bakteri *Micrococcus luteus* Terhadap Pertumbuhan Jamur Benang dan Kandungan Isoflavon pada Proses Pengolahan Tempe

(*Effect Inoculation of Micrococcus luteus to Growth of Mold and Content Isoflavone at Tempe Processing*)

SITI HARNINA BINTARI, ANISA DYAH P., VERONIKA EKA J., RIVANA CITRA R.

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang
Gedung D6 Lt 1 Jl. Raya Sekaran Gunungpati Semarang 50229 Telp. (024) 8508033

ABSTRACT

Tempe content of aglikon isoflavone which have potency to as anticancer compound. During processing of tempe, beside tempe mold (Rhizopus oligosporus) share other microbial namely bacterium. One of the bacterium residing at tempe ecosystem is Micrococcus luteus, having the character of gram positive and can conduct genistein biotransformation and daidzein become factor II compound (6,7,4-tri hidroksi isoflavone). Its problems how amount of R. oligosporus cell and M. luteus at processing of tempe associated is full scale of yielded tempe isoflavone. The study aimed to improve full scalely tempe aglikon isoflavone through inoculation of M. luteus bacteria. Used complete random design, with M. luteus bacteria, as independent variable and variable depended is the amount of mold cell (R. oligosporus), amount of full scale M. luteus cell and total of isoflavone. Result of one way Anava indicate that inoculation of M. luteus bacteria do not degrade the amount of R. oligosporus cell with F call (53,28) > F tab (3,10) at signficancy level 5%. Amount of M. luteus cell from $1,3 \times 10^9$ cell / gr [at] fermentation first becomes $3,4 \times 10^6$ cell/gr and decrease after day fermentation second becoming $1,75 \times 10^6$ cell/gr. Proportion of increasing isoflavone content at day fermentation 1-2 from 19,1 becoming 52,7 mg/100gr. Inoculation of M. luteus bacteria increased to count isoflavone aglicone and no trouble at growth of tempe mold and it relate to the increasing of is full scale of yielded tempe isoflavone.

Keywords : *M. luteus, isoflavone, processing of tempe.*

PENDAHULUAN

Tempe merupakan salah satu jenis makanan yang sangat dikenal oleh masyarakat Indonesia dan mudah diperoleh di berbagai tempat. Tempe bergizi tinggi, dibuat dari bahan dasar kedelai. Selama pengolahan kedelai menjadi tempe terjadi perubahan kimia pada protein, karbohidrat dan lemak oleh aktivitas jamur benang *Rhizopus oligosporus*. Hal itulah yang menyebabkan nilai tempe sebagai sumber protein nabati lebih tinggi daripada kedelai yang belum diolah menjadi tempe, karena jumlah protein terlarut meningkat menjadi tiga atau empat kali lipat (Karyadi & Hermans 1995, Pawiroharsono 2001). Asam amino esensial yang terdapat di dalam tempe, yaitu isoleusin, leusin, lisin, fenilalanin, metionin, treonin, triptofan dan valin, semuanya dibutuhkan oleh tubuh manusia.

Bentuk olahan hasil fermentasi tersebut selain sebagai sumber protein juga merupakan sumber isoflavon potensial yang bermanfaat untuk menghambat proliferasi sel kanker payudara (Bintari 2007). Kandungan isoflavon pada kedelai berkisar 26-49 mg/100g bahan (Bintari 2004). Isoflavon dalam kedelai berbentuk senyawa konjugat dengan gula melalui ikatan -O-glikosidik. Selama proses fermentasi, ikatan -O-glikosidik terhidrolisis sehingga akan dibebaskan senyawa gula dan isoflavon aglikon bebas. Senyawa isoflavon ini dapat mengalami transformasi lebih lanjut membentuk senyawa transforman baru yang disebut sebagai faktor-II (6,7,4-trihidroksi isoflavon) yang mempunyai aktivitas biologi lebih tinggi. Faktor-II tidak terdapat pada kedelai tapi hanya terdapat pada tempe. Senyawa ini terbentuk selama proses fermentasi kedelai menjadi tempe oleh aktivitas mikroorganisme. Menurut penelitian Barz *et al.*

(1993), biosintesis faktor-II dihasilkan melalui demetilasi glistein oleh bakteri *Brevibacterium epidermis* dan *Micrococcus luteus* atau melalui reaksi hidroksilasi daidzein.

M. luteus termasuk kelompok bakteri yang berbentuk bulat. Sel-selnya tidak motil dan tidak membentuk spora. Susunan selnya adalah tetrad atau diplokokus, dan koloninya berbentuk konvek dengan tepi rata. Warna koloni kuning, kuning kehijauan atau jingga. Bakteri mampu mengoksidasi karbohidrat menjadi CO₂ dan air. Habitat utamanya adalah kulit mammalia, namun juga dapat ditemukan pada daging, produk susu, tanah, udara dan air (Sims *et al.* 1986, Zhuang *et al.* 2003). *M. luteus* merupakan salah satu mikrobia kontaminan selama fermentasi tempe dan berpotensi membentuk antioksidan faktor-II. *M. luteus* tumbuh secara optimal pada suhu 25-37°C dalam kondisi aerob, bersifat khemoorganotrof dan termasuk famili *Micrococcaceae* (Anonim 2002) Di dalam ekosistem tempe *Rhizopus sp.* dapat hidup berdampingan dengan mikrobia kontaminan (Pawiroharsono 1996).

Rhizopus sp. merupakan jamur benang atau kapang yang mampu memfermentasi kedelai menjadi tempe. Kapang ini terdiri dari berbagai spesies antara lain *R. oligosporus*, *R. stolonifer*, dan *R. oryzae*. Tempe dapat dibuat dengan bahan baku kedelai atau menggunakan biji turi, biji kecipir, biji kara benguk, biji lamtoro, ampas tahu, ampas kacang tanah, dan ampas kelapa. Kapang tempe bersifat mikroaerofil, apabila proses fermentasi kekurangan oksigen maka pertumbuhan *Rhizopus sp.* akan terhambat dan proses fermentasi tidak berjalan lancar. Oksigen yang terlalu banyak menyebabkan metabolisme terlalu cepat sehingga suhu naik dan pertumbuhan *Rhizopus sp.* terhambat. *Rhizopus sp.* dapat tumbuh dengan baik dan cepat pada kisaran suhu 37-49°C. Apabila suhu naik maka kecepatan metabolisme juga naik dan pertumbuhan *Rhizopus sp.* dipercepat. Sebaliknya apabila suhu turun maka kecepatan metabolisme akan turun pula dan pertumbuhan *Rhizopus sp.* diperlambat. *Rhizopus sp.* dapat tumbuh dengan baik pada pH 4,3-4,5. Apabila pH lebih rendah atau lebih tinggi dari kisaran tersebut maka akan merusak aktivitas *Rhizopus sp.* dan tidak akan tumbuh baik (Kusharyanto & Agus 1995). Menurut Kasmidjo (1990) fermentasi tempe dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu oksigen, suhu, pH, waktu fermentasi, dan inokulum.

Fermentasi pada pembuatan tempe membutuhkan waktu 24-48 jam. Proses

fermentasi yang terlalu lama menyebabkan terjadinya degradasi protein lanjut sehingga terbentuk amonia dan peningkatan pH. Kenaikan pH menyebabkan terjadinya kenaikan jumlah bakteri, dan pertumbuhan *Rhizopus sp.* menurun atau terhenti. Inokulum tempe adalah bahan yang mengandung biakan kapang tempe yang digunakan sebagai agensia pengubah kedelai rebus menjadi tempe. Ragi tempe RAPRIMA yang diproduksi LIPI Bandung mengandung isolat *R. oligosporus* yang telah terseleksi (Kasmidjo 1990).

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui (1) jumlah sel jamur benang (*R. oligosporus*) selama fermentasi tempe akibat penambahan bakteri *M. luteus*, (2) jumlah sel bakteri *M. luteus* selama fermentasi kedelai menjadi tempe, dan (3) jumlah total isoflavon tempe akibat pemberian bakteri *M. luteus*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA UNNES dan Laboratorium Farmasi Jurusan Biologi Fakultas Farmasi UGM Yogyakarta. Penelitian dilakukan pada bulan Maret 2005 sampai Februari 2006. Bahan utama yang dibutuhkan adalah biakan *M. luteus*, kedelai kuning lokal, ragi RAPRIMA, Nutrien Agar, Nutrien Broth, Blood Agar Plate, dan akuades. Alat yang digunakan terdiri atas kompor, autoklaf, inkubator, *colony counter*, erlenmeyer, mortir, cawan petri, tabung reaksi, dan mikropipet.

Bahan yang diteliti adalah tempe yang dibuat dengan penambahan inokulum *M. luteus*, dengan sampel seberat 1 kg, dan tempe yang dibuat tanpa tambahan *M.luteus* sebagai kontrol. Variabel bebas adalah perlakuan pemberian bakteri *M. luteus*, dengan variabel tergantung jumlah sel kapang (jamur benang) tempe, jumlah sel *M. luteus* dan jumlah total isoflavon pada produk tempe yang dihasilkan. Variabel kendali adalah suhu dan kelembaban ruang inkubasi.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), satu perlakuan dengan 4 taraf lama fermentasi yaitu 0, 1, 2, dan 3 hari. Masing-masing taraf dilakukan dengan enam kali pengulangan. Data jumlah sel bakteri *M. luteus* dan jumlah total isoflavon tempe dianalisis secara deskriptif kualitatif, yakni dengan cara membandingkan rata-rata jumlah sel *M. luteus* per hari fermentasi tempe.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Viabilitas dan Jumlah Sel *R. oligosporus*

Tempe dibuat dengan bahan dasar kedelai kuning dan inokulum RAPRIMA-LIPI yang diproduksi oleh Puslitbang Kimia Terapan - LIPI Bandung. Menurut Rahman (1992), *R. oligosporus* mempunyai kemampuan dalam menghasilkan berbagai macam enzim selama fermentasi tempe. Enzim yang dihasilkan antara lain lipase, amilase, fitase dan enzim-enzim proteolitik. Sebelumnya telah dilakukan pembuatan tempe dan perhitungan jumlah sel *R.*

oligosporus selama fermentasi tempe tanpa diinokulasi dengan *M. luteus*. Data ini selanjutnya digunakan sebagai pembandingan saat penelitian utama terhadap tempe yang dibuat dengan inokulasi *M. luteus* (Tabel 1). Hasil perhitungan sel kapang *R. oligosporus* pada tempe yang dibuat dengan tambahan bakteri *M. luteus* disajikan pada Tabel 2. Dari Tabel 1 dan 2, diketahui bahwa selama fermentasi terjadi kenaikan jumlah sel *R. oligosporus*. Rata-rata jumlah sel *R. oligosporus* pada tempe tanpa *M. luteus* maupun dengan *M. luteus* terlihat pada Gambar 1.

Tabel 1 Jumlah sel *R. oligosporus* pada tempe tanpa bakteri *M. luteus*

Ulangan (r)	Jumlah sel <i>R. oligosporus</i> selama fermentasi			
	0	1	2	3
1	6,8 x 10 ²	2,3 x 10 ³	2,8 x 10 ⁴	3,8 x 10 ⁴
2	9,8 x 10 ²	3,0 x 10 ³	2,5 x 10 ⁴	5,9 x 10 ⁴
3	1,0 x 10 ³	2,5 x 10 ³	3,0 x 10 ⁴	4,5 x 10 ⁴
4	2,2 x 10 ³	2,6 x 10 ³	3,2 x 10 ⁴	3,3 x 10 ⁴
5	1,1 x 10 ³	1,9 x 10 ³	2,9 x 10 ⁴	5,2 x 10 ⁴
6	1,5 x 10 ³	4,5 x 10 ³	4,7 x 10 ⁴	3,9 x 10 ⁴
Jumlah	7,46 x 10 ³	1,68 x 10 ⁴	1,91 x 10 ⁵	2,66 x 10 ⁵
Rata-rata	12,4 x 10 ²	28,0 x 10 ²	318 x 10 ²	443 x 10 ²

Tabel 2. Jumlah sel *R. oligosporus* pada tempe yang diinokulasi dengan *M. luteus*

Ulangan (r)	Jumlah sel <i>R. oligosporus</i> selama fermentasi			
	0	1	2	3
1	8,0 x 10 ²	4,7 x 10 ³	2,7 x 10 ⁴	3,5 x 10 ⁴
2	7,0 x 10 ²	2,9 x 10 ³	3,1 x 10 ⁴	3,7 x 10 ⁴
3	6,5 x 10 ²	3,0 x 10 ³	3,1 x 10 ⁴	4,2 x 10 ⁴
4	2,1 x 10 ³	2,4 x 10 ³	4,6 x 10 ⁴	5,9 x 10 ⁴
5	3,0 x 10 ²	1,8 x 10 ³	2,9 x 10 ⁴	5,0 x 10 ⁴
6	1,4 x 10 ³	2,6 x 10 ³	2,0 x 10 ⁴	3,0 x 10 ⁴
Jumlah	5,95 x 10 ³	1,74 x 10 ⁴	1,84 x 10 ⁵	2,53 x 10 ⁵
Rata-rata	9,92 x 10 ²	29,0 x 10 ²	306 x 10 ²	421 x 10 ²

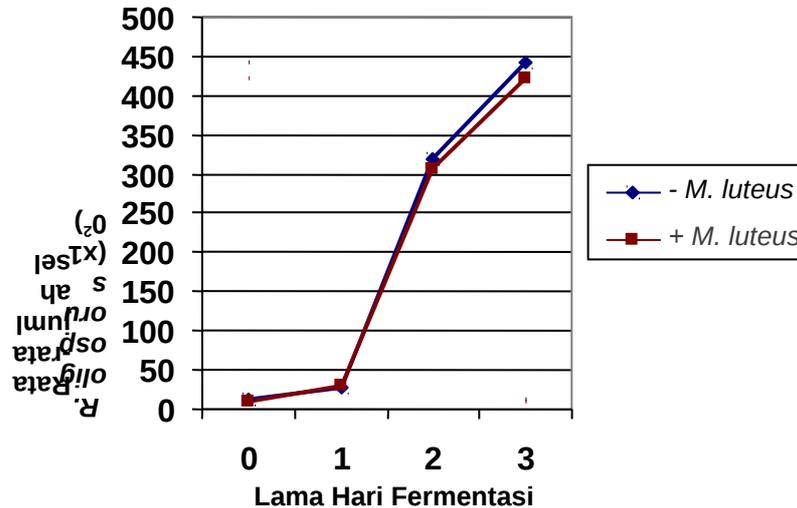
Hasil Anava satu arah menunjukkan bahwa $F_{hitung} 53,28 > F_{tabel} 3,10$ pada taraf signifikansi 5%, yang berarti lama fermentasi mempengaruhi jumlah sel *R. oligosporus*, termasuk pada tempe yang diberi tambahan bakteri *M.luteus*. Dibandingkan dengan rata-rata jumlah sel pada tempe tanpa *M. luteus* yaitu $12,4 \times 10^2$ sel/gr tempe, maka jumlah sel *R. oligosporus* pada tempe yang ditambah dengan bakteri *M. luteus* lebih sedikit. Di sini nampak bahwa *M. luteus* yang ditambahkan sesaat sebelum inokulasi dengan ragi tempe berpengaruh secara nyata bila dibandingkan dengan pertumbuhan jamur tempe (*R.oligosporus*). Hal ini berkaitan dengan

persyaratan hidup dan lingkungan abiotik yang diperlukan untuk tumbuh ke-2 mikroorganisme tersebut.

Perbedaan jumlah sel kapang antara tempe yang dibuat dengan dan tanpa *M. luteus* diduga karena adanya *M. luteus* sebanyak $1,3 \times 10^9$ sel/ml yang menghuni sebagian substrat kedelai, sedangkan pada tempe tanpa penambahan *M. luteus* hal tersebut tidak terjadi. Banyaknya sel bakteri ini diduga menyebabkan perubahan faktor lingkungan di awal fermentasi. Hal ini dapat mempengaruhi pertumbuhan spora *R. oligosporus*, sehingga di awal fermentasi jumlah selnya sedikit menurun dibanding tempe tanpa

penambahan *M. luteus*. Pembuatan tempe dengan tambahan *M. luteus* sebagai inokulum tambahan, dilakukan sesaat sebelum pemberian ragi tempe diinokulasikan. Hal ini mengacu dari pendapat Kasmidjo (1995) bahwa dalam inokulum tempe dapat ditambahkan isolat bakteri sebagai

campuran dengan tujuan tertentu. Penambahan *M. luteus* dalam pembuatan tempe ini bertujuan untuk memperbaiki kualitas tempe, yaitu diharapkan dapat membentuk senyawa isoflavon faktor-II (6, 7, 4-trihidroksi isoflavon).



Gambar 1 Grafik rata-rata jumlah sel *R. oligosporus* selama fermentasi

Berdasarkan Gambar 1, pertumbuhan kapang pada fermentasi hari ke-2 sampai hari ke-3 mengalami peningkatan, tetapi peningkatan yang terjadi pada tempe tanpa *M. luteus* sedikit lebih tinggi daripada tempe yang diberi *M. luteus*. Perbedaan tinggi garis pertumbuhan kapang ini diduga karena adanya *M. luteus*. Menurut Pawiroharsono (1996) dalam ekosistem tempe *R. oligosporus* sebagai mikrobia utama dapat hidup berdampingan dengan mikrobia kontaminan dalam bentuk asosiasi netralisme. Berdasarkan hal tersebut adanya *M. luteus* pada substrat kedelai tidak mempengaruhi kapang dalam mendapatkan suplai zat makanan. Keberadaan *M. luteus* pada tempe diduga hanya sedikit mempengaruhi perubahan faktor pendukung untuk pertumbuhan kapang, sehingga pertumbuhan kapang pada tempe dengan tambahan *M. luteus* sedikit

mengalami penurunan. Hal ini sesuai dengan hasil uji BNT yang menunjukkan bahwa jumlah sel kapang *R. oligosporus* pada fermentasi hari ke-0 sampai ke-1 lebih sedikit dari pada jumlah sel kapang pada hari fermentasi ke-2 dan ke-3 (Tabel 4).

Perubahan faktor pendukung untuk pertumbuhan *R. oligosporus* pada tempe dengan tambahan *M. luteus* menyebabkan viabilitasnya juga mengalami perubahan. Meskipun pertumbuhan sel *R. oligosporus* sedikit mengalami penurunan tetapi masih dalam kapasitas yang wajar, artinya tidak jauh berbeda dengan pertumbuhan *R. oligosporus* pada tempe tanpa penambahan *M. luteus*. *M. luteus* membutuhkan zat makanan dan beberapa vitamin untuk pertumbuhannya.

Tabel 3. Ringkasan hasil analisis varian satu arah

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F _{hitung}	F _{tabel 5%}
Perlakuan	3	75,37 x 10 ⁸	25,12 x 10 ⁸	53,28*	3,10
Galat	20	94,30 x 10 ⁷	47,15 x 10 ⁶		
Total	23	84,80 x 10 ⁸			

Ket : * sangat signifikan

Unsur-unsur esensial yang dibutuhkan untuk pertumbuhan adalah karbon (C), oksigen (O), hidrogen (H), nitrogen (N), fosfor (F), dan sulfur (S). Unsur-unsur tersebut dapat diperoleh dalam bentuk senyawa protein, lemak, dan karbohidrat (Buckle *et al.* 1985). Selama fermentasi tempe berlangsung, unsur-unsur tersebut di atas dapat diperoleh dari kedelai. Perubahan jumlah sel *M. luteus* per hari fermentasi menunjukkan terjadinya perubahan viabilitas *M. luteus* selama fermentasi tempe yang ditambah bakteri *M. luteus*.

Tabel 4. Ringkasan hasil uji Beda Nyata Terkecil (BNT)

Perlakuan	Nilai rata-rata data	BNT
		5%
A	9,92 x 10 ² a	82,70 x 10 ²
B	29,00 x 10 ² a	
C	306,66 x 10 ² b	
D	421,66 x 10 ² c	

Ket : - angka yang diikuti huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata,
 - sedangkan angka yang diikuti huruf yang tidak sama berarti berbeda nyata.

Viabilitas *M. luteus* dan jumlah total isoflavon tempe

Selama fermentasi tempe, *M. luteus* menyerap unsur-unsur C, H, O, N dari kedelai setelah terjadi pemecahan senyawa karbohidrat, lemak, dan protein oleh *Rhizopus sp.*, sehingga terjadi asosiasi komensalisme antara *Rhizopus sp.* dan *M. luteus*. Pemecahan karbohidrat dari

kedelai diduga pada awalnya dilakukan oleh *Rhizopus sp.* Setelah karbohidrat tersebut terpecah menjadi bentuk senyawa sederhana, selanjutnya dipecah oleh *M. luteus* sendiri dengan aktivitas enzim oksidasenya dan diserap untuk pertumbuhannya.

Hasil penelitian sebelumnya diketahui bahwa selama fermentasi tempe *Rhizopus sp* menghasilkan zat antibakteri yang berupa glikoprotein (Pawiroharsono 1996, 1997). Senyawa glikoprotein tersebut aktif menghambat pertumbuhan bakteri gram positif. *M. luteus* merupakan bakteri gram positif dan ditemukan sebagai salah satu kontaminan pada tempe. Diduga *M. luteus* juga dihambat pertumbuhannya oleh senyawa antibakteri tersebut.

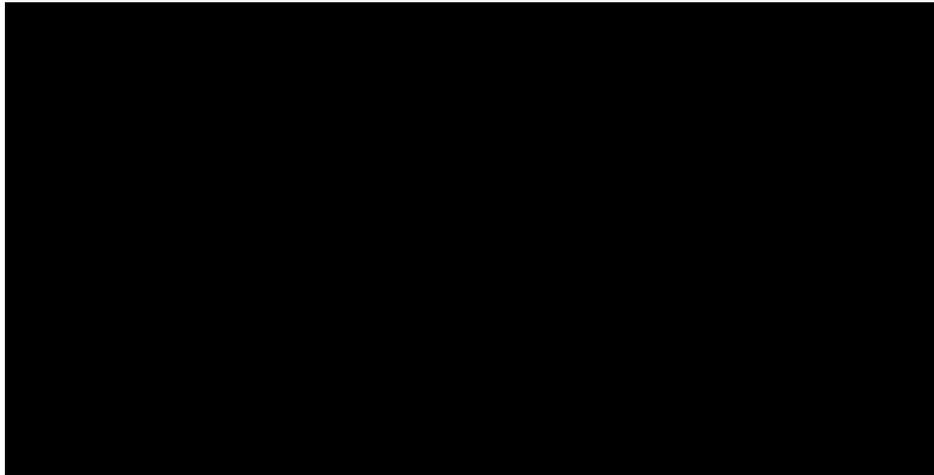
Pada perlakuan fermentasi hari ke-0 jumlah *M. luteus* sebanyak 3,4 x 10⁶ sel/g tempe. Angka ini menurun pada perlakuan fermentasi hari ke-1, yaitu sebanyak 1,75 x 10⁶ sel/g (Tabel 5). Kemungkinan pada fermentasi hari ke-0 belum dihasilkan senyawa antibakteri. Sedangkan pada fermentasi hari ke-1 aktivitas pertumbuhan kapang *Rhizopus sp* belum tinggi, sehingga antibakteri yang dihasilkan masih sedikit.

Zat-zat gizi dalam ekstrak tempe dapat digunakan oleh bakteri untuk pertumbuhannya. Dengan demikian pada fermentasi hari ke-1 tidak semua *M. luteus* mengalami kematian. Hal ini diduga disebabkan oleh kadar antibakteri dalam tempe yang masih rendah. Aktivitas antibakteri tersebut optimum pada tempe dengan masa inkubasi 36 sampai 42 jam (Pawiroharsono 1996). Penurunan jumlah *M. luteus* pada fermentasi tempe hari ke-2 (48 jam) diduga disebabkan oleh adanya aktivitas optimum dari antibakteri yang dihasilkan oleh *Rhizopus sp.* (Gambar 2).

Tabel 5 Jumlah *M. luteus* selama fermentasi tempe dengan tambahan bakteri *M. luteus*

Ulangan	Jumlah <i>M. luteus</i> tiap perlakuan (hari fermentasi)			
	A (0)	B (1)	C (2)	D (3)
1	4,4 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁶	0	0
2	2,7 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶	0	0
3	3,4 x 10 ⁶	3,1 x 10 ⁶	0	0
4	2,9 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁶	0	0
5	4,2 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶	0	0
6	2,9 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁶	0	0
Jumlah	20,5 x 10 ⁶	10,5 x 10 ⁶	0	0

Rata-rata	3,4 x 10 ⁶	1,75 x 10 ⁶	0	0
-----------	-----------------------	------------------------	---	---



Gambar 2 Grafik pertumbuhan *M. luteus* selama fermentasi

Perubahan dan penurunan viabilitas *M. luteus* selama fermentasi tempe diduga akibat kurang sinergisnya hubungan antara pertumbuhan *M. luteus* dengan kapang *Rhizopus sp.* (terutama *R. oligosporus*) selama fermentasi tempe, karena adanya perbedaan syarat hidup yang bersifat *limiting factor* di antara keduanya. Jadi *M. luteus* dihambat pertumbuhannya oleh kapang *R. oligosporus*, penghambatan ini merupakan kontrol bagi pertumbuhan *M. luteus* maupun bakteri lain selama fermentasi tempe. Ini menunjukkan bahwa seiring berjalannya fermentasi asosiasi antara *Rhizopus sp.* dan *M. luteus* berubah menjadi antagonisme.

Selama proses pembuatan tempe, kedelai mengalami berbagai perubahan oleh adanya aktivitas mikrobia. Keterlibatan mikrobia pada proses pembuatan tempe terutama terjadi pada proses perendaman oleh bakteri-bakteri pembentuk asam dan proses fermentasi oleh kapang khususnya *Rhizopus sp.* Menurut Kasmidjo (1990), keterlibatan bakteri dalam proses fermentasi tempe tidak dapat dihindarkan, namun keikutsertaan bakteri tidak selalu merugikan proses pembuatan tempe. Menurut Supardi dan Sukanto (1999), jumlah dan jenis populasi mikrobia yang terdapat pada setiap makanan sangat beragam. Suparmo (1989) mengatakan bahwa beberapa sistem fermentasi campuran banyak didominasi oleh bakteri. Dalam fermentasi tempe bisa dilakukan fermentasi campuran yang bisa memberikan manfaat lainnya, seperti sintesis vitamin atau antioksidan (Suparmo 1989, Pawiroharsono 1994). Lebih lanjut apabila tempe yang akan diproduksi lebih diutamakan nilai gizinya, maka *R. oligosporus* memegang

peranan penting, sebab selama fermentasi berlangsung *R. oligosporus* mensintesis lebih banyak enzim protease yang akan memecah protein kedelai sehingga lebih mudah dicerna tubuh.

Pada tempe, *Rhizopus sp* dapat hidup berdampingan dengan mikrobia kontaminan. *M. luteus* merupakan salah satu mikrobia kontaminan selama fermentasi tempe, dan berpotensi membentuk antioksidan faktor-II. Menurut Siregar dan Pawiroharsono (1998), *M. luteus* mampu membentuk senyawa faktor-II selama fermentasi tempe yang diinokulasi dengan kultur campuran *M. luteus* dan *Rhizopus sp.* Menurut Pawiroharsono (1998) pula, dalam ekosistem tempe *R. oligosporus* sebagai mikrobia utama dapat hidup berdampingan dengan mikroba kontaminan dalam bentuk asosiasi netralisme. Berdasarkan hal tersebut adanya *M. luteus* pada substrat kedelai tidak mempengaruhi kapang dalam mendapatkan suplai zat makanan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar isoflavon pada tempe yang dibuat dengan ragi tempe saja maupun dengan campuran ragi tempe dan *M. luteus* mengalami kenaikan pada fermentasi sampai hari ke-2. Pada hari ke-3 kadar isoflavon mengalami kenaikan yang relatif kecil untuk tempe yang dibuat hanya dengan ragi tempe, sedangkan pada tempe yang dibuat dengan ragi tempe dan *M. luteus* mengalami penurunan. Pada awal fermentasi, *M. luteus* dapat hidup berdampingan dengan *R. oligosporus* dimana *M. luteus* memperoleh nutrisi dari hasil pemecahan senyawa organik kompleks oleh *Rhizopus sp.* Asosiasi seperti itu dinamakan komensalisme. Komensalisme adalah hubungan antara dua

organisme dalam hal ini mikrobial, mikrobial yang satu mendapat keuntungan, sedangkan mikrobial yang lain tidak dirugikan. Terjadinya penurunan jumlah *M. luteus* setelah hari ke-2 diasumsikan bahwa pada saat proses fermentasi, sesudah melakukan sintesis senyawa isoflavon, *M. luteus* kemudian mati. Kematian *M. luteus* menunjukkan adanya asosiasi yang tidak sinergis atau antagonisme antara *Rhizopus sp.* dan *M. luteus*, setelah fermentasi berlangsung 48 jam.

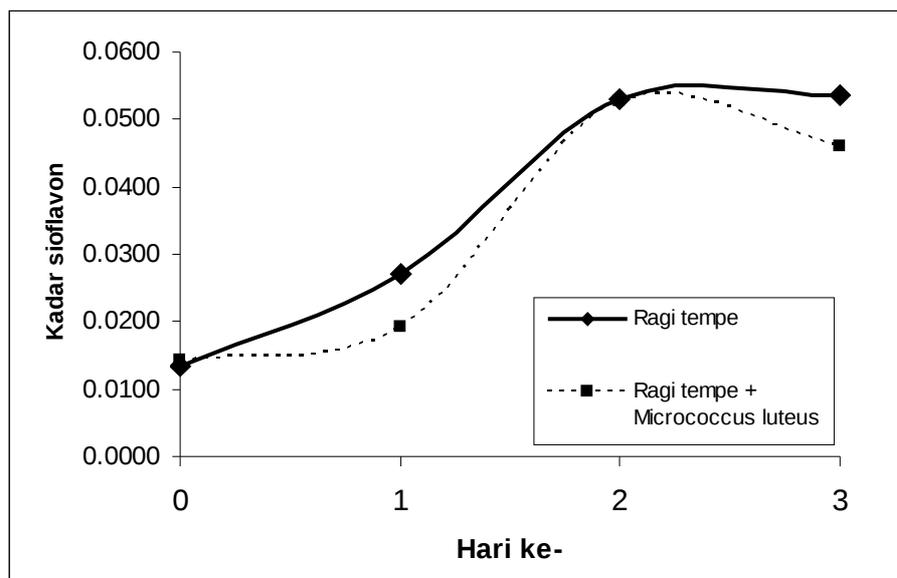
Di awal fermentasi, faktor-faktor pendukung lebih diutamakan untuk pertumbuhan kapang, salah satunya ketersediaan oksigen. Berkaitan dengan sifat kapang yang merupakan mikroba mikroaerofil, maka suplai oksigen selama fermentasi dibatasi (Sukara 2004). Suplai oksigen yang terbatas selama fermentasi tempe diduga digunakan oleh *M. luteus* di samping oleh *R. oligosporus* sebagai mikroba utama. *M. luteus* ini membutuhkan oksigen untuk pertumbuhan karena bakteri ini bersifat aerob.

Jamur *R. oligosporus* dan *M. luteus*, keduanya sama-sama mempunyai aktivitas proteolitik, sehingga kedua mikroorganisme tersebut jika diinokulasikan pada proses pembuatan tempe akan memberikan kontribusi yang positif pada peningkatan kadar protein tempe. Menurut Beatriz (1996), bakteri *M. luteus* juga mempunyai aktivitas proteolitik. Dengan adanya aktivitas proteolitik pada kedua organisme tersebut maka proses degradasi protein menjadi asam amino akan meningkat, sehingga nitrogen terlarut pun meningkat. Seiring berjalannya

fermentasi, zat-zat yang ada dalam kedelai akan didegradasi oleh mikrobial melalui aktivitas enzim dalam kapang. Degradasi senyawa organik juga dilakukan akibat aktivitas mikrobial lain yang tumbuh pada tempe termasuk *M. luteus* yang sengaja ditambahkan.

Bakteri *M. luteus* termasuk bakteri mesofilik, karena mempunyai suhu optimum pertumbuhan 25°C–30°C. Bakteri *M. luteus* masih dapat tumbuh pada suhu 10°C, tetapi tidak tumbuh pada suhu 46°C. Jamur tempe dapat tumbuh baik pada kisaran suhu 25°C sampai 30°C atau pada suhu kamar. Jika suhu yang digunakan lebih rendah dari suhu maksimum, maka pertumbuhannya akan terhambat.

Selain mempunyai aktivitas proteolitik, bakteri ini juga mempunyai kesamaan sifat dengan jamur *R. oligosporus* dalam hal kehidupan abiotiknya (suhu, pH, dan kebutuhan oksigen) sehingga *M. luteus* dan *R. oligosporus* dapat bekerja sama dalam hal fermentasi tempe, terutama peningkatan protein tempe. Pada hari fermentasi ke-2, kandungan isoflavon tanpa bakteri *M. luteus* menunjukkan proporsi peningkatan sebesar 95,9%, lebih kecil daripada proporsi peningkatan kandungan isoflavon pada produk tempe dengan ditambah bakteri *M. luteus* yaitu 175,9%. Hal ini menunjukkan bahwa peran *M. luteus* yang diinokulasikan pada proses pembuatan tempe dapat meningkatkan kandungan isoflavon sampai fermentasi 48 jam, selebihnya kandungan isoflavon menurun pada awal fermentasi hari ke-3 setelah 48 jam (Gambar 3).



Gambar 3 Hubungan antara lama fermentasi dan kadar isoflavon dari masing-masing jenis perlakuan

Semakin lama fermentasi, jumlah *M. luteus* yang hidup semakin berkurang. Rata-rata

jumlah *M. luteus* pada perlakuan fermentasi hari ke-0 sebanyak $3,4 \times 10^6$ sel/g, kemudian

berkurang menjadi $1,75 \times 10^6$ sel/g pada perlakuan fermentasi ke-1. Pada fermentasi hari ke-2 dan ke-3 sudah tidak ditemui *M. luteus*, (Tabel 5). Ketidakhadiran bakteri *M. luteus* pada hari ke-3 fermentasi diasumsikan karena adanya perubahan suhu. Suhu pada tempe kedelai semakin hari semakin naik, dan apabila suhu tempe melebihi 30°C , maka pertumbuhan jamur maupun bakteri akan terhambat. Hal ini menyebabkan kadar isoflavon mengalami penurunan.

Perubahan jumlah sel *M. luteus* per hari fermentasi menunjukkan terjadinya perubahan viabilitas *M. luteus* selama fermentasi tempe dengan bakteri *M. luteus*. Menurut Pawiroharsono (1998), hasil pengujian berbagai isolat kapang *Rhizopus sp*, menunjukkan bahwa *R. oligosporus* mempunyai aktivitas antibakteri yang paling tinggi. Aktivitas antibakteri tersebut optimal untuk tempe dengan masa inkubasi 36-42 jam. Berdasarkan hal tersebut maka dapat diduga bahwa penurunan jumlah sel *M. luteus* pada fermentasi hari ke-3 disebabkan karena aktivitas optimum antibakteri yang dihasilkan *R. oligosporus*. Di samping oksigen, faktor pendukung lainnya untuk pertumbuhan mikrobia yaitu air. Air dalam lingkungan fermentasi tempe diperoleh dari biji kedelai yang telah mengalami perendaman yang memberi kesempatan untuk menyerap air lebih banyak sehingga biji menjadi lebih lunak (Kasmidjo 1999). Kondisi demikian akan memudahkan kapang melakukan penetrasi hifa sehingga zat-zat yang ada dalam kedelai terhidrolisis. Pada saat fermentasi, *M. luteus* dan *R. oligosporus* menggunakan air dari biji kedelai bersama-sama di awal fermentasi. Setelah 24 jam, kadar air dalam kedelai mengalami penurunan menjadi 61% dari kondisi semula (Sudarmaji & Markasis dalam Suliantari & Rahayu 1990). Hal ini mempengaruhi kondisi fermentasi untuk hari berikutnya, sehingga diduga keterbatasan air ini pula yang menyebabkan jumlah isoflavon setelah hari kedua mengalami penurunan karena *M. luteus* mengalami penurunan jumlahnya.

PENUTUP

Berdasar hasil penelitian disimpulkan bahwa jumlah sel jamur benang (*R. oligosporus*) selama fermentasi tempe yang ditambah bakteri *M. luteus* lebih sedikit dibandingkan pada tempe yang dalam proses pembuatannya tidak ditambah *M. luteus*. Jumlah sel bakteri *M. luteus* selama fermentasi kedelai menjadi tempe cenderung menurun sejalan dengan waktu fermentasi. Kandungan isoflavon tempe pada fermentasi hari

ke-2 (48 jam) yang ditambahkan bakteri *M. luteus* 175,9 % lebih tinggi daripada tempe yang tanpa ditambahkan *M. luteus*. Tidak ada gangguan pada pertumbuhan jamur tempe dan penambahan bakteri *M. luteus* berhubungan dengan meningkatnya jumlah total isoflavon tempe yang dihasilkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada BPPS yang telah memberi dukungan dana dalam rangka pelaksanaan penelitian pendukung untuk mengkaji keberadaan isoflavon dalam tempe. Juga ucapan terima kasih kepada semua Tim Peneliti isoflavon tempe yang terdiri atas Sdri. Veronica, sdri. Anisa dan Sdri Rivana.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2004a. *Trichoderma* fungi promot growth, fight plant diseases. <http://www.albrightseed.com/trichoderma.htm>. [22 Oktober 2004].
- Barz W, Heskamp, Klus K, Rehms H, Steinkamp R. 1993. Recent aspect of protein, phytate and isoflavone. *metabolisme by microorganism isolated from tempe fermentation. Tempe Workshop, Jakarta.*
- Beatriz. 1996. *Detection of Extracellular Protease from Microorganism on Agar Plate*. Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz.
- Bintari SH. 2004. Potensi tempe sebagai anti kanker payudara. *Makalah Seminar Temu Ilmiah PAAI Semarang*, 4 September 2004.
- Bintari SH. 2007. Efek isoflavon tempe terhadap proliferasi dan apoptosis sel kanker payudara mencit (*Mus musculus*) galur C3H dengan parameter agnORs, p53, cas-3 dan bcl-2. *Disertasi*. Semarang: Program Pascasarjana Universitas Diponegoro.
- Karyadi D, Hermana H. 1995. *Potensi Tempe Untuk Gizi dan Kesehatan*. Bogor: Puslitbang Gizi.
- Kasmidjo RB. 1990. *Tempe: Mikrobiologi Dan Biokimia Pengolahan Serta Pemanfaatannya*. Yogyakarta: PAU Pangan dan Gizi UGM.
- _____.1995. Teknologi Pembuatan Tempe Sebagai Dasar Pengembangan Industri Tempe Modern. *Prosiding Simposium*

- Nasional Pengembangan Tempe Dalam Industri Tempe Modern*. Jakarta: Yayasan Tempe Indonesia.
- _____. 1999. *Mikrobiologi Pengolahan*. Yogyakarta: Fakultas Teknologi Pertanian UGM.
- Kusharyanto & Budiyanto A. 1995. Upaya Pengembangan Produk Tempe Dalam Industri Pangan. *Prosiding Simposium Nasional Pengembangan Tempe Dalam Industri Tempe Modern*. Jakarta: Yayasan Tempe Indonesia.
- Pawiroharsono S. 1994. Metabolisme isoflavon dan faktor-II, pada proses pembuatan tempe. *Prosiding Simposium Nasional Pengembangan Tempe dalam Industri Pangan Modern*. UGM. Yogyakarta.
- _____. 1998. Benarkah tempe sebagai anti kanker?. *Jurnal Kedokteran dan Farmasi Medika* No.12.
- _____.2001. *Prospek dan Manfaat Isoflavon untuk Kesehatan*. Yogyakarta. Direktorat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi.
- _____, 1997. Prospect of tempe as functional food, 1997. *Proceedings of International tempe Symposium*, July 13-15, 1997 Bali. Indonesia.
- Sims GK, Sommers LE, Konopka A. 1986. Degaradation of piridine by *M. luteus* isolated from soil. *Appl Environ Microbiol* 51 (5): 963 – 968.
- Sukara M. 2004. Antioxydate stability of tempech and liberation of isoflavones by fermentation. *Agric Bio Chem*.
- Suparmo. 1987. Tempe Prepared From Germinated Soybeans. *Journal of Food Science*.
- _____. 2002. *Taxonomy*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy> [3 Agustus 2004]
- Zhuang W, Tay J, Maszenan A, Krumholz L, Tay S. 2003. Importance of gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil – contaminated tropical marine sediments. *Lett Appl Microbiol* 36 (4) : 251 -7.