PENGEMBANGAN INOKULUM UNTUK MENINGKATKAN MUTU GIZI TEMPE

Oleh : Mien Kamini; Hermana; dan Erwin Affandi

ABSTRAK

Inokulum tempe yang lazim digunakan di Indonesia mengandung Rhizopus Sp. Penelitian terdahulu menemukan dua jenis bakteri penghasil vitamin B12, yaitu Citrobacter freundil dan Klebsiella pneumoniae, dan dua jenis bakteri penghasil Faktor-2, yaitu Corynebacterium Sp dan Micrococcus luteus dari air rendaman kedelai. Dalam penelitian ini dibuat inokulum tempe yang merupakan campuran kapang Rhizopus oligosporus dan masing-masing bakteri tersebut. Inokulum campuran Rhizopus oligosporus dan bakteri Klebsiella pneumoniae atau Citrobacter freundii mampu meningkatkan kadar vitamin B12 di dalam tempe lebih dari 100 %. Inokulum campuran Rhizopus oligosporus dan Corynebacterium Sp atau Micrococcus luteus tidak menunjukkan adanya kandungan antioksidan Faktor-2 di dalam tempe.

Pendahuluan

Penelitian-penelitian terdahulu mengungkapkan bahwa pada proses pembuatan tempe terjadi sintesis vitamin B12 dan antioksidan trihidroksi-isoflavon atau Faktor-2 (1,2). Kedua komponen tempe tersebut terbentuk oleh kapang Rhizopus Sp dan bakteri.

Pada penelitian Bioteknologi Indonesia - Jerman (BTIG) di Universitas Munster (3), ditemukan dua jenis bakteri yang mempunyai kemampuan mensintesis vitamin B12 yaitu Citrobacter freundii dan Klebsiella pneumoniae. Selain itu dapat diidentifikasi pula dua jenis bakteri yang berpotensi dalam pembentukan antioksidan Faktor-2 yaitu bakteri Corynebacterium Sp dan Micrococcus luteus.

Keempat bakteri tersebut tidak sengaja ditambahkan pada proses pembuatan tempe, namun terikutkan pada proses perendaman kedelai.

Tidak semua contoh tempe atau air perendam yang diambil dari berbagai daerah di Indonesia mengandung keempat bakteri tersebut.

Sebagian besar perajin tempe di Indonesia menggunakan inokulum tempe berupa bubuk kering sebagai pembawa spora kapang Rhizopus Sp, sebagian perajin lainnya menggunakan inokulum daun waru.

Dalam kedua jenis inokulum tersebut, yang diambil sebagai contoh pada penelitian BTIG tidak ditemukan keempat bakteri berpotensi tersebut di atas.

Apabila bakteri Citrobakter freundii atau Klebsiella pneumoniae ditambahkan pada proses pembuatan inokulum tempe, mungkin semua tempe yang diproduksi dapat mengandung vitamin B12 dalam jumlah optimum. Demikian pula apabila Corynebacterium Sp atau Micrococcus luteus ditambahkan dalam pembuatan inokulum, maka setiap tempe yang diproduksi dapat mengandung Faktor-2

Dapatkah bakteri Citrobacter freundii atau Kleisiella pneumoniae atau Corynebacterium Sp atau Micrococcus luteus dicampur bersama kapang Rhizopus Sp dalam media tepung yang kering, dan apabila dapat, masihkah bakteri-bakteri tersebut berpotensi menghasilkan komponen tersebut ?.

Pada penelitian ini dibuat inokulum tempe dalam bentuk tepung yang mengandung campuran kapang Rhizopus Sp dan masing-masing bakteri tersebut di atas. Kemudian inokulum diuji dalam pembuatan tempe.

Bahan dan Cara

Pada penelitian ini digunakan kapang Rhizopus oligosporus yang diisolasikan dari contoh tempe. Bakteri Citrobacter freundii Klebsiella pneumoniae, Corynebacterium Sp dan Micrococcus luteus diperoleh dari Universitas Munster. Bakteri diisolasikan dari contoh air perendam kedelai yang diperoleh dari beberapa perajin tempe di Indonesia.

Setiap mikroorganisme dibiakkan pada media baku yang spesifik untuk bakteri yang bersangkutan. Suspensi bakteri dan kapang dibuat setelah masing-masing mikroorganisme berumur 20 hari. Setiap mikroorganisme disuspensikan dalam larutan 0.9% NaCl. Sebelum digunakan untuk inokulasi, suspensi ditambah 'tween-80', dikocok dan dihitung jumlah koloni.

Tahap Penelitian

1. Pengujian pertumbuhan kapang Rhizopus oligosporus bersama setiap bakteri dalam media kedelai untuk menghasilkan tempe yang baik. Pada tahap ini ditentukan perbandingan optimum antara kapang dan bakteri. Pengujian ini dilakukan dengan cara menginokulasikan suspensi kapang dan suspensi bakteri pada kedelai yang telah disterilkan, diinkubasikan pada suhu 37^0 C, diamati masa inkubasi. Tempe yang dihasilkan diamati mutu fisik, kandungan kapang dan bakteri. Perbandingan antara kapang dan bakteri yang diuji ialah 4:0; 3:1; 1:1 dan 1:3.
2. Percobaan pembuatan inokulum campuran kapang dan bakteri dalam bentuk bubuk kering. Tahap ini bertujuan menentukan cara pembuatan inokulum yang tepat. Percobaan dilakukan dengan dua cara yaitu cara pertama masing-masing bakteri atau kapang ditumbuhkan pada media beras yang steril, diinkubasikan pada suhu 37^0 C, waktu inkubasi ditentukan sampai beras yang diinokulasi dengan kapang berwarna hitam. Setelah itu nasi dikeringkan pada suhu 50^0 C, dihaluskan dihitung jumlah bakteri dan kapang, dicampurkan dengan perbandingan yang dihasilkan pada penelitian tahap satu. Inokulum yang dihasilkan diuji dalam pembuatan tempe. Cara kedua, bakteri dan kapang dalam perbandingan berdasarkan penelitian tahap satu diinokulasikan ke dalam beras

yang telah disterilkan secara bersama-sama. Diinkubasikan pada suhu 37^0 C, dikeringkan pada suhu 40^0 C, dihaluskan, kemudian diuji dalam pembuatan tempe.

3. Penelitian pembuatan inokulum campuran kapang dan bakteri dengan cara pembuatan seperti yang biasa dilakukan oleh perajin tempe. Inokulum yang dihasilkan pada penelitian tahap dua, diinokulasikan pada nasi, diinkubasikan pada suhu ruang sampai nasi berwarna hitam, dikeringkan dan dihaluskan, ditambah tepung terigu yang telah dipanaskan dan diuji kemampuannya dalam pembuatan tempe.

Penyiapan Media Kedelai, Beras dan Nasi

Kedelai dicuci dengan disiram air panas, ditutup dan dibiarkan sampai air menjadi dingin, kulit kedelai dilepaskan dari kotiledon, sebagian kulit dibuang, kemudian kedelai direndam selama satu malam. Kedelai dicuci, semua kulit dibuang, disterilkan dalam 'auto-clave' selama 15 menit pada suhu 121^0 C, kemudian didinginkan, siap untuk diinokulasi.

Beras sebanyak 10 g ditumbuk, ditambah 10 ml akuades, ditempatkan dalam cawan petri, disterilkan selama 20 menit, kemudian didinginkan, siap untuk diinokulasi. Beras dimasak menjadi nasi dengan cara seperti biasa dilakukan di rumah tangga. Diusahakan nasi yang dihasilkan tidak lembek dan tidak terlalu keras, media nasi siap diinokulasi.

Penentuan Kandungan Vitamin B_{12} dan Faktor-2

Penentuan vitamin B_{12} dilakukan secara mikrobiologi menggunakan bakteri Lactobacillus leichmanii sebagai mikroorganisme penguji. Prinsip penentuan adalah, Lactobacillus leichmanii memerlukan vitamin B_{12} untuk pertumbuhannya. Bakteri ini ditumbuhkan pada medium spesifik tanpa vitamin B_{12}, ditambah ekstrak bahan yang diuji. Pertumbuhan bakteri berbanding lurus dengan kandungan vitamin B_{12} dalam ekstrak yang diuji. Pengukuran dilakukan secara spektrofotometri.

Analisis antioksidan pada tahap pertama dilakukan secara kualitatif yaitu dengan khromatografi lapis tipis. Digunakan standar antioksidan yang dicari. Bila pada khromatografi lapis tipis dapat dideteksi adanya titik dengan rf sama dengan standar, kemudian dilakukan analisis kuantittif dengan menggunakan "High Performance Liquid Chromatography" (HPLC).

Hasil dan Bahasan

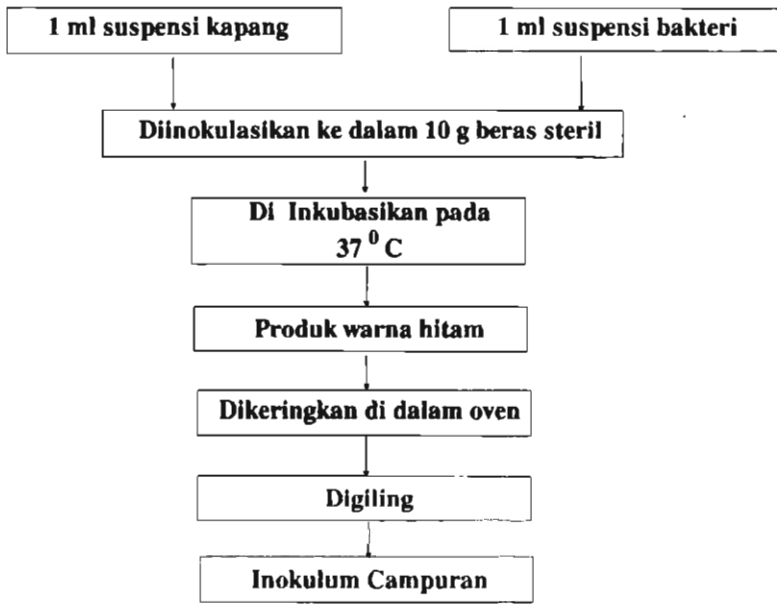
Penelitian tahap pertama menghasilkan rasio optimum kapang Rhizopus Oligosporus dan masing-masing bakteri yaitu 1 : 1. Pada penelitian tahap ini dihasilkan suspensi kapang dan suspensi bakteri seperti disajikan pada Tabel 1. Inokulasi media kedelai menggunakan 1,5 ml suspensi kapang; 1,5 ml suspensi kapang ditambah suspensi bakteri (0,5; 1,5; 4,5 ml). Hasil pengujian tempe yang diperoleh disajikan pada Tabel 2.

Tabel 1. Jumlah mikroorganisme dalam 1 ml suspensi

Jenis Mikroorganisme	Jumlah
Rhizopus oligosporus	9.28×10^6
Klebsiella pneumoniae	1.37×10^7
Citrobacter freundii	2.15×10^7
Micrococcus luteus	2.63×10^7
Corynebacterium sp.	9.89×10^6

Data pada Tabel 1 di atas menunjukkan, jumlah mikroorganisme pada setiap ml suspensi dapat dikatakan sama, sehingga rasio kapang terhadap bakteri ditentukan berdasarkan volume suspensi. Suspensi bakteri dan kapang yang dihasilkan cukup baik sehingga dapat digunakan sebagai inokulum cair untuk pembuatan tempe.

Berdasarkan mutu fisik tempe yang dihasilkan, pada penelitian selanjutnya digunakan campuran kapang dan bakteri dengan rasio 1:1. Penelitian tahap kedua menghasilkan cara pembuatan inokulum campuran berbentuk bubuk kering, seperti digambarkan pada alur kerja berikut. Cara pembuatan inokulum bubuk ini merupakan modifikasi cara yang dikembangkan Hermana (4).



Gambar 1. Cara pembuatan inokulum campuran kapang dan bakteri dalam bentuk bubuk kering

Tabel 2. Hasil pengujian tempe yang dibuat dengan inokulum campuran

Inokulum	Rasio Kapang: Bakteri	Waktu Inkubasi jam	Produk yang dihasilkan	
			Bakteri	Mutu Fisik
Rhizopus	1 : 0	30	-	Kompak warna putih, baik
R3 K1	3 : 1	30	+	Baik, kompak miselium merata
R1 K1	1 : 1	32	+	Baik, kompak miselium merata
R1 K3	1 : 3	32	+	Miselium tidak merata
R3 C1	3 : 1	29	+	Baik, kompak warna putih merata
R1 C1	1 : 1	29	+	Baik, kompak warna putih, merata
R1 C3	1 : 3	32	+	Kurang kompak ada bagian yang tidak ditumbuhi miselium
C1 R3	3 : 1	28	+	Baik, kompak
C1 R1	1 : 1	28	+	Baik, kompak
C3 R1	1 : 3	32	+	Tidak kompak Miselium tidak merata
M1 R3	3 : 1	28	+	Baik
M1 R1	1 : 1	28	+	Baik
M3 R1	1 : 3	32	+	Tidak kompak Miselium tidak merata

Keterangan :

RK : Campuran Rhizopus Oligosporus dengan Klebsiella pneumoniae
RC : Campuran Rhizopus Oligosporus dengan Citrobacter freundii
CR : Campuran Rhizopus Oligosporus dengan Corynebacterium sp.
MR : Campuran Rhizopus Oligosporus dengan Micrococcus luteus

Dengan cara yang sama, pada penelitian ini dihasilkan empat jenis inokulum campuran dan satu jenis inokulum baku dalam bentuk bubuk, yang terakhir adalah inokulum yang hanya mengandung kapang Rhizopus oligosporus (inokulum A). Inokulum yang mengandung kapang Rhizopus oligosporus dan bakteri Klebsiella pneumoniae diberi label inokulum B. Kemudian berturut-turut inokulum dengan label C, D, dan E adalah inokulum campuran Rhizopus oligosporus dengan Citrobacter freundii, Rhizopus oligosporus dengan Micrococcus luteus dan Rhizopus oligosporus dengan Corynebacterium Sp. Jumlah mikroorganisme yang terkandung di dalam setiap inokulum disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Jumlah mikroorganisme dalam 1 gram inokulum plus dengan kadar air 10%

Inokulum	Kapang	Jumlah	Bakteri	Jumlah
A	Rhizopus Sp	2.01×10^{11}	-	-
B	Rhizopus Sp	2.13×10^{10}	Klebsiella	5.80×10^{8}
C	Rhizopus Sp	1.54×10^{10}	Citrobacter	1.01×10^{9}
D	Rhizopus Sp	7.52×10^{9}	Micrococcus	6.04×10^{9}
E	Rhizopus Sp	8.15×10^{9}	Corynebacterium	5.80×10^{7}

Kelima jenis inokulum di atas digunakan untuk membuat inokulum seperti yang dilakukan perajin tempe yaitu setiap inokulum diinokulasikan pada nasi sebanyak 1%, diinkubasikan pada suhu ruang selama 72 jam (sampai nasi berwarna hitam), nasi dikeringkan dengan penjemuran, kemudian dihaluskan, ditambah tepung beras dalam jumlah yang sama. Dari seluruh hasil percobaan dihasilkan 3 kelompok inokulum campuran yaitu : inokulum I, dalam bentuk suspensi, inokulum II dan inokulum III dalam bentuk bubuk.

Pengujian Inokulum

Hasil pengujian setiap jenis inokulum dalam sintesis vitamin B12 disajikan dalam Tabel 4. Data dalam Tabel tersebut menunjukkan, penurunan kandungan vitamin B12 dalam produk ditentukan oleh tingkat generasi bakteri.

Tabel 4. Kadar vitamin B12 dalam tempe yang dihasilkan setiap inokulum

Produk Tempe	Jenis inokulum	Kandungan vitamin B12 ug/100 g
I A	Suspensi Rhizopus	5.79 ± 0.31
I B	Suspensi Rhizopus + Klebsiella	28.90 ± 0.24
I C	Suspensi Rhizopus + Citrobacter	26.47 ± 1.12
II A	Bubuk Rhizopus	8.95 ± 1.15
II B	Bubuk Rhizopus + Klebsiella	18.83 ± 4.18
II C	Bubuk Rhizopus + Citrobacter	17.20 ± 6.52
III A	Bubuk Rhizopus	6.45 ± 0.35
III B	Bubuk Rhizopus + Klebsiella	13.94 ± 1.56
III C	Bubuk Rhizopus + Citrobacter	13.44 ± 2.52

Berdasarkan data pada Tabel 4, ternyata bahwa kemampuan bakteri Klebsiella pneumoniae dan Citrobacter freundii dalam mensintesis vitamin B12 menurun

menurut tingkat generasi. Maka untuk memelihara kemampuan bakteri, penting dilakukan peremajaan generasi dengan cara pembiakan pada media agar sesuai untuk setiap jenis bakteri.

Simpulan

Kesimpulan dari penelitian ini ialah kapang Rhizopus oligosporus dapat dicampur baik dengan bakteri Klebsiella pneumoniae atau Citrobacter freundii dalam suatu media inokulum berbentuk bubuk dan inokulum campuran yang dihasilkan mampu meningkatkan kadar vitamin B12 di dalam tempe lebih dari 100%.

Pengujian kualitatif produk tempe yang dihasilkan menggunakan inokulum campuran Rhizopus oligosporus dengan bakteri Corynebacterium Sp dan Micrococcus luteus berbentuk suspensi (generasi pertama), tidak menunjukkan adanya kandungan antioksidan Faktor-2 atau trihidroksiisoflavon. Kemampuan kedua jenis bakteri ini dalam mengubah genistein dan daidzein menjadi trihidroksi isoflavon, telah dibuktikan pada percobaan in-vitro, demikian pula dalam beberapa jenis tempe yang diproduksi perajin terdeteksi adanya kandungan Faktor-2.

Rujukan

1. Liem ITH, Steinkraus KH and Cronk TC. 1977. Production of Vitamin B12 in Tempeh, A Fermented Soybean Food. Applied and Environmental Microbiology, 34 : 773 - 776.
2. Gyorgy P, Murata K, and Ikehata K. 1964. Antioxidants Isolated from Fermented Soybeans (Tempeh). Nature 203 : 870.
3. Keuth S and Bisping. 1994. Vitamin B12 Production by Citrobacter freundii or Klebsiella pneumoniae during Tempeh Fermentation and Proof of Enterotoxin Absence by PCR. Applied and Environmental Microbiology, 60 : 1495 - 1499.
4. Hermana and Roedjito Sw. 1970. Pembutan Laru Tempe dan Pengamatan Kekuatannya Selama Penyimpanan. Penelitian Gizi dan Makanan, 1 : 52 - 60.