PENGARUH KADAR AIR DAN LAMA PENYIMPANAN LARU CAMPURAN *Rhizopus oligosporus* DENGAN *Klebsiella pneumoniae* TERHADAP KADAR VITAMIN B-12 TEMPE

(THE EFFECTS OF MOISTURE AND STORAGE TIME OF MIXED INOCULUM *Rhizopus oligosporus* AND *Klebsiella pneumoniae* ON THE TEMPEH'S VITAMIN B-12 CONTENT)

Winiati P.Rahayu[1], Suryana Purawisastra[2], dan Mety Sumiati[3]

ABSTRACT

Different moisture and storage time treatment of mixed inoculum Rhizopus oligosporus and Klebsiella pneumoniae were used in tempeh production. Physical characteristics and quality of tempeh product were observed during fermentation, followed by analysis of Vitamin B-12 content. Preliminary observation on mold and bacteria ratio (1 : 1) fermentation, produced tempeh with a perfect solid texture and a normal taste and aroma. Mixed inoculum was drying at 37°C showed the mathematial equation of y = -0.0056 x + 1.994. The best inoculum used in tempeh production was mixed inoculum of mold and bacteria ratio (1:1), incubated at 37°C and the storage time was 21 hours. The vitamin B-12 production of mixed inoculum of mold and bacteria ratio (1:1) was better than the pure inoculum alone. The two weeks storage time of mixed inoculum (15% moisture content) used in tempeh production, resulted the highest vitamin B-12 content 25.44 mg vitamin B12/100 gr tempeh, how ever the two weeks storage time of pure inoculum (15% moisture content) produced only 3.59 ug Vitamin B12/100 gr tempeh. The two weeks storage time of mixed inoculum (10% moisture content) used in tempeh production produced 15.19 ug vitamin B12/100g tempeh, while the two weeks storage time of pure inoculum produced 1.34 ug - 2.65 ug vitamin B12/100 gr tempeh.

PENDAHULUAN

Tempe merupakan salah satu sumber protein nabati yang penting di Indonesia. Kualitas protein tempe tinggi, ditandai dengan daya cerna yang tinggi. NPU (Net Protein Utilization) dari tempe rata-rata relatif tinggi yaitu sekitar 86.1%, serta PER (Protein Efficiency Ration) tempe 2.43 dimana PER bagi kasein sebagai kontrol sebesar 2.81 (Shurtleff dan Aoyagi 1979). Selain itu harga tempe terjangkau oleh semua lapisan masyarakat sehingga konsumsi tempe sangat luas.

Keistimewaan tempe dibandingkan pangan nabati lainnya yaitu kemampuannya untuk memproduksi vitamin B-12; dimana umumnya vitamin B-12 ini terdapat dalam pangan hewani dan produknya.

Penelitian ini bertujuan mengamati stabilitas mutu laru selama penyimpanan dari laru campuran kapang tempe *R. oligosporus* dan bakteri penghasil vitamin B12 *K. pneumoniae*. Stabilitas yang diamati adalah kualitas visual serta kandungan vitamib B12 dari tempe yang dihasilkan.

[1] *Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fateta-IPB, Kotak Pos 220, Kampus Darmaga, Bogor 16002*

[2] *Staf Peneliti Puslitbang Gizi Bogor*

[3] *Alumni Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fateta IPB*

METODOLOGI

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kacang kedelai kuning untuk pembuatan tempe; bahan beras untuk pembuatan laru; bahan pengemas plastik polietilen dengan ketebalan 65 um untuk mengemas laru dan plastik polietilen (LDPE) untuk fermentasi tempe; biakan murni mikroba yang meliputi *Rhizopus oligosporus, Klebsiella pneumoniae* serta *Lactobacillus leichmanii* (NCIB 81/8 atau ATCC 7830) yang didapat dari Puslitbang Gizi Bogor; Media pertumbuhan mikroba antara lain Nutrient Agar (NA), Potatoes Dextrose Agar (PDA), Briliant Green Lactose Bile Agar (BGLBA), Media Assay Vitamin B-12 (Difco 0457-15) serta Micro Inokulum Broth Difco 0320-02.

Bahan kimia meliputi larutan Bovine Serum Albumin, larutan standard vitamin B-12 Standar, sodium hidrosida, sodium asetat dan sodium sianida.

Peralatan

Peralatan yang diperlukan adalah oven, inkubator, desikator, sentrifus, alat-alat gelas, kertas saring Whatman No. 42, spektrofotometer, tabung reaksi assay, otoklaf, vortex mixer.

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini antara adalah kadar air laru karena merupakan faktor penting bagi pertumbuhan serta proses metabolisme kapang dan

Bul. Tek. dan Industri Pangan, Vol. V no. 3. Th. 1994

bakteri. Kapang cenderung aktif pada keadaan relatif kurang air, sedangkan bakteri pada keadaan dengan kandungan air, yang tinggi.

METODOLOGI

Pelaksanaan penelitian dilakukan dalam dua tahap, yaitu penelitian pendahuluan serta penelitian utama.

Penelitian Pendahuluan

Pada penelitian pendahuluan dilakukan tiga sub tahap, yaitu (a) pengukuran kecepatan pengeringan laru di dalam oven sehingga diharapkan akan didapat kadar air laru sekitar 10% dan 15%, (b) pengukuran kuantitas kapang *R. oligosporus* dan *K. pneumoniae* dalam biakan murni agar miring, (c) pembuatan laru dengan menggunakan perbandingan kultur *R. oligosporus* : *K. pneumoniae* = 1:5, 1:1, dan 5:1 (berdasarkan jumlah koloni/ml) untuk selanjutnya dibuat tempe dan diamati mutunya secara organoleptik.

Penelitian Utama

Pada tahap utama dilakukan pembuatan laru kultur campuran dengan formulasi yang didapat, dari penelitian pendahuluan dan digunakan kontrol berupa laru dari murni kapang tempe (*R. oligosporus*). Laru dibuat dengan kadar air 10 $\pm$ 0.5% dan 15 $\pm$ 0.5%. Laru kemudian dikemas dengan menggunakan plastik polietilen ketebalan 65 um masing-masing sekitar 5 gram untuk selanjutnya disimpan dalam suhu dan kelembaban ruang penyimpan.

Perlakuan yang diterapkan dalam penelitian ini adalah kultur mikroba yang digunakan untuk pembuatan laru yaitu kultur murni *R. oligosporus* dan campuran kultur *R. oligosporus* dengan *K. pneumoniae*; kadar air laru yaitu kadar air tinggi (15 $\pm$ 0.5%) dan kadar air rendah (10 $\pm$ 0.5%) serta lama penyimpanan laru yaitu 0 hingga 6 minggu.

Rancangan Percobaan

Rancangan yang digunakan pada penelitian utama adalah Rancangan Acak Faktorial dengan tiga faktor dengan dua kali replikasi, yaitu :

$$Yijk(1) = u + Ai + Bj + Ck + ABij + ACik + BCjk + ABCijk + Eijk(m)$$

Pengamatan

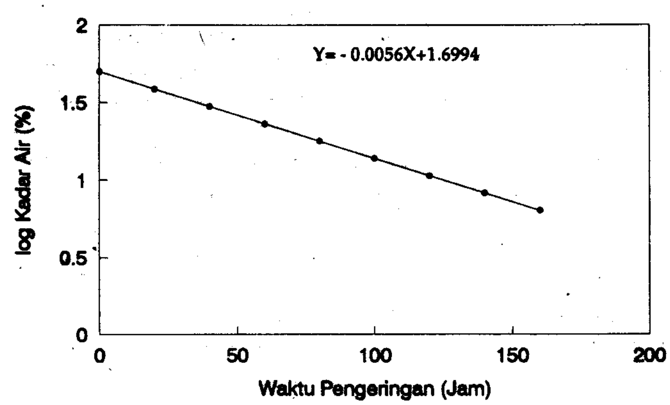
Analisis yang dilakukan meliputi analisis pada laru dan analisis pada tempe yang dihasilkan. Analisis dilakukan setiap minggu mulai minggu ke-0 (tanpa penyimpanan) sampai minggu ke-6. Analisis pada laru meliputi kadar air, total kapang *R. oligosporus* dan total bakteri *K. pneumoniae*. Tempe yang dihasilkan dianalisis kadar air, kadar protein terlarut, kadar vitamin B-12 serta penilaian organoleptik yang meliputi aroma, penampakan visual, serta tekstur.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian Pendahuluan

Pengukuran Kecepatan Pengeringan

Hasil pengamatan kecepatan pengeringan laru pada suhu 37°C menunjukkan persamaan matematis Y = -0.0056 x +1.6994. Dengan demikian waktu yang dibutuhkan untuk mencapai kadar air laru 10 $\pm$ 0.5% adalah 123.8 jam, dan waktu untuk mencapai kadar air laru 15 $\pm$ 0.5% adalah 92.67 jam terhitung sejak pengeringan awal (Gambar 1).



Gambar 1. Kurva kecepatan pengeringan laru tempe pada inkubator dengan suhu 37°c

Nilai aw atau aktivitas air merupakan jumlah air yang terdapat di dalam bahan pangan (Buckle et al, 1987) dan digunakan untuk pertumbuhan jasad renik (Wirakartakusumah et al, 1989). Menurut Syarief dan Halid (1990) istilah aw digunakan untuk menjabarkan air yang tidak terikat atau bebas yang menunjang reaksi biologi atau kimiawi. Pengamatan menunjukkan bahwa semakin lama waktu pengeringan maka kadar air semakin rendah, dan aw pada laru yang terukur akan semakin rendah. Pada saat kadar air laru kurang dari 15% maka penurunan nilai aw semakin landai dan menuju suatu nilai 0.60. Lingkungan laru dalam alat pengering dikondisikan agar tidak terjadi germinasi spora menjadi kapang vegetatif, namun spora tetap hidup. Pada kadar air 10$\pm$0.5% laru berbentuk bubuk, sedangkan pada kadar air 15$\pm$0.5% laru berbentuk gumpalan-gumpalan kecil. Pada kondisi kadar air yang tinggi diharapkan bahwa bakteri *K.pneumoniae* akan bertahan lebih lama selama penyimpanan laru.

Pengukuran Jumlah Kultur Murni R. oligosporus dan K.pneumoniae

Kultur yang digunakan adalah kultur berumur 21 jam dengan suhu inkubasi 37°C. Hasil pengukuran jumlah kapang *R.oligosporus* menunjukkansebanyak $5.0x10^{13}$ koloni/ml suspensi kapang dan *K. pneumoniae* sebanyak $2.3x10^{14}$ koloni/ml suspensi bakteri.

Formulasi Laru Murni Campuran

Pengamatan menunjukkan bahwa dengan menggunakan perbandingan jumlah kapang:bakteri=1:1 akan menghasilkan tempe yang mempunyai kekompakan tekstur yang sempurna serta aroma dan rasa yang normal. Sedangkan dengan menggunakan perbandingkan jumlah kapang:bakteri=1:5 di dapat tempe dengan kekompakan yang kurang dan memiliki aroma yang agak asam. Berdasarkan hasil pengamatan tersebut dipilih formulasi laru dengan perbandingan 1:1 dengan hipotesa semakin banyak kuantitas *K. pneumoniae* maka akan semakin tinggi pula produktivitasnya dalam memproduksi vitamin B-12.

Pertumbuhan *K.pneumonieae* sebagai bakteri penghasil vitamin B-12 pada tempe, tidak mempengaruhi pertumbuhan kapang tempe *R.oligosporus* dan keduanya mempunyai suhu pertumbuhan optimum yang sama sehingga merupakan faktor selektif bagi pertumbuhan bakteri lainnya (Steinkraus, 1983).

Penelitian Utama

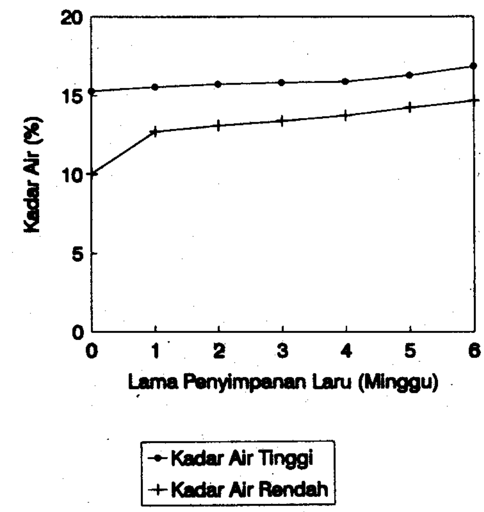
Pengamatan Pada Laru

Kadar Air

Selama penyimpanan laru tempe terjadi kenaikan kadar air baik laru dengan kadar air tinggi (15±0.5 %) maupun laru dengan kadar air rendah (10±0.5 %). Penyimpanan laru murni *R.oligosporus* dengan kadar air tinggi, menunjukkan kenaikan kadar air sebesar 3.6%, sedangkan pada laru jenis yang sama dengan kadar rendah menunjukkan kenaikan sebesar 31.7% selama penyimpanan 6 minggu. Laru campuran dengan kadar air 16.01% (meningkat 4.4%), sedangkan laru jenis yang sama dengan kadar air rendah memiliki rata-rata sebesar 12.89% atau meningkat 29.8% selama penyimpanan 6 minggu. Peningkatan kadar air ini terjadi karena metabolisme organisme yang diikuti oleh pelepasan air, selain terjadi juga penetrasi uap air melalui kemasan (Buckle at al 1985).

Selama penyimpanan terjadi kenaikan kadar air laru, sedangkan rata-rata kadar air laru tanpa penyimpanan adalah sebesar 12.7%, pada penyimpanan minggu ke 6 terjadi kenaikan menjadi 15.8%, atau terjadi kenaikan sebesar 24.4%. Selama penyimpanan laru proses penetrasi uap air terjadi dari ruang penyimpanan ke dalam kemasan laru yang memiliki kadar air yang relatif rendah. Karena itu laru akan menyerap air dari sekelilingnya sehingga semakin lama penyimpanan laru maka kadar air akan meningkat.

Penyimpanan laru dengan kadar air rendah, menunjukkan kenaikan kadar air yang lebih tinggi dibandingkan dengan laru dengan rendah kadar air tinggi. (Gambar 2.). Hal ini disebabkan karena bahan pangan yang berbentuk bubuk umumnya bersifat higroskopis.



Gambar 2. Kurva peningkatan kadar air laru akibat interaksi variabel kadar air dan lama penyimpanan

Total Mikroba

Jumlah awal koloni kapang pada keempat jenis laru berbeda karena pada laru murni jumlah kapang *R. oligosporus* yang diinokulasikan lebih tinggi dibandingkan dengan laru campuran. Pada jenis laru dengan variabel kadar air tinggi, jumlah kapang lebih tinggi dibandingkan laru dengan kadar air rendah.

Laru dengan kadar air tinggi mempunyai jumlah *R. oligosporus* sebesar 12.83 (skala logaritma) sedangkan laru dengan kadar air rendah sebesar 12.20 (skala logaritma). Semakin lama penyimpanan, baik pada laru murni maupun pada laru campuran jumlah koloni kapang *R.oligosporus* akan menurun secara logaritmik. Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroba tersebut antara lain nutrien yang tersedia, air, oksigen, suhu, pH, serta ada tidaknya komponen anti mikroba (Fardiaz (1989). Semakin lama penyimpanan laru maka nutrisi yang diperlukan bagi pertumbuhannya semakin berkurang sehingga jumlah koloni *R.oligosporus* yang tumbuh akan berkurang. Laru murni *R.oligosporus* dengan kadar air tinggi selama penyimpanan 6 minggu mengalami penurunan viabilitas sebesar 39.87%, sedangkan laru murni dengan kadar air rendah mengalami penurunan viabilitas sebesar 41.39%. Pada laru campuran dengan kadar air tinggi penurunan viabilitas *R. oligosporus* selama penyimpanan adalah sebesar 36.60%, dan pada laru dengan kadar air rendah sebesar 37.99%.

Pada pengamatan jumlah *K.pneumoniae* menunjukkan bahwa laru murni maupun laru campuran akan mengalami penurunan secara logaritmik. Pada laru murni dengan kadar air tinggi terjadi penurunan sebesar 22.97% dan laru dengan kadar air rendah sebesar 31.16%. Penurunan jumlah bakteri tersebut sudah dimulai sejak minggu pertama penyimpanan. Laru campuran dengan kadar air tinggi mengalami penurunan jumlah bakteri *K.pneumoniae* sebesar 25.09% dan laru dengan kadar air rendah sebesar 32.10%.

Pengamatan Pada Tempe

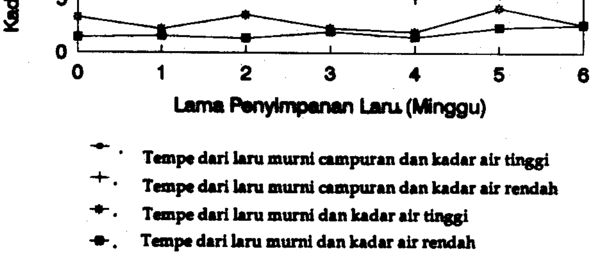
Kadar Vitamin B-12

Tempe dapat menghasilkan vitamin B-12 selama proses fermentasi. Salah satu bakteri yang menghasilkan vitamin tersebut adalah *K.pneumoniae*. Namun demikian belum diketahui fungsi vitamin B-12 yang diproduksi bagi pertumbuhan dan metabolisme bagi bakteri itu sendiri.

Penambahan bakteri *K.pneumoniae* berpengaruh nyata terhadap kadar vitamin B-12 yang dihasilkan tempe. Kadar vitamin B-12 dari tempe yang diinokulasikan dengan laru murni akan menghasilkan kadar vitamin B-12 antara 1.34-4.25 ug/100 g tempe. Sedangkan tempe dengan menggunakan laru campuran akan menghasilkan vitamin B-12 antara 5.14-25.44 ug/100 g tempe. Menurut Karyadi (1985), kandungan vitamin B-12 tempe adalah 3.9 ug/100 g tempe.

Lama penyimpanan berpengaruh nyata terhadap kadar vitamin B-12 yang dihasilkan. Umumnya kadar vitamin B-12 yang dihasilkan cenderung mengalami penurunan. Hal ini disebabkan karena semakin berkurangnya jumlah bakteri *K.pneumoniae* yang ada.

Tempe yang dihasilkan dari laru murni dengan kadar air tinggi memiliki kecenderungan penurunan kadar vitamin B-12 yaitu antara 2.00-3.59 ug/100 g tempe, dimana nilai maksimal terdapat pada penyimpanan laru minggu ke-5. Penurunan ini disebabkan oleh semakin berkurangnya kuantitas *K.pneumoniae* pada laru tempe yang tumbuh selama fermentasi. Sedangkan tempe dari laru murni dengan kadar air rendah cenderung meningkat antara 1.34-2.65 ug/100 g tempe (Gambar 3).



Gambar 3. Kurva kadar vitamin b-12 dari tempe yang dihasilkan oleh laru murni dan laru murni campuran pada setip minggu penyimpanan.

Walaupun dari segi jumlah bakteri *K.pneumoniae* pada laru murni relatif tinggi, namun jumlah vitamin B-12 yang dihasilkan sangat rendah. Okada et al (1985) berhasil mengisolasi bakteri penghasil vitamin B-12 lainnya di dalam tempe, diantaranya *K.pneumoniae* sub *oryzanae*, *K.terrigena*, *K.planticola* dan *Enterobacter cloacae*. Bakteri-bakteri ini hanya menghasilkan kurang lebih 1% dari vitamin B-12 yang dihasilkan oleh *K.pneumoniae*. Dengan demikian mungkin jumlah bakteri *Klebsiella* yang terhitung adalah jenis di atas, sehingga walaupun memiliki jumlah bakteri yang tinggi, namun produktivitasnya dalam menghasilkan vitamin B-12 rendah.

Tempe dengan menggunakan laru campuran dengan kadar air tinggi memiliki kecenderungan menghasilkan kadar vitamin B-12 tertinggi yang didapat pada penyimpanan laru minggu ke-2 yaitu sebesar 25.44 ug/100 g tempe. Walaupun peningkatan ini tidak sesuai dengan kuantitas, dimana dengan semakin lamanya penyimpanan kuantitas bakteri semakin menurun, namun mungkin pada minggu ke-2, aktivitas bakteri untuk menghasilkan B-12 mencapai maksimal.

Sedangkan kadar vitamin B-12 tempe dari laru campuran dengan kadar air rendah memiliki kecenderungan meningkat, setelah laru disimpan selama 2 minggu, yaitu sebesar 15.19 ug/100 g tempe. Peningkatan kadar vitamin B12 ini tidak setinggi kadar vitamin 12 dari laru campuran.

Kadar Protein Terlarut

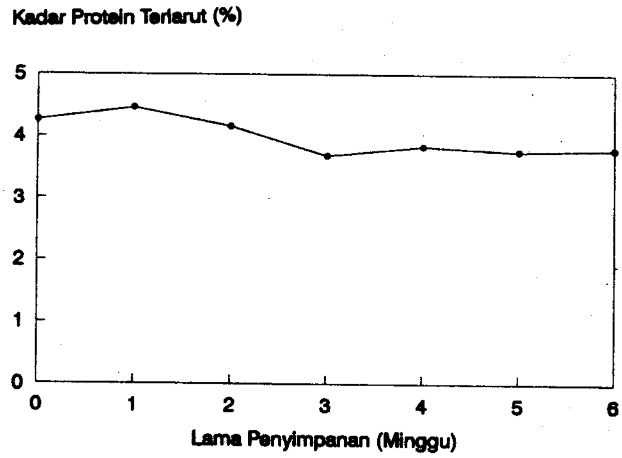
Selama penyimpanan laru secara umum terjadi penurunan jumlah kadar protein terlarut dari tempe yang dihasilkan dengan menggunakan laru tersebut. Lama penyimpanan berpengaruh nyata pada kadar protein terlarut, dimana dengan semakin lamanya penyimpanan laru, kadar protein terlarut semakin menurun (Gambar 4).

R.oligosporus mempunyai aktivitas proteolitik yang tinggi yang dapat menghasilkan amonia bebas setelah 48-72 jam fermentasi (Steinkraus 1983), sehingga selama fermentasi akan terjadi penurunan aktivitas proteolitik karena jumlah *R.oligosporus* berkurang.

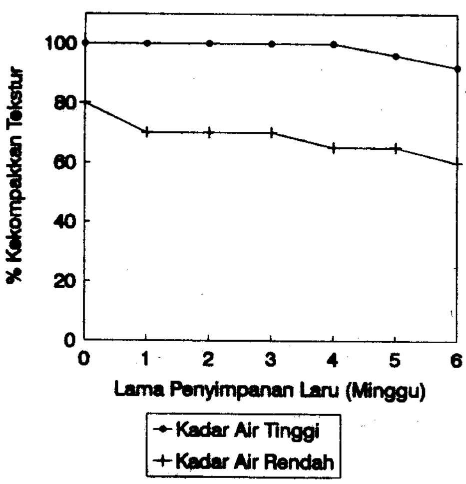
Pengamatan Organoleptik

Secara umum semakin lama penyimpanan laru tempe dari setiap perlakuan maka kualitas organoleptik tempe yang dihasilkan akan menurun. Laru yang dibuat dari laru murni selama penyimpanan akan menghasilkan tempe dengan aroma dan bentuk visual yang normal. Dari segi kekompakkan tekstur, semakin lama penyimpanan laru maka tektur tempe yang dihasilkan akan semakin menurun.

Laru murni dengan kadar air tinggi akan menghasilkan tempe dengan kekompakan 100 persen hanya sampai minggu pertama penyimpanan laru, sedangkan laru murni dengan kadar air rendah mampu memproduksikan tempe dengan tekstur yang sempurna (100%) sampai pada penyimpanan minggu ke 4. Di dalam penelitian ini yang dinamakan produk tempe layak konsumsi dari segi kekompakan antara 80-100%. (Gambar 5.)



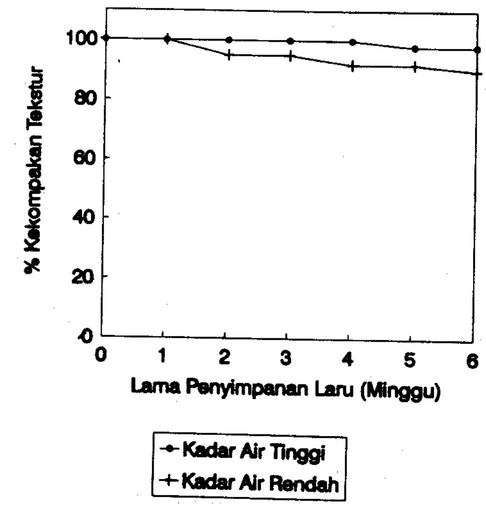
Gambar 4. Kurva kadar protein terlarut tempe selama penyimpanan laru yang digunakan.



Gambar 5. Kurva penurunan kekompakan tekstur tempe dengan menggunakan laru murni *R.oligosporus* selama penyimpanan

Secara umum menurunnya sifat organoleptik tempe yang dihasilkan akibat menurunnya viabilitas (jumlah spora yang hidup) dari kapang, sedangkan jumlah laru yang diinokulasikan tetap (0.1%).

Pada laru campuran dengan kadar air yang tinggi menghasilkan tempe dengan penampakan visual sedikit berlendir (dimulai pada minggu ke-1) dan aroma keasaman. Semakin lama penyimpanan tempe semakin berlendir dan aroma asam serta amoniak semakin kuat. Dari segi kekompakan tekstur maka tempe yang dibuat dengan laru jenis ini tidak pernah menghasilkan tempe dengan kekompakan sempurna. Kekompakan tertinggi tercapai sebelum penyimpanan laru (80%) dan selama penyimpanan, tempe terlihat tidak kompak, berlendir, dan beraroma asam, terkadang berbau amoniak. Hal ini mungkin disebabkan akibat dominasi aktivitas bakteri yang terdapat di dalam laru selama fermentasi sehingga aktivitas kapang tempe untuk membentuk tekstur tempe terganggu.



Gambar 6. Kurva penurunan kekompakan tekstur tempe dengan menggunakan laru campuran selama penyimpanan

Tempe yang dihasilkan laru campuran dengan kadar air yang rendah memiliki sifat organoleptik aroma dan visual normal sampai minggu ke-6 penyimpanan laru. namun kekompakkan tempe yang dihasilkan mengalami penurunan dimulai pada minggu ke-4 penyimpanan (gambar 6).

KESIMPULAN

Laru campuran *R.oligosporus* dan *K.pneumoniae* (rasio 1:1) menghasilkan tempe yang terbaik dengan kandungan vitamin B-12 yang tinggi.

Kadar vitamin B-12 yang dihasilkan dari laru murni hanya mencapai 1.34 - 4.25 ug/100 g tempe, sedangkan tempe yang dihasilkan dari fermentasi laru campuran mencapai 5.14-25.44 ug/100 g tempe atau 5-20 kali lipat lebih tinggi. Kadar vitamin B-12 yang dihasilkan akan mencapai maksimal bila menggunakan l;aru campuran yang telah disimpan selama 2 minggu dengan kadar air 15 -+ 0.5 %.

DAFTAR PUSTAKA

Buckle, K.A., R.A. Edwards, G.H. Fleet dan M. Wootton. 1987. Ilmu Pangan. Penterjemah Hari Purnomo. UI Press. Jakarta.

Fardiaz, S. 1989. Mikrobiologi Pangan. PAU Pangan dan Gizi IPB. Bogor.

Karyadi, D dan Hermana. 1985. Simposium Pemanfaatan Tempe dalam Peningkatan Upaya Kesehatan dan Gizi. Puslitbang Gizi. Depkes. RI. Bogor.

Okada, N., J. Hariantono, R.S. Hadioetomo. 1985. Survey of Vitamin B-12 Producing Bacteria Isolated from Indonesian Tempeh. Food Res. Inst. 47 :49-56.

Steinkraus, K.H. 1983. The Book of Indigenous Fermented Foods. Marcel Decker, New York.

Surtleff, Wand A., Aoyagi,1979. The Book of Tempeh. Harper and Row Publisher. New York.

Syarief,R & H.Halid. 1989. Teknologi Penyimpanan Pangan, PAU Pangan dan Gizi IPB.

Wirakartakusumah, M.A., Hermanianto, D., dan N. Andarwulan. 1989. Prinsip Teknik Pangan. PAU Pangan dan Gizi IPB. Bogor.