



TINJAUAN PUSTAKA

Keunggulan Tempe Sebagai Bahan Makanan

Tempe merupakan salah satu jenis bahan makanan tradisional khas Indonesia. Berdasarkan catatan sejarah, kata tempe berasal dari bahasa Jawa Kuno. Untuk pertama kali kata tempe ditemukan di dalam Serat Centhini, ditulis tahun 1660an, yang mengisahkan bahwa tempe telah digunakan sebagai salah satu komponen pada menu makanan kerajaan di Jawa Tengah (Astuti 1999a).

Tahun 1946 peneliti dari Belanda telah melakukan penelitian tentang manfaat tempe sehingga tempe mulai populer di Eropa. Di Amerika, tempe mulai dikenal sejak tahun 1946, dan tahun 1960-an ilmuwan dari Amerika banyak yang melakukan penelitian tentang tempe, diantaranya Steinkraus, Hesseltine, dan Wang sehingga mereka mengembangkan pabrik tempe secara komersial (Karyadi 1996).

Tempe merupakan bahan pangan yang memiliki banyak keunggulan. Kedelai sebagai bahan baku pembuatan tempe terdiri atas sekitar 40% protein, 20% lemak, 35% karbohidrat, dan sisanya 5% abu (Liu 1997). Pengolahan kedelai menjadi tempe telah merombak makromolekul kedelai menjadi molekul yang lebih sederhana sehingga mudah dicerna dan dimanfaatkan tubuh (Nout & Kiers 2005). Berbagai jenis vitamin B (B₁₂, riboflavin, piridoksin, niasin, biotin, folat) terdapat lebih tinggi pada tempe dibandingkan dengan kedelai. Tempe mengandung senyawa antibakteri yang telah terbukti dapat menghambat pertumbuhan *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, dan *Escherichia coli* 0125K70(B)H19 sehingga anak-anak yang mengalami diare akut akan lebih cepat sembuh bila mengkonsumsi makanan formula yang mengandung tempe (Karyadi & Hermana 1995). Menurut Murata (1985) FAO memilih tempe sebagai salah satu sumber protein nabati yang terbaik sebagai bahan pangan yang terbuat dari kedelai.

Senyawa antioksidan sangat penting untuk melindungi tubuh dari aktivitas radikal bebas yang menyebabkan berbagai jenis penyakit, seperti senyawa yang bersifat karsinogenik dan *aging* (Cutlar 1992). Pada tempe telah ditemukan

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang memurnikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

antioksidan 6,7,4-trihydroxyisoflavone (faktor 2) (Klus *et al.* 1993) dan 3-hydroxyanthranilic Acid (HAA) (Esaki *et al.* 1996).

Metabolisme kapang dan bakteri selama fermentasi meningkatkan kadar vitamin B, terutama riboflavin, niasin, vitamin B₆, dan B₁₂ (Denter *et al.* 1998). Beberapa galur *Rhizopus* dapat memproduksi betakaroten selama pengolahan tempe, sehingga tempe yang difermentasi dengan kultur tersebut dapat menjadi alternatif solusi bagi masyarakat yang mengalami kekurangan vitamin A (Denter *et al.* 1998). Selain itu, tempe terbukti dapat menanggulangi anemia karena mengandung zat besi (Astuti 1999b).

Proses Pembuatan Tempe

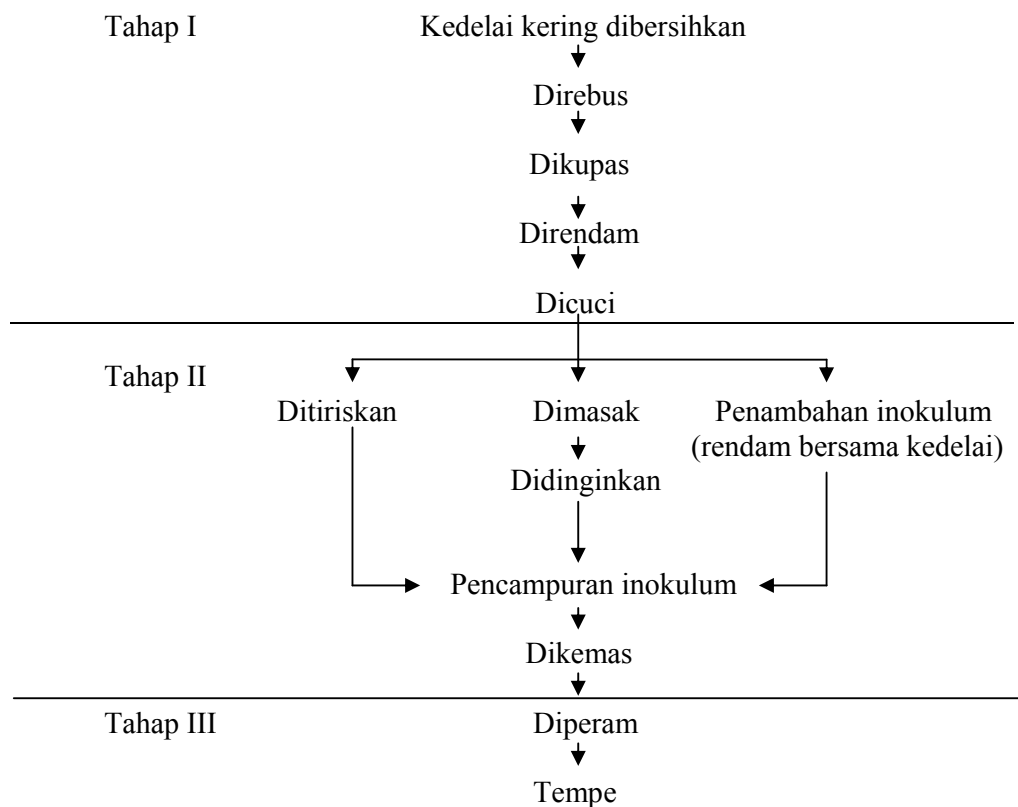
Teknologi pembuatan tempe seperti halnya teknologi pembuatan makanan tradisional lainnya, berkembang secara turun temurun dan berubah karena pengalaman. Teknologi pembuatan tempe sangat beragam, namun terdapat persamaan dalam beberapa hal antar pengrajin. Persamaan tersebut meliputi perebusan kedelai, pengupasan kulit kedelai, pengasaman kedelai, pencucian, pencampuran dengan inokulum, pengemasan, dan pemeraman. Namun, dalam perkembangan selanjutnya telah terjadi modifikasi karena pengalaman dan penyesuaian terhadap sarana atau sumber daya yang ada (Karyadi 1996).

Pembuatan tempe yang umum dipraktekkan di Indonesia saat ini terdiri atas tiga tahap (Gambar 1). Tahap I terdiri atas perebusan kedelai, pengupasan, perendaman, dan pencucian. Pada tahap I pada umumnya semua pengrajin menerapkan hal yang sama. Sebaliknya, tahap II antar pengrajin tidak sama. Beberapa pengrajin langsung meniriskan hasil tahap I lalu mencampur dengan inokulum, dikemas, dan selanjutnya masuk tahap III yaitu pemeraman. Beberapa pengrajin terlebih dahulu merebus kembali, didinginkan, ditambah inokulum, dikemas, lalu masuk tahap III, yaitu pemeraman. Ada juga pengrajin setelah tahap I langsung ditambah inokulum dengan merendamnya bersama-sama kedelai, ditiriskan, dikemas, lalu diperam (Hermana & Karmini 1996). Tahap utama pembuatan tempe ialah tahapan pemeraman (Kasmidjo 1995).



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang memurnikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Gambar 1 Bagan alir teknologi pembuatan tempe (Hermana & Karmini 1996).

Selain tahapan proses produksi yang bervariasi dalam pembuatan tempe oleh pengrajin, terjadi juga modifikasi pada setiap tahap. Modifikasi tersebut antara lain waktu perendaman, waktu perebusan, jenis dan cara pemberian inokulum tempe, jenis bahan pengemas, cara membungkus, dan cara pemeram (Hermana & Karmini 1996).

Perebusan biji kedelai bertujuan untuk membunuh sebagian besar mikroorganisme, melunakkan biji kedelai agar dapat dengan mudah ditembus oleh miselia kapang, dan meningkatkan kandungan air biji kedelai sehingga kulit mudah dilepas. Perendaman bertujuan untuk pengasaman oleh bakteri asam laktat sehingga pH kurang dari 5. Pencucian kedelai bertujuan untuk membuang kulit, menghilangkan lendir dan mengurangi keasaman yang terbentuk selama perendaman kedelai. Pengemasan bertujuan untuk membatasi oksigen dan mengoptimalkan suhu agar sesuai bagi pertumbuhan kapang. Pemeraman yang

baik berada pada suhu sekitar 20-37⁰C karena pada kisaran suhu tersebut kapang dapat tumbuh dengan baik (Karyadi 1996).

Mikroorganisme pada Tempe

Mikroorganisme yang berperan selama proses pengolahan tempe sangat kompleks dan berkembang sejak awal perendaman kedelai (Nout & Klers 2005). Keberadaan mikroorganisme tersebut dapat dilihat dari terjadinya pengasaman secara alami selama perendaman, kontaminasi selama pengemasan, dan inkubasi serta komposisi inokulum yang berbeda-beda. Mikroorganisme yang penting pada pengolahan tempe adalah kapang dan bakteri. Miselium kapang penting untuk mengikat kotiledon kedelai sehingga menjadi satu kesatuan yang berbentuk dan bakteri berperan selama pengasaman kedelai.

Kelompok kapang yang paling berperan adalah genus *Rhizopus*. Genus ini termasuk famili Mucoraceae, ordo Mucorales, subkelas Zygomycotina, dan kelas Zygomycetes. Genus ini terdiri atas beberapa spesies (Hesseltine 1985). Spesies yang paling penting adalah *R. oligosporus*, *R. arrhizus*, *R. stolonifer*, *R. oryzae*, *Mucor* sp., dan *Aspergillus* sp. (Pawiroharsono 1994).

Selama proses pengolahan tempe *Rhizopus* berperan meningkatkan kelarutan protein, lemak dan karbohidrat (Jutono 1985), namun masing-masing spesies memiliki kemampuan yang berbeda-beda. Konsentrasi asam amino bebas tertinggi diperoleh pada tempe yang menggunakan *R. oligosporus* dibandingkan dengan *R. stolonifer* dan *R. oryzae* (Keuth & Bisping 1994).

Rhizopus diformulasikan dalam bentuk ragi, usar, inokulum, atau starter (selanjutnya disebut inokulum). Inokulum diolah dengan menumbuhkan kapang pada media tertentu. Pada awalnya digunakan daun *Hibiscus similis*, *H. tiliaceus*, *Tectona grandis* atau *Bambusa* sp. (Jutono 1985), namun lebih lanjut digunakan nasi, kedelai, atau onggok. Selanjutnya, inokulum tersebut digunakan sebagai sumber inokulum pada pembuatan tempe (Pawiroharsono 1994). Saat ini inokulum tempe yang digunakan oleh para pengrajin tempe di Indosnesia pada umumnya berasal dari jenis inokulum yang sama, yaitu inokulum dengan merek dagang Raprima yang diproduksi oleh PT. Aneka Fermentasi, Bandung.



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Peran bakteri selama pengolahan tempe di Indonesia sangat penting untuk mengasamkan kedelai, namun peran bakteri ini lebih lanjut belum teridentifikasi dengan baik. Di negara beriklim subtropis pengasaman alami selama perendaman tidak selalu terjadi atau sangat lambat (Liu 1997). Pada suhu yang sangat dingin fermentasi asam laktat pada umumnya tidak berlangsung dengan baik, sehingga untuk mencapai pH yang diinginkan dilakukan perendaman dalam asam laktat 0.85% selama 2 jam pada suhu 25 °C atau 20 menit pada suhu 100 °C. Namun menurut Nout dan Kiers (2005) cukup dengan asam laktat $\leq 0.5\%$ atau asam asetat $\leq 0.25\%$.

Bakteri asam laktat (BAL) memberikan kontribusi penting dalam proses pengolahan tempe karena menjamin keamanan untuk mengkonsumsi tempe yang dihasilkan. Hal ini karena selama fermentasi berlangsung terbentuk asam-asam organik yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen dan mikroorganisme pembusuk pada tempe. Jenis mikroorganisme yang umum ditemukan adalah kelompok Enterobacillus seperti *Lactobacillus* sp., dan *L. plantarum* (Pawiroharsono 1994).

BAL yang terdapat selama perendaman secara signifikan meningkatkan asam-asam organik (Nout & Kiers 2005). Asam organik utama yang terdapat pada perendaman kedelai adalah asam laktat (Sparringa & Owens 1999; Nout & Kiers 2005).

Mikroorganisme utama untuk pembuatan tempe adalah golongan *Rhizopus*. Namun selain itu, tempe segar mengandung bakteri mesofilik aerob, seperti Enterobacteria, Stafilokokus dan khamir. Keberadaan bakteri umumnya tidak menghambat proses fermentasi (Ko 1985). Pada tempe Indonesia terdapat bakteri asam laktat sekitar 10^9 - 10^{10} CFUg⁻¹, Enterobacteriaceae 10^8 - 10^9 CFUg⁻¹, bakteri berspora 10 - 10^2 CFUg⁻¹, dan bakteri mesofilik (kecuali BAL) 10^8 - 10^9 CFUg⁻¹ (Han *et al.* 1999).

Peran Bakteri dalam Cita Rasa Bahan Pangan Fermentasi

Fermentasi merupakan suatu proses yang sudah lama digunakan untuk memproduksi bahan pangan. Pada proses fermentasi kultur starter, bahan baku, dan teknologi yang digunakan menentukan cita rasa yang terbentuk.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Pada proses fermentasi selain tempe telah banyak diteliti peran mikroorganisme terhadap produk yang dihasilkan. Banyak jenis mikroorganisme yang berperan dalam pembentukan cita rasa. Bagaimana pengaruh bakteri terhadap flavor dan tekstur tempe belum pernah diteliti (Ko 1985).

Pembentukan flavor bahan pangan hasil fermentasi sangat tergantung pada jenis mikroorganisme yang terdapat selama proses berlangsung. Penelitian tentang keragaman mikroorganisme pada proses fermentasi bahan pangan perlu dilakukan agar memudahkan pembuatan kultur starter yang digunakan (Schwan 1998), karena komunitas mikroorganisme menentukan kualitas dan konsistensi produk yang dihasilkan.

Pada proses fermentasi *nata de coco*, mikroorganisme yang paling berperan adalah *Acetobacter*. Namun, penggunaan kultur starter tunggal *Acetobacter* saja akan menghasilkan kualitas *nata de coco* yang lebih rendah dibandingkan dengan penggunaan kultur starter campuran *Acetobacter* dengan jenis bakteri lain. Keberadaan jenis bakteri lain dapat meningkatkan kualitas *nata de coco*. Hal ini kemungkinan disebabkan karena adanya simbiosis antara *Acetobacter* dengan jenis bakteri lain selama proses fermentasi *nata de coco* berlangsung. Diduga keberadaan jenis bakteri lain tersebut memberi kontribusi terhadap peningkatan jumlah sel *Acetobacter* pada proses fermentasi *nata de coco* (Seumahu 2005).

Analisis komunitas bakteri dengan metode molekular pada dua jenis proses pengolahan/fermentasi vanila menunjukkan bahwa proporsi bakteri yang bersifat tidak dapat dikulturkan (*unculturable*) sangat tinggi. Hasil analisis komunitas bakteri menunjukkan bahwa terdapat perbedaan jumlah, komposisi, dan kemampuan proteolitik bakteri yang sangat tinggi. Besarnya perbedaan tersebut menunjukkan besarnya perbedaan aktivitas bakteri selama proses pembentukan flavor dan menyebabkan terjadinya perbedaan flavor vanila yang dihasilkan (Roling *et al.* 2003).

Rasa pahit yang melebihi ambang batas penerimaan konsumen ditemukan pada keju. Rasa pahit tersebut disebabkan karena adanya akumulasi molekul peptida yang terbentuk selama proses fermentasi susu menjadi keju berlangsung.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang memurnikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Akumulasi molekul peptida tersebut terjadi karena aktivitas protease ekstraseluler dari *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Broadbent *et al.* 2002).

Soy daddawa merupakan suatu jenis makanan tradisional Nigeria yang diolah melalui proses fermentasi kedelai. *Soy daddawa* yang diproduksi dengan menggunakan kultur starter berbagai jenis *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*) menghasilkan cita rasa yang berbeda. Cita rasa *soy daddawa* yang diproduksi dengan kultur starter *B. subtilis* berbeda secara signifikan dibandingkan dengan *soy daddawa* yang diproduksi dengan kultur starter jenis *Bacillus* lainnya. Perbedaan cita rasa tersebut terjadi karena *B. subtilis* mempunyai kemampuan yang lebih tinggi menghasilkan enzim protease dibandingkan dengan jenis lainnya (Omafuvbe *et al.* 2002).

Aktivitas enzim proteolitik dari *Bacillus subtilis* dapat meningkatkan intensitas rasa pahit pada produk hidrolisat protein kedelai karena terbentuknya molekul peptida. Rasa pahit dapat juga karena terbebasnya asam amino leusin, dimana asam amino tersebut bersifat pahit (Marshall 1990).

Kedelai sebagai bahan baku pembuatan tempe, mengandung protein sekitar 40% dari total berat kering kedelai (Liu 1997). Hidrolisis enzimatis protein pada bahan makanan menghasilkan produk hidrolisat yang menyebabkan rasa pahit karena terbentuknya molekul peptida yang bersifat hidrofobik (Reineccius 1994). Molekul peptida yang memiliki berat molekul antara 2400 -3500 Da hasil hidrolisis 11S glisin memberikan rasa pahit (Kim *et al.* 2003).

Tidak semua jenis mikroorganisme yang menghasilkan enzim proteolitik meningkatkan rasa pahit pada produk hidrolisat protein. Menurut Marshall (1990) *Micrococcus* merupakan bakteri yang bersifat proteolitik, namun bakteri tersebut dapat mengurangi rasa pahit dari produk hidrolisat protein kedelai karena mampu mengkonversi asam amino yang pahit, khususnya leusin menjadi aldehid-aldehid alifatik seperti isopentanal. Akumulasi dari aldehid alifatik seperti isopentanal tersebut mengakibatkan terbentuknya suatu profil cita rasa yang kompleks yang menyerupai rasa kaldu. Konversi tersebut diduga melalui suatu proses deaminasi oksidatif yang selanjutnya diikuti dengan dekarboksilasi menjadi isopentanal.



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumpulkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Analisis Komunitas Bakteri dengan *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms*

Menganalisis keragaman mikroorganisme yang terdapat pada lingkungan khususnya yang terdapat pada bahan makanan pada awalnya sangat sulit dilakukan karena sebagian besar dari mikroorganisme tersebut belum dapat dikulturkan pada media untuk skala laboratorium (Giraffa & Neviani 2001). Hanya sekitar 5% dari spesies mikroorganisme yang telah dapat dibiakkan di laboratorium (Hunter-Cevera 1998). Namun sekarang pendekatan yang dilakukan untuk identifikasi dan klasifikasi mikroorganisme banyak menggunakan metode molekular. Pendekatan molekular yang banyak dilakukan antara lain melalui pendekatan analisis sekuen 16S rRNA atau 23S rRNA.

RNA ribosom (rRNA) merupakan bagian dari ribosom (ribosom terdiri atas rRNA dan protein) yang memiliki peranan besar selama proses translasi atau biosintesis protein. Semua rRNA pada makhluk hidup identik secara fungsional yaitu berperan dalam proses translasi atau biosintesis protein (Gutell *et al.* 1994).

Pada prokariot, dan juga kloroplas dan mitokondria eukariot, terdapat tiga macam rRNA, yaitu 5S rRNA, 16S rRNA, dan 23S rRNA. Panjang gen 16S rRNA dan 23S rRNA mengandung kira-kira 1500 dan 3000 nukleotida. Gen 16S rRNA mempunyai beberapa daerah dengan sekuen yang konservatif dan juga daerah yang sekuen-sekuennya sangat bervariasi. Perbandingan sekuen yang konservatif pada molekul rRNA 16S sangat berguna untuk mengkonstruksi pohon filogenetik universal karena untuk keperluan tersebut dibutuhkan molekul yang berubahnya relatif lambat dan mencerminkan kronologi evolusi bumi. Sebaliknya, sekuen pada rRNA 16S yang bersifat hipervariabel banyak digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan galur-galur dalam satu spesies (Suwanto 1994).

Sudah banyak laporan tentang primer umum yang dapat digunakan untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA bakteri, akan tetapi sering ada masalah karena primer umum tersebut dibuat menggunakan database sekuen 16S rRNA yang tidak lengkap dari organisme yang telah dapat dikulturkan. Oleh sebab itu, Marchesi *et al.* (1998) telah mendesain dan mengevaluasi primer 63f dan 1387r

yang mampu mengamplifikasi gen 16S rRNA dari bakteri berukuran sekitar 1300 pasang basa.

Beberapa teknik yang digunakan untuk menganalisis komunitas mikroorganisme yang berdasarkan 16S rRNA antara lain dengan teknik *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA), T-RFLP, dan *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE). T-RFLP merupakan salah satu pendekatan molekular terkini yang dapat menduga adanya perbedaan genetik antar galur. Teknik T-RFLP dalam membedakan genetik mikroorganisme yaitu dengan mengukur polimorfisme dari panjang potongan terminal produk PCR. Menurut Marsh (1999), teknik T-RFLP merupakan gabungan dari teknik RFLP, PCR, dan elektroforesis. Teknik T-RFLP dapat digunakan untuk mendiskriminasi komunitas mikroorganisme pada habitat berbeda.

Teknik T-RFLP telah digunakan oleh beberapa peneliti untuk menganalisis mikroorganisme pada suatu habitat. Cansilla *et al.* (1992), menggunakan teknik T-RFLP untuk menghasilkan sidik jari galur-galur *Lactococcus lactis* yang sekerabat. Aghajani *et al.* (1996), menggunakan T-RFLP untuk menganalisis galur *Mycobacterium*. Liu *et al.* (1997) menggunakan teknik T-RFLP dalam menganalisis mikroorganisme dari beberapa habitat, yaitu lumpur bioreaktif, lumpur teraktifkan, dan usus rayap. Lukow *et al.* (2000), menggunakan teknik T-RFLP untuk membandingkan komunitas mikroorganisme antara tanah yang ditanami tanaman transgenik dan non tanaman transgenik.

T-RFLP merupakan metode yang sangat cepat dan akurat dalam menganalisis dan membandingkan keragaman bakteri yang kompleks. Untuk membandingkan komunitas mikroorganisme pada habitat yang berbeda analisis T-RFLP jauh lebih mudah dibandingkan dengan RFLP (ARDRA) (Liu *et al.* 1997).

Langkah awal teknik T-RFLP adalah isolasi DNA, selanjutnya amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR yang menggunakan primer yang pada terminal 5' dilabel dengan senyawa yang berfluoresens agar dapat dideteksi oleh piranti *automated DNA sequenser*. Selanjutnya, dilakukan proses pemurnian produk PCR, dan pemotongan dengan enzim restriksi yang memotong sering yang mengenali empat basa DNA. Produk PCR yang telah dipotong dengan enzim

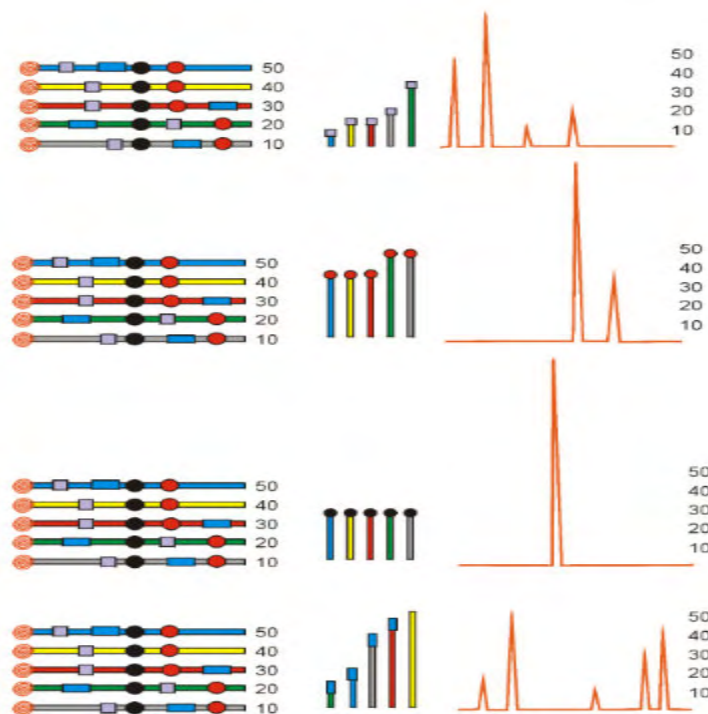


Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

tertentu tersebut dilarikan pada mesin *automated DNA sekuenser* dengan menggunakan program GeneScan[®]. Sebelum produk PCR dilarikan pada *automated DNA sekuenser*, terlebih dahulu dilakukan pencampuran dengan *loading dye* dan standar internal ukuran (*DNA internal marker*), kemudian didenaturasi pada 95 °C selama 5 menit sehingga hanya potongan yang mengandung senyawa berfluorosens saja yang dideteksi oleh mesin *automated DNA sekuenser* tersebut (Yogiara 2004).

Prinsip kerja T-RFLP diilustrasikan pada Gambar 2 di bawah ini. Balok panjang berwarna-warni menggambarkan DNA produk PCR. Lingkaran yang berspiral yang berwarna merah di sebelah kiri menunjukkan label senyawa berfluorosens. Bentuk bujur sangkar abu-abu, persegi panjang biru, bulat hitam, dan merah menunjukkan situs pemotongan enzim restriksi pada setiap sekuen DNA hasil PCR. Grafik menunjukkan keberadaan dan kelimpahan setiap fragmen DNA. Angka menunjukkan kelimpahan relatif dari produk sekuen DNA produk PCR (<http://www.bibliographics.com/LAB/T-RFLP.htm>).



Gambar 2 Ilustrasi prinsip kerja analisis komunitas mikroorganisme menggunakan analisis *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (<http://www.bibliographics.com/LAB/T-RFLP.htm>).

Menurut Tiedje *et al.* (1999), enzim restriksi yang dapat menghasilkan keragaman ukuran potongan ujung paling baik untuk komunitas bakteri adalah *HhaI* (*isoschizomer* dengan *HinP1*), *RsaI* dan *MspI*. Selanjutnya, Engebretson dan Moyer (2003) merekomendasikan penggunaan kombinasi enzim restriksi *BstUI*, *DdeI* dan *MspI*.

Pada saat enzim restriksi bujur sangkar abu-abu digunakan, maka ukuran panjang yang akan dideteksi dimulai dari ujung 5' terlabel sampai titik situs pemotongan enzim restriksi tersebut. Ukuran panjang produk PCR hasil pemotongan dengan enzim tersebut (selanjutnya disebut TRF) dideteksi dan ditampilkan dalam bentuk puncak-puncak grafik. Ukuran panjang TRF tersebut ditentukan berdasarkan posisi potongan terhadap *DNA internal marker*. Untuk enzim bujur sangkar abu-abu terdapat empat puncak TRF yang muncul karena 2 TRF mempunyai ukuran yang sama panjang yaitu balok kuning dan balok merah. Tinggi rendahnya puncak grafik tergantung dari intensitas pendaran senyawa yang berfluorosens yang berhubungan dengan jumlah TRF tersebut. Produk PCR biru berjumlah 50, maka tinggi puncak TRF balok biru setara dengan intensitas pendaran 50 produk PCR. Produk PCR kuning dan merah memiliki ukuran TRF yang sama, maka intensitas pendaran akan setara dengan gabungan kedua TRF tersebut, yaitu setara dengan 70. Berdasarkan penjelasan tersebut di atas maka, satu ukuran TRF bisa jadi terdiri dari banyak TRF yang berbeda yang memiliki ukuran panjang yang sama saat didigesti dengan enzim tertentu (Yogiara, 2004).



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di laboratorium *Research Center for Microbial Diversity* (RCMD) Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Laboratorium Organoleptik Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor, dan Laboratorium Teknologi DNA Fakultas Teknobiologi Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya Jakarta. Waktu penelitian mulai Oktober 2005 sampai dengan Desember 2007.

Bahan dan Alat

Pada uji sensori digunakan sukrosa, kafein, NaCl, MSG dan asam sitrat. Enzim yang digunakan *Bst*UI, *Msp*I, dan Taq polimerase dari New England Biolabs (NEB) USA. Primer yang digunakan yaitu primer 27f FAM (5'- AGAGTTTGATCC TGGCTCAG -3'), 63f (5'- CAGGCCTAACACATGCAAGTC -3'), dan 1387r (5'- GGGCGGWGTGTACAAGGC -3'). Primer 27f FAM terlebih dahulu dilabel dengan *phosphoramidite fluorochrome 5-carboxyfluorescens*. Bahan untuk isolasi DNA genom digunakan *Genomic DNA Purification Kit* (Fermentas, Vilnius, Lithuania) dan untuk purifikasi DNA digunakan Wizard[®] SV Gel and Clean-Up System, Promega, USA.

Untuk menumbuhkan berbagai jenis mikroba yang terdapat pada sampel digunakan *Plate Count Agar/PCA* (Oxoid), *Eosin Methylene Blue Agar/EMB* (Difco), dan *Potato Dextrose Agar/PDA* (Difco). PDA ditambah 0.3g/l ampicilin dan 0.3 g/l streptomycin.

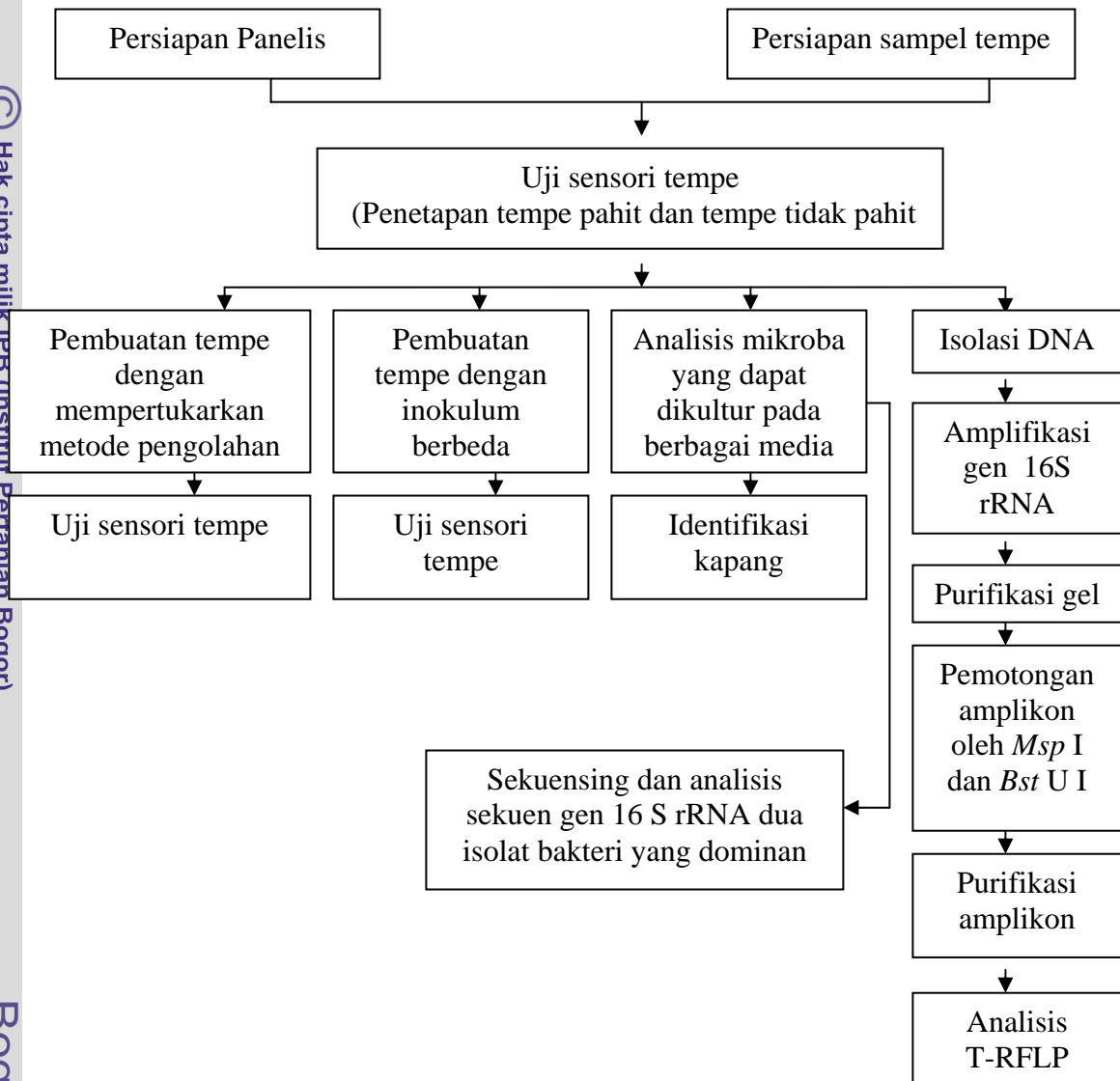
Alat-alat utama yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat piranti elektroforesis mini gel (Bio-Rad Mini-Sub Cell GT. CA.USA), UV *Transilluminator* (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA), *Microcentrifuge* (SORVALL[®] Pico, USA), mesin PCR (GeneAmp PCR system 2400, Perkin Elmer, Norwalk), mesin *automatic DNA sequencer* ABI PRISM 2400 (Perkin Elmer, USA).

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Metodologi

Penelitian ini terdiri atas beberapa tahap. Tahapan kerja penelitian disajikan pada Gambar 3 di bawah ini.



Gambar 3 Tahapan kerja penelitian.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Pengadaan Sampel Tempe

Sampel tempe diperoleh dari lima pengrajin yang berada di wilayah Kota Bogor, yaitu tempe CLR, DRG, MLB, EMP, dan WJB. Penamaan tempe EMP, DRG, MLB, CLR, dan WJB dibuat berdasarkan singkatan nama lokasi pengrajin tempe berada. Kelima jenis tempe diproduksi oleh masing-masing pengrajin dengan menggunakan jenis kedelai yang sama. Tempe CLR, DRG, MLB, EMP diolah dengan metode atau tahapan pengolahan yang sama (pengrajin menyebutnya pengolahan tempe Pekalongan), sedangkan pengolahan tempe WJB berbeda dari yang lainnya (pengrajin menyebutnya pengolahan tempe Malang).

Uji Sensori Rasa Pahit Tempe

Untuk membedakan intensitas rasa pahit kelima jenis sampel tempe (CLR, DRG, MLB, EMP, dan WJB) dilakukan uji sensori. Uji sensori terhadap intensitas rasa pahit tempe ini mengikuti metode Myong *et al.* (2004) dengan modifikasi.

Persiapan Sampel Tempe

Tempe segar berukuran 12 cm x 2 cm x 2 cm dikukus selama 15 menit. Selanjutnya tempe tersebut disajikan kepada panelis dengan ukuran 4 cm x 2 cm x 2 cm.

Persiapan Panelis

Uji sensori dilakukan oleh panelis terlatih. Persiapan panelis dilakukan melalui tahapan seleksi panelis dan pelatihan panelis.

a. Seleksi Panelis

Sebanyak 60 orang calon panelis diperoleh dari mahasiswa Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan IPB. Seleksi dilakukan dalam tiga tahap. Tahap pertama ialah *Matching test* lima rasa dasar: asam, manis, pahit, asin, dan gurih. Untuk rasa asam digunakan asam sitrat 0.04%, rasa manis digunakan sukrosa 0.7%, rasa pahit digunakan kafein 0.04%, rasa asin digunakan NaCl 0.2%, dan rasa gurih digunakan

- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
 2. Dilarang mengumpulkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



MSG 1%. Bagi panelis yang menjawab 80% benar melanjutkan ke seleksi tahap kedua. Tahap kedua ialah uji segitiga rasa pahit. Konsentrasi kafein yang digunakan adalah 0.02% dan 0.04%. Calon panelis yang menjawab 80% benar akan mengikuti seleksi tahap ketiga, yaitu uji ranking rasa pahit. Pada uji ranking rasa pahit ini digunakan kafein 0.025, 0.04%, 0.06%, dan 0.08%. Dari 60 orang calon panelis diperoleh 13 (tiga belas) orang sebagai panelis terpilih.

b. Pelatihan Panelis

Ketiga belas panelis terpilih selanjutnya dilatih dengan uji segitiga rasa pahit dan uji ranking rasa pahit. Uji ranking rasa pahit dilakukan dengan tiga jenis konsentrasi larutan kafein, yaitu 0.025%, 0.05%, dan 0.06%. Uji ranking rasa pahit dilakukan sampai panelis dengan pasti dapat mengingat intensitas rasa pahit masing-masing konsentrasi. Untuk memastikan panelis terpilih pasti mengingat intensitas rasa pahit tersebut yaitu dengan melihat jawaban 100% benar. Pada saat pelatihan, panelis dilatih juga mengenal rasa beberapa jenis tempe sebelum melakukan pengujian sampel tempe yang sesungguhnya.

Pengujian Intensitas Rasa Pahit Tempe

Di hadapan panelis disajikan sampel tempe dan standar. Panelis diminta membandingkan intensitas rasa pahit antara sampel tempe dengan standar. Selanjutnya, panelis diminta menilai intensitas rasa pahit sampel tempe tersebut dan menuliskan hasilnya pada lembar uji yang telah disiapkan (Lampiran 9). Standar rasa pahit yang digunakan adalah kafein dengan konsentrasi 0.025% dan 0.05%.

Pengolahan Data

Data hasil pengujian intensitas rasa pahit tempe dianalisis dengan Analisis Sidik Ragam. Apabila pada hasil Analisis Sidik Ragam terdapat perbedaan yang nyata maka dilanjutkan dengan uji *Honestly Significant Difference* (HSD) (Gomez & Gomez 1995). Dari pengolahan data tentang intensitas rasa pahit tempe yang diperoleh berdasarkan uji sensori maka akan diperoleh jenis tempe "tidak pahit"



(intensitas rasa pahit paling rendah), dan tempe "pahit" (intensitas rasa pahit tertinggi).

Pengolahan Tempe

Pembuatan tempe dilakukan dua kali, yaitu: 1) pembuatan tempe dengan metode yang dilakukan oleh pengrajin tempe rasa "tidak pahit" dan pengrajin tempe rasa "pahit", 2) pembuatan tempe menggunakan inokulum dari kedua pengrajin (inokulum bermerek Raprima saja dan campuran inokulum bermerek Raprima dengan onggok). Pembuatan tempe dengan cara pengolahan tempe WJB (Gambar 5). Masing-masing tempe yang diproduksi selanjutnya diuji sensori rasa pahitnya.

Analisis Kapang

Analisis kapang dilakukan terhadap tempe segar rasa "tidak pahit" dan tempe segar rasa "pahit". Medium yang digunakan ialah *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Difco) yang ditambah ampicilin 0.3 g l^{-1} , streptomycin 0.3 g l^{-1} , dan 16 ml/l (v/v) asam tartarat 10% sehingga diperoleh pH medium 4.

Sebanyak 25 g masing-masing sampel tempe segar dimasukkan ke dalam 225 ml NaCl 0.85%, dilumatkan, dan dibuat seri pengenceran hingga 10^5 . Sebanyak 100 μl suspensi dari setiap seri pengenceran ditumbuhkan pada medium PDA dengan metode tuang. Masing-masing diulang dua kali. Koloni kapang yang tumbuh yang berumur tiga hari diamati morfologinya di bawah mikroskop untuk menentukan jenisnya. Identifikasi dilakukan mengikuti Rifai (1973) dan Domsch *et al.* (1980).

Analisis Bakteri Secara Konvensional

Analisis bakteri dilakukan terhadap kedua jenis sampel tempe (tempe "tidak pahit" dan tempe segar "pahit"). Analisis dilakukan masing-masing terhadap tempe segar dan air rendamannya. Air rendaman diambil tiga tahap, yaitu 1,7, dan 14 jam setelah kedelai direndam. Semua proses analisis komunitas bakteri dilakukan dalam keadaan steril.

Dua puluh lima gram tempe segar dimasukkan ke dalam 225 ml NaCl 0.85%, lalu dilumatkan dengan stomacher selama 1.5 menit. Sebanyak 25 ml air rendaman



kedelai diencerkan dengan 225 ml NaCl 0.85%. Masing-masing sampel dibuat seri pengenceran hingga 10^8 . Sebanyak 100 μ l suspensi dari setiap seri pengenceran disebar untuk memperoleh total sel bakteri mesofil aerob pada media *Plate Count Agar/PCA* (Oxoid), total sel bakteri *Enterobacteria* pada media *Eosin Methylene Blue Agar /EMB* (Difco), dan bakteri berspora (dipanaskan 15 menit pada suhu 85°C) pada media PCA. Masing-masing uji dilakukan dua ulangan. Koloni yang tumbuh dihitung jumlahnya dan diamati perbedaan jenisnya berdasarkan pada ciri morfologi.

Uji positif penghasil enzim protease dilakukan terhadap bakteri yang tumbuh pada media PCA dan bakteri penghasil spora. Pengujian menggunakan media PCA yang ditambah susu skim 2%. Bakteri uji ditotolkan pada media PCA dan diinkubasi pada suhu ruang selama semalam. Uji positif bakteri penghasil enzim protease ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni bakteri.

Identifikasi Bakteri yang dapat Dikulturkan Berdasarkan Sekuen Gen 16S

rRNA

Dua jenis koloni bakteri yang dominan pada media PCA masing-masing diidentifikasi berdasarkan sekuen gen 16S rRNAnya. Sebanyak 1.5 ml suspensi bakteri yang tumbuh pada media PCA cair selama satu malam disentrifugasi selama tiga menit pada kecepatan 10.000 rpm. Pelet ditambah 200 μ l NaCl 0.85%, dan selanjutnya DNA genomnya diekstraksi sesuai prosedur *Genomic DNA Purification Kit* (Fermentas, Vilnius, Lithuania).

Gen 16S rRNA diamplifikasi dengan mesin PCR (Gene Amplification system 2400, Perkin Elmer) menggunakan primer 63f (5'- CAGGCCTAACACATGCAA GTC) dan 1387r (5'- GGGCGGWGTGTACAAGGC -3') (Marchesi *et al.* 1998). Kondisi reaksi adalah sebagai berikut: 36 μ l ddH₂O, 5 μ l 10 x bufer polimerase, 1 μ l dNTPs, 1 μ l DNA polimerase, masing-masing 2 μ l primer (5 pmol/ μ l), dan 3 μ l DNA sampel. Campuran tersebut diinkubasi pada mesin PCR (Perkin Elmer, GeneAmp system 2400). Protokol PCR sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 92°C selama 30 detik, *annealing* primer pada suhu 62°C selama 30 detik, *elongasi* atau pemanjangan pada suhu 72°C

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang memurnikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



selama 30 detik, dan *post* PCR pada suhu 72 °C selama 7 menit. Hasil PCR diamati pada elektroforesis dengan menggunakan gel agarose 0.8%. Amplifikasi dengan mesin PCR ini dilakukan 25 siklus. Pita DNA yang berukuran sekitar 1.300 bp dipotong dan dipurifikasi menggunakan Wizard[®] SV Gel and Clean-Up System (Promega). DNA hasil purifikasi ditambah *nuclease free-water* 35 µl. Sekuensing DNA dilakukan pada piranti *automatic* DNA sekuenser ABI PRISM 2400 (Perkin Elmer, USA). Sekuen yang diperoleh disejajarkan dengan sekuen DNA yang ada di basis data *European Bioinformatics Institute* (EBI) menggunakan program BLASTX 2.0.

Isolasi DNA Genom Langsung dari Sampel

Sebanyak 10 gram tempe segar dimasukkan ke dalam 90 ml 0.85% NaCl, dan dihancurkan. Selanjutnya, sebanyak 2.0 ml suspensi diambil dan disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Supernatan yang terbentuk dibuang dan pelet diresuspensi dengan menambahkan 1ml 0.85% NaCl dan disentrifugasi kembali. Pelet yang terbentuk diresuspensi kembali dengan menambahkan 0.5 ml 0.85% NaCl. Selanjutnya, pengekstraksian DNA dilakukan mengikuti prosedur pada *Genomic DNA Purification Kit* (Fermentas, Vilnius, Lithuania).

Sebanyak 2.0 ml air disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Pelet diresuspensi dengan menambahkan 1 ml 0.85% NaCl dan disentrifugasi kembali. Pelet yang terbentuk diresuspensi kembali dengan menambahkan 0.5 ml 0.85% NaCl. Selanjutnya, pengekstraksian DNA dilakukan mengikuti prosedur pada *Genomic DNA Purification Kit* (Fermentas, Vilnius, Lithuania).

Amplifikasi Gen 16S rRNA

Untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA bakteri secara langsung dari air rendaman kedelai dan dari tempe segar digunakan primer 27f FAM (5'- AGAGTT TGATCCTGGCTCAG -3') dan 1387r (5'- GGGCGGWGTGTACAAGGC -3'). Kondisi reaksi adalah sebagai berikut: 36 µl ddH₂O, 5 µl 10 x bufer polimerase, 1 µl dNTPs, 1 µl DNA polimerase, masing-masing 2 µl primer (5 pmol/µl), dan 3 µl

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang memurnikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



DNA sampel. Campuran tersebut diinkubasi pada mesin PCR (GeneAmp PCR system 2400, Perkin Elmer, USA). Protokol PCR yang digunakan adalah denaturasi awal 94°C selama 5 menit, denaturasi 92 °C selama 30 detik, *annealing* primer 62 °C selama 30 detik, *elongasi* atau pemanjangan 72 °C selama 30 detik, *post PCR* 72 °C selama 7 menit, dan suhu penyimpanan 4 °C. Amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR ini dilakukan sebanyak 30 siklus. Hasil PCR kemudian diamati dengan elektroforesis gel agarose 0.8%. Pita DNA yang berukuran sekitar 1300 bp dipotong untuk selanjutnya dipurifikasi menggunakan Wizard® SV Gel and Clean-Up System. DNA yang diperoleh dari hasil purifikasi ini ditambah *nuclease free-water* 35 µl.

Pemotongan Amplikon dengan Enzim Restriksi

Amplikon hasil PCR yang telah dipurifikasi dari gel selanjutnya dipotong dengan menggunakan Enzim restriksi *Bst*UI dan *Msp*I yang memotong sering, yang mengenali situs 4 basa (New England Biolab, Beverly, MA). Kondisi reaksi dari masing-masing jenis enzim adalah 1.0 µl enzim, 1.0 µl 10X bufer restriksi, dan 8 µl DNA. Pemotongan oleh enzim *Bst*UI diinkubasi pada suhu 60 °C selama ± 16 jam, dan pemotongan oleh *Msp*I diinkubasi pada 37 °C selama ± 16 jam. Hasil pemotongan selanjutnya dipurifikasi dengan metode *Ethanol Precipitation* (Sambrook dan Russell, 2001). DNA hasil purifikasi ditambah *nuclease free- water* 5 µl.

Analisis T-RFLP

Kondisi reaksi yang digunakan untuk mengetahui panjang potongan terminal produk PCR yang terlabel bahan fluorescens adalah sebagai berikut: sampel (DNA) hasil pemotongan dengan enzim restriksi yang telah dipurifikasi ditambah Hi Di™ 1.85 µl, dan standar internal (GeneScan™-500 LIZ®) 0.15 µl. Campuran tersebut didenaturasi pada mesin PCR (geneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer, Norwalk) pada suhu 95 °C selama 3 menit. Setelah denaturasi, dengan cepat didinginkan pada es. Selanjutnya, campuran ini dilarikan pada mesin sekuenser ABI Prism™ 310 *Genetic Analyzer* (AB Applied Biosystem, Foster City, California). Kondisi alat

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

adalah sebagai berikut: waktu injeksi 5 detik, beda potensial pada saat injeksi 15 KV, beda potensial pada saat *run* 15 KV, suhu 60 °C, waktu 30 menit, kekuatan laser 9.9 Mwatt. Panjang potongan terminal produk PCR yang terlabel bahan fluorescens dideterminasi menggunakan program GeneScan (Blackwood *et al.* 2003).

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

