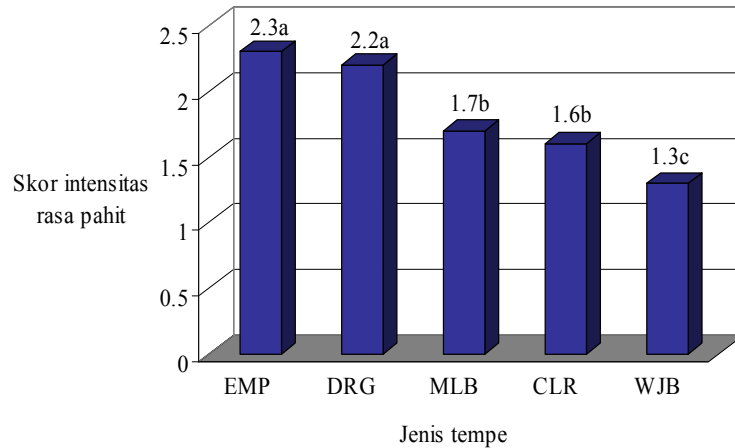


HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Sensori Rasa Pahit Tempe

Uji sensori rasa pahit dilakukan terhadap lima jenis tempe (EMP, DRG, MLB, CLR, dan WJB) yang berasal dari lima pengrajin dengan lokasi yang berbeda, yang diproduksi dengan bahan baku kedelai yang sama. Uji sensori dilakukan bertujuan untuk mendapatkan dua jenis contoh tempe yang memiliki rasa paling berbeda yaitu: tempe rasa “paling pahit” dan tempe “tidak pahit” yang akan diteliti lebih lanjut.



Gambar 4 Skor intensitas rasa pahit beberapa jenis tempe.

Skor intensitas rasa pahit tempe EMP, DRG, MLB, CLR, dan WJB secara signifikan berbeda. Hasil uji *Honestly Significant Difference* (HSD) pada taraf 5% (Gambar 4) menunjukkan bahwa skor intensitas rasa pahit tempe EMP, DRG, MLB, CLR, dan WJB dikategorikan dalam tiga kelompok, yaitu skor tertinggi tempe EMP (2.3) dan DRG (2.2), skor menengah yaitu tempe MLB (1.7) dan CLR (1.6), dan skor terendah adalah tempe WJB (1.3). Angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak signifikan berbeda pada uji HSD taraf 5% (Gambar 4). Berdasarkan hasil uji sensori tersebut, selanjutnya tempe EMP yang memiliki skor tertinggi (2.3) digunakan sebagai wakil tempe rasa “pahit” dan tempe WJB yang



memiliki skor terendah (1.3) mewakili tempe rasa “tidak pahit”, yang selanjutnya disebut tempe EMP dan tempe WJB saja. Berdasarkan persepsi panelis, dari lima jenis tempe yang diuji, ternyata tempe WJB yang paling disukai, sedangkan tempe EMP yang paling tidak disukai.

Hasil uji sensori menunjukkan bahwa rasa pahit selalu ditemukan pada tempe, namun intensitasnya dapat berbeda pada tempe yang diproduksi pengrajin. Rasa pahit tersebut dapat disebabkan oleh jenis kedelai yang digunakan, cara pembuatan, atau mikroorganisme yang berperan selama pengolahan berlangsung.

Jenis kedelai yang digunakan dapat menyebabkan rasa pahit pada tempe sebab menurut Rouseff (1990), jenis kedelai tertentu memiliki asam lemak *hydroxy* yang memiliki rasa pahit akibat adanya lipoxigenase. Namun demikian, perbedaan intensitas rasa pahit antara lima jenis tempe yang diuji, termasuk antara tempe EMP dan tempe WJB bukan disebabkan oleh jenis kedelai, karena kelima jenis tempe diproduksi dari jenis kedelai yang sama, yaitu GCU, USA Soybean No.1. Oleh sebab itu, perlu dianalisis lebih lanjut faktor penyebab perbedaan intensitas rasa pahit pada kedua jenis tempe tersebut.

Pengaruh Perbedaan Proses Pembuatan terhadap Rasa Pahit Tempe

Tempe pada umumnya diproduksi oleh pengrajin pada skala industri kecil (industri rumah tangga). Pembuatan tempe dilakukan dengan cara yang sangat bervariasi oleh para pengrajin, yang berkembang secara turun menurun dan berubah karena pengalaman. Pembuatan tempe yang dimaksud dalam hal ini adalah tahapan-tahapan yang dilakukan oleh pengrajin terhadap kedelai hingga dihasilkan tempe yang siap dikonsumsi. Menurut Karyadi (1996), terdapat beberapa tahapan proses dasar yang tetap diterapkan oleh para pengrajin tempe di Indonesia, yaitu: kedelai direbus, dikupas, dicuci, dan direndam sampai asam, lalu dicampur inokulum. Namun, tahapan proses dasar ini dapat juga berbeda antar pengrajin karena adanya pengalaman dan faktor lain sehingga terjadi modifikasi pada setiap tahapannya.

Tempe EMP dan DRG memiliki intensitas rasa pahit yang signifikan berbeda dibandingkan dengan tempe MLB dan CLR (Gambar 4). Keempat jenis tempe tersebut

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

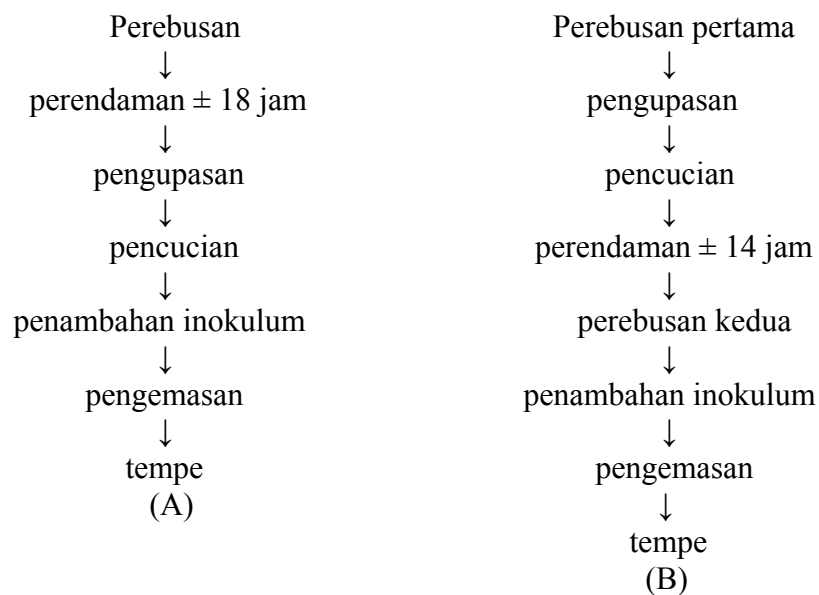
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

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.

diproduksi dengan cara yang sama (Gambar 5). Berarti intensitas rasa pahit tempe dapat berbeda antar pengrajin walaupun diproduksi dengan cara yang sama. Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Hartoyo (1994).

Tempe EMP dan WJB memiliki intensitas rasa pahit yang signifikan berbeda (Gambar 4). Kedua jenis tempe diproduksi oleh pengrajin tempe dengan cara pembuatan yang berbeda. Seperti yang sudah dijelaskan sebelumnya bahwa cara pembuatan yang dimaksud adalah tahapan-tahapan pengolahan kedelai hingga tempe siap dikonsumsi (Gambar 5). Oleh sebab itu, untuk lebih memastikan pengaruh cara pembuatan tempe terhadap rasa pahit, maka diproduksi tempe pada skala laboratorium melalui kedua cara pembuatan tempe tersebut. Tujuannya adalah untuk lebih memastikan apakah perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan WJB tersebut disebabkan karena perbedaan cara pembuatan atau karena faktor lain. Saat pembuatan tempe, faktor-faktor selain cara pembuatan, yaitu: jenis kedelai, jenis inokulum, dan sumber air yang digunakan adalah sama. Dengan demikian maka apabila terdapat perbedaan intensitas rasa pahit antara kedua jenis tempe yang diproduksi, maka perbedaan tersebut disebabkan oleh perbedaan cara pembuatan.



Gambar 5 Tahapan pembuatan tempe yang dilakukan oleh pengrajin tempe EMP, DRG, MLB, CLR (A) dan WJB (B).



Hasil uji sensori menunjukkan bahwa intensitas rasa pahit kedua jenis tempe yang diproduksi dengan cara pembuatan berbeda tidak signifikan berbeda, yaitu masing-masing dengan skor 1.1 dan 1.2. Dengan demikian maka perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan tempe WJB bukan disebabkan karena perbedaan cara pembuatan (Gambar 5), namun disebabkan karena faktor lain.

Dari eksperimen yang telah dilakukan pada penelitian ini, hasilnya menunjukkan bahwa perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan WJB bukan karena faktor jenis kedelai dan cara pembuatan tempe. Oleh sebab itu, diduga mikroorganisme berpengaruh terhadap perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan tempe WJB, sehingga perlu diteliti lebih lanjut.

Kondisi Umum Proses Pembuatan Tempe EMP dan Tempe WJB

Kunjungan ke pengrajin tempe EMP dan WJB dilakukan untuk mendapatkan informasi tentang kondisi pengolahan tempe EMP dan WJB. Hasil pengamatan di lokasi pengrajin tempe EMP dan WJB diperoleh informasi tentang keadaan umum proses pembuatan kedua jenis tempe tersebut (Tabel 1).

Kondisi proses pembuatan tempe WJB lebih higienis dibandingkan dengan kondisi proses pembuatan tempe EMP. Saat pembuatan tempe WJB, semua alat-alat yang digunakan dan ruangan pembuatan dalam keadaan bersih. Ruang perendaman dan pemeraman dalam keadaan tertutup. Sumber air yang digunakan berasal dari air PAM. Kondisi ini sangat berbeda dengan proses pembuatan tempe EMP, dimana proses perendaman dan pemeraman dilakukan di ruangan yang tidak tertutup. Peralatan yang digunakan dan ruangan pembuatan, terutama saat perendaman sangat tidak higienis. Sumber air yang digunakan berasal dari sumur.

Perbedaan kondisi selama proses pembuatan antara tempe EMP dan tempe WJB, dan perbedaan sumber air yang digunakan memungkinkan terjadinya perbedaan komunitas mikroorganisme selama pembuatan berlangsung. Komunitas mikroorganisme sangat mempengaruhi kualitas bahan pangan yang diproduksi melalui proses fermentasi.

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 mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Tabel 1 Keadaan umum proses pembuatan tempe EMP dan tempe WJB.

Kondisi	Tempe EMP	Tempe WJB
Perebusan pertama	kedelai sampai matang	kedelai sampai matang
Pengasaman	± 18 jam	± 14 jam
Perebusan kedua	-	± 2 jam
Pemberian inokulum	kedelai direndam bersama inokulum	kedelai diaduk dengan inokulum
Pemeraman	dalam plastik	disebar pada ubin
Pengemasan	plastik berlubang	plastik berlubang
Waktu inkubasi	± 36 jam	± 36 jam
Sumber air	air sumur	air ledeng
Alat pengupas	mesin	mesin
Wadah pengolahan	drum kaleng	drum kaleng
Wadah peniris	kantong plastik	nyiru bambu
Jenis inokulum	LIPI + onggok	LIPI
pH rendaman awal	7.0	7.0
pH pertengahan	5.4	6.0
pH rendaman akhir	4.4	5.0
Air rendaman	sangat kental berwarna kuning	agak kental berwarna putih

Salah satu tahapan pembuatan tempe adalah proses pengasaman melalui proses perendaman kedelai yang telah direbus. Pada awal perendaman, pH air rendaman kedelai tempe EMP dan tempe WJB tidak berbeda, yaitu masing-masing 7 (Gambar 6). Pada 7 dan 14 jam setelah perendaman, pH air rendaman kedelai tempe EMP menjadi 5.4 dan 4.4, sementara pH air rendaman kedelai tempe WJB 6.0 dan 5.0 (Gambar 6). Tampak bahwa pada 7 dan 14 jam setelah perendaman, pH air rendaman kedelai tempe EMP lebih rendah dibandingkan dengan pH air rendaman

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

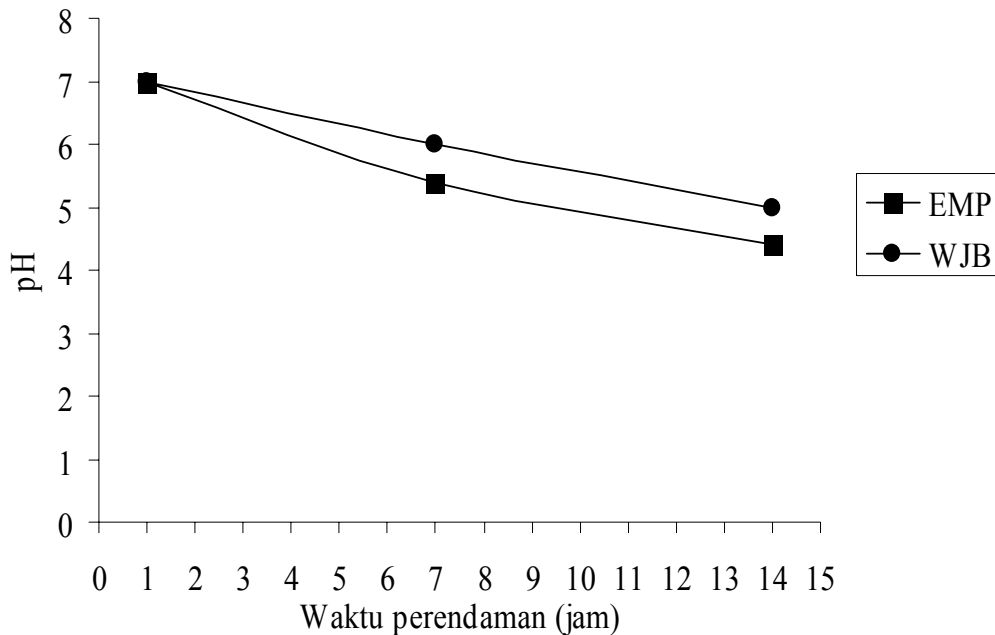
© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

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 mengurniakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



kedelai tempe WJB. Perbedaan penurunan pH antara tempe EMP dan tempe WJB ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan komunitas bakteri antara kedua jenis tempe tersebut.



Gambar 6 pH air rendaman kedelai tempe EMP dan tempe WJB selama 14 jam proses perendaman

Selain perbedaan pH, kekentalan air rendaman juga berbeda. Air rendaman tempe EMP lebih kental dibandingkan dengan tempe WJB (tidak dilakukan pengukuran). Selain itu, kedelai tempe EMP berwarna coklat kekuningan dan tempe segarnya berwarna coklat kekuningan dengan jalinan miselium kapang berwarna putih, sementara kedelai tempe WJB berwarna kuning bersih dan tempe segarnya berwarna kuning bersih dengan jalinan miselium kapang berwarna putih (Gambar 7).

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.

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University



(A)



(B)



(C)



(D)

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

Gambar 7 Penampilan kedelai tempe EMP yang telah direndam (A), kedelai tempe WJB yang telah direndam (B), tempe segar EMP (C), dan tempe segar WJB (D).

Perbedaan pH dan warna air rendaman kedelai antara tempe EMP dan tempe WJB kemungkinan disebabkan oleh perbedaan komunitas mikroorganisme yang terdapat selama perendaman berlangsung. Tampaknya perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan tempe WJB telah terbentuk sejak perendaman kedelai berlangsung, sebab berdasarkan persepsi panelis, kedelai tempe WJB yang telah direndam dan siap diberi inokulum tidak pahit dan tidak asam, sementara kedelai tempe EMP agak pahit, dan asam. Tampaknya, proses perendaman kedelai pada pembuatan tempe merupakan salah faktor penting dalam pembentukan cita rasa tempe, sebab kualitas tempe yang dihasilkan sudah diawali dari proses tersebut.

Jumlah dan Jenis Kapang

Analisis terhadap kapang dilakukan untuk mengetahui perbedaan jenis dan jumlah kapang yang terdapat pada tempe EMP dan tempe WJB. Tujuannya adalah

- 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 mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



untuk mengetahui apakah kapang yang menyebabkan perbedaan intensitas rasa pahit terhadap kedua jenis tempe tersebut.

Peran kapang terhadap rasa pahit perlu dikaji, sebab kapang merupakan mikroorganisme utama yang berperan saat proses pembuatan tempe. Jenis kapang yang paling berperan adalah kelompok *Rhizopus*. Jenis *Rhizopus* berperan mempengaruhi kualitas tempe, sebab *Rhizopus* terdiri atas berbagai jenis yang memiliki karakteristik sendiri (Nout & Kiers 2005). Hasil penelitian Keuth dan Bisping (1995) menunjukkan bahwa dari beberapa jenis *Rhizopus* yang digunakan untuk memproduksi tempe, *R. oligosporus* merupakan jenis yang memiliki aktivitas proteolitik tertinggi dibandingkan dengan *R. oryzae* dan *R. stolonifer*.

Mikroorganisme yang memiliki aktivitas proteolitik penting dalam proses pembuatan tempe, sebab hidrolisis enzimatis protein kedelai dapat menyebabkan timbulnya rasa pahit akibat terbentuknya molekul peptida yang bersifat hidrofobik (Reineccius, 1994), yaitu peptida yang memiliki berat molekul sekitar 2.4 -3.5 kDa (Kim *et al.* 2003), dan peptida yang berukuran 2 kDa dan 4 kDa (Myong *et al.* 2004). Lebih lanjut dilaporkan bahwa kapang berperan pada pembentukan karakteristik flavor tempe karena tempe yang diproduksi dengan *R. oryzae* menghasilkan flavor yang tidak diinginkan.

Berdasarkan hasil analisis kapang yang dilakukan, ditemukan bahwa kapang yang terdapat pada tempe segar EMP adalah *R. oligosporus* dan *Mucor* sp. masing-masing dengan kelimpahan 3.4×10^5 CFU g⁻¹ dan 3.5×10^3 CFU g⁻¹. Jenis kapang yang terdapat pada tempe segar WJB adalah *R. oligosporus*, *Mucor* sp. dan *Geotrichum* sp, masing-masing dengan kelimpahan 3.8×10^5 CFU g⁻¹, 4.8×10^3 CFU g⁻¹, dan kurang dari 3.0×10^1 CFU g⁻¹. Jenis dan jumlah kapang yang terdapat pada tempe EMP dan WJB relatif sama. Oleh sebab itu maka tampaknya kapang tidak berperan dalam menyebabkan perbedaan intensitas rasa pahit pada kedua jenis tempe tersebut. Namun, untuk lebih memastikan tentang pengaruh kapang terhadap perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan WJB, maka diproduksi tempe pada skala laboratorium dengan menggunakan inokulum dari pengrajin tempe EMP

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 mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



dan WJB. Hal ini karena inokulum merupakan sumber kapang yang terdapat pada tempe.

Pada saat produksi tempe, jenis kedelai, cara pembuatan, dan sumber air yang digunakan sama. Prosedur pembuatan tempe dilakukan mengikuti cara yang digunakan pengrajin tempe WJB (Gambar 5). Selanjutnya, dilakukan uji sensori terhadap tempe yang diproduksi untuk menentukan perbedaan intensitas rasa pahitnya.

Hasil uji sensori dua jenis tempe yang diproduksi pada skala laboratorium menggunakan inokulum dari pengrajin tempe EMP dan WJB menunjukkan skor intensitas rasa pahit yang tidak signifikan berbeda, yaitu masing-masing dengan skor 1.1 dan 1.2. Hasil tersebut semakin memperkuat informasi yang menunjukkan bahwa perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan tempe WJB bukan disebabkan oleh kapang.

Jenis inokulum yang digunakan oleh pengrajin tempe EMP dan WJB berasal dari sumber yang sama, yaitu inokulum dengan merek dagang Raprima yang diproduksi oleh PT. Aneka Fermentasi, Bandung. Namun, pengrajin EMP terlebih dahulu mencampur inokulum tersebut dengan ongkok untuk menghemat biaya pengadaan inokulum. Namun, hasil uji sensori dua jenis tempe menggunakan inokulum dari kedua pengrajin menunjukkan bahwa pencampuran ongkok oleh pengrajin tempe EMP bukan penyebab perbedaan intensitas rasa pahit antara kedua jenis tempe tersebut.

Geotrichum sp. tidak ditemukan pada tempe EMP, tetapi ditemukan pada tempe WJB dengan jumlah kurang dari 3.0×10^1 CFU g^{-1} (11 CFU g^{-1}). Jumlah *Geotrichum* sp. tersebut relatif sangat rendah bila dibandingkan dengan jumlah mikroorganisme lainnya yang terdapat pada tempe WJB. Dengan demikian maka peranannya juga relatif sangat kecil dalam mempengaruhi rasa pahit pada tempe. Oleh sebab itu, rendahnya intensitas rasa pahit tempe WJB dibandingkan dengan tempe EMP bukan disebabkan oleh *Geotrichum* sp.

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.

Analisis Komunitas Bakteri Secara Konvensional

Perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan tempe WJB bukan disebabkan oleh jenis kedelai, cara pembuatan, dan kapang. Oleh sebab itu perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan tempe WJB kemungkinan disebabkan karena perbedaan komunitas bakteri selama proses pembuatan berlangsung.

Untuk mengetahui lebih lanjut faktor penyebab perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan WJB, maka dianalisis perbedaan komunitas bakteri pada kedua jenis tempe, baik secara konvensional (pengkulturan bakteri) dan secara molekular dengan teknik T-RFLP. Tujuannya agar dapat dibandingkan keadaan komunitas bakteri yang terdapat pada tempe EMP dan WJB.

Jenis media yang dipakai pada analisis komunitas bakteri secara konvensional adalah PCA dan EMB. Media PCA digunakan sebab media ini adalah jenis media yang direkomendasikan untuk menumbuhkan total jenis bakteri aerob yang terdapat pada bahan makanan. Demikian juga EMB digunakan sebab merupakan jenis media untuk menumbuhkan golongan bakteri gram negatif.

Jumlah sel *Enterobacteria* dan bakteri pembentuk spora pada air rendaman dan pada tempe segar EMP lebih tinggi dibandingkan dengan air rendaman dan tempe segar WJB. *Enterobacteria* dan bakteri berspora secara berturut-turut sekitar 1.5×10^3 - 5×10^3 dan 2×10^1 - 3×10^2 kali lebih banyak terdapat pada air rendaman tempe EMP dibandingkan tempe WJB. Demikian juga pada tempe segar, total bakteri mesofil, *Enterobacteria*, dan bakteri berspora secara berturut-turut sekitar 5×10^2 , 2×10^2 , dan 2×10^1 kali lebih banyak terdapat pada tempe EMP dibandingkan tempe WJB (Tabel 2).

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.



© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University



Tabel 2 Kelimpahan beberapa jenis bakteri yang terdapat pada air rendaman dan tempe segar EMP dan WJB.

Jenis bakteri	Lama perendaman kedelai			Tempe segar (CFU/g)
	1 jam (CFU/ml)	7 jam (CFU/ml)	14 jam (CFU/ml)	
	Tempe EMP			
Total bakteri	8.7×10^6	4.4×10^7	3.7×10^8	9.4×10^8
Enterobacteria	3.1×10^6	7.7×10^7	3.3×10^8	1.1×10^8
Bakteri berspora	3.4×10^2	3.3×10^3	5.3×10^3	3.2×10^2
	Tempe WJB			
Total bakteri	7.1×10^6	1.3×10^7	7.6×10^8	1.8×10^6
Enterobacteria	6.1×10^2	5.3×10^4	6.0×10^5	4.2×10^5
Bakteri berspora	$< 3.0 \times 10^1$	$< 3.0 \times 10^1$	$< 3.0 \times 10^1$	$< 3.0 \times 10^1$

Semua bakteri berspora dalam penelitian ini bersifat proteolitik

Berdasarkan morfologinya, *Enterobacteria* pada tempe EMP didominasi oleh bakteri yang berwarna hijau metalik (fekal), dan selainnya non fekal yang serupa dengan bakteri *Enterobacteria* yang terdapat pada tempe WJB. Kelompok *Enterobacteria* pada tempe EMP yang berwarna hijau metalik tersebut kemungkinan adalah *Escherichia coli*.

Berdasarkan data analisis komunitas bakteri (Tabel 2) menunjukkan bahwa mikroorganisme yang berperan selama proses pembuatan tempe sangatlah kompleks. Mikroorganisme yang paling berperan adalah kapang, khususnya kelompok *Rhizopus*. Namun demikian, bakteri terdapat dalam kelimpahan yang tinggi sejak awal hingga akhir proses pembuatan tempe. Dengan demikian, kemungkinan komunitas bakteri berpengaruh terhadap rasa pahit tempe.

Proses pembuatan tempe secara tradisional pada umumnya dilakukan pada kondisi yang tidak aseptik, sehingga bakteri berkembang dengan baik. Namun, peranan bakteri terhadap pembentukan rasa, tekstur, dan nutrisi tempe masih perlu dikaji lebih lanjut.

Dua jenis bakteri yang tumbuh dominan pada media PCA yang diamati secara morfologi (Cappuccino & Sherman 2001), selanjutnya diidentifikasi. Berdasarkan ciri morfologinya, maka jenis bakteri yang terdapat dominan pada sampel tempe EMP

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.



bertipe A, B, F, dan I, sedangkan pada tempe WJB bertipe B, D, G, H dan I (Tabel 3). Bakteri Tipe I memiliki aktivitas proteolitik, dan tipe morfologi koloninya sama dengan bakteri berspora yang terdapat pada tempe EMP dan tempe WJB, yaitu: berbentuk tidak beraturan dan menyebar, berlendir, rata, putih, dan besar. Bakteri berspora juga memiliki aktivitas proteolitik. Secara keseluruhan kelimpahan bakteri yang bersifat proteolitik terdapat lebih tinggi pada tempe EMP dibandingkan dengan tempe WJB.

Identifikasi dua jenis bakteri yang paling dominan dilakukan berdasarkan sekuensing gen 16S rRNA. Hasil sekuensing DNA menunjukkan bahwa jenis bakteri mesofil yang dominan pada tempe EMP ialah *Acetobacter indonesiensis* (Tipe A), *Bacillus subtilis* (Tipe I), *Klebsiella pneumoniae* (Tipe B), dan *Flavobacterium* sp. (Tipe F), sedangkan jenis bakteri mesofil yang dominan pada tempe WJB adalah *Klebsiella* sp. (Tipe B), *Bacillus pumilus* (Tipe I), *Pseudomonas putida* (Tipe D), dan *Acinetobacter* sp. (Tipe H) (Tabel 3). Masing-masing dengan tingkat kemiripan 99%-100%.

Pada tempe EMP, *Klebsiella pneumonia* yang terdapat pada air rendaman masih ditemukan juga pada tempe segarnya. Hal ini kemungkinan karena setelah perendaman kedelai tidak dilakukan lagi perebusan kembali sehingga kemungkinan jenis bakteri yang terdapat pada air rendaman bakteri masih terikut selama inkubasi.

Bacillus terdapat lebih tinggi sekitar 9×10^4 kali lebih banyak terdapat pada air rendaman kedelai tempe EMP dibandingkan dengan tempe WJB. Kedua jenis *Bacillus* tersebut (Tabel 3) bersifat proteolitik. *Bacillus* bersifat sangat kuat mensekresikan enzim protease sehingga dapat menghidrolisis molekul protein menjadi fragmen-fragmen yang lebih kecil (Suhartono 1992). Oleh sebab itu, walaupun banyak faktor kemungkinan yang menyebabkan perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan WJB, namun perbedaan kelimpahan dan jenis *Bacillus* yang terdapat selama proses pengolahan kemungkinan berperan menyebabkan terjadinya perbedaan intensitas rasa pahit antara tempe EMP dan WJB. Omafuvbe *et al.* (2002) melaporkan bahwa protease *Bacillus* sp. yang berbeda dapat menghasilkan kadar asam amino bebas dan atribut sensori yang berbeda pada *soy-daddawa*

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.



(makanan tradisional Nigeria hasil fermentasi kedelai). Lebih lanjut, hasil penelitian Myung *et al.* 2007 menunjukkan bahwa jenis *Bacillus* tertentu berperan pada pembentukan rasa pahit pada chungkukjangs (makanan tradisional Korea hasil fermentasi kedelai).

Tabel 3 Dua jenis bakteri yang dominan dari EMP dan WJB yang tumbuh pada media PCA

Contoh	Tipe koloni	Identitas	CFUml ⁻¹ CFU g ⁻¹	Distri-busi (%)
Tempe EMP				
Rendaman 1 (AE1)	A	<i>Acetobacter indonesiensis</i>	5.5 x 10 ⁶	64%
	I	<i>Bacillus subtilis</i> *	3.1 x 10 ⁶	35%
Rendaman 2 (AE2)	B	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3.7 x 10 ⁷	85%
	I	<i>Bacillus subtilis</i>	6.6 x 10 ⁶	15%
Rendaman 3 (AE3)	B	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3.7 x 10 ⁸	99.9%
	I	NA	4.7 x 10 ⁵	<1%
Tempe segar (TE)	F	<i>Flavobacterium</i> sp.	5.9 x 10 ⁸	62.7%
	B	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3.5 x 10 ⁸	37.2%
Tempe WJB				
Rendaman 1 (AW1)	B	<i>Klebsiella</i> sp.	7.1 x 10 ⁶	99.9%
	I	<i>Bacillus pumilus</i> *	3.3 x 10 ¹	<1%
Rendaman 2 (AW2)	B	<i>Klebsiella</i> sp.	1.3 x 10 ⁷	99.9%
	G	<i>Brevundimonas</i> sp.	3.5 x 10 ³	<1%
Rendaman 3 (AW3)	B	NA	7.6 x 10 ⁸	99.9%
	G	NA	3.0 x 10 ⁵	<1%
Tempe segar (TW)	D	<i>Pseudomonas putida</i>	1.7 x 10 ⁶	99.9%
	H	<i>Acinetobacter</i> sp.	5.4 x 10 ³	<1%

Tipe A: Bundar, tepian licin, berlendir, cembung, putih kekuningan, kecil.

Tipe B: Bundar, tepian licin, berlendir, cembung, putih, kecil.

Tipe D: Bundar, tepian licin, berlendir, cembung, putih, besar.

Tipe F: Bundar dengan tepian kerang, berlendir, cembung, putih kecoklatan, besar.

Tipe G: Bundar, tepian licin, berlendir, cembung, putih, sedang.

Tipe H: Bundar, tepian licin, berlendir, timbul, putih kekuningan, kecil.

Tipe I: Tidak beraturan dan menyebar, berlendir, rata, putih, besar.

NA : tidak diidentifikasi.

* : bersifat proteolitik

Kedelai sebagai bahan baku pembuatan tempe mengandung sekitar 40% protein dari total berat keringnya, yang terdiri atas protein 11S glycinin dan protein α , β , γ conglycinin (Liu 1997). Hidrolis protein 11S glysinin kedelai oleh tripsin



menghasilkan peptida yang pahit, yaitu peptida yang memiliki berat molekul antara 2.4 - 3.5 kDa (Kim *et al.* 2003). Rasa pahit pada hidrolisis enzimatis protein kedelai disebabkan karena terbentuknya molekul peptida yang bersifat hidrofobik (Reineccius 1994). Selanjutnya ditambahkan oleh Myong *et al.* (2004) bahwa hidrolisis protein kedelai oleh enzim menyebabkan timbulnya rasa pahit akibat terbentuknya peptida yang berukuran sekitar 2 kDa dan 4 kDa.

Analisis Komunitas Bakteri dengan Teknik T-RFLP

Intensitas rasa pahit tempe EMP dan tempe WJB secara signifikan berbeda. Telah dianalisis bahwa perbedaan intensitas rasa pahit tersebut bukan disebabkan oleh jenis kapang, cara pembuatan, dan jenis kedelai yang digunakan. Namun, dari hasil analisis komunitas bakteri secara konvensional (analisis berdasarkan pengkulturan bakteri) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan jenis dan kelimpahan bakteri yang terdapat pada tempe EMP dan tempe WJB.

Untuk mengetahui lebih lanjut tentang perbedaan jenis dan kelimpahan bakteri antara tempe EMP dan tempe WJB, maka dilakukan analisis komunitas bakteri metode molekular, sebab apabila hanya berdasarkan analisis secara konvensional saja hasilnya dapat bias karena bisa tidak menggambarkan keadaan komunitas bakteri yang sesungguhnya. Hal ini karena sebagian besar bakteri belum dapat ditumbuhkan pada media untuk skala laboratorium (Giraffa & Neviani 2001). Oleh sebab itu, analisis komunitas bakteri tempe EMP dan tempe WJB dilakukan lebih lanjut dengan teknik T-RFLP, agar lebih jelas diketahui perbedaan jenis dan kelimpahan bakteri antara kedua jenis tempe tersebut.

Analisis T-RFLP digunakan untuk melakukan perbandingan dan deteksi spesies bakteri yang menghuni suatu ekosistem. Teknik T-RFLP telah digunakan untuk membandingkan komunitas bakteri pada tanah (Dunbar *et al.* 2000), menganalisis keragaman bakteri yang menyebabkan infeksi paru-paru (Rogers *et al.* 2004), menganalisis keragaman bakteri pada vagina (Coolen *et al.* 2005), dan mendeteksi kehadiran bakteri pada darah (Christensen *et al.* 2003).

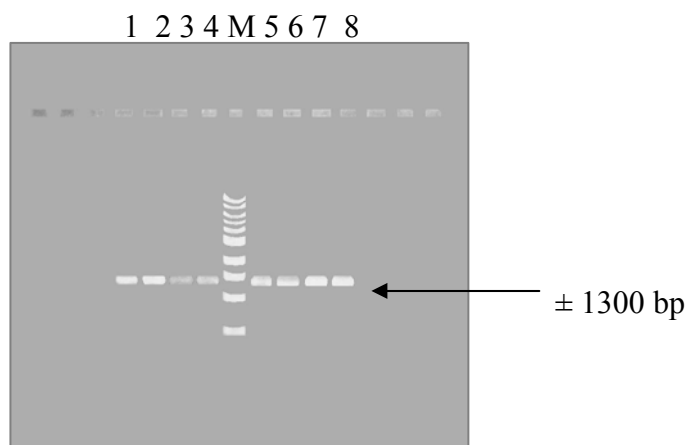
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

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.

Analisis komunitas bakteri pada kedua jenis tempe dengan teknik T-RFLP dilakukan berdasarkan pada analisis gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA tersebut berukuran sekitar 1300 bp (Gambar 8).



Gambar 8 Elektroforesis gel agarose (0.8%) DNA gen 16S rRNA komunitas bakteri dari tempe EMP dan WJB.

- 1 : 1 jam perendaman kedelai WJB (AW1)
- 2 : 7 jam perendaman kedelai WJB (AW2)
- 3 : 14 jam perendaman kedelai WJB (AW3)
- 4 : Tempe segar WJB (TW)
- M : Marker 100 bp
- 5 : Tempe segar EMP (TE)
- 6 : 14 jam perendaman kedelai EMP (AE3)
- 7 : 7 jam perendaman kedelai EMP (AE2)
- 8 : 1 jam perendaman kedelai EMP (AE1)

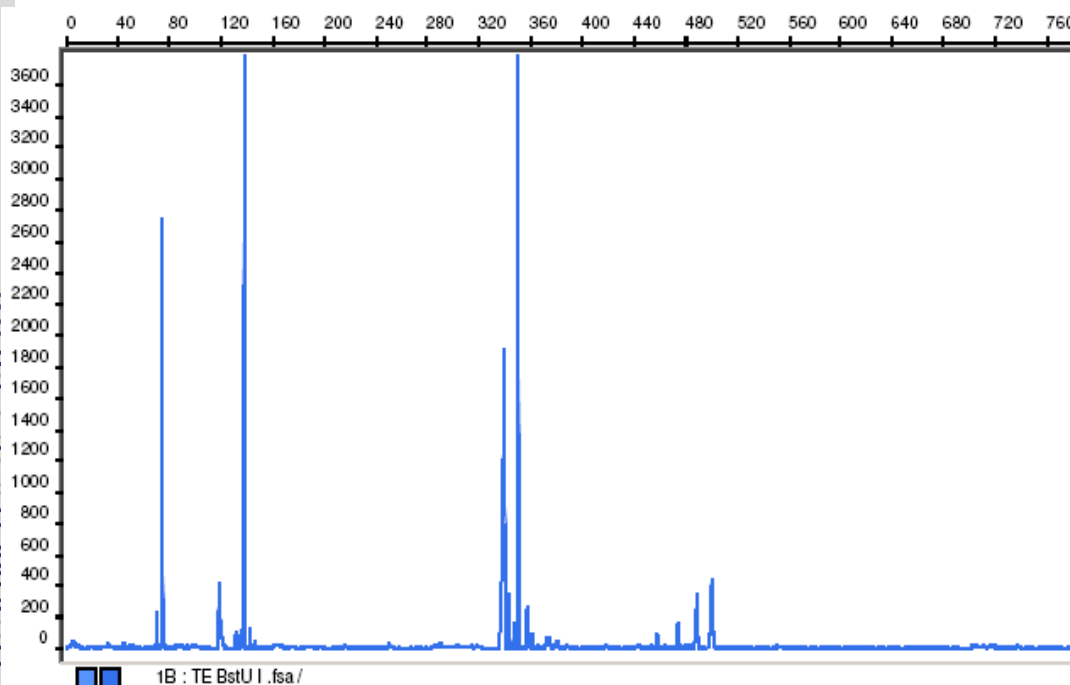
Hasil analisis T-RFLP berupa elektrogram yang memperlihatkan grafik ukuran fragment ujung 5' yang terlabel ditambah dengan informasi pada tabel tentang TRF tersebut di bagian bawahnya (Gambar 9). Setiap puncak grafik mewakili minimal satu TRF gen 16S rRNA bakteri yang terdapat di dalam contoh. Ketinggian grafik menunjukkan intensitas pendaran TRF. Pembacaan data yang terdapat di bawah grafik dari kiri ke kanan (Gambar 9) adalah sebagai berikut: kolom pertama



merupakan nomor urut keluarnya TRF, kolom kedua waktu keluarnya TRF (menit), kolom ketiga ukuran TRF (bp), kolom keempat intensitas pendaran TRF (unit fluoresens), kolom kelima luas area grafik (mm), dan kolom keenam titik keluarnya data pada alat.

Berdasarkan hasil analisis T-RFLP, jenis bakteri pada suatu ekosistem dapat diduga dari jenis TRF yang dihasilkan, yaitu dengan mencocokkan jenis TRF tersebut dengan *database* (<http://mica.ibest.uidaho.edu/>), dan kelimpahan relatifnya ditunjukkan oleh tinggi puncak (*peak height*) atau luas area (*peak area*) grafik TRF (Gambar 9). Dalam penelitian ini kelimpahan relatif jenis bakteri digunakan tinggi puncak grafik TRF.

Untuk menganalisis komunitas bakteri pada tempe EMP dan WJB dengan T-RFLP ini digunakan dua jenis enzim, yaitu *Bst*UI dan *Msp*I. Hasil T-RFLP menunjukkan bahwa kedua jenis enzim ini mampu membuat perbedaan antara gen 16S rRNA bakteri yang satu dengan yang lainnya. Namun, untuk pembahasan lebih lanjut dipilih hasil T-RFLP yang dipotong dengan enzim *Bst*UI, karena total intensitas pendaran TRF pada tempe WJB yang dipotong dengan *Bst*UI jauh lebih tinggi dibandingkan dengan pemakaian enzim *Msp*I.



Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
1B, 1	10.34	45.56	50	422	2819
1B, 2	11.22	70.50	258	2173	3060
1B, 3	11.43	75.00	3130	16628	3117
1B, 4	11.47	76.01	61	504	3126
1B, 5	12.32	118.90	481	3970	3360
1B, 6	12.56	131.76	113	829	3425
1B, 7	12.61	134.40	95	481	3439
1B, 8	12.65	136.49	143	963	3450
1B, 9	12.70	139.00	6194	32972	3463
1B, 10	12.75	139.48	100	801	3475
1B, 11	13.22	143.18	144	1005	3604
1B, 12	13.82	146.90	61	1184	3767
1B, 13	15.33	251.18	51	398	4179
1B, 14	15.84	290.24	54	585	4318
1B, 15	16.42	340.00	1964	33009	4476
1B, 16	16.63	343.15	378	2634	4534
1B, 17	16.95	346.63	178	1914	4621
1B, 18	17.20	349.10	142	1091	4690
1B, 19	17.29	350.00	7705	90317	4715
1B, 20	17.62	357.88	309	3095	4805
1B, 21	17.73	360.72	106	736	4835
1B, 22	18.18	373.86	75	1717	4958
1B, 23	18.36	379.76	59	672	5005
1B, 24	18.37	380.16	60	159	5008
1B, 25	18.39	380.96	71	629	5014

Gambar 9 Contoh hasil analisis komunitas bakteri dengan T-RFLP. Sumbu x adalah ukuran TRF (bp) dan sumbu y adalah intensitas pendaran TRF (unit fluoresens).

- 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.



Apabila dibandingkan profil hasil T-RFLP komunitas bakteri antara tempe EMP dan tempe WJB pada setiap tahapannya (AE1 dan AW1, AE2 dan AW2, AE3 dan AW3, serta TE dan TW) maka keduanya tampak berbeda (Gambar 10, Gambar 11, Gambar 12, Gambar 13). Perbedaan ini menggambarkan perbedaan profil komunitas bakteri yang terdapat pada kedua jenis tempe tersebut. Hasil T-RFLP selengkapnya ditunjukkan pada Lampiran 1-8 dan rangkuman data ditunjukkan pada Tabel 4.

Hasil analisis komunitas bakteri dengan T-RFLP (Tabel 4) menunjukkan bahwa pada AE1, AE2, AE3, dan TE secara berturut-turut ditemukan 25, 23, 24, dan 29 jenis TRF, dan pada AW1, AW2, AW3, dan TW secara berturut-turut ditemukan 29, 18, 24, dan 29 TRF. Hasil T-RFLP ini menunjukkan bahwa pada AE1, AE2, AE3, dan TE secara berturut-turut ditemukan minimal 25, 23, 24, dan 29 jenis bakteri, dan pada AW1, AW2, AW3, dan TW secara berturut-turut ditemukan minimal 29, 18, 24, dan 29 jenis bakteri.

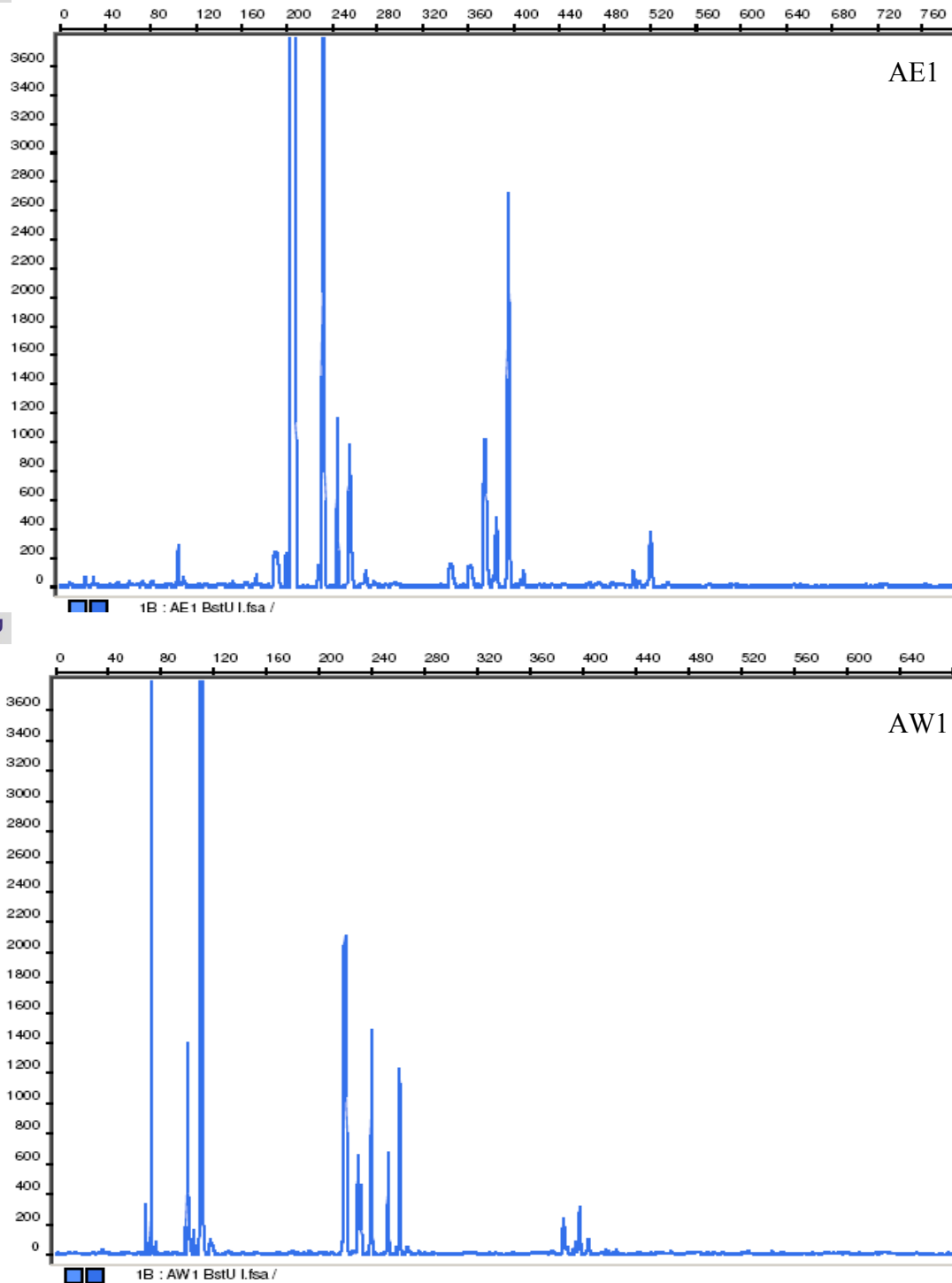
Jenis bakteri pada tempe EMP dan tempe WJB mungkin bahkan dapat bertambah sebab satu TRF menggambarkan minimal 1 jenis bakteri. Hasil analisis komunitas ini menunjukkan bahwa komunitas bakteri selama proses pengolahan tempe sangat kompleks. Kompleksnya jenis mikroorganisme yang terlibat selama proses fermentasi telah ditemukan juga pada fermentasi Pozol (makanan tradisional Indian dari jagung) yang melibatkan sekitar 139 strain bakteri (Ampe *et al.* 1999).



- 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 mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University



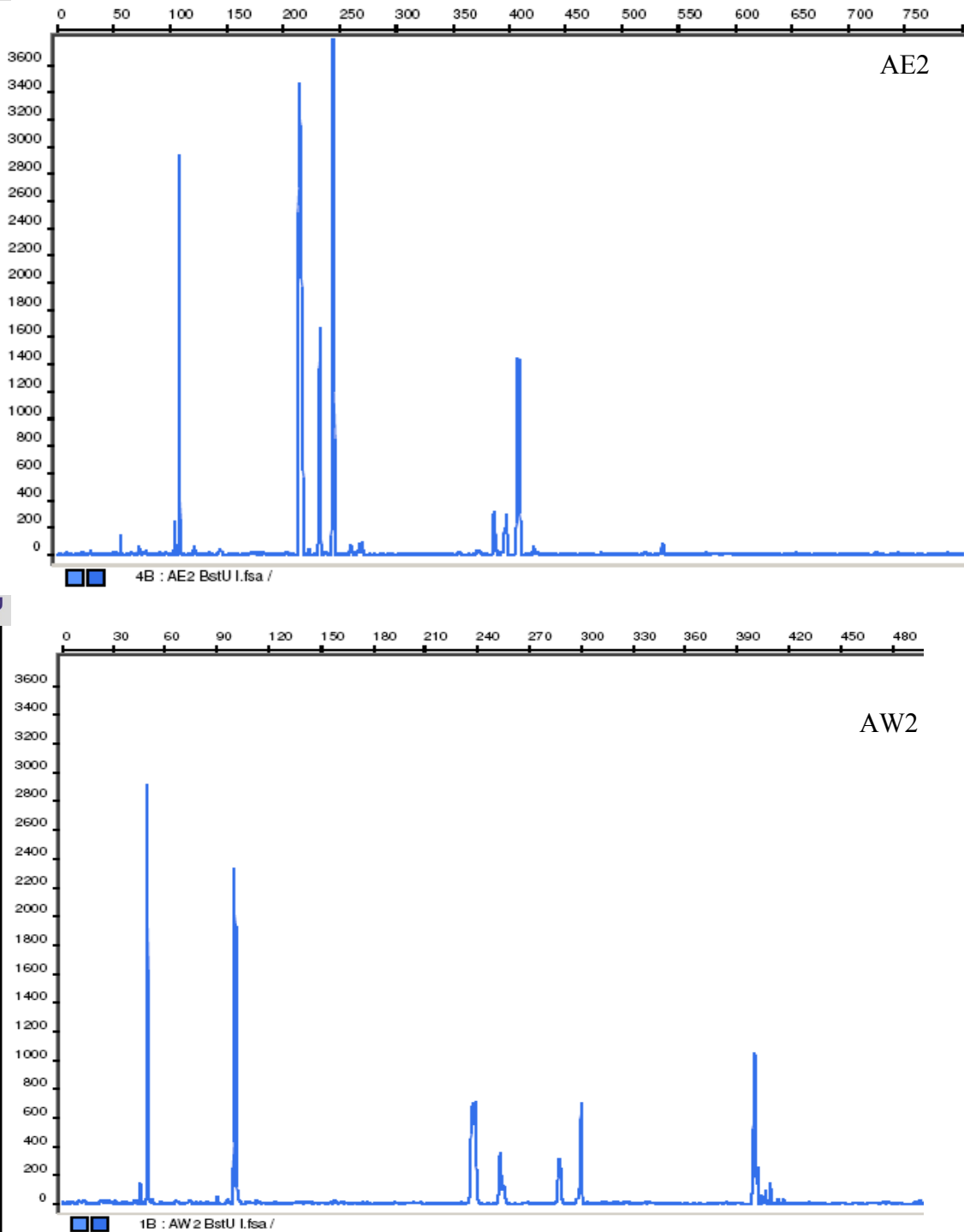
Gambar 10 Profil TRF gen 16S rRNA bakteri AE1 (1 jam perendaman kedelai tempe EMP) dan AW1 (1 jam perendaman kedelai tempe WJB) yang dipotong dengan enzim restriksi *Bst*UI. Sumbu x adalah ukuran TRF (bp) dan sumbu y adalah intensitas pendaran TRF (unit fluoresens).



- 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.

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

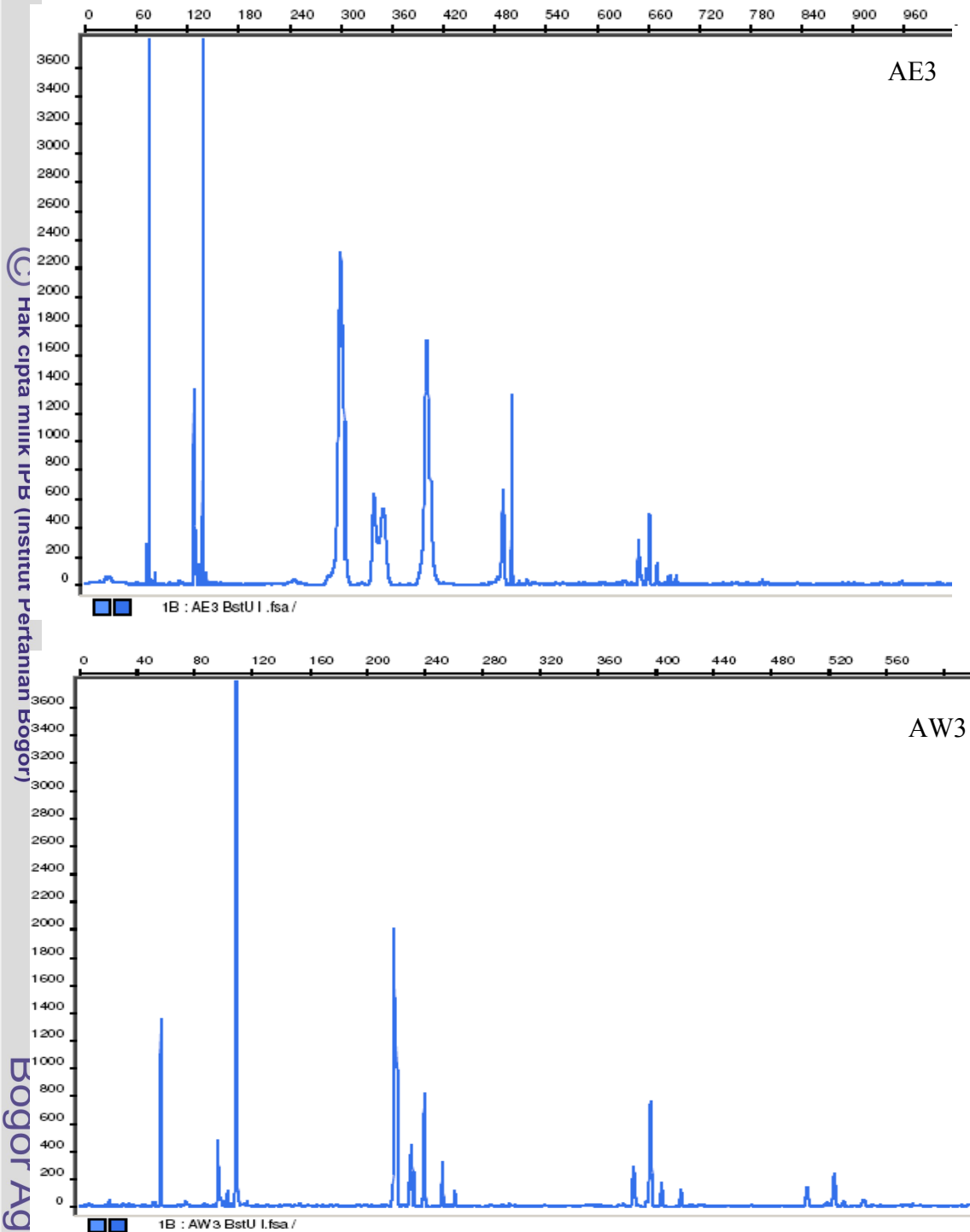
Bogor Agricultural University



Gambar 11 Profil TRF gen 16S rRNA bakteri AE2 (7 jam perendaman kedelai tempe EMP) dan AW2 (7 jam perendaman kedelai tempe WJB) yang dipotong dengan enzim restriksi *Bst*UI. Sumbu x adalah ukuran TRF (bp) dan sumbu y adalah intensitas pendaran TRF (unit fluoresens).



- 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 mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



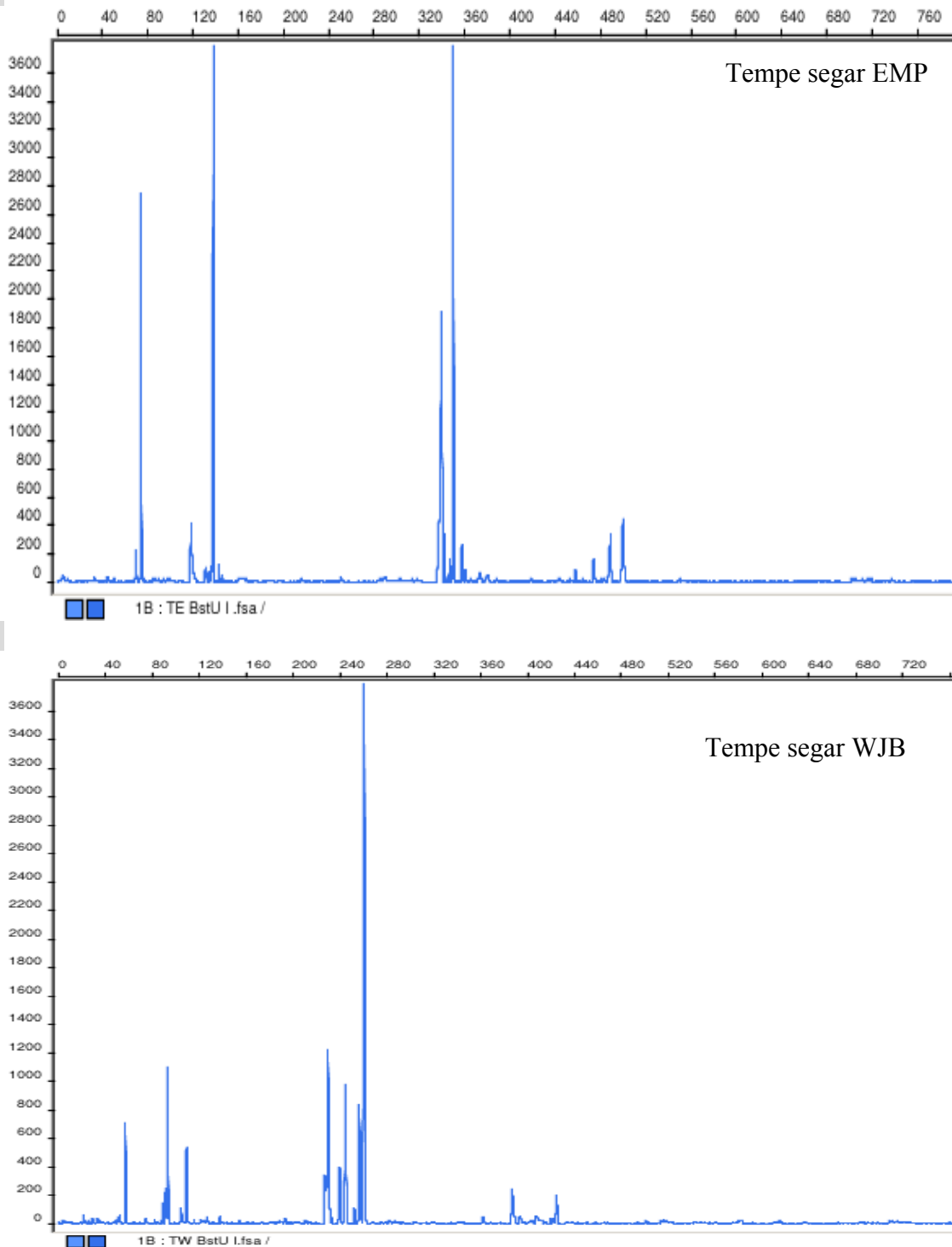
Gambar 12 Profil TRF gen 16S rRNA bakteri AE3 (14 jam perendaman kedelai tempe EMP) dan AW3 (14 jam perendaman kedelai tempe WJB) yang dipotong dengan enzim restriksi *Bst*UI. Sumbu x adalah ukuran TRF (bp) dan sumbu y adalah intensitas pendaran TRF (unit fluoresens).



- 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 mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University



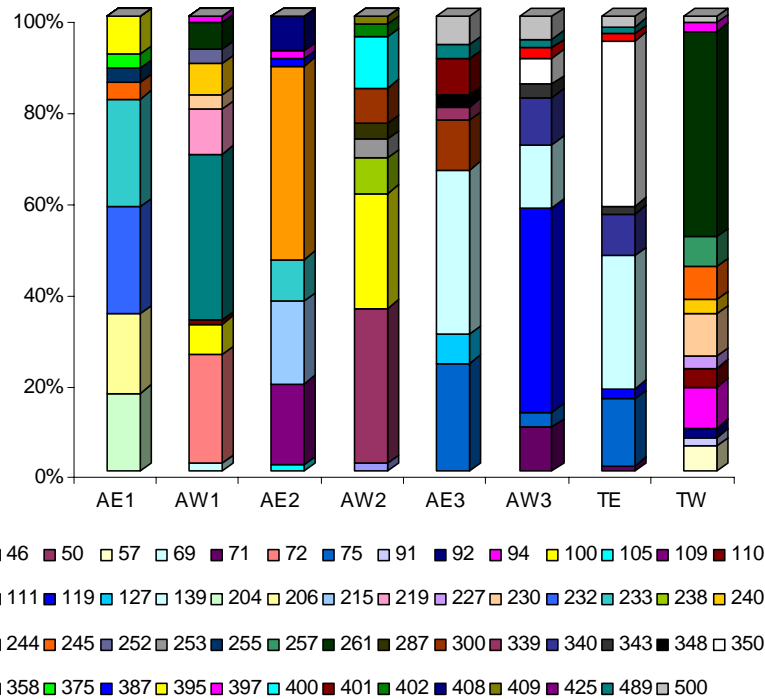
Gambar 13 Profil TRF gen 16S rRNA bakteri Tempe segar EMP dan tempe segar WJB yang dipotong dengan enzim restriksi *Bst*UI. Sumbu x adalah ukuran TRF (bp) dan sumbu y adalah intensitas pendaran TRF (unit fluoresens).

Tabel 4 Jenis TRF (bp) gen 16S rRNA komunitas bakteri dari air rendaman dan tempe segar EMP dan WJB yang dipotong dengan enzim restriksi *Bst*UI

No	AE1	AW1	AE2	AW2	AE3	AW3	TE	TW
1	52.54	69.04	56.96	45.68	71.86	52.48	45.56	52.51
2	62.36	71.88	73.27	49.25	74.44	57.08	70.50	57.35
3	73.29	72.48	104.76	50.00	74.94	74.80	75.00	74.71
4	104.73	73.55	108.22	51.14	77.12	87.30	76.01	87.94
5	109.86	76.22	109.12	74.68	82.64	96.86	118.90	89.08
6	163.49	100.00	110.14	90.62	127.00	103.08	131.76	90.80
7	174.11	105.30	121.75	100.00	133.10	108.37	134.40	92.06
8	190.83	108.00	145.21	101.82	134.84	109.32	136.49	93.57
9	199.76	109.82	146.80	238.44	135.98	110.89	139.00	94.73
10	200.86	110.59	214.86	253.06	137.64	116.63	139.48	105.01
11	203.58	111.96	223.21	255.56	139.00	217.15	143.18	109.52
12	206.05	117.31	233.18	287.44	139.39	219.04	146.90	126.98
13	228.14	118.35	243.13	299.80	142.02	220.10	251.18	137.80
14	232.09	118.98	244.44	400.00	142.59	229.39	290.24	193.58
15	233.37	217.68	259.66	402.02	143.30	230.83	340.00	227.29
16	244.95	219.42	266.84	404.43	245.23	238.30	343.15	230.06
17	255.25	229.68	269.52	406.04	290.32	239.75	346.63	233.10
18	269.65	231.19	372.45	408.94	300.00	252.22	349.10	239.97
19	344.54	239.68	386.77		338.76	260.38	350.00	244.83
20	361.58	252.37	395.86		348.13	384.47	357.88	252.44
21	374.50	260.55	397.36		401.00	392.97	360.72	256.59
22	381.62	266.83	408.18		473.77	396.40	373.86	260.50
23	384.72	376.32	422.32		489.49	403.73	379.76	362.26
24	394.96	384.64			500.00	416.96	380.16	386.98
25	408.46	388.43					380.96	393.23
26		393.54					458.07	407.73
27		396.97					473.94	419.82
28		404.21					488.69	421.90
29		465.76					498.09	424.73



Bila dibandingkan jenis TRF pada setiap tahapan, maka pada umumnya jenisnya berbeda (Gambar 14). Ditemukan ada beberapa jenis yang sama (Tabel 5), namun kelimpahan beberapa jenis TRF yang sama tersebut pada umumnya lebih tinggi pada tempe EMP dibandingkan pada tempe WJB (Tabel 5). Perbedaan jenis TRF ini menggambarkan perbedaan jenis bakteri pada kedua jenis tempe.



Gambar 14 Persentase kelimpahan jenis bakteri tempe EMP dan WJB

Tabel 5 Jenis TRF yang sama yang ditemukan pada tempe EMP dan WJB

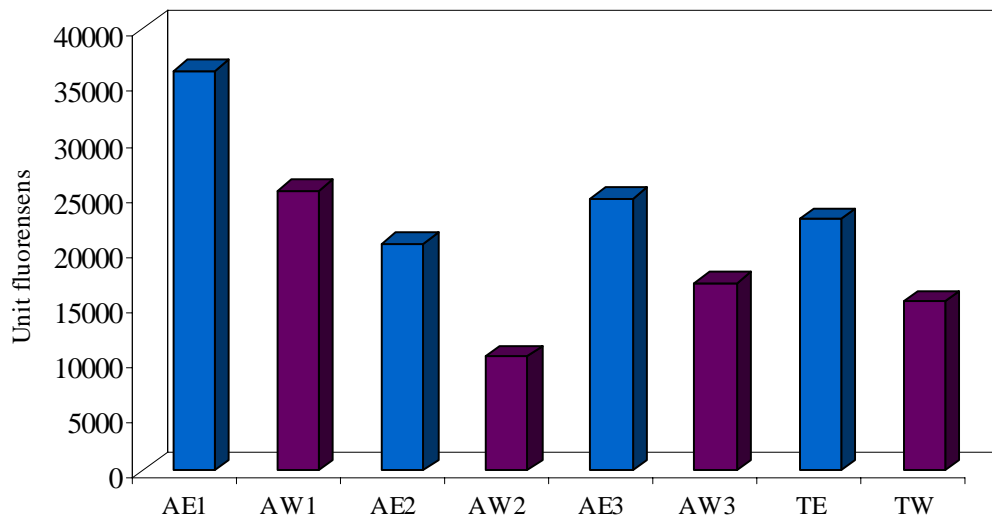
Jenis TRF (bp)	AE1	AW1	AE3	AW3	TE	TW
	(Unit fluoresens)					
75	-	-	5376	512	3130	52
105	337	186	-	-	-	-
110	87	206	-	-	-	-
385	491	251	-	-	-	-

AE1 : 1 jam perendaman kedelai EMP
 AE2 : 7 jam perendaman kedelai EMP
 AE3 : 14 jam perendaman kedelai EMP
 TE : Tempe segar EMP
 AW1 : 1 jam perendaman kedelai WJB
 AW2 : 7 jam perendaman kedelai WJB
 AW3 : 14 jam perendaman kedelai WJB
 TW : Tempe segar WJB

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.

Apabila ingin diketahui pengaruh aktivitas bakteri terhadap intensitas rasa pahit tempe, maka tidak cukup hanya dilihat dari keragaman jenis saja. Hal ini karena meskipun jenis bakteri tertentu ada tetapi jika kelimpahan relatifnya sangat rendah, maka pengaruh aktivitasnya terhadap pembentukan rasa pahit pada tempe juga sangat rendah.

Kelimpahan bakteri pada suatu komunitas yang dianalisis dengan teknik T-RFLP dilihat dari intensitas pendaran TRF yang dihasilkan. Oleh sebab itu, apabila dibandingkan pada setiap tahapannya (AE1 dan AW1, AE2 dan AW2, AE3 dan AW3 serta TE dan TW) (Gambar 15) maka keseluruhan tempe EMP memiliki intensitas pendaran TRF yang lebih tinggi. Intensitas pendaran TRF mulai dari air rendaman hingga tempe segar lebih tinggi sekitar 40.85% - 119.42% (Tabel 6) pada EMP dibandingkan dengan pada tempe WJB. Hal ini menggambarkan bahwa kelimpahan bakteri pada EMP lebih tinggi sekitar 40.85% - 119.42%.



AE1 : 1 jam perendaman kedelai EMP AW1 : 1 jam perendaman kedelai WJB
 AE2 : 7 jam perendaman kedelai EMP AW2 : 7 jam perendaman kedelai WJB
 AE3 : 14 jam perendaman kedelai EMP AW3 : 14 jam perendaman kedelai WJB
 TE : Tempe segar EMP TW : Tempe segar WJB

Gambar 15 Total intensitas TRF pada air rendaman kedelai dan tempe segar EMP dan WJB yang dipotong dengan *Bst*UI.

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.



Tabel 6 Persentase ketinggian kelimpahan bakteri tempe EMP dibandingkan dengan pada tempe WJB.

Contoh	Ketinggian kelimpahan relatif bakteri tempe EMP (%)
AE1 dan AW1	40.85
AE2 dan AW2	119.42
AE3 dan AW3	56.78
TE dan TW	62.85

Jenis dan kelimpahan bakteri pada ekosistem pangan sangat menentukan kualitas bahan pangan hasil fermentasi, karena jenis mikroorganisme yang berbeda memiliki fungsi yang berbeda-beda, dan sangat penting untuk menentukan kondisi lingkungan selama proses fermentasi tersebut berlangsung (Schwan 1998; Ampe *et al.* 2001; Randazzo *et al.* 2002). Pada pengolahan bahan makanan melalui proses fermentasi, pembentukan cita rasa sangat ditentukan oleh jenis mikroorganismenya yang terlibat.

Proses pengolahan tempe merupakan suatu proses fermentasi yang melibatkan komunitas mikroorganisme yang kompleks. Dimana baik kapang maupun bakteri masing-masing memiliki peran penting selama proses pengolahan berlangsung. Bahkan selama proses pengolahan tempe yang membutuhkan waktu sekitar 54 jam, selama 18 jam (30%) dari waktu pengolahan, yaitu pada tahapan perendaman kedelai, bakteri merupakan mikroorganisme yang paling berperan. Oleh sebab itu pendapat yang mengatakan bahwa bakteri merupakan mikroorganisme “kontaminan” yang menunjukkan kesan bakteri tidak penting pada pengolahan tempe tampaknya kurang tepat.

Sejauh ini peranan berbagai jenis bakteri tersebut sehingga menyebabkan perbedaan intensitas rasa pahit belum dapat dijelaskan dengan pasti. Namun, besarnya perbedaan keragaman dan kelimpahan bakteri selama proses fermentasi kedua jenis tempe tersebut menunjukkan besarnya perbedaan aktivitas bakteri selama proses pengolahan berlangsung, terutama berhubungan dengan keragaman aktivitas enzimatik dari masing-masing jenis bakteri tersebut.

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.



Kacang kedelai sebagai bahan baku pembuatan tempe, mengandung protein sekitar 40% dari total berat kering kedelai (Liu, 1997). Hidrolisis protein pada bahan pangan akan menghasilkan peptida yang mengandung asam-asam amino yang bersifat hidrofobik, dan peptida yang demikian menyebabkan rasa pahit (FitzGerald & Cunin 2006). Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa rasa pahit pada hasil hidrolisat kedelai berhubungan dengan terbentuknya peptida tertentu (Kim *et al.* 2003; Reineccius 1994). Selain itu, rasa pahit pada tempe disebabkan juga oleh asam lemak (Hartoyo 1994). Oleh sebab itu, bakteri yang bersifat proteolitik dan bakteri yang menghasilkan enzim yang dapat menghidrolisis lemak diduga berperan penting dalam pembentukan rasa pahit pada tempe pada EMP.

Intensitas rasa pahit yang disebabkan oleh akumulasi jenis peptida tertentu akibat aktivitas proteinase dari *Lactococcus lactis* ditemukan juga pada keju *Cheddar* (Broadbent *et al.* 1998). Flavor rasa pahit pada keju disebabkan karena akumulasi peptida yang bersifat hidrofobik yang melebihi ambang yang dapat dirasakan (Sridhar *et al.* 2005). Selanjutnya, Tan *et al.* (1993) telah melaporkan bahwa aminopeptidase dari *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* WG2 dapat menurunkan konsentrasi peptida hidrofobik sehingga secara drastis dapat menurunkan rasa pahit.

Jenis dan kelimpahan bakteri yang terlibat selama proses pengolahan tempe EMP dan tempe WJB berlangsung sangat kompleks, oleh karena itu aktivitas bakteri tersebut juga sangat kompleks mempengaruhi kualitas tempe. Oleh sebab itu, rendahnya intensitas rasa pahit pada tempe WJB dapat juga terjadi karena adanya aktivitas enzim dari mikroorganisme tertentu yang dapat menghidrolisis peptida yang berasa pahit tersebut sehingga rasa pahit menjadi berkurang. Untuk mengurangi rasa pahit peptida hasil hidrolisis protein pada bahan pangan dapat dilakukan dengan menggunakan enzim exopeptidase termasuk amino dan karboksipeptidase (FitGerald & Cunin 2006). Endopeptidase *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 dapat mengurangi rasa pahit pada keju, enzim ini memotong ikatan dekat asam amino hidrofobik sehingga mengurangi rasa pahit (Sridhar *et al.* 2005).

Hasil penelitian ini belum dapat menjelaskan lebih lanjut tentang jenis bakteri yang bersifat proteolitik, lipolitik, dan jenis bakteri yang menghasilkan 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 memurnikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



peptidase sehingga menyebabkan terjadinya perbedaan intensitas rasa pahit pada tempe EMP dan tempe WJB. Namun, penelitian ini dapat menjadi dasar penelitian lebih lanjut untuk mengkaji lebih detail tentang kontribusi bakteri terhadap flavor tempe. Hal ini penting guna meningkatkan kualitas tempe. Hal yang sama telah dilakukan untuk meningkatkan flavor pada coklat (Schwan 1998).

Perbedaan cara pengolahan tidak berpengaruh terhadap intensitas rasa pahit, namun perbedaan cara pengolahan berpengaruh terhadap kelimpahan bakteri pada tempe (Gambar 15). Pada tempe EMP, setelah perendaman kedelai langsung dicuci dan dikemas, sehingga beberapa jenis bakteri pada air perendaman ditemukan juga secara dominan pada tempe segarnya. Berbeda dengan tempe WJB, setelah perendaman kedelai direbus kembali, sehingga bakteri yang terdapat selama perendaman berlangsung sedikit sekali peluangnya ditemukan pada tempe segarnya.

Untuk mengetahui kemungkinan jenis bakteri sesuai dengan jenis TRFnya dapat dilakukan dengan mencocokkan jenis TRF tersebut dengan *database* (<http://mica.ibest.uidaho.edu/>). Dari hasil pencocokan akan diketahui kemungkinan jenis bakteri dari jenis TRF tersebut. Namun, keterbatasan teknik analisis dengan T-RFLP ini adalah dalam identifikasi jenis bakterinya. Oleh karena hanya sebagian kecil saja dari ujung/fragmen 5' dari gen 16S rRNA yang dianalisis, maka banyak genus bakteri yang memiliki jenis TRF yang sama, sehingga suatu jenis TRF tertentu akan dimiliki oleh beberapa jenis bakteri.

Penggunaan dua atau lebih jenis enzim restriksi dapat mengurangi banyaknya kemungkinan jenis bakteri pada jenis TRF, sehingga pada penelitian ini digunakan dua jenis enzim restriksi (*Bst*UI dan *Msp*I). Dimana kemungkinan jenis bakteri dari jenis TRF yang diperoleh dari enzim *Bst*UI dicek silang dengan *database* enzim restriksi *Msp*I, yaitu dengan mencocokkan antara jenis TRF-*Bst*UI dengan semua TRF-*Msp*I yang muncul. Namun, walaupun telah menggunakan dua jenis enzim restriksi, kemungkinan jenis bakteri yang muncul tetap masih tinggi.

Kelemahan analisis T-RFLP lainnya adalah terdapat kemungkinan jenis TRF tertentu yang tidak terdapat pada *database*. Jenis TRF tertentu belum ada di *database* sebab analisis komunitas bakteri dengan teknik T-RFLP relatif masih baru, sehingga

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.



sampai saat ini *database* tersebut masih terus dikembangkan. Namun demikian, analisis dengan teknik T-RFLP ini merupakan metode yang dapat untuk membandingkan suatu komunitas bakteri pada habitat berbeda. Hal ini penting untuk mendasari penelitian lebih lanjut tentang tempe, sehingga diketahui jenis bakteri yang merugikan dan jenis bakteri yang menguntungkan. Bila informasi tentang jenis dan peran bakteri pada tempe ini telah diketahui, maka dapat digunakan untuk pengontrolan terhadap jenis bakteri yang merugikan dan memanfaatkan secara maksimal bakteri yang dapat meningkatkan kualitas tempe.

Berdasarkan pencocokan dua jenis TRF tempe EMP dan tempe WJB yang didominasi hasil pemotongan dengan enzim *Bst*UI dan dicek silang dengan *Msp*I dengan *database*, maka diperoleh kemungkinan beberapa jenis bakteri pada tempe EMP dan tempe WJB (Tabel 7 dan Tabel 8). Jenis-jenis bakteri yang diperoleh tersebut masih bersifat dugaan karena belum tentu semua jenis bakteri tersebut terdapat pada tempe EMP dan tempe WJB. Oleh karena kemungkinan jenis bakteri hasil pencocokan tersebut jumlahnya sangat banyak, maka jenis yang ditampilkan dibatasi hanya sampai tingkat genus.

Berdasarkan pencocokan jenis TRF dengan *database* ditemukan bahwa kemungkinan jenis bakteri tempe EMP dan tempe WJB didominasi oleh kelompok bakteri yang bersifat *unculturable*. Hal ini menunjukkan bahwa jenis bakteri yang terdapat pada tempe EMP dan tempe WJB didominasi oleh jenis bakteri yang sampai saat ini belum berhasil dikultur pada media buatan (*unculturable*). Keberadaan bakteri yang bersifat *unculturable* secara dominan telah juga ditemukan pada proses fermentasi Mexican pozol (Ampe *et al.* 1999), dan pada proses fermentasi vanilla (Roling *et al.* 2003). Selanjutnya, hasil penelitian ini mendukung penelitian Roling *et al.* (2003) yang melaporkan bahwa kelompok bakteri yang bersifat *unculturable* mempengaruhi flavor bahan pangan yang diolah dengan proses fermentasi. Oleh karena jenis bakteri yang bersifat *unculturable* yang diperoleh dari hasil pencocokan TRF dengan *database* tersebut sangat beragam, maka semuanya dikelompokkan menjadi satu sehingga dilaporkan sebagai kelompok bakteri yang bersifat *unculturable* yang selanjutnya disebut bakteri *uncultured* saja (Tabel 7 dan Tabel 8).

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.

Tabel 7 Kemungkinan jenis bakteri yang dominan pada tempe EMP berdasarkan analisis T-RFLP menggunakan enzim *Bst*UI

Contoh	Jenis TRF (bp)	Kelimpahan relatif (%)	Kemungkinan jenis bakteri
AE1	233	21.82	<i>Bacillus /Bergeyella /Kurthia /Rubrobacter/ /Sporosarcina /bakteri uncultured</i>
	232	21.60	<i>Bacillus /Brevibacterium /Caloramator /Clostridium /Desulfitobacterium /Nitrospina /Oerskovia /Thermodesulfovibrio /bakteri uncultured</i>
AE2	244	39.60	<i>Desulfomonile /Enterococcus /Lactobacillus /Thermomonospora /bakteri uncultured</i>
	215	17.00	<i>Aeromonas /Frankia /Nocardioides /Pseudoxanthomonas /Stenotrophomonas /bakteri uncultured</i>
AE3	139	33.07	<i>Eubacterium /bakteri uncultured</i>
	75	21.83	<i>Clostridium /Streptococcus /Mycobacterium</i>
TE	350	33.19	Tidak ada pada <i>database</i>
	139	26.68	<i>Eubacterium /bakteri uncultured</i>

AE1: 1 jam perendaman kedelai EMP
 AE2: 7 jam perendaman kedelai EMP
 AE3: 14 jam perendaman kedelai EMP
 TE : Tempe segar EMP



Tabel 8 Kemungkinan jenis bakteri yang dominan pada tempe WJB berdasarkan analisis T-RFLP menggunakan enzim *Bst*UI

Contoh	Jenis TRF (bp)	Kelimpahan relatif (%)	Kemungkinan jenis bakteri
AW1	111	33.15	<i>Bacteroidetes/ Clostridium/Cytophaga/Flexibacter/Heliobacillus/Heliobacterium Parabacteroides/ Psychroserpens/ Streptococcus/ Tannerella/ bakteri uncultured</i>
	72	21.79	<i>Exiguobacterium /bakteri uncultured</i>
	50	32.13	Tidak ada dalam <i>database</i>
AW2	100	23.78	<i>Cyanobacterium /Rhodovibrio /bakteri uncultured</i>
	109	41.24	<i>Alkalilimnicola /alpha proteobacterium /Deferribacter /Dethiosulfovibrio/ Flavobacteriaceae /Flavobacterium/Flexistipes/Formosa/Gelidibacter /Geobacter / Geobacter /Gillisia /Magnetococcus /Maorithyas /Mariprofundus /Pedobacter /Pelobacter /Selenomonas /Sphingobacteriaceae /Sphingobacterium /Sporobacter /Streptococcus /Thermoactinomycetaceae /bakteri uncultured</i>
AW3	219	12.63	<i>Candidatus /Kitasatospora /Rhodococcus /Streptomyces /bakteri uncultured</i>
	261	38.3	<i>Meiothermus/ bakteri uncultured</i>
	230	8.5	<i>Ruminococcus/ bakteri uncultured</i>

AW1 : 1 jam perendaman kedelai WJB

AW2 : 7 jam perendaman kedelai WJB

AW3 : 14 jam perendaman kedelai WJB

TW : Tempe segar WJB



Dua jenis bakteri mesofil dari setiap contoh tempe EMP dan tempe WJB yang berhasil ditumbuhkan pada media PCA telah diidentifikasi melalui sekuensing gen 16S rRNANYA (Tabel 3). Selanjutnya, kedua jenis bakteri tersebut dikonfirmasi keberadaannya pada kemungkinan jenis bakteri hasil analisis T-RFLP pada *database*. Tujuannya untuk mengetahui kelimpahan relatif bakteri tersebut pada kemungkinan jenis bakteri hasil analisis T-RFLP.

Lima dari tujuh jenis bakteri mesofil yang telah diidentifikasi dapat ditemukan pada kemungkinan jenis bakteri hasil T-RFLP. Kelima jenis bakteri tersebut adalah *Acetobacter indonesiensis*, *Bacillus subtilis*, *Flavobacterium* sp, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter* sp. Dua jenis bakteri lainnya (*Klebsiella* sp., dan *Brevundimonas* sp.) tidak terdapat pada kemungkinan jenis bakteri hasil T-RFLP. Kelimpahan *Bacillus* sp. yang lebih tinggi pada tempe EMP dibandingkan dengan tempe WJB diperoleh secara konsisten baik melalui analisis secara konvensional maupun dengan teknik T-RFLP.

Analisis secara konvensional ditemukan bahwa pada tempe EMP, *Acetobacter indonesiensis*, dan *Bacillus subtilis*. kelimpahannya masing-masing sekitar 10^6 CFUml⁻¹ pada air rendaman, dan *Flavobacterium* sp. sekitar 10^8 CFUg⁻¹ pada tempe segar. Demikian juga pada tempe WJB ditemukan *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas putida*, dan *Acinetobacter* sp. kelimpahannya masing-masing sekitar 10^1 CFUml⁻¹, 10^6 CFUg⁻¹, 10^3 CFUg⁻¹ (Tabel 3). Kelimpahan bakteri hasil analisis secara konvensional tersebut terdapat hanya dalam jumlah yang kecil pada kemungkinan jenis bakteri hasil TRF (< dari 10%), kecuali *Bacillus* sp. sekitar 21.82% (Tabel 9 dan Tabel 10). Artinya bahwa kelimpahan bakteri total pada tempe EMP dan WJB sesungguhnya terdapat lebih tinggi dari 10^8 CFU yang berhasil dikulturkan secara konvensional pada penelitian ini. Hal ini menggambarkan bahwa keberadaan bakteri selama proses pengolahan tempe sangat kompleks, dan tentu kompleks juga pengaruhnya terhadap cita rasa tempe, khususnya rasa pahit pada tempe. Lebih lanjut, apabila analisis komunitas bakteri pada suatu ekosistem hanya berdasarkan metode konvensional saja, maka analisis tersebut tidak menggambarkan kondisi komunitas bakteri yang sesungguhnya sehingga hasilnya bias.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

© Hak cipta dilindungi Undang-Undang
Institut Pertanian Bogor (IPB)

Bogor Agricultural University

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.

Jenis dan kelimpahan bakteri sangat menentukan kualitas bahan pangan hasil fermentasi, karena jenis mikroorganisme yang berbeda memiliki fungsi yang berbeda-beda, dan sangat penting untuk menentukan kondisi lingkungan selama proses fermentasi tersebut berlangsung (Schwan 1998, Ampe *et al.* 2001, Randazzo *et al.* 2002). Dengan demikian maka mikroorganisme sangat menentukan cita rasa bahan pangan yang diolah melalui proses fermentasi (Schreier 1992).

© 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 mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

