



Sinergisme Pertumbuhan dan Tingkat Kesukaan pada Pembuatan Tempe Probiotik dengan Penambahan *Pichia kudriavzevii* TMT-2 dan *Lactobacillus plantarum* Dad-13

Growth Synergy and Preference Level in Making Probiotic Tempeh with the Addition of *Pichia kudriavzevii* TMT-2 and *Lactobacillus plantarum* Dad-13

Muhammad Raihan Yafi¹, Wisnu Adi Yulianto^{2*}

¹Program Studi Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Agroindustri, Universitas Mercu Buana Yogyakarta
Jl. Wates Km 10 Yogyakarta, Indonesia

²Magister Ilmu Pangan, Fakultas Agroindustri, Universitas Mercu Buana Yogyakarta
Jl. Wates Km 10 Yogyakarta, Indonesia

Email: wisnuadi@mercubuana-yogya.ac.id

*Penulis korespondensi

Abstract

Tempeh probiotics can be made by adding probiotic yeast (*Pichia kudriavzevii* TMT-2) and probiotic bacteria (*Lactobacillus plantarum* Dad-13). This study aims to study the synergism of growth between tempeh molds, probiotic yeast, and bacteria, and determine which panelists prefer probiotic tempeh. This study was conducted using a completely randomized two-factor design. The first factor was the type of inoculum used (mold tempeh with Raprima brand, Raprima + *Pichia kudriavzevii* TMT-2, Raprima + *L. plantarum* Dad-13, Raprima + *P. kudriavzevii* TMT-2 + *L. plantarum* Dad-13). The second factor was the length of fermentation time (0, 24, 48, and 72 hours). The results showed that adding probiotic yeast, probiotic bacteria, and probiotic yeast and bacteria did not inhibit the growth of tempeh molds. The addition of probiotic yeast accelerated the growth rate of tempeh molds. Based on the number of probiotics and the panelists' preference level, the best treatment was tempeh inoculated with Raprima + *P. kudriavzevii* TMT-2 + *L. plantarum* Dad-13. The tempeh contained 8.53 log₁₀ CFU/g of molds, 9.06 log₁₀ CFU/g of yeast, and 8.88 log₁₀ CFU/g of lactic acid bacteria. This tempeh probiotic is worthy of development, especially in diversifying food and its level of preference.

Keywords: *Lactobacillus plantarum* Dad-13, *Pichia kudriavzevii* TMT-2, probiotic tempeh, probiotic yeast, probiotic bacteria

Abstrak

Tempe probiotik dapat dibuat dengan penambahan khamir probiotik (*Pichia kudriavzevii* TMT-2) dan bakteri asam laktat (*Lactobacillus plantarum* Dad-13). Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari sinergisme pertumbuhan antara jamur tempe, khamir dan bakteri probiotik, serta menentukan tempe probiotik yang disukai oleh panelis. Penelitian ini dikerjakan dengan menggunakan rancangan acak lengkap dua faktor. Faktor pertama ialah jenis inokulum (tempe jamur merk Raprima, Raprima + *Pichia kudriavzevii* TMT-2, Raprima + *L. plantarum* Dad-13, Raprima + *P. kudriavzevii* TMT-2 + *L. plantarum* Dad-13). Faktor kedua adalah lama fermentasi (0, 24, 48, dan 72 jam). Hasil penelitian menunjukkan penambahan yeast, bakteri, dan bakteri probiotik tidak menghambat pertumbuhan jamur tempe. Penambahan khamir probiotik mempercepat laju pertumbuhan jamur tempe. Khamir dan bakteri probiotik yang ditambahkan dapat tumbuh dengan baik dan dapat mencapai 9 log₁₀ CFU/g pada akhir fermentasi. Penambahan khamir dan bakteri probiotik tidak menurunkan tingkat kesukaan panelis dibandingkan dengan kontrol (jamur tempe). Berdasarkan jumlah probiotik dan tingkat kesukaan panelis perlakuan terbaik adalah tempe yang diinokulasi dengan Raprima + *P. kudriavzevii* TMT-2 + *L. plantarum* Dad-13. Tempe tersebut mengandung jumlah jamur sebanyak 8,53 log₁₀ CFU/g, khamir 9,06 log₁₀ CFU/g, dan bakteri 8,88 log₁₀ CFU/g. Tempe probiotik ini layak untuk dikembangkan khususnya diversifikasi produk olahannya dan tingkat kesukaan konsumen.

Kata Kunci: *Lactobacillus plantarum* Dad-13, *Pichia kudriavzevii* TMT-2, tempe probiotik, khamir probiotik, bakteri probiotik

Diterima: 3 November 2023, Direvisi: 10 November 2023, Disetujui: 4 Januari 2024



Pendahuluan

Pangan fungsional adalah makanan atau minuman yang mengandung komponen zat aktif yang menyehatkan bagi tubuh manusia apabila dikonsumsi dalam jumlah yang telah ditentukan. Secara lebih rinci, Asosiasi Profesi P3FNI (Perhimpunan Penggiat Pangan Fungsional dan Nutrasetikal Indonesia) mendefinisikan pangan fungsional sebagai pangan segar maupun olahan yang mengandung komponen yang bermanfaat untuk meningkatkan fungsi fisiologis tertentu, dan / atau mengurangi risiko sakit yang dibuktikan berdasarkan kajian ilmiah, harus menunjukkan manfaatnya dengan jumlah yang biasa dikonsumsi sebagai bagian dari pola makan sehari-hari (P3FNI, 2017).

Salah satu produk pangan fungsional ialah pangan probiotik. Pangan probiotik telah diyakini memberikan efek menguntungkan bagi konsumen. WHO/FAO (2006) memberikan batasan probiotik sebagai mikroorganisme hidup yang apabila dikonsumsi dalam jumlah mencukupi akan memberikan manfaat kesehatan bagi penggunaannya. Karena tuntutan dapat menyehatkan manusia itulah, maka kini kriteria probiotik haruslah memiliki sifat-sifat sebagai berikut: resistensi terhadap keasaman lambung, resistensi asam empedu, pelekatan (adesi) pada lendir dan sel epitel, memiliki aktivitas antimikroba melawan mikroorganisme patogen, ko-agregasi dengan patogen, dan memiliki aktivitas hidrolase garam empedu untuk melawan (tahan) komplikasi saluran pencernaan (Kassaa, 2017). Berbagai strain bakteri asam laktat (BAL) termasuk beberapa *Lactobacillus*, sejumlah *Bifidobacterium*, dan khamir *Saccharomyces boulardii* merupakan mikroorganisme utama sebagai probiotik.

Salah satu produk makanan fermentasi asli Indonesia yang dapat dikembangkan menjadi pangan probiotik ialah tempe. Tempe yang selama ini dikonsumsi masyarakat belum termasuk pangan probiotik karena belum mengandung bakteri dan / atau khamir probiotik. Oleh karena itu untuk meningkatkan potensinya sebagai pangan probiotik maka pada waktu pembuatan tempe dapat

ditambahkan bakteri dan / atau khamir probiotik.

Salah satu bakteri probiotik unggulan asli Indonesia yang telah dilaporkan dapat meningkatkan kesehatan *host* atau konsumen ialah *Lactobacillus plantarum* Dad-13 (Rahayu *et al.*, 2021; Rahayu, E.S. and Utami, 2019; Tari *et al.*, 2016; Wulandari *et al.*, 2023). *Lactobacillus plantarum* Dad-13 yang diisolasi dari dadih tersebut telah berhasil diaplikasikan pada pembuatan minuman tape ketan (Nursiwi *et al.*, 2018), minuman yang menyerupai yoghurt (Pamungkaningtyas *et al.*, 2018), keju (Meidistria *et al.*, 2020) dan peningkatan folat pada fermentasi susu skim (Purwandhani *et al.*, 2017) dan pembuatan tape beras parboiled (Utamingdyah *et al.*, 2022).

Sementara itu hasil isolasi dari tomat (TMT-2) telah diketahui memiliki kriteria sebagaimana khamir probiotik. Hasil penelitian Yulianto dan Pujimulyani (2022) melaporkan bahwa isolat khamir TMT-2 memenuhi kriteria sebagai probiotik, yaitu tahan terhadap pH rendah, tahan terhadap garam empedu, kemampuan menghambat bakteri patogen, dan memiliki sifat autoagregasi, koagregasi, dan hidrofobitas. Hasil identifikasi berdasarkan hasil BLAST, isolat khamir TMT-2 *align* / sejajar dengan sekuens-sekuens isolat *Pichia kudriavzevii*, dengan *match percent identity* 100% pada semua hit di Top 10 HIT BLAST (Yulianto, 2023).

Penambahan probiotik baik khamir maupun bakteri dapat terjadi hubungan timbal balik atau asosiasi dengan jamur tempe (*Rhizopus oligosporus*). Virgianti (2015) melaporkan *Rhizopus* sp yang diisolasi dari tempe bersifat antagonis terhadap bakteri patogen enterik: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* dan *Shigella flexneri*. Sementara itu dari hasil analisis mikrobiota usus diketahui *L. plantarum* Dad-13 menyebabkan populasi Firmicutes menurun dan populasi Bacteroidetes (terutama Prevotella) meningkat (Rahayu *et al.*, 2021) dan mampu memberikan efek kesehatan sebagai pengurang diare atau menurunkan enteropatogenik *E. coli* (Tari *et al.*, 2016). Demikian halnya dilaporkan oleh Yulianto (2023), *Pichia kudriavzevii* TMT-2 mampu menghambat *E. coli*, *S. typhi*, dan *B. subtilis*.

Oleh karena itu, kedua jenis probiotik (bakteri dan yeast) tersebut perlu dimanfaatkan untuk pengembangan produk tempe probiotik.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui asosiasi pertumbuhan jamur tempe *Rhizopus oligosporus* dengan *L. plantarum* Dad-13 dan *Pichia kudriavzevii* TMT-2, dan menentukan tempe probiotik yang disukai panelis dan sifat kimianya.

Metode Penelitian

Pembuatan Tempe Probiotik

Pembuatan tempe probiotik dilakukan sebagai berikut. Kedelai kering dibersihkan untuk membuang benda benda asing yang bercampur dengan biji kedelai. Kedelai dicuci, kemudian direbus dengan air mendidih selama 30 menit. Selanjutnya kedelai dikuliti lalu direndam selama 36 jam. Setelah itu kedelai ditiriskan hingga tuntas dan dicuci hingga aroma asam menghilang, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Kedelai steril ditimbang sebanyak 200 g untuk masing-masing perlakuan dan diinokulasi dengan 0,5 g bubuk Raprima yang mengandung 10^6 CFU jamur dan 0,5 g bubuk Raprima + 1 ml khamir probiotik *Pichia kudriavzevii* TMT-2 (1 ml mengandung sekitar 8.10^7 CFU) yang telah ditumbuhkan pada media PGY cair), 0,5 g bubuk Raprima + 1 g bakteri probiotik (1 g bubuk *L. plantarum* mengandung 2.10^8 CFU), dan 0,5 g bubuk Raprima + 1 ml *Pichia kudriavzevii* TMT-2 + 1 g bubuk *L. plantarum*. Dalam 1 L media YPD mengandung pepton 20 g, glukosa 20 g, dan ekstrak 10 g. Kedelai terinokulasi dimasukkan ke dalam kantong plastik yang sudah dilubangi, dan diinkubasi pada suhu ruang.

Pengamatan, Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Penghitungan jumlah mikrobia menggunakan *plate count agar* yang meliputi

jumlah jamur (PDA), khamir (PGYA), dan BAL (MRSA), diikuti penentuan pH dan aktivitas antioksidan (metode DPPH), serta uji tingkat kesukaan panelis, dan sifat kimia tempe probiotik, yang meliputi kadar protein (metode Kjeldahl), air, serat kasar, abu (metode gravimetri), serta tingkat kesukaan tempe oleh panelis. Uji tingkat kesukaan menggunakan 25 panelis dengan skala penilaian: 1 (sangat tidak suka), 2 (tidak suka), 3 (sedikit tidak suka), 4 (sedikit suka), 5 (suka), dan 6 (sangat suka).

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan rancangan percobaan acak lengkap dengan dua faktor. Faktor pertama ialah jenis inokulum (tempe jamur merk Raprima yang diproduksi oleh LIPI, Raprima + *Pichia kudriavzevii* TMT-2, Raprima + *L. plantarum* Dad-13, Raprima + *P. kudriavzevii* TMT-2 + *L. plantarum* Dad-13. Faktor kedua adalah lama fermentasi (0, 24, 48, dan 72 jam).

Data yang diperoleh dihitung secara statistik menggunakan Anova dengan tingkat kepercayaan 95% dan jika terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan menggunakan SPSS *for windows* versi 20.

Hasil dan Pembahasan

Pertumbuhan Jamur

Hasil penghitungan jumlah jamur tempe yang ditambah dengan berbagai jenis inokulum selama 72 jam inkubasi disajikan pada Tabel 1. Terdapat interaksi antara jenis inokulum dengan waktu inkubasi terhadap jumlah jamur tempe yang dihasilkan.

Tabel 1. Jumlah Jamur pada Tempe Probiotik (Log_{10} CFU/g)

Jenis Inokulum	Waktu Inkubasi			
	0 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam
Raprima (jamur tempe)	3,56 ± 0,01 ^b	5,67 ± 0,01 ^e	7,25 ± 0,01 ^h	8,46 ± 0,03 ^j
Raprima + <i>Pichia kudriavzevii</i> TMT-2	3,98 ± 0,50 ^d	6,03 ± 0,02 ^f	7,56 ± 0,04 ⁱ	8,39 ± 0,30 ^j
Raprima + <i>L. plantarum</i> Dad-13	2,96 ± 0,08 ^a	5,61 ± 0,02 ^e	6,60 ± 0,08 ^g	8,46 ± 0,03 ^j
Raprima + <i>Pichia kudriavzevii</i> TMT-2 + <i>L. plantarum</i> Dad-13	3,78 ± 0,01 ^c	5,76 ± 0,06 ^e	7,10 ± 0,30 ^h	8,53 ± 0,17 ^j

Angka yang diikuti oleh notasi huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf kepercayaan 95%

Berdasarkan hasil penelitian pada Tabel 1 diketahui bahwa penambahan probiotik, baik tunggal maupun gabungan (khamir dan bakteri probiotik) tidak mempengaruhi pertumbuhan jamur sebagaimana ditunjukkan pada pembuatan tempe konvensional yang ditambah jamur tempe Rapi (*Rhizopus oligosporus*) di akhir fermentasi (72 jam), yakni mencapai 8,39-8,53 log₁₀ CFU/g). Pada tempe yang diberi inokulum bakteri probiotik, fermentasi sampai jam ke-48 diketahui jumlah pertumbuhan jamurnya lebih rendah dibandingkan dengan tempe yang dihasilkan dengan perlakuan lainnya. Pada fase pertumbuhan ini boleh jadi *L. plantarum* Dad-13 menghasilkan senyawa antimikrobia yang dapat menghambat pertumbuhan jamur. Yang dan Chang (2010) melaporkan *Lactobacillus plantarum* AF1 menghasilkan senyawa C₁₂H₂₂N₂O₂, 3,6-bis(2-methylprophyl)-2,5,piperazinedon dengan BM 226 (Da) yang mampu menghambat *A. flavus* ATCC 22546 dan *A. fumigatus* ATCC 96918. Sebagaimana dilaporkan oleh Tari *et al.* (2016) *L. plantarum* D-13 mampu menurunkan enteropatogenik *E. coli*. Sulistiani (2017) melaporkan bahwa *L. plantarum* dapat menghasilkan asam laktat 71,16-77,91 mg/mL, hidrogen peroksida 0,17-0,25 mg/mL dan bakteriosin yang merupakan senyawa antibakteri yang berfungsi sebagai pengawet.

Dari Tabel 1 tersebut juga menunjukkan penambahan inokulum khamir probiotik (*P. kudriavzevii* TMT-2) dapat mendorong pertumbuhan jamur tempe. Secara alami juga ditemukan di dalam tempe. Yeast, terutama *Saccharomyces cerevisiae* (Kustyawati *et al.*, 2017) dikenal sebagai mikroorganisme penghasil β-glukan (Pengkumsri *et al.*, 2016). Terbentuknya β-glukan yang dihasilkan oleh khamir tersebut dapat menstimulasi atau membantu dalam pertumbuhan jamur, khusus pada pembentukan dinding sel jamur. Dinding sel jamur tersusun oleh organel seluler spesifik dan kompleks yang terdiri dari glukan, kitin, kitosan, dan protein terglukosilasi (Garcia-rubio *et al.*, 2020).

Meskipun *P. kudriavzevii* TMT-2 memiliki sifat antimikrobia dan mampu menghambat *E. coli*, *S. typhi*, dan *B. subtilis* (Yulianto, 2023), dan *L. plantarum* Dad-3

mampu menurunkan populasi *E. coli* (Tari *et al.*, 2016), tetapi tidak menghambat jamur tempe (*Rhizopus oligosporus*). Sebaliknya, penambahan khamir probiotik tersebut dapat mendorong laju pertumbuhan jamur tempe.

Pertumbuhan Yeast

Hasil penghitungan jumlah khamir pada tempe yang ditambah dengan berbagai jenis inokulum selama 72 jam inkubasi disajikan pada Tabel 2. Terdapat interaksi antara jenis inokulum dengan waktu inkubasi terhadap jumlah khamir tempe yang dihasilkan.

Dari Tabel 2 dapat diketahui inokulum khamir probiotik yang ditambahkan pada pembuatan tempe dapat tumbuh baik dan dapat mencapai 9,06 log₁₀ CFU/g baik yang ditambahkan secara individual, maupun bersamaan dengan bakteri probiotik. Demikian pula ditunjukkan meskipun tanpa penambahan inokulum khamir probiotik, tempe yang dihasilkan mengandung sekitar 7,5 log₁₀ CFU/g tempe. Tempe nampaknya merupakan media yang cocok untuk pertumbuhan yeast. Sebagaimana dilaporkan oleh Efriwati *et al.* (2013), populasi khamir sebesar 6,8 - 9,7 log₁₀ CFU/g pada tempe yang diproduksi oleh dua produsen kecil di Bogor, Indonesia. Populasi sebesar 9,7 log₁₀ CFU/g nampaknya sangat tinggi, tergantung pada ukuran sel yeast, hal ini menunjukkan bahwa volume biomassa khamir dapat mewakili 17 hingga 33% tempe (untuk sel berdiameter 4 atau 5 μm). Populasi 8 log₁₀ CFU sel khamir (diameter sekitar 5 μm) per g tempe segar akan menghasilkan biomassa kering sebesar ~6,5 × 10⁻¹ g per kg tempe segar dibandingkan dengan perkiraan biomassa kapang sebesar ~70 g kering biomassa per kg tempe segar (Owens, 2015).

Purwijantiningsih *et al.* (2005) melaporkan terdapat dua belas isolat jamur dan khamir yang diisolasi dari ragi tempe yang memiliki kemampuan menghambat produksi aflatoxin. *Candida* sp1 memiliki kemampuan menghambat produksi aflatoxin tertinggi yakni sebesar 99.96%. Meskipun pada pembuatan tempe ini ditambahkan dengan *P. kudriavzevii* TMT-2 yang memiliki antimikrobia, tetapi tidak ditunjukkan adanya penghambatan pada jamur tempe *R. oligosporus*.

Tabel 2. Jumlah Khamir pada Tempe Probiotik (Log₁₀ CFU/g)

Jenis Inokulum	Waktu Inkubasi			
	0 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam
Raprima (Jamur Tempe)	4,45 ± 0,17 ^a	7,22 ± 0,12 ^d	7,39 ± 0,10 ^e	7,59 ± 0,13 ^f
Raprima + <i>Pichia kudriavzevii</i> TMT-2	5,79 ± 0,11 ^c	7,90 ± 0,02 ^h	8,13 ± 0,09 ⁱ	9,06 ± 0,08 ^j
Raprima + <i>L.plantarum</i> Dad-13	4,48 ± 0,00 ^a	7,21 ± 0,03 ^d	7,21 ± 0,03 ^d	7,48 ± 0,00 ^{ef}
Raprima + <i>Pichia kudriavzevii</i> TMT-2 + <i>L.plantarum</i> Dad-13	5,45 ± 0,04 ^b	7,72 ± 0,03 ^g	8,15 ± 0,06 ⁱ	9,06 ± 0,08 ^j

Angka yang diikuti oleh notasi huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf kepercayaan 95%

Tabel 3. Jumlah Bakteri Asam Laktat pada Tempe Probiotik (Log₁₀ CFU/g)

Jenis Inokulum	Waktu Inkubasi			
	0 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam
Raprima (Jamur Tempe)	5,41 ± 0,08 ^a	7,16 ± 0,19 ^d	7,84 ± 0,07 ^{fg}	7,74 ± 0,04 ^{ef}
Raprima + <i>Pichia kudriavzevii</i> TMT-2	5,27 ± 0,13 ^a	7,34 ± 0,09 ^d	7,34 ± 0,09 ^d	7,65 ± 0,40 ^e
Raprima + <i>L.plantarum</i> Dad-13	6,16 ± 0,09 ^c	7,94 ± 0,02 ^{gh}	8,11 ± 0,02 ^h	9,60 ± 0,01 ^j
Raprima + <i>Pichia kudriavzevii</i> TMT-2 + <i>L.plantarum</i> Dad-13	5,82 ± 0,03 ^b	7,60 ± 0,02 ^e	8,02 ± 0,03 ^{gh}	8,88 ± 0,03 ⁱ

Angka yang diikuti oleh notasi huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf kepercayaan 95%

Tabel 4. Derajat Keasaman (pH) Tempe selama Waktu Inkubasi

Jenis Inokulum	Waktu Inkubasi			
	0 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam
Raprima (Jamur Tempe)	5,28 ± 0,00 ^c	5,05 ± 0,01 ^b	7,34 ± 0,01 ^k	5,96 ± 0,01 ^g
Raprima + <i>Pichia kudriavzevii</i> TMT-2	5,28 ± 0,00 ^c	4,87 ± 0,02 ^a	5,99 ± 0,01 ^g	5,99 ± 0,08 ^g
Raprima + <i>L.plantarum</i> Dad-13	5,28 ± 0,00 ^c	5,52 ± 0,22 ^e	5,40 ± 0,02 ^d	6,98 ± 0,10 ^j
Raprima + <i>Pichia kudriavzevii</i> TMT-2 + <i>L.plantarum</i> Dad-13	5,28 ± 0,00 ^c	5,81 ± 0,06 ^f	6,19 ± 0,01 ^h	6,68 ± 0,01 ⁱ

Angka yang diikuti oleh notasi huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf kepercayaan 95%

Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat

Hasil penghitungan jumlah BAL tempe yang ditambah dengan berbagai jenis inokulum selama 72 jam inkubasi disajikan pada Tabel 3. Terdapat interaksi antara jenis inokulum dengan waktu inkubasi terhadap jumlah BAL tempe yang dihasilkan.

Jumlah BAL tempe pada akhir fermentasi diketahui lebih tinggi secara signifikan ketika dilakukan penambahan inokulum bakteri probiotik secara individual maupun bersamaan dengan khamir probiotik, yakni mencapai 8,88 – 9,60, dibandingkan tempe konvensional dan hanya ditambah khamir probiotik (7,65 – 7,74 log₁₀ CFU/g). Data tersebut menunjukkan bahwa pertumbuhan BAL tidak mengalami penghambatan dengan adanya khamir probiotik, maupun jamur tempe. Meskipun

dilaporkan oleh Virgianti (2015), *Rhizopus* sp yang diisolasi dari tempe bersifat antagonis terhadap bakteri patogen enterik: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* dan *Shigella flexneri*, hal tersebut tidak terjadi pada *L. plantarum* Dad-13.

Terkait jumlah BAL dan khamir pada tempe, Damayanti *et al.* (2021) melaporkan total BAL sebesar 7,16 - 8,25 log₁₀ CFU/g sedangkan total khamir sebesar 4,48 - 7,38 log₁₀ cfu/gram tempe. Aktivitas antijamur tertinggi pada jamur penghasil mikotoksin seperti *Aspergillus parasiticus* dan *Penicillium citrinum* ditunjukkan pada isolat LAB G1 yang diidentifikasi sebagai *Lactobacillus* sp. dan khamir G6K1 dan G6K2 yang diidentifikasi sebagai *Saccharomyces* spp, kesemuanya berasal dari tempe gembus. Aksi antijamur tempe pada penelitian ini tidak ditunjukkan oleh *P. kudriavzevii* dan *L. plantarum* Dad-12.

Derajat Keasaman (pH) Tempe

Hasil pengukuran pH tempe, hasil fermentasi yang ditambah dengan berbagai jenis inokulum selama 72 jam inkubasi disajikan pada Tabel 4. Terdapat interaksi antara jenis inokulum dengan waktu inkubasi terhadap pH tempe yang dihasilkan.

Dari hasil pengukuran pH tempe secara umum dapat dikatakan mengalami peningkatan pH hingga kisaran 5,96 – 6,98. Peningkatan pH selama proses fermentasi tempe dapat disebabkan oleh jamur *R. oligosporus* yang memiliki tingkat aktivitas proteolitik yang tinggi. Aktivitas ini menyebabkan pemecahan senyawa protein menjadi asam amino-asam amino dan amonia, yang pada akhirnya berkontribusi terhadap peningkatan pH tempe. Hal senada juga disampaikan oleh Owens *et al.* (2015) peningkatan produksi biomassa terjadi pada pH 3.0, 4.0 dan 5.0, tetapi mengalami penurunan ketika pH berada pada kisaran 6 – 7.

Perubahan pH kedelai berlangsung selama preparasi pembuatan tempe. Setelah perendaman, pH kedelai sekitar 5 namun setelah perebusan pH meningkat tajam sampai di atas 7 dan pada tahap fermentasi terdeteksi amonia bebas dan pH tempe segar sebesar 6.5 - 6,9 (Steinkraus, 2004). Di samping pembebasan asam lemak, pH meningkat tajam menjadi 7.1 sebagai akibat proteolisis dan deaminasi asam amino-asam amino oleh kapang (Winiati *et al.*, 2015). Selama pertumbuhannya, BAL menurunkan pH hingga 4.6-5.2. Kondisi tersebut dapat merepresi pertumbuhan mikroorganisme patogen untuk ikut tumbuh dan berkembang selama proses perendaman, karena pertumbuhan optimal mikroorganisme patogen pada umumnya pada kisaran pH 6.0-7.0. Selain itu, metabolit seperti asam organik, bakteriosin, karbondioksida, hidrogen peroksida, etanol, dan reuterin dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen (Adams and Nouts, 2001).

Aktivitas Antioksidan Tempe

Hasil penentuan aktivitas antioksidan dengan menggunakan DPPH pada tempe probiotik yang ditambah berbagai jenis inokulum selama 72 jam inkubasi disajikan pada Tabel 5. Terdapat interaksi antara jenis inokulum dengan waktu inkubasi terhadap aktivitas antioksidan tempe yang dihasilkan.

Dari Tabel 5 tersebut menunjukkan bahwa penambahan probiotik khamir dan bakteri, baik secara individual maupun bersamaan pada akhir fermentasi tidak mampu meningkatkan aktivitas antioksidan tempe yang dihasilkan. Semakin lama waktu fermentasi (sampai dengan 72 jam), aktivitas antioksidan meningkat dan tertinggi (18,16%) dihasilkan dengan penambahan jamur tempe Raprima.

Aktivitas antioksidan dari tempe dengan inokulum Raprima tersebut sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh (Widoyo & Handajani, 2015). Hasilnya, dilaporkan bahwa semakin lama fermentasi semakin tinggi aktivitas antioksidan tempe beberapa varietas kedelai. Tempe kedelai hitam dengan perlakuan lama fermentasi 42 jam memiliki aktivitas antioksidan tertinggi yaitu sebesar 67,40%. Meskipun demikian tidak berlaku jika pembuatan tempe tersebut ditambah sel probiotik baik *P. kudriavzevii* maupun *L. plantarum* Dad-13.

Secara umum, aktivitas antioksidan tempe ditentukan oleh kandungan isoflavon, yang dapat menangkal senyawa radikal bebas. Selama fermentasi kedelai terjadi peningkatan aktivitas antioksidan yang disebabkan oleh terbentuknya isoflavon bebas atau aglikon. Menurut Sheih *et al.* (2014), *Rhizopus* spp. pada tempe dapat meningkatkan aktivitas antioksidan karena menghasilkan enzim glukosidase yang menghidrolisis senyawa isoflavone glikosida kedelai menjadi senyawa isoflavon bebas pada tempe (Pabesak *et al.*, 2013).

Sementara itu, aktivitas antioksidan dari khamir ditunjukkan karena mengandung (1→3)-β-D -glukan dan β-glukan lainnya yang ditemukan di dinding sel (Jaehrig *et al.*, 2007). Selain senyawa β-glukan, Datta *et al.* (2017) melaporkan *S. boulardii* secara komparatif menghasilkan potensi antioksidan 6 hingga 10 kali lipat lebih besar, dengan total fenolat dan flavonoid berturut-turut 70 dan 20 kali lipat lebih tinggi di dalam fraksi ekstraseluler. Yulianto *et al.* (2022) juga melaporkan bahwa aktivitas antioksidan tape ketan putih dapat ditingkatkan dengan penambahan sel probiotik (*Saccharomyces boulardii* dan / atau *Lactobacillus plantarum* Dad-13). Pada tape ketan hitam aktivitas antioksidannya (87,57-88,61 %RSA) lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas tape ketan putih (15,58-51,22 %RSA). Meskipun demikian, fenomena

peningkatan aktivitas antioksidan tersebut tidak terbukti ketika khamir dan bakteri probiotik ditambahkan pada pembuatan tempe. Dengan kata lain, penambahan bakteri dan / atau khamir probiotik tidak meningkatkan aktivitas antioksidan pada tempe yang dihasilkan.

Tingkat Kesukaan

Uji sesoris tingkat kesukaan dilakukan dengan 5 parameter, yaitu warna, aroma, rasa, tekstur dan keseluruhan, uji ini menghadirkan 25 orang panelis semi terlatih. Panelis diminta untuk mencoba tempe mentah (*fresh*) lalu menilai tingkat kesukaan dengan skala penilaian: 1 = sangat tidak suka, 2 = tidak suka, 3 = sedikit tidak suka, 4 = sedikit suka, 5 = suka, dan 6 = sangat suka. Hasil uji tingkat kesukaan panelis terhadap tempe probiotik disajikan pada Tabel 6.

Warna tempe yang lebih disukai ialah tempe yang ditambah dengan inokulum khamir probiotik dan gabungan khamir dan bakteri probiotik. Tempe tersebut nampak relatif lebih putih dibanding tempe dari hasil fermentasi dengan perlakuan lainnya. Keberadaan khamir dapat mendorong pertumbuhan jamur tempe sehingga miselinya menutupi seluruh permukaan kedelai yang difermentasi. Seiring dengan berlalunya waktu inkubasi, warna putih pada hifa jamur secara perlahan berubah menjadi hitam seiring dengan terbentuknya sporangiospora (Nurrahman *et al.*, 2012).

Hasil uji statistik untuk atribut mutu aroma, rasa dan tekstur dari keempat perlakuan tersebut tidak berbedanya nyata atau

pembuatan tempe dengan penambahan probiotik tidak mempengaruhi tingkat kesukaan panelis atau sama dengan tempe konvensional. Aroma yang terdeteksi akibat dari terbentuknya senyawa-senyawa hasil fermentasi kedelai. Selama fermentasi, jamur, bakteri, dan khamir memiliki enzim proteolitik, lipolitik, dan lainnya sehingga mengurai protein dan lemak menjadi senyawa lebih sederhana seperti asam amino, ester, asam lemak, etanol, asetaldehid, etil asetat, serta etil butirat. Senyawa-senyawa tersebut merupakan elemen penting pembentuk flavor dan aroma yang dihasilkan.

Rasa tempe tidak dipengaruhi oleh jenis inokulum yang ditambahkan. Rasa khas tempe sangat kuat dan masih ada rasa langunya, meskipun hasil tempe yg diinokulasi dengan khamir agak terasa manis. Tekstur tempe yang kompak dari keempat perlakuan menunjukkan tidak berbeda nyata. Menurut Nurrahman *et al.* (2012) dalam proses fermentasi oleh jamur, terbentuk benang-benang putih yang mengikat butiran kedelai, yang kemudian menghasilkan tekstur yang padat dan terintegrasi.

Hasil analisis statistik anova ($p < 0,05$) untuk atribut mutu keseluruhan diketahui tidak ada perbedaan dari keempat perlakuan. Dengan kata lain penambahan inokulum probiotik pada pembuatan tempe dapat dihasilkan tempe yang memiliki tingkat kesukaan yang sama dengan tempe yang hanya diinokulasi dengan jamur tempe Raprime dengan skor 3,64 – 4,28 atau berada pada tingkat sedikit tidak suka sampai dengan suka.

Tabel 5. Aktivitas Antioksidan (%) selama 72 Jam Inkubasi Tempe

Jenis Inokulum	Waktu Inkubasi			
	0 Jam	24 Jam	48 Jam	72 Jam
Raprime (Jamur Tempe)	9,02±0,30 ^{ab}	10,58±0,51 ^{abc}	19,77±0,82 ^d	18,16±0,86 ^d
Raprime + <i>Pichia kudriavzevii</i> TMT-2	11,09±1,05 ^{abc}	10,58±0,88 ^{abc}	10,55±0,75 ^{abc}	12,20±0,75 ^{bc}
Raprime + <i>L.plantarum</i> Dad-13	6,19±1,04 ^a	12,91±1,07 ^{bc}	10,11±1,02 ^{abc}	11,46±0,89 ^{abc}
Raprime + <i>Pichia kudriavzevii</i> TMT-2 + <i>L.plantarum</i> Dad-13	8,38±1,40 ^{ab}	15,09±0,9 ^{cd}	13,08±1,01 ^{bc}	12,05±1,53 ^{bc}

Angka yang diikuti oleh notasi huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf kepercayaan 95%.

Tabel 6. Uji Tingkat Kesukaan Sensoris Tempe Probiotik

Jenis Inokulum	Parameter				
	Warna	Aroma	Rasa	Tekstur	Keseluruhan
Raprima (Jamur Tempe)	3,76 ^a	3,44 ^a	3,72 ^a	3,88 ^a	3,64 ^a
Raprima + <i>Pichia kudriavzevii</i> TMT-2	4,56 ^b	3,96 ^a	3,32 ^a	3,56 ^a	3,64 ^a
Raprima + <i>L.plantarum</i> Dad-13	4,04 ^a	3,72 ^a	3,8 ^a	4,04 ^a	3,92 ^a
Raprima + <i>Pichia kudriavzevii</i> TMT-2 + <i>L.plantarum</i> Dad-13	4,68 ^b	4,16 ^a	3,96 ^a	4,16 ^a	4,28 ^a

Angka yang diikuti oleh notasi huruf yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf kepercayaan 95%.

Tabel 7. Nilai Gizi Tempe Probiotik dengan Inokum Raprima + *Pichia kudriavzevii* TMT 2 + *L.plantarum* Dad-13

Nilai Gizi	SNI 314	% Hasil penelitian
Kadar air	≤65,00%	34,42%
Kadar protein	≥15,00%	20,20%
Kadar serat kasar	≤2,50%	11,90%
Kadar abu	≤1,00%	0,87%

Komposisi Kimia Tempe

Berdasarkan jumlah sel probiotik dan tingkat kesukaan tempe, maka tempe yang terbaik ialah tempe yang dibuat dengan penambahan gabungan khamir dan bakteri probiotik. Hasil analisis komponen penyusun tempe tersebut disajikan pada Tabel 7.

Hasil uji kadar air menunjukkan bahwa tempe probiotik memiliki kadar air sebesar 34,42%, yang telah memenuhi syarat mutu tempe sesuai dengan Standar Nasional Indonesia (Badan Standar Nasional, 2015) yang menetapkan kadar air minimal ≤65,00%. Hasil analisis kadar protein tempe probiotik sebesar 20,20%. Hasil ini telah memenuhi syarat mutu protein sesuai dengan SNI Tempe Kedelai yang menyatakan harus sama dengan atau lebih besar dari 15% kadar protein. Kadar serat kasar tempe probiotik sebesar 11,90%. Hasil ini tidak memenuhi syarat ketentuan SNI yang menyatakan kadar serat kasar sebanyak sama dengan atau lebih kecil dari 2,5%. Tingginya serat kasar tersebut dapat disebabkan oleh tingginya jumlah biomassa probiotik (khamir dan bakteri), serta jumlah miselium jamur tempe yang tumbuh pada kedelai tersebut yang terhitung sebagai serat kasar pada tempe. Hasil analisis kadar abu tempe probiotik sebesar 0,87%. Hasil ini telah memenuhi ketentuan SNI yang mensyaratkan

kadar abu tempe kedelai sebanyak sama atau lebih kecil dari 1%.

Simpulan dan Saran

Penambahan yaeast, bakteri, dan khamir dan bakteri probiotik tidak menghambat pertumbuhan jamur tempe. Penambahan khamir probiotik mempercepat laju pertumbuhan jamur tempe. Khamir dan bakteri probiotik yang ditambahkan dapat tumbuh dengan baik dan dapat mencapai 9 log₁₀ CFU/g pada akhir fermentasi. Penambahan khamir dan bakteri probiotik tidak menurunkan tingkat kesukaan panelis dibandingkan dengan kontrol (jamur tempe). Berdasarkan jumlah probiotik dan tingkat kesukaan panelis perlakuan terbaik adalah tempe yang diinokulasi dengan Raprima + *P. kudriavzevii* TMT-2 + *L. plantarum* Dad-13. Tempe tersebut mengandung jumlah jamur sebanyak 8,53 log₁₀ CFU/g, khamir 9,06 log₁₀ CFU/g, dan bakteri 8,88 log₁₀ CFU/g dengan pH 6,68 dan kadar antioksidan sebesar 12,05%. Tempe tersebut mengandung 20,20% protein, 34,42% kadar air, 11,90% serat kasar, dan 0,87% kadar abu. Tempe probiotik ini layak dikembangkan untuk tingkat

kesukaannya dan diversifikasi produk olahannya.

Penelitian yang perlu dilanjutkan ialah kajian metabolit yang dihasilkan oleh jamur, yeast, dan bakteri probiotik selama fermentasi untuk mengetahui asosiasi pertumbuhan antar mikrobia tersebut.

Ucapan Terima Kasih

Penulis menyampaikan terima kasih penulis kepada Paoyan S.P. yang telah membantu penelitian ini, dan Rektor serta Kepala LPPM Universitas Mercu Buana Yogyakarta yang telah memberikan dana riset dan mendorong penguatan Penelitian Payung, khususnya Pengembangan Khamir Probiotik di Indonesia.

Daftar Pustaka

- Adams, M.R. & Nouts, M.JR. (2001). *Fermentation and Food Safety*. An Aspen Publication.
- Badan Standarisasi Nasional. 2015. *Tempe Kedelai*. SNI 3144:2015. Jakarta.
- Damayanti, E., Shabrina, N., Prihantoro, F.A. & Shoviri, M. (2021). Antifungal activities of lactic acid bacteria and yeast isolated from various types of Tempe. Antifungal activities of lactic acid bacteria and yeast isolated from various types of Tempe. *IOP Conference Series Materials Science and Engineering* 1011(1): 012021
- Datta, S., Timson, D. J. & Annapure, U. S. (2017). Antioxidant properties and global metabolite screening of the probiotic yeast. *J Sci Food Agric* 97(9): 3039-3049.
- Owens, D.J. (2015). *Indigenous Fermented Foods of Southeast Asia*. CRC Press. Boca Raton.
- Efriwati, Suwanto, A., Rahayu, G. & Nuraida, L. (2013). Population Dynamics of Yeasts and Lactic Acid Bacteria (LAB) During Tempeh Production. *HAYATI Journal of Biosciences* 20(2): 57–64.
- Garcia-rubio, R., Oliveira, H. C. De, Rivera, J., Niño-vega, G. A., & Hall, R. A. (2020). *The Fungal Cell Wall: Candida , Cryptococcus , and Aspergillus Species*. *Frontiers in Microbiology* 10: 1–13.
- Jaehrig, S.C., Rohn, S., Kroh, L.W., Fleischer, L.G. & Kurz ,T. (2007). In vitro potential antioxidant activity of (1→3),(1→6)-beta-D-glucan and protein fractions from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. Agric. Food Chem* 55: 4710–4716.
- Kassaa, I. A. L. (2017). Methods and Techniques to Evaluate the Antiviral Activity of a New Probiotic Strain. In: *New Insights on Antiviral Probiotics from Research to Applications* (I.A. Kassaa, ed., 2017). *Springer International Publishing AG Switzerland* 1(1): 1-25.
- Kustyawati, M.E., Nawansih, O. & Nurdjanah, S. (2017). Profile of aroma compounds and acceptability of modified tempeh. *International Food Research Journal* 24(2): 734-740.
- Meidistria, T., Sembiring, L., Rahayu, E. S., Haedar, N., & Dwyana, Z. (2020). Survival of *Lactobacillus plantarum* dad 13 in probiotic cheese making. *IOP Conference Series Materials Science and Engineering* 575(2020): 012020.
- Nurrahman, N., Astuti, M., Suparmo, S., Soesatyo, M. H. N. E. (2012). Pertumbuhan Jamur, Sifat Organoleptik, dan Aktivitas Antioksidan Tempe Kedelai Hitam yang Diproduksi dengan Berbagai Jenis Inokulum. *Agritech* 32(1): 60–65.
- Nursiwi, A, Sekar, A., Supriyanto, Rahayu, S. E. (2018). Development of the Traditional Tape Ketan into Probiotic Drink with the Supplementation of Lactic Acid Bacteria. *Indonesian Food and Nutrition Progress* 15(1): 11–20.
- P3FNI. (2017). *Apa Itu Pangan Fungsional?*P3FNI. <https://p3fni.org/>.
- Pabesak, RV., Lusiawati Dewi, L. & Lestario, L. (2013). Aktivitas Antioksidan dan Fenolik Total Pada Tempe Dengan Penambahan Biji Labu Kuning (*Cucurbita moschata* ex Poir). *Prosiding Seminar Nasional X Pendidikan Biologi FKIP UNS. Solo*.
- Pamungkaningtyas, F. H., Kamil, R. Z. & Setyawan, R. H. (2018). Sensory Evaluation of Yogurt-like Set and Yogurt-like Drink Produced by Indigenous Probiotic Strains for Market Test. *Indonesian Food and Nutrition Progress* 15(1): 1-10.
- Pengkumsri, N., Sivamaruthi, B. S., Sirilun, S., & Peerajan, S. (2016). Extraction of β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of different extraction methods and in Vivo assessment of immunomodulatory effect in mice. *Food*

- Science and Technology* 37(1): 124-130.
- Purwandhani, S. N., Utami, T., Millati, R., & Rahayu, E. S. (2017). Potency of *Lactobacillus plantarum* Isolated from Dadih to Increase the Folate Levels in Fermented Milk. *Agritech* 37(4): 395-401.
- Purwijantiningsih, E., Dewanti-hariyadi, R., & Nurwitri, C. C. (2005). Penghambatan Produksi Aflatoksin dari *Aspergillus flavus* oleh Kapang dan Khamir yang Diisolasi dari Ragi Tempe. *Biota X* (3): 146-153.
- Rahayu, E.S. and Utami, T. (2019). *Probiotik dan Gut Microbiota serta Manfaatnya pada Kesehatan*. PT Kanisius. Yogyakarta.
- Rahayu, E. S., Mariyatun, M., Manurung, N. E. P., Hasan, P. N., Therdtatha, P., Mishima, R., Komalasari, H., Mahfuzah, N. A., Pamungkaningtyas, F. H., Yoga, W. K., Nurfiana, D. A., Liwan, S. Y., Juffrie, M., Nugroho, A. E., & Utami, T. (2021). Effect of probiotic *Lactobacillus plantarum* Dad-13 powder consumption on the gut microbiota and intestinal health of overweight adults. *World Journal of Gastroenterology* 126(1): 107-128.
- Sheih, I., Fang, T. J., Wu, T., & Chen, R. (2014). Effects of fermentation on antioxidant properties and phytochemical composition of soy germ. *J Sci Food Agric* 94: 3163-3170.
- Sulistiani. 2017. Senyawa Antibakteri yang Diproduksi oleh *Lactobacillus plantarum* dan Aplikasinya untuk Pengawetan Bahan Ikan. *Jurnal Biologi Indonesia* 13(2): 233-240.
- Steinkraus, K. (2004). Traditional fermentations as industrial resources. *Acta Biotechnol* 3: 1-12.
- Tari, A.I.N, Handayani,C.B., Sudarmi. 2016. Potensi probiotik indigenus *Lactobacillus plantarum* dad 13 pada yogurt dengan suplementasi ekstrak ubi jalar ungu untuk penurunan diare dan radikal bebas. *Agritech* 36 (1): 7-14.
- Utamingdyah, AB, Yulianto, WA, Pujimulyani, D. (2022). Pengaruh Jenis Beras dan Konsentrasi Karboksimetil Selulosa (CMC) terhadap Tape Beras Probiotik dan Produk Es Krim. *Agritech* 42(2): 165-176.
- Virgianti, D. P. (2015). Uji Antagonis Jamur Tempe (*Rhizopus* sp) terhadap Bakteri Patogen Enterik. *Biosfera* 32 (3): 162-168.
- WHO/FAO. (2006). *Probiotics in food*. In *Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of The United of Nations.
- Widoyo, S., & Handajani, S. R. I. (2015). Pengaruh lama fermentasi terhadap kadar serat kasar dan aktivitas antioksidan tempe beberapa varietas kedelai. *Biofarmasi* 13(2): 59-65.
- Winiati, PR, Rindit, P., Santoso, U. & Nuraida, L., A. (2015). *Tinjauan Ilmiah Proses Pengolahan Tempe Kedelai*. Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia (PATPI).
- Wulandari, W, Yulianto, W.A. & Pujimulyani, D. (2023). Probiotic potential of the Indonesian local variety of fermented parboiled rice. *Food Research* 7(2): 96 - 106.
- Yang, E. J., & Chang, H. C. (2010). Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *International journal of food microbiology* 139(1-2): 56-63.
- Yulianto, W.A., Pujimulyani, D., Pratami, C.A. (2022). The Potential of Glutinous Rice Tape Added with *Lactobacillus plantarum* Dad-13 And *Saccharomyces boulardii*. *J. Functional Food & Nutraceutical* 4(1): 57-66.
- Yulianto, W.A. (2023). *Evaluasi Keamanan dari Isolat Yeast Probiotik Dari Sayur-Sayuran dan Buah-Buahan [Laporan Penelitian Payung]*. Universitas Mercu Buana. Yogyakarta.
- Yulianto, W.A. & Pujimulyani, D. (2022). *Isolasi dan Karakterisasi Potensi Yeast Probiotik Dari Berbagai Sumber [Laporan Penelitian Payung]*. Universitas Mercu Buana. Yogyakarta.