

PERUBAHAN KIMIA DAN MIKROBIOLOGI TEMPE BUSUK SELAMA FERMENTASI

Chemical and Microbiological Changes of Over Fermented Tempeh During Fermentation

Vivi Nuraini^{1)*}, Irvia Resti Puyanda¹⁾, Widasari Atrilania Sri Kunciati¹⁾,
Laurensia Atha Margareta¹⁾

¹⁾Fakultas Teknologi dan Industri Pangan, Universitas Slamet Riyadi Surakarta
Jalan Sumpah Pemuda No.18, Kadipiro, Kec. Banjarsari, Kota Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia

*Korespondensi Penulis: nurainivivi@gmail.com

ABSTRACT

Tempeh is a very popular food because it is delicious and has good nutritional value. Over-fermented tempeh is used as a seasoning in dishes such as lodeh and sambal tumpang. Thus, it is necessary to know the length of time tempeh fermentation is safe for consumption. The purpose of this study was to determine the chemical and microbiological quality of over-fermented tempeh and the effect of the packaging used. This study used a 2-factor factorial completely randomized design. The first factor is the storage time of tempeh (1, 3, 5, 7, and 9 days), and the second factor is the type of tempeh packaging (plastic, teak leaves, and banana leaves). The results of the water content test showed that the tempeh began to decay in storage for 5 days. Teak leaf packaging has the lowest water content of the others. Tempeh, which has the highest protein content of 0.60 g/L, is tempeh packaged in teak leaves that has been stored for 3 days. Tempeh stored for 9 days has high water content, exceeding the maximum SNI standard (SNI 3144:2015) by about 65%. Soluble protein levels increased and then decreased during the decomposition process. Free fatty acids continued to experience a decrease in storage for 9 days, which indicated that the process of decay had occurred. The highest free fatty acids were found after 3 days of storage in plastic packaging, which reached 6.2 mg NaOH/g, while tempeh packaged with teak on the third day still showed a lower value of 3.83 mg NaOH/g. The total bacteria test showed an increasing trend from the first day to the ninth day of storage. Tempeh was still suitable for consumption up to five days after being stored. After 5 days of storage, tempeh has decreased in quality. Teak leaves have been proven to be able to maintain the quality of tempeh better than plastic packaging or banana leaf packaging.

Keywords: banana leaf, FFA (free fatty acid), teak leaf, tempeh

PENDAHULUAN

Tempe merupakan salah satu makanan favorit di Indonesia. Secara nasional, konsumsi kedelai total yang terdapat pada makanan jadi seperti tahu, tempe, dan kecap mengalami peningkatan selama tahun 2015-2019, dengan rata-rata pertumbuhan sebesar 0,72% (Sabarella *et al.*, 2020). Peningkatan konsumsi tempe dipengaruhi oleh harga tempe yang murah

tetapi kualitas gizinya baik. Proses fermentasi menyebabkan tempe memiliki beberapa keunggulan dibandingkan kacang kedelai. Tempe memiliki enzim fitase yang berperan mendegradasi asam fitat pada kedelai karena peran kapang (Perdani & Utama, 2020). Selain itu, kapang yang tumbuh pada tempe mampu menghasilkan enzim protease untuk

menguraikan protein menjadi peptida dan asam amino bebas (Astawan, 2008).

Selain tempe segar, masyarakat juga gemar mengonsumsi tempe yang difermentasi melebihi waktu biasa yang sering disebut tempe busuk. Tempe terfermentasi lanjut dikenal oleh masyarakat dengan nama tempe busuk. Tempe busuk (*over fermented*) juga diketahui memiliki manfaat untuk kesehatan karena memiliki kandungan isoflavon yang tinggi. Soetjipto *et al.* (2018) melakukan penelitian dengan mengisolasi gistein yang merupakan salah satu bagian dari isoflavon dari sumber tempe busuk menghasilkan kandungan gistein dalam serat kasar dan dalam isolat berturut-turut 4737,50 dan 31,36 g/g ekstrak.

Tempe busuk diminati karena memiliki rasa dan aroma spesifik “semangit”. Rasa unik “semangit” ini bagi sebagian orang menjadikan cita rasa makanan menjadi lebih lezat. Tempe busuk banyak digunakan untuk berbagai masakan seperti sayur lodeh, sayur tumpang, gudeg, bothok, dan sambal (Rachmawati *et al.*, 2019).

Tempe busuk diperoleh dengan cara menyimpan tempe lebih lama agar proses fermentasi tetap berjalan. Lemak pada tempe mengalami peningkatan derajat ketidakjenuhan karena adanya proses fermentasi. Terjadi peningkatan asam lemak tidak jenuh majemuk pada tempe sehingga hal tersebut memberikan efek baik untuk kesehatan karena dapat menurunkan kandungan kolesterol serum dan menetralkan efek negatif sterol dalam tubuh (BSN, 2012). Menurut Deliani (2008), lama fermentasi tempe yang semakin meningkat juga akan meningkatkan jenis asam lemak yang

dihasilkan dari proses pertumbuhan bakteri asam laktat (BAL) selama proses fermentasi.

Akan tetapi fermentasi berkepanjangan juga akan memberikan efek negatif. Tempe segar hanya memiliki umur simpan selama 2 hari dalam suhu ruang, meskipun pada penyimpanan 3 dan 4 hari masih memenuhi standar SNI 3144:2015 tetapi setelah melewati 2×24 jam kapang akan mati sehingga yang akan tumbuh adalah bakteri perombak protein. Oleh karena itu, maka tempe akan menjadi mudah busuk. Tempe busuk masih bisa dikonsumsi, akan tetapi nilai gizinya telah banyak berkurang. Batas waktu aman untuk mengonsumsi tempe busuk belum diketahui sehingga perlu dilakukan penelitian terkait apa saja perubahan kimia dan mikrobiologi tempe selama fermentasi hingga fermentasi berlebih. Tujuan penelitian adalah mengetahui perubahan kimia dan perubahan mikrobiologi tempe busuk selama proses fermentasi berlanjut. Informasi yang diperoleh akan dapat digunakan untuk menentukan batasan waktu tempe aman dikonsumsi dan masih memiliki nilai gizi. Selain itu, penelitian juga bertujuan untuk mendapatkan perlakuan kemasan dan lama fermentasi terbaik.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan untuk penelitian terdiri dari alat untuk pembuatan tempe dan untuk analisis. Alat untuk pembuatan tempe antara lain ember, panci pengukus, tampah, dan pengaduk. Peralatan untuk penyimpanan berupa inkubator (Mimmert). Alat analisis terdiri atas oven (Mimmert), desikator (Duran),

labu soxhlet (Iwaki), krus porselen, sedok/spatula, waterbath, gelas beker 100 mL, erlenmeyer 100 mL, tabung reaksi, pipet ukur 1 mL, pipet ukur 10 mL, mortar, kuvet, spektrofotometer (Shimadzu), timbangan analitik (Shimadzu AUX320), labu takar 100 mL, kertas saring, cawan petri, jarum ose, dan alat *moisture analyzer* (Shimadzu MOC6-3U).

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini terdiri dari bahan pembuatan tempe dan bahan untuk analisis. Bahan untuk pembuatan tempe meliputi ragi tape (merk Raprima), kedelai, daun jati, daun pisang. Bahan-bahan yang digunakan untuk analisis yaitu NaOH (Merck), larutan Nelson, arsenomolibdat, akuades, pelarut eter, indikator PP, alkohol netral, media *nutrien agar* (Merck), larutan garam fisiologis, dan NaCl (Merck).

Tahapan Penelitian

Penelitian dimulai dengan pembuatan tempe yang dikemas dengan tiga jenis kemasan yaitu daun jati, daun pisang, dan plastik. Pengamatan dilakukan saat proses fermentasi hari ke-0, hari ke-1, hari ke-3, hari ke-5, dan hari ke-7.

Proses Pembuatan Tempe Tradisional (Alvina & Hamdani, 2019 dengan Modifikasi)

Kedelai dibersihkan dari benda asing seperti batu dan kotoran lainnya kemudian dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya menuangkan air mendidih sehingga semua biji kedelai terendam (selama 12 jam). Kedelai dicuci dengan air dingin dan dilakukan penghilangan kulit ari sampai bersih. Kedelai yang sudah bersih dikukus selama 30 menit. Kemudian diangkat, ditiriskan, dan ditebarkan dalam tampah yang bersih dan kering. Kedelai tersebut

lalu dikipasi sampai suhu kedelai dingin (sekitar 30°C). Tahapan selanjutnya adalah menaburkan ragi tape (*Rhizopus oligosporus*) sesuai kebutuhan yaitu 10 g/kg kedelai. Kedelai yang sudah diberi ragi kemudian ditimbang sebanyak 39 g lalu dikemas dengan pembungkus daun jati, daun pisang, dan plastik. Tempe disimpan hingga hari ke-9, pengamatan dilakukan setiap 2 hari sekali.

Rancangan Percobaan

Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial, faktor pertama adalah jenis kemasan tempe dan faktor kedua adalah lama waktu fermentasi (**Tabel 1**). Penelitian dilakukan dengan menyimpan tempe dari tiga macam kemasan (daun pisang, daun jati, dan plastik). Ketiga tempe diinkubasi pada suhu ruang selama 9 hari. Tempe diamati pada hari ke-1, 3, 5, 7, dan 9.

Tabel 1. Rancangan percobaan

Perlakuan penyimpanan Hari ke-	Kemasan daun jati (A1)	Kemasan daun pisang (A2)	Kemasan plastik (A3)
1 (B1)	A1B1	A2B1	A3B1
3 (B2)	A1B2	A2B2	A3B2
5 (B3)	A1B3	A2B3	A3B3
7 (B4)	A1B4	A2B4	A3B4
9 (B5)	A1B5	A2B5	A3B5

Metode Analisis

Pengujian kimiawi dan mikrobiologi dilakukan pada tempe busuk selama penyimpanan. Pengujian kimia meliputi kadar air metode thermogravimetri (AOAC, 1995), pengujian pH menggunakan pH meter, protein terlarut (AOAC, 1995), dan pengujian angka asam (BSN, 1998). Uji

mikrobiologi pada tempe *over fermented* (busuk) yaitu uji total bakteri metode (BSN, 2008; Cempaka *et al.*, 2020 dengan modifikasi).

Uji Protein Terlarut (AOAC, 1995)

Sampel tempe ditimbang sebanyak 0,5 g kemudian dilarutkan menggunakan akuades hingga 100 mL. Selanjutnya suspensi disaring menggunakan kertas saring. Filtrat diambil 1 mL dan direaksikan dengan 1 mL larutan Lowry D yaitu Lowry A:B:C (20:1:1). Kemudian dihomogenisasi. Setelah itu, larutan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Setelah dilakukan inkubasi, larutan direaksikan dengan 3 mL larutan Folin Ciau-Calteau 2 N (Lowry E) dan dihomogenisasi. Kemudian larutan tersebut didiamkan selama 45 menit. Selanjutnya, larutan campuran ditera menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 750 nm. Kadar protein terlarut diketahui dari nilai absorbansi yang diplotting pada kurva standar. Kurva standar dibuat menggunakan protein standar BSA (*bovine serum albumin*) dengan konsentrasi 0 µm/mL hingga 300 µm/mL dan ditera dengan panjang gelombang 750 nm. Hasil kurva standar kemudian diplot hingga mendapat persamaan garis lurus $y = ax + b$, sehingga diperoleh nilai x (kadar protein) melalui rumus:

$$X = \frac{y-b}{a}$$

Keterangan:

- x = kadar protein
 y = hasil pembacaan spektrofotometer UV-Vis

a dan b = konstanta yang diperoleh dari persamaan garis lurus kurva standar

Uji Angka Asam (BSN, 1998 dengan Modifikasi)

Tempe busuk (*over fermented*) ditimbang sebanyak $28,2 \pm 0,2$ g dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 250 mL. 50 mL alkohol netral panas dan 2 mL indikator fenolftalein (PP) dimasukkan ke dalam sampel, lalu dititrasi menggunakan NaOH 0,100 N sampai terjadi perubahan warna dari tidak berwarna menjadi merah jambu (tidak hilang selama 30 detik). Asam lemak bebas dinyatakan dalam persen. Perhitungan angka asam adalah sebagai berikut:

Angka asam (%) =

$$\frac{V \text{ NaOH (mL)} \times N \text{ NaOH} \times \text{BM As Lemak}}{\text{Bobot sampel (g)}} \times 100\%$$

Keterangan:

- V = volume
 N = normalitas
 BM = berat molekul

Pengujian Total Bakteri

Pengujian total bakteri dimulai dengan pembuatan media NA. NA (*nutrient agar*) sebanyak 39 g dicampurkan dalam 1000 mL akuades kemudian dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* hingga mendidih. Media tersebut disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Pada pengujian total bakteri (angka lempeng total), 25 g sampel dimasukkan dalam 225 mL larutan garam fisiologis sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} . 1 mL suspensi dipipet dan dimasukkan

dalam 9 mL larutan garam fisiologis sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} . Hal ini dilakukan sampai pengenceran 10^{-5} . Seri pengenceran yang di-*plating* yaitu 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5} . Masing-masing pengenceran tersebut dipipet sebanyak 1 mL ke dalam cawan petri yang telah disterilkan. Selanjutnya, NA dituangkan sebanyak 15-20 mL. Cawan petri yang telah berisi medium dan sampel, dihomogenkan dengan cara menggoyangkan cawan petri secara perlahan membentuk angka delapan, ke atas-bawah, dan ke samping kiri-kanan. Selanjutnya ditunggu hingga memadat. Media NA + sampel diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam dengan posisi terbalik. Setelah 24 jam, masing-masing cawan petri diamati dan dihitung seluruh mikroba yang tumbuh. Perhitungan jumlah bakteri sesuai dengan SNI 2897:2008 (BSN, 2008) dengan modifikasi. Jumlah bakteri yang dihasilkan dalam satuan CFU/g kemudian disajikan dalam bentuk \log_{10} CFU/g.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar Air Tempe Busuk Selama Penyimpanan

Kadar air merupakan salah satu parameter yang dapat digunakan untuk mengetahui kualitas bahan pangan. (BSN, 2015) mensyaratkan tempe memiliki kadar air maksimal 65% (SNI 3144:2015). **Tabel 2** menunjukkan hasil pengamatan kadar air tempe yang dibungkus dengan 3 kemasan berbeda, dan waktu fermentasi yang berbeda. Kadar air paling tinggi diperoleh pada tempe yang disimpan dihari ke-9 dengan kemasan plastik. Pada hari ke-9 tempe yang dikemas menggunakan kemasan plastik memiliki kadar air yang

paling tinggi diantara 2 kemasan yang lainnya. Kadar air dalam suatu bahan pengemas makanan berkaitan dengan laju transmisi uap air. Hal tersebut dikarenakan kemasan plastik lebih kedap udara meskipun sudah dilubangi tapi jika dibandingkan kemasan daun pisang dan kemasan daun jati, daun memiliki pori-pori yang lebih banyak di sepanjang bagian.

Tabel 2 menunjukkan kadar air cenderung meningkat dari hari ke-1 hingga hari ke-9, akan tetapi di hari ke-7 mengalami penurunan pada perlakuan kemasan daun jati. Hari ke-1 kadar air kemasan daun jati mencapai $44,80 \pm 0,28\%$ kemudian mengalami kenaikan dan kembali menurun pada hari ke-7 yaitu $49,01 \pm 1,44\%$, lalu kembali naik di hari ke-9 mencapai $67,13 \pm 0,06\%$. Kemasan daun jati memiliki kadar air yang fluktuatif dibandingkan dengan kedua kemasan yang lainnya (plastik dan daun pisang). Setelah hari ke-7 kadar air mengalami kenaikan dan mencapai nilai tertinggi di hari ke-9. Hari ke-9 kadar air tempe sudah melebihi dari nilai SNI 3144:2015 (BSN, 2015) yaitu maksimal 65% yaitu $67,13 \pm 0,06$ (perlakuan kemasan daun jati), $67,81 \pm 0,01\%$ (kemasan plastik), dan $66,73 \pm 0,07\%$ (kemasan daun pisang). Kadar air memiliki hubungan erat dengan proses pembusukan, kadar air yang tinggi akan mempercepat proses pembusukan dan memungkinkan adanya bakteri patogen. Kadar air dalam tempe dipengaruhi oleh jenis kemasan tempe yang digunakan. Pada kadar air tertentu pertumbuhan kapang terhenti dan terjadi perubahan *flavor* karena degradasi protein lanjut sehingga terbentuk ammonia (Suhartanti, 2010).

Tabel 2. Kadar air, protein terlarut, asam lemak bebas, dan log ALT (angka lempeng total) tempe yang dikemas dalam berbagai kemasan dan berbagai waktu penyimpanan

Hari ke-	Kemasan	Kadar air (%)	Protein terlarut (mg/L)	Asam lemak bebas (mgNaOH/g)	Log total bakteri (log ₁₀ CFU/g)
1	Plastik	48,95 ± 0,24 ^d	0,45 ± 0,06 ^e	1,21 ± 0,04 ^a	2,43 ± 0,04 ^h
	Pisang	45,98 ± 0,29 ^c	0,38 ± 0,02 ^d	1,58 ± 0,01 ^b	1,76 ± 0,03 ^{bc}
	Jati	44,80 ± 0,28 ^b	0,51 ± 0,01 ^f	2,12 ± 0,12 ^d	1,68 ± 0,02 ^a
3	Plastik	55,02 ± 0,01 ^e	0,35 ± 0,01 ^d	6,25 ± 0,02 ^k	2,48 ± 0,001 ⁱ
	Pisang	56,24 ± 0,37 ^f	0,46 ± 0,02 ^e	5,02 ± 0,01 ^j	2,21 ± 0,03 ^g
	Jati	39,99 ± 0,02 ^a	0,60 ± 0,03 ^g	3,86 ± 0,04 ^h	1,84 ± 0,01 ^d
5	Plastik	63,09 ± 0,1 ^{ij}	0,22 ± 0,00 ^{bc}	3,96 ± 0,03 ^{hi}	2,44 ± 0,03 ^{hi}
	Pisang	62,68 ± 0,71 ^{hi}	0,61 ± 0,00 ^g	3,98 ± 0,04 ⁱ	1,93 ± 0,01 ^e
	Jati	64,00 ± 0,01 ^j	0,18 ± 0,00 ^{ab}	4,41 ± 0,02 ^j	1,78 ± 0,01 ^c
7	Plastik	62,03 ± 0,35 ^h	0,22 ± 0,00 ^{bc}	4,01 ± 0,1 ⁱ	3,23 ± 0,01 ^j
	Pisang	60,51 ± 0,32 ^g	0,61 ± 0,01 ^g	3,99 ± 0,06 ⁱ	2,79 ± 0,01 ^l
	Jati	49,01 ± 1,44 ^c	0,18 ± 0,00 ^{ab}	4,39 ± 0,02 ⁱ	1,73 ± 0,02 ^b
9	Plastik	67,81 ± 0,08 ^m	0,17 ± 0,00 ^a	2,00 ± 0,04 ^c	3,23 ± 0,01 ^l
	Pisang	66,73 ± 0,07 ^k	0,18 ± 0,00 ^{ab}	2,36 ± 0,02 ^e	2,83 ± 0,01 ^k
	Jati	67,13 ± 0,06 ^{kl}	0,25 ± 0,00 ^c	2,96 ± 0,01 ^f	2,15 ± 0,01 ^f

Keterangan: Huruf berbeda menunjukkan adanya beda nyata pada tingkat kepercayaan 95%

Kadar Protein Terlarut dan Nilai pH Tempe Busuk Selama Penyimpanan

Protein terlarut merupakan banyaknya asam-asam amino yang mudah diserap oleh sistem pencernaan sehingga menjadi parameter kualitas tempe. Tempe memiliki kelebihan dibandingkan bahan pangan lain karena mengandung protein yang mudah dicerna karena adanya proses fermentasi. Aktivitas enzimatik dalam proses fermentasi pada tempe menyebabkan terjadinya protein kompleks dipecah menjadi protein yang lebih sederhana dengan cara memutuskan ikatan-ikatan peptida dalam protein. Pemutusan tersebut menyebabkan protein bersifat mudah larut sehingga kadar protein terlarutnya meningkat.

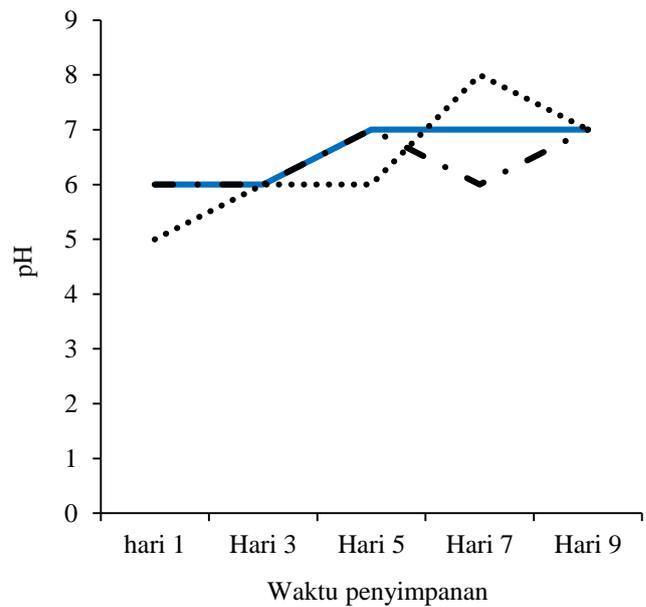
Tabel 2 menunjukkan nilai protein terlarut terhadap tempe yang dikemas dengan 3 perlakuan kemasan dan disimpan

pada lama waktu fermentasi yang berbeda. Tempe yang memiliki kadar protein tertinggi adalah tempe yang disimpan di hari ke-3 yaitu 0,60 mg/L dengan pengemas daun jati. Sementara itu, kadar protein terendah pada hari ke-9 dengan pengemas plastik. Protein terlarut mengalami kenaikan kemudian kembali menurun seiring proses pembusukan. Razie & Widawati (2018) telah melakukan penelitian untuk memperpanjang kemasan tempe dengan menggunakan plastik vakum kemasan sekunder plastik PP 0,06 mm maksimal bertahan 4 hari. Setelah hari ke-4, tempe mengalami kerusakan dan penurunan kadar protein yang signifikan.

Protein terlarut meningkat hingga hari ke-3 kemudian menurun mulai hari kelima. Protein terlarut pada penyimpanan hari pertama tertinggi adalah kemasan daun jati yaitu sebesar 0,51±0,01 mg/L,

dan terendah adalah kemasan daun pisang yaitu $0,38 \pm 0,02$ mg/L. Protein terus meningkat hingga hari ke-3 dan mulai menurun dari ke-5 kecuali pada kemasan daun pisang yang tetap tinggi sampai hari ke-7 yaitu $0,61 \pm 0,01$ mg/L. Hari ke-9 semua perlakuan kemasan menurun drastis dengan nilai terendah adalah kemasan plastik yaitu $0,17 \pm 0,00$ mg/L. Kadar protein terlarut pada tempe dipengaruhi oleh aktivitas enzimatik, semakin tinggi aktivitas enzimatik yang terjadi, maka akan semakin tinggi kadar protein terlarut. Aktivitas enzimatik dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain adalah suhu, pH, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, inhibitor, dan aktivator (Risnawati, 2013). pH merupakan salah satu faktor yang memengaruhi kecepatan enzim dalam mengkatalisis reaksi. Lama fermentasi bioetanol memberikan pengaruh signifikan terhadap nilai pH. Lama fermentasi menyebabkan produksi gas CO_2 juga semakin bertambah meskipun hasilnya tidak signifikan. Peningkatan produksi gas ternyata juga diikuti dengan penurunan nilai pH (Azizah *et al.*, 2012). Gas CO_2 sering disebut gas asam (*acid whey*) karena gas CO_2 memiliki sifat asam. Oleh karena itu gas CO_2 juga berkontribusi terhadap nilai pH (Kartohardjono *et al.*, 2007).

Enzim protease optimal pada pH yang cenderung asam yaitu pH 4-7 (Fathimah & Wardani, 2014). Hasil penelitian menunjukkan kisaran pH tempe 5-8. pH tempe tidak berpengaruh secara signifikan terhadap kadar protein terlarut karena cenderung asam-netral. Nilai pH tertinggi mencapai 8 terjadi pada kemasan pisang pada hari ke-7 (**Gambar 1**).



Gambar 1. Nilai pH tempe yang dikemas dalam berbagai kemasan: plastik (—), pisang (.....), jati (- · -) dan berbagai waktu penyimpanan

Asam Lemak Bebas Tempe *Over Fermented* Selama Penyimpanan

Asam lemak bebas atau *free fatty acid* (FFA) adalah asam lemak yang berada sebagai asam bebas tidak terikat sebagai trigliserida. Asam lemak bebas dihasilkan oleh proses hidrolisis dan oksidasi. Terjadinya kenaikan kadar asam lemak bebas juga disebabkan oleh lamanya penyimpanan. Selama penyimpanan, minyak dan lemak mengalami perubahan fisiko-kimia yang dapat disebabkan oleh proses hidrolisis maupun oksidasi. Pada pembuatan tempe, peningkatan asam lemak bebas disebabkan adanya enzim lipolitik yang dihasilkan oleh kapang *Rhizopus* sp. (Darawati *et al.*, 2016). Asam lemak bebas mulai meningkat dari hari pertama menuju hari ke-3. Hal tersebut menandakan tahap pertumbuhan cepat sudah dimulai. Tempe menjadi hangat karena kenaikan suhu, kemudian miselia sudah mulai tumbuh,

lebat, dan kompak dihari ke-3. Akan tetapi, asam lemak bebas mulai turun pada hari ke-5 yang menandakan bahwa telah terjadi fermentasi lanjut dan sudah memasuki proses pembusukan (Sulistyowati *et al.*, 2004). Kapang sudah tidak tumbuh dan kadar air semakin meningkat. Asam lemak bebas terus mengalami proses penurunan hingga hari ke-9 yang menunjukkan sudah terjadinya proses pembusukan. Nilai asam lemak bebas paling tinggi pada perlakuan kemasan plastik hari ke-3 yang mencapai 6,2 mgNaOH/g, sementara tempe yang dikemas daun jati di hari ketiga masih menunjukkan nilai rendah yaitu 3,83 mgNaOH/g. Zulfa & Kumalaningsih (2014) menyatakan bahwa ekstrak jaun jati memiliki antioksidan jenis karotenoid. Hal tersebut menyebabkan daun jati dapat menghambat terbentuknya asam lemak bebas pada tempe, meskipun pada hari ke-5 dan ke-9 nilai asam lemak bebas pada kemasan daun jati menjadi tinggi karena adanya proses pembusukan (**Tabel 2**).

Setelah melewati hari ke-3 menuju hari ke-5 asam lemak bebas mengalami penurunan. Penurunan asam lemak bebas kemungkinan disebabkan oleh proses hidrolisis yang sudah optimal. Jika hidrolisis dilanjutkan lagi, maka asam lemak bebas akan diurai lebih lanjut dalam siklus katabolisme lemak menghasilkan suatu heksosa sehingga jumlah asam lemak bebas akan berkurang (Su'i *et al.*, 2010).

Total Bakteri Tempe *Over Fermented* Selama Penyimpanan

Total bakteri menentukan jumlah bakteri dalam suatu sampel. Dalam pengujian tersebut diketahui perkembangan banyaknya bakteri dapat

dikontrol dengan mengatur jumlah sampel, dimana total bakteri tergantung atas formasi bakteri di dalam media tempat tumbuhnya dan masing-masing bakteri yang dihasilkan akan membentuk koloni yang tunggal. Perhitungan total bakteri dapat dipergunakan sebagai indikator proses higienis sanitasi produk, analisis mikroba lingkungan pada produk jadi, indikator proses pengawasan, dan digunakan sebagai dasar kecurigaan dapat atau tidak diterimanya suatu produk berdasarkan kualitas mikrobiologinya.

Angka total bakteri menunjukkan tren yang semakin meningkat dari hari pertama hingga hari ke-9, nilai total bakteri tertinggi pada hari ke-9. Pemeriksaan total bakteri dilakukan untuk menentukan jumlah bakteri dalam suatu sampel. Semakin tinggi angka total bakteri mengindikasikan adanya proses pembusukan. Tempe yang dikemas dengan plastik memiliki nilai total bakteri paling tinggi dibandingkan dua kemasan yang lainnya, sementara kemasan daun jati memiliki nilai total bakteri paling rendah. Menurut Alfiyah *et al.* (2017), daun jati memiliki ciri berdaun besar, bulat telur terbalik, berhadapan, dengan tangkai yang sangat pendek, dan memiliki kandungan fitokimia yang sangat tinggi (Thoha & Diana, 2010).

Berdasarkan hasil uji fitokimia dalam daun jati terdapat flavonoid, alkaloid, tanin, napthaquinones, dan antrakuinon yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri atau sebagai antibakteri (Purushotham *et al.*, 2010). Senyawa aktif dalam daun jati ini dapat digunakan untuk mengawetkan daging.

Kenaikan total bakteri pesat terjadi dari hari ke-1 menuju hari ke-3 pada semua jenis kemasan, kemudian menurun

di hari ke-7 pada kemasan daun pisang dan plastik (**Tabel 2**). Hari ke-9 kembali naik dan mencapai nilai total bakteri paling tinggi selama masa fermentasi. Pada hari pertama menuju hari ke-3 terjadi kenaikan jumlah total bakteri. Hal tersebut dikarenakan adanya proses fermentasi, proses fermentasi akan memberikan sumbangan bakteri dalam perhitungan total bakteri. Kemudian, nilai total bakteri menurun di hari ke-5 saat proses fermentasi sudah selesai dan kembali naik karena adanya proses pembusukan. Nilai total bakteri terus naik hingga hari penyimpanan ke-9. Nilai populasi bakteri terendah adalah kemasan daun jati pada penyimpanan hari ke-1 yaitu $1,68 \pm 0,02 \log_{10}$ CFU/g dan tertinggi kemasan plastik $3,23 \pm 0,01 \log_{10}$ CFU/g pada hari ke-7. Kemasan daun jati memiliki nilai populasi bakteri paling rendah dibanding dua kemasan yang lainnya pada penyimpanan hari ke-9 yaitu sebesar $2,15 \pm 0,01 \log_{10}$ CFU/g.

KESIMPULAN

Tempe busuk (*over fermented*) masih layak dikonsumsi hingga penyimpanan hari ke-5 dilihat dari parameter protein terlarut, jumlah total bakteri dan nilai asam lemak bebas. Perlakuan terbaik adalah kemasan daun jati yang masih baik dikonsumsi pada hari ke-5. Tempe busuk (*over fermented*) perlakuan kemasan daun jati dengan lama penyimpanan hari ke-5 memiliki kadar air sebesar 64%, kadar protein terlarut sebesar 0,18%, kadar asam lemak bebas sebesar 4,41 mgNaOH/g, dan log total bakteri sebesar $1,68 \log_{10}$ CFU/g.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami ucapkan kepada LPPM Universitas Slamet Riyadi Surakarta yang telah memberikan dukungan secara moril dan material pada Hibah Penelitian Universitas tahun 2021 No: 037/S9/AK/2021.

DAFTAR PUSTAKA

- Alfiah, M.F., Budiretnani, D.A., & Solikin, N. (2017). Uji ekstrak etanol daun jati (*Tectona grandis*) sebagai bahan pengawet alami daging sapi. *Prosiding Semnas Hayati IV*, 94–102.
- Alvina, A., & Hamdani, D. (2019). Proses pembuatan tempe tradisional. *Jurnal Pangan Halal*, 1(1), 1-4.
- AOAC. (1995). *Official Methode of Analysis of The Association of Official Analytical Chemist*.
- Azizah, N., Al-Baarri, A., & Mulyani, S. (2012). Pengaruh lama fermentasi terhadap kadar alkohol, pH, dan produksi gas pada proses fermentasi bioetanol dari whey dengan substitusi kulit nanas. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 1(2), 72–77.
- BSN (Badan Standardisasi Nasional). (2015). *SNI 3144:2015. Tempe Kedelai*, 1–26.
- BSN (Badan Standardisasi Nasional). (2008). *SNI 2897:2008. Metode pengujian cemaran mikroba dalam daging, telur dan susu, serta hasil olahannya. Badan Standardisasi Nasional*, 1–32.
- Cempaka, L., Widyana, M.A., & Astuti, R.M. (2020). Karakteristik sensori dan analisis mikroba tempe segar beraneka rasa. *Jurnal Ilmu Pangan dan Hasil Pertanian*, 4(1), 43–59.
- Darawati, M., Riyadi, H., Damayanthi, E., & Kustiyah, L. (2016). Pengembangan pangan fungsional berbasis pangan lokal sebagai produk sarapan untuk remaja

- gemuk. *Jurnal Gizi dan Pangan*, 11(1), 43–50.
- Fathimah, A.N., & Wardani, A.K. (2014). Ekstraksi dan karakterisasi enzim protease dari daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.). *Jurnal Teknologi Pertanian*, 15(3), 191–200.
- Kartohardjono, S., Anggara, Subihi, & Yuliusman. (2007). Kontaktor membran serat berongga menggunakan pelarut air. *Makara Teknologi*, 11(2), 97–102.
- Perdani, A.W., & Utama, Z. (2020). Korelasi kadar asam fitat dan protein terlarut tepung tempe kedelai lokal kuning (*Glycine max*) dan hitam (*Glycine soja*) selama fermentasi. *Prosiding Pendidikan Teknik Boga Busana FT UNY*, 15.
- Purushotham, K.G., Arun, P., Jayarani, J.J., Vasanthakumari, R., Sankar, L., & Reddy, B.R. (2010). Synergistic in vitro antibacterial activity of *Tectona grandis* leaves with tetracycline. *International Journal of PharmTech Research*, 2(1), 519–523.
- Rachmawati, M.H., Soetjipto, H., & Kristijanto, A.I.G.N. (2019). Profil asam lemak minyak tempe busuk. *Jurnal Kimia*, 13(1), 82–87.
- Razie, F., & Widawati, L. (2018). Kombinasi pengemasan vakum dan ketebalan kemasan untuk memperpanjang umur simpan tempe. *Agritepa: Jurnal Ilmu dan Teknologi Pertanian*, 5(1), 94–107.
- Reddy, N.R. (2019). Tempe. *Legume-Based Fermented Foods*, 95–40.
- Risnawati, M. (2013). Pengaruh penambahan ion logam Ca^{2+} terhadap aktivitas enzim papain (The addition effect of the metal ions Ca^{2+} on the papain activities). *UNESA Journal of Chemistry*, 2(1), 76–83.
- Sabarella, Komalasari, W.B., Seran, K., Saida, M.D.N., Manurung, M., Sehusman, Rinawati, & Yani Supriyati. (2020). *Buletin Konsumsi Pangan. Buletin Komsumsi, Volume 11*, 48. (http://epublikasi.setjen.pertanian.go.id/epublikasi/buletin/konsumsi/2020/Buletin_Konsumsi_Vol_11_No_I_2020/files/assets/basic-html/page1.html). [Diakses tanggal 16 September 2021].
- Soetjipto, H., Martono, Y., & Yuniarti, Z. (2018). Isolasi dan analisis genistein dari tempe busuk menggunakan metode kromatografi kolom. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBi)*, 5(1), 88.
- Su'i, M., Harijono, Yuniarta, & Aulani'am. (2010). Hidrolysis activity of lipase enzyme from coconut houstonia for coconut oil. *Agritech*, 30(3), 164–167.
- Suhartanti, P.D. (2010). "Karakteristik Fisik Biji Beberapa Varietas Kedelai (*Glycine max*) dan Pengaruh Lama Fermentation Terhadap Karakteristik Kimia Tempe". Program Studi Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret Surakarta, Surakarta.
- Sulistyowati, E., Arianingrum, R., & Salirawati, D. (2004). "Studi Pengaruh Lama Fermentasi Tempe Kedelai Terhadap Aktivitas Tripsin." Laporan Penelitian. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Yogyakarta, Yogyakarta.
- Suroso, A.S. (2013). Kualitas minyak goreng habis pakai ditinjau dari bilangan peroksida, bilangan asam, dan kadar air. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 3(2), 77–88.

Zulfa, L., & Kumalaningsih, S. (2014).
Ekstraksi pewarna alami dari daun jati
(*Tectona grandis*) (kajian konsentrasi
asam sitrat dan lama ekstraksi) dan
analisa tekno-ekonomi skala
laboratorium. *Industria: Jurnal
Teknologi dan Manajemen
Agroindustri*, 3(1), 62-72.