

## POTENSI PROBIOTIK DARI TIGA MACAM TEMPE KACANG MERAH, TEMPE KACANG TANAH, DAN KACANG KEDELAI

Serly Ghoniyah, Yoni Rina Bintari, Dini Sri Damayanti \*  
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

### ABSTRAK

**Pendahuluan:** Tempe merupakan salah satu produk fermentasi tradisional yang sering dikonsumsi oleh masyarakat dan merupakan salah satu protein nabati mengandung probiotik yang berpotensi sebagai antibakteri. Adanya aktivitas antibakteri pada tempe berasal dari kandungan BAL (Bakteri asam laktat) yang dihasilkan saat proses fermentasi dan aktivitas antibakteri lain yang dihasilkan dari bahan baku kacang. Penelitian ini bertujuan untuk mengukur total bakteri asam laktat, pH dan laju pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada tempe kacang merah, tempe kacang tanah, dan kacang kedelai.

**Metode :** Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental laboratorium dengan 3 kelompok tempe yakni tempe kacang merah, tempe kacang tanah dan tempe kacang kedelai dengan perlakuan pengulangan 3 kali. Ketiga kelompok sampel tersebut yakni ekstrak tempe, ekstrak tempe kombinasi *E.coli* dengan pengenceran  $10^{-1}$ - $10^{-3}$ . Setiap sampel diinokulasikan pada media *MRS Broth* dan *MRS Agar* (untuk BAL) dan media *EMBA* (Untuk *Escherichia coli*). Koloni yang tumbuh dihitung dengan TPC (*Total Plate Count*) dan pengukuran pH dengan pH meter yang di kalibrasi. Hasil dianalisa secara statistik menggunakan uji *One Way Anova* tingkat signifikansi  $p < 0,05$ .

**Hasil:** Koloni BAL paling tinggi diperoleh dari tempe kacang merah dengan hasil  $2,06 \pm 0,58$  cfu/ml pada kacang tanah  $1,79 \pm 0,17$  cfu/ml dan kacang kedelai  $1,76 \pm 0,55$  cfu/ml. Analisa laju pertumbuhan *Escherichia coli* paling tinggi pada tempe kacang tanah  $5,68 \pm 3,03$  cfu/ml, pada kacang kedelai  $2,06 \pm 0,58$  cfu/ml dan yang paling rendah pada tempe kacang merah  $1,71 \pm 1,41$  cfu/ml. Hasil pH pada tempe kacang kedelai  $6,96 \pm 0,02$ , pada kacang tanah  $5,97 \pm 0,25$  dan hasil pengukuran pH paling rendah pada tempe kacang merah yakni  $4,39 \pm 0,02$ .

**Kesimpulan:** Tempe kacang merah menghasilkan koloni BAL paling tinggi dan pH paling rendah dibandingkan tempe yang lain. Hambatan koloni bakteri *Escherichia coli* paling rendah didapatkan pada tempe kacang merah.

**Kata Kunci:** Tempe kacang merah, Tempe kacang tanah, Tempe kacang kedelai, BAL, pH, *Escherichia coli*

Korespondensi:  
Dr.dr Dini Sri Damayanti, M.Kes,  
Jl. MT Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65145  
e-mail: [dinisridamayanti@unisma.ac.id](mailto:dinisridamayanti@unisma.ac.id)

## PROBIOTIC POTENTIAL FROM THREE KINDS OF RED BEAN TEMPE, PEANUT TEMPE, AND SOYBEAN TEMPE

Serly Ghoniyah, Yoni Rina Bintari, Dini Sri Damayanti \*  
Faculty of Medicine, Islamic University of Malang

### ABSTRACT

**Introduction:** Tempe is one of the fermented products that is often consumed by the public and is one of the proteins containing probiotics that are likely to be antibacterial. The presence of antibacterial activity in tempeh comes from the content of LAB (lactic acid bacteria) produced during the fermentation process and other antibacterial activities produced from peanut raw materials.

**Method:** This study used a laboratory experimental research method with 3 groups of tempeh, namely red bean tempeh, peanut tempeh and soybean tempeh with 3 repetitions of treatment. The three groups of samples were tempeh, tempeh combined with *E.coli* with a dilution of  $10^{-1}$ - $10^{-3}$ . Each sample was inoculated on *MRS Broth* and *MRS Agar* (for LAB) and *EMBA* (For *Escherichia coli*) media. Colonies that grew were counted by TPC (*Total Plate Count*) and pH measurement with a calibrated pH meter. The results were analyzed statistically using the *One Way Anova* test with a significance level of  $p < 0.05$ .

**Results:** The highest BAL colony was obtained from red bean tempeh with a yield of  $2.06 \pm 0.58$  cfu/ml in peanuts  $1.79 \pm 0.17$  cfu/ml and soybeans  $1.76 \pm 0.55$  cfu/ml. *Escherichia coli* growth rate analysis was highest in peanut tempeh  $5.68 \pm 3.03$  cfu/ml, in soybeans  $2.06 \pm 0.58$  cfu/ml and lowest in red bean tempeh  $1.71 \pm 1.41$ . The pH result in soybean tempeh was  $6.96 \pm 0.02$ , in peanuts  $5.97 \pm 0.25$  and the lowest pH measurement result in red bean tempeh was  $4.39 \pm 0.02$ .

**Conclusion:** Red bean tempeh produced the highest LAB colonies and the lowest pH compared to other tempeh. The lowest *Escherichia coli* bacterial colony resistance was found in red bean tempeh.

**Keywords:** Red bean tempeh, Peanut tempeh, Soybean tempeh, BAL, pH, *Escherichia coli*

Correspondence to:  
Dini Sri Damayanti,  
Jl. MT Haryono 193 Malang City, East Java, Indonesia, 65145  
e-mail: [dinisridamayanti@unisma.ac.id](mailto:dinisridamayanti@unisma.ac.id)

## PENDAHULUAN

Pada negara maju dan negara berkembang insiden diare yang disebabkan oleh infeksi bakteri tetap tinggi dan masih menjadi masalah Kesehatan. Data dan informasi dari profil Kesehatan Indonesia tahun 2019 menunjukkan angka terjadinya diare di Indonesia masih cukup tinggi. Pada tahun 2019 angka diare pada semua umur 270/1000 penduduk. Sedangkan pada balita mencapai angka 843/1000<sup>1</sup>. Hasil riset kesehatan dasar (Riskesdas) menyatakan bahwa penyakit diare mengalami peningkatan dari 7 % pada tahun 2013 dan menjadi 8% pada tahun 2018<sup>2</sup>. Selain itu kejadian luar biasa (KLB) diare masih sangat sering di Indonesia dengan angka kematian (*Case Fatality Rate/ CFR*) yang tinggi. Berdasarkan profil Kesehatan Indonesia frekuensi KLB diare mengalami fluktuasi dengan angka kematian yang terus meningkat. Kasus KLB diare pada tahun 2015 mencapai 1.213 orang pada 13 provinsi dengan angka kematian 2,47%. Sedangkan pada tahun 2016 terjadi KLB pada 3 provinsi dengan angka kasus 198 dan angka kematian 3,03%. Pada tahun 2018 terjadi KLB diare sebanyak 10 kasus yang tersebar pada 8 provinsi di 8 kabupaten/ kota dengan angka 756 orang penderita dan angka kematian 4,76 %<sup>3</sup>.

Penyebab tingginya jumlah kejadian diare yakni karena *foodborne infections* dan *waterborne infections* yang disebabkan bakteri *Salmonella spp*, *Campylobacter jejuni*, *Stafilococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium Clostridium perfringens* dan *Enterohemorrhagic Escherichia coli*<sup>4</sup>. Adanya infeksi bakteri melalui perantara *foodborne infection* dan *waterbone infection* menyebabkan kerusakan epitel pada saluran cerna. Hal ini menyebabkan terjadinya adhesi bakteri patogen pada saluran cerna. Penempelan bakteri pada epitel menyebabkan invasi enterotoksin dan sitotoksin yang dihasilkan oleh bakteri patogen, zat tersebut menyebabkan terjadinya inflamasi akibat dilepaskannya mediator inflamasi seperti leukotriene, interleukin dan zat vasoaktif. Selain menyebabkan inflamasi, toksin yang dihasilkan oleh bakteri patogen menyebabkan gejala sistemik seperti demam, lemah, dan gangguan pencernaan<sup>5</sup>.

Salah satu pencegahan gangguan pencernaan yakni dengan konsumsi makanan yang mengandung probiotik. Makanan yang mengandung probiotik bermanfaat memperbaiki keseimbangan mikroflora di dalam saluran pencernaan. Salah satu makanan yang mengandung probiotik adalah tempe<sup>4</sup>.

Tempe merupakan salah satu produk fermentasi dengan bahan baku utama menggunakan kacang-kacangan seperti kacang kedelai dan kacang tanah<sup>6</sup>. Perlu adanya inovasi baru terkait bahan baku tempe dikarenakan penggunaan kacang kedelai dan kacang tanah pada tahun 2012 sebesar 843,15 ribu ton kurang dari kebutuhan yang diharapkan nasional yakni 2,3 juta ton. Adanya data ini diharapkan mengurangi jumlah penggunaan kacang kedelai dengan bahan alternatif menggunakan kacang merah. Kacang merah mengandung senyawa kimia flavonoid pada bagian biji

dan kulitnya. Kulit kacang merah mengandung kuersetin, pelargonidin, sianidin, kemferol malvidin dan mirsetin<sup>6</sup>.

Tempe dengan bahan baku kacang selain mengandung senyawa aktif tempe juga mengandung bakteri probiotik yang berfungsi menekan pertumbuhan bakteri patogen, memperbaiki sawar mukosa, dan menstimulasi imun sel *host*. Adanya bakteri probiotik ini menghasilkan asam laktat yang menyebabkan penurunan pH saluran cerna. Selain itu bakteri probiotik menghasilkan zat bakterisidal yang mencegah kolonisasi bakteri patogen terutama bakteri *E.coli* pada saluran cerna<sup>7</sup>.

Tempe sebagai probiotik dibuktikan dari beberapa penelitian tentang antibakteri yang dihasilkan pada tempe berbahan baku kacang. Pada ekstrak tempe kacang merah dan tempe kacang kedelai mempunyai efek penghambatan terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*<sup>8</sup>. Selain pada tempe bahan baku kacang merah dan kacang kedelai, tempe dengan bahan baku kacang tanah juga menghasilkan penghambatan terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*<sup>9</sup>. Hal ini disebabkan adanya aktivisasi antibakteri dari bakteri asam laktat sehingga tempe termasuk salah satu makanan yang mengandung probiotik<sup>10</sup>.

Penggunaan metode pengukuran total BAL (bakteri asam laktat), pH dan laju pertumbuhan *Escherichia coli* pada tempe kacang tanah, kacang kedelai, dan kacang merah merupakan salah satu indikator probiotik dengan mengukur kemampuan BAL dan kandungan antibakteri yang ada pada ketiga tempe. Penelitian ini memiliki tiga variasi kacang yang digunakan sebagai bahan baku tempe kacang dan dilakukan perbandingan terhadap total BAL, pH dan laju pertumbuhan *Escherichia coli*. Perbandingan ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas tempe yang dominan sebagai bakteri probiotik dalam menghambat bakteri patogen dalam saluran cerna. Uji antibakteri dan potensi probiotik pada tempe dengan bahan baku kacang masih minim dilakukan terutama pada bahan baku kacang merah.

## METODE PENELITIAN

### Desain, Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental secara *in vitro* yang dilakukan di Laboratorium Pusat Riset Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang pada bulan Mei-Juni 2021.

### Inokulasi Bakteri

Bakteri *Escherichia coli* pada media padat dari Laboratorium Pusat Riset Kedokteran UNISMA diambil menggunakan *oshe* dan ditumbuhkan langsung pada cawan petri berisi *Nutrient Agar* dengan Merck Millipore® yang komposisinya terdiri dari *Lemco beef extract* 1 g *Yeast extract* 2 g *Peptone* 5 g *NaCl* 5 g *Agar* 15 g.

### Pembuatan Tempe Kacang Kedelai, Kacang Tanah dan Kacang Merah.

Tahapan pertama yaitu perendaman dengan air asam murni yang berasal dari campuran cuka dan air rebusan kedelai. Air rebusan kacang kedelai digunakan sebagai bahan perendam untuk kacang tanah dan kacang merah.

Tujuan dari perendaman yakni agar terjadi fermentasi asam laktat sehingga menimbulkan kacang menjadi asam. Keadaan asam ini menyebabkan proses pertumbuhan tempe dapat terjadi. Proses pengasaman ini menyebabkan bau asam dan busa yang ditimbulkan dapat keluar sehingga mempercepat proses keasaman pada kacang kedelai, kacang tanah maupun kacang merah<sup>11</sup>.

Tahapan kedua yaitu penggilingan kacang yang digiling dengan menggunakan mesin penggiling, Tujuan penggilingan ini agar biji kacang terbelah menjadi dua bagian dan agar kulit pada biji kacang terlepas. Tujuan dari pengupasan kulit ini agar asam laktat yang dihasilkan selama proses perendaman bisa masuk dengan mudah kedalam biji dan agar miselium pada tempe dapat tumbuh pada saat fermentasi berlangsung<sup>11</sup>.

Tahap ketiga adalah pencucian, dan kacang dicuci hingga bersih. Tujuan dari pencucian ini supaya bau asam yang ditimbulkan hilang dan juga lendir yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat pada kacang hilang. Adanya lendir pada tahap ini dapat menghambat proses fermentasi. Tahap keempat yaitu perebusan, tujuan dari perebusan yaitu membuat biji kacang menjadi lunak. Perebusan juga bertujuan untuk mematikan bakteri yang masih hidup selama proses perendaman<sup>11</sup>.

Tahap kelima yaitu pendinginan. Pendinginan ini bertujuan untuk mendinginkan kacang sebelum pemberian ragi. Pendinginan juga bertujuan supaya kacang lebih mengering. Tahap keenam yaitu peragian. Setelah didinginkan, kacang diberi ragi sebanyak ½ sendok makan, dan diaduk hingga homogen. Ragi yang digunakan pada proses pembuatan tempe ini mengandung jamur *Rhizopus sp.* Fungsi ragi tempe ini untuk mengaktivitas enzim, sehingga memiliki kemampuan untuk menghasilkan antibiotika, biosintesis vitamin B, dan penetrasi miselia jamur tempe ke dalam biji kedelai, biji kacang tanah dan biji kacang merah<sup>11</sup>.

#### **Pembuatan Ekstrak Tempe Kacang**

Tempe kacang kedelai, kacang tanah dan kacang merah dengan wadah masing-masing yang digunakan untuk proses penelitian yaitu tempe kacang dalam keadaan *fresh* tanpa campuran apapun<sup>12</sup>. Tempe dihaluskan menggunakan *blender* hingga menjadi ekstrak kasar. Ekstrak kasar yang dihasilkan di timbang dan siap di ujikan<sup>12</sup>.

#### **Pembuatan Media Cair MRS BROTH**

MRS Broth dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 52,2 g media MRS Broth dalam 1 liter aquades lalu diaduk hingga rata. MRS Broth disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan diacampur dengan ekstrak tempe yang telah di haluskan sebanyak 1 gr<sup>13,14</sup>.

#### **Pembuatan Media Agar MRS Agar**

MRS *agar* dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 52,2 g media MRS *Agar* dalam 1 liter aquades lalu diaduk hingga rata. MRS *Agar* disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit<sup>13,14,15</sup>.

#### **Pembuatan Media Eosine Methylene Blue Agar**

*EMB Agar* dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 37,5 g media dalam 1 liter aquades lalu diaduk hingga rata. Media disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit<sup>13,16</sup>.

#### **Pembuatan Sampel Uji Bakteri**

Tempe yang sudah dihaluskan sebanyak 1 gr di masukkan kedalam MRS broth 9ml dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C<sup>13</sup>, kelompok sampel yang diinkubasi terdapat tiga kelompok yakni kelompok tempe dengan *E.coli*, Tempe saja, dan *E.coli* saja. Hasil inkubasi dari 3 kelompok selanjutnya di masukkan ke dalam 9ml aquades steril dan diencerkan berulang sebanyak 10<sup>3</sup>.

Masing masing pengenceran dikultur ke dalam media *MRS Agar* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, hasil inkubasi diinokulasikan kedalam media selektif *EMB Agar*. Penghitungan koloni yang muncul pada media *EMB Agar* dengan metode *Total Plate Count* pada setiap pengenceran<sup>17</sup>. Hasil munculnya *E.coli* pada media *EMB Agar* akan muncul berwarna hijau metalik sedangkan bakteri asam laktat permukaan cembung dan elevasinya semi mucoid dan berwarna putih susu<sup>14</sup>.

Penghitungan koloni bakteri dilakukan langsung setelah inkubasi selesai. Penghitungan jumlah koloni yang terbentuk bisa menggunakan *colony counter* atau menghitung secara manual dengan kriteria inklusi jumlah bakteri dalam satu cawan 30-300 koloni<sup>17</sup>. Bandingkan jumlah BAL dan *E.coli* pada setiap cawan petri.

#### **Pengecekan pH**

Pengecekan pH pada nutrient agar yang telah di campurkan oleh ekstrak tempe yang di blender halus. Pengecekan pH menggunakan pH meter<sup>18</sup>. Suasana asam atau pH yang pas bagi pertumbuhan jamur tempe sendiri berkisar 4-5,3<sup>19</sup>.

#### **Analisa Statistik**

Hasil penelitian akan ditampilkan dalam bentuk data kuantitatif dan analisa data menggunakan metode uji *One Way Analysis of Varians* (ANOVA) dengan membandingkan setiap konsentrasi dari hasil penelitian. Hasil signifikan apabila  $p < 0,05$  dan dilanjutkan *poc host test* yaitu uji *Least Significance Different* (LSD) untuk mengetahui adanya perbedaan antar perlakuan. Analisa statistik dilakukan dengan program *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) version 22.0.

### **HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA**

#### **Hasil Kuantifikasi TPC BAL, TPC *Escherichia coli*, dan pengukuran pH Pada Tempe Kacang Merah, Tempe Kacang Tanah dan Tempe Kacang Kedelai.**

Hasil analisa pada tempe kacang merah, tempe kacang tanah dan tempe kacang kedelai dengan metode TPC dengan pengenceran 10<sup>-1</sup> – 10<sup>-3</sup> dengan rata-rata digambarkan pada (**Tabel 1**) untuk TPC BAL, (**Tabel 2**) TPC *E.coli* dan (**Tabel 3**) untuk pengukuran pH..

**Tabel 1. Hasil Kuantifikasi TPC Bakteri Asam Laktat Pada Tempe Kacang Merah, Tempe Kacang Kedelai dan Kacang Merah.**

Sampel	n	TPC Mean $\pm$ SD Cfu/ml
Tempe Kacang Merah	3	$2,06 \times 10^4 \pm 0,58 \times 10^{4a}$
Tempe Kacang Tanah	3	$1,79 \times 10^4 \pm 0,17 \times 10^{4b}$
Tempe Kacang Kedelai	3	$1,76 \times 10^4 \pm 0,55 \times 10^{4c}$

**Keterangan :**

Data merupakan hasil rata rata tiga kali pengulangan pada setiap pengenceran  $\pm$  standar deviasi yang dinyatakan dalam cfu/ml. Analisa statistik menggunakan *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji LSD yang tingkat signifikansi  $p < 0,05$ . Nilai signifikan pada semua sampel memiliki nilai  $p < 0,05$ .

Tabel 1. Menunjukkan bahwa koloni asam laktat yang tumbuh pada tempe kacang merah paling tinggi terdapat pada pengenceran pertama . Hasil ini berhubungan dengan semakin tinggi pengenceran, maka hasil BAL juga akan semakin sedikit.



Gambar a



Gambar b



Gambar c

**Keterangan :**

Gambar diatas merupakan media MRS Agar yang telah ditumbuhi bakteri asam laktat (BAL). Gambar a merupakan BAL dari tempe kacang merah. Gambar b merupakan hasil BAL tempe Kacang Tanah dan Gambar C merupakan hasil BAL tempe kacang kedelai.

**Hasil Kuantifikasi TPC *Escherichia coli* Pada Tempe Kacang Merah, Tempe Kacang Tanah dan Tempe Kacang Kedelai.**

Hasil kuantitas bakteri *Escherichia coli* pada tempe kacang tanah , kacang merah dan kacang kedelai dengan metode TPC (*Total Plate Count* ) dengan pengenceran  $10^{-1} - 10^{-2}$  dengan rata-rata yang digambarkan pada (Tabel 2).

**Tabel 2 . Hasil Kuantifikasi TPC Bakteri *Escherichia coli* Pada Tempe Kacang Merah, Tempe Kacang Kedelai dan Kacang Merah**

Sampel	n	TPC Mean $\pm$ SD Cfu/ml
Tempe Kacang Merah	3	$1,71 \times 10^4 \pm 1,41 \times 10^{4a}$
Tempe Kacang Tanah	3	$5,68 \times 10^4 \pm 3,03 \times 10^{4b}$
Tempe Kacang Kedelai	3	$2,06 \times 10^4 \pm 0,58 \times 10^{4c}$

**Keterangan :**

Data merupakan hasil rata rata tiga kali pengulangan pada setiap pengenceran  $\pm$  standar deviasi yang dinyatakan dalam cfu/ml. Analisa statistik menggunakan *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji LSD yang tingkat signifikansi  $p < 0,05$ . Nilai signifikan pada semua sampel memiliki nilai  $p < 0,05$ .

Tabel 2. Menunjukkan bahwa koloni *Escherichia coli* yang tumbuh pada tempe kacang merah paling rendah terdapat pada pengenceran pertama . Hasil ini berhubungan dengan semakin tinggi pengenceran, maka daya hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* akan juga akan semakin sedikit. Hasil ini juga didukung pada perhitungan koloni dari BAL tempe kacang merah yang menunjukkan pada pengenceran pertama jumlah koloni BAL paling tinggi. Semakin tinggi kadar BAL maka daya hambat dalam mengurangi pertumbuhan *Escherichia coli* makin tinggi pula sehingga hasil koloni yang semakin rendah



Gambar a



Gambar b



Gambar C

**Keterangan :**

Gambar diatas merupakan media EMB (*Eosine Methylene Blue*) agar yang telah ditumbuhi bakteri *Escherichia coli*. Pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ditandai dengan adanya warna hijau metalik pada media. Gambar a merupakan *Escherichia coli* dari tempe kacang merah. Gambar b merupakan hasil *Escherichia coli* pada tempe kacang tanah dan gambar C merupakan hasil *Escherichia coli* tempe kacang kedelai.

**Hasil Pengukuran pH Pada Tempe Kacang Merah , Tempe Kacang Tanah dan Tempe Kacang Kedelai.**

Hasil pengukuran pH pada tempe kacang tanah , kacang merah dan kacang kedelai pada pengenceran  $10^{-1}$  - $10^{-3}$  dengan rata-rata yang digambarkan pada (Tabel 3).

**Tabel 3 . Hasil Pengukuran pH Pada Tempe Kacang Merah, Tempe Kacang Kedelai dan Kacang Merah**

Sampel	N	Pengukuran pH
Tempe Kacang Merah	3	4,39 ± 0,02 <sup>a</sup>
Tempe Kacang Tanah	3	6,96 ± 0,02 <sup>b</sup>
Tempe Kacang Kedelai	3	5,97 ± 0,25 <sup>c</sup>

**Keterangan :**

Data merupakan hasil rata rata tiga kali pengulangan pada setiap pengenceran ± standar deviasi yang dinyatakan dalam cfu/ml. Analisa statistik menggunakan *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji LSD yang tingkat signifikansi  $p < 0,05$ . Nilai signifikan pada semua sampel memiliki nilai  $p < 0,05$ .

**Tabel 3.** Menunjukkan hasil berbeda signifikan. Namun, semakin tinggi pengenceran maka semakin tinggi juga pH yang dihasilkan. Hal ini berhubungan dengan semakin tinggi koloni BAL yang dihasilkan maka semakin rendah pH yang ada pada media.

**PEMBAHASAN****Total Bakteri Asam Laktat Pada Tempe Kacang Kedelai, Kacang Tanah, Kacang Merah**

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan di Laboratorium FK UNISMA didapatkan hasil TPC dari Tempe kacang merah menghasilkan total BAL (bakteri asam laktat) paling tinggi dengan nilai  $2,06 \pm 0,58$  cfu/ml dibandingkan dengan kedua tempe yang lain.

Uji statistic *One Way Anova* yang dilakukan pada perhitungan total BAL(bakteri asam laktat) pada pengenceran  $10^{-1}$ - $10^{-3}$  pada tempe kacang merah, kedelai, dan kacang tanah berbeda signifikan ( $p < 0,05$ ) antara masing-masing tempe. Uji *post hoc* LSD pada setiap tempe pada pengenceran  $10^{-1}$  –  $10^{-3}$  menunjukkan data yang berbeda signifikan antar ketiga macam tempe dikarenakan nilai ( $p < 0,05$ ).

Pertumbuhan BAL pada tempe kacang merah mempunyai nilai paling tinggi disebabkan saat inkubasi terjadi perombakan glukosa oleh BAL yang lebih lama dan optimal daripada jenis tempe yang lain. Kadar glukosa pada tempe sangat berpengaruh pada pertumbuhan dan metabolisme BAL. Semakin tinggi

ketiga tempe yang diteliti dari pengenceran  $10^{-1}$  –  $10^{-3}$  yang telah diinkubasi pada media *MRS BROTH* dan diinokulasikan ke dalam media *MRS Agar* hingga tumbuh koloni BAL dengan bakteri berwarna putih dan semi *mucoïd*. Hal ini merupakan ciri spesifik dari tumbuhnya bakteri asam laktat pada media.

Dalam penelitian ini hasil tersebut dihitung dengan rumus TPC dan diambil rata-rata tertinggi kadar glukosa maka semakin tinggi pula perombakan glukosa menjadi asam laktat akan semakin tinggi.

Tingginya bakteri asam laktat (BAL) juga berpengaruh pada kandungan senyawa aktif pada kacang merah. Kandungan senyawa aktif kacang merah mengandung flavonoid, senyawa fenolik, tanin, alkaloid, daidzein, formononetin, glicitein dan genestein. Beberapa senyawa ini akan dipecah menjadi senyawa yang lebih aktif oleh adanya bakteri asam laktat yang dihasilkan saat proses fermentasi<sup>20</sup>. Semakin tinggi bakteri asam laktat maka semakin cepat metabolisme dari senyawa yang di hasilkan dari kacang merah<sup>20,21</sup>.

Pada penelitian ini tempe kacang merah menghasilkan total BAL yang paling tinggi diantara kedua tempe yang lain. Hal ini dipengaruhi oleh kandungan karbohidrat pada kacang merah lebih tinggi dibandingkan kacang yang lain. Kacang merah

mengandung karbohidrat sebanyak 59,5 kacang kedelai 34,8 , kacang tanah 16g per 100 gr makanan. Tingginya karbohidrat pada kacang merah menyebabkan metabolisme BAL juga meningkat. Karbohidrat inilah yang akan dipecah menjadi glukosa sebagai bahan baku metabolisme BAL.

Metabolisme BAL menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir dari BAL. Hal ini akan menyebabkan kadar asam laktat yang dihasilkan akan semakin tinggi . Asam laktat yang tinggi akan menyebabkan aktivitas BAL dalam memecah laktosa menjadi asam laktat melalui jalur *Embden Meyerhof-Parnas* (EMP) dalam metabolisme BAL semakin tinggi pula<sup>22</sup>. Tingginya asam laktat yang dihasilkan akan memacu pertumbuhan. BAL dan mencegah koloni bakteri lain tumbuh pada media dikarenakan akan menurunkan nilai pH lingkungan media <sup>22</sup>. Pada penelitian ini, pada media *MRS Agar* hanya terlihat bakteri berwarna putih dengan permukaan cembung dan semi mucoid dan tidak adanya bakteri lain yang muncul . Hal ini disebabkan karena media *MRS Agar* merupakan media selektif yang di gunakan untuk penumbuhan BAL<sup>23</sup>.

Tumbuhnya BAL juga dipengaruhi oleh proses fermentasi pada saat pembuatan tempe Makanan yang mengandung probiotik salah satu kriterianya yakni menghasilkan bakteri probiotik yaitu bakteri asam laktat dengan minimal asam laktat yang tumbuh yakni  $10^8$  cfu/ml . Bakteri asam laktat berfungsi sebagai barrier epitel terutama pada saluran cerna <sup>21</sup>. Selain itu, bakteri asam laktat menghasilkan bakteriosin yang mencegah terjadinya kolonisasi bakteri patogen terutama bakteri *Escherichia coli*. Selain menghasilkan asam laktat dan bakteriosin, BAL juga memiliki kemampuan memproduksi asam asetat yang berfungsi menekan pertumbuhan bakteri patogen seperti *Clostridium pefringens* dan bakteri *E.coli* yang merupakan salah satu penyebab peradangan pada saluran cerna <sup>4,24</sup>.

#### **Hasil Kuantifikasi TPC *Escherichia coli* Tempe Kacang Merah, Kacang Kedelai, Kacang Tanah**

Dalam penelitian ini didapatkan hasil TPC bakteri *E. coli* untuk melihat kemampuan BAL dalam mencegah kolonisasi bakteri *E.coli* dari ketiga tempe yang diteliti dari pengenceran  $10^{-1} - 10^{-3}$  yang telah diinkubasikan pada media *MRS Agar* dan diinokulasikan ke dalam media *EMBA (Eosine Methylene Blue)* yang merupakan media selektif pada pertumbuhan *E.coli* dengan ditandai koloni bakteri yang muncul berwarna hijau metalik<sup>14</sup>. Hal ini disebabkan media *EMBA (Eosine Methylene Blue)* merupakan media yang selektif terhadap bakteri *E.coli*<sup>14</sup>.

Uji statistic *One Way Anova* yang dilakukan pada perhitungan laju pertumbuhan *Escherichia coli* pada pengenceran  $10^{-1}-10^{-3}$  pada tempe kacang merah, kedelai, dan kacang tanah berbeda signifikan ( $p < 0,05$ ) antara masing-masing tempe. Uji *post hoc* LSD pada setiap tempe pada pengenceran  $10^{-1} - 10^{-3}$  menunjukkan data yang berbeda signifikan antar ketiga macam tempe dikarenakan nilai ( $p < 0,05$ )

Pada penelitian ini didapatkan hasil tempe kacang merah lebih efektif dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* dengan hasil koloni *Escherichia coli*

yang paling rendah yakni  $1,71 \pm 1,41$  cfu/ml. Hasil penelitian ini berhubungan dengan penghitungan total BAL pada tempe kacang merah paling tinggi dibandingkan dari tempe kacang kedelai dan kacang tanah . Semakin tinggi bakteri asam laktat (BAL) yang dihasilkan, maka semakin banyak asam laktat dan asam asetat, dan semakin turun pH yang menyebabkan kolonisasi bakteri patogen seperti *Escherichia coli* juga akan terhambat<sup>25</sup>.

Selain asam laktat yang dihasilkan oleh metabolisme BAL, pada tempe kacang merah mengandung senyawa aktif seperti flavonoid, fenolik, tanin, alkaloid, daidzein, formononetin, glicitein dan genestein<sup>20</sup>. Beberapa senyawa ini akan dipecah menjadi senyawa yang lebih aktif oleh adanya bakteri asam laktat yang dihasilkan saat proses fermentasi<sup>20</sup>. Semakin tinggi bakteri asam laktat maka semakin cepat metabolisme dari senyawa yang di hasilkan dari kacang merah<sup>26</sup>. Beberapa senyawa aktif pada kacang merah diduga sebagai antibakteri sehingga membantu penghambatan koloniasi bakteri<sup>21,27</sup>

Kandungan senyawa aktif pada kacang merah memiliki potensi antibakteri pada bakteri *Escherichia coli*. Hal ini berhubungan dengan kadar asam organik, total bakteri asam laktat dan polifenol yang mengalami peningkatan saat proses fermentasi. Adanya peningkatan kadar asam organik menyebabkan keseimbangan pH pada bakteri sehingga menyebabkan proses sintesis pada bakteri terhambat. Selain itu, adanya kandungan flavonoid pada kacang merah juga mengalami degradasi sehingga aktivitasnya akan meningkat saat proses fermentasi. Degradasi flavonoid ini disebabkan karena adanya enzim peroksisomal seperti katalase yang membelah cincin C pada flavonoid menjadi asam fenolik. Flavonoid memiliki potensi antibakteri dengan menghambat sintesis asam nukleat, menghambat metabolisme energi , menghambat pembentukan biofilm, dan menyebabkan permeabilitas membran bakteri terganggu<sup>28</sup>. Hal ini juga di dukung pada penelitian tentang kombucha *Annona muricata* Linn terhadap penghambatan pada bakteri *Escherichia coli* membuktikan bahwa kombucha menghasilkan faktor asam laktat yang bisa menghambat kolonisasi bakteri *Escherichia coli* pada produk fermentasi salah satunya yakni kombucha<sup>28</sup>.

Bakteri asam laktat yang dihasilkan pada produk tempe selain asam asetat, BAL menghasilkan hidrogen peroksida karbondioksida dan bakteriosin. Senyawa yang dihasilkan oleh BAL ini mekanisme produksinya di atur oleh gen-gen dalam kromosom bakteri dan berasal dari gen yang berada dalam plasmid. Gen ini sangat peka terhadap perubahan lingkungan seperti pH . Jika pH asam, maka bakteri asam laktat akan mudah bermetabolisme dan menghasilkan zat bakteriosin dan senyawa lainnya<sup>29</sup>.

Bakteriosin merupakan toksin yang dihasilkan BAL menyerupai protein yang dilepaskan bakteri untuk menghambat pertumbuhan dari bakteri dengan strain yang sama. Bakteriosin memiliki sifat *single hit inactivation* yang artinya satu molekul bakteriosin akan membunuh satu sel bakteri indikator. Bakteriosin juga

mencegah sintesis peptidoglikan sehingga dinding sel bakteri patogen akan melemah dan akhirnya akan lisis. Semakin tinggi BAL yang dihasilkan, semakin tinggi pula penghambatan kolonisasi bakteri patogen<sup>29</sup>.

Pada penelitian ini, semakin tinggi pengenceran, maka koloni bakteri *Escherichia coli* akan semakin tinggi dikarenakan potensi atau kadar BAL yang dihasilkan juga akan makin sedikit. Aktivitas BAL dalam menghambat bakteri patogen sangat dipengaruhi oleh pH, suhu, sumber karbon, serta fase pertumbuhan<sup>29</sup>.

### Hasil pengukuran pH pada Tempe Kacang Merah, Kacang Kedelai, Kacang Tanah.

Dalam penelitian ini didapatkan hasil tempe kacang merah memiliki pH yang paling asam dan paling mendekati pH tempe pada umumnya<sup>4</sup>. Uji statistik *One Way Anova* yang dilakukan pada perhitungan pH dengan pH mter pada pengenceran  $10^{-1}$  –  $10^{-3}$  pada tempe kacang merah, kedelai, dan kacang tanah berbeda signifikan ( $p < 0,05$ ) antara masing-masing tempe. Uji *post hoc* LSD pada setiap tempe pada pengenceran  $10^{-1}$  –  $10^{-3}$  menunjukkan data yang berbeda signifikan antar ketiga macam tempe dikarenakan nilai ( $p < 0,05$ ).

pH yang asam pada tempe dihasilkan akibat adanya proses fermentasi saat pembuatan tempe. Asam laktat yang dihasilkan berasal dari bakteri asam laktat yang menghasilkan asam laktat dan asam asetat. Adanya peningkatan angka bakteri asam laktat, maka semakin rendah pH yang dihasilkan<sup>18</sup>. Hal ini didukung pada penelitian total BAL (bakteri asam laktat) pada tempe kacang merah paling tinggi dan pada kombinasi ekstrak tempe kacang merah dengan kombinasi *Escherichia coli* menghasilkan koloni *Escherichia coli* paling rendah. Kedua hal tersebut berhubungan pada hasil pH ekstrak tempe kacang merah. Semakin tinggi BAL yang dihasilkan, maka semakin rendah pH sehingga penghambatan pada bakteri *Escherichia coli* semakin besar. Semakin rendah pH maka kandungan asam laktat dan asam asetat semakin tinggi<sup>8</sup>.

Asam laktat merupakan metabolit utama yang dihasilkan bakteri asam laktat (BAL) dalam metabolisme karbohidrat. Metabolit ini bersifat antimikroba terhadap pertumbuhan mikroorganisme sehingga menyebabkan kolonisasi bakteri patogen berkurang terutama pada bakteri yang tidak tahan asam<sup>18</sup>. Hal ini didukung pada penelitian yang dilakukan di Laboratorium FK UNISMA didapatkan hasil pH tempe paling rendah pada tempe kacang merah yakni  $4,39 \pm 0,01$  dan jumlah total BAL pada tempe lebih banyak daripada total bakteri *Escherichia coli* yang tumbuh.

Penghambatan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* di sebabkan oleh adanya pH yang rendah. Pada proses fermentasi menurunkan pH substrat sehingga menghambat kelompok bakteri lain atau menyebabkan gangguan metabolisme bakteri patogen lain<sup>18</sup>. Perubahan pH bergantung pada jumlah BAL yang dihasilkan saat proses fermentasi. Perubahan pH ini menunjukkan terjadinya seleksi pertumbuhan yang dapat disebabkan oleh perubahan kondisi fermentasi yang melibatkan faktor lingkungan salah satunya kelembapan dan suhu

lingkungan<sup>18</sup>. Suhu dan kelembapan berhubungan dengan pembuatan tempe agar bisa mendapatkan tempe yang bagus dan mengandung probiotik.

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisa statistik penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Total BAL (Bakteri Asam Laktat) pada tempe kacang merah lebih tinggi dibandingkan tempe kacang tanah dan kacang kedelai.
2. Tempe Kacang merah menghasilkan koloni bakteri *Escherichia coli* lebih rendah dibandingkan tempe kacang tanah dan kacang kedelai
3. Tempe kacang merah memiliki nilai pH paling rendah dibandingkan pH tempe kacang tanah dan kacang kedelai.

### SARAN

Adapun beberapa saran untuk meningkatkan penelitian ini di masa mendatang yaitu:

1. Melakukan penelitian lanjutan dengan menggunakan uji fitokimia untuk mengetahui zat antioksidan yang bersifat antimikroba dengan ekstrak yang lebih halus
2. Melakukan penelitian lanjutan dengan menggunakan uji pewarnaan gram untuk mengetahui kelompok gram negatif atau gram positif pada bakteri asam laktat yang dihasilkan saat penelitian.

### UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Ikatan Orang Tua Mahasiswa (IOM) selaku pemberi dana serta tim kelompok penelitian yang telah membantu penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Kemenkes. Diare. Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI. 2020.
2. Kemenkes. Laporan Hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) Indonesia tahun 2018. Riskesdas Kesehatan Dasar 2018. 2018;182–3.
3. Kemenkes. Profil Kesehatan Indonesia 2018 [Internet]. Kementerian Kesehatan. 2019. Available from: [http://www.depkes.go.id/resources/download/pusdatin/profil-kesehatan-indonesia/Data-dan-Informasi\\_Profil-Kesehatan-Indonesia-2018](http://www.depkes.go.id/resources/download/pusdatin/profil-kesehatan-indonesia/Data-dan-Informasi_Profil-Kesehatan-Indonesia-2018)
4. Zein U. Diare Akut Disebabkan Bakteri. Univ Sumatera Utara. 2004;(January 2004):1–15.
5. Zein U. Diare Akut Disebabkan Bakteri. Univ Stuttgart. 2004;(January 2004):1–15.
6. Rachmawani NR, Oktarlina RZ. Khasiat Pemberian Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) sebagai Terapi Alternatif Diabetes Melitus Tipe 2 The Effect of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as Alternative Therapy Of Type 2 Diabetes Mellitus. Majority. 2017;8:145–50.
7. Priyantoro ST, Mustika S. Peranan Gut Mikrobiota dalam Patogenesis Inflammatory Bowel Disease dan Pendekatan Terapi Probiotik. Bagian Ilmu Penyakit Dalam Fak Kedokt Univ Brawijaya. 2015;42(6):467–70.
8. Puspaningrum, Wijaya B, Widowati A, Wardani T. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Tempe

- Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli*. Repos Unsri [Internet]. 2021; Available from: <http://repository.unsri.ac.id/id/eprint/50445>
9. Shengjuan Jiang, Yuhan M, Yan D. Antioxidant and antimicrobial properties of water soluble polysaccharide from *Arachis hypogaea* seeds. *Assoc Food Sci Technol* 2012. 2012;1:2841.
  10. Panjaitan R, Nuraida L, Dewanti-Hariyadi R. Seleksi Isolat Bakteri Asam Laktat Asal Tempe Dan Tape Sebagai Kandidat Probiotik. *J Teknol dan Ind Pangan*. 2018;29(2):175–84.
  11. Suknia. Proses Pembuatan Tempe Home Industry Berbahan Dasar kedelai dan Kacang Merah Di Candiwesi Salatiga. *South East Asian J Islam Educ*. 2020;01:59–75.
  12. Af'idah F, Trimulyono G. Uji Aktivitas Antioksidan Dan Kadar Asam Laktat Yoghurt Tempe Kedelai (*Glycine Max*) Dan Yoghurt Tempe Kacang Hijau (*Vigna Radiata*). *LenteraBio Berk Ilm Biol*. 2019;8(1).
  13. Putri N, Mujtahidah T. Panduan Praktikum Mikrobiologi Dasar. *Panduan Praktikum Mikrobiologi*. Magelang: Universitas Tidar; 2019. p. 28–31.
  14. Onggowidjaja P, Rusmana D, Kedokteran F, Maranatha UK, Prof J, Mph S, et al. Bakteri Coliform dalam Es Batu pada Tiga Rumah Makan Ayam Goreng Siap Saji di Bandung. 2002;(65):124–8.
  15. MicrobeHolic. MRS Agar - Definisi, Komposisi, Cara Pembuatan dan Interpretasi Hasil [Internet]. MicrobeHolic. 2020. Available from: [https://www.microbeholic.com/2020/05/mrs-agar-definisi-komposisi-cara-pembuatan-dan-interpretasi-hasil.html#google\\_vignette](https://www.microbeholic.com/2020/05/mrs-agar-definisi-komposisi-cara-pembuatan-dan-interpretasi-hasil.html#google_vignette)
  16. Utami S, Bintari SH, Susanti R. Deteksi *Escherichia coli* pada Jamu Gendong di Gunungpati dengan Medium Selektif Diferensial. *Life Sci*. 2018;7(2):73–81.
  17. Wijaya RC, Utari EL, Yudianingish. Perancangan Alat Perhitungan Bakteri. *J Teknol Inf*. 2015;10(1):1907–2430.
  18. Indah D, Yanti W, Dali FA. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Yang Diisolasi Selama Fermentasi Bakasang. *J Pengolah Has Perikan Indones*. 2014;16(2):133–41.
  19. Erna Ayu Dwinaningsih. Karakteristik Kimia dan Sensori Tempe dengan Variasi Bahan Baku Kedelai/Beras dan Penambahan Angkak Serta Variasi Lama Fermentasi. *Fak Pertan Univ Negeri Semarang*. 2010;01.
  20. Damayanti D. Potency Of *Vigna Angularis* Against  $E\alpha$  Through In Silico Studies. *J Kesehat Islam Islam Heal J*. 2020;9(2):49.
  21. Rizal S, Erna M, Nurainy F. Karakteristik Probiotik Minuman Fermentasi Laktat Sari Buah Nanas dengan Variasi Jenis Bakteri Asam Laktat Probiotic Characteristic of Lactic Fermentation Beverage of Pineapple Juice with Variation of Lactic Acid Bacteria ( LAB ) Types mengonsumsi minuman. *Indones J Appl Chem*. 2016;18(1):63–71.
  22. Murni I, Reftiana E, Puji A, Harti AS, Estuningsih, Kusumawati HN. Pemanfaatan bakteri asam laktat dalam proses pembuatan tahu dan tempe untuk peningkatan kadar isoflavon, asam linoleat dan asam linolenat. *J Kesehat Kusuma Husada* [Internet]. 2013;4(2):89–95. Available from: <http://jurnal.stikeskusumahusada.ac.id/index.php/JK/article/view/66/111>
  23. Putri AL, Kusdiyantini E. Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat dari pangan fermentasi berbasis ikan (Inasua) yang diperjualbelikan di Maluku-Indonesia. *J Biol Trop*. 2018;1(2):6.
  24. Sopandi T, A W. *Mikrobiologi Pangan*. 01 ed. Yogyakarta: ANDI; 2014.
  25. Poernomo D, Wijatur W, Perikanan F. Pengaruh Konsentrasi Garam Pada Peda Ikan Kembang (*Rastrelliger Sp.*) Dengan Fermentasi Spontan. 2009;XII:73–87.
  26. Virgianti D. Uji Antagonis Jamur Tempe (*Rhizopus Sp*) terhadap Bakteri Patogen Enterik. *Biosfera* [Internet]. 2015;32(3):162–8. Available from: <https://journal.bio.unsoed.ac.id/index.php/biosfera/article/view/339>
  27. Dewi Listyana, subandi S. Uji Antibakteri Dan Daya Inhibisi Ekstrak Kulit Kacang Tanah Terhadap Aktivitas Enzim Xantin Oksidase. *Jur Kim Fmipa Univ Negeri Malang* [Internet]. 2013;(July):32.
  28. Palupi K, Hakim R, Damayanti D. Penghambatan Pertumbuhan *Escherichia Coli* Dan *Salmonella Typhi* Oleh Kombucha *Annona muricata* Linn. *J Bio Komplementer Med*. 2021;1–8.
  29. Hamidah M, Rianingsih L, Romadhon. Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat dari Peda Jenis Ikan Berbeda Terhadap *E. coli* dan *S. aureus*. *J Ilmu dan Teknol Perikan*. 2019;1(2):182–4.