

Artikel Penelitian

# Profil Bakteri Asam Laktat dan Evaluasi Sensori dari Tempe Bungkus Daun Jati yang Disuplementasi dengan Daun Kelor

*Lactic Acid Bacteria Profile and Sensory Evaluation of Teak Leaf-Wrapped Tempeh Supplemented with Moringa Leaves*

Stella Magdalena<sup>1\*</sup>, Yogiara<sup>2</sup>, Adi Yulandi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknobiologi, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jakarta

<sup>2</sup>Program Studi Magister Bioteknologi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jakarta

<sup>3</sup>Program Studi Biologi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jakarta

\*Korespondensi dengan penulis ([stella.magdalena@atmajaya.ac.id](mailto:stella.magdalena@atmajaya.ac.id))

Artikel ini dikirim pada tanggal 4 Maret 2020 dan dinyatakan diterima tanggal 27 Februari 2021. Artikel ini juga dipublikasi secara online melalui <https://ejournal2.undip.ac.id/index.php/jatp>. Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang diperbanyak untuk tujuan komersial.

Diproduksi oleh Indonesian Food Technologists ©2021

## Abstrak

Tempe bungkus daun jati merupakan produk pangan fermentasi tradisional Indonesia yang kaya protein, serat, dan vitamin yang sangat populer di Kabupaten Blora, Jawa Tengah. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh penambahan daun kelor pada tahapan perendaman dan peragian dalam proses produksi tempe terhadap profil bakteri asam laktat (BAL) dan tingkat kesukaan. Daun kelor segar dan serbuk disuplementasikan dengan variasi konsentrasi pada proses produksi tempe kacang kedelai. Hasil penelitian menunjukkan bahwa daun kelor tidak menghambat aktivitas pertumbuhan dari kapang *Rhizopus*. Penambahan serbuk daun kelor sebanyak 1x dan 2x (b/b) dari total jumlah ragi pada proses peragian menghasilkan tekstur tempe yang kompak. Semakin tinggi konsentrasi air perasan daun kelor dalam proses perendaman, jumlah total bakteri asam laktat menurun hingga  $10^3$  CFU/g. Profil BAL dari tempe bungkus daun jati dengan ataupun tanpa suplementasi daun jati mengandung BAL dari genus *Weissella*. Tempe bungkus daun jati dengan suplementasi 1x (b/b) serbuk daun kelor sangat berpotensi untuk disosialisasikan sebagai pangan fungsional kepada masyarakat.

Kata kunci: tempe bungkus daun jati, daun kelor, bakteri asam laktat, sensori, probiotik

## Abstract

*Tempeh wrapped in teak leaves is a traditional Indonesian fermented food product that is rich in protein, fiber, and vitamins which is very popular in Kabupaten Blora, Central Java. This study aimed to investigate the effect of Moringa leaves addition in the soaking and fermentation stages of tempeh production towards the profile of lactic acid bacteria (LAB) and the level of respondent acceptance. Fresh and powdered leaf was supplemented in various doses to soybean tempeh production. As results, Moringa leaves did not inhibit the growth of Rhizopus. The addition of Moringa leaf powder as much as 1x and 2x (w/w) of the total amount of yeast in the fermentation process produced a compact tempeh texture. The higher the concentration of Moringa leaf juice in the soaking process reduced total number of lactic acid bacteria to  $10^3$  CFU/g. LAB profile of teak leaf-wrapped tempeh with or without teak leaf powder supplementation contained LAB that belongs to the genus Weissella. Teak leaf-wrapped tempeh supplemented by 1x (w/w) Moringa leaf powder has a potential value to be socialized as functional food to the community.*

Keywords: teak leaf-wrapped tempeh, Moringa leaves, lactic acid bacteria, sensory, probiotic

## Pendahuluan

Tempe merupakan sumber protein nabati yang umum dikonsumsi di Indonesia dan diketahui memiliki nilai fungsional terhadap kesehatan, diantaranya mencegah terjadinya diare, sumber antioksidan, dan mereduksi munculnya penyakit kardiovaskular serta kanker (Astuti *et al.*, 2001; Nout and Kiers, 2005). Konsumsi tempe juga dapat meningkatkan fungsi kognitif otak pada komunitas lansia (Hogervorst *et al.*, 2008; Hogervorst *et al.*, 2011). Tempe juga dapat meningkatkan komposisi bakteri yang bermanfaat di dalam usus manusia (Stephanie *et al.*, 2018). Menurut Badan Pusat Statistik, rata-rata konsumsi tempe per kapita seminggu di Indonesia pada tahun 2007-2017 sebanyak 138 g. Pengalaman dan metode yang diwariskan secara turun temurun pada proses pembuatan tempe di tiap daerah biasanya mengikuti ketersediaan sumber daya alam yang ada. Salah satu

daerah penghasil tempe terbesar di provinsi Jawa Tengah yaitu Kabupaten Blora.

Kabupaten Blora memiliki hutan jati terluas di Jawa Tengah (Ulyatin dan Ba'in, 2020). Selain potensi kayu, masyarakat memanfaatkan daun tanaman jati sebagai media pembungkus dalam produksi tempe. Rata-rata industri rumah tangga di Jawa Tengah menghabiskan 70% dari ketersediaan kacang kedelai untuk menjadi tempe, termasuk tempe bungkus daun jati, dengan aroma dan cita rasa khas yang siap dipasarkan (Arnanda *et al.*, 2015).

Tipe fermentasi yang terbuka pada produksi tempe memungkinkan komunitas mikroba yang bersifat aerob obligat ataupun anaerob fakultatif dari lingkungan bersama *Rhizopus* spp. sebagai ragi, menghidrolisis senyawa-senyawa kompleks kacang kedelai menjadi senyawa sederhana yang lebih mudah dicerna dan meningkatkan nilai nutrisinya (Liem *et al.*, 1977; Nout

and Kiers, 2005; Barus *et al.*, 2008). Aktivitas mikroba selama proses fermentasi berperan dalam transformasi bahan pangan sehingga dapat meningkatkan kandungan nutrisi dan cita rasa (Bigot *et al.*, 2016). Keberadaan bakteri asam laktat pada komunitas mikroba tersebut menjadikan tempe sebagai salah satu sumber probiotik yang mampu meningkatkan respon imun (Soka *et al.*, 2015).

Selain tanaman jati, kabupaten Blora memiliki potensi sumber daya alam lainnya yang sangat bermanfaat yaitu tanaman kelor (*Moringa oleifera*) yang sangat bermanfaat dalam mengatasi permasalahan gizi buruk di Indonesia (Akbar *et al.*, 2019). Daun kelor memiliki kandungan nutrisi dan manfaat bagi kesehatan sebagaimana penelitian Moyo *et al.* (2011), daun kelor kering memiliki kandungan 19 asam amino, asam lemak, vitamin E,  $\beta$ -karoten, dan mineral yang jauh lebih tinggi dibandingkan daun kelor segar. Daun kelor merupakan sumber vitamin C, kalsium, protein, senyawa fenolik, dan flavonoid (Razis *et al.*, 2014). Ekstrak daun kelor, diantaranya memiliki aktivitas antiinflamasi (Razis *et al.* 2014), antioksidan (Fitriana *et al.*, 2018) dan anti-kanker (Razis *et al.*, 2014). Oleh karena itu, suplementasi daun kelor pada tempe diduga dapat meningkatkan kualitas dan manfaat tempe.

Pemanfaatan daun kelor sebagai suplementasi pada produk probiotik yoghurt telah diteliti oleh peneliti terdahulu. Ilona dan Ismawati (2015) melaporkan pengaruh penambahan ekstrak daun kelor berpengaruh nyata terhadap warna, aroma, kekentalan dan rasa, namun tidak berpengaruh nyata terhadap tekstur dan kesukaan dengan jumlah BAL sebesar  $1,2 \times 10^4$  CFU/ml. Hal ini juga sejalan dengan penelitian sebelumnya (Kuikman and O'Connor, 2015) yang menyatakan bahwa penambahan daun kelor pada produk yoghurt yang mengandung pisang tidak menurunkan nilai kualitas sensori dibandingkan dengan probiotik yoghurt kontrol. Sampai saat ini masih sedikit informasi mengenai penggunaan daun kelor pada pembuatan tempe, sehingga penelitian ini menjadi salah satu kegiatan penelitian yang penting untuk dilakukan.

Tujuan dari penelitian ini adalah memproduksi tempe yang dibungkus daun jati dengan suplementasi daun kelor. Penambahan dilakukan dengan dua perlakuan yaitu serbuk daun kelor ditambahkan bersamaan dengan pemberian ragi dan air perasan daun kelor segar digunakan pada perendaman kacang kedelai. Selanjutnya tempe modifikasi tersebut dikarakterisasi dari profil bakteri asam laktat dan tingkat kesukaan. Penelitian ini sangat bermanfaat untuk mendapatkan informasi tentang potensi penggunaan daun kelor dalam menghasilkan tempe.

## Materi dan Metode

### Materi

Bahan yang digunakan meliputi kacang kedelai putih dan ragi komersial *Raprima*<sup>TM</sup>. Daun kelor segar diperoleh dari tanaman kelor di daerah Jakarta Barat dan serbuk daun kelor komersial *Kelorina*<sup>TM</sup> merupakan produk dari Kabupaten Blora. Daun Jati diperoleh dari hutan milik Kampus BSD, Universitas Katolik Indonesia

Atma Jaya. Total dan profil bakteri asam laktat dianalisis dengan media *de Man Rogosa Sharpe Agar* (Oxoid, Inggris) disuplementasi dengan  $\text{CaCO}_3$  dan *SolG Genomic DNA Prep Kit* (SolGent, Korea Selatan). Alat yang digunakan meliputi inkubator (Mermert GmbH, Jerman), elektroforesis (Bio-Rad Laboratories Inc., Amerika Serikat), mesin *thermocycler ProFlex PCR System* (ThermoFisher Scientific, Amerika Serikat), Vilber Gel Doc System (Vilber Lourmat, Perancis).

### Metode

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei–September 2019 di Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Teknologi DNA, Fakultas Teknobiologi, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jakarta. Eksperimen ini menggunakan 2 macam perlakuan yaitu penambahan serbuk daun kelor pada tahapan peragian dan penambahan air perasan daun kelor segar pada proses perendaman kacang kedelai.

### Produksi Tempe

Proses pembuatan tempe dilakukan dengan metode yang diadaptasi dari para pengrajin tempe di Kabupaten Blora, yang sejalan dengan metode Winarno dan Reddy (1986). Kacang kedelai dicuci untuk menghilangkan kotoran, yang kemudian direbus selama 20 menit, dan dilepaskan kulit arinya. Kacang kedelai yang sudah dipisahkan kulit arinya, direndam dengan menggunakan air bebas klorin selama semalam lalu direbus kembali selama 20 menit, ditiriskan, dan dikeringudarkan. Ragi tempe sebanyak 2% (b/b) ditambahkan pada kacang kedelai dan diaduk secara merata. Pada tahap ini, kacang kedelai siap untuk dibungkus dengan daun jati. Modifikasi perlakuan penambahan serbuk daun kelor dan penggunaan air perasan daun kelor segar dilakukan pada tahap ini.

### Modifikasi Pembuatan Tempe

Serbuk daun kelor ditambahkan pada saat peragian dengan variasi konsentrasi yaitu 1x, 2x, dan 5x (b/b) dari total jumlah ragi yang diberikan. Konsentrasi suplementasi terbaik dipilih berdasarkan dari tekstur tempe yang dihasilkan.

Daun kelor segar dipetik dan dipisahkan dari ranting. Daun kelor diperas dan variasi konsentrasi tertentu digunakan sebagai air rendaman kacang kedelai. Air perasan untuk perendaman dibuat dengan cara menimbang sebanyak 100 g daun kelor segar, dimasukkan ke dalam 100 ml air, dan diperas selama 10 menit (Diantoro *et al.*, 2015). Variasi konsentrasi air rendaman yang digunakan yaitu 100% air perasan dan 100% air dengan perbandingan 1:1 (v/v).

### Penghitungan Jumlah Bakteri Asam Laktat (BAL)

Sebanyak 1 g tempe dimasukkan dalam 9 ml garam fisiologis 0,85% (b/v). Dilusi bertingkat dibuat dan sebanyak 100  $\mu\text{L}$  suspensi disebar pada media *de Man Rogosa Sharpe agar* (MRSA) yang disuplementasi dengan  $\text{CaCO}_3$  (Abubakr and Al-Adiwih, 2017). Media diinkubasi selama 48 jam pada suhu 35 °C secara anaerob. Pertumbuhan BAL pada media diobservasi

dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni dan dihitung jumlahnya. Tempe bungkus daun jati tanpa perlakuan digunakan sebagai kontrol. Sebanyak 5 isolat BAL dari tempe tanpa perlakuan dan 5 isolat BAL dari tempe dengan penambahan serbuk daun kelor dimurnikan pada media MRSA untuk dianalisis profilnya secara molekuler.

#### Uji Evaluasi Sensori

Evaluasi sensori dilakukan pada 30 orang panelis tidak terlatih dengan variasi gender dan usia. Uji ini dilakukan pada tempe bungkus daun jati tanpa perendaman air perasan daun kelor dengan variasi perlakuan pada penambahan serbuk daun kelor yang meliputi tanpa perlakuan (sebagai kontrol), 1x (b/b) serbuk, dan 2x (b/b) serbuk. Setiap sampel tempe diberikan kode tertentu. Uji kesukaan dilakukan dengan metode *scoring* menggunakan skala 1 (sangat tidak disukai) – 5 (sangat disukai). Setiap sampel tempe dipotong dengan ukuran 2 x 2 x 2 cm<sup>3</sup> dan digoreng hingga berwarna kecoklatan. Panelis diberi 3 sampel, 1 gelas air mineral, dan borang penilaian di atas nampan. Setiap panelis diminta minum air putih di antara mencicip tiap sampel untuk menetralkan indera pengecap. Penilaian meliputi aroma, tekstur, rasa, *aftertaste*, dan keseluruhan penampakan. Setiap data dikumpulkan dan dianalisis untuk diukur rerata. Grafik *spider web* nilai rata – rata penilaian dari panelis dibuat menggunakan *package 'fmsb'* pada aplikasi R (<https://www.r-project.org>)

#### Analisis Profil Bakteri Asam Laktat

Sebanyak total 6 isolat yang diperoleh dari tempe bungkus daun jati dengan suplementasi 1x (b/b) serbuk daun kelor dipilih untuk diidentifikasi secara molekuler. Sebagai pembanding, lima isolat yang diisolasi dari tempe bungkus daun jati asal Kabupaten Blora juga diidentifikasi. Analisis profil BAL dilakukan melalui sekuensing gen penyandi 16S rRNA. DNA diisolasi dengan menggunakan Solg Genomic DNA Prep Kit (SolGent, Daejeon, Korea Selatan) mengacu pada protokol standar dari produsen. Gen penyandi 16S rRNA diamplifikasi dengan menggunakan primer universal 7F (5'-AGAGTTTGGAT(C/T)(A/C)TGGCTCAG-3') dan 7R (5'-CACCGCTACACATGGAG -3') (Lane *et al.*, 1991). Komposisi campuran reaksi PCR terdiri dari 1 µl cetakan DNA, 1 µl *forward primer* (7F), 1 µl *reverse primer* (7R), 25 µl GoTaq Green Master Mix, dan 22 µl of ddH<sub>2</sub>O dengan volume total 50 µL. Amplifikasi gen dikondisikan sebagai berikut: pre-denaturasi pada suhu 94 °C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94 °C selama 30 detik, penempelan pada suhu 57 °C selama 30 detik, perpanjangan pada suhu 72 °C selama 60 detik, dan pasca perpanjangan pada suhu 72 °C selama 5 menit.

Produk hasil amplifikasi dipisahkan pada gel elektroforesis dengan 1% agarosa selama 60 menit pada 90V dan divisualisasi dengan menggunakan Vilber Gel Doc System (Vilber Lourmat, Perancis). Produk PCR disekuensing oleh First Base Laboratories Sdn Bhd, Malaysia. Hasil sekuens diedit menggunakan program SeqTrace versi 0.8.1 dan dibandingkan dengan

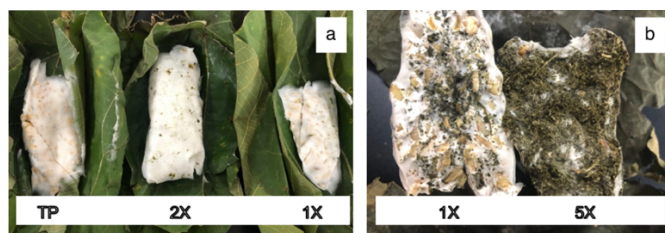
database genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) menggunakan algoritma BLASTN (Altschul *et al.*, 1990). Pohon filogenetika dikonstruksi menggunakan program MEGA X (Kumar *et al.*, 2018), dengan metode *Neighbor-Joining* dan model Jukes-Cantor dengan replikasi *bootstrapping* sebanyak 1000.

#### Hasil dan Pembahasan

##### Produksi Tempe dengan Suplementasi Daun Kelor

Pembuatan tempe bungkus daun jati dengan suplementasi daun kelor tidak menghambat pertumbuhan kapang *Rhizopus* (Gambar 1a). Hal ini bertolak belakang dengan penelitian Manenji *et al.* (2017), ekstrak daun kelor dengan air suling pada konsentrasi 30% mampu menghambat pertumbuhan *Rhizopus stolonifer* yang diisolasi dari buah tomat yang matang. Aktivitas penghambatan pertumbuhan terhadap kapang *Rhizopus* sp. juga ditunjukkan dari ekstrak biji daun kelor dengan menggunakan pelarut kloroform (Manenji *et al.*, 2017).

Karakteristik tempe yang disuplementasi dengan serbuk daun kelor masih memenuhi standar SNI 3144:2015 yaitu memiliki penampakan yang berwarna permukaan putih dan tidak menghasilkan aroma amoniak. Namun, kriteria tempe yang bertekstur kompak tidak terpenuhi pada suplementasi serbuk daun kelor sebesar 5x (b/b) (Gambar 1b). Miselium kapang *Rhizopus* tetap mampu menjalin butiran kacang kedelai, tetapi serbuk daun kelor rontok ketika tempe dipotong, maka penambahan serbuk daun kelor yang digunakan pada tahapan selanjutnya yaitu tempe bungkus daun jati dengan suplementasi serbuk daun kelor 1x dan 2x (b/b). Penampakan morfologi tempe dengan perlakuan perendaman pada semua variasi konsentrasi tidak berbeda jika dibandingkan dengan tempe tanpa perlakuan dan memenuhi standar SNI 3144:2015.



Gambar 1 Tampilan luar (a) dan tampilan dalam (b) dari tempe bungkus daun jati. TP: tanpa perlakuan sebagai kontrol; 1x, 2x, 5x: penambahan serbuk daun kelor dengan kelipatan terhadap jumlah massa ragi

##### Jumlah Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat yang ditumbuhkan pada media MRS dan CaCO<sub>3</sub> ditandai dengan pembentukan zona bening di sekeliling koloni karena asam organik yang dihasilkan (khususnya asam laktat) dapat bereaksi dengan kalsium karbonat. Berdasarkan Tabel 1, perendaman dengan air perasan daun kelor berpengaruh pada penurunan jumlah isolat BAL. Semakin tinggi tingkat konsentrasi air perasan daun kelor, jumlah isolat BAL semakin menurun hingga menjadi 10<sup>5</sup> CFU/g. Hal ini menunjukkan bahwa air perasan daun kelor segar memiliki aktivitas antibakteri.

Tabel 1. Total BAL pada tempe dengan penambahan air perasan dan serbuk daun kelor

Porsi air perasan daun kelor	Rasio serbuk daun kelor terhadap ragi (b/b)	Total BAL (CFU/g)
Air perasan 0%	0 (TP)	$1,14 \times 10^8$
	1x	$9,10 \times 10^7$
	2x	$6,50 \times 10^7$
Air tanah 50%: air perasan 50%	1x	$2,90 \times 10^6$
	2x	$1,24 \times 10^7$
Air perasan 100%	1x	$1,00 \times 10^5$
	2x	$4,00 \times 10^5$

Keterangan: TP berarti tanpa perlakuan

Daun kelor diketahui memiliki sifat antimikroba dan antiinflamasi (Yulianto, 2020). Menurut Abalaka *et al.* (2012), daun kelor yang diekstrak menggunakan air destilata dan dikonsentratkan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella thypi*. Daun kelor yang diekstrak dengan menggunakan pelarut kloroform, zona inhibisi yang terbentuk dapat lebih tinggi. Hal ini dapat terjadi karena hasil ekstrak dengan kloroform memiliki kandungan metabolit sekunder yang meliputi alkaloid, flavonoid, saponin, dan tannin. Ekstrak etanol dari daun kelor diketahui memiliki kandungan komponen bioaktif, seperti alkaloid, tannin, dan fenol yang mempengaruhi terhadap aktivitas penghambatan *E. coli* dan *Salmonella* (Imohiosen *et al.*, 2014). Hal ini juga sejalan dengan penelitian Oluduro (2012), ekstrak air dan methanol pada daun kelor memiliki aktivitas terhadap bakteri entopatojenik.

Lain halnya dengan penelitian Villarruel-López *et al.* (2018), jumlah BAL yang diisolasi dari feses mencit diabetes yang mengkonsumsi daun kelor kering tidak terdapat perbedaan enumerasi dengan mencit diabetes kontrol dan mencit non-diabetes. Namun, aktivitas antibakteri terhadap BAL dalam penelitian tersebut diperoleh dari daun kelor yang telah dikeringkan.

Air perasan daun kelor dalam produksi pangan fermentasi yoghurt tidak berimbas pada pertumbuhan bakteri asam laktat sebagai *starter* yang digunakan (Ilona dan Ismawati, 2015). Penelitian tersebut memberikan hasil yang bertolak belakang dengan penelitian ini yang menunjukkan adanya sifat antibakteri air perasan daun kelor terhadap BAL yang ditandai dengan penurunan jumlah BAL pada tempe yang direndam pada air perasan daun kelor segar (Tabel 1).

Ditinjau dari total jumlah BAL, pada tempe tanpa penambahan air rendaman daun kelor memenuhi standar yang menyatakan bahwa produk pangan fungsional harus memiliki probiotik berkisar  $10^6$ - $10^8$  CFU/ml (Martins *et al.*, 2013; Tripathi and Giri, 2014; Scourboutakus *et al.*, 2017). Namun, untuk produk tempe dengan penambahan 100% air perasan daun kelor tidak lagi memenuhi syarat pangan fungsional.

Secara umum, penambahan serbuk daun kelor pada konsentrasi 1x dan 2x (b/b) pada semua perendaman tidak mempengaruhi jumlah total isolat BAL (Tabel 1). Pada penelitian El-Sayed *et al.* (2016) dan Dixit *et al.* (2018) menunjukkan bahwa penambahan serbuk daun kelor dalam pembuatan produk minuman

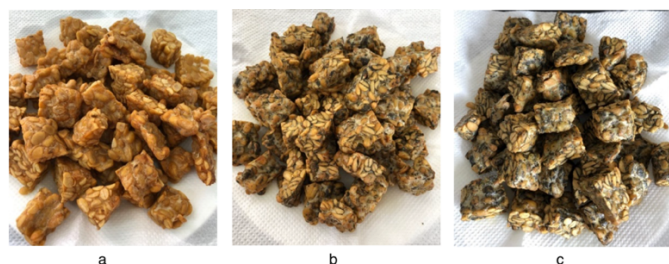
fermentasi berpotensi meningkatkan nilai fungsional dari minuman tersebut bahkan dalam menghambat pertumbuhan total bakteri, kapang, dan khamir; bahkan mampu meningkatkan jumlah bakteri probiotik yang memiliki pengaruh positif terhadap kesehatan manusia.

#### Evaluasi Sensori

Uji ini dilakukan pada tempe bungkus daun jati tanpa perendaman air perasan daun kelor dengan variasi perlakuan penambahan serbuk daun kelor yang meliputi tanpa perlakuan (sebagai kontrol), 1x (b/b) serbuk, dan 2x (b/b) serbuk (Gambar 2). Warna tidak menjadi salah satu parameter dalam penilaian evaluasi hedonik karena tempe diolah dengan cara digoreng sehingga dapat mempengaruhi hasil penilaian.

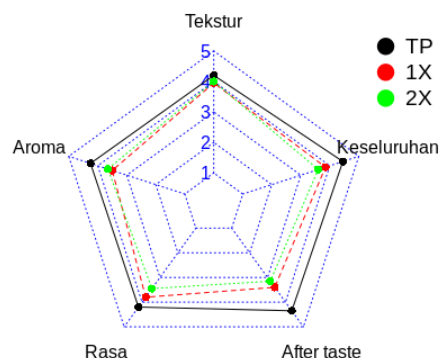
Tingkat kesukaan pada setiap variasi tempe dapat dilihat pada Gambar 3. Tempe tanpa perlakuan menunjukkan nilai sensori yang paling tinggi pada semua parameter dibandingkan tempe dengan suplementasi serbuk daun kelor. Grafik ini menunjukkan bahwa penilaian panelis terhadap parameter tekstur tempe cenderung tidak berbeda ( $\approx 4$ ). Parameter *after taste* dari tempe tanpa perlakuan (4,35) sebagai kontrol masih lebih disukai oleh panelis dibanding sampel tempe lain. Semakin tinggi konsentrasi suplementasi serbuk daun kelor maka semakin rendah nilai sensori pada *after taste*. Yang dimaksud dengan *after taste* yang tidak disukai berdasarkan panelis yaitu adanya rasa yang tertinggal seperti *green leaves flavour* dan sedikit pahit.

Penilaian panelis terhadap dua tempe modifikasi dengan variasi konsentrasi suplementasi daun kelor menunjukkan perbedaan yang mencolok pada rasa (1x= 3,8 dan 2x= 3,45), sedangkan pada penilaian secara keseluruhan tidak terlalu berbeda (1x=3,8 dan 2x= 3,6). Hasil ini serupa dengan penelitian Chizoba (2014) dan Bourekoua (2018) yang menunjukkan semakin tinggi penambahan konsentrasi serbuk daun kelor pada produk makanan, maka semakin rendah tingkat kesukaan oleh panelis. Hal ini dimungkinkan karena adanya aroma daun pada produk pangan, rasa pahit yang muncul, dan kandungan klorofil pada serbuk daun tersebut. Hasil evaluasi sensori mengindikasikan bahwa tempe dengan suplementasi serbuk daun kelor 1x (b/b) berpotensi untuk dikembangkan sebagai suplemen pada produksi tempe bungkus daun jati untuk menghasilkan pangan fungsional yang dapat dikomersialkan.



Gambar 2. Tampilan tempe bungkus daun jati tanpa perendaman air perasan daun kelor yang sudah digoreng dengan variasi konsentrasi serbuk daun kelor yang telah digoreng. Tampak pada gambar a, b, dan c adalah masing-masing tempe tanpa perlakuan dan dengan perlakuan serbuk daun kelor sebanyak 1x dan 2x dari total jumlah ragi.





Gambar 3. Grafik *spider web* rata-rata penilaian panelis terhadap lima mutu sensori pada produk tempe bungkus daun jati. TP, 1x, dan 2x adalah masing-masing tempe tanpa perlakuan dan dengan perlakuan serbuk daun kelor sebanyak 1x dan 2x dari total jumlah ragi.

Sejauh ini, modifikasi produk tempe banyak dilakukan pada variasi bahan baku ataupun produk variasi olahan tempe sebagai produk pangan siap saji. Seperti pada penelitian Ambari *et al.* (2014), tempe dijadikan sebagai bahan baku pembuatan sosis analog yang disuplementasi dengan jamur tiram memiliki tingkat penerimaan lebih dari 50%. Tempe dengan bahan baku dari biji lotus mempengaruhi perubahan warna, tekstur, aroma dengan tingkat penerimaan terbaik pada substitusi maksimum 50% dari biji lotus (Sarti *et al.*, 2019). Penelitian ataupun publikasi yang menganalisis tingkat penerimaan pada produk tempe dengan suplementasi bahan alami tertentu relatif masih jarang. Namun, pembuatan tempe dengan suplementasi rempah-rempah ataupun rumput laut telah didaftarkan dalam paten dengan nomor P00201602869, S00201702800, dan P00199801334.

#### Analisis Profil Bakteri Asam Laktat

Berdasarkan hasil sekuensing, sebelas isolat terpilih dari tempe bungkus daun jati dengan penambahan serbuk 1x (b/b) dan tempe bungkus daun jati asal Kabupaten Blora teridentifikasi mirip dengan genus *Weissella* dan *Streptococcus* (Tabel 2). Analisis filogenetika isolat BAL menunjukkan pengelompokan yang jelas berdasarkan genus bakteri (Gambar 4).

Isolat yang diidentifikasi molekuler dipilih secara acak sehingga tidak dapat menggambarkan keragaman keseluruhan bakteri probiotik BAL yang terdapat pada setiap sampel tempe. Namun, adanya variasi genus pada sampel tempe daun jati asal Kabupaten Blora tanpa penambahan serbuk daun kelor menunjukkan bahwa variasi ini dapat disebabkan oleh sumber daun jati yang berbeda ataupun karena adanya aktivitas antibakteri dari serbuk daun kelor. Analisis metagenomika pada tempe lain menunjukkan bahwa genus *Lactobacillus* sebagai genus dominan dan berkorelasi dengan perbedaan metode produksi terutama pada proses perendaman tempe (Radita *et al.*, 2017).

Identifikasi secara molekuler menggunakan marka gen 16S rRNA menunjukkan adanya dua klaster

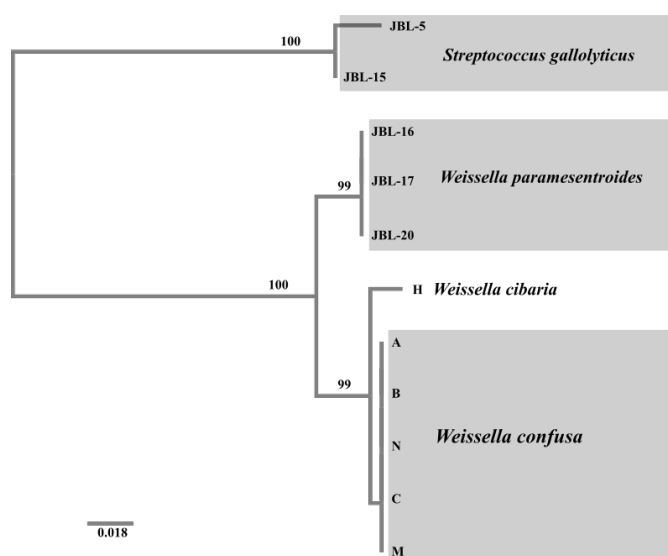
besar yaitu klaster *Weissella* dan *Streptococcus*. Perbandingan menggunakan database genbank terdapat tiga species genus *Weissella* dan satu species *Streptococcus*. Klaster *Weissella* terdapat pada tempe tanpa perlakuan dan tempe dengan suplementasi serbuk daun kelor. Genus *Weissella* merupakan salah satu golongan probiotik yang banyak ditemukan pada pangan fermentasi tradisional (Fusco *et al.*, 2015). *Weissella cibaria* JW15 berhasil diisolasi dari Kimchi, pangan fermentasi tradisional asal Korea dan diketahui memiliki aktivitas antibakteri dan memenuhi sebagai kandidat probiotik (ketahanan terhadap asam, garam empedu, dan suhu tinggi) (Lee *et al.*, 2013). Pangan fermentasi tradisional dari India, *Idli batter*, diketahui mengandung *Weissella confusa* yang mampu tumbuh dan bertahan terhadap kondisi pencernaan, memiliki aktivitas antioksidan, dan tidak memiliki aktivitas hemolisis sehingga memenuhi kriteria sebagai probiotik (Sharma *et al.*, 2018).

Tabel 2 Identifikasi isolat BAL secara molekuler dari tempe bungkus daun jati

Jenis Perlakuan	Nama isolat	Kemiripan	Tingkat kemiripan (%)
Suplementasi serbuk daun kelor 1x	A	<i>Weissella confusa</i>	100
	B	<i>Weissella confusa</i>	100
	C	<i>Weissella confusa</i>	100
	H	<i>Weissella cibaria</i>	100
	M	<i>Weissella confusa</i>	100
	N	<i>Weissella confusa</i>	100
Tanpa perlakuan serbuk daun kelor	JBL-5	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	99
	JBL-15	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	99
	JBL-16	<i>Weissella paramesentroides</i>	100
	JBL-17	<i>Weissella paramesentroides</i>	100
	JBL-20	<i>Weissella paramesentroides</i>	100

Hasil serupa juga diperoleh pada penelitian Rambitan *et al.* (2018), *W. cibaria* dan *W. confusa* berhasil diisolasi dari fermentasi kol merah (*Brassica oleracea* L) dan juga berada pada cluster yang sama. *W. paramesentroides* diisolasi dari saluran pencernaan belut asal Indonesia (*Anguilla bicolor* McClelland) dan diketahui memiliki aktivitas antibakteri sehingga berpotensi sebagai probiotik pada bidang perikanan (Dinoto *et al.*, 2018). Semua isolat genus *Weissella* terletak dalam 2 cluster dan menunjukkan kekerabatan yang berdekatan dibandingkan dengan genus *Streptococcus* (Gambar 4).

*Streptococcus gallolyticus* juga merupakan salah satu species yang biasa ditemukan pada pangan fermentasi tradisional Afrika berbasis susu (Jans *et al.*, 2017). *S. gallolyticus* subsp. *Macedonicus* CRL 415 mampu memproduksi folat, bertahan pada kondisi lingkungan gastrointestinal, serta mampu melekat pada sel epitel usus sehingga menjadi kandidat kuat sebagai starter dan probiotik pada produk pangan (Laiño *et al.*, 2019).



Gambar 4. Pohon filogenetik berdasarkan *sequence* basa nukleotida gen 16S rRNA dari isolat BAL tempe bungkus daun jati tanpa perlakuan (JBL-5, JBL-15, JBL-16, JBL-17, JBL-20) dan tempe bungkus daun jati dengan penambahan serbuk daun kelor (A, B, C, H, N, M). Pohon filogenetik disusun menggunakan metode Neighbor-Joining dan model Jukes-Cantor dengan replikasi *bootstrapping* sebanyak 1000.

Untuk memperoleh informasi lebih lanjut terkait karakterisasi isolat BAL sebagai kandidat probiotik, isolat tersebut perlu diuji ketahanan pada kondisi saluran pencernaan, kemampuan hemolisis darah, kemampuan menghasilkan  $\gamma$ -Aminobutyric Acid, uji resistensi terhadap antibiotik, dan kemampuan dalam menghasilkan senyawa antimikroba ataupun efek terhadap sistem imun. Produk tempe yang dihasilkan perlu diuji lebih lanjut untuk memastikan produk tersebut memiliki nilai kandungan nutrisi yang lebih tinggi dibandingkan tempe pada umumnya, ataupun apakah produk tempe memenuhi standar SNI.

### Kesimpulan

Pembuatan tempe bungkus daun jati dengan suplementasi daun kelor tidak menghambat pertumbuhan *Rhizopus* dan dapat menghasilkan tempe yang sesuai dengan standar SNI, serta dapat diterima panelis. Profil BAL yang berhasil diperoleh, diketahui memiliki kemiripan dengan *Weissella*.

### Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Pemerintah Kabupaten Blora yang telah mendanai penelitian ini melalui Program Riset Unggulan Daerah Nomor 077/016/2019.

### Daftar Pustaka

Abalaka, M.E., Daniyan, S.Y., Oyeleke, S.B., Adeyemo, S.O. 2012. The antibacterial evaluation of *Moringa oleifera* leaf extracts on selected bacterial pathogens. *Journal of Microbiology Research* 2(2):1-4. DOI: 10.5923/j.microbiology.20120202.01.

- Abubakr M.A.S., Al-Adiwih, W.M. 2017. Isolation and identification of lactic acid bacteria from different fruits with proteolytic activity. *International Journal of Microbiology and Biotechnology* 2(2):58-64. DOI:10.11648/j.ijmb.20170202.12.
- Akbar, C.T., Suketi, K., Kartika, J.G. 2019. Panen dan pascapanen kelor (*Moringa oleifera* Lam.) organik di Kebun Organik Kelorina, Blora, Jawa Tengah. *Buletin Agrohorti* 7(3):247-254. DOI:10.29244/agrob.v7i3.30171.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410. DOI:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Ambari, D.P., Anwar, F., Damayanthi, E. 2014. Formulasi sosis analog sumber protein berbasis tempe dan jamur tiram sebagai pangan fungsional kaya serat pangan. *Jurnal Gizi dan Pangan* 9(1):65-72. DOI:10.25182/jgp.2014.9.1.%25p.
- Arnanda, F., Kriswanto, Y., Izzatun, I., Nurlita, D., Fajriyani, A., Utami, T.W. 2015. Pemodelan ketahanan pangan kedelai (*glysine soya max* (Lenus&Merril) di Provinsi Jawa Tengah dengan pendekatan spatial regression. *Jurnal Statistika* 3(1):13-19. DOI:10.26741/jsunimus.3.1.2015.%25p.
- Astuti, M., Meliala, A., Dalais, F.S., Wahlqvist, M.L. 2001. Tempe, a nutritious and healthy food from Indonesia. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 9(4):322-325. DOI:10.1046/j.1440-6047.2000.00176.x.
- Barus, T., Suwanto, A., Wahyudi, A.T., Wijaya, H. 2008. Role of bacteria in tempe bitter taste formation: microbiological and molecular biological analysis based on 16S rRNA gene. *Microbiology Indonesia* 2(1):17-21. DOI:10.5454/mi.2.1.4.
- Bigot, C., Meile, J., Remize, F., Strub, C. 2016. Fermented foods. Part I, Biochemistry and Biotechnology. 1<sup>st</sup> edition, Montet D, Ray R-C, editor. CRC Press, Boca Raton, US. DOI:10.1201/b19872.
- Bourekoua, H., Rozylo, R., Gawlik-Dziki, U., Benatallah, L., Zidoune, M.N., Dziki, D. 2018. Evaluation of physical, sensorial, and antioxidant properties of gluten-free bread enriched with *Moringa oleifera* leaf powder. *European Food Research and Technology* 244:189-195. DOI:10.1007/s00217-017-2942-y.
- Chizoba, N.N. 2014. Sensory evaluation of cookies produced from different blends of wheat and *Moringa oleifera* leaf flour. *International Journal of Nutrition and Food Sciences* 3(4):307-310. DOI:10.11648/j.ijnfs.20140304.21.
- Diantoro, A., Rohman, M., Budiarti, R., Palupi, H.T. 2015. Pengaruh penambahan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.) terhadap kualitas yoghurt. *Jurnal Teknologi Pangan* 6(2): 59-66. DOI:10.35891/tp.v6i2.469.
- Dinoto, A., Sulistiani, S., Handayani, R., Julistiono, H. 2018. *Weissella paramesentroides* from intestine

- of Indonesian eel (*Anguilla bicolor* McClelland) and their potential antimicrobial property. AIP Conference Proceedings. DOI: 10.1063/1.5062799.
- Dixit, N.K.M., Hossain, S.K.A., Bharti, B.K., Singh, S.S., Mishra, S. 2018. Development of lassi using whey and moringa powder. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 7(11):602-612. DOI:10.20546/ijcmas.2018.711.073.
- El-Sayed, O.F., El-Taweel, H.S.M., El-Shibiny, A.A., Metwally, M.M.K. 2016. Using moringa leaves powder in production of probiotic yoghurt. SINA Journal of Applied Sciences 5(2):197-208. DOI:10.21608/sinjas.2016.78645.
- Fitriana, W.D., Ersam, T., Shimizu, K, Fatmawati, S. 2018. Antioxidant activity of *Moringa oleifera* extracts. Indonesian Journal of Chemistry 16(3):297–301. DOI:10.22146/ijc.21145.
- Fusco, V., Quero, G.M., Cho, G-S., Kabisch, J., Meske, D., Neve, H., Bockelmann, W., Franz, C.M.A.P. 2015. The genus *Weissella*: taxonomy, ecology, and biotechnological potential. Frontiers in Microbiology 6:155. DOI:10.3389/fmicb.2015.00155.
- Hogervorst, E., Sadjimim, T., Yesufu, A., Kreager, P., Rahardjo, T.B. 2008. High tofu intake is associated with worse memory in elderly Indonesian men and women. Dementia Geriatric and Cognitive Disorders 26(1):50-7. DOI:10.1159/000141484.
- Hogervorst, E., Mursjid, F., Priandini, D., Setyawan, H., Ismael, R.I., Stephan, B., Rahardjo, T.B. 2011. Borobudur revisited: Soy consumption may be associated with better recall in younger, but not in older, rural Indonesian elderly. Brain Research 1379:206–212. DOI:10.1016/j.brainres.2010.10.083.
- Ilona, A.D., Ismawati, R. 2015. Pengaruh penambahan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dan waktu inkubasi terhadap sifat organoleptik yoghurt. Journal Tata Boga 4(3):151-159. DOI:10.35891/tp.v6i2.469.
- Imohiosen, O., Gurama, H.H., Lamidi, T.B. 2014. Phytochemical and antimicrobial studies on *Moringa oleifera* leaves extracts. IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology, and Food Technology 8(1):39-45. DOI:10.9790/2402-08143945.
- Jans, C., Meile, L., Kaindi, D.W.M., Kogi-Makau, W., Lamuka, P., Renault, P., Kreikemeyer, B., Lacroix, C., Hattendorf, J., Zinsstag, J., Schelling, E., Fokou, G., Bonfoh, B. 2017. African fermented dairy products-overview of predominant technologically important microorganisms focusing on African *Streptococcus infantairus* variants and potential future applications for enhanced food safety and security. International Journal of Food Microbiology 250:27-36. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.012.
- Kuikman, M., O'Connor, C.P. 2015. Sensory evaluation of *Moringa*-probiotic yoghurt containing banana, sweet potato, or avocado. Journal of Food Research 4(5):165-171. DOI:10.5539/jfr.v4n5p165.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35(6): 1547-1549. DOI:10.1093/molbev/msy096.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In Nucleic acid techniques in bacterial systemic. Stackebrandt E, Goodfellow M, editor, p 115-175. John Wiley, Chichester.
- Laiño, J.E., Levit, R., de LeBlanc, A.M., de Giori, G.S., LeBlanc, J.G. 2019. Characterization of folate production and probiotic potential of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* CRL415. Food Microbiology 79:20-26. DOI:10.1016/j.fm.2018.10.015.
- Lee, W.K., Ahn, S.B., Park, H.E., Lee, S.M., Kim, S.Y., Shon, M.Y. 2013. Characteristics and immunomodulatory effects of *Weissella cibaria* JW 15 isolated from kimchi, Korea traditional fermented food, for probiotic use. Journal of Biomedical Research 14(4): 206-211. DOI:10.12729/jbr.2013.14.4.206.
- Liem, I.T., Steinkraus, K.H., Cronk, T.C. 1977. Production of vitamin B-12 in tempeh, a fermented soybean food. Applied and Environmental Microbiology 34(6):773–776. DOI:10.1128/aem.34.6.773-776.1977.
- Manenji, B.T., Mudywiwa, R.M., Midzi, J., Tsodzo, A. 2017. Antifungal effects of botanical leaf extracts of *Lantana camara*, *Moringa oleifera*, and *Tagetes minuta* on *Rhizopus stolonifer* in vitro. Journal of Agriculture and Ecology Research 11(2):1-8. DOI:10.9734/JAERI/2017/28371.
- Martins, E.M.F., Ramos, A.M., Vanzela, E.S.L., Stringheta, P.C., Pinto, C.L.O., Martins, J.M. 2013. Products of vegetable origin: a new alternative for the consumption of probiotic bacteria. Food Research International 51(2013):764-770. DOI:10.1016/j.foodres.2013.01.047.
- Moyo, B., Masika, P.J., Hugo, A., Muchenje. 2011. Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. African Journal of Biotechnology 10 (60):12925-12933. DOI: 10.5897/AJB10.1599.
- Nout, M.J.R., Kiers, J.L. 2005. Tempe fermentation, innovation and functionality: update info the third millennium. Journal of Applied Microbiology 98:789-805. DOI:10.1111/j.1365-2672.2004.02471.x.
- Oluduro, A.O. 2012. Evaluation of antimicrobial properties and nutritional potentials of Moringa oleifera Lam. Leaf in South-Western Nigeria. Malaysian Journal of Microbiology 8(2):59-67. DOI: 10.21161/mjm.02912.

- Radita, R., Suwanto, A., Kurosawa, N., Wahyudi, A.T., Rusmana, I. 2017. Metagenome analysis of tempeh production: where did the bacterial community in tempeh come from? *Malaysian Journal of Microbiology* 13(4): 280-288. DOI:10.21161/mjm.101417.
- Rambitan, G., Pelealu, J.J., Tallei, T.E. 2018. Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat hasil fermentasi kol merah (*Brassica oleracea* L) sebagai probiotik potensial. *Jurnal Bios Logos* 8(2): 33-37. DOI:10.35799/jbl.8.2.2018.21447.
- Razis, A.F.A., Ibrahim, M.D., Kntayya, S.B. 2014. Health benefits of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15(20):8571-8576. DOI:10.7314/APJCP.2014.15.20.8571.
- Sarti, M.Y., Rhidowati, S., Lestari, S.D., Wulandari, R. 2019. Studi kesukaan panelis terhadap tempe dari biji lotus (*Nelumbo nucifera*) dan kedelai (*Glycine max*). *Jurnal fishtech* 8(2):34-41. DOI:10.36706/fishtech.v8i2.9665.
- Scourboutakus, M.J., Franco-Arellano, B., Murphy, S.A., Norsen, S., Comelli, E.M. Abbè, M.R.L. 2017. Mismatch between probiotic benefits in trial versus food products. *Nutrients* 9(4):400. DOI:10.3390/nu9040400.
- Sharma, S., Kandasamy, S., Kavitate, D., Shetty, P.H. 2018. Probiotic characterization and antioxidant properties of *Weissella confusa* KR780676, isolated from an Indian fermented food. *LWT-Food Science and Technology* 97(2018):53-60. DOI:10.1016/j.lwt.2018.06.033.
- Soka, S., Suwanto, A., Sajuthi, D., Rusmana, I. 2015. Impact of tempeh supplementation on mucosal immunoglobulin A in Sprague-Dawley rats. *Food Science and Biotechnology* 24(4):1481-1486. DOI:10.1007/s10068-015-0191-z.
- Stephanie, Kartawidjajaputra, F., Silo, W., Yogiara, Suwanto, A. 2018. Tempeh consumption enhanced beneficial bacteria in the human gut. *Food Research* 3(1):57-63. DOI:10.26656/fr.2017.3(1).220.
- Tripathi, M.K., Giri, S.K. 2014. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods* 9(2014):225-241. DOI:10.1016/j.jff.2014.04.030.
- Ulyatin, N.C., Ba'in. Eksploitasi hutan jati di Kabupaten Blora tahun 1845-1949. *Journal of Indonesian History* 9(1):10-16. DOI:10.15294/jih.v9i1.40927
- Villarruel-López, A., López-de la Mora, D.A., Vázquez-Paulino, O.D., Puebla-Mora, A.G., Torres-Vitela, M.R., Guerrero-Quiroz, L.A., Nuño, K. 2018. Effect of *Moringa oleifera* consumption on diabetic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 18:127. DOI:10.1186/s12906-018-2180-2.
- Winarno, F.G., Reddy, N.R. 1986. Tempe. Di dalam: Reddy NR, editor. *Legume based fermented foods*. CRC Press, Boca Raton, US. DOI:10.1201/9781351074001-13.
- Yulianto, S. 2020. Identifikasi alkaloid pada daun kelor (*Moringa oleifera* L.). *Jurnal Kebidanan dan Kesehatan Tradisional* 5(1):55-57. DOI:10.37341/jkkt.v5i1.136.