

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI *RHIZOPUS OLIGOSPORUS* PADA BEBERAPA INOKULUM TEMPE

Oleh

Putu Ari Sandhi Wipradnyadewi

Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Udayana

Endang S. Rahayu dan Sri Raharjo

Fakultas Teknologi Pertanian, UGM

ABSTRACT

The research was aimed to isolate the fungi grown and to identify *R. oligosporus* in several *tempe* inoculum samples.

Seventy microbes were isolated from *tempe* inoculum, which was consisted of 58 greyish brown conidia, and 12 grey conidia isolates. All isolates were belong to genera of *Rhizopus*. Seven of them were selected based on their origin of *tempe* inoculum, conidia colour, growth of mycelia, and conidia mass. Macroscopic and microscopic observation showed that the selected isolates were *R. oligosporus*.

Kata kunci : inokulum tempe, isolasi, identifikasi, R. oligosporus

PENDAHULUAN

Tempe adalah produk fermentasi yang amat dikenal oleh masyarakat Indonesia dan mulai digemari pula oleh berbagai kelompok masyarakat Barat. Tempe dapat dibuat dari berbagai bahan. Tetapi yang biasa dikenal sebagai tempe oleh masyarakat pada umumnya ialah tempe yang dibuat dari kedelai (Kasmidjo, 1990). Tempe mempunyai ciri-ciri putih, tekstur kompak. Pada dasarnya cara pembuatan tempe meliputi tahapan sortasi dan pembersihan biji, hidrasi atau fermentasi asam, penghilangan kulit, perebusan, penirisan, pendinginan, inokulasi dengan ragi tempe, pengemasan, inkubasi dan pengundukan hasil (Rahayu, 1988). Tahapan proses yang melibatkan jamur dalam pembuatan tempe adalah saat inokulasi atau fermentasi.

Kualitas tempe amat dipengaruhi oleh kualitas starter yang digunakan untuk inokulasinya. Inokulum tempe disebut juga sebagai starter tempe, dan banyak pula yang menyebutkan dengan nama ragi tempe. Starter tempe adalah bahan yang mengandung biakan jamur tempe, digunakan sebagai agensia pengubah kedelai rebus menjadi tempe akibat tumbuhnya jamur tempe pada kedelai dan melakukan kegiatan fermentasi yang menyebabkan kedelai berubah sifat/karakteristiknya menjadi tempe (Kasmidjo, 1990).

Inokulum tempe juga dapat diperoleh dengan berbagai cara antara lain (Kasmidjo, 1990) :

1. Berupa tempe dari batch sebelumnya, yang telah mengalami sporulasi.
2. Berupa tempe segar, yang dikeringkan dibawah sinar matahari atau yang mengalami liofilisasi.
3. Berupa ragi tempe, yaitu pulungan beras (bentuk bundar pipih atau bulatan-bulatan kecil) yang mengandung miselia dan spora jamur tempe.
4. Sebagai biakan murni *R. oligosporus* yang disiapkan secara aseptis oleh lembaga riset atau lembaga pendidikan (Kasmidjo, 1990).
5. Inokulasi tempe yang disiapkan dengan cara menempatkan potongan daun dalam bungkus tempe yang sedang mengalami fermentasi. Potongan-potongan daun tersebut

akan terselubungi miselia jamur tempe selama berlangsungnya fermentasi tempe, yang kemudian diambil, dikeringkan dibawah sinar matahari kemudian disimpan sampai saat digunakan. Daun yang biasanya digunakan untuk keperluan tersebut ialah daun dadap (*Erythrina* spp), daun waru (*Hibiscus similis* B1), daun jati (*Tectona grandis* Linn) atau daun pisang (*Musa* spp) (Kasmidjo, 1990).

Fermentasi pada tempe dapat menghilangkan bau langu dari kedelai yang disebabkan oleh aktivitas dari enzim lipoksigenase. Jamur yang berperan dalam proses fermentasi tersebut adalah *R. oligosporus*. *R. oligosporus* Saito mempunyai koloni abu-abu kecoklatan dengan tinggi 1 mm atau lebih. Sporangiofor tunggal atau dalam kelompok dengan dinding halus atau agak sedikit kasar, dengan panjang lebih dari 1000 μ m dan diameter 10-18 μ m. Sporangia globosa yang pada saat masak berwarna hitam kecoklatan, dengan diameter 100-180 μ m.

Kolumela globosa sampai sub globosa dengan apofisa apofisa berbentuk corong. Ukuran sporangiospora tidak teratur dapat globosa atau elip dengan panjang 7-10 μ m. Klamidospora banyak, tunggal atau rangkaian pendek, tidak berwarna, dengan berisi granula, terbentuk pada hifa, sporangiofor dan sporangia. Bentuk klamidospora globosa, elip atau silindris dengan ukuran 7-30 μ m atau 12-45 μ m x 7-35 μ m.

Suhu optimum, minimum, maksimum berturut-turut adalah 30-35 $^{\circ}$ C, 12 $^{\circ}$ C dan 42 $^{\circ}$ C. Ditemukan di Jepang, China dan Indonesia yang diisolasi dari tempe (Samson, et al., 1995). Pitt dan Hocking (1985) *R. oligosporus* memiliki panjang sporangiosfor pada media Malt Extract Agar (MEA) 150-400 μ m lebih pendek dari *R. oryzae* yaitu lebih dari 1500 μ m. *R. oligosporus* biasanya memiliki rhizoid yang pendek, sporangium dengan diameter 80 –120 μ m dan pada saat 7 hari akan pecah yang menyebabkan spora keluar kolumela dengan diameter 25-75 μ m. Sedangkan *R. oryzae* memiliki diameter sporangium lebih dari 150 μ m, kolumela dengan diameter lebih dari 100 μ m. Beberapa sifat penting dari *R. oligosporus* antara lain meliputi aktivitas enzimatiknya, kemampuan menghasilkan antibiotika, biosintesa vitamin-vitamin B, kebutuhannya akan senyawa sumber karbon dan nitrogen, perkecambahan spora, dan penetrasi miselia jamur tempe ke dalam jaringan biji kedelai (Kasmidjo, 1990).

Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan isolat *R. oligosporus* hasil isolasi dari beberapa inokulum tempe.

METODA PENELITIAN

Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari Maret 2004 sampai dengan Juli 2005 di laboratorium Mikrobiologi UGM.

Sumber *R. oligosporus*

Untuk mendapatkan isolat *Rhizopus oligosporus* dalam penelitian ini diperoleh dari hasil isolasi beberapa merk tempe antara lain tempe merk Muklar, Pedro, Kembar, Buchori, dan tempe tanpa merk yang dibungkus dengan daun pisang. Inokulum tempe antara lain ragi tempe yang dibeli di pasar Demangan, usar daun waru. Pemeliharaan isolat melalui regenerasi setiap 3 bulan sekali dengan menginokulasikan pada media Potato Dextrose agar (PDA) miring dan diinkubasi 30 $^{\circ}$ C selama 7 hari. Selanjutnya disimpan dalam refrigerator 4 $^{\circ}$ C.

Media

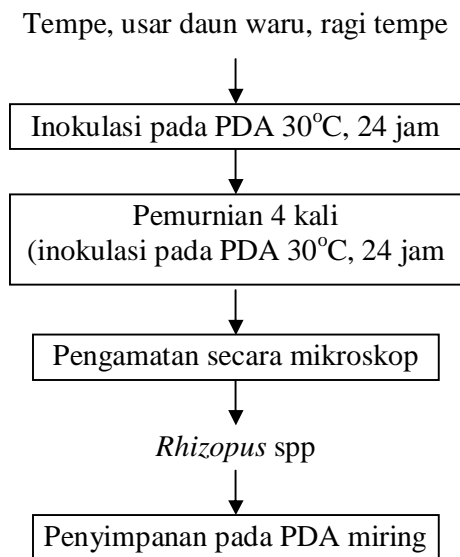
Media isolasi, purifikasi, penyimpanan dan pemeliharaan isolat. Media untuk menumbuhkan jamur menggunakan media agar Potato Dextrose agar (PDA). Setiap 1000 ml media dibuat dari 200 g kentang, 20 g glukosa, 20 g agar, 0,1 g kloramphenikol serta disterilkan pada 121 $^{\circ}$ C selama 15 menit. Isolat jamur yang diperoleh dari koloni jamur di

media agar Potato Dextrose agar (PDA) dipindah dan disimpan pada media miring PDA sebelum diidentifikasi lebih lanjut. Setiap 1000 ml media dibuat dari 200 g kentang, 20 g glukosa, 20 g agar, serta disterilkan pada 121°C selama 15 menit.

Media identifikasi (Pitt dan Hocking, 1985). Isolat pada media miring Potato Dextrose agar (PDA) kemudian dipindahkan ke media Czapek Yeast Extract Agar (CYA), 25% Glycerol Nitrate Agar (G25N), Malt Extract Agar (MEA) untuk identifikasi. Komposisi media Czapek Yeast Extract Agar (CYA) per 1000 ml adalah 1,0 g K_2HPO_4 , 10 ml czapek concentrate, 5,0 g yeast extract powder, 30 g sukrosa, 15 g agar. Sedangkan komposisi Czapek Concentrate dalam 100 ml adalah 30 g NaNO_3 , 5,0 g KCl, 5,0 g $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Komposisi media 25% Glycerol Nitrate Agar (G25N) per 1000 ml adalah 0,75 g K_2HPO_4 , 7,5 ml czapek concentrate, 3,7 g yeast extract powder, 250 g glycerol, 12 g agar. Komposisi media Malt Extract Agar (MEA) per 1000 ml adalah 20 g malt extract powder, 1,0 g pepton, 20 g glukosa, 20 g agar. Ketiga media diatas disterilkan 121°C selama 15 menit.

Pelaksanaan Penelitian

Isolasi dan purifikasi *Rhizopus* spp. Tahapan isolasi dan purifikasi *Rhizopus* spp dilakukan dengan mengambil secara aseptik isolat dominan dari tempe, usar daun waru dan ragi tempe yang diinokulasikan pada media Potato Dextrose Agar (PDA) dan diinkubasi pada 30°C selama 24 jam sampai terbentuk koloni. Pemindahan isolat (pemurnian) diulang sebanyak 4 kali sampai isolat benar-benar murni. Diagram alir tahapan isolasi dan purifikasi dapat dilihat pada Gambar 1 (Pitt dan Hocking, 1985 yang dimodifikasi).



Gambar 1. Diagram alir tahapan isolasi dan purifikasi *Rhizopus* spp

Identifikasi *R. Oligosporus*. Isolat jamur pada media Potato Dextrose Agar (PDA) miring dikelompok kembali sesuai tempat asal inokulum. Identifikasi dibatasi pada isolat dengan warna konidia keabu-abuan kecoklatan menggunakan media Czapek Yeast Extract Agar (CYA), 25% Glycerol Nitrate Agar (G25N), Malt Extract Agar (MEA) yang diinkubasi selama 7 hari pada suhu 5°C , 25°C dan 37°C (Pitt dan Hocking, 1985 yang dimodifikasi).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Identifikasi Jamur pada Inokulum Tempe

Dalam tahap isolasi jamur pada beberapa inokulum tempe diperoleh 70 isolat jamur terdiri dari 58 isolat berkonidia abu-abu kecoklatan dan 12 isolat berkonidia abu-abu. Hasil isolasi ke- 70 isolat ditampilkan pada Tabel 1. Hasil isolasi dikelompokkan sesuai asal inokulum, warna konidia, pertumbuhan miselia dan konidia pada media agar Potato Dextrose Agar (PDA).

Tabel 1. Hasil isolasi makroskopik karakter jamur

Asal	Warna konidia	Kode isolat	Pengamatan pada media PDA miring	
			Miselial	Konidia
Tempe Merk Muklar	abu-abu kecoklatan	MK 1	+++	+++
Tempe Merk Muklar	abu-abu kecoklatan	MK 2	+++	++
Tempe Merk Muklar	abu-abu kecoklatan	MK 3	++	++
Tempe Merk Muklar	abu-abu kecoklatan	MK 4	++	++
Tempe Merk Muklar	abu-abu kecoklatan	MK 5	++	++
Tempe Merk Muklar	abu-abu kecoklatan	MK 6	+++	++
Tempe Merk Muklar	abu-abu kecoklatan	MK 7	++	++
Tempe Merk Muklar	Abu-abu	MK 8	+++	+++
Tempe Merk Muklar	abu-abu kecoklatan	MK 9	++	++
Tempe Merk Muklar	abu-abu kecoklatan	MK 10	++	++
Tempe Merk Pedro	abu-abu kecoklatan	PD 1	+++	+++
Tempe Merk Pedro	abu-abu kecoklatan	PD 2	++	++
Tempe Merk Pedro	abu-abu kecoklatan	PD 3	++	++
Tempe Merk Pedro	abu-abu kecoklatan	PD 4	+++	++
Tempe Merk Pedro	abu-abu kecoklatan	PD 5	++	++
Tempe Merk Pedro	Abu-abu	PD 6	+++	+++
Tempe Merk Pedro	abu-abu kecoklatan	PD 7	++	++
Tempe Merk Pedro	abu-abu kecoklatan	PD 8	++	++
Tempe Merk Pedro	abu-abu kecoklatan	PD 9	++	++
Tempe Merk Pedro	abu-abu kecoklatan	PD 10	+++	++
Ragi tempe dari Ps. Demangan	abu-abu kecoklatan	RD 1	++	++
Ragi tempe dari Ps. Demangan	abu-abu kecoklatan	RD 2	++	++
Ragi tempe dari Ps. Demangan	Abu-abu	RD 3	++	++
Ragi tempe dari Ps. Demangan	abu-abu kecoklatan	RD 4	+++	+++
Ragi tempe dari Ps. Demangan	abu-abu kecoklatan	RD 5	+++	++
Ragi tempe dari Ps. Demangan	Abu-abu	RD 6	+++	+++
Ragi tempe dari Ps. Demangan	abu-abu kecoklatan	RD 7	++	++
Ragi tempe dari Ps. Demangan	abu-abu kecoklatan	RD 8	++	++
Ragi tempe dari Ps. Demangan	Abu-abu	RD 9	++	++
Ragi tempe dari Ps. Demangan	abu-abu kecoklatan	RD 10	+++	+++
Tempe tanpa merk	abu-abu kecoklatan	TM 1	++	++
Tempe tanpa merk	abu-abu kecoklatan	TM 2	++	++
Tempe tanpa merk	abu-abu kecoklatan	TM 3	++	++
Tempe tanpa merk	abu-abu kecoklatan	TM 4	+++	+++
Tempe tanpa merk	abu-abu kecoklatan	TM 5	++	++
Tempe tanpa merk	abu-abu kecoklatan	TM 6	++	++
Tempe tanpa merk	abu-abu kecoklatan	TM 7	++	++
Tempe tanpa merk	abu-abu kecoklatan	TM 8	++	++
Tempe tanpa merk	abu-abu kecoklatan	TM 9	+++	++
Tempe tanpa merk	abu-abu kecoklatan	TM 10	++	++
Tempe Merk Buchori	abu-abu kecoklatan	BUC 1	++	++
Tempe Merk Buchori	abu-abu kecoklatan	BUC 2	++	++
Tempe Merk Buchori	Abu-abu	BUC 3	+++	+++
Tempe Merk Buchori	abu-abu kecoklatan	BUC 4	+++	+++
Tempe Merk Buchori	Abu-abu	BUC 5	+++	+++
Tempe Merk Buchori	abu-abu kecoklatan	BUC 6	++	++
Tempe Merk Buchori	abu-abu kecoklatan	BUC 7	++	++
Tempe Merk Buchori	Abu-abu	BUC 8	++	++
Tempe Merk Buchori	abu-abu kecoklatan	BUC 9	++	++
Tempe Merk Buchori	abu-abu kecoklatan	BUC 10	++	++
Usar Daun Waru	abu-abu kecoklatan	USR 1	+++	++
Usar Daun Waru	abu-abu kecoklatan	USR 2	++	++
Usar Daun Waru	abu-abu kecoklatan	USR 3	+++	+++
Usar Daun Waru	abu-abu kecoklatan	USR 4	+++	++
Usar Daun Waru	abu-abu kecoklatan	USR 5	+++	++
Usar Daun Waru	abu-abu kecoklatan	USR 6	+++	++
Usar Daun Waru	abu-abu kecoklatan	USR 7	++	++
Usar Daun Waru	abu-abu kecoklatan	USR 8	++	++
Usar Daun Waru	Abu-abu	USR 9	+++	++
Usar Daun Waru	abu-abu kecoklatan	USR 10	++	++

Asal	Warna konidia	Kode isolat	Pengamatan pada media PDA miring	
			Miselial	Konidia
Tempe Merk Kembar	Abu-abu	KMB 1	++	++
Tempe Merk Kembar	Abu-abu	KMB 2	++	++
Tempe Merk Kembar	abu-abu kecoklatan	KMB 3	+++	++
Tempe Merk Kembar	abu-abu kecoklatan	KMB 4	++	++
Tempe Merk Kembar	abu-abu kecoklatan	KMB 5	++	++
Tempe Merk Kembar	abu-abu kecoklatan	KMB 6	+++	+++
Tempe Merk Kembar	Abu-abu	KMB 7	++	++
Tempe Merk Kembar	abu-abu kecoklatan	KMB 8	++	++
Tempe Merk Kembar	abu-abu kecoklatan	KMB 9	++	++
Tempe Merk Kembar	abu-abu kecoklatan	KMB 10	++	++

Keterangan : +++ : sangat lebat (menutupi seluruh media PDA miring), ++ : lebat (menutupi $\frac{3}{4}$ media PDA miring)

Sesuai hasil isolasi dalam penelitian ini ternyata jamur dengan warna konidia abu-abu kecoklatan merupakan jamur yang selalu dijumpai dari setiap merk tempe dan inokulum tempe yang digunakan. Hal ini menunjukkan adanya keterkaitan erat antara jamur berkonidia abu-abu kecoklatan dengan tempe. Dalam Samson *et al* (1995) dijelaskan bahwa jamur *Rhizopus oligosporus* dan *R. oryzae* memiliki konidia dengan warna abu-abu kecoklatan. Dari ke-70 isolat yang memiliki warna konidia abu-abu kecoklatan dipilih 7 isolat untuk dilakukan identifikasi sampai tingkat spesies untuk memperoleh isolat *R. oligosporus*. Pemilihan ke-7 isolat tersebut berdasarkan kode asal inokulum, warna konidia, kelembatan miselia dan konidia pada media agar Potato Dextrose Agar (PDA) seperti ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil isolasi makroskopik karakter jamur terpilih

Kode isolat	Asal	Warna konidia	Pengamatan pada media PDA miring	
			Miselial	Konidia
MK 1	Tempe Merk Muklar	abu-abu kecoklatan	+++	+++
PD 1	Tempe Merk Pedro	abu-abu kecoklatan	+++	+++
RD 4	Ragi tempe dari Ps. Demangan	abu-abu kecoklatan	+++	+++
TM 4	Tempe tanpa merk	abu-abu kecoklatan	+++	+++
BUC 4	Tempe Merk Buchori	abu-abu kecoklatan	+++	+++
USR 3	Usar Daun Waru	abu-abu kecoklatan	+++	+++
KMB 6	Tempe Merk Kembar	abu-abu kecoklatan	+++	+++

Keterangan : +++ : sangat lebat (menutupi seluruh media PDA miring)

Isolat MK 1, PD1, RD 4, TM 4, BUC 4, USR 3, KMB 6, dipilih karena berdasarkan asal inokulum, warna konidia, pertumbuhan miselia dan konidia relatif lebat dalam media Potato Dextrose Agar (PDA) miring. Ke-7 isolat jamur tersebut memiliki warna konidia abu-abu kecoklatan, pertumbuhan miselia lebat, adanya rhizoid pada pengamatan mikroskopik menunjukkan genera *Rhizopus* kemudian dilakukan pengamatan dalam media identifikasi yaitu media Czapek Yeast Extract Agar (CYA), 25% Glycerol Nitrate Agar (G25N), Malt Extract Agar (MEA) untuk menentukan spesiesnya. Ke-7 isolat tersebut dikelompokkan sesuai warna konidia, warna miselia, bentuk konidia yaitu oval, globosa, bentuk kladospora yaitu globosa, elip atau silindris, bentuk sporangiofor yaitu tunggal atau dalam bentuk kelompok, panjang dan diameter sporangiosfor, diameter sporangium. Berdasarkan hasil pengamatan secara makroskopik dan mikroskopik ternyata ke- 7 isolat jamur hasil isolasi beberapa inokulum tempe yang dipilih termasuk dalam *R. oligosporus*. Perbandingan ke-7 isolat tersebut dapat dilihat pada Tabel 3.

Pada Tabel 3 dapat dilihat bahwa panjang sporangiosfor dan sporangium ke-7 isolat hasil isolasi dari tempe dan inokulum tempe termasuk dalam *R. oligosporus*. Pitt dan Hocking (1985) mengemukakan bahwa panjang sporangiosfor *R. oligosporus* 150-400 μm lebih pendek dari *R.oryzae* yaitu lebih dari 1500 μm sedangkan sporangium *R. oligosporus* 80-120 μm lebih pendek dari *R.oryzae*. Bentuk kolumela globose dengan ukuran panjang dan

lebar yaitu 50 μm dan 40 μm juga menunjukkan bahwa semua isolat hasil isolasi beberapa inokulum tempe termasuk *R. oligosporus*, *R. oryzae* dan *R. stolonifer* memiliki diameter kolumela berturut-turut sebesar lebih dari 100 μm dan lebih dari 200 μm .

Tabel 3. Pengamatan makroskopik dan mikroskopik ke-7 isolat hasil isolasi beberapa inokulum tempe

Karakter	Kode isolat							<i>R. oligosporus</i>
	KMB6	BUC4	TM4	USR3	RD4	MK1	PD1	
Warna konidia	Hitam kecoklatan	Hitam kecoklatan	Hitam kecoklatan	Hitam kecoklatan	Hitam kecoklatan	Hitam kecoklatan	Hitam kecoklatan	Hitam kecoklatan *
Warna miselium	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih *
Panjang sporangiosfor	150 µm	140 µm	140-160 µm	140 µm	140-160 µm	140 µm	140 µm	150-400 µm *
Panjang sporangium	80 µm	80 µm	80 µm	80 µm	80 µm	80 µm	80 µm	80-120 µm *
Panjang kolumela	50 µm	50 µm	50 µm	50 µm	50 µm	50 µm	50 µm	25-27 µm *
Tekstur sporangiosfor	halus	halus	halus	halus	halus	halus	halus	Halus **
Bentuk kolumela	Globose sampai sub globose	Globose sampai sub globose	Globose sampai sub globose	Globose sampai sub globose	Globose sampai sub globose	Globose sampai sub globose	Globose sampai sub globose	Globose sampai sub globose **
Bentuk konidia	elipsoidal (oval)	elipsoidal (oval)	Globose, elipsoidal (oval)	elipsoidal (oval)	elipsoidal (oval)	elipsoidal (oval)	elipsoidal (oval)	Globose, elipsoidal (oval) **
Panjang konidia	10 µm	10 µm	10 µm	10 µm	10 µm	10 µm	10 µm	7-10(24) µm **
Bentuk klamidospora	single	single	single	single	single	single	single	Abundant, single atau rantai pendek

Keterangan :

* Sumber : Pitt dan Hocking (1997), ** Sumber Samson *et al.*, (1995).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Diperoleh sebanyak 7 isolat dari 70 isolat jamur berkonidia abu-abu kecoklatan telah diidentifikasi termasuk dalam *R.oligosporus* yang berhasil diisolasi dari 7 sampel inokulum tempe.

Saran

Dari hasil penelitian ini dapat disarankan bahwa perlu dilakukan penelitian pengembangan manfaat *R.oligosporus*

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Proyek Hibah Penelitian Tim Pascasarjana (HPTP) Angkatan I Tahun Ke-2 (Tahun 2004).

DAFTAR PUSTAKA

- Kasmidjo, R.B. 1990. Tempe : Mikrobiologi dan Biokimia Pengolahan serta Pemanfaatannya. PAU Pangan dan Gizi. UGM, Yogyakarta.
- Pitt, J.I. and A.D Hocking,. 1985. Fungi and Food Spoilage. Academic Press, Australia.
- Rahayu, K. 1988. Bahan Pengajaran Mikrobiologi Pangan PAU Pangan dan Gizi. UGM, Yogyakarta.
- Samson, R.A., E.S. Hoekstra, J.C. Frisvad and O. Filtenborg. 1995. Introduction to Food-Borne Fungi. Baarn and Lyngby, Netherlands.