1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Diare akut merupakan masalah kesehatan yang ditemukan di seluruh dunia, tidak saja di negara berkembang tetapi juga di negara maju. Diare karena infeksi saluran pencernaan masih merupakan masalah yang cukup serius di negara-negara berkembang termasuk Indonesia. Infeksi ini dapat disebabkan oleh virus, bakteri, dan parasit (Jones dan Farthing, 2004). Pada tahun 2015 terjadi 18 kali KLB (Kejadian Luar Biasa) diare yang tersebar di 11 provinsi, 18 kabupaten/kota di Indonesia, dengan jumlah penderita 1.213 orang dan kematian 30 orang. Pada tahun tahun tersebut angka kematian akibat KLB diare masih melebihi target (kurang dari 1%) yaitu 2,47% (Kemenkes RI, 2015).

Penanganan diare yang tidak tepat dapat menimbulkan efek samping bahkan kematian. Pertolongan pertama yang masyarakat ketahui saat diare adalah mengkonsumsi oralit yang berfungsi untuk mengembalikan cairan tubuh yang hilang, kemudian penggunaan obat-obatan seperti antibiotik untuk membunuh bakteri penyebab diare (Priyanto dan Lestari, 2008). Padahal antibiotik tidak dianjurkan untuk diare tanpa instruksi dari badan kesehatan yang berwenang. Hal ini dikarenakan antibiotik dapat menyebabkan resistennya mikroorganisme patogen dan membunuh bakteri baik dalam saluran pencernaan (Pedoman Umum Penggunaan Antibiotik, 2011). Oleh karena itu diperlukan alternatif pengganti obat-obatan menggunakan bahan yang alami, namun tetap murah dan mudah didapatkan.

Tempe kedelai merupakan bahan makanan yang murah, mudah didapatkan, dan memiliki banyak manfaat bagi kesehatan. Salah satu manfaat tempe dari kedelai (*Glycine max (L.) Merr*.) adalah dapat membantu mengatasi diare (anti-diare) dan mengandung senyawa anti-bakteri. Antibakteri pada ekstrak tempe positif menghambat pertumbuhan bakteri gram positif seperti *Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Streptococcus* dan *Clostridium spp.* Aktivitas antibakteri tersebut diindikasi merupakan komponen protein hasil degradasi selama proses

fermentasi dan memiliki karakteristik sensitif terhadap panas, pH rendah, dan protease (Roubos-van den Hil dan Nout, 2011)

Salah satu metode ekstrak tempe yang mudah diterapkan dalam kehidupan sehari-hari dan dipercaya dapat mengobati diare adalah dengan menyeduh tempe dalam air panas, untuk dikonsumsi air seduhannya. Oleh karena itu, diperlukan studi mengenai manfaat anti-diare tempe kedelai dan aktivitas antibakteri air seduhan tempe terhadap pertumbuhan bakteri penyebab diare, baik bakteri gram positif maupun bakteri gram negatif.

1.2. Tinjauan Pustaka

1.2.1. Pencernaan dan Diare

Saluran pencernaan merupakan organ terpenting dalam kaitannya dengan kebutuhan nutrisi dalam tubuh. Fungsi mendasar saluran pencernaan adalah dalam proses pemecahan makanan dan penyerapan makanan, namun juga memiliki fungsi penghalang terhadap mikroorganisme patogen. Saluran pencernaan meliputi mulut, esofagus, lambung, usus halus (duodenum, jejunum, ileum), usus besar, rectum, dan anus.

Fungsi utama saluran pencernaan adalah mencerna (mendegradasi) dan absopsi (menyerap) komponen makanan dan air. Tempat utama pencernaan terjadi adalah di bagian atas dari saluran pencernaan (mulut, lambung, dan usus halus), sedangkan tempat utama proses penyerapan terjadi di bagian bawah usus halus dan usus besar. Pencernaan melibatkan proses hidrolisis molekul makanan yang besar oleh enzim sehingga menjadi molekul yang lebih sederhana. Enzim-enzim ini disekresikan oleh jaringan eksokrin dari kelenjar ludah, sel sekretori dalam lambung dan dalam pancreas. Pencernaan terakhir dan penyerapan nutrisi terjadi di usus halus (Kiers, 2001).

Molekul makanan yang sudah terhidrolisis (monosakarida, peptida dan asam amino) oleh enzim disekitar *brush border* sel epitel kemudian akan terserap bersamaan dengan sodium (Na). Hal ini dikarenakan konsentrasi Na dalam sel

dalam kondisi rendah akibat dari Na yang terpompa keluar dari dasar dan sisi membrane sel. Sodium yang terpompa pada sisi membrane sel menciptakan gradien osmosis untuk air mengalir dan terserap dalam usus halus (Argenzio dalam Kiers, 2001).

Kelainan fungsi dari mukosa usus halus menyebabkan penyakit usus, dan sering berkaitan dengan diare. Diare merupakan hasil dari tidak normalnya cairan dan transpor ion oleh mukosa dalam usus halus atau usus besar. Hilangnya cairan melalui usus merupakan akibat dari malabsorbsi (ketidakmampuan menyerap) atau dan sekresi berlebihan (*hypersecretion*) zat terlarut dan air. Malabsopsi dapat diakibatkan oleh induksi virus atau kerusakan mukosa oleh invasi bakteri dan parasit. Sekresi berlebihan dapat mengakibatkan hilangnya cairan dan elektrolit dalam jumlah besar. Hal ini umumnya merupakan akibat dari kolonisasi bakteri penghasil enterotoksin pada mukosa usus dan dapat diikuti dengan malabsorbsi (ketidakmampuan menyerap) tanpa kerusakan jaringan (Kiers, 2001).

Diare menurut kriteria frekuensinya, merupakan buang air besar encer lebih dari 3 kali per hari. Buang air besar encer tersebut dapat/tanpa disertai lendir. Diare akut adalah diare yang gejalanya tiba-tiba dan berlangsung kurang dari 14 hari, sedangkan diare kronik adalah diare yang berlangsung lebih dari 14 hari. Diare dapat disebabkan infeksi maupun non infeksi. Diare infeksi merupakan penyebab diare yang paling sering terjadi. Diare infeksi dapat disebabkan oleh virus, bakteri, dan parasit (Lung, 2003).

Pengobatan antibiotik pada penderita diare infeksi tidak dianjurkan untuk semua penderita, namun hanya pada penderita yang gejalanya demam, feses berdarah, leukosit pada feses, mengurangi ekskresi dan kontaminasi lingkungan, persisten atau penyelamatan jiwa pada diare infeksi, diare pada pelancong, dan pasien *immunocompromised* (Ciesla dan Guerrant, 2003). Antibiotik adalah obat yang digunakan untuk mengatasi infeksi bakteri. Antibiotik dapat bersifat bakterisidal (membunuh bakteri) atau bakteriostatik (mencegah berkembangbiaknya bakteri).

Intensitas penggunaan antibiotik yang relatif tinggi menimbulkan berbagai permasalahan dan merupakan ancaman global bagi kesehatan terutama resistensi bakteri terhadap antibiotik. Selain berdampak pada morbiditas dan mortalitas, juga memberi dampak negatif terhadap ekonomi dan sosial yang sangat tinggi. Pada awalnya resistensi terjadi di tingkat rumah sakit, tetapi lambat laun juga berkembang di lingkungan masyarakat, khususnya *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli* (Pedoman Umum Penggunaan Antibiotik, 2011).

1.2.2. Bakteri-bakteri Penyebab Diare

1.2.2.1. Bakteri Gram Positif

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif berbentuk bulat dengan diameter 0,7-1,2 µm, tersusun dalam kelompok-kelompok yang tidak teratur. Bakteri ini bersifat fakultatif anaerob, tidak membentuk spora, dan non motil. Suhu optimumnya adalah 37 ºC, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25 ºC). *Staphylococcus aureus* dapat bertumbuh pada suhu 6,5- 46º C dan pada pH 4,2-9,3 (Paryati dalam Dewi, 2013). Waktu generasi bakteri ini dalam media *Heart Infusion Broth* adalah 27-30 menit (Todar, 2008).

Staphylococcus aureus dapat menghasilkan enterotoksin yang tahan terhadap panas dan jika terkonsumsi, maka dapat menyebabkan gejala rasa mual, muntah-muntah, dan diare yang hebat tanpa disertai demam (Jawetz *et al*., 1995). Pertumbuhan dan daya tahan bakteri ini tergantung dari kemampuan sel-selnya untuk beradaptasi terhadap perubahan lingkungan. *S. aureus* telah mengembangkan banyak mekanisme untuk mengatasi perubahan-perubahan tersebut, terutama dalam penginfeksian. Sebuah kurva pertumbuhan *S. aureus* yang ditumbuhkan dalam kondisi yang ideal, dapat dibagi menjadi 3 fase, yaitu lag, ekponensial, dan stasioner. Pada fase lag bakteri mulai menginfeksi, kemudian masuk ke fase ekponensial dimana bakteri bermutiplikasi dan mensintesis protein permukaan dan protein esensial untuk pertumbuhan, pembelahan sel, dan adhesi. Selama pasca-ekponensial, sekumpulan bakteri ini memproduksi toksin dan eksoprotein. Hal ini memungkinkan bakteri untuk keluar

dari infeksi lokal selama fase stasioner dan menyebar ke lokasi baru, dimana siklus ini diulang kembali (Harris *et al.*, 2002).

Bacillus cereus adalah bakteri Gram Positif pembentuk spora yang dapat menimbulkan dua tipe keracunan makanan. Tipe pertama adalah tipe diare karena bakteri ini memproduksi enterotoksin dalam usus halus dan kedua adalah tipe emetik dimana racun dihasilkan di makanan yang sudah terkontaminasi. Sel vegetative *Bacillus cereus* dalam usus halus dapat memproduksi enterotoksin, dimana sekresinya tergantung pada temperatur yang sesuai dan sering kali terjadi pada fase eksponensial. Sedangkan toksin emetik dalam produk pangan diproduksi selama fase stasioner (Kotiranta *et al.*, dalam Roubos-van den Hil, 2010a).

Bacillus cereus merupakan organisme mesofil yang bertumbuh pada suhu 10° sampai 50°C dengan suhu optimum antara 35-40°C (Claus & Berkeley dalam Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). *B. cereus* bertumbuh pada pH antara 4,9- 9,3 (Robinson *et al.*, 2000). Di laboratorium dengan kondisi optimal pertumbuhan, waktu generasi yang diperlukan *Bacillus* sp. adalah 25 menit (Todar, 2008). Bakteri ini dapat hidup dimana saja dalam alam dan biasanya diisolasi dari tanah dan tumbuhan sehingga mikroorganisme ini dengan mudah mengkontaminasi makanan (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Diketahui juga bahwa *Bacillus* sp. dapat memproduksi keragaman enzim-enzim ektraseluler terlarut (Priest dalam dalam Roubos-van den Hil *et al*. (2010b).

1.2.2.2. Bakteri Gram Negatif

Bakteri merupakan organisme yang banyak ditemukan di alam dalam jumlah besar dan ada juga yang tumbuh sebagai flora normal di tubuh manusia, di antaranya *E. coli* (Pelczar & Chan, 1988). *E. coli* merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang, bersifat anaerob fakultatif, namun mereka lebih baik tumbuh dengan kondisi aerob (Meng dan Schroeder dalam Yates, 2011b). Rentang suhu pertumbuhan *E. coli* adalah 7–8°C sampai 46°C, dengan temperature optimum 35–40°C (ICMSF 1996a). *E. coli* lebih tahan terhadap panas pada fase stasioner

pertumbuhannya dibandingkan pada fase log. *E. coli* bertumbuh dalam rentang pH 4.4–10.0, dengan optimum pH 6–7 (Desmarchelier and Fegan dalam Yates, 2011b). Waktu generasi yang diperlukan *E. coli* di laboratorium dengan kondisi optimal biasanya adalah 15-20 menit, namun saat di saluran pencernaan waktu generasi koliform diperkirakan 12-24 jam (Todar, 2008).

E. coli patogen adalah penyebab utama diare pada pelancong. *E. coli* patogen dikategorikan menjadi beberapa kategori berdasarkan mekanisme terjadinya diare. Kategori tersebut adalah *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC), *Enterophatogenic E. coli* (EPEC), *Enteroadherent E. coli* (EAEC), *Enterohemorrhagic E. coli* (EHEC), *Enteroinvasive E. Coli (EIEC)*, dan *Diffusely Adhering E. coli (DAEC)* (Montville and Matthews dalam Yates, 2011b). Di negara maju, EHEC adalah patogen *E. coli* yang paling serius, sedangkan di negara berkembang EPEC adalah penyebab utama diare pada anak-anak (Ochoa *et al*. 2008).

Bakteri ini dapat ditemukan pada kolon manusia, berkoloni pada usus, dan beberapa jenis *E. coli* kontaminan dapat ditemukan pada feses hewan atau manusia (Levinson & Jawetz, 1989). Proses infeksi *E. coli* dapat melalui makanan dan minuman yang terkontaminasi dan dapat menyebabkan penyakit infeksi saluran kemih, diare, sepsis, dan meningitis (Kusuma, 2010). Menurut Noviana (2004), resistensi bakteri *E. coli* terhadap antibiotik telah banyak dilaporkan. *E. coli* tersebut resisten terhadap antibiotik golongan β-laktam, fosfomisin, dan golongan kuinolon. Jenis bakteri *E. coli* yang telah mengalami resistensi dan menyebabkan infeksi ialah *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC) dan *Enteropathogenic E. coli* (EPEC).

Organisme dominan penyebab diare yang parah adalah *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) dan rotavirus (Bhan dalam Kiers, 2001). ETEC memiliki kemampuan untuk menempel pada permukaan epitel usus karena bakteri ini memiliki fimbria atau faktor kolinisasi pada permukaannya sebagai perantara penempelan (Valvatne dalam Roubos-van den Hil, 2010a). Setelah ETEC telah menempel dekat dengan sel inang dalam usus halus, ETEC dapat menghasilkan enterotoksin yang akan mengikat reseptor spesifik permukaan sel epitel. Terdapat

dua tipe enterotoksin yang dihasilkan, yaitu enterotoksin stabil terhadap panas dan enterotoksin labil terhadap panas. Mekanisme dasar kedua enterotoksin ini adalah mereka menyebabkan perubahan fungsional yang mendalam di sel-sel epitel usus halus sehingga meningkatkan sekresi air, kation sodium, dan anion klorida dan seiring dengan menurunnya penyerapan air, terjadi dehidrasi dan asidosis (Nagy dan Fekete dalam Kiers, 2001).

Salmonella spp. merupakan bakteri Gram-negatif yang tidak membentuk spora, berbentuk batang, dan termasuk famili *Enterobacteriaceae*. Bakteri ini termasuk organisme fakultatif anaerob dimana tidak memerlukan oksigen untuk pertumbuhannya (Jay *et al*. dalam Yates, 2011a). Suhu pertumbuhan *Salmonella* spp. adalah 5.2–46.2°C, dengan suhu optimal 35–43°C (ICMSF 1996b). Ketahanan bakteri ini terhadap panas tergantung dari komposisi, pH, dan aktivitas air dalam makanan. Dalam kondisi pH yang rendah, ketahanan panas *Salmonella* spp berkurang (Jay *et al*. dalam Yates, 2011a). *Salmonella* spp. masih dapat bertumbuh pada rentang pH 3.8–9.5, dengan rentang pH optimum untuk bertumbuh yaitu 7–7.5 (ICMSF 1996b). Waktu generasi yang dibutuhkan *Salmonella* adalah 21- 34,8 menit (Silva *et al*., 2009). *Salmonella enteriditis* dan *Salmonella typhimurium* merupakan spesies *Salmonella* yang paling sering menyebabkan diare. Awal penyakit dengan gejala demam, menggigil, dan diare, diikuti dengan mual, muntah, dan kejang abdomen. Sedangkan *Salmonella typhi* dan *Salmonella paratyphi* adalah spesies *Salmonella* yang secara spesifik menginfeksi manusia dan menyebabkan demam typhoid (Procop *et al*., 2003).

1.2.3. Tempe Kedelai

Tempe merupakan sebutan untuk kacang-kacangan, serealia atau hasil sampingan produk pangan yang dimasak dan difermentasi oleh miselium dari kapang hidup yang akan mengikat biji-biji tersebut menjadi satu kesatuan produk. Kacang kedelai yang berwarna kuning merupakan bahan mentah yang umumnya dipakai dalam pembuatan tempe. Dalam Nout dan Rombouts (1990) disebutkan bahan kacang-kacangan lain yang biasa dijadikan substrat tempe, yaitu kacang kecipir (tempe kecipir), koro benguk (tempe benguk), koro pedang (tempe koro pedang),

lamtoro (tempe lamtoro), dan kacang gude (tempe gude). Substrat tempe dari hasil sampingan produk pangan yaitu, ampas kedelai dalam pembuatan tahu (tempe gembus). Bahan serealia yang dapat dibuat menjadi tempe, yaitu barley, gandum, oat, dan sorgum (Roubos-van den Hil dan Nout, 2011).

Tempe adalah makanan fermentasi tradisional asal Indonesia, dimana kapang memiliki peran yang penting (Nout dan Rombouts, 1990). Proses fermentasi dalam pembuatan tempe ini bertujuan untuk memodifikasi bahan-bahan dan meningkatkan nutrisinya oleh adanya aktivitas enzim (Nout dan Kiers, 2005). Aspek utama yang diinginkan pada tempe adalah flavor dan tekstur yang menarik dan sifat nutrisi tertentu. Di Indonesia tempe kedelai dikonsumsi sebagai pengganti daging berprotein tinggi oleh semua kelompok ekonomi. Di luar negeri, tempe kedelai dikenal sebagai sumber protein utama selain daging (Nout dan Kiers, 2005).

Pembuatan tempe secara tradisional melibatkan dua proses utama, yaitu proses perendaman kedelai dan fermentasi kapang. Selama proses perendaman kedelai, mikroflora yang berada dalam tempat perendaman bertindak sebagai starter untuk fermentasi asam laktat atau asam asetat yang akan menurunkan pH dari 6,5- 7 menjadi 4,5- 5,5 (Nout dan Rombouts, 1990). Proses pengasaman kedelai ini penting untuk dilakukan karena bakteri asam laktat yang mendominasi dalam proses pengasaman kedelai akan menghambat pertumbuhan mikroorganisme perusak dan patogen sehingga memperpanjang umur simpan tempe (Ashenafi dan Busse dalam Roubos-van den Hil dan Nout, 2011). Efek penghambatan ini merupakan hasil dari peningkatan asam organik yang signifikan selama proses pengasaman sehingga mikroorganisme perusak atau patogen tidak dapat bertumbuh pada kondisi asam. Pengasaman dan efek penghambatan lain dari bakteri asam laktat juga menekan pertumbuhan mikroflora pada tempe, seperti koliform, *Klebsiella pneumonia* (Tuncel dan Goktan dalam Nout dan Kiers, 2005), dan khamir (Ashenafi dalam Nout dan Kiers, 2005). Selain memungkinkan terjadinya aktivitas mikroba, tujuan perendaman biji kedelai lainnya adalah meningkatkan kadar air pada biji, dan untuk mengekstrak senyawa antimikroba

(saponin) dan kompenen pahit yang secara alami ada dalam biji kedelai (Roubos-van den Hil dan Nout, 2011).

Setelah biji kedelai ditiriskan dari air perendaman, proses utama selanjutnya adalah fermentasi kapang. Fermentasi kapang dilakukan dengan menambahkan kultur starter kapang ke biji kedelai dan menyimpannya selama 1-2 hari pada suhu 25-30°C. Kapang hidup yang umum digunakan sebagai starter tempe adalah *Rhizopus sp*. terutama jenis *R. oligosporus*, *R. oryzae*, dan terkadang kapang *Mucor sp.* (Nout dan Kiers, 2005). Kultur starter pada pembuatan tempe tradisional berupa bubuk kering dari tempe sebelumnya, atau dari inokulum yang tumbuh pada permukaan daun (usar), atau inokulum yang ditumbuhkan pada nasi atau singkong (Nout dan Rombout, 1990).

Biji kedelai yang sudah diinokulasi kapang kemudian dibungkus dengan kemasan yang sudah dilubangi. Kemasan tempe perlu diberi lubang-lubang kecil yang cukup untuk menyediakan pertumbuhan aerobik bagi kapang selama proses fermentasi (Roubos-van den Hil dan Nout, 2011). Kemasan tradisional yang digunakan sebagai pembungkus tempe adalah daun jati dan daun pisang. Sedangkan kemasan yang umum digunakan sekarang adalah daun pisang dan plastik.

1.2.3.1. Peran Mikroorganisme dalam Tempe Kedelai

Tempe merupakan hasil dari fermentasi kultur campuran oleh kelompok mikroorganisme kapang, khamir, bakteri asam laktat, dan bakteri gram-negatif yang berbeda. Namun, *Rhizopus* merupakan genus kapang utama dalam pembuatan tempe dengan spesies *R. microsporus, R. oligosporus, dam R. oryzae* (Nout dan Kiers, 2005). Kompleksnya mikroorganisme dalam tempe yang dibuat secara tradisional disebabkan oleh kultur starter campuran yang disiapkan dari sporulasi tempe sebelumnya atau dari inokulum yang tumbuh pada daun tertentu. Penyebab lainnya adalah bertahannya bakteri penghasil spora selama proses pemasakan dan terjadinya kontaminasi selama proses pendinginan dan pengeringan biji kedelai sebelum diinokulasi (Samson *et al*., 1987).

Kontaminasi pada tempe juga dapat berasal dari kemasan pembungkus tempe yang digunakan. Tempe yang dibungkus dengan daun pisang memiliki aroma tempe yang lebih disukai oleh konsumen, namun daun dapat menjadi sumber kontaminan alami. Bakteri yang sering terdapat pada permukaan daun adalah *Bacillus cereus, B. subtilis, Lactobacillus acidophilus sp., Staphylococcus aureus, S. epidermis, Pseudomonas sp., Corynebacterium sp,* dan *Micrococcus sp*. Sedangkan kapang yang sering dijumpai adalah *Mucor mucedo, Aspergillus niger, A. flavus, Penicillium expansum,* dan *Rhizopus stolonifer* (Supardi dan Sukamto, 1999)

Seperti yang telah disebutkan sebelumnya bahwa kapang yang tumbuh pada daun juga dapat menjadi sumber starter tempe yang dikenal dengan "usar" atau "laru". Usar juga dapat diinokulasi pada nasi atau tepung singkong untuk menumbuhkan starter. Di Yogyakarta, usar berasal dari daun *Hibiscus similis, H. tiliaceleus, Tectona grandis, Bambusa sp*. atau *Musa paradisiaca* (Jutono dalam Nout dan Rombouts, 1990). Jenis daun yang berbeda menghasilkan pertumbuhan miselium, pembentukan spora, dan keberadaan klamidospora yang bervariasi. Hal ini menunjukkan bahwa dalam suatu daun yang sama terdapat banyak strain Rhizopus (Nout dan Rombouts, 1990)

Pertumbuhan bakteri akan melampaui pertumbuhan kapang, jika waktu pemasakan biji kedelai terlalu singkat atau biji kedelai masih terlalu basah saat inkubasi. Hal ini menyebabkan produk tempe yang tidak sesuai dan bahkan busuk. Pertumbuhan bakteri dan khamir dalam produk tempe yang telah jadi akan terus berlanjut selama proses penyimpanan pada suhu ruang. Lama-kelamaan warna putih bersih berubah menjadi kecoklatan dan permukaan tempe menjadi basah dan berlendir (Samson *et al*., 1987).

Bakteri kontaminan dalam tempe, dapat juga berupa bakteri yang berpotensi patogen seperti *S. aureus, B. cereus* dan *E.coli* yang juga ditemukan pada tempe (Samsom *et al*., 1987). Pada penelitian tersebut dihasilkan 10% sampel

mengandung *S. aureus* dalam jumlah yang dapat menyebabkan keracunan makanan. Oleh karena itu, untuk mendapatkan produk tempe yang aman dianjurkan untuk merendam kedelai dalam kondisi asam dengan pH rendah untuk mencegah pertumbuhan bakteri yang berpotensi patogen, waktu pemasakan tempe yang cukup, menyiapkan kondisi yang higienis selama proses produksi dan penyimpanan, menyimpan tempe pada suhu dibawah 7°C selama periode tertentu.

Menurut Fadahunsi *et al*,. (2013), *R. oligosporus* yang merupakan mikroorganisme utama yang berperan dalam proses fermentasi tempe menghasilkan senyawa fenol yang berperan sebagai zat anti inflamasi, antimikroba, dan antioksidan. Senyawa fenol sebagai senyawa antibiotik menghambat fungsi membran sel. Selain senyawa fenol, pada penelitian Kobayashi *et al*., (1992) *R. oligosporus* menghasilkan senyawa antibakteri berupa protein 5,5 kDa yang diisolasi dari kultur media kasein terhidrolisa. Senyawa antibakteri tersebut terlihat aktivitasnya terhadap *Bacillus sp.* (khususnya *B. subtilis*), *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus cremoris*. Selain itu, *R. oligosporus* dapat menghambat pertumbuhan, sporulasi, dan produksi *aflatoxin* dari *A. flavus* yang mengkontaminasi selama proses fermentasi (Ko dalam Samson *et al*., 1987). Dengan kemampuan kapang tempe tersebut dan proses pembuatan tempe yang benar, dapat dikatakan bahwa tempe kedelai yang dihasilkan aman dikonsumsi.

Kondisi lingkungan mempenaruhi pertumbuhan kapang selama proses inkubasi (fermentasi). Temperature optimum untuk germinasi atau perkecambahan spora *R. oligosporus* adalah 40°C, sedangkan untuk pertumbuhan suhu 33°C memberi laju yang lebih tinggi dibanding suhu 30°C dan 27 °C (Seaby dalam Nout dan Rombouts, 1990). Kapang *Rhizopus* tahan dengan kondisi asam, dimana pertumbuhannya tetap stabil selama pH 3,5 atau lebih. Selain memerlukan oksigen yang cukup, kapang juga dapat bertumbuh lebih baik dalam lingkungan dengan level kelembapan yang tinggi, yaitu 75-78%.

Seperti yang sudah disebutkan sebelumnya bahwa selama fermentasi kapang, terdapat kelompok bakteri dan khamir yang bertumbuh dan terdeteksi di dalam tempe. Pertumbuhan bakteri dan khamir ini tidak mempengaruhi pertumbuhan kapang selama fermentasi (Feng *et al*. dalam Nurdini *et al*., 2015). Kontribusi bakteri dan khamir pada karakteristik tempe hanya diketahui sebagaian, namun mikroorganisme ini dapat berperan dalam pengembangan rasa (flavor), modifikasi substrat, dan dalam keamanan produk (Nout dan Rombouts, 1990).

Bakteri kontaminan *Klebsiella pneumonia* yang merupakan bakteri yang berperan dalam menghasilkan vitamin B12 pada tempe komersial (Liem dalam Purawisastra *et al*., 1994). Bakteri ini secara alami mengkontaminasi tempe pada awal proses perendaman dan seiring terjadinya peningkatan keasaman, bakteri ini tidak dapat bertahan (Mulyowidarsono dalam Nout dan Rombouts, 1990). Kedelai yang diinokulasi dengan kultur campuran *R. oligosporus* dan *Kl. Pneumonia* dengan perbandingan 1:1 menghasilkan tempe dengan kandungan vitamin B12 yang lebih tinggi (Purawisastra *et al*., 1994). *Klebsiella pneumonia* bertumbuh pada pH 5-7 dan temperature optimal untuk menghasilkan vitamin B12 adalah 35°C (Suparmo dalam Nout dan Rombouts, 1990). Pertumbuhannya tidak mengganggu pertumbuhan *R. oligosporus* (Steinkraus dalam Purawisastra, 1994) dan tidak sensitif terhadap antibakteri yang dihasilkan *Rhizopus sp* (Shurtleff dan Aoyagi dalam Purawisastra *et al*., 1994).

Selama fermentasi kapang terjadi pada pembuatan tempe, terdeteksi juga pertumbuhan kelompok bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat dapat tumbuh mencapai 9 log CFU/g pada tempe (Van den Hil dan Nout 2011). Jumlah bakteri asam laktat pada tempe berkisar antara 6.8-9.9 log CFU/g (Moreno *et al*. 2002). Namun, pertumbuhan bakteri asam laktat tersebut tidak mempengaruhi pertumbuhan kapang tempe (Feng *et al* dalam Nurdini *et al*., 2015)

Bakteri asam laktat yang teridentifikasi bertumbuh selama fermentasi tempe, diantaranya *Enterococcus faecium, Lactobacillus plantarum, Pediococcus acidilactici, Weisela confusa, Pediococcus pentosaceus,* dan *Lactobacillus*

fermentum (Moreno *et al*. 2002). Bakteri asam laktat *Enterococcus faecium* yang ditemukan di tempe merupakan salah satu bakteri asam laktat penghasil bakteriosin yang berpotensi untuk memperpanjang umur simpan tempe (Moreno *et al*. dalam Nout dan Kiers, 2005). Bakteriosin merupakan senyawa protein yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri lain (terutama yang memiliki kekerabatan erat) yang dihasilkan oleh beberapa strain bakteri asam laktat. Selain itu, bakteriosin memiliki sifat mudah terdegradasi oleh enzim proteolitik dalam pencernaan manusia dan hewan sehingga senyawa ini berpotensi sebagai pengawet makanan alami (Daeschel, 1993 dalam Kusmiati dan Malik, 2002).

Adanya mikroba kompetitor yang ditambahkan (*Lactobacillus plantarum*) dalam kedelai dengan pH rendah akan membantu menghambat pertumbuhan bakteri-bakteri kontaminan seperti *E. coli, Salmonella infantis, Ent. Aerogenes* seiring dengan meningkatnya pH selama fermentasi kapang (Nout dan Rombouts, 1990). Walaupun bakteri kontaminan *S. aureus* akan tetap bertumbuh, tempe dengan penambahan 10^3 cfu/ g *Lactobacillus plantarum* atau *L. brevis* selama fermentasi kapang menunjukkan bahwa terjadi pengurangan 65% enterotoksin stapilokokal A dan 96% enterotoksin stapilokokal B setelah fermentasi selama 48 jam. Penghambatan enterotoksin ini disebabkan karena adanya bakteri asam laktat sebagai kompetitor aktif dan sedikitnya oksigen yang tersedia selama fermentasi (Nout *et al*, 1988).

Asam organik yang dihasilkan selama proses perendaman kedelai adalah asam laktat, asam malat, dan asam asetat. Perendaman yang dilakukan secara alami (tanpa penambahan inokulum bakteri asam laktat atau asam) menghasilkan asam asetat dan asam laktat yang mendominasi, sedangkan asam malat sangat rendah. Berbeda dengan pengasaman yang ditambahkan dengan inokulum murni bakteri asam laktat, dihasil asam laktat saja yang mendominasi dengan jumlah yang lebih tinggi (Nout dan Kiers, 2015). Selain dapat menghambat pertumbuhan mikroba kontaminan pada tahap perendaman, pH rendah pada perendaman akan menimbulkan rendahnya pH biji kedelai pada awal fermentasi. Nilai pH yang rendah di awal fermentasi dapat mempercepat fase lag dari pertumbuhan *Rhizopus*

selama fermentasi kapang dan menghambat pertumbuhan mikroba kontaminan (Nout dan Rombout, 1990).

Bakteri asam laktat dapat menghidrolisa protein kedelai, namun hasilnya tidak sebanyak yang dihasilkan kapang dan khamir (Roubos-van den Hil *et al*. dalam Nurdini, 2015). Dalam fermentasi makanan, khamir diketahui bertumbuh sinergi dengan bakteri asam laktat karena mampu menghasilkan vitamin, asam-asam amino dan juga memecah karbohidreat komples yang penting bagi pertumbuhan BAL (Arroyo-Lopez *et al*. dalam Nurdini, 2015). Sedangkan khamir dapat mengkonsumsi asam laktat yang dihasilkan BAL (Cheirsilp *et al*. dalam Nurdini, 2015).

Pada tempe juga terdapat bakteri lain yang pertumbuhannya tidak diinginkan selama fermentasi kapang. *Bacillus* merupakan mikroorganisme yang tidak dinginkan pertumbuhannya karena dianggap menyebabkan timbulnya rasa pahit pada tempe. Tempe dengan jumlah *Bacillus* yang tinggi dianggap memiliki rasa yang pahit (Barus *et al*., 2008 dalam Nurdini, 2015). Selain bakteri, pada tempe juga sering muncul bercak hitam pada permukaan tempe. Munculnya spora hitam pada tempe mengindikasikan kondisi fermentasi tempe yang tidak mencukupi atau produk tempe disimpan melebih masa simpannya atau suhu penyimpanan 7°C (Samson *et al*., 1987).

1.2.3.2. Perubahan Biokimia Selama Fermentasi

Pada puncak pertumbuhan kapang selama fermentasi tempe, pH akan meningkat sampai 6,00- 6,70. Nilai pH masih dapat meningkat sampai 7,60 selama fermentasi, namun produk akhir tempe yang baik memiliki pH antara 6,30- 6,50 (Beuchat, 2001). Semakin lama waktu fermentasi, dihasilkan nilai pH yang semakin meningkat. Hal ini disebabkan oleh mikroflora pada tempe yaitu kapang dan bakteri lainnya yang berperan dalam mendegradasi senyawa kompleks seperti protein menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti asam-asam amino dan juga amonia yang menyebabkan kenaikkan pH pada tempe (Sparringa dan Owens, 1990).

Selama proses fermentasi kedelai, terjadi perubahan biokimia yang menambah kualitas nutrisi dan sensori pada tempe. Hal ini disebabkan oleh aktivitas enzim yang dihasilkan kapang *Rhizopus* spp. Enzim-enzim yang mengkatalis pemecahan karbohidrat, lipase, dan protease yang dihasilkan tersebut dapat mendegradasi makronutrien menjadi senyawa dengan massa molekul yang rendah dan kelarutan dalam air yang lebih tinggi. Selain itu, vitamin, fitokimia, dan senyawa antioksida juga terbentuk (Nout dan Kiers, 2005)

Karbohidrat dalam kedelai meliputi polisakarida-polisakarida dinding sel dan gula kecil seperti fruktosa, rafinosa, dan *stachyose*. Gula kecil ini biasanya terbuang selama proses perendaman, pemasakan, dan fermentasi kedelai. Polisakarida dinding sel yang tidak larut (*insoluble*) seperti pektin, selulosa, dan hemiselulosa akan terdegradasi sebagian selama fermentasi oleh enzim kapang sehingga meningkatkan kelarutannya dalam air (Kiers *et al*, 2000). Enzim utama yang mengkatalis pemecahan karbohidrat dari *R. oligosporus* dalam tempe termasuk poligalakturonase, endoselulase, xylanase, dan arabinanase (Sarrette el al. dalam Roubos-van den Hil dan Nout, 2011). Selama fermentasi kedelai, fraksi pektin dan rantai arabinogalaktan-nya akan terlarut dengan dominan (De Reu *et al*. dalam Roubos-van den Hil dan Nout, 2011). Selama fermentasi, substansi yang tereduksi semakin menurun jumlahnya, sedangkan serat makanan meningkat dari 3,7 sampai 5,8% karena bertumbuhnya miselia kapang (Karyadi dalam Ang dalam Nout dan Kiers, 2005)

Kadar protein dalam tempe dan kedelai hampir sama, namun kadar protein terlarut pada tempe meningkat tajam karena aktivitas enzim protease yang dihasilkan kapang selama fermentasi. Oleh karena itu dapat dikatakan bahwa kualitas protein dalam tempe sedikit lebih tinggi daripada kacang kedelai yang tidak difermentasi (Astuti *et al*., 2000). Hal ini didukung oleh Bintari *et al.*, (2008), perubahan pada tempe kedelai menyebabkan jumlah protein terlarut menjadi empat kali lipat lebih banyak.

Aktivitas lipase dan produksi asam lemak bebas terjadi dari tahap terawal dari fermentasi. Jumlah gliserol yang hanya sedikit menandakan bahwa trigliserida terhidrolisis terutama menjadi monogliserida dan digliserida dan asam lemak bebas (Ruiz-Teran dan Owen dalam Roubos-van den Hil dan Nout, 2011). Asam lemak ini digunakan sebagai sumber energi oleh kapang sehingga menghasilkan tempe dengan kadar lemak yang rendah. Asam lemak bebas yang banyak digunakan *R. oligosporus* sebagai sumber energi adalah asam oleat (Peredes-Lopez *et al*. dalam Nout dan Rombout, 1990) dengan hasil lipolisis dominan lainnya adalah asam linoleat, asam palmitat, asam linolenat, dan asam stearat (Nout dan Rombout, 1990).

Pada penelitian Van der Riet *et al*. (1987) terjadi penurunan 65% asam fitat pada tempe sebagai hasil dari aktivitas enzim fitase yang dihasilkan oleh *R. oligosporus*. Penurunan asam fitat merupakan hal yang penting karena senyawa ini dapat mengikat mineral sehingga menurunkan bioavailabilitas mineral (ketersediaan mineral untuk diserap tubuh). Selain asam fitat, faktor antinutrisi lain seperti, *trypsin inhibitors* dan *lectins* juga terbuang atau terinaktivasi selama perendaman, pemasakan, dan fermentasi (Astuti *et al*., 2000).

Tingkat mineral dalam tempe tidak dipengaruhi oleh proses fermentasi, namun kelarutannya meningkat tajam. Besi terlarut meningkat sebesar 66,51% selama fermentasi. Hal ini dikarenakan besi terbebas dari protein kompleks yang terpecah menjadi asam amino bebas, peptida atau protein sederhana (Astuti *et al*., 2000).

Aktivitas metabolisme kapang dan bakteri selama proses fermentasi juga menyebabkan beberapa vitamin dari golongan vitamin B meningkat jumlahnya, yaitu riboflavin, niacin, vitamin B6 dan vitamin B12 (Bisping *et al*., Denter *et al*., Keuth dan Bisping dalam Roubos-van den Hil dan Nout, 2011). Vitamin B12 lebih tinggi kadarnya dalam tempe yang dibuat di Indonesia, dibanding tempe yang dibuat di Jepang dengan inokulum murni *R.oligosporus* NRRL 2710. Hal ini menunjukkan bahwa vitamin B12 lebih banyak dihasilkan oleh bakteri

kontaminan, *Klebsiella pneumonia* selama proses perendaman kedelai (Okada dalam Astuti *et al*., 2000).

Kedelai dan olahan kedelai diketahui mengandung isoflavon dengan 4 bentuk yang berbeda, yaitu malonil-glikosida, setil-glikosida, glikosida, dan aglikon (bebas). Dari keempat bentuk tersebut, aktivitas antioksida tertinggi ditunjukkan pada isoflavon aglikon. Namun, kandungan tertinggi isoflavon dalam kedelai adalah dalam bentuk malonil-glikosida dan setil-glikosida. Isoflavon tersebut mudah terdeesterifikasi menjadi bentuk glikosida dengan perlakuan suhu diatas 40°C (Kudou *et al*. dalam Purwoko, 2004). Isoflavon glikosida dapat terhidrolisis menjadi bentuk aglikon dan glukosa dengan adanya enzim beta-glukosidase atau asam (Purwoko *et al*. dalam Purwoko, 2004).

Isoflavon dalam kedelai dapat hilang selama proses pencucian dan pemasakan. Sedangkan pada proses perendaman dan fermentasi, terjadi peningkatan total isoflavon dalam tempe karena terdapat enzim glukosidase yang mengubah glikosida (isoflavon terikat) menjadi aglikon (isoflavon bebas) yang mudah diserap tubuh (Pawiroharsono dalam Utari *et al*., 2010). Enzim beta-glukosidase tersebut dihasilkan dari mikroba disekitar biji kedelai yang mengalami perendaman, dimana suhu dan lama perendaman kedelai mempengaruhi jumlah isoflavon aglikon yang dihasilkan. Semakin mendekati suhu optimum dengan waktu yang lama, dihasilkan jumlah isoflavon aglikon yang lebih tinggi (Purwoko, 2004).

Tempe juga ditemukan mengandung enzim superoksida dismutase (SOD) yang dihasilkan selama proses fermentasi tempe. Enzim ini melindungi sel dari radikal bebas. Pada awal fermentasi, SOD belum terbentuk, namun setelah 24 jam fermentasi, SOD meningkat secara bertahap sampai 60 jam fermentasi. Setelah itu enzim ini mulai menurun karena keberadaan SOD beriringan dengan pertumbuhan kapang (Astuti dalam Astuti *et al*., 2000)

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui manfaat anti-diare pada tempe. Salah satu manfaat anti-diare tempe dibuktikan melalui analisa aktivitas antibakteri air seduhan tempe terhadap bakteri gram positif (*Staphylococcus aureus* dan *Bacillus cereus*) dan bakteri gram negatif (*Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*) penyebab diare sehingga dapat mengetahui suhu dan waktu yang efektif dalam menyeduh tempe berkaitan dengan aktivitas penghambatan terbesar.