

Aktivitas Antibakteri Metabolit *Rhizopus* sp. Asal Usar Daun Jati terhadap *Salmonella typhi*

Antibacterial Activity of *Rhizopus* sp. Metabolites from Teak Leaf Usar Against *Salmonella typhi*.

Nur Khikmah^{1*} dan Anindita Vidya Jatiswara¹

¹Program Studi DIII Teknologi Laboratorium Medis,
Akademi Analis Kesehatan Manggala, Yogyakarta, Indonesia

Abstrak

Kapang *Rhizopus* sp. berperan sebagai inokulum utama dalam fermentasi tempe. Inokulum dalam fermentasi tempe juga dapat diperoleh secara alami dari usar daun jati. *Rhizopus* sp. yang tumbuh pada kedelai akan menghasilkan metabolit yang telah dikaji sebagai antidiare yang disebabkan bakteri *Salmonella typhi* sebagai penyebab demam tifoid yang masih menjadi penyakit endemis di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari aktivitas antibakteri metabolit *Rhizopus* sp. asal usar daun jati terhadap *S. typhi*. Metabolit *Rhizopus* sp. diproduksi pada media *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) selama 5 hari. Uji antibakteri metabolit menggunakan metode difusi kertas. Isolasi dari usar daun jati memperoleh satu isolat kapang yang teridentifikasi *Rhizopus* sp. Hasil uji menunjukkan bahwa *crude* metabolit *Rhizopus* sp. mempunyai aktivitas antibakteri kategori sedang terhadap *S. typhi*.

Kata Kunci: *Rhizopus* sp., usar daun jati, metabolit, antibakteri, *Salmonella typhi*

Abstract

The mold *Rhizopus* sp. plays a role as the main inoculum in Tempeh fermentation. Inoculum for Tempeh fermentation can also be naturally obtained from the leaves of the Teak tree. The mold *Rhizopus* sp. that grows on soybeans will produce metabolites that have been studied as anti-diarrheal agents against *Salmonella typhi*, the bacterium causing typhoid fever, which remains an endemic disease in Indonesia. This research aimed to study the antibacterial activity of metabolites from *Rhizopus* sp. originating from teak tree leaves against *S. typhi*. Metabolites from *Rhizopus* sp. are produced in *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) media for 5 days. The antibacterial test of metabolites was conducted using the paper diffusion method. Mold isolation from Teak tree leaves yields an isolate identified as *Rhizopus* sp. The test results indicate that the *crude* metabolites of *Rhizopus* sp. have a moderate antibacterial activity against *S. typhi*.

Keywords: *Rhizopus* sp., teak leaves wrap, metabolites, antibacterial, *Salmonella typhi*

*** Corresponding author:**

Nur Khikmah

Program Studi DIII Teknologi Laboratorium Medis, Akademi Analis Kesehatan Manggala Yogyakarta,
Jl. Bratajaya 25 Sokowaten, Banguntapan, Bantul, Indonesia,

E-mail: khikmahnr@gmail.com

Pendahuluan

Rhizopus sp. berperan sebagai inokulum utama dalam pembuatan tempe yang berfungsi sebagai agensia pengubah kedelai rebus menjadi tempe melalui proses fermentasi. Pertumbuhan miselium *Rhizopus* sp. menjadikan biji kedelai merekat sehingga terbentuk tekstur yang memadat. *Rhizopus* sp. berperan merombak senyawa kompleks protein menjadi senyawa-senyawa lebih sederhana yang mudah diserap oleh tubuh.

Pertumbuhan *Rhizopus* sp. pada kedelai akan menghasilkan metabolit yang dapat dimanfaatkan sebagai penghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif seperti kelompok Enterobacteriaceae. Menurut Brooks *et al.* (2012), kelompok Enterobacteriaceae merupakan bakteri Gram negatif penyebab diare dengan contoh spesies diantaranya adalah *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, dan *Vibrio cholerae*. Hasil penelitian Maskar (2013), menyatakan bahwa terapi tempe pada anak yang terkena diare menyebabkan periode diare lebih pendek sehingga penderita lebih cepat sembuh. Hal tersebut disebabkan oleh adanya komponen antidiare yang dikandung tempe. Hasil penelitian Babu *et al.* (2009) menyebutkan bahwa orang Indonesia yang secara rutin mengonsumsi tempe akan terhindar dari penyakit disentri dan gangguan pencernaan.

Konsumsi kacang kedelai yang difermentasi *Rhizopus* sp dapat mengurangi keparahan dan waktu diare pada anak babi yang disebabkan oleh *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) K88 dibandingkan kacang kedelai panggang (Kiers *et al.*, 2003). Senyawa metabolit *R. oligosporus* NRRL 2710 menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap patogen yang diuji dengan urutan penghambatan tertinggi pada *E. coli* dan *S. typhi*, diikuti *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacteria diphtheriae* dan *Klebsiella pneumoniae* (Fadahunsi *et al.*, 2013). *Rhizopus* sp. IP dan *Rhizopus* sp. IJ yang diisolasi dari inokulum tempe komersial juga mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Vibrio cholerae* dengan kategori yang sama besar. (Khikmah & Haloho, 2021).

Rhizopus sebagai inokulum pada tempe

yang digunakan pengrajin tempe pada saat ini sebagian besar berasal dari inokulum komersial yang dijual di pasaran dalam bentuk serbuk kering pembawa spora. Inokulum juga dapat berasal dari usar berupa kapang *Rhizopus* yang diperoleh langsung dari daun pembungkus tempe. Daun tersebut di antaranya daun jati (*Tectona grandis*), dan daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L). Permukaan bawah daun jati dan daun waru secara alami memiliki bulu-bulu halus (trikoma) sebagai tempat penempelan spora *Rhizopus* dari udara. Spora akan tumbuh menjadi miselium berwarna putih. Penggunaan usar sebagai inokulum tempe pada saat ini semakin berkurang karena alasan ketidakpraktisan dalam penyiapannya sehingga pengrajin tempe banyak menggunakan inokulum komersial.

Usar merupakan sumber inokulum *Rhizopus* bersifat *indigenous* yang didapatkan secara alami. Penggunaan inokulum *indigenous* dalam fermentasi tempe dapat diarahkan sebagai salah satu upaya untuk menjaga keanekaragaman dan kelestarian *Rhizopus* yang ada di Indonesia agar tidak punah. Metabolit yang dihasilkan oleh kapang *indigenous* berbasis usar diharapkan akan sesuai sebagai antibakteri patogen lokal, khususnya bagi bakteri penyebab diare di Indonesia.

Bakteri *Salmonella typhi* merupakan penyebab demam tifoid, yaitu infeksi akut pada usus halus. Gejala infeksi adalah diare, demam, lemas, mual-mual, muntah, nyeri perut, nyeri kepala, dan nyeri otot (Brooks *et al.*, 2012). Di Indonesia, penyakit tersebut merupakan penyakit endemis. Kasus diare di Indonesia tidak dilaporkan secara kumulatif di pusat data dan informasi kesehatan Kementerian Kesehatan RI. Data yang tersedia saat ini di Indonesia adalah data diare yang bersifat umum. Diare yang terdata tersebut disebabkan oleh banyak hal dan tidak spesifik, didasarkan pada gejala klinis atau keterangan melalui proses wawancara tanpa penunjang diagnostik laboratorium.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari aktivitas antibakteri senyawa metabolit *Rhizopus* sp. asal usar daun jati terhadap *S. typhi*.

Materi dan Metode

Sumber Isolat

Sumber isolat *Rhizopus* sp. berasal dari usar daun jati yang diperoleh dari pedagang tempe di pasar Bantengan, Wonocatur, Banguntapan, Bantul. Bakteri uji *S. typhi* diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan (BLK) Yogyakarta.

Isolasi dan Identifikasi *Rhizopus* sp. dari Usar Daun Jati

Isolasi *Rhizopus* sp. dilakukan dengan memotong usar daun jati berukuran 2 x 2 cm secara aseptis, kemudian diinokulasikan pada *Potato Dextrose Agar* (PDA), dan diinkubasi selama 4 x 24 jam. Setelah inkubasi, pertumbuhan kapang diamati dan dilakukan pemurnian isolat.

Isolat yang telah murni kemudian diidentifikasi berdasarkan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis mengacu pada *Introduction to Food and Airborne Fungi* (Samson *et al.*, 2004)

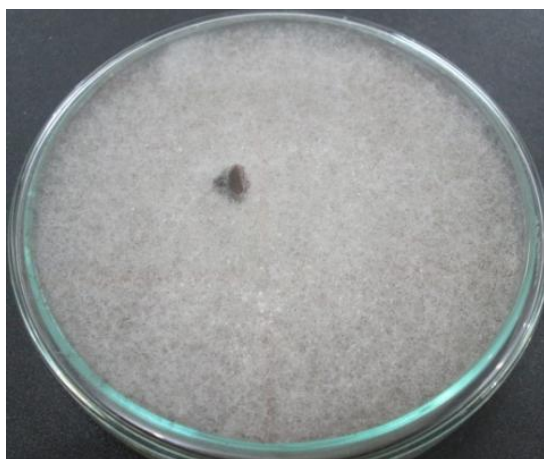
Produksi Metabolit *Rhizopus* sp.

Isolat *Rhizopus* sp. yang telah teridentifikasi diinokulasi kembali pada PDA, diinkubasi selama 4 hari, kemudian diambil sebanyak 4 bulatan dengan *perforator* berdiameter 5 mm untuk diinokulasikan pada 20 mL *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB). Inkubasi dilakukan dalam *shaker* selama 5

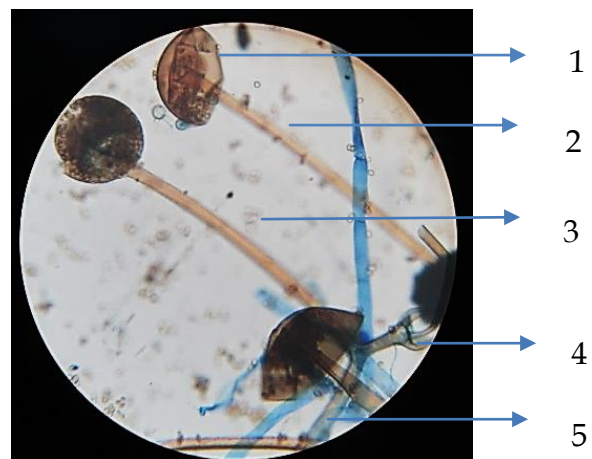
hari dengan kecepatan 100 rpm pada suhu kamar. Setelah inkubasi, kultur disentrifus 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh digunakan untuk uji aktivitas antibakteri (Sukron *et al.*, 2014).

Aktivitas Antibakteri Metabolit *Rhizopus* sp terhadap *Salmonella typhi*

Uji aktivitas antibakteri *Rhizopus* sp. terhadap *S. typhi* dilakukan menggunakan metode difusi kertas (*disc diffusion*). Material berupa *blank disc* dengan diameter 5 mm direndam dalam supernatan, lalu diletakkan pada permukaan medium *Nutrien Agar* (NA) yang sudah ditumbuhi *S. typhi*. Kloramfenikol dengan jumlah 30 µg digunakan sebagai kontrol positif dan akuades steril digunakan sebagai kontrol negatif. Medium uji diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemampuan antibakteri metabolit *Rhizopus* sp. terhadap *S. typhi* ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat di sekitar *disc* (Sukron *et al.*, 2014). Zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur diameternya menggunakan mistar standar (mm) tanpa dikurangi dengan nilai diameter *disc*. Diameter zona hambat pada kloramfenikol (30 µg) mengacu pada CLSI (2019), diukur tanpa dikurangi diameter *disc*.



A



B

Gambar 1. Pertumbuhan isolat dari usar daun jati pada media *Potato Dextrose Agar* (A) dan pengamatan mikroskopis pada perbesaran 40x objektif (B). Bagian-bagian yang ditunjukkan pada gambar, meliputi: sporangium (1), sporangifor (2), sporangiospora (3), rizoid (4), dan stolon (5).

HASIL

Isolasi dan Identifikasi *Rhizopus sp.* dari Usar Daun Jati

Satu isolat kapang berhasil diisolasi dari usar daun jati. Koloni berwarna abu-abu kehitaman, warna sebalik koloni berwarna kuning, tidak memiliki eksudat, tidak memiliki garis radial, tidak memiliki lingkaran konsentris, koloni berfilamen dan tekstur *cottony* (Gambar 1A). Morfologi mikroskopis menunjukkan adanya sporangiospora berwarna coklat kehitaman, sporangium bulat berwarna coklat kehitaman, memiliki kolumela berwarna coklat berbentuk setengah bulat, sporangiofor, rizoid dan hifa tidak bersekat. Sporangiospora berbentuk bulat coklat kehitaman (Gambar 1B).

Isolat kapang diidentifikasi berdasarkan karakterisasi morfologi makroskopis dan mikroskopis dengan mengacu pada *Introduction to Food and Airborne Fungi* (Samson *et al.*, 2004), maka isolat teridentifikasi sebagai anggota *Rhizopus* dengan ciri khas rizoid.

Aktivitas Antibakteri Metabolit *Rhizopus sp* terhadap *Salmonella typhi*

Uji aktivitas antibakteri metabolit *Rhizopus sp.* dari usar daun jati menunjukkan bahwa *Rhizopus sp.* mampu menghambat pertumbuhan *S. typhi*. Kemampuan tersebut terlihat dengan terbentuknya zona hambat berupa zona jernih di sekitar *disc* (Gambar 2). Kriteria zona hambat dihitung berdasarkan diameternya. Hasil pengukuran diameter zona hambat disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata diameter zona hambat antibakteri terhadap *S. typhi*

Antibakteri	Diameter zona hambat (mm)
Metabolit <i>Rhizopus sp.</i>	7,14
Kloramfenikol 10 µg (kontrol +)	34
Akuades steril (kontrol -)	0

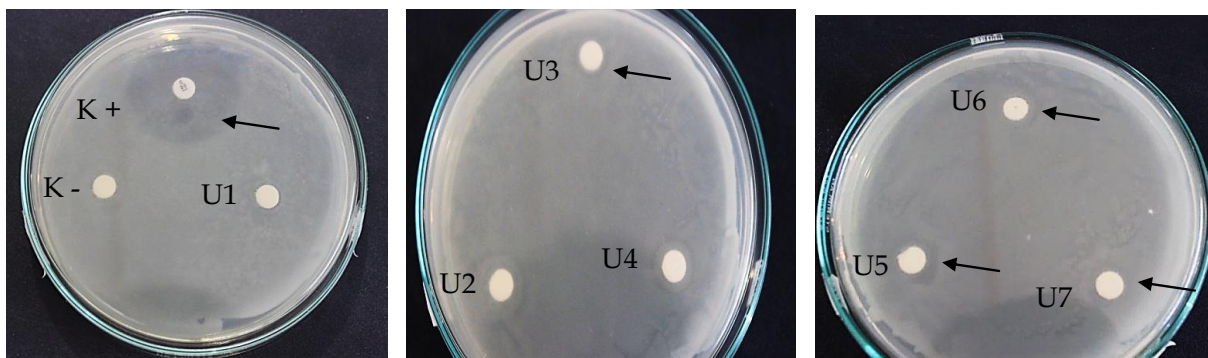
Pembahasan

Isolasi dan Identifikasi *Rhizopus* dari Usar Daun Jati

Isolat kapang dari usar daun jati teridentifikasi sebagai anggota *Rhizopus* dengan ciri adanya rizoid. Identifikasi belum dilakukan sampai spesies. Menurut Samson *et al.* (2004), koloni *Rhizopus* tumbuh cepat, hifa tidak bersepta, mempunyai stolon, rizoid dan sporangiofor. Sporangiofor dapat tunggal atau berkelompok, biasanya tidak bercabang dan berfungsi untuk menyangga sporangium yang banyak mengandung sporangiospora. Sporangium hialin menjadi coklat kehitaman dengan bertambahnya umur kultur. Kolumela berwarna coklat dan berbentuk *globose*. Sporangiospora berbentuk ovoid atau elips, berwarna coklat kehitaman.

Rhizopus pada usar daun jati didapatkan secara alami dari spora *Rhizopus* yang terdapat di udara. Spora akan menempel pada daun jati di permukaan daun bagian bawah yang mempunyai rambut-rambut halus (trikoma), kemudian tumbuh menjadi miselium. Proses pembuatan dan pengeringan usar dilakukan secara alami sehingga jumlah mikroorganisme pada usar lebih banyak dibandingkan inokulum komersial.

Jenis kapang yang terkandung pada usar



Gambar 2. Aktivitas antibakteri metabolit *Rhizopus sp.* terhadap *Salmonella typhi* Keterangan: Kontrol positif (K+), kontrol negatif (K-), dan metabolit (U1-U7). Zona jernih ditunjukkan dengan tanda panah

juga bervariasi, terdiri dari *Rhizopus* spp. dan mikroorganisme lainnya. Hasil penelitian Dewi dan Aziz (2011) mengidentifikasi sepuluh isolat *Rhizopus oligosporus* dari usar daun waru, daun jati, dan daun pisang. Hasil penelitian lain seperti Wipradnyadewi *et al.* (2005) mengidentifikasi *R. oligosporus* dari satu isolat USB3 usar daun waru dan Ayun *et al.* (2022) mendapatkan satu isolat teridentifikasi *R. stolonifer* dari tempe yang dibungkus daun pisang. Isolat-isolat tersebut diidentifikasi berdasarkan morfologi makroskopis dan mikroskopis. Babu *et al.* (2009) menyatakan *R. oligosporus* mempunyai peranan utama dalam fermentasi tempe. Codex Alimentarius (2015) menuliskan bahwa kapang inokulum dalam pembuatan tempe adalah *Rhizopus* spp., yaitu *R. oligosporus*, *R. oryzae*, dan atau *R. stolonifer*.

Aktivitas Antibakteri Metabolit *Rhizopus* sp. terhadap *Salmonella typhi*

Aktivitas antibakteri *Rhizopus* sp. terhadap *S. typhi* disebabkan oleh metabolit yang dihasilkan oleh *Rhizopus* sp. saat fermentasi biji kedelai menjadi tempe. Metabolit yang dihasilkan ini bersifat antibakteri. Aktivitas antibakteri tersebut ditandai dengan terbentuknya zona jernih pada media uji yang telah ditumbuhi *S. typhi* yang menunjukkan bahwa metabolit *Rhizopus* sp. mampu menghambat pertumbuhan *S. typhi*.

Kemampuan antibakteri metabolit *Rhizopus* sp yang diperoleh dalam penelitian ini sejalan dengan beberapa hasil penelitian dari peneliti lain. Hasil penelitian McCue *et al.* (2004) menunjukkan bahwa kapang *Rhizopus oligosporus* NRRL 2770 pada fermentasi kedelai menghasilkan senyawa fenolik. Kadar fenol tertinggi diperoleh setelah 6 hari fermentasi dan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Helicobacter pylori* penyebab infeksi dan kanker lambung. Penelitian Fadahunsi *et al.* (2013) yang melakukan fermentasi *R. oligosporus* NRRL 2770 pada medium *Potato Dextrose Broth* (PDB) menunjukkan bahwa setelah 8 hari, filtrat bebas sel dari *R. oligosporus* NRRL 2770 dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif.

Filtrat antibakteri tersebut bekerja optimum pada pH 4 dan suhu 37°C. Urutan aktivitas penghambatan metabolit *Rhizopus* terhadap patogen uji pada penelitian Fadahunsi *et al.* (2013) adalah *E. coli*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, dan *B. subtilis* dengan diameter zona 8 mm; *S. aureus*, *K. pneumoniae*, dan *C. diphtheriae* dengan diameter zona 7 mm, dan *Proteus mirabilis* dengan diameter zona 6,5 mm. Hasil penelitian Sukron *et al.* (2014) juga membuktikan bahwa senyawa yang bersifat antibakteri terdapat pada *R. oligosporus* Saito yang berpengaruh terhadap pertumbuhan *E. coli* dengan diameter zona hambat 5,68 mm. Filtrat tersebut menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* secara *in vitro*, sedangkan filtrat ekstrak tempe kedelai tidak menghambat pertumbuhan bakteri.

Filtrat atau supernatan yang dihasilkan oleh *Rhizopus* sp asal usar daun jati pada penelitian ini mempunyai aktivitas penghambatan terhadap *S. typhi* dengan diameter 7,14 mm. Nilai ini lebih rendah dari hasil penelitian McCue *et al.* (2004), tetapi lebih tinggi dari penelitian Sukron *et al.* (2014). Perbedaan hasil tersebut kemungkinan dikarenakan perbedaan jenis metabolit antibakteri yang dihasilkan oleh setiap spesies *Rhizopus*.

Pada penelitian ini metabolit antibakteri yang dihasilkan oleh *Rhizopus* sp. masih dalam bentuk kasar (*crude*) dan belum diidentifikasi. Metabolit yang dihasilkan kemungkinan termasuk golongan asam organik karena fermentasi karbohidrat dalam medium PDB oleh *Rhizopus* sp. akan menghasilkan asam organik.

Efek aktivitas antibakteri oleh asam organik didukung oleh kemampuan molekul asam organik melintasi membran sel. Molekul asam yang tidak terdisosiasi akan berdifusi melintasi membran sel menuju sitoplasma yang lebih basa sehingga mengganggu fungsi metabolisme bakteri (Šušćković *et al.*, 2010). Gangguan tersebut terwujud dalam bentuk terganggunya transpor nutrisi ke dalam sel yang menyebabkan metabolit internal keluar dari sel dan menyebabkan kerusakan sel pada bakteri (Parada *et al.*, 2007).

Dihasilkannya asam organik pada fermentasi substrat oleh *Rhizopus* sp. juga

ditunjukkan oleh hasil penelitian Oda *et al* (2002). Tiga puluh delapan strain *R. oryzae* yang digunakan pada fermentasi limbah kentang selama 6 hari menghasilkan asam laktat, asam fumarik, dan etanol. Kadar L (+) asam laktat tertinggi (10 mg/g) dihasilkan oleh *R. oryzae* IFO 4707. Hasil analisis juga menunjukkan *R. oryzae* mampu menghasilkan enzim yang menghidrolisis secara parsial dinding sel. Hasil penelitian Ito *et al.* (2020) juga mendapatkan asam linoleik dari *R. oligosporus* NBRC 30816 pada fermentasi tempe. Asam tersebut mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* 25175 penyebab karies gigi.

Beberapa penelitian telah mengidentifikasi metabolit selain asam organik yang dihasilkan dari fermentasi oleh *Rhizopus* spp. Hasil penelitian Sohail *et al.* (2014) menunjukkan bahwa ekstrak asetonitril dan n-heksana dari miselium *R. stolonifer* mempunyai potensi sebagai antifungi dan antibakteri. Bakteri patogen yang diuji adalah *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. aureus* (resisten metisilin), dan *S. aureus* (resisten vankomisin). Aktivitas penghambatan metabolit *R. stolonifer* terhadap patogen uji menunjukkan bahwa ekstrak dalam pelarut asetonitril lebih efektif dibandingkan pelarut n-heksana.

Kapang *Rhizopus oryzae* 15 yang ditumbuhkan pada *Potato Dextrose Broth* (PDB) selama 21 hari menghasilkan metil eugenol yang mempunyai aktivitas antibiotik, benzena dan asam lemak (Peeran *et al.*, 2018). Metabolit sekunder metil eugenol dari *R. oryzae* 6975 yang diperoleh dari fermentasi padat selama 21 hari bersifat antijamur, antibakteri dan feromon (Faisal & Prasad, 2016).

Ekstrak etil asetat dari *R. stolonifer* yang ditumbuhkan pada medium PDB selama 12 hari mempunyai kemampuan antibakteri terhadap *Erwinia carotovora* dan *Xanthomonas campestris* (Iqbal *et al.*, 2014). Kapang *Rhizopus oryzae* GY18 menghasilkan asam laktat dalam jumlah tinggi pada medium minimal dengan sumber karbon glukosa (Guo *et al.*, 2010).

Hasil fermentasi kedelai oleh *R. oligosporus* menghasilkan metabolit asam lemak bebas, monogliserida, dan etil asam

lemak ester. Di antara senyawa tersebut, asam linoleat dan asam α -linolenat menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *B. subtilis*. (Kusumah *et al.*, 2020) Asam lemak jenuh rantai sedang dan asam lemak bebas rantai panjang cenderung lebih aktif menghambat bakteri Gram positif daripada Gram negatif (Desbois & Smith, 2010). Target utama asam lemak sebagai antibakteri adalah membran sel. Mekanisme antibakteri melalui peningkatan permeabilitas membran dan lisis sel, gangguan rantai transpor elektron dan pelepasan fosforilasi oksidatif, serta penghambatan aktivitas enzimatik dan penyerapan nutrisi (Yoon *et al.*, 2018).

Hasil penelitian Liasi *et al.* (2009), mengkategorikan daya hambat senyawa antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri dalam media uji menjadi empat kategori yaitu lemah (<5 mm), sedang (6-9 mm), kuat (10-14 mm), dan sangat kuat (15-18 mm). Diameter zona hambat *Rhizopus* sp. asal usar daun jati lebih rendah dibandingkan kloramfenikol 30 μ g sebagai kontrol positif (Tabel 1). Berdasarkan kategori daya antibakteri, daya antibakteri *Rhizopus* sp. asal usar daun jati masuk dalam kategori sedang dan daya hambat kloramfenikol 30 μ g dikategorikan sangat kuat. Kloramfenikol (30 μ g) digunakan sebagai kontrol positif mampu menghambat *S. typhi* dengan diameter zona hambat 34 mm. Menurut CLSI (2019), interpretasi tanggapan *S. typhi* terhadap kloramfenikol berdasarkan diameter zona hambat dikelompokkan menjadi 3 yaitu *susceptible* atau sensitif (≥ 18 mm), *intermediate* (13-17 mm) dan *resistant* (≤ 12 mm).

Hasil uji antibakteri pada penelitian ini menunjukkan bahwa metabolit *Rhizopus* sp. asal usar daun jati mempunyai potensi sebagai antibakteri terhadap *S. typhi* dengan kategori penghambatan sedang. Karakterisasi dan identifikasi metabolit tersebut diperlukan untuk mengetahui jenis metabolit yang bersifat sebagai antibakteri pada *crude* hasil fermentasi menggunakan medium SDB.

Kesimpulan

Metabolit *Rhizopus* sp. asal usar daun jati mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi* dengan kategori daya hambat sedang.

Daftar Pustaka

- Ayún, Q., Suryani, S., & Kurnia, C. (2022). Identifikasi Kapang Pada Tempe Bungkus Daun Pisang Dan Plastik asal Pengrajin Tempe Jatiasih, Bekasi. *Bioed: Jurnal Pendidikan Biologi*, 10(2), 45-51. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.25157/jpb.v10i2.8685>
- Babu, P. D., Bhakyaraj, R., & Vidhyalakshmi, R. (2009). A Low Cost Nutritious Food Tempe. *World Journal of Dairy and Food Sciences*, 4(1), 22–27.
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. (2012). *Jawetz, Melnick, & Adelberg Mikrobiologi Kedokteran* (A. Adityaputri, C. Salim, F. Sandra, M. Iskandar, Nalurita, P. Ayuningtyas, R. Soeharsono, Rifky, & S. Debby (eds.); 25th ed.). Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- CLSI. (2019). *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (29th ed., Vol. 39, Issue 1). <http://www.emeraldinsight.com/doi/10.1108/08876049410065598>
- Codex Alimentarius. (2015). *Regional standard for Tempe (CODEX STAN 313R-2013)*.
- Desbois, A. P., & Smith, V. J. (2010). Antibacterial Free Fatty Acids: Activities, Mechanisms of Action and Biotechnological Potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1629–1642. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3>
- Dewi, R. S., & Aziz, S. (2011). Isolasi *Rhizopus oligosporus* Pada Beberapa Inokulum Tempe di Kabupaten Banyumas. *Molekul*, 6(2), 93–104.
- Fadahunsi, I. F., Ogunbanwo, S. T., & Ogundana, D. T. (2013). Heat Stability And Optimization Of In Vitro Antimicrobial Activity Of Metabolites Produced By *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 Against Some Pathogenic Bacteria. *Trakia Journal of Sciences*, 11(2), 110–117.
- Faisal, M. ., & Prasad, L. (2016). A Potential Source of Methyl-Eugenol From Secondary Metabolite of *Rhizopus oryzae* 6975. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 7(4), 187–192. <https://doi.org/10.21276/Ijabpt.2016.7.4.22>
- Guo, Y., Yan, Q., Jiang, Z., Teng, C., & Wang, X. (2010). Efficient production of lactic acid from sucrose and corn cob hydrolysate by a newly isolated *Rhizopus oryzae* GY18. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(11), 1137–1143. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0761-2>
- Iqbal, M., Amin, M., Iqbal, Z., Bibi, H., Iqbal, A., Din, Z., Suleman, M., & Shah, H. . (2014). Antimicrobial, cytotoxic and phytotoxic potency of ethyl acetate extract of *Rhizopus stolonifer* culture. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(1), 87–92. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i1.13>
- Ito, M., Ito, T., Aoki, H., Nishioka, K., Shiokawa, T., Tada, H., Takeuchi, Y., Takeyasu, N., Yamamoto, T., & Takashiba, S. (2020). Isolation and Identification of the Antimicrobial Substance included in Tempeh using *Rhizopus stolonifer* NBRC 30816 for fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 325, 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108645>
- Khikmah, N., & Haloho, A. S. (2021). Uji Antibakteri *Rhizopus* sp. Asal Inokulum Tempe terhadap *Vibrio cholerae*. *Sciscitatio*, 2(2), 82–89. <https://doi.org/10.21460/sciscitatio.2021.22.72>
- Kiers, J. L., Meijer, J. C., Nout, M. J. R., Rombouts, F. M., Nabuurs, M. J. A., & Van Der Meulen, J. (2003). Effect of fermented soya beans on diarrhoea and feed efficiency in weaned piglets. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 545–552. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02011.x>
- Kusumah, D., Wakui, M., Murakami, M., Xie, X., Yukihito, K., & Maeda, I. (2020). Linoleic Acid, α -Linolenic Acid, and Monolinolenins as Antibacterial Substances in the Heat-Processed Soybean Fermented with *Rhizopus oligosporus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 84(6), 1285–1290. <https://doi.org/10.1080/09168451.2020.1731299>

- Liasi, S. A., Azmi, T. I., Hassan, M. D., Shuhaimi, M., Rosfarizan, M., & Ariff, A. B. (2009). Antimicrobial Activity and Antibiotic Sensitivity of Three Isolates of Lactic Acid Bacteria from Fermented Fish Product, Budu. *Malaysian Journal of Microbiology*, 5(1), 33–37. <https://doi.org/10.21161/mjm.15008>
- Maskar, D. (2013). *Ayo Makan Tempe, Bisa Jadi Obat Diare dan Mampu Cegah Kanker*. <https://finance.detik.com/berita-ekonomi-bisnis/d-2271201/ayomakan-tempe-bisa-jadi-obat-diare-dan-mampu-cegah-kanker>
- McCue, P., Lin, Y. T., Labbe, R. G., & Shetty, K. (2004). Sprouting and solid-state bioprocessing by *Rhizopus oligosporus* increase the In Vitro antibacterial activity of aqueous soybean extracts against *Helicobacter pylori*. *Food Biotechnology*, 18(2), 229–249. <https://doi.org/10.1081/FBT-200025669>
- Oda, Y., Saito, K., Yamauchi, H., & Mori, M. (2002). Lactic Acid Fermentation of Potato Pulp by the Fungus *Rhizopus oryzae*. *Current Microbiology*, 45, 1–4. <https://doi.org/10.1007/s00284-001-0048-y>
- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., & Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and Use as Biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(3), 521–542. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132007000300018>
- Peeran, M. ., Prasad, L., & Kamil, D. (2018). Characterization of Secondary Metabolites from *Rhizopus oryzae* and Its Effect on Plant Pathogens. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(03), 705–710. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.703.082>
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., & Frisvad, J. C. (2004). *Introduction To Food And AirBorne Fungi* (7th ed.). CBS.
- Sohail, Afzal, M., Iqbal, Z., Sheena, Khan, S. ., Rahman, U., Khan, W., Asghar, A., Ullah, M., & Numan, M. (2014). Antimicrobial activity of mycelial extracts of *Rhizopus stolonifer* against different fungal and bacterial pathogenic strains. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 4(7), 276–282. <https://doi.org/10.12692/ijb/4.7.276-282>
- Sukron, M. A., Suarsini, E., & Witjoro, A. (2014). *Pengaruh Ekstrak Tempe Kedelai (Glycine max (L) Merr.) dan Ekstrak Inokulum Kapang Tempe Terhadap Penghambat Esherichia coli Secara in Vitro*. Universitas Negeri Malang, Malang.
- Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Pavunc, A. L., Habjanič, K., & Matoč, S. (2010). Antimicrobial Activity - The most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 296–307.
- Wipradnyadewi, P. A. S., Rahayu, E. S., & Raharjo, S. (2005). Isolasi dan Identifikasi *Rhizopus Oligosporus* pada Beberapa Inokulum Tempe. *Jurnal Agrotekno*, 11(2), 1–9.
- Yoon, B. K., Jackman, J. A., Valle-González, E. R., & Cho, N. J. (2018). Antibacterial Free Fatty Acids and Monoglycerides: Biological Activities, Experimental Testing, and Therapeutic Applications. In *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 1-40. <https://doi.org/10.3390/ijms19041114>