

Isolasi, Identifikasi, dan Produksi Miselia *Rhizopus* sp. Berkadar Asam Nukleat Rendah untuk Pengembangan Mikoprotein

(Isolation, Identification, and Production of *Rhizopus* sp. Mycelium Containing Low Nucleic Acid for Mycoprotein Development)

Riza Firmansyah¹, Nampiah Sukarno^{1,2*}, Utut Widyastuti Suharsono^{1,2}, Sukarno³, Wendi Nurul Fadillah¹

(Diterima Desember 2022/Disetujui Januari 2024)

ABSTRAK

Cendawan, termasuk *Rhizopus* sp., merupakan bahan pangan yang mengandung asam nukleat tinggi sehingga kandungannya perlu diturunkan agar memenuhi standar kesehatan. Penelitian ini bertujuan mengisolasi, mengidentifikasi, dan memproduksi miselia *Rhizopus* sp. berkadar asam nukleat rendah yang berkualitas. Isolat *Rhizopus* spp. diperoleh dari 12 sampel tempe yang berasal dari berbagai daerah di Indonesia dan diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologi. Isolat diseleksi berdasarkan pertumbuhan miselia dan produksi spora pada media PDA. Miselia diproduksi secara massal pada media cair ekstrak kentang dengan konsentrasi 200 g/L dan ekstrak kedelai dengan konsentrasi 333,3 g/L serta tambahan 6 macam konsentrasi gula, yaitu 0, 2, 3, 4, 5, dan 6 g/L. Kadar asam nukleat diturunkan melalui pemanasan pada suhu 55°C dan 65°C selama 15 menit. Kandungan asam nukleat dianalisis dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm. Percobaan ini menghasilkan 58 isolat *Rhizopus* yang teridentifikasi ke dalam 3 spesies, yaitu *Rhizopus oryzae*, *R. stolonifer*, dan *R. microsporus*. *R. microsporus* menghasilkan pertumbuhan miselia tercepat, yaitu 4,3 cm dalam waktu 3 hari tetapi sporulasi terendah, yaitu kurang dari 1×10^6 spora/10 mL media dibandingkan dengan kedua spesies lainnya. Produksi miselia *R. microsporus* tertinggi, yaitu 0,95 g, diperoleh pada media ekstrak kedelai dengan tambahan gula 5 g/L. Kandungan asam nukleat miselia setelah dipanaskan pada suhu 50°C ialah 1,82% dan pada suhu 65°C ialah 1,73%. Nilai ini telah memenuhi standar maksimum USDA dalam hal kandungan asam nukleat pada bahan pangan yang aman untuk dikonsumsi.

Kata kunci: ekstrak kedelai, ekstrak kentang, *Rhizopus microsporus*, spora, suhu, tempe

ABSTRACT

Fungi, including *Rhizopus* sp., are food sources that commonly contain high nucleic acid levels. Therefore, the nucleic acid content must be reduced to achieve health standard requirements. This study aimed to isolate, identify, and produce *Rhizopus* sp. mycelium containing low nucleic acid. The *Rhizopus* spp. were isolated from tempeh collected from 12 different areas in Indonesia. Fungal identification was conducted based on morphological characteristics. The fungal isolates were selected based on mycelial growth and spore production on PDA. Biomass production of mycelium was carried out in potato extract and soybean extract media obtained from 200 g/L and 333.3 g/L, respectively. In each medium, 6 sugar levels were added, namely 0, 2, 3, 4, 5, and 6 g/L. Mycelium nucleic acid content reduction was achieved by heat treatment at 50°C and 60°C for 15 minutes and measured by a spectrophotometer at 260 nm. Fifty-eight isolates that were identified into 3 species were obtained in this experiment: *R. oryzae*, *R. stolonifera*, and *R. microsporus*. *R. Microsporus* had higher mycelium biomass and lower spore number than the other species. *R. Microsporus* produced a higher mycelium biomass in the soybean extract medium with 5 g/L additional sugar. The nucleic acid content of the 50°C heat-treated mycelium was 1.82% and 1.73% at 65°C. These values fulfilled the standard of mycelial nucleic acid content permitted in food by the USDA.

Keywords: potato extract, *Rhizopus microspores*, spore, soybean extract, tempeh

PENDAHULUAN

Cendawan telah diketahui sebagai salah satu sumber bahan pangan berprotein tinggi, tetapi sampai

¹ Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB University, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

² Pusat Bioteknologi (BioTect Center), IPB University, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

³ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB University, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

* Penulis Korespondensi: E-mail: nampiah@apps.ipb.ac.id

saat ini belum dimanfaatkan secara optimal di Indonesia sebagai sumber pangan yang berkualitas. Di luar negeri seperti Inggris, beberapa negara di Eropa dan Amerika Serikat, miselia cendawan *Fusarium venetatum* digunakan untuk bahan pangan mikoprotein yang disebut “Quorn”, yang tersedia secara komersial (Derbyshire 2022). Mikoprotein merupakan bahan pangan berprotein tinggi (Derbyshire & Delange 2021; Derbyshire 2022) dan kaya akan nutrisi serta berbagai metabolit yang bermanfaat bagi kesehatan (Yu *et al.* 2020, Berger *et al.* 2022, Othman *et al.* 2022).

Tempe dikenal sebagai makanan sehat dan dikonsumsi secara rutin sejak ratusan tahun yang lalu di Indonesia (Slamet & Tarwotjo 1980; Ahnan-Winarno 2021; Sjamsuridzal 2021). Makanan tradisional yang sehat ini dihasilkan dengan memfermentasikan kacang kedelai menggunakan cendawan *Rhizopus* spp. Hal ini menunjukkan bahwa cendawan tempe tersebut aman untuk dikonsumsi sehingga dapat digunakan sebagai sumber pangan berbasis mikoprotein. Selain itu, *Rhizopus* spp. juga dapat ditumbuhkan pada media semisintetik dengan pertumbuhan relatif cepat. Pertumbuhan miselia *Rhizopus* telah memenuhi cawan berdiameter 9 cm dalam 3 hari setelah inokulasi pada media MEA (*malt extract agar*) dan PDA (*potato dextrose agar*) (Zheng *et al.* 2007; Syamsuridzal *et al.* 2021). Oleh karena itu, miselia cendawan *Rhizopus* sp. dapat dikembangkan sebagai sumber pangan mikoprotein berprotein tinggi dan berkualitas untuk program pengembangan diversitas pangan dalam rangka menunjang peningkatan gizi masyarakat Indonesia.

Miselial cendawan merupakan bahan pangan berprotein tinggi, tetapi seperti halnya produk makanan yang berasal dari mikroorganisme, cendawan dapat mengandung asam nukleat yang tinggi. Konsumsi asam nukleat berlebih pada manusia, yaitu 400 mg/hari, dapat mengakibatkan akumulasi pada tubuh yang dapat menyebabkan penyakit gout pada persendian (Kaneko *et al.* 2014; Huang *et al.* 2017). Kandungan asam nukleat maksimum dalam produk pangan yang diperkenankan ialah 2% (Graham & Ladesma-Amaro 2023). Oleh karena itu, kandungan asam nukleat dari miselium cendawan *Rhizopus* sebagai bahan mikoprotein perlu diturunkan sampai pada tingkat aman untuk dikonsumsi. Penelitian ini bertujuan mengisolasi, mengidentifikasi, dan memproduksi miselia *Rhizopus* sp. yang berkualitas dan berkadar asam nukleat rendah, yaitu di bawah 2%.

METODE PENELITIAN

Isolasi Cendawan *Rhizopus* dari Tempe

Rhizopus spp. diisolasi dari tempe yang diperoleh dari 12 daerah di Indonesia, yaitu Aceh, Bondowoso, Situbondo, Malang, Cilegon, Yogyakarta, Jember, Bekasi, Bogor, Jakarta, Padang, dan Balikpapan. Cendawan *Rhizopus* sp. diisolasi dengan mengambil hifa sebanyak satu jarum inokulasi steril dari bagian dalam tempe yang selanjutnya ditumbuhkan pada media PDA segar yang telah diberi antibiotik kloramfenikol. Cawan kemudian diinkubasi selama 5 hari pada suhu 28°C (Helal *et al.* 2021). Setelah itu, isolat dipindahkan ke agar-agar miring dalam tabung dan diinkubasi selama 5 hari. Kultur selanjutnya dimurnikan melalui isolasi spora tunggal dengan cara memasukkan air steril sebanyak 10 mL ke dalam tabung yang berisi isolat *Rhizopus* sp. dan digoyang hingga membentuk suspensi spora. Selanjutnya,

suspensi spora diencerkan dengan akuades steril hingga mencapai konsentrasi 1×10^5 spora per mL. Sebanyak 1 μ L larutan spora disebar pada permukaan media *gellan gum*. Spora diamati menggunakan mikroskop stereo; setiap spora tunggal yang letaknya terpisah diisolasi dan ditumbuhkan pada media PDA segar (Hartanti *et al.* 2018). Kultur murni kemudian diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologi cendawan, yaitu sporangiofor, sporangium, dan sporangiospora atau spora menggunakan kunci identifikasi *Rhizopus* (Rifai 1973; Chipper & Stalpers 1984).

Pemilihan Isolat Potensial

Isolat-isolat murni yang telah diidentifikasi selanjutnya dipilih berdasarkan pada karakter pertumbuhan miselia dan produksi spora (Sjamsuridzal *et al.* 2021). Isolat potensial diseleksi dengan cara memilih isolat yang memiliki pertumbuhan miselia yang cepat dan produktivitas spora rendah. Setiap isolat ditumbuhkan pada cawan petri yang berisi media PDA pada suhu 28°C selama 5 hari secara terpisah. Pertumbuhan miselia dalam bentuk diameter koloni diukur setiap hari hingga kultur berumur 5 hari.

Produksi spora diamati dengan cara menumbuhkan setiap isolat secara terpisah pada 5 mL PDA dalam tabung reaksi berdiameter 1,5 cm dan diinkubasi selama 5 hari pada suhu 28°C. Pada hari ke-5, spora dipanen dengan cara memasukkan 20 mL akuades steril ke dalam tabung kultur, kemudian kultur diaduk menggunakan batang pengaduk steril agar suspensi spora homogen. Suspensi spora selanjutnya diencerkan hingga mencapai konsentrasi 1×10^5 spora per mL. Sebanyak 0,1 mL larutan spora yang telah diencerkan dimasukkan ke dalam hemasitometer untuk penghitungan jumlah spora yang dihasilkan menggunakan mikroskop stereo pada perbesaran 40 \times (Hartanti *et al.* 2018). Percobaan diulang sebanyak 3 kali. Isolat yang menghasilkan pertumbuhan miselia tercepat tetapi menghasilkan spora dalam terendah digunakan untuk pengujian selanjutnya, yaitu optimisasi media tumbuh dan penurunan kandungan asam nukleat.

Optimisasi Media Tumbuh

Inokulum *Rhizopus* yang digunakan untuk optimisasi media tumbuh ialah spora. Spora diperoleh dengan menumbuhkan isolat terpilih dalam 100 mL media PDB pada Erlenmeyer berukuran 250 mL selama 5 hari pada suhu 28°C. Selanjutnya, 30 mL air steril ditambahkan pada kultur dan dihomogenkan hingga spora tersuspensi dalam air steril. Suspensi spora yang diperoleh digunakan sebagai sumber inokulum.

Terdapat 2 perlakuan dalam optimisasi media tumbuh, yaitu jenis media tumbuh dan konsentrasi gula (Ito & Reshi 2014). Media tumbuh yang diuji ialah media cair ekstrak kentang dan media cair ekstrak kedelai, dan gula yang digunakan terdiri atas 6 konsentrasi, yaitu 0, 2, 3, 4, 5, dan 6 g/L. Konsentrasi gula pada medium dapat memengaruhi laju

pertumbuhan cendawan sehingga konsentrasi sumber gula yang tepat untuk mengoptimalkan pertumbuhan miselia perlu ditentukan (Hamad *et al.* 2014).

• **Medium ekstrak kentang**

Sebanyak 200 g kentang yang telah dikupas dan dipotong dadu, direbus dalam 1 L akuades selama 20 menit. Setelah itu, air rebusan disaring, lalu ditambahkan antibiotik kloramfenikol sebanyak 30 mg/L dan gula sesuai dengan perlakuan (Hamad *et al.* 2014). Media selanjutnya ditambah dengan akuades steril sampai volume larutan mencapai 1 L. Sebanyak 300 mL ekstrak kentang selanjutnya dituang ke dalam Erlenmeyer 1 L. Media selanjutnya disterilkan dengan otoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

• **Medium ekstrak kedelai**

Sebanyak 1 kg kedelai direbus dalam air 3 L selama 15 menit kemudian dibiarkan selama 24 jam. Air rendaman kedelai disaring dan ditambah larutan *anti-bubble* 0,2 mL/L dan antibiotik kloramfenikol 30 mg/L. Setelah itu, gula ditambahkan ke dalam ekstrak kedelai sesuai dengan konsentrasi setiap perlakuan, dan akuades hingga volumenya mencapai 3 L. Sebanyak 300 mL ekstrak kedelai dari setiap perlakuan gula dituang ke dalam Erlenmeyer 1 L. Media ini disterilkan dengan otoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Media steril kemudian diinokulasi dengan suspensi spora dari isolat terpilih pada kondisi aseptik dan diinkubasi selama 5 hari dengan inkubator bergoyang pada suhu 28°C (Syafitri 2016).

Perlakuan Penurunan Asam Nukleat

Asam nukleat diturunkan dengan memanaskan massa miselia selama 15 menit pada suhu 50°C dan 65°C dalam penangas air. Sebelum dipanaskan, miselia yang diproduksi pada media cair dibagi menjadi 2 bagian, sebagian untuk penentuan bobot kering miselia dan sebagian digunakan untuk perlakuan penurunan asam nukleat melalui pemanasan. Selanjutnya, kandungan asam nukleat dianalisis.

Miselia tanpa perlakuan pemanasan digunakan sebagai kontrol.

Kandungan asam nukleat diukur hanya pada spesies cendawan *R. microsporus*. Hal ini karena spesies tersebut memiliki pertumbuhan miselia cepat dengan sporulasi lambat. Kandungan asam nukleat dianalisis sebagai berikut: 1,5 g miselia *R. microsporus* dicuci dengan akuades steril dingin sebanyak 2 kali, kemudian dihaluskan. Selanjutnya ditambahkan 5 mL larutan PCA (*perchloric acid*, asam perklorat) 0,5 N dingin dan larutan disentrifus selama 15 menit pada suhu 4°C pada 3000 rpm. Residu yang dihasilkan dilarutkan dalam 5 mL PCA 0,5 N dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit. Setelah dingin, larutan disentrifus selama 15 menit pada 3000 rpm. Supernatan yang dihasilkan dianalisis menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm (Sambrook & Russel 2000).

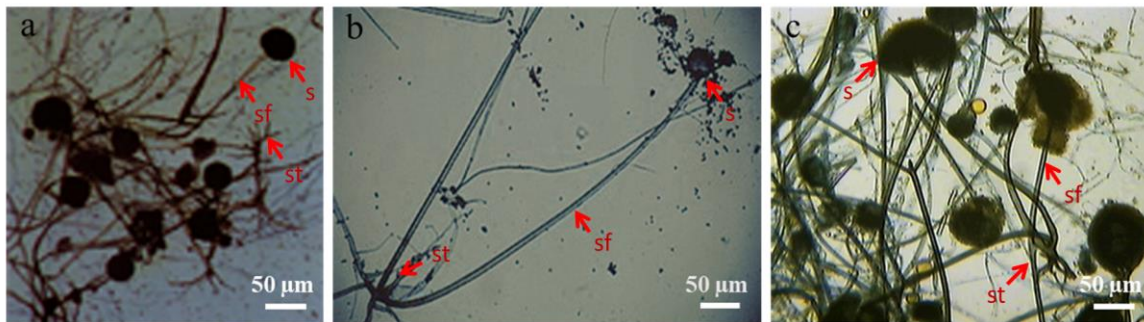
HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat Cendawan *Rhizopus* dari Tempe

Rhizopus ialah cendawan yang termasuk dalam ordo Mucorales (Kirk *et al.* 2008). Di Indonesia, cendawan ini banyak ditemukan di alam karena hidupnya sebagai saprofit dan beberapa anggota spesiesnya digunakan dalam pembuatan tempe (Sjamsuridzal *et al.* 2021). Penelitian ini menghasilkan 58 isolat *Rhizopus* yang diisolasi dari 12 sampel tempe yang berasal dari 12 daerah di Indonesia (Tabel 1). Berdasarkan ciri morfologi sporangiofor, sporangium, sporangiospora atau spora, dan rizoid, 58 isolat yang diperoleh teridentifikasi ke dalam tiga spesies, yaitu *Rhizopus oryzae*, *R. stolonifer*, dan *R. microsporus* (Gambar 1 dan Tabel 2). Sebelumnya, *R. microsporus* diberi nama *R. oligosporus* (Ahnann-Winarno *et al.* 2021, Sjamsuridzal *et al.* 2021). Chipper dan Stalpers (1984) merevisi *R. oligosporus* menjadi *R. microsporus* var *oligosporus*. *R. microsporus* merupakan spesies yang paling dominan ditemukan pada 12 sampel tempe. *R. stolonifer* hanya ditemukan pada 10 sampel tempe, kecuali pada sampel yang berasal dari Aceh dan Yogyakarta. Adapun *R. oryzae*

Tabel 1 Jumlah solat dan identitas isolat *Rhizopus* dari sampel tempe asal 12 lokasi di Indonesia

Lokasi	Jumlah isolat	Hasil identifikasi
Aceh	4	<i>R. microspores</i>
Padang	6	<i>R. microsporus</i> , <i>R. stolonifer</i>
Cilegon	5	<i>R. microsporus</i> , <i>R. stolonifer</i> , <i>R. oryzae</i>
Jakarta	7	<i>R. microsporus</i> , <i>R. stolonifer</i> , <i>R. oryzae</i>
Bekasi	4	<i>R. microsporus</i> , <i>R. stolonifer</i>
Bogor	5	<i>R. microsporus</i> , <i>R. stolonifer</i>
Yogyakarta	5	<i>R. microsporus</i> , <i>R. oryzae</i>
Malang	5	<i>R. microsporus</i> , <i>R. stolonifer</i>
Jember	4	<i>R. microsporus</i> , <i>R. oryzae</i>
Bondowoso	5	<i>R. microsporus</i> , <i>R. stolonifer</i>
Situbondo	4	<i>R. microsporus</i> , <i>R. stolonifer</i>
Balikpapan	4	<i>R. microsporus</i> , <i>R. stolonifer</i>
Total isolat	58	



Gambar 1 Struktur mikroskopis *Rhizopus* dengan perbesaran 400×. a) *R. oryzae*, b) *R. stolonifer*, dan c) *R. Microsporus*. s = Sporangium, sf = Sporangiofor, dan st = Stolon.

Tabel 2 Ciri morfologi isolat *Rhizopus* dari sampel tempe yang berasal dari 12 lokasi di Indonesia

Spesies	Sporangiofor		Sporangium	Sporangiospora (spora)	
	Ciri	Ukuran (mm)		Bentuk dan permukaan	Ukuran (µm)
<i>R. oryzae</i>	berizoid medium, kaku	2–4	selalu membentuk sporangiospora atau spora	elips sampai hampir bulat halus, berlikur	8–9
<i>R. stolonifer</i>	berizoid kompleks, berkembang baik, bercabang-cabang, kaku	2–4	selalu membentuk sporangiospora atau spora	bulat telur sampai hampir bulat, halus, berlikur, bersudut	16–20
<i>R. microsporus</i>	berizoid sederhana, bercabang, sering pendek	2–4	selalu membentuk sporangiospora atau spora	bulat telur sampai hampir bulat, halus, berlikur, warna keabu-abuan	12–15

hanya ditemukan pada sampel yang berasal dari Cilegon, Jakarta, dan Yogyakarta. Ciri setiap isolat *Rhizopus* dapat dilihat pada Gambar 1, Gambar 2, dan Tabel 2. Hasil ini sesuai dengan temuan Sjamsuridzal *et al.* (2021) dan Hartanti *et al.* (2018), tetapi berbeda dengan yang dilaporkan oleh Nout & Kiers (2005). Nout & Kiers (2005) mendapatkan 7 spesies *Rhizopus* dari tempe, yaitu *R. microsporus*, *R. oligosporus*, *R. rhizopodiformis*, *R. arrhizus*, *R. Nigricans*, dan *R. oryzae*.

Rendahnya jumlah spesies *Rhizopus* pada sampel diduga karena produksi tempe cenderung menggunakan ragi yang sama yang tersedia secara komersial di pasaran. Ragi tempe komersial tersebut dilaporkan menggunakan spesies tunggal *Rhizopus*, yaitu *R. microsporus* sehingga spesies ini mendominasi populasi tempe yang diproduksi (Sjamsuridzal *et al.* 2021).

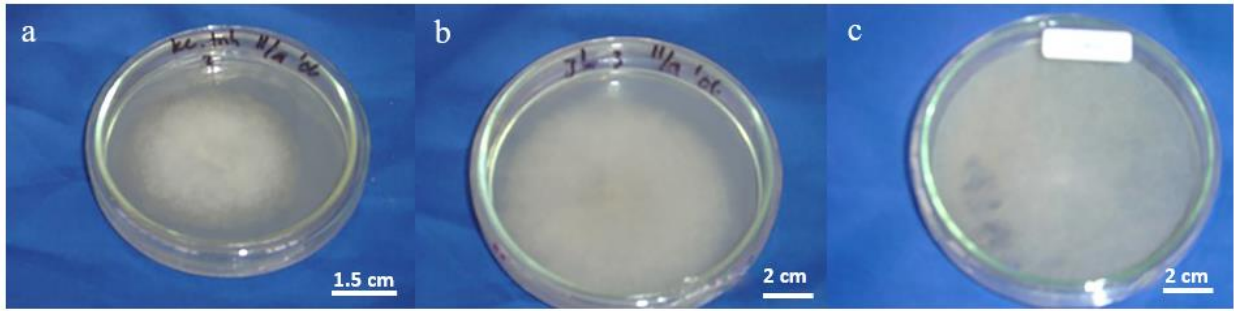
Isolat Potensial Terpilih

Kuantitas dan kualitas miselia merupakan faktor utama dalam memilih spesies cendawan sebagai sumber mikoprotein. Tiga spesies isolat *Rhizopus* diseleksi kemampuannya dalam memproduksi miselia dan spora. Spesies yang menghasilkan jumlah miselia tertinggi dan spora terendah selanjutnya dipilih untuk produksi massal miselia karena produk akhir yang dihasilkan selain memiliki biomassa yang tinggi juga tidak berwarna hitam akibat warna kumpulan spora.

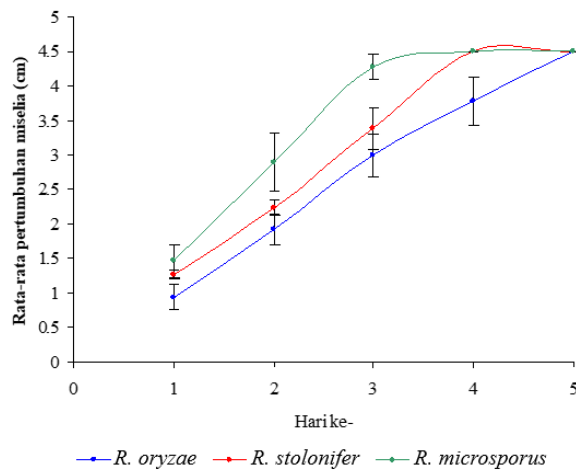
Kemampuan pertumbuhan miselia dan produksi spora 3 isolat *Rhizopus* ditapis pada media tumbuh PDA yang merupakan media tumbuh yang umum dan sesuai untuk pertumbuhan *Rhizopus* (Ahnan-Winarno *et al.* 2021; Sjamsuridzal *et al.* 2021).

Pertumbuhan miselia dan spora 3 spesies *Rhizopus* pada media PDA beragam. *R. microsporus* memperlihatkan pertumbuhan tertinggi, yaitu 4,3 cm setelah hari ketiga dibandingkan dengan *R. oryzae* dan *R. stolonifer*. Adapun *R. stolonifer* dan *R. oryzae* memiliki pertumbuhan miselia terendah (Gambar 3). Pola pertumbuhan spora, yang ditunjukkan dengan jumlah spora dari tiga spesies, berbeda dengan pola pertumbuhan miselia. *R. oryzae* menghasilkan spora lebih banyak dibandingkan dengan *R. microsporus* dan *R. stolonifer* (Gambar 4).

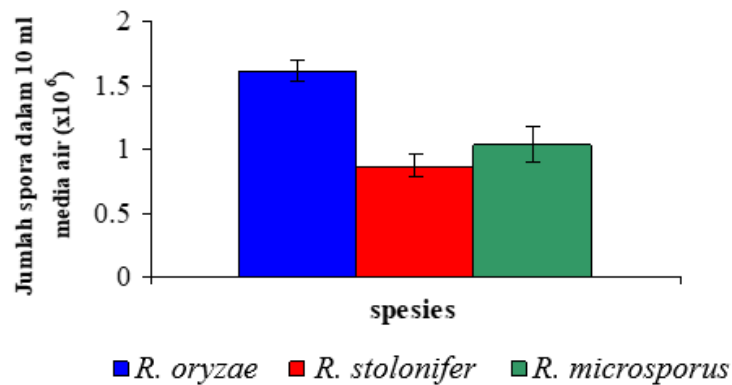
Hasil percobaan menunjukkan bahwa *R. microsporus* memiliki pertumbuhan miselia lebih cepat tetapi produksi spora lebih rendah daripada *R. stolonifer* dan *R. oryzae*. Dengan demikian, *R. microsporus* dipilih untuk produksi miselia dalam rangka pengembangan pangan berbasis cendawan. Ciri unik *R. microsporus* lainnya ialah mempunyai aktivitas lipolitik yang tinggi (Helal *et al.* 2021). Spesies *Rhizopus* lain, yaitu *R. stolonifer*, menghasilkan jumlah spora yang sama dengan *R. microsporus*, tetapi pertumbuhan miseliana lebih lambat daripada *R. microsporus* serta menghasilkan miselia berwarna hitam yang merupakan salah satu pigmen yang



Gambar 2 Pertumbuhan isolat pada media PDA pada hari ke-4 setelah inokulasi. a) *Rhizopus oryzae*, b) *R. stolonifer*, dan c) *R. microsporus*.



Gambar 3 Rata-rata pertumbuhan miselia *Rhizopus oryzae*, *R. stolonifer*, dan *R. microsporus*.



Gambar 4 Rata-rata jumlah spora *Rhizopus oryzae*, *R. stolonifer*, dan *R. Microspores* yang ditumbuhkan dalam media PDA pada suhu 28°C selama 5 hari.

dihasilkan oleh cendawan. Oleh karena itu, *R. stolonifer* tidak dapat digunakan untuk produksi massal miselia sebagai bahan mikoprotein. Cendawan *R. stolonifer* biasa disebut sebagai cendawan hitam roti, karena menghasilkan massa spora berwarna hitam dan sering tumbuh pada roti. *R. oryzae* menunjukkan pertumbuhan miselia lebih lambat dan produksi sporanya tercepat dan dalam

jumlah banyak daripada kedua spesies lainnya. Kondisi ini menyebabkan *R. oryzae* dalam penelitian ini tidak digunakan untuk produksi massal miselia sebagai bahan mikoprotein. Pigmen atau warna pada spora dan struktur cendawan lainnya seperti miselia ialah senyawa kimia kompleks yang berfungsi sebagai perlindungan terhadap kondisi lingkungan yang berpotensi merusak struktur seluler spora atau

miselia. Salah satu pigmen cendawan ialah melanin yang berfungsi memproteksi cendawan dari paparan radiasi sinar ultraviolet (UV), lisis secara enzimatik, suhu tinggi, logam toksik, dan resisten terhadap fungisida. Melanin sering menghasilkan warna cokelat atau hitam (de Malo 2017).

Media Tumbuh Optimum

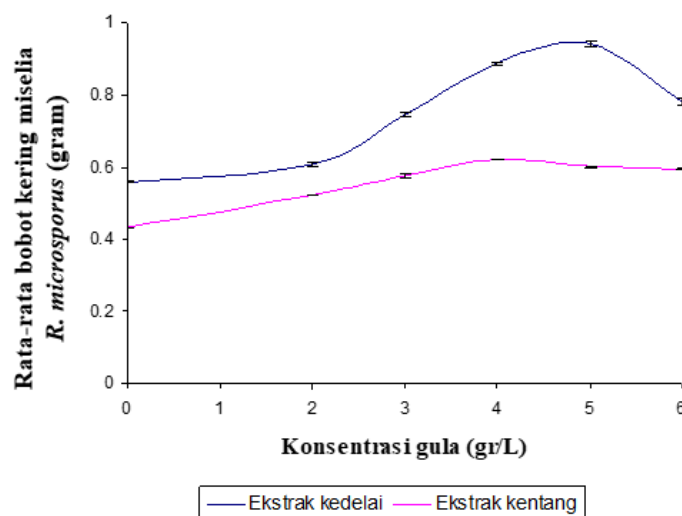
Produksi miselia *Rhizopus* sangat dipengaruhi oleh kandungan nutrisi seperti nitrogen dan unsur karbon pada media tumbuhnya. Ketersediaan dan harga media tumbuh akan menentukan biaya produksi dan harga produk mikoprotein. Oleh karena itu, pemilihan media tumbuh yang murah dan berkualitas sangat penting. Media cair yang digunakan dalam penelitian ini ialah ekstrak kedelai dan ekstrak kentang dengan tambahan berbagai konsentrasi gula (Ito & Reshi 2014, Adnan *et al.* 2018). Hasil percobaan menunjukkan bahwa pertumbuhan miselia pada media ekstrak kedelai lebih baik dibandingkan dengan media ekstrak kentang. Pertumbuhan miselia *R. microsporus* pada media ekstrak kedelai meningkat dengan bertambahnya gula sampai 5 g/L (Gambar 5), tetapi tambahan gula lebih lanjut dapat menurunkan produksi miselia. Pertumbuhan miselia pada media tumbuh ekstrak kentang meningkat dengan bertambahnya gula. Namun, peningkatan biomassa miselia tertinggi pada media tumbuh ekstrak kentang terjadi pada tambahan gula 4 g/L.

Bobot kering miselia *R. microsporus* yang tumbuh pada media ekstrak kedelai menunjukkan hasil 2× lipat lebih tinggi dibandingkan dengan bobot kering miselia *R. microsporus* yang tumbuh pada media ekstrak kentang. Hal ini diduga karena kandungan asam amino total pada kedelai lebih tinggi dibandingkan pada kentang. Kedelai mengandung

asam amino total 5,9 g/100 g, sedangkan kentang hanya 4,12 g/100 g. Kedelai juga mengandung protein dapat-dicerna lebih tinggi daripada kentang, protein kedelai yang dapat dicerna adalah sekitar 94%, sedangkan pada kentang hanya 40% (USDA 1998). Kedelai sebagai substrat pertumbuhan *Rhizopus* dalam pembuatan tempe merupakan salah satu hasil pertanian yang sangat penting sebagai bahan pangan dan pakan karena jumlah dan mutu protein yang dikandungnya sangat tinggi. Kedelai mengandung protein sekitar 40% dan susunan asam amino esensial yang lengkap sehingga ekstrak kedelai merupakan media tumbuh yang baik untuk memproduksi miselia *R. microsporus* (Ahn-an-Winarno *et al.* 2021).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak kedelai sebagai media tumbuh dapat meningkatkan biomassa miselia dibandingkan dengan ekstrak kentang. Oleh karena itu produksi miselia dapat menggunakan hasil samping dari produksi tempe berupa limbah cair rebusan kedelai sehingga produksi mikoprotein berbasis miselia bersifat ramah lingkungan dan berkontribusi dalam penyelesaian masalah lingkungan akibat cemaran limbah (Jach *et al.* 2022).

Cendawan, termasuk juga *Rhizopus*, memerlukan sumber karbon untuk pertumbuhannya, salah satunya ialah gula. Menambahkan gula sampai konsentrasi 4 g/L pada ekstrak kentang dapat meningkatkan biomassa miselia, tetapi tambahan gula lebih lanjut sampai konsentrasi 5 g/L dan 6 g/L justru menurunkan biomassa miselia (Ito & Reshi 2014, Hamad *et al.* 2014). Salah satu sumber gula yang sering digunakan dalam kultivasi cendawan ialah sukrosa. Sukrosa termasuk ke dalam golongan oligosakarida yang terdiri atas rantai pendek unit monosakarida yang saling berikatan kovalen sehingga dapat dengan



Gambar 5 Rata-rata bobot kering *Rhizopus microsporus* pada media ekstrak kentang dan ekstrak kedelai pada suhu 28°C dan umur 5 hari setelah inokulasi

mudah dipecah oleh cendawan menjadi monosakarida (glukosa) yang mudah diserap dan digunakan dalam proses metabolismenya (Adnan *et al.* 2018). Sukrosa teknis dapat digunakan untuk pertumbuhan cendawan sehingga penggunaan sukrosa teknis ini dapat menekan biaya produksi miselia yang akhirnya dapat menekan harga jual produk dan diharapkan dapat bersaing dari segi kualitas dan harga.

Penurunan Asam Nukleat

Kandungan asam nukleat pada sel mikro-organisme yang mempunyai kecepatan pertumbuhan tinggi cenderung tinggi, Namun, makanan yang mengandung asam nukleat terlalu tinggi dapat menyebabkan kandungan asam urat dalam darah meningkat. Hal ini berpotensi terakumulasinya asam urat pada sendi dan jaringan, dan membentuk kristal yang dapat menimbulkan penyakit gout (Koukoumaki *et al.* 2023). Cendawan pada umumnya mengandung asam nukleat cukup tinggi, yaitu sekitar 10% dari bobot keringnya, sehingga harus diturunkan. Oleh karena itu pada penelitian ini asam nukleat pada biomassa miselia diturunkan melalui pemanasan.

Data eksperimen menunjukkan bahwa pemanasan miselia pada suhu 50°C menurunkan kandungan asam nukleat miselia *R. microsporus* menjadi 1,82%. Pemanasan lebih lanjut, yaitu pada suhu 65°C, menurunkan kandungan asam nukleat lebih rendah lagi, yaitu 1,73% (Tabel 3). Perlakuan pemanasan menurunkan kadar asam nukleat antara 4,5 sampai 4,7 kali lebih rendah daripada perlakuan kontrol (tanpa pemanasan). Kandungan asam nukleat miselia *R. microsporus* yang dicapai melalui pemanasan ialah 1,73–1,82% sedangkan batas amannya ialah 2% (Graham & Ladesma-Amaro 2023). Hal ini mengindikasikan bahwa pemanasan yang digunakan cukup efektif untuk menurunkan kandungan asam nukleat. Suhu dan lamanya pemanasan sangat memengaruhi kandungan asam nukleat. Pemanasan dapat merusak membran sel sehingga komponen-komponen di dalam sel larut dalam medium dan dapat menyebabkan enzim-enzim yang memproduksi asam nukleat terhidrolisis, Akibatnya, enzim-enzim tersebut terdenaturasi dan menyebabkan produksi asam nukleat menurun. Selain itu, pemanasan dapat juga menghidrolisis asam nukleat (Koukoumaki *et al.* 2023). Selain menurunkan kadar asam nukleat, pemanasan juga dapat menurunkan kadar protein miselia. Oleh karena itu, pemanasan pada suhu 50°C lebih dianjurkan karena diduga penurunan kadar protein miselia pada suhu ini lebih rendah daripada

perlakuan pada suhu 65°C. Berdasarkan pengamatan secara fisik pada miselia, pemanasan pada suhu 50°C dan 65°C tidak mengubah warna dan aroma miselia. Uji organoleptik pada miselia yang telah memiliki kadar asam nukleat rendah masih perlu diteliti lebih lanjut.

KESIMPULAN

Sebanyak 58 isolat *Rhizopus* yang terdiri atas 3 spesies, yaitu *R. oryzae*, *R. stolonifer* dan *R. microsporus* telah berhasil diisolasi. *R. microsporus* ialah isolat terbaik untuk produksi miselia yang mengandung asam nukleat rendah. Media terbaik untuk produksi miselia ialah ekstrak kedelai dengan konsentrasi 333,3 g/L dan dengan menambahkan gula 5 g/L. Penurunan kandungan asam nukleat miselia untuk memenuhi standar persyaratan bahan pangan tercapai dengan pemanasan pada suhu 50°C dan 65°C selama 15 menit dengan kandungan asam nukleat masing-masing 1,82% dan 1,73%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Wellyzar Sjamsuridzal dari Departemen Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Indonesia, atas penyediaan fasilitas pustaka *Rhizopus*.

DAFTAR PUSTAKA

Adnan M, Zheng W, Islam W, Arif M, Abubakar YS, Wang Z, Lu G. 2018. Carbon catabolite repression in filamentous fungi. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(48): 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms19010048>

Ahnan-Winarno AD, Cordeiro L, Winarno FG, Gibbons J, Xiao H. 2021. Tempeh: A semicentennial review on its health benefits, fermentation, safety, processing, sustainability, and affordability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 20: 1717–1767. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12710>

Berger RG, Bordewick S, Krahe NK, Ersoy F. 2022. Mycelium vs. fruiting bodies of edible fungi—a comparison of metabolites. *Microorganisms*. 10(7): 1379–1394. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071379>

Chipper MAA, Stalpers JA. 1984. A Revision of the Genus *Rhizopus*. 2. The *Rhizopus microsporus* group. *Studies in Mycology*. 25: 20–34.

Derbyshire E. 2022. Fungal-derived mycoprotein and health across the lifespan: a narrative review. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*. 8(7): 653–662. <https://doi.org/10.3390/jof8070653>

Tabel 3 Pengaruh suhu pemanasan pada kandungan asam nukleat *Rhizopus microsporus*

Suhu °C	Kandungan asam nukleat (% bobot kering)
Kontrol	8,18
50°C	1,82
65°C	1,73

- Derbyshire EJ, Delange J. 2021. Fungal protein-What is it and what is the health evidence? A systematic review focusing on mycoprotein. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 5: 581682. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.581682>
- de Malo DC. 2017. Fungal stains on paper: Melanins produced by fungi. [Disertasi]. Lisbon [PT]: Universidade Nova de Lisboa.
- Graham AE, Ledesma-Amaro R. 2023. The microbial food revolution. *Nature Communications*. 14: 2231–2240. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37891-1>
- Hamad HO, Alma MA, Ismael HM, Goceri A. 2014. The effect of some sugars on the growth of *Aspergillus niger*. *KSU Journal of Natural Sciences*. 17(4): 7–12. <https://doi.org/10.18016/ksujns.28479>
- Hartanti AT, Rahayu G, Hidayat I. 2015. *Rhizopus* species from fresh tempeh collected from several regions in Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences*. 22(3): 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2015.10.004>
- Helal SE, Abdelhady HM, Abou-Taleb KA, Hassan MG, Amer MM. 2021. Lipase from *Rhizopus oryzae* R1: in-depth Characterization, Immobilization, and Evaluation in Biodiesel Production. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 19(1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00094-y>
- Huang SJ, Juan HW, Tsai SY. 2017. Content of purine in mushroom fruiting bodies and mycelia. *International Journal of Food Engineering*. 3(2): 95–100. <https://doi.org/10.18178/ijfe.3.2.95-100>
- Ito ZA, Reshi ZA. 2014. Effect of different nitrogen and carbon sources and concentrations on the mycelial growth of ectomycorrhizal fungi under in-vitro conditions. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 29(7): 619–628. <https://doi.org/10.1080/02827581.2014.964756>
- Jach ME, Serefko A, Ziaja M, Kieliszek M. 2022. Yeast protein as an easily accessible food source. *Metabolites*. 12(63): 1–27. <https://doi.org/10.3390/metabo12010063>
- Kaneko K, Aoyagi Y, Fukuuchi T, Inazawa K, Yamaoka N. 2014. Total purine and purine base content of common foodstuffs for facilitating nutritional therapy for gout and hyperuricemia. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 37(5): 709–721. <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00967>
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stappers JA. 2008. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. Edisi ke-10. Wallingford [GD]: CAB International. <https://doi.org/10.1079/9780851998268.0000>
- Koukoumaki DI, Tsouko E, Papanikolaou S, Ioannou Z, Diamantopoulou P, Sarris D. 2023. Recent advances in the production of single-cell protein from renewable resources and applications. *Carbon Resources Conversion*. 7(2): 100195 <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2023.07.004>
- Nout MJR, Kiers JL. 2005. Tempe Fermentation, Innovation and Functionality: Update Into the Third Millennium. *Journal of Applied Microbiology*. 98: 789–805. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02471.x>
- Othman SI, Mekawey AAI, El-Metwally MM, Gabr SA, Alwaele MA, Al Fassam H, Abo-Eleneen R, Allam AA, Saber WIA. 2022. *Rhizopus oryzae* AM16; a new hyperactive L-asparaginase producer: Semi solid-state production and anticancer activity of the partially purified protein. *Biomedical Reports*. 16(3): 1–9. <https://doi.org/10.3892/br.2022.1498>
- Rifai MA. 1973. *Kunci Kerja Untuk Mendeterminasi Jenis-Jenis Rhizopus di Indonesia*. Bogor (ID): Herbarium Bogoriense.
- Sambrook J, Russel DW. 2000. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Edisi ke-3, Vol 3. New York [US]: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sjamsuridzal W, Khasanah M, Febriani R, Vebliza Y, Oetari A, Santoso I, Gandjar I. 2021. The effect of the use of commercial tempeh starter on the diversity of *Rhizopus* tempeh in Indonesia. *Scientific Reports*. 11(1): 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03308-6>
- Slamet DS, Tarwotjo IG. 1980. *Komposisi Zat Gizi Makanan Indonesia*. Jakarta (ID): Departemen Kesehatan RI.
- Syafitri W. 2016. Produksi miselium jamur tiram merah muda (*Pleurotus flabellatus*) dan karakterisasi sifat-sifat fisikokimianya. [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Taherzadeh MJ, Fox M, Hjorth H, Edebo L. 2003. Production of Mycellium Biomass and Ethanol From paper Pulp Sulfite Liquor by *Rhizopus oryzae*. *Journal Bioresource Technology*. 88: 167–77. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00010-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00010-5)
- Trinci APJ. 1992. Myco-protein: A twenty-year overnight success story. *Mycological Research*. 96 (1): 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80989-1](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80989-1)
- [USDA] United State Food and Drugs Administration. 1998. *Nutrient Data Base for Standard Reference*. USA [US]: Quorn Foods Inc.
- Yu Q, Guo M, Zhang B, Wu H, Zhang Y, Zhang L. 2020. Analysis of nutritional composition in 23 kinds of edible fungi. *Food Quality*. 2020(1): 1–9. <https://doi.org/10.1155/2020/8821315>