



## IDENTIFIKASI DAN PERAN MIKROBA PADA TEMPE BUSUK YANG DIGUNAKAN SEBAGAI BUMBU MASAKAN JAWA

Dhanang Puspita\*, Velistia Bunga Renata Putri

Teknologi Pangan, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Kristen Satya Wacana, Jl.Kartini No.11a, Salatiga-Jawa Tengah, 50711, Indonesia

### Info Artikel

*Sejarah Artikel:*

Disubmit : 9-12-2024

Direvisi : 17-12-2024

Disetujui : 18-12-2024

*Keywords:*

*Fermentation, microorganism, tempeh.*

### Abstrak

Tempe adalah makanan tradisional Indonesia yang memiliki sumber gizi nabati. Tempe diolah dengan proses fermentasi kedelai dengan menggunakan jamur *Rhizopus*. Tempe busuk, banyak digunakan sebagai bumbu masak atau sambal. Penelitian bertujuan mengidentifikasi mikroorganisme yang terlibat dalam fermentasi. Metoda penelitian yang digunakan adalah isolasi mikroba dan identifikasi mikroba secara mikroskopis dengan pengecatan gram. Terdapat beragam jenis mikroorganisme yang terdiri dari bakteri dan yeast. Kehadiran mikroorganisme dalam tempe busuk berkontribusi dalam proses biokonversi hingga menciptakan aroma khas pada tempe.

### Abstract

*Tempeh is a traditional Indonesian food that has a vegetable source of nutrition. Tempeh is processed using a soybean fermentation process using the Rhizopus fungus. Rotten tempeh (over fermented), widely used as a cooking spice or chili sauce. The research aims to identify the microorganisms involved in fermentation. The research method used was microbial isolation and microscopic identification of microbes using gram staining. There are various types of microorganisms consisting of bacteria and yeast. The presence of microorganisms in rotten tempeh contributes to the bioconversion process and creates the distinctive aroma of tempeh.*

\* Alamat Korespondensi:

E-mail: dhanang.puspita@uksw.edu

p-ISSN 2746-0207

e-ISSN 2807-7865

## 1. Pendahuluan

Indonesia dikenal dengan beragam kuliner yang melibatkan mikroorganisme, yang berupa bakteri, *yeast*/khamir, atau jamur. Pemanfaatan mikroorganisme dalam pengolahan pangan bertujuan untuk pengolahan, pengawetan, bahkan untuk menciptakan rasa atau tekstur tertentu. Selain itu, pangan fermentasi ini juga berkontribusi dalam peningkatan kualitas pangan, terutama dalam unsur gizinya. Tempe adalah salah satu kuliner asli Indonesia, dengan beragam metode pengolahan berikut juga dengan bahan bakunya. Tempe menjadi salah satu warisan kekayaan kuliner di Indonesia yang sampai saat ini masih eksis di masyarakat bahkan dunia. Hampir semua kacang-kacangan atau legum bisa diolah menjadi tempe (Tan et al., 2024).

Tempe merupakan pangan fermentasi yang diolah dari biji kacang-kacangan yang ditambahkan ragi atau jamur yang kemudian diperam hingga terbentuk miselia yang menyelubungi permukaan. Pangan fermentasi ini sangat familiar di masyarakat dan menjadi bahan baku aneka macam olahan kuliner. Tempe menjadi salah satu sumber protein nabati yang terjangkau oleh semua lapisan masyarakat, sehingga menjadi sumber gizi yang murah. Gizi pada tempe adalah peptida dan asam amino hasil perombakan protein pada kacang-kacangan oleh jamur dengan bantuan enzim protease (Nuraini et al., 2022).

Pengolahan tempe cukup sederhana, yakni hanya dengan cara merendam biji kacang-kacangan, lalu mengupas kulit bijinya yang kemudian dikukus. Usai pengukusan dilakukan penambahan ragi tempe, selanjutnya dibungkus dengan aneka jenis daun seperti; pisang, mendong/andong, jati, talas, bahkan ada yang menggunakan plastik. Pemeraman tempe dilakukan selama 3 – 4 hari, dan kemudian tempe siap diolah dengan cara di goreng, rebus, bacem, dan lain sebagainya. Olahan tempe sangat sederhana dan mudah. Di sisi lain, ada juga yang melakukan pemeraman tempe hingga melebihi waktu normalnya (*over fermented*) yang dikenal dengan tempe busuk (Rachmawati et al., 2019).

Tempe busuk digemari oleh beberapa kalangan masyarakat, terutama di Jawa Tengah. Di Kabupaten Boyolali terdapat kuliner sambel tumpang yang menggunakan tempe busuk sebagai bumbunya, begitu pula di Kota Salatiga dengan Tumpang Koyornya. Ada juga yang menggunakan tempe busuk sebagai sambal, yakni dengan cara dipanggang lalu ditumbuk bersama dengan cabai, garam, dan bawang putih. Tempe busuk memiliki aroma dan rasa yang unik menyerupai oncom. Aroma yang khas ini bisa memberikan persepsi yang enak (*umami*) dan rasa yang sedikit pahit dan getir juga memberikan sensasi yang unik. Aroma '*semangit*' (bahasa Jawa) pada tempe

busuk justru disukai dan digunakan sebagai penyedap rasa (Nuraini et al., 2022)

Tekstur tempe busuk yang lembek, lengket, dan berair merupakan proses lanjut dari fermentasi yang tidak lagi dilakukan hanya oleh jamur, tetapi juga mikroorganisme lain yang terlibat. Pengolahan tempe secara tradisional tidak menjamin higienitas produk, terlebih produk fermentasi. Dengan demikian perlu dilakukan analisa mikrobiologi untuk melihat keterlibatan mikroorganisme selama proses fermentasi berlangsung. Dengan menggunakan medium selektif akan memudahkan untuk menyaring mikroorganisme dan pengecatan gram akan membantu dalam mengidentifikasi jenis gram bakteri, dan morfologinya. Identifikasi mikroba ini sangat penting, karena bisa menjadi evaluasi proses produksi. Kehadiran mikroorganisme patogen bisa menjadi potensi gangguan keamanan pangan karena bisa menyebabkan infeksi dan keracunan. Sedangkan bakteri non patogen akan berkontribusi dalam penyediaan sumber probiotik yang bagus bagi saluran pencernaan. Dengan demikian, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi mikroorganisme yang terlibat pada proses fermentasi tempe busuk.

## 2. Metodologi Penelitian

Penelitian bersifat eksperimen laboratoris yang dilakukan di laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Kristen Satya Wacana pada bulan November 2024. Adapun tahap penelitiannya adalah preparasi medium, inokulasi sampel, dan diidentifikasi sampel. Hasil penelitian berupa gambar yang dideskripsikan secara kualitatif.

### 2.1. Preparasi Medium

Disiapkan 3 jenis medium Nutrien Agar (Merck), Potato Dextrose Agar (Merck), dan Eosine Methylene Blue Agar (Merck), yang kemudian ditimbang dengan timbangan analitik (Oxhaus) dan masing-masing dilarutkan dalam aquades dalam erlemeyer tertutup. Proses selanjutnya, masing-masing suspensi larutan disterilkan dengan autoclave (Hirayama) pada suhu 121°C dengan tekanan 2 ATM selama 15 menit. Suspensi yang sudah steril kemudian di tuangkan dalam cawan petri steril di dalam Laminar Air Flow enkass dan didiamkan hingga agar mengeras.

### 2.2. Inokulasi Sampel

Disiapkan sampel tempe busuk yang diperoleh dari pasar tradisional di Salatiga yang diperjual belikan sebagai bahan baku bumbu masak. Permukaan tempe dicuplik dengan menggunakan jarum ose, kemudian dilakukan pengolesan pada permukaan agar membentuk pola zigzag yang rapi dan tidak terputus. Medium agar yang sudah digores kemudian

dinkubasi di Inkubator (Membert) pada suhu 37°C selama 48 jam.

2.3. Identifikasi Mikroorganisme

Mikroorganisme yang sudah tumbuh ada medium agar dilakukan identifikasi dengan pengecatan gram. Koloni pada sampil dicuplik dengan jarum ose, proses ini dilakukan di dalam LAF Enkass secara aseptis. Cuplikan koloni digoreskan secara melingkar di permukaan gelas obyek lalu ditetaskan gram A (Merck) selama satu menit, setelah itu dibilas dengan aquades. Proses selanjutnya dalam pengeringan cuplikan dengan cara dilakukan di atas api bunsen, dan setelah kering ditetaskan gram B (Merck) dan dibiarkan selama 1 menit lalu cuci dengan aquades dan dikeringkan. Tahap berikutnya, cuplikan ditetesi alkohol 70% (Merck) selama 15 detik lalu dicuci dengan aquades dan setelah itu ditetaskan gram D (Merck) selama 30 detik lalu dicuci dan dikeringkan. Tahap akhir adalah ditutup dengan gelas penutup, ditambakan minyak imersi lalu diamati dengan menggunakan mikroskop (Olympus) pada perbesaran 1000x. Hasil identifikasi, jika bakteri berwarna biru adalah gram positif, dan gram negative jika berwarna merah, merah muda atau ungu.

3. Hasil dan Pembahasan

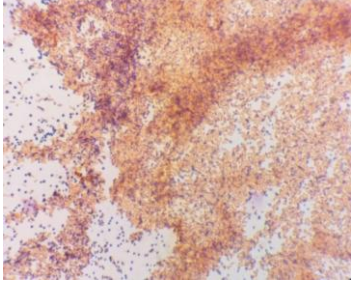
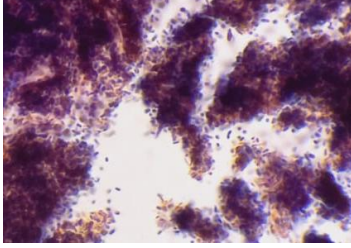
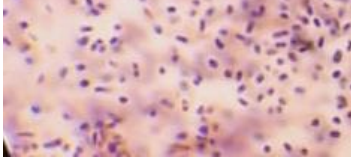
Tempe yang dibiarkan melewati batas waktu fermentasi normal (*over fermented*), dan biasanya adalah lebih dari 5 hari akan mengalami pembusukan. Tekstur tempe akan berubah menjadi lembek dan berair, akan muncul aroma yang menyimpang dari aroma normal, dan terjadi perubahan warna kecoklatan (gambar 1). Penanda ekologis lain adalah munculnya serangga dan biasanya yang datang adalah lalat buah (*Drosophila melanogaster*). Kondisi tempe yang demikian, dimanfaatkan oleh masyarakat di Jawa Tengah sebagai bumbu masak, dan ada juga yang digunakan sebagai sambal tempe busuk.



Gambar 1. Gambar tempe busuk (*over fermented*).

Dari hasil pengamatan pengecatan gram dari tiga medium yang berbeda ditunjukkan pada tabel 1. Ada 3 jenis medium yang digunakan yakni EMB Agar, NA, dan PDA. Tujuan penggunaan medium ini adalah untuk menyeleksi mikroorganisme. EMB agar digunakan untuk mendapatkan mikroba coliform, NA digunakan untuk melihat kekayaan mikroorganisme yang hadir, dan PDA untuk menseleksi hanya ragi atau jamur yang tumbuh.

Tabel 1. Morfologi bakteri pada tempe busuk

Gambar	Keterangan
	EMB Agar. Mayoritas adalah bakteri gram negatif (merah) dengan bentuk mono kokus, sedangkan yang gram positif (ungu) terkonfigurasi dalam streptococcus.
	NA Agar Mayoritas adalah bakteri gram positif yang berbentuk kokus dengan konfigurasi diplokokus dan streptococcus.
	PDA Agar Terlihat individu yeast, dan bakteri gram positif yang berbentuk diplococcus dan streptococcus.

Mikroba pada Tempe Busuk

Kandungan air pada tempe sebesar 64%, yang menyebabkan mudahnya mikroorganisme untuk tumbuh dan berkembang biak. Pada fase awal, jamur akan tumbuh mendominasi sehingga biji kedelai akan ditutupi miselia, dan apabila sudah memenuhi permukaan maka tempe dikatakan matang. Dalam fermentasi tempe, kehadiran mikroorganisme tidak hanya jamur saja, tetapi ada mikroorganisme lain baik bakteri ataupun yeast (Rachmawati et al., 2019).

Sebagai salah sumber gizi, tempe memiliki komposisi protein 18,3%, karbohidrat, 12% dan lemak 3%, sehingga menjadi media pertumbuhan mikroorganisme yang ideal. Adanya kandungan air sebesar 64% akan mendukung pertumbuhan mikroorganisme yang ditambahkan yakni ragi, juga kontaminasi alaminya. Dengan komposisi demikian dan kompleksitas mikroba yang ada di dalamnya akan dapat dengan mudah dilakukan biokonversi senyawa organik (Rachmawati et al., 2019). Tempe adalah produk rombakan dari makromolekul menjadi mikromolekul dimana terjadi perombakan karbohidrat, protein, lemak, dan serat oleh jamur *Rhizopus* dan konsorsium mikroba yang ada di dalamnya melalui proses enzimatis (Kim et al., 2024)

Kehadiran bakteri dapat dilihat pada tabel 1, yakni pada media NA dan EMB agar. Pada media NA terlihat ragam jenis bentuk mikroorganismem, ada yang

berbentuk kokus/bulat dan basil/batang dengan beragam konfigurasi. Pada media NA juga terlihat komposisi mikroorganisme dari karakter dinding selnya, yakni bakteri gram negatif dan bakteri gram positif. Bakteri gram positif terlihat menonjol dengan corak gelap yakni warna ungu dan biru. Bakteri ini memiliki dinding sel yang tipis karena tidak memiliki membran luar seperti bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif akan berwarna merah muda, karena lapisan membran luarnya menyerap pada pengecatan terakhir yakni gram D.

Pada media EMB Agar yang merupakan medium selektif, dimana bakteri patogen yang akan tumbuh dan berkembang di sini. Dari pengecatan gram terlihat warna merah muda yang merupakan penanda gram negatif dan kemungkinan adalah bakteri koliform jenis *Streptococcus*. Kehadiran mikroba tersebut dikarenakan pada kontaminasi alami dari pekerja atau dari bahan baku atau media fermentasinya, dapat juga dari sumber air, pembungkus, ruangan fermentasi/pemeraman (Fallo & Sine, 2022). Hadirnya bakteri tersebut, sangat jarang menyebabkan gangguan kesehatan pada manusia, sebab tempe diolah terlebih dahulu dengan pemanasan baik perebusan, pengukusan, atau penggorengan.

Beberapa jenis bakteri yang ada pada tempe antara lain; *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella infantis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc* spp. delbrueckii, dan *Alicyclobacillus* spp. SNI 3144-2009 tentang tempe menyatakan ada ambang batas bakteri Koliform yakni 10 koloni/gram sampel, artinya kehadiran mikroba tersebut masih ada toleransi (Ahn-an-Winarno et al., 2021).

Adanya konsorsium jamur, bakteri dan yeast juga akan mempengaruhi senyawa bioaktif dalam tempe terhadap hasil fermentasinya. Fermentasi yang hanya menggunakan jamur *Rhizopus*, berbeda hasil fermentasinya jika ada konsorsium mikroba lain. Kehadiran yeast pada fermentasi, secara signifikan meningkatkan  $\beta$ -glucan hingga 0,13% dimana zat ini sangat penting untuk system kekebalan tubuh/imunitas (Rizal et al., 2022)

Pada media dari PDA terlihat jelas kontaminasi dari yeast, dari morfologinya. Yeast ini juga berasal dari kontaminasi alami. Yeast akan mengkonversi gula/karbohidrat menjadi, gas CO<sub>2</sub>, asam organik dan alkohol, yang kehadirannya bisa mendatangkan lalat buah sebagai indikator bahwa tempe sudah membusuk. Aroma yang khas inilah yang menjadi alasan tempe busuk menjadi bumbu masakan atau sambal.

#### Rasa dan Aroma Tempe Busuk

Aroma yang muncul pada tempe antara lain; kacang (*nutty*), jamur (*mushroom*), ragi (*yeasty*), biji-bijian (*beany*), dan ammonia. Aroma kacang dan biji-bijian berasal dari materialnya yakni kedelai, sedangkan aroma jamur dari jamur *Rhizopus* dan aroma ragi berasal dari yeast yang ada dalam proses fermentasi. Untuk aroma ammonia berasal dari hasil biokonversi protein menjadi asam amino pada saat

proses fermentasi. Untuk rasa pada tempe, secara organoleptik antara lain; *nutty*, *mushroom*, *beany*, *cerealy*. Rasa sereal atau *Cerealy* muncul dari material yang tidak terfermentasi dan menjadi dominan pada kondisi fermentasi yang tidak sempurna atau tempe masih mentah.

Tempe busuk yang digunakan menjadi bumbu akan memberikan citarasa lezat (*umami*) pada makanan. Rasa lezat ini disebabkan karena adanya kandungan asam glutamat. Asam glutamat dalam industri, banyak digunakan menjadi penyedap masakan dalam bentuk MSG (*mono sodium glutamat*). Asam glutamat merupakan senyawa penting dalam metabolisme sel. Di dalam tempe, asam glutamat diperoleh dari perombakan protein menjadi asam amino dengan enzim proteolitik (Massa et al., 2024). Agar asam amino tersebut menjadi glutamate, maka protein harus dihidrolisis agar menjadi asam glutamate bebas. Hidrolisis ini menjadi bagian dari proses fermentasi yang bisa dilakukan oleh jamur dan atau bakteri, Adanya kandungan asam glutamat pada tempe busuk bisa berpotensi menggantikan MSG, sebab tidak ada kandungan sodiumnya (Witono et al., 2015), bagi yang menghedaki diet rendah garam.

Karakter unik lain dari tempe busuk adalah, semakin lama pemeraman akan meningkatkan kadar air berikut dengan kandungan glutamatnya. Selain itu, intensitas warna akan semakin cokelat, aroma ammonia semakin kuat, berikut dengan *umami*-nya (Prameswari et al., 2021). Dengan demikian, alasan tempe busuk dijadikan bumbu masakan adalah adanya kandungan asam glutamat berikut dengan umami yang bisa memberikan sensasi lezat pada masakan.

## 4. Kesimpulan

Tempe busuk mengandung beragam jenis mikroorganisme (jamur, bakteri, dan yeast). Masing-masing mikroba berperan dalam proses biokonversi selama proses fermentasi. Salah satu hasil biokonversi adalah peningkatan kandungan asam glutamate seiring lamanya fermentasi. Asam glutamate akan memberikan sensasi rasa lezat atau *umami* pada masakan. Dengan demikian, alasan tempe busuk dijadikan bumbu adalah adanya peningkatan asam glutamate sebagai MSG alami tanpa sodium, dan mikroorganisme berperan dalam sintesisnya selama proses fermentasi.

## 5. Ucapan Terima Kasih

Diucapkan untuk lembaga penyedia dana dengan surat kontrak penelitiannya. Selain itu dapat diucapkan kepada pihak-pihak yang membantu dalam kelancaran riset.

## 6. Daftar Pustaka

- Ahn-an-Winarno, A. D., Cordeiro, L., Winarno, F. G., 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(2), 1717–1767. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12710>.

- Ahnan-Winarno, A. D., Cordeiro, L., Winarno, F. G., 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(2), 1717–1767. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12710>.
- Fallo, G., & Sine, Y. (2022). Identification of lactic acid bacteria and quality parameter of Tempeh obtained from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) and cowpeas (*Vigna unguiculata*). *Biogenesis: Jurnal Ilmiah Biologi*, 10(1). <https://doi.org/10.24252/bio.v10i1.27349>
- Fallo, G., & Sine, Y. (2022). Identification of lactic acid bacteria and quality parameter of Tempeh obtained from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) and cowpeas (*Vigna unguiculata*). *Biogenesis: Jurnal Ilmiah Biologi*, 10(1). <https://doi.org/10.24252/bio.v10i1.27349>
- Kim, D. H., Chun, B. H., Lee, J. J., Kim, O. C., Hyun, J., Han, D. M., Jeon, C. O., Lee, S. H., Lee, S. H., Choi, Y. H., & Hong, S. B. (2024). Enzymatic Activity and Amino Acids Production of Predominant Fungi from Traditional Meju during Soybean Fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(3), 654–662. <https://doi.org/10.4014/jmb.2309.09008>
- Kim, D. H., Chun, B. H., Lee, J. J., Kim, O. C., Hyun, J., Han, D. M., Jeon, C. O., Lee, S. H., Lee, S. H., Choi, Y. H., & Hong, S. B. (2024). Enzymatic Activity and Amino Acids Production of Predominant Fungi from Traditional Meju during Soybean Fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(3), 654–662. <https://doi.org/10.4014/jmb.2309.09008>
- Massa, A., Baiget, M., Rothschild, L. J., Axpe, E., & Carrero-Carralero, C. (2024). New food ingredient via acid-tolerant *Rhizopus oligosporus* growth. *Applied Food Research*, 4(2). <https://doi.org/10.1016/j.afres.2024.100583>
- Massa, A., Baiget, M., Rothschild, L. J., Axpe, E., & Carrero-Carralero, C. (2024). New food ingredient via acid-tolerant *Rhizopus oligosporus* growth. *Applied Food Research*, 4(2). <https://doi.org/10.1016/j.afres.2024.100583>
- Nuraini, V., Puyanda, I. R., Kunciati, W. A. S., & Margareta, L. A. (2022). PERUBAHAN KIMIA DAN MIKROBIOLOGI TEMPE BUSUK SELAMA FERMENTASI. *JURNAL AGROTEKNOLOGI*, 15(02), 127. <https://doi.org/10.19184/j-agt.v15i02.25729>
- Prameswari, H. A., Nursiwi, A., Zaman, M. Z., Ishartani, D., & Sari, A. M. (2021). Changes in chemical and sensory characteristics of gunungkidul's lamtoro (*Leucaena Leucocephala*) tempeh during extended fermentation. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 828(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/828/1/012001>
- Prameswari, H. A., Nursiwi, A., Zaman, M. Z., Ishartani, D., & Sari, A. M. (2021). Changes in chemical and sensory characteristics of gunungkidul's lamtoro (*Leucaena Leucocephala*) tempeh during extended fermentation. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 828(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/828/1/012001>
- Rachmawati, M. H., Soetjipto, H., & I G N Kristijanto, dan A. (2019). PROFIL ASAM LEMAK MINYAK TEMPE BUSUK. *JOURNAL OF CHEMISTRY*, 13(1), 82–87.
- Rachmawati, M. H., Soetjipto, H., & I G N Kristijanto, dan A. (2019). PROFIL ASAM LEMAK MINYAK TEMPE BUSUK. *JOURNAL OF CHEMISTRY*, 13(1), 82–87.
- Rizal, S., Kustyawati, M. E., Suharyono, A. S., & Suyarto, V. A. (2022). Changes of nutritional composition of tempeh during fermentation with the addition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biodiversitas*, 23(3), 1553–1559. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d2303455>
- Rizal, S., Kustyawati, M. E., Suharyono, A. S., & Suyarto, V. A. (2022). Changes of nutritional composition of tempeh during fermentation with the addition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biodiversitas*, 23(3), 1553–1559. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d2303455>
- Tan, Z. J., Abu Bakar, M. F., Lim, S. Y., & Sutimin, H. (2024). Nutritional composition and sensory evaluation of tempeh from different combinations of beans. *Food Research*, 8(2), 138–146. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.8\(2\).088](https://doi.org/10.26656/fr.2017.8(2).088)
- Tan, Z. J., Abu Bakar, M. F., Lim, S. Y., & Sutimin, H. (2024). Nutritional composition and sensory evaluation of tempeh from different combinations of beans. *Food Research*, 8(2), 138–146. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.8\(2\).088](https://doi.org/10.26656/fr.2017.8(2).088)
- Witono, Y., Bambang Widjanarko, S., & Tri Rachmawati, D. (2015). Amino Acids Identification of Over Fermented Tempeh, The Hydrolysate and The Seasoning Product Hydrolysed by Calotropin from Crown Flower (*Calotropis gigantea*). 5(2).
- Witono, Y., Bambang Widjanarko, S., & Tri Rachmawati, D. (2015). Amino Acids Identification of Over Fermented Tempeh, The Hydrolysate and The Seasoning Product Hydrolysed by Calotropin from Crown Flower (*Calotropis gigantea*). 5(2).