

IV. METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan waktu penelitian

Tempat Penelitian: Laboratorium Bioteknologi
Universitas Diponegoro.

Waktu Penelitian : Mei - Juli 1995

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan:

- Spektrofotometer
- Autoklaf
- Tanur
- Buret
- Tabung reaksi
- Inkubator
- pH meter
- erlemeyer
- Cawan petri
- Mikroskop
- Hemositometer
- Cawan porselin
- Pipet

Bahan-bahan yang digunakan:

- Kedelai kuning

- Larutan garam 20%
- Tepung beras
- Tepung terigu
- Air pepton 0,1%
- Inokulum: *A. oryzae*

R. oligosporus

- Alkohol 95%
- Larutan KOH standar
- Phenol Phthalein
- Larutan 0,1 N NaOH
- Kalsium Oksida
- Asam Hidroklorat
- Reagen Molybdate
- Reagen Hydroquinone
- Reagen Natrium Sulfat
- Potato Dextrose Agar (PDA)

C. Cara Kerja

1. Pembuatan Inokulum

Spora-spora jamur dari jenis *A. oryzae* dan *R. oligosporus* diinokulasikan pada medium potato dextrose agar. Diinkubasikan pada suhu kamar selama 5 - 7 hari. Setelah jamur banyak menghasilkan spora, dapat digunakan sebagai starter. Pengambilan spora dapat dilakukan dengan menambahkan air pepton ke dalam tabung pembiakkan dan digojok agar spora yang ada bisa terlepas dari jamurnya.

2. Penghitungan jumlah spora

Penghitungan jumlah spora dilakukan dengan metode Breed. Hal ini dilakukan sebelum dan sesudah fermentasi koji berlangsung.

Suspensi spora dimasukan ke dalam lekukan gelas benda hemositometer dengan pipet dan dibiarkan sampai memenuhi ruang hitung. Diamati dengan mikroskop pada perbesaran 400 kali dan dihitung jumlah spora yang terdapat pada 80 kotak kecil yang terletak di dalam kotak tengah yang berukuran 1 mm^2 .

Cara penghitungannya adalah sebagai berikut: satu kotak kecil mempunyai sisi $0,05 \text{ mm}$, dengan kedalaman $0,1 \text{ mm}$. Jadi volume kotak kecil $0,00025 \text{ mm}^3$. Untuk volume 80 kotak adalah $80 \times 0,00025 = 0,02 \text{ mm}^3$. Sedang volume yang diinginkan adalah 1 mm^3 . Faktor koreksi volume adalah $1 : 0,02 = 50$. Bila jumlah spora pada 80 kotak = E dan faktor pengenceran adalah F, maka: jumlah spora per $\text{mm}^3 = E \times 50 \times F$ (Bibiana dan Hatowo, 1992).

3. Pembuatan Kecap

Pada prinsipnya proses pembuatan kecap ini terbagi dalam tiga perlakuan:

3.1. Fermentasi kedelai (koji).

Sebelum dilakukan fermentasi pada kedelai, terlebih dahulu dilakukan perendaman selama 10 - 12 jam. Selanjutnya kedelai direbus menggu-

nakan autokla selama 20 menit pada tekanan 10 psi. Kemudian kedelai ditiriskan. Setelah kedelai dingin, ditambahkan starter berupa spora jamur pada kedelai tersebut. Kedelai yang digunakan pada tiap-tiap perlakuan sebanyak 250 g, dengan jumlah spora sekitar $2 \cdot 10^7$. Selanjutnya ditambahkan tepung beras dan tepung terigu dengan perbandingan 1 : 1, sebanyak 50 g. Lama fermentasi koji adalah 0, 1, 2, 3, 4 dan 5 hari. Setelah fermentasi koji dianggap cukup, miselium serta spora yang ada dihilangkan. Untuk mempermudah penghilangan spora serta miselium yang ada, dilakukan dengan pengeringan. Pengeringan ini dilakukan dengan oven pada suhu 45°C - 50°C selama 15 menit.

3.2. Fermentasi di dalam larutan garam (moromi).

Setelah jamur yang ada dihilangkan, kedelai direndam dalam larutan garam 20%. Penambahan larutan garam 20% tersebut sebanyak 600ml pada tiap-tiap perlakuan. Lama proses moromi ini sekitar 1 bulan.

3.3. Perebusan dan penyaringan.

Setelah proses fermentasi moromi selesai, dilanjutkan dengan perebusan kedelai selama sekitar 7 menit. Perebusan ini berfungsi agar mikroba yang ada menjadi inaktif. Selanjutnya dilakukan penyaringan.

3.4 Kontrol.

Kedelai mendapat perlakuan seperti pada perlakuan yang lain, tetapi tidak difermentasikan.

4. Analisa Kadar Lesitin (Markley, 1961)

Sebelum sampel dianalisa, terlebih dahulu dibuat larutan fosfor standar maupun kurva konsentrasi yang nantinya akan digunakan dalam pengukuran. Dilarutkan 0,4389 g KH_2PO_4 (Kalium dihidrogen fosfat) dalam 1 L aquadest. Berarti tiap 1 ml larutan tersebut mengandung 0,1 mg fosfor. Selanjutnya dibuat larutan dengan kandungan fosfor: 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 dan 1,0 mg/100 ml.

Adapun prosedur analisa lesitin untuk kecap, sebagai berikut:

- 4.1. Ditimbang 50 g kecap, ditambahkan 0,5 g CaO dan diabukan. Kemudian dilarutkan dalam aquadest dan ditempatkan pada labu erlenmeyer 100 ml.
- 4.2. Larutan ditempatkan pada labu erlemeyer dan ditambah dengan 5 ml reagen molibdat, dibiarkan beberapa menit. Kemudian ditambah dengan 2 ml reagen hidroquinone dan 2 ml reagen Natrium sulfat. Selanjutnya larutan dijadikan 100 ml dan dikocok. Biarkan selama 1 jam.

4.3. Absorbansi dibaca pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 600mu. Banyaknya fosfor dikorelasikan dengan panjang gelombang tersebut kemudian dibaca dari kurva konsentrasi yang telah dibuat.

Berat lesitin = berat fosfor x 45,5.

5. Penentuan Asam Lemak Bebas (FFA). (Mehlenbacher, 1960)

5.1. Bahan harus diaduk merata dan berada dalam keadaan cair pada waktu diambil contohnya. Timbang sebanyak 28,2 g contoh dalam erlenmeyer.

Ditambahkan 50 ml alkohol netral yang panas dan 2 ml indikator PP.

5.2. Kemudian dilakukan titrasi dengan larutan 0,1 N NaOH yang telah distandardisir sampai warna merah jambu tercapai dan selama 30 detik warna tersebut tidak hilang.

5.3. Asam lemak bebas dinyatakan dengan % FFA.

$$\% \text{ FFA} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N NaOH} \times \text{BM Asam lemak}}{\text{berat contoh} \times 1000} \times 100$$

Asam lemak yang digunakan sebagai tolok ukur adalah jenis linoleat dengan harga BM sebesar 278.

5. Pengukuran Angka Asam

Angka asam adalah mg KOH yang dibutuhkan untuk menetralkan 1 g sampel. Untuk merubah % FFA menjadi angka asam, maka % FFA dikalikan dengan faktor berikut:

$$\frac{\text{BM KOH}}{\text{BM asam lemak} / 10}$$

6. Pengukuran pH

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter. Pengukuran dilakukan pada awal dan akhir fermentasi koji maupun fermentasi dalam larutan garam.

D. Analisa Data

Setelah data diperoleh, dilakukan analisis varian dari rancangan percobaan acak lengkap pola faktorial pada taraf uji 5% dan 1%. Percobaan ini terdiri dari 15 perlakuan dengan 3 kali ulangan. Kombinasi masing-masing perlakuan adalah sebagai berikut:

K A-0 = kecap dengan *A. oryzae*, fermentasi 0 hari.

K A-2 = Kecap dengan *A. oryzae*, fermentasi 2 hari.

K A-3 = Kecap dengan *A. oryzae*, fermentasi 3 hari.

K A-4 = Kecap dengan *A. oryzae*, fermentasi 4 hari.

K A-5 = Kecap dengan *A. oryzae*, fermentasi 5 hari.

- K R-0 = Kecap dengan *R. oligosporus*, fermentasi 0 hari.
- K R-2 = Kecap dengan *R. oligosporus*, fermentasi 2 hari.
- K R-3 = Kecap dengan *R. oligosporus*, fermentasi 3 hari.
- K R-4 = Kecap dengan *R. oligosporus*, fermentasi 4 hari.
- K R-5 = Kecap dengan *R. oligosporus*, fermentasi 5 hari.
- K AR-0= Kecap dengan *A. oryzae* dan *R. oligosporus*,
fermentasi 0 hari.
- K AR-2= Kecap dengan *A. oryzae* dan *R. oligosporus*,
fermentasi 2 hari.
- K AR-3= Kecap dengan *A. oryzae* dan *R. oligosporus*,
fermentasi 3 hari.
- K AR-4= Kecap dengan *A. oryzae* dan *R. oligosporus*,
fermentasi 4 hari.
- K AR-5= Kecap dengan *A. oryzae* dan *R. oligosporus*,
fermentasi 5 hari.

