

**BAB IV**  
**METODOLOGI PENELITIAN**

**A. Waktu dan Tempat Penelitian**

**1. Waktu Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret - Juni 1997

**2. Tempat Penelitian**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikro-bio-genetika Jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Diponegoro, Semarang.

**B. Bahan dan Alat Penelitian**

**1. Bahan Penelitian**

Kapang *A. oryzae*, *A. soyae* dan *A. wentii* (diperoleh dari Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, UGM), kacang tolo, beras, akuades, gula kelapa, tepung terigu, bumbu kecap (salam, laos, bawang, dsb), ammonium molybdat, ammonium sulfat kristal, K-Na tartrat, foline ciocalteu, medium PDA (Potato Dextrosa Agar),  $\text{NaCO}_3$  0,1 N,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,1 N,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,01 N,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat,  $\text{NaOH}$  0,1 N,  $\text{NaOH}$  0,01 N,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,2 M,  $\text{Na-COOH}$  0,2 M,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2%,  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2 M, indikator PP 1%.

**2. Alat Penelitian**

Jarum ose runcing, gelas ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, bunsen, panci, kompor, pH meter, erlenmeyer 100 ml, erlenmeyer 500 ml, timbangan Sartorius, termometer, oven, autoclave, pipet tetes, pipet ukur, corong kaca,

inkubator, kertas saring, pengaduk, kapas, sentrifugasi, pinset, hot plate, stirer, spektrofotometer Spektronik 20, buret, filter.

### **C. Cara Kerja**

#### **1. Pembuatan medium PDA (Potato Dextrosa Agar) (Dharmaputra, 1981)**

200 gram kentang dikupas, dipotong kecil-kecil, dimasukkan ke dalam 1000 ml akuades, dididihkan kira-kira 1 jam kemudian disaring dengan kapas, dikembalikan volumenya dengan akuades sampai 1000 ml, ditambahkan 15 gram agar dan 20 gram dextrosa, dipanaskan sampai larut, pH diatur sampai dengan 5. Disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### **2. Pembuatan inokulum (Anonim, 1991)**

200 gram beras yang sudah disterilkan dimasukkan masing-masing dalam erlenmeyer 100 ml, direndam dalam 200 ml akuades selama 15 menit. Kemudian dikeringkan. Setelah dingin diinokulasi konidia kapang *A.oryzae*, *A. soyae* dan *A. wentii*, yang masing-masing dengan kepadatan  $10^6$  konidia/ml, dibiarkan selama 5 hari pada suhu kamar. Beras yang tertutup miselium diaduk, dikeringkan di dalam oven pada suhu 40°C selama 24 jam. Setelah kering beras dihaluskan dengan blender dan selanjutnya diayak sehingga diperoleh ragi kecap

### **3. Pembuatan kecap (Anonim, 1991)**

#### **3.1. Perendaman**

Kacang tolo sebanyak 1500 gram yang telah dibersihkan, dicuci dan direndam dalam air selama 10 jam. Air perendaman diganti setiap 2 jam sekali.

#### **3.2. Pemasakan**

Kacang tolo yang direndam selanjutnya dimasak kemudian disterilkan dalam autoclave selama 15 menit pada tekanan 15 lbs dengan suhu 121°C.

#### **3.3. Penirisan dan pendinginan**

Setelah proses pemasakan selesai, selanjutnya kacang tolo ditiriskan dan didinginkan.

#### **3.4. Penambahan inokulum**

Selanjutnya inokulum (berisi tepung beras yang sudah diinokulasi dengan kapang *Aspergillus*) sebanyak 10% (b/b) dan tepung terigu sebanyak 5% (b/b) ditambahkan pada 20 gram kacang tolo. Campuran tersebut kemudian diaduk sampai merata dengan menggunakan pengaduk steril.

#### **3.5. Fermentasi I (proses koji)**

Campuran antara inokulum, tepung terigu dan kacang tolo dimasukkan dalam erlenmeyer 100 ml steril dan ditutup dengan kapas, kemudian disimpan selama 3 hari sampai seluruh permukaan kacang tolo ditumbuhi kapang. Setiap hari dilakukan pengadukan secara aseptis.

### 3.6. Fermentasi II (proses moromi)

Kacang tolo hasil fermentasi I selanjutnya direndam dalam larutan garam (NaCl) 18% (b/v) di dalam erlenmeyer steril 250 ml selama 0, 7, 14, 21, 28 dan 35 hari. Selama perendaman bahan diaduk secara aseptis (2 kali setiap hari).

### 3.7. Penyaringan

Setelah proses perendaman dalam larutan garam selesai, selanjutnya bahan disaring untuk memisahkan air rendaman (yang merupakan cairan kecap mentah) dengan ampasnya, setelah itu dilakukan pemasakan kembali selama 10 menit dengan tujuan untuk menghentikan aktivitas mikroorganisme. Dari sinilah dimulai analisis kimia yang meliputi kadar protein, gula reduksi, total asam, pH dan temperatur.

### 3.8. Penambahan bumbu

Cairan yang diperoleh dari hasil penyaringan merupakan cairan kecap mentah. Selanjutnya kecap mentah ditambahkan gula aren (2,5 ons) yang terlebih dulu dilarutkan dalam 500 ml air, dan ditambahkan bumbu lainnya seperti 1 batang serai, 1 potong kecil lengkuas, 1 lembar daun salam, 1 siung bawang, moto secukupnya, 1 lembar daun jeruk, 0,5 sendok minyak wijen (dari 0,5 liter kecap). Bumbu tersebut disangrai dan ditumbuk sampai halus kemudian dicampurkan dengan cairan kecap mentah, lalu dimasak sampai mencapai kekentalan yang dikehendaki sambil diaduk agar tidak gosong.

#### 4. Pembuatan Reagen (Sudarmadji, 1984)

##### 4.1. Reagen Lowry

Lowry A: dibuat dengan melarutkan foline ciocalteu dengan akuades dengan perbandingan 1:1.

Lowry B: terdiri dari 2 larutan, larutan 1 adalah larutan 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dalam  $\text{NaOH}$  0,1 N. Larutan 2 merupakan campuran 1 ml  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1% dan 1 ml larutan K-Na-tartrat 2% (dibuat segera sebelum digunakan). Lowry B dibuat dengan mencampurkan larutan 1 dan 2 dengan perbandingan 100:1.

##### 4.2. Buffer Asetat pH 5

Dibuat dengan mencampurkan X ml larutan A 14,8 ml dan Y ml larutan B 35,2 ml yang diencerkan menjadi 100 ml. Larutan A terdiri dari 0,2 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (11,5 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$  dalam 1000 ml). Larutan B terdiri dari 0,2 M Na-COOH (16,4 gr  $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$  dalam 1000 ml).

##### 4.3. Reagen Nelson

Larutan A : 0,25 gr  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidrat ditambah 0,25 gr Na bikarbonat dan 2 gr Na sulfat dilarutkan dalam 50 ml air suling dan diencerkan sampai 100 ml.

Larutan B : Larutan 0,75  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  dan 10 ml air suling ditambah 1 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat.

Reagen Nelson ini dibuat dengan cara mencampurkan 25 bagian larutan A dan 1 bagian larutan B dan pencampuran ini dikerjakan setiap akan digunakan.

#### 4.4. Reagen Arsenomolybdat

Larutan 1. Dibuat dengan melarutkan 6 gr Ammoniummolybdat dalam 100 ml air suling, ditambahkan 50 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dan dimasukkan dalam botol erlenmeyer.

Larutan 2. Dibuat dengan melarutkan 6 gr Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O dalam 50 ml, ditempatkan dalam erlenmeyer yang lain. Larutan 2 dituang ke dalam larutan 1, disimpan dalam botol coklat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Reagen ini baru bisa digunakan setelah masa inkubasi tersebut dan reagen ini akan berwarna kuning.

### 5. Analisis Kimiawi

#### 5.1. Penentuan Kandungan Protein (Sudarmadji, 1984)

##### a. Penyiapan kurva standart larutan protein

Disiapkan pengenceran bertingkat yang berisi larutan protein (BSA) yang kadarnya 30 -300 µ g/ml.

Tabung	ml larutan 300 µ g protein/ml	ml H <sub>2</sub> O	µ g protein/ml	OD (abs)
1	0	1	0	
2	0,1	0,9	30	
3	0,2	0,8	60	
4	0,3	0,7	90	
5	0,4	0,6	120	
6	0,5	0,5	150	
7	0,6	0,4	180	
8	0,7	0,3	210	
9	0,8	0,2	240	
10	1,0	0	300	

Kemudian ditambahkan ke dalam masing-masing tabung 8 ml reagen Lowry B dan dibiarkan paling sedikit 10 menit. Ditambahkan 1 ml

reagen Lowry A, digojok dan dibiarkan selama 20 menit. OD dibaca pada panjang gelombang 600 nm dengan spektrofotometer. Dibuat kurva standart yang menunjukkan hubungan antara OD dan konsentrasi

b. Penyiapan sampel

Larutan protein sampel yang terlarut diendapkan lebih dulu dengan amonium sulfat kristal. Protein yang mengendap dipisahkan dengan sentrifus 5.000 rpm selama 20 menit. Dipisahkan supernatannya. Presipitat yang merupakan protein kemudian dilarutkan kembali dengan buffer asam asetat pH 5. Kemudian diambil volume tertentu dari protein sampel dan dilakukan seperti prosedur A mulai dengan penambahan reagen Lowry B dan seterusnya. Kadar protein dibaca dari OD yang didapat dari larutan sampel dengan menggunakan kurva standart di atas. Juga diperhitungkan pengenceran sampel yang telah dilakukan.

**5.2. Penentuan Kandungan Gula Reduksi (Sudarmadji, 1984)**

a. Penyiapan kurva standart (Sudarmadji, 1984)

Dibuat larutan glukosa standart (10 mg glukosa anhidrat/100 ml). Dari larutan glukosa standart tersebut dilakukan pengenceran sebanyak 6 sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 mg/100 ml. Disiapkan 7 tabung reaksi dan masing-masing tabung diisi dengan 1 ml larutan glukosa. 1 tabung diisi 1 ml air sebagai kontrol. Ditambahkan ke dalam masing-masing tabung 1 ml reagen Nelson dan semua tabung dipanaskan sampai mendidih selama 20 menit. Kemudian didinginkan sampai suhu mencapai 25°C. Kemudian ditambahkan 1 ml reagen

Arsenomolybdat dan digojok sampai semua endapan  $\text{Cu}_2\text{O}$  yang ada larut kembali. Setelah semua endapan larut sempurna, ditambahkan 7 ml air suling dan digojok sampai homogen. OD masing-masing larutan dibaca pada panjang gelombang 540 nm. Kemudian dibuat kurva standart yang menunjukkan hubungan konsentrasi glukosa dengan OD.

glukosa (mg/100 cc)	OD (abs)
2	
4	
6	
8	
10	

b. Penentuan gula reduksi pada sampel

Disiapkan larutan contoh yang mempunyai kadar glukosa sekitar 2 - 8 mg/100 ml. Diambil 1 ml larutan contoh yang jernih tersebut ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 1 ml reagen Nelson dan selanjutnya diperlakukan seperti pada penyiapan kurva standart diatas. Jumlah gula reduksi dapat ditentukan berdasarkan OD larutan contoh dan kurva standart larutan glukosa.

**5.3. Penentuan Total Asam (Sudarmadji, 1984)**

Ditimbang bahan sebanyak 15 gram dan ditumbuk halus. Dimasukkan dalam labu takar 250 ml dan ditambahkan akuadest sebanyak 100 ml, digojok dan dipanaskan sampai mendidih selama 10 menit, digojok lagi dan didinginkan. Ditambah akuadest lagi sampai pada tanda, disaring dengan corong, kemudian filtrat yang diperoleh ditampung. Diambil 10 ml filtrat dan ditambah 10 ml akuadest dan ditambah juga 2 - 3 tetes indikator PP



1%. Dititrasi dengan larutan NaOH 0,01 N sampai berubah warna menjadi merah muda. Kebutuhan NaOH dicatat dan dapat dihitung jumlah asam totalnya dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Jumlah asam total} = \frac{\text{Vol. NaOH} \times \text{N NaOH}}{\text{Vol. (ml sampel)}} \times 9\%$$

#### 5.4. Keasaman (pH)

Diukur dengan menggunakan pH meter.

#### 5.5. Temperatur

Diukur dengan menggunakan termometer.

#### 5.6. Uji Organoleptik (Soekarto, 1985)

Tujuan uji penerimaan/organoleptik ini adalah untuk mengetahui suatu komoditi atau sifat sensorik tertentu dapat diterima atau tidak. Uji ini dilakukan dengan mengambil jumlah panelis sebanyak 25 orang, sampel kecap yang diuji sebanyak 26 dan diuji mengenai bau, rasa dan warna dari sampel kecap yang dihasilkan.

Sebagai pembandingnya adalah kecap yang diberi standart bumbu pabrik.

Caranya adalah sebagai berikut :

- Disediakan sampel kecap yang akan diuji dan sampel pembanding.
- Masing-masing sampel tersebut sebelum diujikan, terlebih dahulu diberi kode sebanyak 3 digit (misal : 357), kode tersebut hanya diketahui oleh si peneliti. Jadi para panelis tidak mengetahui perbedaan sampel kecap yang diteliti dan sampel kecap pembandingnya.

- Kemudian diberikan skala hedonik dan skala numeriknya, yaitu :

Amat sangat suka = 6

Sangat suka = 5

Suka = 4

Agak suka = 3

Netral = 2

Tidak suka = 1

#### **D. Rancangan Percobaan**

Dalam penelitian ini, perlakuan yang diberikan meliputi :

1. Jenis kapang : tanpa kapang sebagai kontrol ( $A_0$ ), *A. oryzae* ( $A_1$ ), *A. soyae* ( $A_2$ ), *A. wentii* ( $A_3$ ).
2. Lama inkubasi : 0 hari ( $B_0$ ), 7 hari ( $B_1$ ), 14 hari ( $B_2$ ), 21 hari ( $B_3$ ), 28 hari ( $B_4$ ) dan 35 hari ( $B_5$ ).
3. Ulangan dilakukan sebanyak 3 kali untuk masing-masing perlakuan, sehingga didapat 72 unit percobaan. Kombinasi perlakuan tertera pada Tabel 05 berikut ini :

Tabel 05. Susunan kombinasi perlakuan.

	A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>
B <sub>0</sub>	A <sub>0</sub> B <sub>0</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>0</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>0</sub>	A <sub>3</sub> B <sub>0</sub>
B <sub>1</sub>	A <sub>0</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>3</sub> B <sub>1</sub>
B <sub>2</sub>	A <sub>0</sub> B <sub>2</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub>
B <sub>3</sub>	A <sub>0</sub> B <sub>3</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>3</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>3</sub>	A <sub>3</sub> B <sub>3</sub>
B <sub>4</sub>	A <sub>0</sub> B <sub>4</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>4</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>4</sub>	A <sub>3</sub> B <sub>4</sub>
B <sub>5</sub>	A <sub>0</sub> B <sub>5</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>5</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>5</sub>	A <sub>3</sub> B <sub>5</sub>

4. Parameter yang diamati adalah kandungan protein, gula reduksi, total asam, pH, temperatur dan uji organoleptik yang meliputi tingkat bau dan rasa.
5. Analisis data.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap Pola Faktorial. Data yang diperoleh dianalisis dengan Analisis Sidik Ragam atau ANOVA. Sedangkan uji lanjutan yang digunakan adalah Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 1% dan. Untuk mengetahui hubungan antara 2 peubah yaitu peubah bebas (lama inkubasi) dengan peubah tak bebas (peningkatan kandungan protein, gula reduksi dan total asam) dilakukan analisis regresi dan besarnya hubungan antara 2 peubah selanjutnya dinyatakan dengan koefisien korelasi (r).