

**KARAKTERISTIK MOROMI YANG DIHASILKAN DARI
FERMENTASI MOROMI KECAP KORO PEDANG
(*Canavalia ensiformis* L.) PADA KONDISI
FERMENTASI YANG BERBEDA**

**Tesis
untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Sarjana S-2**

**Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan
Fakultas Teknologi Pertanian**



**diajukan oleh
Beti Cahyaning Astuti
09/290805/PTP/1002**

**kepada
PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS GADJAH MADA
YOGYAKARTA
2012**

Tesis
KARAKTERISTIK MOROMI YANG DIHASILKAN DARI FERMENTASI
MOROMI KECAP KORO PEDANG (*Canavalia ensiformis* L.)
PADA KONDISI FERMENTASI YANG BERBEDA

dipersembahkan dan disusun oleh

Beti Cahyaning Astuti

telah dipertahankan di depan Dewan Penguji

pada tanggal **17 Januari 2012**

Susunan Dewan Penguji

Pembimbing Utama



Prof. Dr. Ir. Sardjono, M.S.

Pembimbing Pendamping I



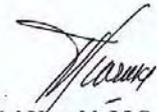
Dr. Ir. Retno Indrati, M.Sc.

Pembimbing Pendamping II

Anggota Dewan Penguji Lain



Dr. Ir. Eni Harmayani, M.Sc.



Dr. Ir. Sri Naruki, M.S.

Tesis ini telah diterima sebagai salah satu persyaratan
untuk memperoleh gelar Magister

Tanggal **26 Maret 2012**



Dr. Yudi Pranoto, S.TP., M.P.

Ketua Program Studi S2 Ilmu dan Teknologi Pangan

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, Maret 2012



Beti Cahyaning Astuti

UNIVERSITAS TERBUKA

PERSEMBAHAN

Sesungguhnya Allah tidak akan mengubah keadaan suatu kaum sebelum mereka mengubah keadaan diri mereka sendiri. (Ar-Ra'd: 11).

Allah akan mengangkat (derajat) orang-orang yang beriman diantaramu dan orang-orang yang diberi ilmu beberapa derajat. (Al-Mujadilah: 11).

Setiap manusia pasti binasa kecuali orang yang berilmu, setiap orang yang berilmu juga binasa kecuali orang yang mengamalkan ilmunya, setiap pengamal ilmu pun rusak binasa kecuali orang yang ikhlas niatnya. (Al-Hadist).

Tesis ini penulis persembahkan kepada orang-orang yang selalu memberikan pengharapan dan menyayangi penulis.

Mereka selalu hadir, baik secara lahir maupun melalui doa.

- 1. Ayah dan Ibu terhormat yang selalu memberikan kasih sayang, doa dan nasihatnya.*
- 2. Pangeranku M. Burhan Yasin yang selalu memberikan semangat, perhatian dan motivasinya untuk terus berjuang.*
- 3. Adikku yang kucintai Nevy, Zam dan Putri.*
- 4. Rekan-rekan program studi Ilmu dan Teknologi Pangan.*
- 5. Almamaterku yang kbanggakan.*

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbil'aalamiin, dengan mengucapkan segala puji bagi Allah Tuhan semesta alam, yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan menyusun tesis yang berjudul “Karakteristik Moromi yang Dihasilkan dari Fermentasi Moromi Kecap Koro Pedang (*Canavalia ensiformis* L.) pada Kondisi Fermentasi yang Berbeda” ini sebagai salah satu syarat menyelesaikan studi strata dua (S2) untuk memperoleh gelar Master pada Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada.

Dalam pelaksanaan penelitian sampai tersusunnya tesis ini, penulis tidak lepas dari berbagai hambatan, cobaan dan rintangan. Namun atas bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, akhirnya penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Dalam kesempatan ini penulis menyampaikan rasa terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada:

1. Rektor Universitas Terbuka, yang telah memberikan ijin tugas belajar.
2. Prof. Dr. Ir. Sardjono, M.S., Dosen Pembimbing I, terima kasih atas ilmu, bimbingan dan dukungannya yang telah bapak berikan.
3. Dr. Ir. Retno Indrati, M.Sc., Dosen Pembimbing II, terima kasih atas bimbingan dan arahnya hingga terselesaikannya tesis ini.
4. Prof. Dr. Ir. Djagal Wiseso Marseno, M.Agr., Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada, yang telah memberikan ijin untuk melaksanakan penelitian.

5. Dr. Yudi Pranoto, S.TP., M.P., Ketua Program Studi S2 Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada.
6. Dr. Ir. Eni Harmayani, M.Sc. selaku Dosen Penguji I atas segala masukannya.
7. Dr. Ir. Sri Naruki, M.S. selaku Dosen Penguji II atas segala masukannya.
8. Universitas Terbuka, yang telah memberikan beasiswa.
9. Bapak Ibu Dosen yang saya hormati, yang telah mencurahkan berbagai ilmu, pengalaman berharga dan motivasinya.
10. Bapak Ibu Dosen dan seluruh Staf Pegawai Universitas Terbuka baik Pusat maupun UPBJJ Surakarta, atas semua bantuannya.
11. Seluruh Staf Tata Usaha Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada atas pelayanan akademiknya.
12. Seluruh Laboran Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada atas bantuannya selama penelitian dilakukan.
13. Ibu Desy dari Laboratorium Balai Besar Penelitian Tanaman Padi atas bantuannya selama penelitian dilakukan.
14. Rekan-rekan seperjuangan S2 ITP 2009, terima kasih atas segala bentuk kerja sama, bantuan dan canda tawanya.
15. Rekan-rekan mahasiswa S2 ITP 2010 dan TPHP 2009, terima kasih atas bantuan dan pengalaman berharga yang kalian berikan.
16. Serta seluruh pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan tesis ini, yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Semoga amal kebaikan pihak-pihak yang telah membantu penulis di atas mendapat pahala dan balasan yang lebih baik dari Allah SWT. Amiin...

Yogyakarta, Maret 2012

Ben Cahyaning Astuti

UNIVERSITAS TERBUKA

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN	iii
PERSEMBAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
INTISARI	xiv
ABSTRACT	xv
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan	5
1.3 Manfaat	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Koro Pedang (<i>Canavalia ensiformis</i> L.)	6
2.2 Kecap	10
2.3 Fermentasi Koji	11
2.4 Fermentasi Moromi	14
2.5 Flavor	18
2.6 Hipotesis	22
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	23
3.1 Tempat Penelitian	23
3.2 Bahan	23
3.2.1 Bahan untuk Fermentasi Koji dan Moromi	23

3.2.3	Bahan untuk Analisis Kimia.....	24
3.3	Alat.....	24
3.3.1	Peralatan untuk Fermentasi Koji dan Moromi	24
3.3.2	Peralatan untuk Analisis Mikrobiologi.....	24
3.3.3	Peralatan untuk Analisis Kimia.....	25
3.4	Tahap Penelitian	25
3.5	Prosedur Penelitian	26
3.5.1	Pengecilan Ukuran	26
3.5.2	Fermentasi Kecap Koro Pedang.....	27
3.6	Metode Analisis	30
3.6.1	Analisis Kimia Koro Pedang dan Koji.....	30
3.6.1.1	Kadar HCN.....	30
3.6.1.2	Bilangan Formol.....	30
3.6.1.3	Protein Total	30
3.6.2	Analisis Mikrobiologi Moromi	30
3.6.2.1	Pertumbuhan BAL Selama Fermentasi Moromi.....	30
3.6.2.2	Pertumbuhan Yeast Selama Fermentasi Moromi	31
3.6.2.3	Pertumbuhan Bakteri Proteolitik Selama Fermentasi Moromi.....	31
3.7.3	Analisis Kimia pada Moromi	32
3.7.3.1	Kadar HCN.....	32
3.7.3.2	pH	32
3.7.3.3	Bilangan Formol	32
3.7.3.4	Protein Total	32
3.7.3.5	Profil Asam Amino Bebas	32
3.7.3.6	Komponen Flavor	33
3.7	Rancangan Percobaan	33
BAB IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	34
4.1	Pengecilan Ukuran Koro Pedang.....	34
4.2	Fermentasi Kecap Koro Pedang	35

4.2.1	Kadar HCN	35
4.2.2	Perbandingan antara Bilangan Formol dengan Protein Total Sebelum dan Sesudah Fermentasi Koji	36
4.2.3	Pengamatan Suhu Selama Fermentasi Moromi	37
4.2.4	Pertumbuhan BAL Selama Fermentasi Moromi	38
4.2.5	Pertumbuhan Yeast Selama Fermentasi Moromi	40
4.2.6	Pertumbuhan Bakteri Proteolitik Selama Fermentasi Moromi	42
4.2.7	pH Selama Fermentasi Moromi.....	44
4.2.8	Bilangan Formol Selama Fermentasi Moromi	45
4.2.9	Protein Total Selama Fermentasi Moromi.....	47
4.2.10	Profil Asam Amino Bebas pada Moromi	48
4.2.11	Flavor Moromi.....	51
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN		59
5.1	Kesimpulan.....	59
5.2	Saran	59
DAFTAR PUSTAKA		60
LAMPIRAN		66

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Kandungan gizi koro pedang dan kedelai hitam.....	7
Tabel 2. Komposisi asam amino kacang koro pedang dan kedelai (mg/100 mg protein)	8
Tabel 3. Kadar HCN koro benguk dan koro putih dengan berbagai perlakuan (mg/100 g)	10
Tabel 4. Protease pada koji	13
Tabel 5. Peptidase pada koji	13
Tabel 6. Syarat mutu kecap kedelai manis.....	18
Tabel 7. Komponen flavor yang terbentuk dan prekursor selama fermentasi	20
Tabel 8. Kadar HCN sebelum dan sesudah fermentasi koji	35
Tabel 9. Perbandingan bilangan formol/ protein total sebelum dan sesudah fermentasi	36
Tabel 10. Komponen flavor yang terbentuk pada moromi	52
Tabel 11. Komponen flavor manis pada moromi	57

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Tanaman koro pedang (kiri) dan biji koro pedang (kanan).....	7
Gambar 2. Gaftar alir pengecilan ukuran koro pedang	27
Gambar 3. Gaftar alir fermentasi moromi koro pedang.....	29
Gambar 4. Koro pedang utuh (kiri) dan hancuran koro pedang (kanan) ..	34
Gambar 5. Perbedaan suhu selama fermentasi moromi	38
Gambar 6. Pertumbuhan bakteri asam laktat selama fermentasi moromi.	39
Gambar 7. Pertumbuhan yeast selama fermentasi moromi	41
Gambar 8. Pertumbuhan bakteri proteolitik selama fermentasi moromi ..	43
Gambar 9. Perubahan nilai pH selama fermentasi moromi	45
Gambar 10. Perubahan bilangan formol selama fermentasi moromi.....	46
Gambar 11. Perubahan protein total selama fermentasi moromi.....	48
Gambar 12. Komposisi asam amino bebas pada moromi.....	49

UNIVERSITAS TERBUKA

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Spesifikasi alat <i>desintedratator</i>	67
Lampiran 2. Penentuan HCN (Sudarmadji <i>et al</i> , 1995).....	68
Lampiran 3. Bilangan formol dari AOAC dari AOAC(Anonim, 1995)...	69
Lampiran 4. Protein total mikro Kjeldahl dari AOAC (Anonim, 1995)...	70
Lampiran 5. Prosedur analisis HPLC asam amino bebas moromi.....	71
Lampiran 6. Prosedur analisis flavor moromi.....	73
Lampiran 7. Data pengukuran suhu moromi selama fermentasi moromi.	74
Lampiran 8. <i>Analysis of varience</i> (anova) kadar HCN sebelum dan sesudah fermentasi koji	81
Lampiran 9. <i>Analysis of varience</i> (anova) perbandingan bilangan formol/ protein total sebelum dan sesudah fermentasi koji	81
Lampiran 10. Data hasil analisis pH moromi	82
Lampiran 11. Data hasil analisis bilangan formol	82
Lampiran 12. Data hasil analisis protein total.....	83
Lampiran 13. Data hasil pertumbuhan bakteri proteolitik pada moromi	83
Lampiran 14. Data hasil pertumbuhan BAL pada moromi.....	84
Lampiran 15. Data hasil pertumbuhan yeast pada moromi	84
Lampiran 16. Data hasil analisis HPLC asam amino bebas pada moromi .	85
Lampiran 17. Komponen flavor moromi	86

**KARAKTERISTIK MOROMI YANG DIHASILKAN DARI
FERMENTASI MOROMI KECAP KORO PEDANG
(*Canavalia ensiformis* L.) PADA KONDISI
FERMENTASI YANG BERBEDA**

Beti Cahyaning Astuti

INTISARI

Koro pedang merupakan jenis legum yang mempunyai kandungan protein dan karbohidrat yang tinggi. Pemanfaatan koro pedang sebagai bahan pangan masih sedikit karena mengandung HCN. Kecap koro pedang merupakan salah satu alternatif pemanfaatan koro pedang. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh fermentasi koji terhadap penurunan kadar HCN koro pedang, perbedaan suhu moromi di dalam dan di luar laboratorium (terpapar sinar matahari) dan pengaruh suhu terhadap karakteristik moromi yang dihasilkan. Produksi kecap koro pedang disamakan dengan fermentasi kecap kedelai, terdiri dari fermentasi koji dan fermentasi moromi.

Koji dianalisis kadar HCN, bilangan formol dengan metode titrasi dan protein total dengan metode mikro Kjeldahl. Selama fermentasi moromi dilakukan pengamatan suhu, pertumbuhan bakteri proteolitik, Bakteri Asam Laktat, yeast, analisis pH dengan pH-meter, bilangan formol dengan metode titrasi, protein total dengan metode mikro Kjeldahl, HCN, profil asam amino dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dan flavor dengan *Gas Chromatography Mass Spectrometry Olfactometry* (GCMSO).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fermentasi koji efektif mengurangi kadar HCN dan meningkatkan perbandingan bilangan formol/ protein total dari koji. Perbedaan kondisi fermentasi moromi menunjukkan bahwa fermentasi di luar laboratorium (terpapar sinar matahari) menghasilkan moromi yang lebih tinggi suhunya dibandingkan dengan fermentasi di dalam laboratorium. Fermentasi di luar laboratorium (terpapar sinar matahari) lebih cepat menurunkan nilai pH, meningkatkan bilangan formol dan protein total dalam larutan moromi dan mempercepat pertumbuhan yeast. Fermentasi di luar laboratorium (terpapar sinar matahari) juga menghasilkan komponen flavor lebih kompleks yaitu manis dan gurih.

Kata kunci : Koro pedang, kondisi, fermentasi, koji, moromi, mikroflora, flavor

CHARACTERISTIC OF MOROMI PRODUCED BY DIFFERENT MOROMI FERMENTATION CONDITION DURING JACK BEAN SAUCE FERMENTATION

Beti Cahyaning Astuti

ABSTRACT

Jack bean is kind of legume contain high protein and carbohydrate. Utilization of jack bean as food still limited because of hydrogen cyanide content. Jack bean sauce is one of the alternative utilization of jack bean. The objective of this research was to know the effect of koji fermentation for reducing hydrogen cyanide content, different temperature of moromi in and out laboratory (under the sun) and the effect of temperature for characteristic of moromi produced. Production of jack bean sauce was showed similar with soy sauce fermentation, consist of koji fermentation and moromi fermentation.

Analysis were carried out on koji were: analysis of hydrogen cyanide, formol value by titration method and total protein by micro Kjeldahl method has been done. On moromi fermentation, analysis of temperature, the growth of lactic acid bacteria, the growth of yeast, the growth of proteolytic bacteria, pH by pH-meter, formol value by titration method, hydrogen cyanide, total protein by micro Kjeldahl method, amino acid by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and moromi flavor by Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Olfactometry (GCMSO) has been done.

The results indicated that koji fermentation was effective for reducing hydrogen cyanide content, increasing ratio of formol value/ total protein in koji. Different condition of moromi fermentation showed that out laboratory fermentation (under the sun) produce higher moromi temperature compared to in laboratory fermentation. Out laboratory fermentation (under the sun) produced faster in decreasing pH, increasing formol value and total protein in moromi filtrate, and increasing the growth in yeast. Out laboratory fermentation (under the sun) also produced more complex of flavor component of sweet and savory in moromi.

Key words: jack bean, condition, fermentation, koji, moromi, microflora, flavor

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kecap merupakan produk pangan tradisional yang digunakan sebagai penambah cita rasa makanan. Kecap sebagai produk hasil fermentasi, merupakan bagian penting dalam menu makanan masyarakat Indonesia. Kecap banyak digunakan di Jepang, Cina, Korea dan negara-negara Asia lainnya sebagai bumbu dan pewarna dalam makanan. Dalam Rencana SNI, kecap manis dideskripsikan sebagai produk berbentuk cair yang dibuat dari cairan hasil fermentasi kedelai atau bungkil kedelai ditambah gula dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan yang diijinkan (Anonim, 2011). Karakteristik pembentukan flavor pada kecap tergantung pada cara produksi kecap, bahan baku dan strain mikroorganisme yang digunakan.

Selama ini produk kecap dibuat dari kedelai dan bungkil kedelai. Hasil penelitian Handajani dan Windi (1996) menyatakan bahwa Indonesia mempunyai banyak jenis legum yang beberapa diantaranya belum dimanfaatkan secara optimal. Salah satu jenis legum yang cocok dibudidayakan di Indonesia dan dapat berfungsi sebagai bahan pangan tetapi produk olahannya masih jarang dikonsumsi yaitu koro pedang (*Canavalia ensiformis* L.). Kelebihan dari koro pedang adalah kandungan gizinya yang

cukup tinggi terutama karbohidrat dan protein (Handajani, 1993). Karakteristik kecap koro pedang kemungkinan berbeda dengan kecap kedelai. Hal ini dapat dilihat dari bahan baku utama yaitu legum, dimana komposisi kimia dari koro pedang dan kedelai berbeda. Komposisi kimia koro pedang kaya akan protein 27,4% dan karbohidrat 66,1% (Salunkhe dan Kadam, 1990), sedangkan untuk kedelai hitam kandungan protein 37,3% dan karbohidrat 68,0% (Slamet, 1978). Perbedaan komposisi ini mempengaruhi jenis mikroorganisme yang tumbuh dan berkembang selama fermentasi dalam pemecahan substrat.

Kekurangan dari koro pedang adalah mengandung senyawa toksik yaitu glukosida sianogen sehingga bila dikonsumsi secara langsung akan berefek negatif bagi tubuh (Ekanayake *et al.*, 2004). Perlakuan panas, perendaman dan fermentasi akan meminimalkan senyawa tersebut dalam bahan baku. Wedhastrı (1990) melaporkan bahwa fermentasi koji oleh kapang *Aspergillus oryzae*, *A. sojae*, *Rhizopus oligosporus* dan *R. oryzae* menurunkan glukosida sianogen biji koro benguk.

Chou dan Ling (1999) melaporkan bahwa perlakuan dengan modifikasi fisik dan kimia bahan baku dengan perbedaan komposisi protein, lemak dan karbohidrat mempengaruhi fermentasi koji. Fermentasi koji ada dua cara yaitu cara pertama secara tradisional tanpa penambahan inokulum dan cara kedua dengan penambahan inokulum. Pada penelitian ini dilakukan dengan penambahan inokulum *Aspergillus oryzae* dan *Aspergillus sojae*.

Strain yang mempunyai aktivitas baik untuk proses fermentasi koji adalah jamur *Aspergillus oryzae* (Beuchat, 1995) dan *Aspergillus sojae* (Wood, 2004). Strain *Aspergillus* memproduksi ekstraseluler protease dan amilase, dimana dua enzim ini akan merombak protein dan karbohidrat menjadi senyawa yang lebih sederhana.

Tahapan selanjutnya adalah fermentasi moromi. Pada tahap ini, koro pedang yang telah mengalami proses fermentasi koji direndam dalam larutan garam. Pada tahap awal, bakteri yang biasanya berperan dalam fermentasi moromi adalah *Pediococcus halophilus* yang akan mengubah gula sederhana menjadi asam laktat dan sekaligus menurunkan pH hingga mencapai pH optimum untuk fermentasi oleh yeast (Iwasaki *et al.*, 1993). Selanjutnya terjadi fermentasi alkohol oleh yeast. Yeast yang berperan adalah *Zygosaccharomyces rouxi* dan spesies *Candida* (Nunomura dan Sasaki, 2003).

Tahapan fermentasi ini disebut juga dengan fermentasi dalam larutan garam. Kadar garam yang ditambahkan pada penelitian ini adalah 24%. Larutan garam yang cukup tinggi dalam moromi berfungsi sebagai senyawa pembatas terhadap mikroorganisme yang tumbuh. Larutan garam harus masih memungkinkan untuk pertumbuhan yeast dan bakteri asam laktat (BAL). Selama fermentasi moromi, BAL akan mengubah asam amino menjadi komponen pembentuk flavor umami melalui proses transaminasi, bakteri proteolitik akan mendegradasi protein menjadi peptida dan asam-asam amino

serta yeast mengubah gula sederhana menjadi alkohol yang akan bereaksi dengan asam-asam organik yang menghasilkan komponen flavor.

Pada pembuatan kecap di Indonesia fermentasi moromi dilakukan pada ruangan terbuka yang terpapar sinar matahari. Belum ada informasi ilmiah tentang kondisi fermentasi moromi yang diletakkan di luar ruangan yang terpapar sinar matahari, dikaitkan dengan sinar matahari atau suhu moromi. Kondisi lingkungan menentukan pertumbuhan mikroorganisme (BAL, bakteri proteolitik dan yeast) yang ada dalam fermentasi moromi.

Beberapa jurnal menyebutkan bahwa suhu pada fermentasi moromi merupakan faktor penting dalam proses *aging* dan menentukan kualitas kecap. Dari hasil penelitian terdahulu, peneliti menyarankan agar pada saat *aging* kecap lebih baik suhu dipertahankan pada 15°C selama bulan pertama fermentasi dan bertahap dinaikkan menjadi 30°C (Chou dan Ling, 1999; Iwasaki *et al.*, 1993). Kemudian, Jansen *et al.*, (2003) menemukan bahwa produksi fusel alkohol sebagai senyawa flavor dalam kecap yang diproduksi oleh *Z. rouxii* juga tergantung pada suhu fermentasi. Penelitian Wu *et al.*, (2010) melaporkan bahwa perbedaan suhu (25, 35 dan 45°C) akan mempengaruhi nilai pH moromi kecap kedelai. Perbedaan suhu akan mempengaruhi pertumbuhan mikroflora dan reaksi kimia dalam pemecahan substrat yang akan menentukan flavor dari kecap.

Pada penelitian ini kondisi fermentasi moromi dibuat berbeda dengan meletakkan moromi di dalam dan di luar laboratorium (dibagian atas selasar

lantai 4 yang jika cuaca tidak berawan terpapar sinar matahari sepanjang hari). Perbedaan kondisi fermentasi moromi ini akan memberikan efek suhu yang berbeda pada moromi. Perbedaan suhu pada fermentasi moromi akan menghasilkan karakteristik moromi yang berbeda.

1.2. Tujuan

Tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh fermentasi koji terhadap penurunan kadar HCN koro pedang.
2. Mengetahui perbedaan suhu moromi yang di fermentasi di dalam dan di luar laboratorium.
3. Mengetahui pengaruh suhu terhadap karakteristik moromi yang dihasilkan.

1.3. Manfaat

Manfaat dari penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui profil asam amino, mikroflora dan flavor moromi yang terbentuk dalam fermentasi kecap koro pedang.
2. Memberikan alternatif pemanfaatan koro pedang sebagai bahan baku pembuatan kecap koro pedang.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kecap merupakan produk pangan tradisional yang digunakan sebagai penambah cita rasa makanan. Kecap sebagai produk hasil fermentasi, merupakan bagian penting dalam menu makanan masyarakat Indonesia. Kecap banyak digunakan di Jepang, Cina, Korea dan negara-negara Asia lainnya sebagai bumbu dan pewarna dalam makanan. Dalam Rencana SNI, kecap manis dideskripsikan sebagai produk berbentuk cair yang dibuat dari cairan hasil fermentasi kedelai atau bungkil kedelai ditambah gula dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan yang diijinkan (Anonim, 2011). Karakteristik pembentukan flavor pada kecap tergantung pada cara produksi kecap, bahan baku dan strain mikroorganisme yang digunakan.

Selama ini produk kecap dibuat dari kedelai dan bungkil kedelai. Hasil penelitian Handajani dan Windi (1996) menyatakan bahwa Indonesia mempunyai banyak jenis legum yang beberapa diantaranya belum dimanfaatkan secara optimal. Salah satu jenis legum yang cocok dibudidayakan di Indonesia dan dapat berfungsi sebagai bahan pangan tetapi produk olahannya masih jarang dikonsumsi yaitu koro pedang (*Canavalia ensiformis* L.). Kelebihan dari koro pedang adalah kandungan gizinya yang

cukup tinggi terutama karbohidrat dan protein (Handajani, 1993). Karakteristik kecap koro pedang kemungkinan berbeda dengan kecap kedelai. Hal ini dapat dilihat dari bahan baku utama yaitu legum, dimana komposisi kimia dari koro pedang dan kedelai berbeda. Komposisi kimia koro pedang kaya akan protein 27,4% dan karbohidrat 66,1% (Salunkhe dan Kadam, 1990), sedangkan untuk kedelai hitam kandungan protein 37,3% dan karbohidrat 68,0% (Slamet, 1978). Perbedaan komposisi ini mempengaruhi jenis mikroorganisme yang tumbuh dan berkembang selama fermentasi dalam pemecahan substrat.

Kekurangan dari koro pedang adalah mengandung senyawa toksik yaitu glukosida sianogen sehingga bila dikonsumsi secara langsung akan berefek negatif bagi tubuh (Ekanayake *et al.*, 2004). Perlakuan panas, perendaman dan fermentasi akan meminimalkan senyawa tersebut dalam bahan baku. Wedhastri (1990) melaporkan bahwa fermentasi koji oleh kapang *Aspergillus oryzae*, *A. sojae*, *Rhizopus oligosporus* dan *R. oryzae* menurunkan glukosida sianogen biji koro benguk.

Chou dan Ling (1999) melaporkan bahwa perlakuan dengan modifikasi fisik dan kimia bahan baku dengan perbedaan komposisi protein, lemak dan karbohidrat mempengaruhi fermentasi koji. Fermentasi koji ada dua cara yaitu cara pertama secara tradisional tanpa penambahan inokulum dan cara kedua dengan penambahan inokulum. Pada penelitian ini dilakukan dengan penambahan inokulum *Aspergillus oryzae* dan *Aspergillus sojae*.

Strain yang mempunyai aktivitas baik untuk proses fermentasi koji adalah jamur *Aspergillus oryzae* (Beuchat, 1995) dan *Aspergillus sojae* (Wood, 2004). Strain *Aspergillus* memproduksi ekstraseluler protease dan amilase, dimana dua enzim ini akan merombak protein dan karbohidrat menjadi senyawa yang lebih sederhana.

Tahapan selanjutnya adalah fermentasi moromi. Pada tahap ini, koro pedang yang telah mengalami proses fermentasi koji direndam dalam larutan garam. Pada tahap awal, bakteri yang biasanya berperan dalam fermentasi moromi adalah *Pediococcus halophilus* yang akan mengubah gula sederhana menjadi asam laktat dan sekaligus menurunkan pH hingga mencapai pH optimum untuk fermentasi oleh yeast (Iwasaki *et al.*, 1993). Selanjutnya terjadi fermentasi alkohol oleh yeast. Yeast yang berperan adalah *Zygosaccharomyces rouxi* dan spesies *Candida* (Nunomura dan Sasaki, 2003).

Tahapan fermentasi ini disebut juga dengan fermentasi dalam larutan garam. Kadar garam yang ditambahkan pada penelitian ini adalah 24%. Larutan garam yang cukup tinggi dalam moromi berfungsi sebagai senyawa pembatas terhadap mikroorganisme yang tumbuh. Larutan garam harus masih memungkinkan untuk pertumbuhan yeast dan bakteri asam laktat (BAL). Selama fermentasi moromi, BAL akan mengubah asam amino menjadi komponen pembentuk flavor umami melalui proses transaminasi, bakteri proteolitik akan mendegradasi protein menjadi peptida dan asam-asam amino

serta yeast mengubah gula sederhana menjadi alkohol yang akan bereaksi dengan asam-asam organik yang menghasilkan komponen flavor.

Pada pembuatan kecap di Indonesia fermentasi moromi dilakukan pada ruangan terbuka yang terpapar sinar matahari. Belum ada informasi ilmiah tentang kondisi fermentasi moromi yang diletakkan di luar ruangan yang terpapar sinar matahari, dikaitkan dengan sinar matahari atau suhu moromi. Kondisi lingkungan menentukan pertumbuhan mikroorganisme (BAL, bakteri proteolitik dan yeast) yang ada dalam fermentasi moromi.

Beberapa jurnal menyebutkan bahwa suhu pada fermentasi moromi merupakan faktor penting dalam proses *aging* dan menentukan kualitas kecap. Dari hasil penelitian terdahulu, peneliti menyarankan agar pada saat *aging* kecap lebih baik suhu dipertahankan pada 15°C selama bulan pertama fermentasi dan bertahap dinaikkan menjadi 30°C (Chou dan Ling, 1999; Iwasaki *et al.*, 1993). Kemudian, Jansen *et al.*, (2003) menemukan bahwa produksi fusel alkohol sebagai senyawa flavor dalam kecap yang diproduksi oleh *Z. rouxii* juga tergantung pada suhu fermentasi. Penelitian Wu *et al.*, (2010) melaporkan bahwa perbedaan suhu (25, 35 dan 45°C) akan mempengaruhi nilai pH moromi kecap kedelai. Perbedaan suhu akan mempengaruhi pertumbuhan mikroflora dan reaksi kimia dalam pemecahan substrat yang akan menentukan flavor dari kecap.

Pada penelitian ini kondisi fermentasi moromi dibuat berbeda dengan meletakkan moromi di dalam dan di luar laboratorium (dibagian atas selasar

lantai 4 yang jika cuaca tidak berawan terpapar sinar matahari sepanjang hari). Perbedaan kondisi fermentasi moromi ini akan memberikan efek suhu yang berbeda pada moromi. Perbedaan suhu pada fermentasi moromi akan menghasilkan karakteristik moromi yang berbeda.

1.2. Tujuan

Tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh fermentasi koji terhadap penurunan kadar HCN koro pedang.
2. Mengetahui perbedaan suhu moromi yang di fermentasi di dalam dan di luar laboratorium.
3. Mengetahui pengaruh suhu terhadap karakteristik moromi yang dihasilkan.

1.3. Manfaat

Manfaat dari penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui profil asam amino, mikroflora dan flavor moromi yang terbentuk dalam fermentasi kecap koro pedang.
2. Memberikan alternatif pemanfaatan koro pedang sebagai bahan baku pembuatan kecap koro pedang.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kecap merupakan produk pangan tradisional yang digunakan sebagai penambah cita rasa makanan. Kecap sebagai produk hasil fermentasi, merupakan bagian penting dalam menu makanan masyarakat Indonesia. Kecap banyak digunakan di Jepang, Cina, Korea dan negara-negara Asia lainnya sebagai bumbu dan pewarna dalam makanan. Dalam Rencana SNI, kecap manis dideskripsikan sebagai produk berbentuk cair yang dibuat dari cairan hasil fermentasi kedelai atau bungkil kedelai ditambah gula dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan yang diijinkan (Anonim, 2011). Karakteristik pembentukan flavor pada kecap tergantung pada cara produksi kecap, bahan baku dan strain mikroorganisme yang digunakan.

Selama ini produk kecap dibuat dari kedelai dan bungkil kedelai. Hasil penelitian Handajani dan Windi (1996) menyatakan bahwa Indonesia mempunyai banyak jenis legum yang beberapa diantaranya belum dimanfaatkan secara optimal. Salah satu jenis legum yang cocok dibudidayakan di Indonesia dan dapat berfungsi sebagai bahan pangan tetapi produk olahannya masih jarang dikonsumsi yaitu koro pedang (*Canavalia ensiformis* L.). Kelebihan dari koro pedang adalah kandungan gizinya yang

cukup tinggi terutama karbohidrat dan protein (Handajani, 1993). Karakteristik kecap koro pedang kemungkinan berbeda dengan kecap kedelai. Hal ini dapat dilihat dari bahan baku utama yaitu legum, dimana komposisi kimia dari koro pedang dan kedelai berbeda. Komposisi kimia koro pedang kaya akan protein 27,4% dan karbohidrat 66,1% (Salunkhe dan Kadam, 1990), sedangkan untuk kedelai hitam kandungan protein 37,3% dan karbohidrat 68,0% (Slamet, 1978). Perbedaan komposisi ini mempengaruhi jenis mikroorganisme yang tumbuh dan berkembang selama fermentasi dalam pemecahan substrat.

Kekurangan dari koro pedang adalah mengandung senyawa toksik yaitu glukosida sianogen sehingga bila dikonsumsi secara langsung akan berefek negatif bagi tubuh (Ekanayake *et al.*, 2004). Perlakuan panas, perendaman dan fermentasi akan meminimalkan senyawa tersebut dalam bahan baku. Wedhastri (1990) melaporkan bahwa fermentasi koji oleh kapang *Aspergillus oryzae*, *A. sojae*, *Rhizopus oligosporus* dan *R. oryzae* menurunkan glukosida sianogen biji koro benguk.

Chou dan Ling (1999) melaporkan bahwa perlakuan dengan modifikasi fisik dan kimia bahan baku dengan perbedaan komposisi protein, lemak dan karbohidrat mempengaruhi fermentasi koji. Fermentasi koji ada dua cara yaitu cara pertama secara tradisional tanpa penambahan inokulum dan cara kedua dengan penambahan inokulum. Pada penelitian ini dilakukan dengan penambahan inokulum *Aspergillus oryzae* dan *Aspergillus sojae*.

Strain yang mempunyai aktivitas baik untuk proses fermentasi koji adalah jamur *Aspergillus oryzae* (Beuchat, 1995) dan *Aspergillus sojae* (Wood, 2004). Strain *Aspergillus* memproduksi ekstraseluler protease dan amilase, dimana dua enzim ini akan merombak protein dan karbohidrat menjadi senyawa yang lebih sederhana.

Tahapan selanjutnya adalah fermentasi moromi. Pada tahap ini, koro pedang yang telah mengalami proses fermentasi koji direndam dalam larutan garam. Pada tahap awal, bakteri yang biasanya berperan dalam fermentasi moromi adalah *Pediococcus halophilus* yang akan mengubah gula sederhana menjadi asam laktat dan sekaligus menurunkan pH hingga mencapai pH optimum untuk fermentasi oleh yeast (Iwasaki *et al.*, 1993). Selanjutnya terjadi fermentasi alkohol oleh yeast. Yeast yang berperan adalah *Zygosaccharomyces rouxi* dan spesies *Candida* (Nunomura dan Sasaki, 2003).

Tahapan fermentasi ini disebut juga dengan fermentasi dalam larutan garam. Kadar garam yang ditambahkan pada penelitian ini adalah 24%. Larutan garam yang cukup tinggi dalam moromi berfungsi sebagai senyawa pembatas terhadap mikroorganisme yang tumbuh. Larutan garam harus masih memungkinkan untuk pertumbuhan yeast dan bakteri asam laktat (BAL). Selama fermentasi moromi, BAL akan mengubah asam amino menjadi komponen pembentuk flavor umami melalui proses transaminasi, bakteri proteolitik akan mendegradasi protein menjadi peptida dan asam-asam amino

serta yeast mengubah gula sederhana menjadi alkohol yang akan bereaksi dengan asam-asam organik yang menghasilkan komponen flavor.

Pada pembuatan kecap di Indonesia fermentasi moromi dilakukan pada ruangan terbuka yang terpapar sinar matahari. Belum ada informasi ilmiah tentang kondisi fermentasi moromi yang diletakkan di luar ruangan yang terpapar sinar matahari, dikaitkan dengan sinar matahari atau suhu moromi. Kondisi lingkungan menentukan pertumbuhan mikroorganisme (BAL, bakteri proteolitik dan yeast) yang ada dalam fermentasi moromi.

Beberapa jurnal menyebutkan bahwa suhu pada fermentasi moromi merupakan faktor penting dalam proses *aging* dan menentukan kualitas kecap. Dari hasil penelitian terdahulu, peneliti menyarankan agar pada saat *aging* kecap lebih baik suhu dipertahankan pada 15°C selama bulan pertama fermentasi dan bertahap dinaikkan menjadi 30°C (Chou dan Ling, 1999; Iwasaki *et al.*, 1993). Kemudian, Jansen *et al.*, (2003) menemukan bahwa produksi fusel alkohol sebagai senyawa flavor dalam kecap yang diproduksi oleh *Z. rouxii* juga tergantung pada suhu fermentasi. Penelitian Wu *et al.*, (2010) melaporkan bahwa perbedaan suhu (25, 35 dan 45°C) akan mempengaruhi nilai pH moromi kecap kedelai. Perbedaan suhu akan mempengaruhi pertumbuhan mikroflora dan reaksi kimia dalam pemecahan substrat yang akan menentukan flavor dari kecap.

Pada penelitian ini kondisi fermentasi moromi dibuat berbeda dengan meletakkan moromi di dalam dan di luar laboratorium (dibagian atas selasar

lantai 4 yang jika cuaca tidak berawan terpapar sinar matahari sepanjang hari). Perbedaan kondisi fermentasi moromi ini akan memberikan efek suhu yang berbeda pada moromi. Perbedaan suhu pada fermentasi moromi akan menghasilkan karakteristik moromi yang berbeda.

1.2. Tujuan

Tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh fermentasi koji terhadap penurunan kadar HCN koro pedang.
2. Mengetahui perbedaan suhu moromi yang di fermentasi di dalam dan di luar laboratorium.
3. Mengetahui pengaruh suhu terhadap karakteristik moromi yang dihasilkan.

1.3. Manfaat

Manfaat dari penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui profil asam amino, mikroflora dan flavor moromi yang terbentuk dalam fermentasi kecap koro pedang.
2. Memberikan alternatif pemanfaatan koro pedang sebagai bahan baku pembuatan kecap koro pedang.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Koro Pedang (*Canavalia ensiformis* L.)

Canavalia ensiformis L. berasal dari Amerika Selatan dan dapat ditemui di beberapa daerah di India, Srilangka, Myanmar dan di Negara Asia Timur lainnya. Di Indonesia banyak ditemukan di daerah Jawa Tengah dan Jawa Barat. Di Jawa Tengah terkenal dengan nama koro bledog, koro loke, koro gogok, koro wedhung dan koro kaji. Sedangkan di Jawa Barat dikenal dengan nama koro bakul (Maradja, 1976).

Bentuk tanaman koro pedang menyerupai perdu batangnya bercabang pendek dan lebat dengan jarak percabangan pendek dan perakaran termasuk akar tunggang. Bentuk daun trifoliat dengan panjang tangkai daun 7-10 cm, lebar daun sekitar 10 cm dan tinggi tanaman dapat mencapai 1 meter. Bunga berwarna kuning, tumbuh pada ketiak/buku cabang. Bunga termasuk bunga majemuk dan berbunga mulai umur 2 bulan hingga umur 3 bulan. Polong dalam satu tangkai berkisar 1-3 polong, tetapi umumnya 1 polong per tangkai. Panjang polong 30 cm dan lebar 3,5 cm, polong muda berwarna hijau dan polong tua berwarna kuning jerami. Biji berwarna putih dan tanaman koro dapat dipanen pada 9-12 bulan, namun terdapat varietas genjah dengan umur 4-6 bulan (Rubatzky dan Yamaguchi, 1997). Tanaman dan biji koro pedang (*Canavalia ensiformis* L.) dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Tanaman koro pedang (kiri) dan biji koro pedang (kanan)

Kandungan gizi koro tidak kalah dengan kedelai yaitu karbohidrat dan protein yang cukup tinggi serta kandungan lemak yang rendah. Koro pedang juga memiliki kandungan mineral yang tinggi. Agbede dan Aletor (2005) melaporkan, selain mengandung *α-aminobutyric acid*, koro pedang juga mengandung *lectin*, yaitu karbohidrat sederhana yang berikatan dengan protein. Koro pedang mengandung protein cukup tinggi, yaitu sekitar 27,4% dari biji kering. Kandungan gizi koro pedang dan kedelai hitam dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan gizi koro pedang dan kedelai hitam

Kandungan gizi	Koro pedang (% db) ^a	Kedelai hitam (% db) ^b
Energi (kkal)	389	528
Kadar air	11	11.3
Protein	27,4	37.3
Lemak	2,9	13.4
Karbohidrat	66,1	68
Kalsium	0,6	0,15
Fosfor	0,46	0,58
Besi	0,01	0,09

Sumber: ^a Salunkhe dan Kadam (1990)

^b Slamet (1978)

Kandungan protein koro pedang (27,4%) lebih rendah daripada kedelai hitam (37,3%) akan tetapi kandungan asam amino penyusunnya hampir sama baik dari segi kualitas maupun kuantitas (Tabel 2), sehingga koro pedang ini cocok digunakan sebagai bahan baku dalam pembuatan kecap.

Tabel 2. Komposisi asam amino koro pedang dan kedelai (mg/100 mg protein)

Asam amino	Koro pedang ^a	Kedelai hitam ^b
Asam Glutamat	2,4-16	17
Asam Aspartat	2,3-14	11
Serin	1,1-5,0	5,7
Treonin	1,0-4,3	3,8
Prolin	0,8-4,3	4,9
Alanin	0,1-4,7	4,2
Glisin	0,9-4,3	4,0
Valin	1,1-5,3	4,6
Sistein	Trace-0,9	1,7
Metionin	Trace-1,2	1,2
Isoleusin	-	4,6
Leusin	2,5-16*	7,7
Tirosin	0,8-3,3	3,4
Fenilalanin	1,1-5,2	4,8
Triptofan	0,3-1,2	1,2
Lisin	1,3-6,8	6,1
Histidin	0,6-3,2	2,5
Arginin	1,1-5,6	7,1

Keterangan : * isoleusin + leusin

Sumber : ^a Arora, 1995; D'Mello dan Walker, 1991; Mohan dan Janardhanan, 1994; Siddhuraju dan Becker, 2001.

^b Bau *et al.*, 1994.

Disamping keunggulan tanaman koro pedang yang telah disebutkan diatas, koro pedang ini juga memiliki kekurangan. Koro pedang tidak dapat dikonsumsi langsung karena mengandung beberapa senyawa toksik dan antinutrisi seperti hemaglutinin, glukosida sianogen dan oligosakarida yang

dapat menyebabkan flatulensi (Ekanayake *et al.*, 2004). Asam sianida (HCN) secara alami terdapat pada umbi-umbian serta koro-koroan. HCN dihasilkan jika produk dihancurkan, dikunyah, diiris atau diolah. Jika dicerna, HCN sangat cepat terserap oleh alat pencernaan masuk ke dalam saluran darah dan terikat bersama oksigen. Bahaya HCN terutama pada sistem pernafasan, dimana oksigen dalam darah terikat oleh senyawa HCN dan terganggunya sistem pernafasan (sulit bernafas). Sementara itu lethal dosis bagi HCN yaitu 50-60 mg/kg berat badan.

Kadar HCN dapat diturunkan dengan berbagai perlakuan sederhana yaitu perendaman, pemanasan dan fermentasi oleh jamur. Perlakuan perendaman menunjukkan bahwa terjadi penurunan dari biji kering. Hal ini disebabkan karena HCN bersifat sangat larut dalam air (Kanetro dan Hastuti, 2006), sehingga selama perendaman HCN dalam koro terlarut dalam air ketika air diganti maka HCN dalam koro akan ikut terbang. Pemanasan, dalam hal ini adalah pengukusan, perebusan dan presto merupakan cara yang cukup efektif untuk menghilangkan HCN karena titik didih HCN adalah 26,5°C, sehingga HCN ikut menguap selama pemanasan. Perlakuan presto menyebabkan kadar HCN mengalami penurunan paling besar karena suhu yang digunakan paling tinggi yaitu 115°C. Proses fermentasi sangat efektif menghilangkan kadar HCN dalam koro. Kadar HCN koro benguk dan koro putih dengan berbagai perlakuan (mg/ 100 g) dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Kadar HCN koro benguk dan koro putih dengan berbagai perlakuan (mg/100 g)

Variabel	Koro benguk		Koro putih
	Biji utuh ^a	Biji kupas ^a	Biji utuh ^b
Biji kering	11.050	10.070	26,17
Direndam 1 hari	9.992	5.568	17,02
Direndam 2 hari	2.348	1.452	6,34
Direndam 3 hari	0.310	0.265	3,79
Kukus	-	-	2,92
Rebus	-	-	2,82
Presto	-	-	2,76
Tempe	-	0.000	-

Sumber : ^a Handajani (1993)

^b Handajani dan Windi (1996)

2.2. Kecap

Dalam Rencana SNI (Anonim, 2011), kecap manis adalah produk berbentuk cair yang dibuat dari cairan hasil fermentasi kedelai atau bungkil kedelai ditambah gula dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan yang diijinkan. Cairan hasil fermentasi kedelai adalah ekstrak hasil fermentasi kedelai atau bungkil kedelai oleh kapang *Aspergillus oryzae* atau jenis kapang yang lain yang tidak membentuk mikotoksin serta khamir bila diperlukan dengan atau tanpa penambahan enzim selama proses fermentasi dalam larutan garam.

Menurut Nunomura dan Sasaki (1992), kecap di dunia dibagi menjadi dua kategori berdasarkan cara pembuatannya yaitu kecap fermentasi dan kecap yang dibuat secara hidrolisis kimia. Kecap fermentasi dibuat menggunakan mikroorganisme dalam proses pembuatannya. Kecap fermentasi diklasifikasikan menjadi dua yaitu kecap Jepang dan kecap Cina.

Pada pembuatan kecap Jepang digunakan gandum dan kedelai dalam jumlah yang sama, sedangkan pada pembuatan kecap Cina hanya menggunakan kedelai atau ditambahkan gandum dengan jumlah yang lebih sedikit dari jumlah kedelai. Gandum pada proses pembuatan kecap dapat meningkatkan aktivitas fermentasi sehingga menghasilkan flavor yang lebih kuat dan beragam dibandingkan jika hanya menggunakan kedelai. Selain itu, gula yang terkandung dalam gandum juga dapat meningkatkan rasa manis dari kecap (Jeong *et al.*, 2004).

Dari segi prosedur pembuatan kecap, kecap Jepang mengalami proses pasteurisasi sedangkan kecap Cina mengalami proses pemasakan (Nunomura dan Sasaki, 1986). Pada tahapan fermentasi koji, kecap Jepang diinokulasi oleh jamur *Aspergillus* saja yaitu *A. oryzae* dan *A. sojae*, sedangkan pada tahapan fermentasi koji kecap Cina menggunakan jamur *Aspergillus*, *Rhizopus* dan *Mucor*. Beberapa pembuat kecap di Indonesia menginokulasi kedelai dengan *Rhizopus oligosporus* pada tahap fermentasi koji (Djien, 1982).

2.3. Fermentasi Koji

Proses fermentasi kecap terdiri dari 2 tahap, yaitu fermentasi koji dan fermentasi moromi. Fermentasi koji adalah fermentasi oleh jamur. Pada fermentasi koji digunakan starter jamur dengan karakteristik berikut : laju germinasi spora tinggi, jumlah jamur asing rendah, dapat diawetkan dengan

pengeringan serta sekresi protease banyak (Huang dan Teng, 2004). Starter jamur yang biasa digunakan dalam pembuatan koji adalah starter *Aspergillus sojae* dan *Aspergillus oryzae*. Jumlah starter jamur yang ditambahkan adalah 0,1-0,2% dari gabungan *A. sojae* dan *A. oryzae* (Luh, 1994).

A. oryzae hanya bereproduksi secara aseksual dan mempunyai kemampuan menggunakan pati, oligosakarida, gula sederhana, asam organik dan alkohol sebagai sumber karbon, serta protein, asam amino dan urea sebagai sumber nitrogen. *A. oryzae* bersifat aerobik dengan pertumbuhan paling optimal pada pH 6,0, suhu 37°C dan kandungan air 50% dalam media. Ketika pasokan udara terbatas atau kandungan air dibawah 30% maka pertumbuhan akan menurun. Ketika temperatur di bawah 28°C maka pertumbuhan juga akan menurun tetapi aktivitas enzim tetap tinggi (Liu, 2004).

Penggunaan campuran *A. oryzae* dan *A. sojae* pada fermentasi koji akan menghasilkan berbagai enzim yang akan memberikan cita rasa dan flavor yang lebih enak. Selama fermentasi koji, *Aspergillus sojae* menghasilkan enzim proteolitik dan glutaminase, sedangkan *Aspergillus oryzae* mampu menghasilkan enzim proteolitik dan amilolitik (Huang dan Teng, 2004).

Jenis enzim proteolitik yang dihasilkan jamur pada fermentasi koji adalah protease dan peptidase. Protease merupakan endoenzim, yaitu enzim yang memotong ikatan rantai suatu polimer dari arah dalam. Enzim ini akan

menghidrolisis protein menjadi peptida. Menurut Fukushima (2004) terdapat tujuh macam protease pada koji dengan pH optimum yang berbeda (Tabel 4).

Tabel 4. Protease pada koji

Protease	Berat Molekul (x 10 ³)	pH Optimum
Basa	23	10.5
Semi-basa	32	8.3
Netral I	41	7.0
Netral II	19	6.0
Asam I	39	3.2
Asam II	100	3.0
Asam III	31	3.0

Sumber: Fukushima (2004)

Peptidase merupakan eksoenzim, yaitu enzim yang memotong ikatan rantai suatu polimer dari arah ujung atau luar. Ada dua jenis peptidase pada koji, yaitu karboksipeptidase (empat macam) dan aminopeptidase (tujuh macam) seperti yang ditunjukkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Peptidase pada koji

Peptidase	Berat Molekul (x 10 ³)	pH Optimum
Karboksipeptidase Asam		
I	120	3 – 4
II	105	3 – 4
III	61	3
IV	43	3 – 4
Leusin Aminopeptidase		
I	27	8.5
II	61	5 – 8
III	55	8.0
IV	130	7.0
V	100	–
VI	39	–
VII	170	–
Arylamidase	130	8.5

Sumber: Fukushima (2004)

Perbedaan antara karboksipeptidase dengan aminopeptidase adalah arah pemotongan. Karboksipeptidase memotong peptida dari gugus karboksinya, sedangkan aminopeptidase memotong peptida dari gugus aminonya. Aktivitas kedua enzim ini menghasilkan asam-asam amino yang berperan penting dalam pembentukan flavor kecap. Selain itu, asam-asam amino ini juga akan digunakan oleh bakteri dalam fermentasi moromi.

Protein pada kedelai dan gandum mengandung cukup banyak glutamin dan asam glutamat, sebagai hasil dari pemecahan rantai polipeptida. Sebagian dari glutamin akan diubah menjadi asam glutamat oleh glutaminase pada koji. Sisa dari glutamin akan dengan mudah berubah menjadi asam piroglutamat yang tidak memberikan dampak pada flavor kecap. Glutaminase sangat diperlukan dalam mengubah glutamin menjadi asam glutamat yang merupakan salah satu komponen penting dalam pembentukan flavor kecap karena akan menimbulkan flavor umami/ gurih (Fukushima, 2004).

2.4. Fermentasi Moromi

Tahap kedua dalam fermentasi kecap adalah fermentasi moromi. Fermentasi moromi dimulai dengan perendaman koji dalam larutan garam konsentrasi tinggi (24%). Mikrobia yang berperan adalah bakteri asam laktat halofilik dan yeast osmofilik atau yang toleran terhadap garam. Konsentrasi garam sebesar 16-19 % (b/v) dianggap dapat menghambat pertumbuhan mikroba yang tidak dikehendaki. Akan tetapi konsentrasi garam yang umum

digunakan dalam fermentasi kecap di Jepang yaitu 22-25% (b/v) (Fukushima, 2004).

Konsentrasi garam yang tinggi dalam fermentasi moromi efektif mencegah pertumbuhan mikroorganisme yang tidak diinginkan. Hanya mikroorganisme yang bersifat halofilik dapat bertahan hidup pada moromi, seperti *Tetragenococcus halophilus* (bakteri asam laktat halofilik, disebut juga *Pediococcus halophilus*), *Zygosaccharomyces rouxii* (*salt-tolerant yeast*) dan beberapa spesies *Candida* (juga termasuk kelompok *salt-tolerant yeast*) (Nunomura dan Sasaki, 1992).

Suhu pada fermentasi moromi merupakan faktor penting dalam proses *aging* dan menentukan kualitas kecap. Dari hasil penelitian terdahulu, peneliti menyarankan agar pada saat *aging* kecap lebih baik suhu dipertahankan pada 15°C selama bulan pertama fermentasi dan bertahap dinaikkan menjadi 30°C (Chou dan Ling, 1999; Iwasaki *et al.*, 1993). Kemudian, Jansen *et al.*, (2003) menemukan bahwa produksi fusel alkohol sebagai senyawa flavor dalam kecap yang diproduksi oleh *Z. rouxii* juga tergantung pada suhu fermentasi. Penelitian Wu *et al.*, (2010) melaporkan bahwa perbedaan suhu (25, 35 dan 45°C) akan mempengaruhi kandungan etanol dan pH, tetapi kandungan total nitrogen tidak berpengaruh.

Pada fermentasi moromi, enzim-enzim yang dihasilkan *Aspergillus* tetap bekerja menghidrolisis sebagian besar protein dalam bahan menjadi gula dan asam amino (Yong dan Wood, 1977). Gula dan asam amino ini

diubah oleh bakteri asam laktat yang tahan garam (*Tetragenococcus halophilus*) dan yeast (*Zygosaccharomyces rouxii* dan spesies *Candida*) selama fermentasi moromi.

Tahap awal dari fermentasi moromi, *Tetragenococcus halophilus* tumbuh dan menghasilkan asam laktat yang mengakibatkan penurunan pH moromi. Bakteri ini bersifat halofilik dan fakultatif anaerob. Aw optimum bagi pertumbuhan bakteri ini yaitu 0,99-0,94, yang setara dengan Aw media dengan kadar garam 5-10% (b/v). Aw minimum bagi pertumbuhan bakteri ini adalah 0,808, setara dengan Aw media dengan kadar garam 24% (b/v). Suhu optimum bagi pertumbuhan *Pediococcus halophilus* adalah 25-30°C (Fukushima, 2004). Setelah pH turun sekitar 5,0, *Zygosaccharomyces rouxii* tumbuh sehingga terjadi fermentasi alkohol. Hasil fermentasi alkohol ini adalah 2% etanol dan beberapa alkohol yang lain serta 4-hydroxyfuranones yang membentuk komponen flavor dari moromi. Akan tetapi fermentasi alkohol ini terbatas, karena jumlah gula yang tersedia dan adanya efek penghambatan dari kandungan nitrogen yang tinggi. Pada tahap tengah dan akhir dari fermentasi dalam larutan garam, yeast dari spesies *Candida* sering tumbuh. Kisaran suhu optimum untuk pertumbuhan *Z. rouxii* adalah 20–35°C pada media bebas garam dan suhu diatas 40°C pada media garam 18% (b/v). Sedangkan kisaran suhu optimum untuk pertumbuhan spesies *Candida* adalah 20–30°C pada media bebas garam dan suhu diatas 35°C pada media garam 18% (b/v) (Fukushima, 2004). Yeast ini merupakan yeast yang tahan

garam dan mampu memproduksi senyawa fenolik serta beberapa senyawa aroma khas kecap seperti *4-ethylguaiacol* dan *4-ethylphenol* (Sluis *et al.*, 2001).

Selain *4-ethylguaiacol* dan *4-ethylphenol*, masih banyak lagi komponen flavor yang dihasilkan selama fermentasi moromi, baik yang berasal dari hasil fermentasi bakteri asam laktat (BAL), yeast maupun dari turunan-turunan hasil fermentasi tersebut. Moromi akan mengalami pencoklatan selama proses fermentasi berlangsung. Hal ini disebabkan karena adanya reaksi Maillard, yaitu reaksi antara gula reduksi pada karbohidrat dengan gugus amina pada protein dalam moromi (Fukushima, 2004).

Fermentasi moromi berperan dalam pembentukan prekursor flavor kecap manis. Moromi yang telah difermentasi disaring dan diambil filtratnya kemudian dimasak. Setelah selesai pemasakan, disaring dalam keadaan panas (Nunomura dan Sasaki, 1986). Syarat mutu kecap kedelai manis sesuai dengan Rencana SNI (Anonim, 2011) dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Syarat mutu kecap kedelai manis

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	Normal, khas
1.2	Rasa	-	Normal, khas
2	Kadar protein (Nx6,25)	% (b/b)	Min. 1
3	Kadar gula (dihitung sebagai sakarosa)	% (b/b)	Min. 30
4	pH	-	3,5-6,0
5	Cemaran logam		
5.1	Timbal (Pb)	mg/kg	Maks. 1,0
5.2	Kadmium (Cd)	mg/kg	Maks. 0,2
5.3	Timah (Sn)	mg/kg	Maks. 40,0
5.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	Maks. 0,05
6	Cemaran arsen (As)	mg/kg	Maks. 0,5
7	Cemaran mikroba		
7.1	Bakteri koliform	APM/g	< 3
7.2	Kapang	Koloni/g	Maks. 50
7.3	Khamir	Koloni/g	Maks. 50

Sumber: Anonim (2011)

2.5. Flavor

Flavor merupakan sensasi yang dihasilkan oleh suatu bahan yang diletakkan dalam mulut atau suatu atribut bahan yang sedang dirasakan. Atribut ini adalah gabungan karakteristik bahan yang menghasilkan sensasi (Fisher dan Scott, 1997).

Penelitian awal mengenai flavor kecap Jepang dilakukan oleh Tawara pada tahun 1887, kemudian dilanjutkan oleh Yukawa tahun 1916 (Yokotsuka, 1986). Mulanya peneliti beranggapan bahwa leusin adalah senyawa yang berperan terhadap flavor kecap Jepang dan penelitian selanjutnya yang mereka lakukan didapatkan bahwa senyawa keton dan

aldehid pun berperan terhadap pembentukan flavor kecap Jepang. Sejalan dengan berkembangnya alat instrumental untuk analisis bahan pangan, maka sejak awal tahun 1950 penelitian mengenai flavor kecap jepang telah intensif dilakukan dan telah berhasil diisolasi sekitar 300 komponen volatil kecap Jepang (Yokotsuka, 1986).

Senyawa yang telah berhasil diisolasi dari kecap jepang adalah 37 komponen hidrokarbon, 32 alkohol, 41 ester, 15 aldehid, 4 asetal, 19 keton, 24 asam, 17 fenolik, 16 furan, 8 lakton, 6 furanon, 5 piron, 27 pirazin, 7 piridin, 6 senyawa nitrogen, 16 senyawa yang mengandung sulfur, 4 tiazol dan 3 senyawa terpen (Yokotsuka, 1986).

Menurut Fukushima (2004), komponen flavor yang dominan pada moromi adalah ethanol, asam laktat, gliserol, asam asetat, 4-hidroksi-5-metil-3(2H)-furanone (HMMF), 2,3-butandiol, isovaleraldehid dan 4-hidroksi-2(atau 5)-etil-5(atau 2)-metil-3(2H)-furanon (HEMF). Di antara komponen-komponen tersebut, HEMF dan HMMF merupakan komponen yang penting. HEMF memberikan aroma manis seperti karamel, sedangkan HMMF memberikan flavor daging (*meaty / beefy flavor*). Menurut Hayashida dan Slaughter (1997), kedua komponen flavor ini diproduksi secara spontan melalui reaksi antara asam amino glisin atau alanin dengan gula seperti xylosa, atau bisa juga diproduksi dari fermentasi yeast, baik oleh *Zygosaccharomyces rouxii* maupun *Saccharomyces cerevisiae*. Komponen

flavor dan prekursor yang terbentuk selama fermentasi dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Komponen flavor dan prekursor yang terbentuk selama fermentasi

Senyawa	Komponen	Prekursor
Alkohol	Isobutanol	Valin
	n-Butanol	Isoleusin dan Leusin
	Isoamil alkohol	Metionin
	Aseton	Fenilalanin
	Asetoin	Asam ferulik
	2,3-Butanediol	
	Furfuril alkohol	
	Metionol	
	2-Penil etanol	
	Maltol	
	4-Etil guaiacol	
Asam	Asam asetat	Pentosa
	Asam laktat	Heksosa
	Asam suksinat	
Furanon	HDMF	Asam amino dan gula reduksi
	HEMF	
	HMF	
Pirazin	Metilpirazin	Treonin
	2,6-dimetilpirazin	
Esters	Etil laktat	Asam laktat
	Diethyl suksinat	Asam suksinat, Asam lemak dan Etanol

Sumber: Huang dan Teng (2004)

Reaksi pencoklatan nonenzimatis diduga juga merupakan jalur penting pembentukan flavor kecap manis pada saat pemanasan, yaitu terjadinya reaksi antara gula reduksi dari gula palma dengan senyawa beramino hasil dekomposisi protein pada proses fermentasi moromi (Nunomura dan Sasaki, 1992).

Senyawa yang berperan pada flavor kecap Jepang adalah senyawa fenol dan senyawa furanon serta piran yang memberikan aroma karamel. Senyawa fenol seperti *4-etilgualakol (4-etil-2-metoksifenol)* memberikan flavor penting pada kecap Jepang. Dilaporkan bahwa *4-etilgualakol* ini dihasilkan oleh *Candida torulopsis* selama fermentasi koji menjadi moromi (Nunomura dan Sasaki, 1992) dan jumlah senyawa ini mengalami peningkatan selama pasteurisasi pada suhu 115°C.

Pada tahun 1997, Blank melaporkan bahwa sebenarnya HEMF merupakan senyawa yang berasal dari reaksi Maillard dengan prekursor gula-gula pentosa. Gula-gula pentosa dihasilkan dari degradasi enzimatik kedelai dan gandum, yang mulai terbentuk pada pembentukan koji. Senyawa lain seperti HMF merupakan produk degradasi selama pasteurisasi kecap Jepang melalui jalur *3-deoksiglukoson* seperti: *3-deoksi-D-glukoson* dan *3-deoksigalaktoson* (Yokotsuka, 1986). Senyawa HDMF mempunyai proporsi yang rendah dibanding senyawa lain yang berperan pada flavor kecap Jepang seperti HEMF dan HMF, karena senyawa HDMF sangat tidak stabil dan apabila dipanaskan pada suhu 160°C akan berubah menjadi senyawa *3(2H)-furanon*, *2-dimetil-3(2H)-furanon* dan senyawa karbonil seperti: asetaldehid, aseton, metil etilketon, 2,3-butanadion dan hidroksiaseton (Seo *et al.*, 1996).

2.6. Hipotesis

1. Fermentasi koji dapat mengurangi kadar HCN koro pedang.
2. Fermentasi moromi di luar laboratorium akan memberikan kondisi suhu moromi lebih tinggi dan mempercepat pembentukan flavor.

UNIVERSITAS TERBUKA

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioteknologi FTP UGM untuk analisis mikrobiologi, Laboratorium Rekayasa dan Pengolahan Pangan (RPP) FTP UGM untuk preparasi bahan baku, Laboratorium Kimia dan Biokimia Pangan (KBP) FTP UGM untuk analisis kimia, Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM untuk analisis profil asam amino dan Laboratorium Balai Besar Penelitian Tanaman Padi Sukamandi untuk analisis flavor.

3.2. Bahan

3.2.1. Bahan untuk Fermentasi Koji dan Moromi

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah koro pedang dari Wonogiri, isolat *Aspergillus oryzae* dan *Aspergillus sojae* dari Laboratorium Bioteknologi FTP UGM, larutan asam laktat 0,1% dan larutan NaCl 24%.

3.2.2. Bahan untuk Analisis Mikrobiologi

Bahan-bahan yang digunakan untuk analisis mikrobiologi adalah media pertumbuhan bagi mikrobia, meliputi *MRSA* + CaCO_3 0,5% untuk bakteri asam laktat (BAL), *Pepton Glucose Yeast (PGY) Agar* +

asam laktat 0,1 % untuk yeast, dan *Skim Milk Agar* untuk bakteri proteolitik. Selain itu, diperlukan NaCl dan aquades untuk larutan pengencer.

3.2.3. Bahan untuk Analisis Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah kalium oksalat, NaOH 0,1 N, formaldehid, indikator PP, katalisator N, H₂SO₄ pekat, NaOH-Na₂S₂O₄, asam borat, indikator BCG-MR, HCl 0,02 N, larutan Orthophalaldehid (OPA), NaOH 6 N, asam oksalat 15%, aquades, larutan Pb-asetat 40%, asam pikrat basa 0,5%, KCN, aquades dan kertas saring.

3.3. Alat

3.3.1. Peralatan untuk Fermentasi Koji dan Moromi

Peralatan yang digunakan untuk fermentasi koji dan moromi adalah autoklaf, oven, rak, kompor gas, nampan, toples plastik ukuran 15 liter, neraca analitik dan panci.

3.3.2. Peralatan untuk Analisis Mikrobiologi

Peralatan yang digunakan untuk analisis mikrobiologi adalah *laminar flow* (LABCONCO), inkubator (SANYO), autoklaf, pemanas, mikropipet, cawan petri dan peralatan gelas.

3.3.3. Peralatan untuk Analisis Kimia

Peralatan yang digunakan untuk analisis kimia adalah *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merk *Knauer* [kolom *Eurospher 100-5 C18*, 250x4 dengan *precolumn* P/N: I115Y535, *Solid-Phase Microextraction* (SPME), *Gas Chromatography Mass Spectrometry Olfactometry* (GCMSO), spektrofotometer, waterbath, oven, timbangan analitik, desikator, pH-meter, termometer dan peralatan gelas.

3.4. Tahap Penelitian

Tahap penelitian ini yaitu:

1. Preparasi Bahan Baku (Pengecilan Ukuran)
2. Fermentasi Kecap Koro Pedang (Fermentasi Koji dan Fermentasi Moromi)

Penelitian ini dilakukan dengan dua tahap yaitu preparasi bahan baku dan fermentasi kecap koro pedang. Preparasi bahan baku yaitu pengecilan ukuran. Pengecilan ukuran dilakukan dengan alat *disintegrator*. Fermentasi kecap koro pedang dilakukan 2 *batch*. Masing-masing *batch* meliputi dua tahap, yaitu tahap fermentasi koji dan tahap fermentasi moromi. Pada tahap fermentasi moromi diberi perlakuan perbedaan kondisi fermentasi yaitu:

A = Fermentasi moromi di dalam laboratorium

B = Fermentasi moromi di luar laboratorium (dibagian atas selasar lantai 4 yang jika cuaca tidak berawan terpapar sinar matahari sepanjang hari). Untuk selanjutnya disebut di luar laboratorium.

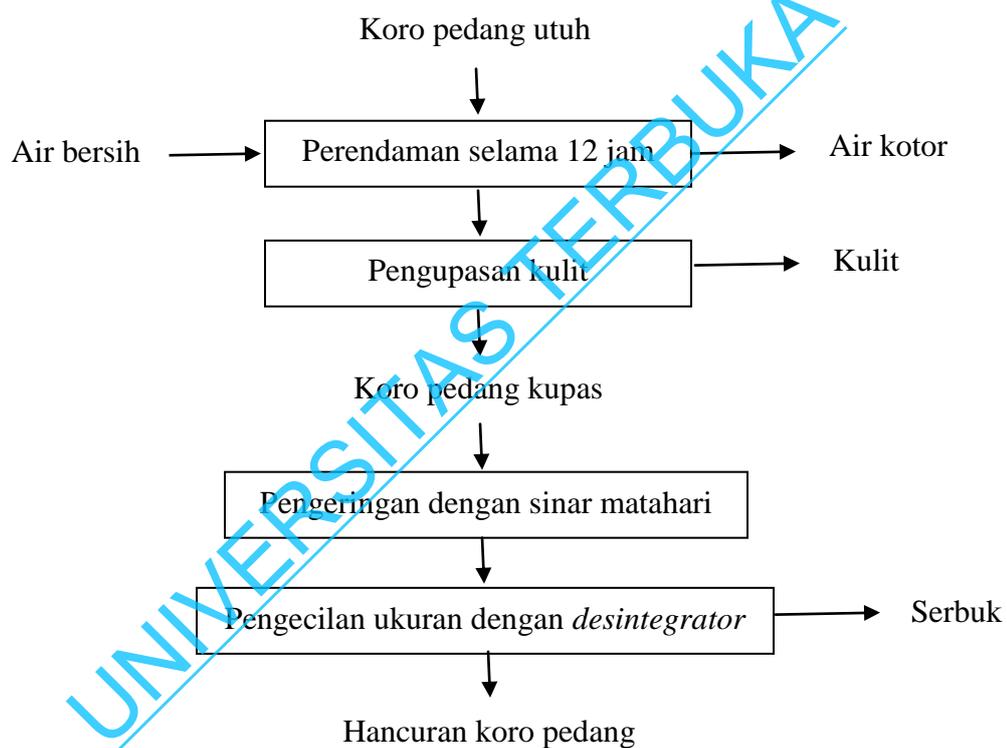
Kondisi fermentasi di dalam laboratorium adalah moromi di letakkan dalam wadah toples 15 liter tertutup dan di dalam laboratorium, sedangkan di luar laboratorium adalah moromi di letakkan dalam wadah toples 15 liter tertutup dan di luar laboratorium yang terpapar sinar matahari. Setiap hari dilakukan pengadukan sekali.

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Pengecilan Ukuran

Tahap pendahuluan dilakukan untuk preparasi bahan baku yaitu pengecilan ukuran koro pedang. Langkah-langkah penelitian pendahuluan adalah koro pedang utuh direndam selama 12 jam pada suhu kamar. Tujuan perendaman 12 jam adalah memberikan kesempatan pada koro pedang untuk menyerap air. Perbandingan air dan biji yang digunakan adalah sebanyak 2:1 (v/b) agar air yang tersedia cukup untuk diserap oleh biji koro pedang sehingga mudah dalam proses pengupasan. Pengupasan kulit koro pedang lebih mudah dilakukan saat masih dalam bentuk biji utuh daripada biji pecah. Kemudian koro pedang kupas dikeringkan dengan sinar matahari supaya mudah dalam proses

pegecilan ukuran, meningkatkan rendemen dan memudahkan penyimpanan. Koro pedang kering dikecilkan ukuran dengan alat *desintegrator* (Lampiran 1) sehingga diperoleh hancuran koro pedang dan serbuk. Hancuran koro pedang digunakan untuk fermentasi kecap koro pedang. Diagram alir pengecilan ukuran koro pedang dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Gaftar alir pengecilan ukuran koro pedang

3.5.2. Fermentasi Kecap Koro Pedang

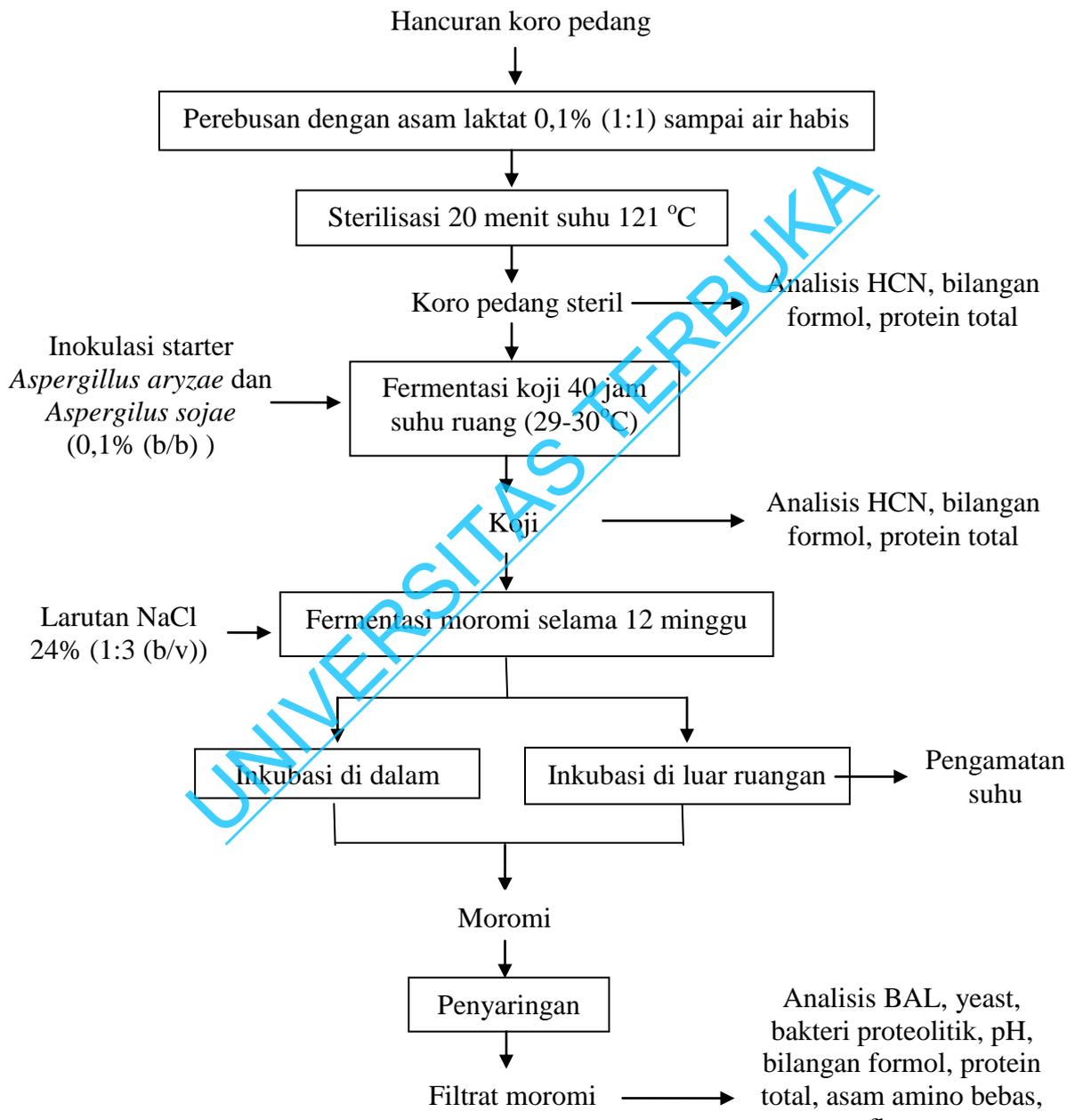
Langkah-langkah yang dilakukan adalah hancuran koro pedang sebanyak 2 kilogram direbus dalam larutan asam laktat 0,1% sampai air habis dengan perbandingan larutan asam laktat : koro pedang (1:1 (v/b)).

Koro pedang rebus kemudian disterilisasi (sterilisasi basah) dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 20 menit sehingga diperoleh koro pedang steril. Koro pedang steril diambil sampelnya untuk analisis HCN, protein total dan bilangan formol. Koro pedang steril diinokulasi dengan starter *Aspergillus sojae* dan *Aspergillus oryzae* masing-masing sebanyak 0,05% (b/b) dari berat hancuran koro pedang, lalu diinkubasi pada suhu ruang (29-30°C) selama 40 jam sehingga dihasilkan koji. Koji diambil sampelnya untuk analisis HCN, protein total dan bilangan formol.

Langkah-langkah dalam fermentasi moromi adalah koji direndam larutan NaCl 24 % perbandingan 1:3 (b/v) dalam wadah toples 15 liter. Kemudian dilakukan inkubasi dengan kondisi fermentasi moromi yang berbeda yaitu inkubasi di dalam dan di luar laboratorium (dibagian atas selasar lantai 4 yang jika tidak berawan terpapar sinar matahari sepanjang hari) sehingga dihasilkan moromi. Selama inkubasi, dilakukan pengamatan suhu pada moromi setiap dua hari sekali dengan tiga titik (tepi kanan, tengah dan tepi kiri) sampai di bagian tengah wadah toples.

Moromi diambil sampelnya untuk analisis mikrobiologi dan kimia. Analisis mikrobiologi pada 0, 1, 2, sampai 12 minggu meliputi analisis pertumbuhan bakteri asam laktat (BAL), analisis pertumbuhan yeast dan analisis pertumbuhan bakteri proteolitik, sedangkan analisis kimia pada 0, 1, 2, sampai 12 minggu meliputi analisis pH, bilangan

formol dan total protein. Pada 12 minggu juga dilakukan analisis asam amino bebas dan flavor. Diagram alir penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Gaftar alir fermentasi moromi koro pedang

3.6. Metode Analisis

3.6.1. Analisis Kimia Sebelum dan Setelah Fermentasi Koji

3.6.1.1. HCN

Analisis HCN dilakukan menggunakan metode Sudarmadji *et al.*, 1981. Prosedur analisis HCN dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.6.1.1. Bilangan formol

Analisis bilangan formol dilakukan menggunakan metode titrasi. Prosedur analisis bilangan formol dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.6.1.2. Protein Total

Analisis protein total dilakukan menggunakan metode mikro Kjeldahl. Prosedur analisis protein total dapat dilihat pada Lampiran 4.

3.6.2. Analisis Mikrobiologi pada Moromi

3.6.2.1. Pertumbuhan BAL Selama Fermentasi Moromi

Analisis pertumbuhan BAL pada moromi menggunakan metode *dillution and plating* dari AOAC (Anonim, 1995) dengan cara *pour plate*. Pengamatan pertumbuhan BAL dilakukan dengan interval waktu seminggu sekali selama 12 minggu melalui penghitungan koloni spesifik BAL yang tumbuh pada media *MRS Agar + CaCO₃ 0,5%* dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Pertumbuhan BAL diidentifikasi dengan ciri-ciri berbentuk

bulat kecil dan terdapat zona bening pada media di sekitar koloni tersebut.

3.6.2.2. Pertumbuhan Yeast Selama Fermentasi Moromi

Analisis pertumbuhan yeast pada moromi menggunakan metode *dillution and plating* dari AOAC (Anonim, 1995) dengan cara *spread plate*. Pengamatan pertumbuhan yeast dilakukan dengan interval waktu seminggu sekali selama 12 minggu melalui penghitungan koloni spesifik yeast yang tumbuh pada media *PGY Agar* + asam laktat 0,1% dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pertumbuhan yeast diidentifikasi dengan ciri-ciri berbentuk bulat-kecil dan berwarna putih.

3.6.2.3. Pertumbuhan Bakteri Proteolitik Selama Fermentasi Moromi

Analisis pertumbuhan bakteri proteolitik pada moromi menggunakan metode *dillution and plating* dari AOAC (Anonim, 1995) dengan cara *pour plate*. Pengamatan pertumbuhan bakteri dilakukan dengan interval waktu seminggu sekali selama 12 minggu melalui penghitungan koloni spesifik bakteri proteolitik yang tumbuh pada media *Skim Milk Agar* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Pertumbuhan bakteri proteolitik diidentifikasi dengan ciri-ciri berbentuk bulat kecil dan terdapat zona bening pada media di sekitar koloni tersebut.

3.6.3. Analisis Kimia pada Moromi

3.6.3.1. pH

Analisis pH dilakukan dengan menggunakan pH-meter. Adapun prosedur analisisnya adalah sebagai berikut: sampel moromi diukur nilai pH dengan menggunakan pH-meter yang telah dikalibrasi dengan dua macam buffer, yaitu buffer pH 4 dan pH 7.

3.6.3.2. Bilangan Formol

Analisis bilangan formol dilakukan menggunakan metode titrasi. Prosedur analisis bilangan formol dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.6.3.3. Protein Total

Analisis protein total dilakukan menggunakan metode mikro Kjeldahl. Prosedur analisis protein total dapat dilihat pada Lampiran 4.

3.6.3.4. Profil Asam Amino Bebas

Analisis profil asam amino dilakukan menggunakan HPLC. Prosedur analisis asam amino bebas dapat dilihat pada Lampiran 5.

3.6.3.5. Komponen Flavor

Analisis komponen flavor moromi dilaksanakan pada moromi berumur 12 minggu menggunakan SPME-GCMSO.

Prosedur analisis komponen flavor moromi dapat dilihat pada Lampiran 6.

3.7. Rancangan Percobaan

Penelitian ini akan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pada analisis kadar HCN dan perbandingan antara bilangan formol dengan protein total sebelum dan sesudah fermentasi koji dengan dua kali ulangan. Data yang diperoleh diolah secara statistik dengan ANOVA tingkat signifikansi 5%. Analisis ini dilakukan menggunakan software SPSS 15.0.

UNIVERSITAS TERBUKA

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pengecilan Ukuran Koro Pedang

Pengecilan ukuran koro pedang diperoleh serbuk 15% dan hancuran koro pedang 85%. Ukuran hancuran koro pedang bervariasi yaitu kira-kira setengah, sepertiga, seperempat, seperlima, seperenam, septujuh dan seperdelapan dari koro pedang utuh. Hasil pemecahan jamur lebih banyak pada hancuran koro pedang dibandingkan dengan koro pedang utuh. Karena luas permukaan dan penetrasi miselia lebih baik pada hancuran koro pedang. Hal ini berpengaruh terhadap banyaknya enzim yang dihasilkan selama fermentasi koji berlangsung. Hasil pemecahan oleh enzim tersebut akan berpengaruh terhadap kadar gula reduksi dan asam amino pada koji. Chou dan Ling (1999) menyatakan bahwa perlakuan awal pada bahan baku kecap kedelai dengan metode ekstrusi akan memperbanyak aktivitas enzim pada fermentasi koji. Gambar koro pedang utuh (kiri) dan hancuran koro pedang (kanan) dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Koro pedang utuh (kiri) dan hancuran koro pedang

4. 2. Fermentasi Kecap Koro Pedang

Selama fermentasi koji dan moromi dilakukan analisis mikrobiologi dan kimia. Fermentasi moromi dikerjakan dalam dua inkubasi yang berbeda yaitu di dalam dan di luar laboratorium.

4. 2. 1. Kadar HCN

Asam sianida merupakan komponen antinutrisi dari koro pedang. Namun demikian, proses pengolahan sederhana seperti perendaman, pemanasan ataupun fermentasi oleh jamur dapat meminimalkan senyawa-senyawa tersebut sehingga koro pedang aman dikonsumsi. Hasil analisis kadar HCN sebelum dan sesudah fermentasi dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Kadar HCN sebelum dan sesudah fermentasi koji

Sampel	HCN (ppm)
Sebelum fermentasi koji	156,908 a \pm 0,0007
Sesudah fermentasi koji	15,646 b \pm 0,5360

Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5%

Hasil uji anova kadar HCN sebelum dan sesudah fermentasi koji berbeda nyata pada taraf 5% (Lampiran 8). Dari Tabel 8 terlihat bahwa fermentasi koji efektif mengurangi kadar HCN koro pedang. Hal ini disebabkan *A. oryzae* dan *A. sojae* mempunyai aktivitas β -glukosidase yang dapat memotong gugus HCN. HCN terikat pada senyawa linamarin. Linamarin mempunyai rumus molekul $C_{10}H_{17}NO_6$. Linamarin terhidrolisis oleh enzim β -glukosidase menjadi glukosa, aseton dan HCN. HCN yang

terpotong kemudian menguap, karena HCN mempunyai titik didih yang rendah 26,5°C (Wedhastri, 1990).

4. 2. 2. Perbandingan antara Bilangan Formol dengan Protein Total Sebelum dan Sesudah Fermentasi Koji

Pada fermentasi koji, indikator yang digunakan untuk menilai tingkat degradasi protein yaitu dengan perbandingan antara bilangan formol dengan protein total. Hasil analisis perbandingan antara bilangan formol dengan protein total sebelum dan sesudah fermentasi koji dapat dilihat pada Tabel 9. Dari Tabel 9 terlihat bahwa tingkat degradasi protein sesudah fermentasi koji lebih tinggi sebesar 0,28 sedangkan sebelum fermentasi koji sebesar 0,15.

Tabel 9. Perbandingan bilangan formol/ protein total sebelum dan sesudah fermentasi koji

Sampel	Perbandingan bilangan formol/ protein total
Sebelum fermentasi koji	0,15 a ± 0,02664
Sesudah fermentasi koji	0,28 b ± 0,0319

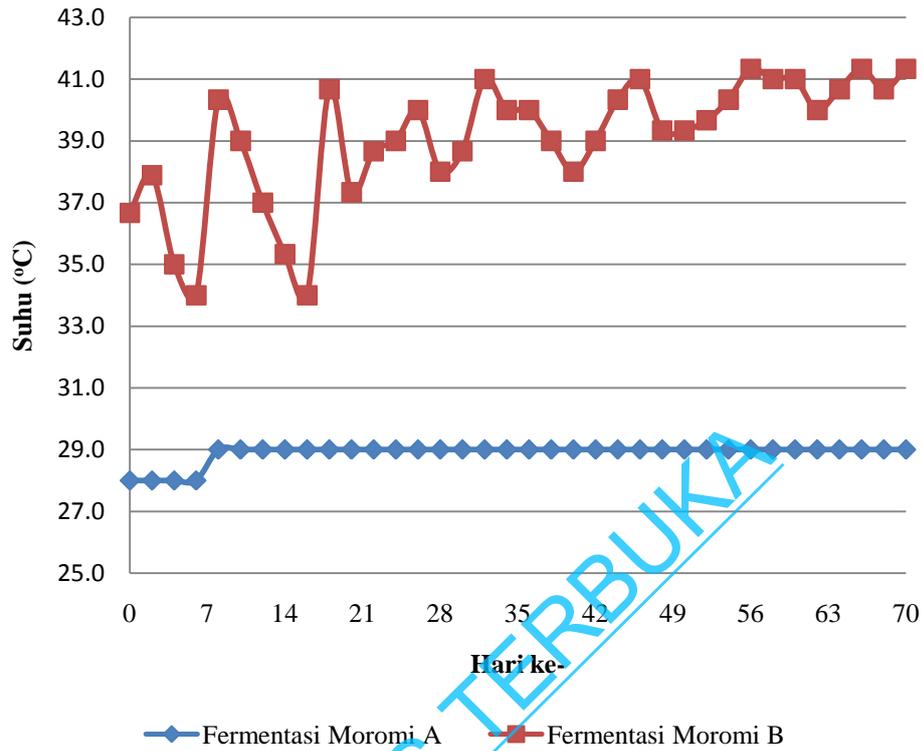
Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5%

Hasil uji anova perbandingan bilangan formol/ protein total sebelum dan sesudah fermentasi koji berbeda nyata pada taraf 5% (Lampiran 9). Perbedaan perbandingan bilangan formol/ protein total antara kedua sampel dapat disebabkan karena protein pada koji telah didegradasi oleh enzim yang dihasilkan *Aspergillus oryzae* dan *Aspergillus sojae*. Su *et al.*, (2005) menyatakan bahwa perbandingan bilangan formol/ protein total dari koji

kedelai lebih dari 0,43 akan berkontribusi terhadap pembentukan flavor yang enak.

4. 2. 3. Pengamatan Suhu Selama Fermentasi Moromi

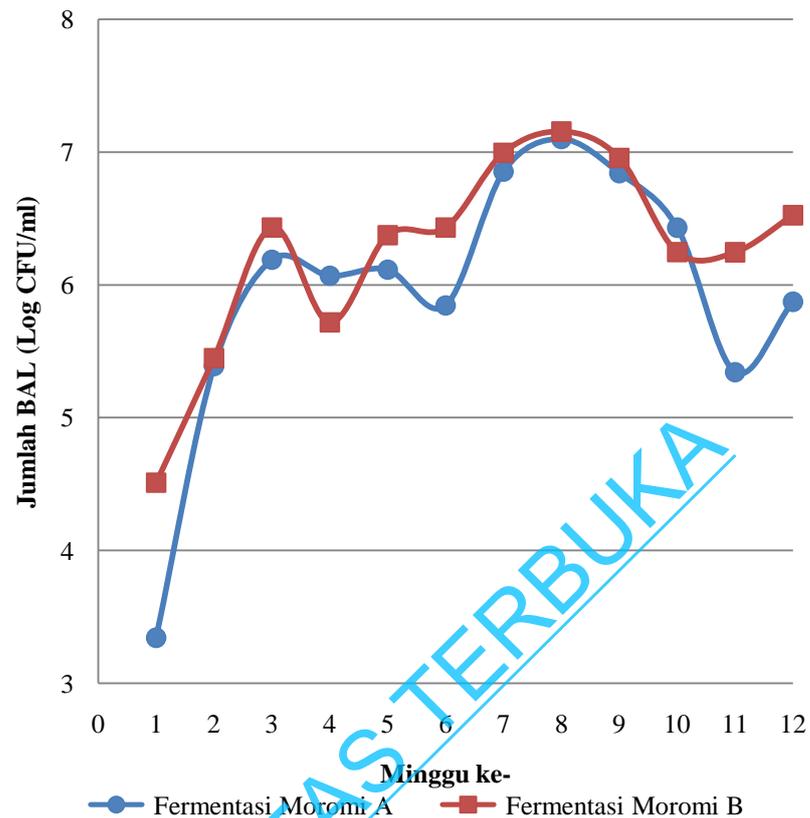
Perlakuan perbedaan kondisi fermentasi moromi memperlihatkan fermentasi moromi di dalam laboratorium suhunya lebih rendah dibandingkan dengan fermentasi moromi di luar laboratorium. Perbedaan suhu fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium dapat dilihat pada Gambar 5. Pengukuran suhu moromi selama fermentasi dapat dilihat pada Lampiran 7. Suhu moromi di dalam laboratorium sekitar 28–29°C dan suhu moromi di luar laboratorium sekitar 32–45°C. Dari Gambar 5 terlihat suhu pada fermentasi moromi di luar laboratorium meningkat pada minggu ke-4 dan stabil sampai minggu ke-12. Semakin tinggi suhu pada fermentasi moromi diharapkan semakin mempercepat reaksi kimia dan pertumbuhan mikroflora (BAL, bakteri proteolitik dan yeast). Sehingga akan mempercepat pembentukan flavor moromi. Perlakuan pada fermentasi moromi dengan suhu dinaikkan sekitar 28-30°C akan meningkatkan produksi asam laktat dan reaksi enzimatik untuk hidrolisis bahan baku. Selain itu, fermentasi moromi dengan suhu dinaikkan sekitar 40-45°C akan meningkatkan hidrolisis enzimatik dari protein dan pati bahan baku (Huang dan Teng, 2004).



Gambar 5. Perbedaan suhu selama fermentasi moromi

4. 2. 4. Pertumbuhan BAL Selama Fermentasi Moromi

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan mikroflora yang penting dalam pembentukan flavor moromi. BAL memberikan kontribusi yang besar pada fermentasi moromi, yaitu menurunkan pH moromi sehingga cocok untuk pertumbuhan yeast. Hasil analisis pertumbuhan BAL selama fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium dapat dilihat pada Gambar 6.



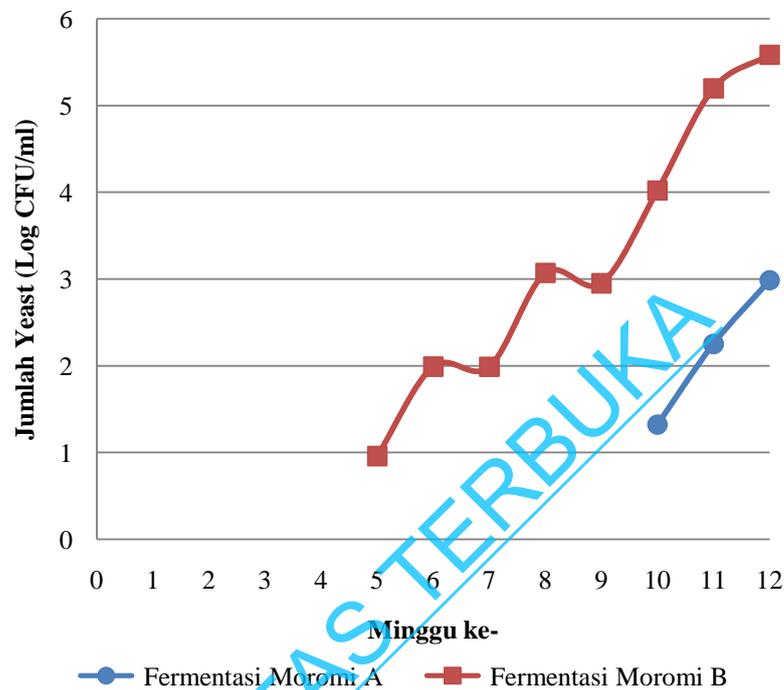
Gambar 6. Pertumbuhan bakteri asam laktat selama fermentasi

Dari Gambar 6, dapat diketahui bahwa pada awal inkubasi, pertumbuhan BAL pada fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium belum mencapai 10^1 CFU/ml. Pada minggu pertama inkubasi pertumbuhan BAL pada fermentasi moromi di luar laboratorium sebesar 10^4 CFU/ml dan fermentasi di dalam laboratorium sebesar 10^3 CFU/ml meningkat sampai minggu ketiga. Dari Gambar 6, dapat diketahui bahwa jumlah pertumbuhan BAL selama fermentasi moromi di luar laboratorium cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan fermentasi moromi di dalam laboratorium.

4. 2. 5. Pertumbuhan Yeast Selama Fermentasi Moromi

Pertumbuhan yeast selama fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium dapat dilihat pada Gambar 7. Minggu-minggu pertama fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium belum ada pertumbuhan yeast. Pertumbuhan yeast dipengaruhi oleh faktor pH, suhu dan konsentrasi nitrogen (Liu, 2004). Yeast akan mulai tumbuh setelah pH mencapai 5,0 (Sluis *et al.*, 2001). Penurunan pH terjadi sampai pH cocok untuk pertumbuhan yeast. Yeast pada fermentasi moromi di luar laboratorium mulai tumbuh pada inkubasi minggu ke-5 sebesar 10^1 CFU/ml pada pH 5,55, sedangkan pada fermentasi moromi di dalam laboratorium baru tumbuh pada inkubasi minggu ke-10 sebesar 10^1 CFU/ml pada pH 5,32. Pada akhir fermentasi minggu ke-12, yeast pada fermentasi moromi di luar laboratorium sebesar 10^6 CFU/ml dan yeast pada fermentasi moromi di dalam laboratorium sebesar 10^3 CFU/ml. Yeast pada fermentasi moromi di luar laboratorium mulai tumbuh pada fermentasi minggu ke-5. Pertumbuhan yeast lebih cepat pada fermentasi moromi dengan suhu tinggi. Fermentasi moromi di luar laboratorium suhunya lebih tinggi daripada fermentasi moromi di dalam laboratorium (Gambar 5). Perlakuan pada fermentasi moromi dengan suhu dinaikkan sampai 40-45°C akan meningkatkan hidrolisis enzimatik dari protein dan pati bahan baku (Huang dan Teng, 2004). Menurut Jansen *et al.*, (2003) bahwa produksi fusel alkohol oleh *Z. rouxii* juga dipengaruhi oleh

suhu fermentasi. Semakin banyak populasi yeast yang tumbuh diharapkan akan membentuk flavor kecap yang enak.



Gambar 7. Pertumbuhan yeast selama fermentasi moromi

Pada penelitian ini tidak dilakukan identifikasi yeast yang tumbuh selama fermentasi kecap koro pedang. Yeast yang umumnya tumbuh pada fermentasi kecap adalah *Zygosaccharomyces rouxii* dan *Candida spesies*, yang akan mengubah gula menjadi alkohol dan komponen flavor (Nunomura dan Sasaki, 2003). Kisaran suhu optimum untuk pertumbuhan *Z. rouxii* adalah 20–35°C pada media bebas garam dan suhu diatas 40°C pada media garam 18% (b/v). Sedangkan kisaran suhu optimum untuk pertumbuhan spesies *Candida* adalah 20–30°C pada media bebas garam dan suhu diatas 35°C pada media garam 18% (b/v) (Fukushima, 2004). Pada penelitian ini,

suhu moromi di dalam laboratorium sekitar 28–29°C dan suhu moromi di luar laboratorium sekitar 32–45°C pada media garam 24% (b/v).

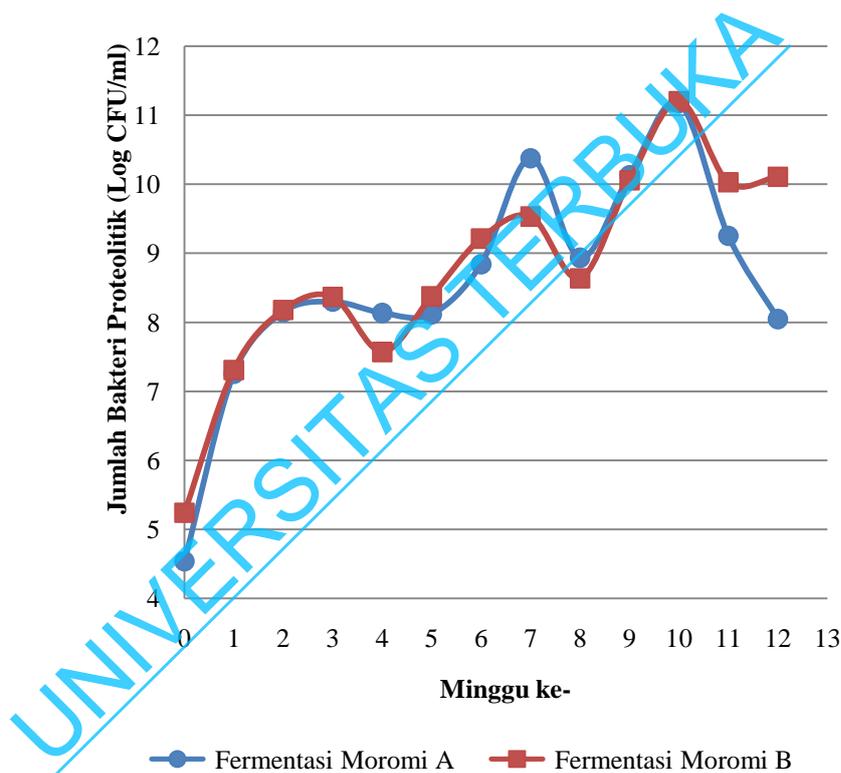
Selama proses fermentasi moromi, *Z. rouxii* memproduksi etanol dalam kondisi anaerobik dan HEMF dalam kondisi aerobik (Fukushima, 2004). Konsentrasi jumlah sel yeast secara langsung berpengaruh terhadap peningkatan etanol selama fermentasi moromi (Rolling *et al.*, 1996). *Z. rouxii* adalah yeast tahan garam 24–26% (b/v) yang penting dalam pembentukan flavor selama proses fermentasi moromi. *Z. rouxii* memproduksi isoamyl alkohol, aktif amyl alkohol dan isobutyl alkohol yang merupakan komponen penting dalam kecap. *Candida spesies* penting dalam pembentukan flavor kecap dengan membentuk komponen phenolik seperti *4-ethyl-guaiacol* (Fukushima, 2004).

4. 2. 6. Pertumbuhan Bakteri Proteolitik Selama Fermentasi Moromi

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang memproduksi protease ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel, kemudian dilepaskan keluar dari sel. Pertumbuhan bakteri proteolitik pada fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium dapat dilihat pada Gambar 8. Bakteri proteolitik ini berperan dalam pemecahan protein menjadi peptida dan asam-asam amino.

Pertumbuhan bakteri proteolitik pada awal inkubasi sudah relatif banyak. Populasi bakteri proteolitik pada awal inkubasi pada moromi di dalam laboratorium sebesar 10^4 CFU/ml dan moromi di luar laboratorium

sebesar 10^5 CFU/ml. Kemungkinan bakteri proteolitik sudah tumbuh pada saat fermentasi koji. Kemudian mengalami peningkatan jumlah populasi sampai minggu ke-7 dan pada inkubasi minggu ke-8 mengalami penurunan. Peningkatan jumlah bakteri proteolitik menunjukkan kemampuan bakteri menghidrolisis protein menjadi peptida dan asam-asam amino. Asam-asam amino ini akan diubah oleh BAL menjadi komponen flavor.



Gambar 8. Pertumbuhan bakteri proteolitik selama fermentasi moromi

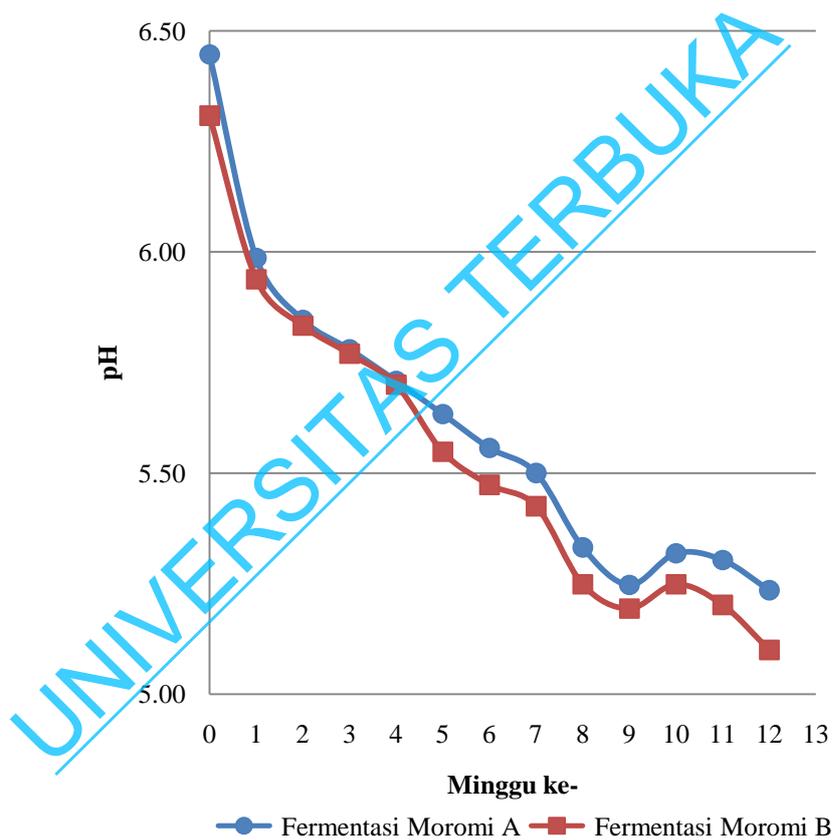
Pada inkubasi minggu ke-10 bakteri proteolitik mengalami peningkatan yaitu sebesar 10^{11} CFU/ml pada kedua sampel. Kemudian pada inkubasi minggu ke-11 dan minggu ke-12 mengalami penurunan. Penurunan populasi bakteri proteolitik disebabkan karena substrat sudah menurun.

4. 2. 7. pH Selama Fermentasi Moromi

Nilai pH menggambarkan kandungan asam suatu bahan pangan. Perubahan nilai pH selama fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium dapat dilihat pada Gambar 9. Perubahan pH moromi dipengaruhi oleh pertumbuhan BAL. Hasil ini sesuai dengan hasil analisis pertumbuhan BAL selama fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium yang dapat dilihat pada Gambar 6. Dari Gambar 6, dapat dihubungkan dengan analisis nilai pH moromi pada Gambar 9. Semakin tinggi populasi BAL maka asam laktat dan asam organik yang terbentuk semakin banyak dan pH moromi akan lebih rendah. Secara keseluruhan, pH selama fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium mengalami penurunan. Nilai pH moromi selama fermentasi moromi di luar laboratorium lebih rendah dibandingkan di dalam laboratorium. Selama tiga bulan fermentasi moromi di dalam laboratorium mengalami penurunan pH 6,45–5,24 dan di luar laboratorium 6,31–5,10. Fermentasi moromi di luar laboratorium memberikan kondisi suhu lebih tinggi dari pada fermentasi moromi di dalam laboratorium (Gambar 6). Fermentasi moromi dengan suhu dinaikkan sekitar 40-45°C akan meningkatkan hidrolisis enzimatis dari protein dan pati bahan baku (Huang dan Teng, 2004).

Nilai pH minggu ke-10 mengalami peningkatan, dimana populasi BAL mengalami penurunan. Asam laktat diproduksi oleh mikroflora dari gula sehingga menurunkan nilai pH (Yong dan Wood, 1976). Setelah pH turun

sekitar 5,0, *T. halophilus* tidak dapat tumbuh dan fermentasi alkohol oleh *Z. rouxii* dimulai (Sluis *et al.*, 2001). Penurunan pH selama fermentasi kemungkinan juga dihubungkan akumulasi dari asam lemak bebas, asam amino, dan peptida yang mengandung rantai cabang *carbolylic* sebagai hasil hidrolisis bahan baku dalam filtrat moromi. (Kim dan Lee, 2008).

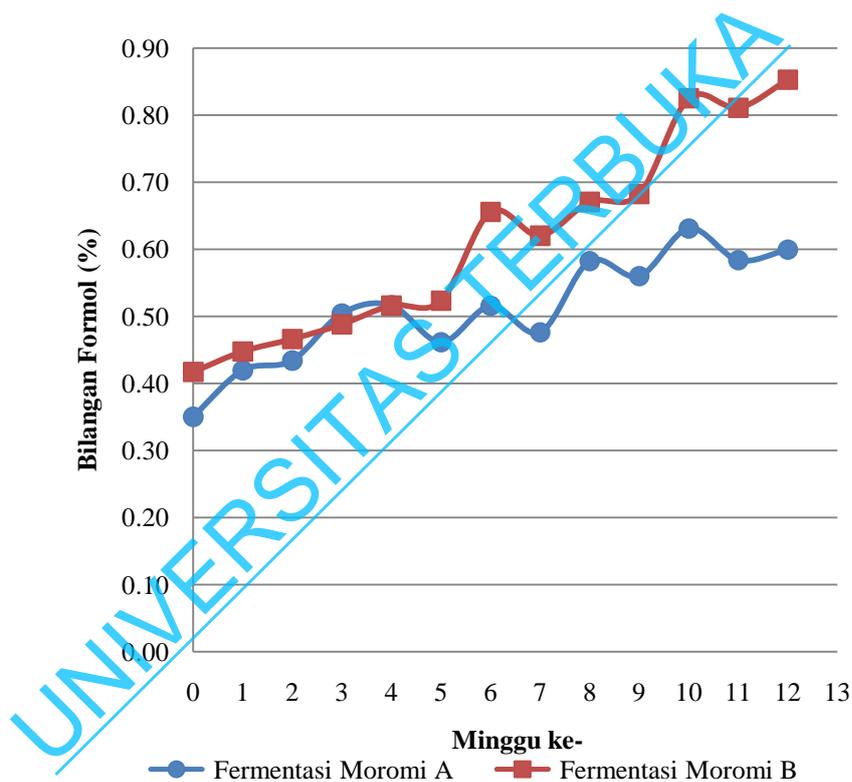


Gambar 9. Perubahan nilai pH selama fermentasi moromi

4. 2. 8. Bilangan Formol Selama Fermentasi Moromi

Bilangan formol menggambarkan jumlah asam amino bebas, amonia dan asam nukleat. Semakin tinggi nilai bilangan formol berarti semakin

banyak protein yang terurai selama fermentasi. Bilangan formol selama fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium dapat di lihat pada Gambar 10. Bilangan formol selama fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium mengalami peningkatan. Bilangan formol selama fermentasi moromi di luar laboratorium lebih tinggi sebesar 0,4–0,8% dibandingkan dengan fermentasi moromi di dalam laboratorium sebesar 0,3–0,5%.



Gambar 10. Perubahan bilangan formol selama fermentasi

Hal ini menunjukkan bahwa degradasi protein ke dalam larutan moromi selama fermentasi di luar laboratorium lebih banyak. Perlakuan dengan fermentasi moromi pada suhu tinggi yaitu di luar laboratorium (Gambar 5), meningkatkan hidrolisis enzimatik dari protein dan pati bahan

baku (Huang dan Teng, 2004). Peningkatan bilangan formol ini menandakan adanya aktivitas proteolitik dalam mendegradasi protein menjadi asam amino, peptida dan amonia.

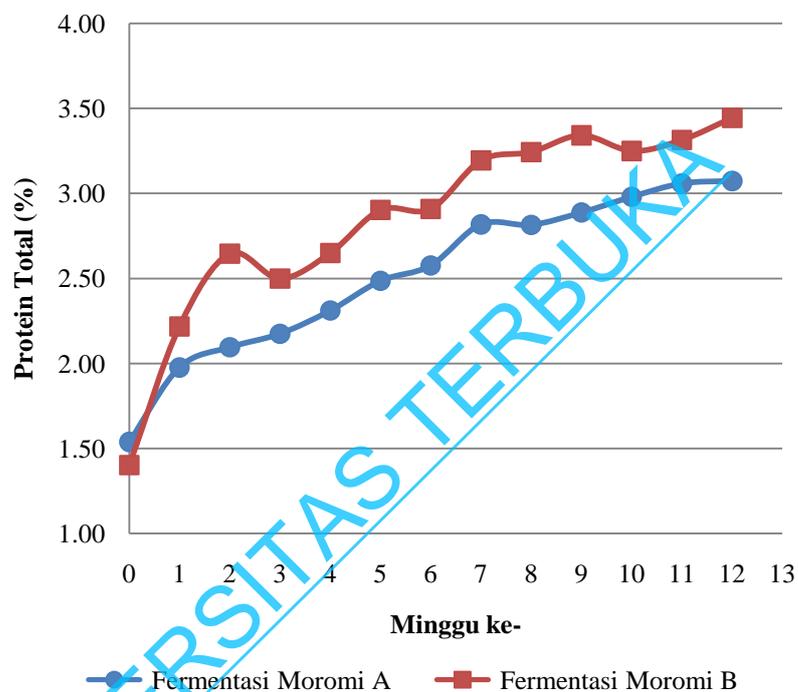
4. 2. 9. Protein Total Selama Fermentasi Moromi

Selama fermentasi, protein dari bahan baku akan terhidrolisis menjadi peptida dengan berat molekul kecil, asam amino dan amonia oleh protease yang diproduksi oleh *A. oryzae* dan *A. sojae* (Whitaker, 1978). Kandungan protein total merupakan parameter penting dalam menentukan kualitas kecap (Chou dan Ling, 1999). Perubahan kandungan protein total selama fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium dapat dilihat pada Gambar 12.

Kandungan protein total filtrat moromi selama fermentasi mengalami kenaikan. Kandungan protein total filtrat moromi di luar laboratorium lebih tinggi dibandingkan dengan fermentasi moromi di dalam laboratorium. Kandungan protein total pada minggu ke-12 filtrat moromi di luar laboratorium sebesar 3,4% (b/v) dan moromi di dalam laboratorium sebesar 3,1% (b/v). Hal ini kemungkinan disebabkan karena aktivitas proteolitik yang dihasilkan oleh enzim protease, dimana aktivitas protease lebih tinggi pada fermentasi moromi di luar laboratorium. Fermentasi moromi dengan suhu dinaikkan sekitar 40-45°C akan meningkatkan hidrolisis enzimatik dari protein dan pati bahan baku (Huang dan Teng, 2004).

Selama proses fermentasi, peningkatan kandungan protein total filtrat moromi dalam fase cairan disebabkan karena proses hidrolisis dari koro

pedang. Peningkatan kandungan protein total filtrat moromi pada awal fermentasi dapat dihubungkan dengan proses osmosis yang berperan dalam pertukaran air dan komponen cairan nitrogen dari bahan baku (Beddows, 1985).

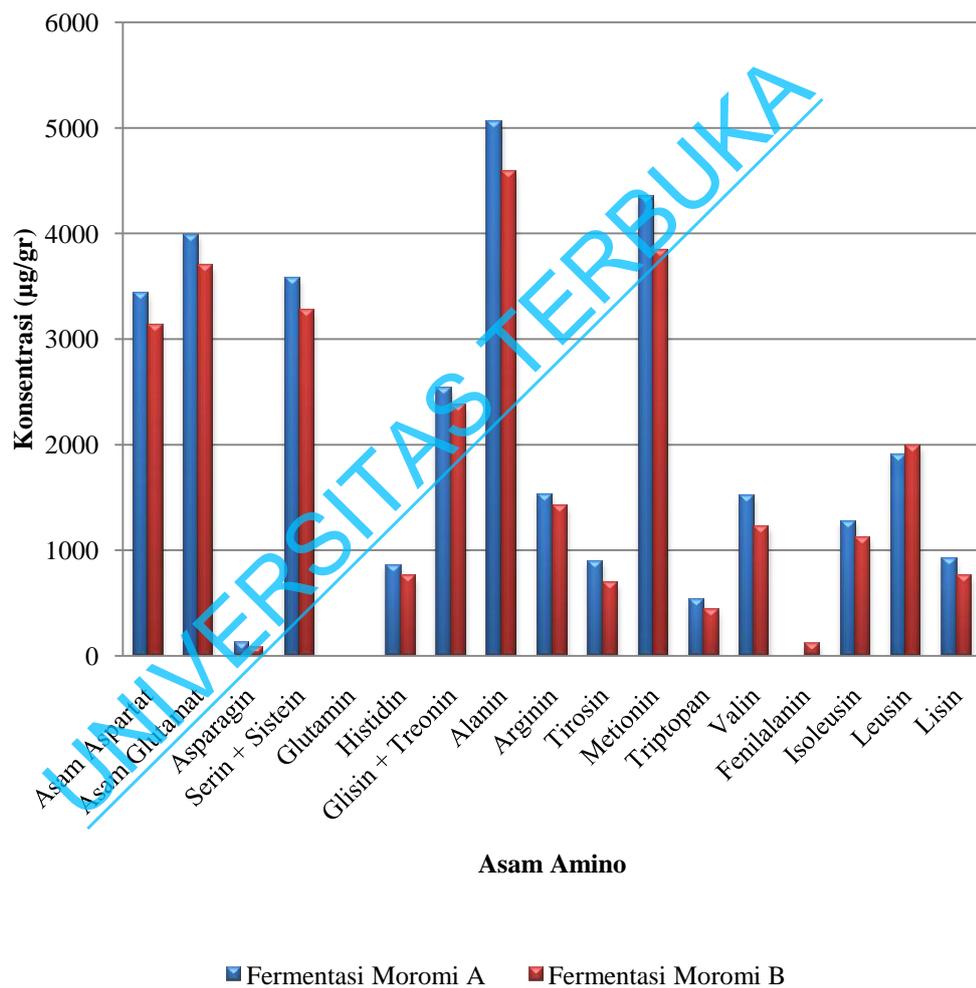


Gambar 11. Perubahan protein total selama fermentasi moromi

4. 2. 10. Profil Asam Amino Bebas pada Moromi

Produk makanan tradisional seperti kecap sengaja dilakukan fermentasi untuk mendegradasi komponen koro pedang yang digunakan agar memberikan flavor yang diharapkan. Gambar 12 memperlihatkan kandungan asam amino moromi pada fermentasi di dalam dan di luar laboratorium selama fermentasi 12 minggu. Kandungan asam amino bebas pada fermentasi

moromi di dalam laboratorium lebih tinggi dibandingkan pada fermentasi moromi di luar laboratorium. Selain itu, dibandingkan dengan bilangan formol dan protein total yang lebih tinggi pada fermentasi moromi di luar laboratorium dapat dikaitkan dengan enzim proteolitik yang berperan dalam fermentasi.



Gambar 12. Komposisi asam amino bebas pada moromi

Moromi di dalam dan di luar laboratorium mengandung beberapa asam amino alanin, metionin, asam glutamat, serin+sistein, asam aspartat,

glisin+treonin, leusin, valin, arginin, histidin, tirosin, isoleusin, lisin, triptopan dan asparagin. Sedangkan moromi pada fermentasi di luar laboratorium terdapat fenilalanin dan moromi di dalam laboratorium tidak terdeteksi. Moromi fermentasi di dalam dan di luar laboratorium tidak terdeteksi glutamin. Enam asam amino moromi selama 12 minggu fermentasi, konsentrasi dari alanin, metionin, asam glutamat, serin+sistein dan asam aspartat tinggi pada fermentasi di dalam dan di luar laboratorium. Asam amino yang berkontribusi penting dalam pembentukan flavor kecap adalah asam glutamat dan aspartat (Nishimura dan Kato, 1988; Sarkar *et al.*, 1997). Asam glutamat dan aspartat diduga berpengaruh terhadap rasa gurih kecap manis yang berinteraksi dengan NaCl moromi membentuk garam glutamat dan garam aspartat. Asam glutamat dan aspartat dalam bentuk bebas menimbulkan rasa asam dan umami dan dalam bentuk Na-glutamat dan Na-aspartat rasa gurih kedua asam ini meningkat (Kato *et al.*, 1989).

Selama fermentasi moromi, asam-asam amino digunakan oleh mikroflora dan berkontribusi untuk pembentukan flavor. Asam-asam amino tersebut dikonversi oleh enzim bakteri asam laktat yaitu transaminase menjadi senyawa-senyawa flavor pada fermentasi moromi. Beberapa asam amino esensial yang dibutuhkan oleh bakteri asam laktat adalah leusin, isoleusin, valin, asam glutamat, arginin, histidin, triptopan dan fenilalanin (Fukushima, 2004). Asam amino berkontribusi terhadap pembentukan komponen flavor kecap. Sebagai misal, tipe flavor dari asam glutamat adalah

meaty/ daging. Glisin, alanin, serin dan treonin memberikan rasa *sweet*/ manis, sedangkan valin, fenilalanin dan histidin memberikan rasa *bitter*/ pahit (Kim dan Lee, 2007).

4. 2. 11. Flavor Moromi

Karakteristik dari flavor kecap tergantung pada cara proses produksi, seperti bahan baku, cara fermentasi dan strain mikroflora. Komponen flavor dianalisis pada penelitian ini untuk mengetahui flavor seperti kecap kedelai dari kecap koro pedang yang dihasilkan. Analisis komponen flavor moromi koro pedang belum ada penelitian terdahulu, sehingga menggunakan acuan komponen flavor pada kecap kedelai. Terbentuknya flavor pada moromi merupakan akibat dari aktivitas mikroflora (BAL dan yeast) selama fermentasi berlangsung. Flavor yang khas dari kecap adalah flavor manis dan gurih.

Komponen flavor penting yang pertama ditemukan pada kecap kedelai adalah *furfuryl alcohol*. Kemudian ditemukan komponen flavor penting pada kecap adalah *4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-furanone* (HEMF), *2,3-butanediol*, *2-phenyl ethanol*, *ethyl palmitate*, *isoamyl alcohol* dan *ethyl linoleate*. HEMF adalah komponen flavor paling penting berkontribusi terhadap pembentukan flavor kecap yang memberikan aroma manis dan *caramel-like*. Komponen flavor lain yang penting adalah *4-ethyl guaiacol*, *2-phenylethanol*, *2,6-dimethylpyrazine*, *acetoin*, *acetol*, *3-methylthio-1-*

propanol (methionol), *3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one (matol)*, *butyllactone* dan *vanillin asetat* (Fukushima, 2004).

Komponen flavor moromi koro pedang pada fermentasi moromi di luar laboratorium memperlihatkan lebih banyak yang terbentuk dibandingkan dengan fermentasi moromi di dalam laboratorium (Lampiran 17). Fermentasi moromi di luar laboratorium memberikan kondisi suhu lebih tinggi dari pada fermentasi moromi di dalam laboratorium (Gambar 5). Semakin tinggi suhu pada fermentasi moromi meningkatkan reaksi kimia dan pertumbuhan mikroflora. Flavor moromi yang terbentuk meningkat. Komponen flavor yang terbentuk pada moromi dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Komponen flavor yang terbentuk pada moromi

Senyawa	Komponen	
	Fermentasi Moromi A	Fermentasi Moromi B
Alkohol	7	7
Asam	7	7
Alkana	-	1
Aldehid	3	4
Phenol	2	2
Keton	1	-
Pirazin	1	-
Furan	2	2
Furanon	1	1
Komponen lain	21	24
Jumlah	45	48

Tujuh komponen flavor alkohol yang terbentuk pada moromi koro pedang di dalam laboratorium adalah *1-butanol (sweet, cereal)*; *propylene*

glycol sweet); *1-propanol (sweet)*; *1-propanol, 2-methyl-*; *1-butanol, 3-methyl-*; *1-octen-3-ol (mushroom-like, sweet)* dan *1-propanol, 3-(methylthio)- (sweet)*. Sedangkan tujuh komponen flavor alkohol yang terbentuk pada moromi koro pedang di luar laboratorium adalah *1-butanol (sweet, cereal)*; *propylene glycol (sweet)*; *1-propanol (sweet)*; *1-propanol, 2-methyl-*; *1-butanol, 3-methyl-*; *2-pentanol (burnt)* dan *1-octen-3-ol (mushroom, sweet)*. Lee *et al.*, (2006) melaporkan bahwa komponen alkohol yaitu *ethanol (alcoholic)*, *1-butanol, 3-methyl- (medicinal/ metallic)*, *1-octen-3-ol (mushroom)* dan *phenylethyl alcohol (flowery/sweet)* merupakan komponen yang berpengaruh pada flavor kecap kedelai. Secara umum, metabolisme dari mikroflora, pemotongan gugus karbonil dan degradasi asam lemak tidak jenuh adalah tiga jalur pembentukan alkohol selama fermentasi kecap (Lee *et al.*, 2006).

Pembentukan komponen flavor alkohol seperti isobutyl alkohol, isoamyl alkohol, methionol dan 2-phenylethanol oleh *Z. rouxii*, dibentuk dari pemotongan gugus karbonil dan kemudian dipotong menjadi asam α -keto. Asam α -keto sebagian besar dibentuk dalam dua jalur. Jalur pertama adalah jalur biosintesis asam amino dan jalur kedua adalah jalur katabolisme asam amino yang disebut jalur Ehrlich. Dalam jalur Ehrlich, asam α -keto dibentuk dengan cara deaminasi atau transaminasi dari asam amino ekstraseluler (Sluis *et al.*, 2001).

Komponen flavor asam yang terbentuk pada moromi koro pedang di dalam laboratorium adalah *ethyl acetate*, *acetic acid*, *propanoic acid* (*sweet, fruity*), *propanoic acid, 2-methyl-*, *butanoic acid, 3-methyl-*, *butanoic acid, 2-methyl-* dan *butanoic acid* (*sour, unpleasant*). Sedangkan komponen flavor asam yang terbentuk pada moromi koro pedang di luar laboratorium adalah *acetic acid*, *propanoic acid*, *propanoic acid, 2-methyl-*, *butanoic acid, 3-methyl-* (*sweet-like*), *butanoic acid, 2-methyl-*, *butanoic acid* (*sour*) dan *undecanoic acid* (*cereal, coconut-like, sweet*). Asam asetat merupakan komponen utama asam yang berkontribusi dalam pembentukan flavor kecap (Yanfang dan Wenyi, 2009). Moromi koro pedang di dalam dan di luar laboratorium terdapat komponen asam asetat. Asam pentanoat juga merupakan komponen penting dalam pembentukan flavor kecap, tetapi tidak terdeteksi pada moromi di dalam dan di luar laboratorium pada penelitian ini.

Komponen flavor aldehid yang terbentuk pada moromi koro pedang di dalam laboratorium adalah *hexanal*, *octanal* (*fatty, caramel-like*) dan *benzaldehyde* (*roasted nutty*). Sedangkan flavor aldehid yang terbentuk pada moromi koro pedang di luar laboratorium adalah *propanal*, *3-(methylthio)-* (*green, savory*), *benzaldehyde* (*roasted nutty*), *2-furancarboxaldehyde*, *5-methyl-* (*soy sauces, sweet*), *benzeneacetaldehyde* (*cereal, honey-like*) dan *benzaldehyde, 2-methyl-* (*soy sauces, sweet*). Komponen flavor keton yang terbentuk pada moromi koro pedang di dalam laboratorium adalah *3-hydroxy-3-methyl-2-butanone* (*sweet, caramel-like*). Sedangkan moromi koro pedang

di luar laboratorium tidak terbentuk komponen flavor keton. Menurut Estrella *et al.*, (2004) menyatakan bahwa komponen aldehid dan keton merupakan komponen intermediet yang tidak stabil yang dengan mudah diturunkan menjadi alkohol.

Komponen flavor phenol yang terbentuk pada moromi koro pedang di dalam dan di luar laboratorium adalah *phenol*, *2-methoxy-* (*spicy, cereal*) dan *phenol* (*burnt, cereal, green*). Empat komponen penting yang membentuk flavor sedap dalam fermentasi moromi yaitu *phenol*, *2-methoxy-phenol* (*guaiacol*), *2-methoxy-4-vinyl phenol* dan *4-ethylphenol*. *Phenol* dan *4-ethylphenol* terbentuk dari degradasi *lignin glycoside* selama fermentasi (Kobayashi dan Sugawara, 1999), *2-methoxy-4-vinyl phenol* mengkarakteristik kedelai dimasak, sedangkan *2-methoxy-phenol* (*guaiacol*) merupakan produk degradasi termal dari lignin berikatan dengan *phenolic carboxylic acids* (Chung, 1999).

Komponen flavor pirazin yang terbentuk pada moromi koro pedang di dalam laboratorium adalah *pyrazine, methyl-* (*coffee, cereal*). Komponen flavor pirazin tidak terbentuk pada moromi koro pedang di luar laboratorium. Komponen flavor furan yang terbentuk pada moromi koro pedang di dalam dan di luar laboratorium adalah *furfural* (*cooked potatoes*) dan *2-furanmethanol*. Komponen flavor furanon yang terbentuk pada moromi koro pedang di dalam dan di luar laboratorium adalah *2(5H)-furanone* (*sweet burnt, caramel*).

Moromi koro pedang di luar laboratorium membentuk komponen flavor yang kompleks yaitu manis dan gurih (Lampiran 17). Dari Lampiran 17, dapat dilihat bahwa di antara banyak komponen pembentuk flavor pada moromi, moromi di luar laboratorium terbentuk flavor gurih yang memberikan sensasi *coconut-like* yaitu *undercanoic acid*. Moromi di dalam laboratorium tidak terbentuk flavor gurih. Ini berarti bahwa fermentasi moromi di luar laboratorium dapat meningkatkan transaminasi asam amino oleh BAL pada moromi. Flavor gurih merupakan hasil dari transaminasi asam aspartat, asam glutamat dan asam-asam amino siklis-aromatis oleh bakteri asam laktat pada moromi (Liu, 2004).

Komponen pembentuk flavor manis pada moromi dapat dilihat pada Tabel 11. Jumlah komponen flavor manis moromi di luar laboratorium lebih banyak dan konsentrasi sebagian dari komponen manis tersebut lebih besar. Ini berarti bahwa fermentasi moromi di luar laboratorium dapat meningkatkan flavor manis moromi. Hal ini dikarenakan jumlah yeast pada moromi di luar laboratorium lebih banyak dari jumlah yeast pada moromi di dalam laboratorium. Flavor manis terbentuk sebagai hasil dari fermentasi alkohol oleh yeast (Liu, 2004).

Tabel 11. Komponen flavor manis pada moromi

Komponen flavor	Area (%)		Odorant
	Fermentasi	Fermentasi	
	Moromi A	Moromi B	
<i>1-Butanol</i>	0.0597	1.2693	<i>sweet, cereal</i>
<i>Propylene glycol</i>	51.3197	23.6774	<i>sweet</i>
<i>1-Propanol</i>	0.6038	0.8212	<i>sweet</i>
<i>1-Octen-3-ol</i>	0.6147	0.2520	<i>mushroom-like, sweet</i>
<i>1-Propanol, 3-(methylthio)-</i>	16.4602	-	<i>sweet</i>
<i>Propanoic acid</i>	0.4274	1.0559	<i>sweet, fruity</i>
<i>Butanoic acid, 3-methyl-</i>	0.4070	0.3213	<i>sweet-like</i>
<i>2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-</i>	-	3.3704	<i>soy sauces, sweet</i>
<i>Benzeneacetaldehyde</i>	-	1.3461	<i>cereal, honey-like</i>
<i>Benzaldehyde, 2-methyl-</i>	-	9.8389	<i>soy sauces, sweet</i>
<i>3-Hydroxy-3-methyl-2-butanone</i>	1.8481	-	<i>sweet, caramel-like</i>
<i>2(5H)-Furanone</i>	0.3047	0.1232	<i>sweet burnt, caramel</i>

Dalam fermentasi moromi ada komponen-komponen flavor yang tidak kalah penting yaitu komponen *heterocyclic*. Komponen *heterocyclic* merupakan flavor yang walaupun kandungannya kecil tetapi mempunyai sifat menimbulkan flavor kuat (*powerful aromatic*). Tujuh belas komponen flavor *heterocyclic* yaitu *methyl pyrazine*, *2,5-dimethyl pyrazine*, *2,6-dimethyl*

pyrazine, 2-ethyl-6-methylpyrazine, trimethylpyrazine, tetrahydro-3-methyl-5-oxo-2-furancarboxylic, tetrahydro-2,2-dimethyl-5-(1-methylethyl)-furan, 2-furanmethanol, 2(5H)-furanone, 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (HDMF), 4-benzoyloxy-2H-pyran-3-one, 3-hydroxy-2,6-dimethyl-4H-pyran-4-one, 3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one, 1-(1H-pyrrol-2yl)-ethanone, 2-carboxaldehyde-1H-pyrrole) dan *3-phenyl-pyridine* (Yanfeng dan Wenyi, 2009).

Pada penelitian ini, komponen penting pada kecap *4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-furanone* (HEMF) tidak terbentuk pada moromi koro pedang di dalam dan di luar laboratorium. HEMF tidak dijumpai dalam penelitian ini karena populasi yeast tergolong rendah. Menurut Huang dan Teng (2004), HEMF merupakan komponen yang dibentuk karena jumlah populasi yeast pada moromi sangat tinggi. Jalur biosintesis HEMF adalah *pentose-phosphate cycle* oleh *Z. rouxii*.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pengecilan Ukuran Koro Pedang

Pengecilan ukuran koro pedang diperoleh serbuk 15% dan hancuran koro pedang 85%. Ukuran hancuran koro pedang bervariasi yaitu kira-kira setengah, sepertiga, seperempat, seperlima, seperenam, sepertujuh dan seperdelapan dari koro pedang utuh. Hasil pemecahan jamur lebih banyak pada hancuran koro pedang dibandingkan dengan koro pedang utuh. Karena luas permukaan dan penetrasi miselia lebih baik pada hancuran koro pedang. Hal ini berpengaruh terhadap banyaknya enzim yang dihasilkan selama fermentasi koji berlangsung. Hasil pemecahan oleh enzim tersebut akan berpengaruh terhadap kadar gula reduksi dan asam amino pada koji. Chou dan Ling (1999) menyatakan bahwa perlakuan awal pada bahan baku kecap kedelai dengan metode ekstrusi akan memperbanyak aktivitas enzim pada fermentasi koji. Gambar koro pedang utuh (kiri) dan hancuran koro pedang (kanan) dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Koro pedang utuh (kiri) dan hancuran koro pedang

4. 2. Fermentasi Kecap Koro Pedang

Selama fermentasi koji dan moromi dilakukan analisis mikrobiologi dan kimia. Fermentasi moromi dikerjakan dalam dua inkubasi yang berbeda yaitu di dalam dan di luar laboratorium.

4. 2. 1. Kadar HCN

Asam sianida merupakan komponen antinutrisi dari koro pedang. Namun demikian, proses pengolahan sederhana seperti perendaman, pemanasan ataupun fermentasi oleh jamur dapat meminimalkan senyawa-senyawa tersebut sehingga koro pedang aman dikonsumsi. Hasil analisis kadar HCN sebelum dan sesudah fermentasi dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Kadar HCN sebelum dan sesudah fermentasi koji

Sampel	HCN (ppm)
Sebelum fermentasi koji	156,908 a \pm 0,0007
Sesudah fermentasi koji	15,646 b \pm 0,5360

Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5%

Hasil uji anova kadar HCN sebelum dan sesudah fermentasi koji berbeda nyata pada taraf 5% (Lampiran 8). Dari Tabel 8 terlihat bahwa fermentasi koji efektif mengurangi kadar HCN koro pedang. Hal ini disebabkan *A. oryzae* dan *A. sojae* mempunyai aktivitas β -glukosidase yang dapat memotong gugus HCN. HCN terikat pada senyawa linamarin. Linamarin mempunyai rumus molekul $C_{10}H_{17}NO_6$. Linamarin terhidrolisis oleh enzim β -glukosidase menjadi glukosa, aseton dan HCN. HCN yang

terpotong kemudian menguap, karena HCN mempunyai titik didih yang rendah 26,5°C (Wedhastri, 1990).

4. 2. 2. Perbandingan antara Bilangan Formol dengan Protein Total Sebelum dan Sesudah Fermentasi Koji

Pada fermentasi koji, indikator yang digunakan untuk menilai tingkat degradasi protein yaitu dengan perbandingan antara bilangan formol dengan protein total. Hasil analisis perbandingan antara bilangan formol dengan protein total sebelum dan sesudah fermentasi koji dapat dilihat pada Tabel 9. Dari Tabel 9 terlihat bahwa tingkat degradasi protein sesudah fermentasi koji lebih tinggi sebesar 0,28 sedangkan sebelum fermentasi koji sebesar 0,15.

Tabel 9. Perbandingan bilangan formol/ protein total sebelum dan sesudah fermentasi koji

Sampel	Perbandingan bilangan formol/ protein total
Sebelum fermentasi koji	0,15 a ± 0,02664
Sesudah fermentasi koji	0,28 b ± 0,0319

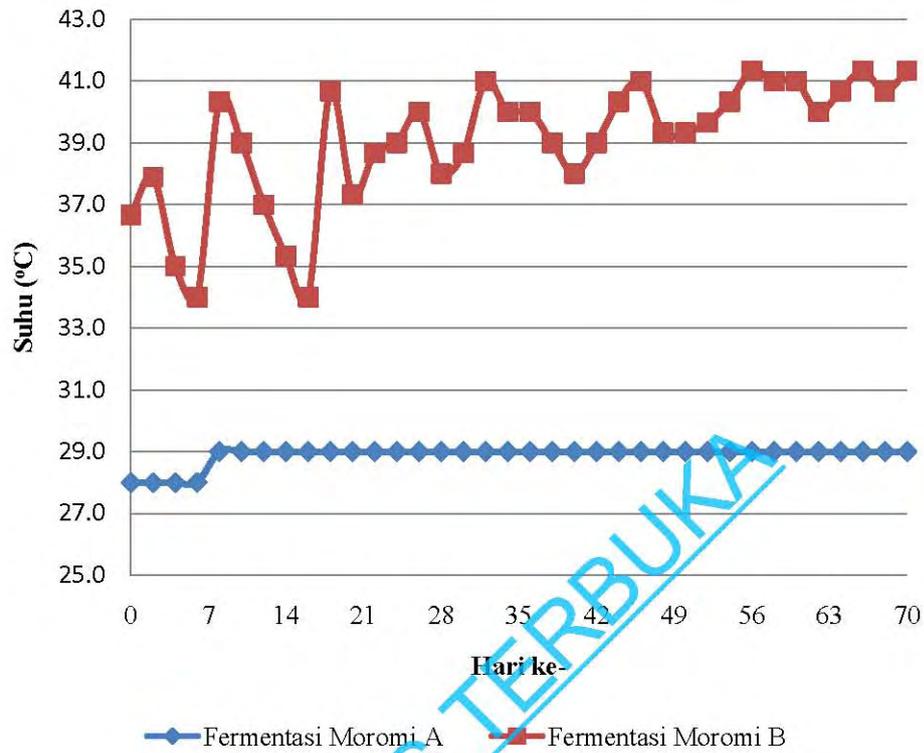
Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5%

Hasil uji anova perbandingan bilangan formol/ protein total sebelum dan sesudah fermentasi koji berbeda nyata pada taraf 5% (Lampiran 9). Perbedaan perbandingan bilangan formol/ protein total antara kedua sampel dapat disebabkan karena protein pada koji telah didegradasi oleh enzim yang dihasilkan *Aspergillus oryzae* dan *Aspergillus sojae*. Su *et al.*, (2005) menyatakan bahwa perbandingan bilangan formol/ protein total dari koji

kedelai lebih dari 0,43 akan berkontribusi terhadap pembentukan flavor yang enak.

4. 2. 3. Pengamatan Suhu Selama Fermentasi Moromi

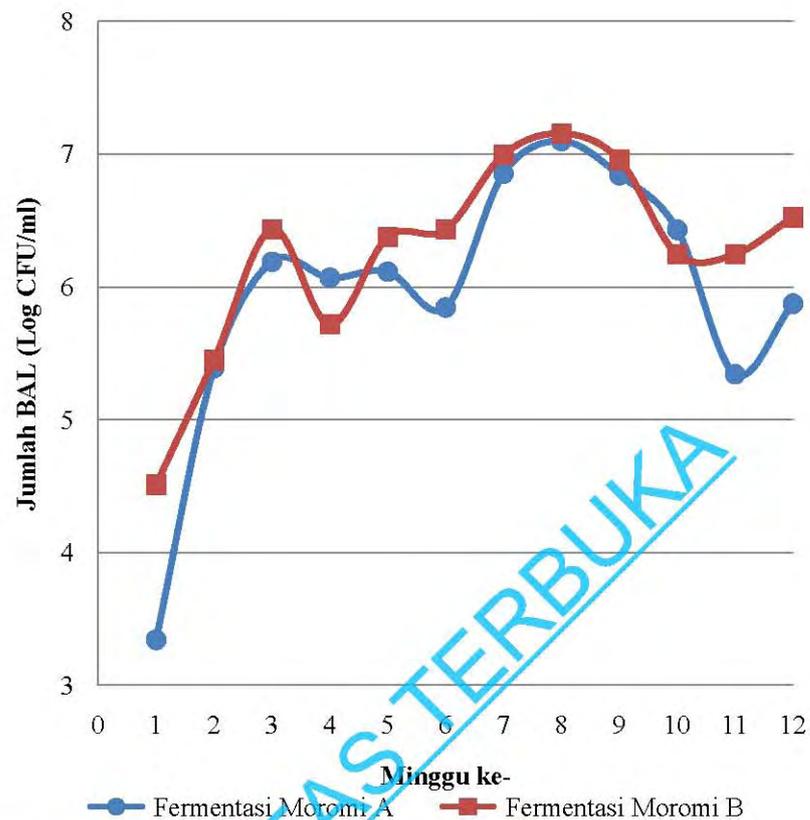
Perlakuan perbedaan kondisi fermentasi moromi memperlihatkan fermentasi moromi di dalam laboratorium suhunya lebih rendah dibandingkan dengan fermentasi moromi di luar laboratorium. Perbedaan suhu fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium dapat dilihat pada Gambar 5. Pengukuran suhu moromi selama fermentasi dapat dilihat pada Lampiran 7. Suhu moromi di dalam laboratorium sekitar 28–29°C dan suhu moromi di luar laboratorium sekitar 32–45°C. Dari Gambar 5 terlihat suhu pada fermentasi moromi di luar laboratorium meningkat pada minggu ke-4 dan stabil sampai minggu ke-12. Semakin tinggi suhu pada fermentasi moromi diharapkan semakin mempercepat reaksi kimia dan pertumbuhan mikroflora (BAL, bakteri proteolitik dan yeast). Sehingga akan mempercepat pembentukan flavor moromi. Perlakuan pada fermentasi moromi dengan suhu dinaikkan sekitar 28-30°C akan meningkatkan produksi asam laktat dan reaksi enzimatik untuk hidrolisis bahan baku. Selain itu, fermentasi moromi dengan suhu dinaikkan sekitar 40-45°C akan meningkatkan hidrolisis enzimatik dari protein dan pati bahan baku (Huang dan Teng, 2004).



Gambar 5. Perbedaan suhu selama fermentasi moromi

4. 2. 4. Pertumbuhan BAL Selama Fermentasi Moromi

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan mikroflora yang penting dalam pembentukan flavor moromi. BAL memberikan kontribusi yang besar pada fermentasi moromi, yaitu menurunkan pH moromi sehingga cocok untuk pertumbuhan yeast. Hasil analisis pertumbuhan BAL selama fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium dapat dilihat pada Gambar 6.



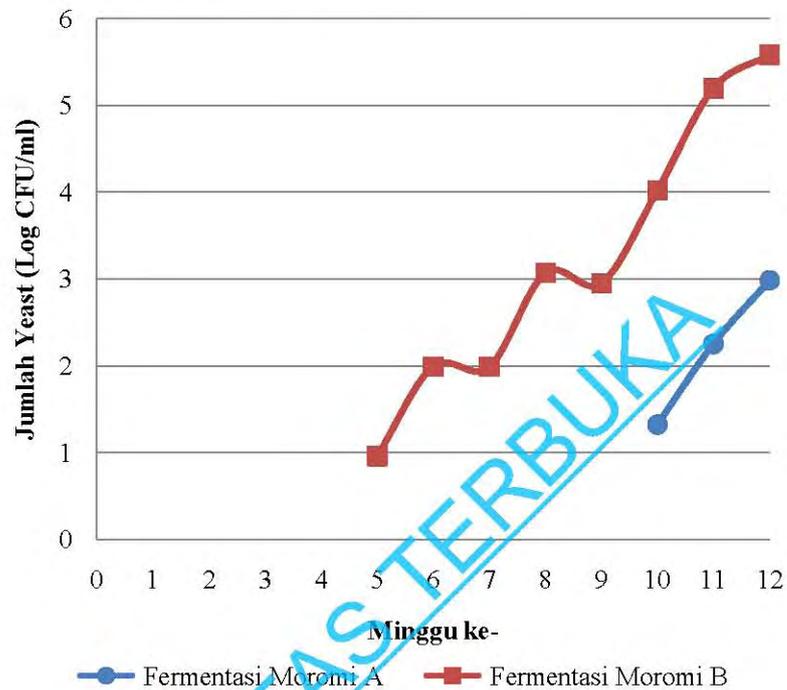
Gambar 6. Pertumbuhan bakteri asam laktat selama fermentasi

Dari Gambar 6, dapat diketahui bahwa pada awal inkubasi, pertumbuhan BAL pada fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium belum mencapai 10^1 CFU/ml. Pada minggu pertama inkubasi pertumbuhan BAL pada fermentasi moromi di luar laboratorium sebesar 10^4 CFU/ml dan fermentasi di dalam laboratorium sebesar 10^3 CFU/ml meningkat sampai minggu ketiga. Dari Gambar 6, dapat diketahui bahwa jumlah pertumbuhan BAL selama fermentasi moromi di luar laboratorium cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan fermentasi moromi di dalam laboratorium.

4. 2. 5. Pertumbuhan Yeast Selama Fermentasi Moromi

Pertumbuhan yeast selama fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium dapat dilihat pada Gambar 7. Minggu-minggu pertama fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium belum ada pertumbuhan yeast. Pertumbuhan yeast dipengaruhi oleh faktor pH, suhu dan konsentrasi nitrogen (Liu, 2004). Yeast akan mulai tumbuh setelah pH mencapai 5,0 (Sluis *et al.*, 2001). Penurunan pH terjadi sampai pH cocok untuk pertumbuhan yeast. Yeast pada fermentasi moromi di luar laboratorium mulai tumbuh pada inkubasi minggu ke-5 sebesar 10^1 CFU/ml pada pH 5,55, sedangkan pada fermentasi moromi di dalam laboratorium baru tumbuh pada inkubasi minggu ke-10 sebesar 10^1 CFU/ml pada pH 5,32. Pada akhir fermentasi minggu ke-12, yeast pada fermentasi moromi di luar laboratorium sebesar 10^6 CFU/ml dan yeast pada fermentasi moromi di dalam laboratorium sebesar 10^3 CFU/ml. Yeast pada fermentasi moromi di luar laboratorium mulai tumbuh pada fermentasi minggu ke-5. Pertumbuhan yeast lebih cepat pada fermentasi moromi dengan suhu tinggi. Fermentasi moromi di luar laboratorium suhunya lebih tinggi daripada fermentasi moromi di dalam laboratorium (Gambar 5). Perlakuan pada fermentasi moromi dengan suhu dinaikkan sampai 40-45°C akan meningkatkan hidrolisis enzimatik dari protein dan pati bahan baku (Huang dan Teng, 2004). Menurut Jansen *et al.*, (2003) bahwa produksi fusel alkohol oleh *Z. rouxii* juga dipengaruhi oleh

suhu fermentasi. Semakin banyak populasi yeast yang tumbuh diharapkan akan membentuk flavor kecap yang enak.



Gambar 7. Pertumbuhan yeast selama fermentasi moromi

Pada penelitian ini tidak dilakukan identifikasi yeast yang tumbuh selama fermentasi kecap koro pedang. Yeast yang umumnya tumbuh pada fermentasi kecap adalah *Zygosaccharomyces rouxii* dan *Candida spesies*, yang akan mengubah gula menjadi alkohol dan komponen flavor (Nunomura dan Sasaki, 2003). Kisaran suhu optimum untuk pertumbuhan *Z. rouxii* adalah 20–35°C pada media bebas garam dan suhu diatas 40°C pada media garam 18% (b/v). Sedangkan kisaran suhu optimum untuk pertumbuhan spesies *Candida* adalah 20–30°C pada media bebas garam dan suhu diatas 35°C pada media garam 18% (b/v) (Fukushima, 2004). Pada penelitian ini,

suhu moromi di dalam laboratorium sekitar 28–29°C dan suhu moromi di luar laboratorium sekitar 32–45°C pada media garam 24% (b/v).

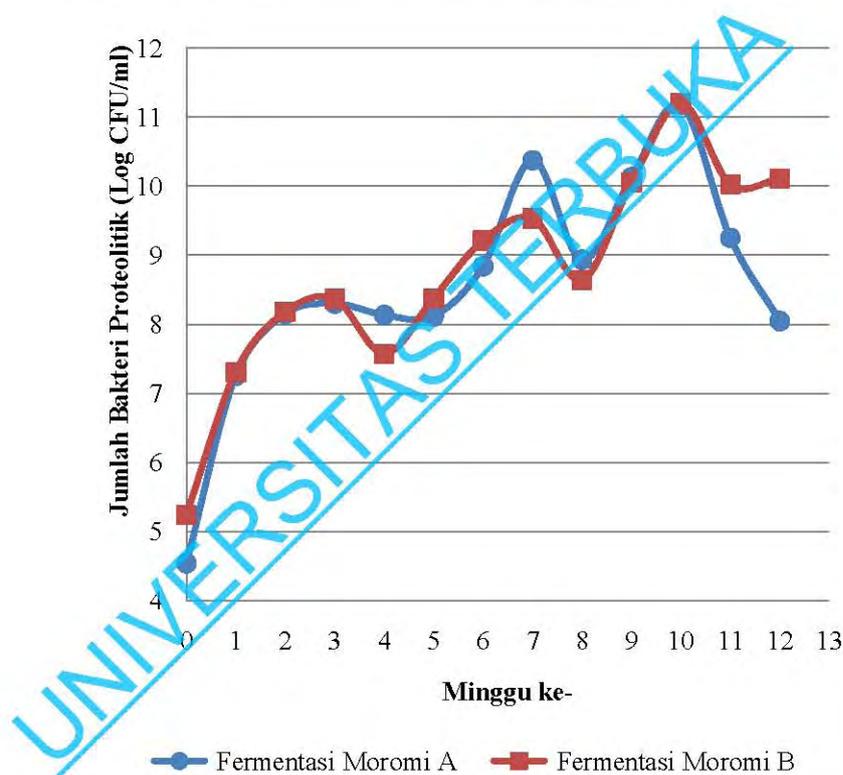
Selama proses fermentasi moromi, *Z. rouxii* memproduksi etanol dalam kondisi anaerobik dan HEMF dalam kondisi aerobik (Fukushima, 2004). Konsentrasi jumlah sel yeast secara langsung berpengaruh terhadap peningkatan etanol selama fermentasi moromi (Rolling *et al.*, 1996). *Z. rouxii* adalah yeast tahan garam 24–26% (b/v) yang penting dalam pembentukan flavor selama proses fermentasi moromi. *Z. rouxii* memproduksi isoamyl alkohol, aktif amyl alkohol dan isobutyl alkohol yang merupakan komponen penting dalam kecap. *Candida spesies* penting dalam pembentukan flavor kecap dengan membentuk komponen phenolik seperti *4-ethyl-guaiacol* (Fukushima, 2004).

4. 2. 6. Pertumbuhan Bakteri Proteolitik Selama Fermentasi Moromi

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang memproduksi protease ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel, kemudian dilepaskan keluar dari sel. Pertumbuhan bakteri proteolitik pada fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium dapat dilihat pada Gambar 8. Bakteri proteolitik ini berperan dalam pemecahan protein menjadi peptida dan asam-asam amino.

Pertumbuhan bakteri proteolitik pada awal inkubasi sudah relatif banyak. Populasi bakteri proteolitik pada awal inkubasi pada moromi di dalam laboratorium sebesar 10^4 CFU/ml dan moromi di luar laboratorium

sebesar 10^5 CFU/ml. Kemungkinan bakteri proteolitik sudah tumbuh pada saat fermentasi koji. Kemudian mengalami peningkatan jumlah populasi sampai minggu ke-7 dan pada inkubasi minggu ke-8 mengalami penurunan. Peningkatan jumlah bakteri proteolitik menunjukkan kemampuan bakteri menghidrolisis protein menjadi peptida dan asam-asam amino. Asam-asam amino ini akan diubah oleh BAL menjadi komponen flavor.



Gambar 8. Pertumbuhan bakteri proteolitik selama fermentasi moromi

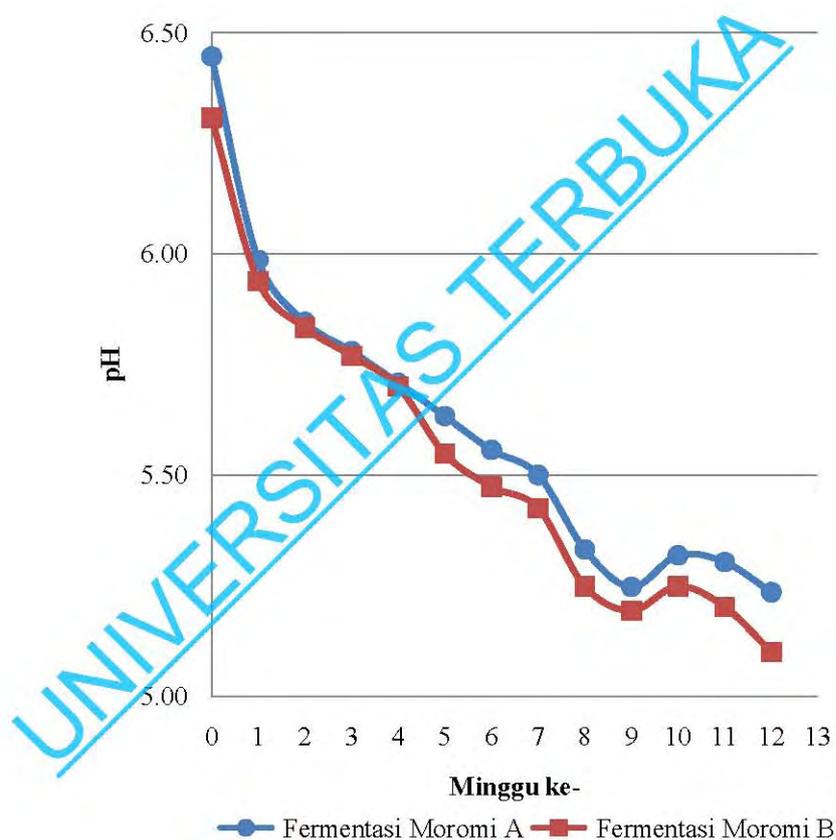
Pada inkubasi minggu ke-10 bakteri proteolitik mengalami peningkatan yaitu sebesar 10^{11} CFU/ml pada kedua sampel. Kemudian pada inkubasi minggu ke-11 dan minggu ke-12 mengalami penurunan. Penurunan populasi bakteri proteolitik disebabkan karena substrat sudah menurun.

4. 2. 7. pH Selama Fermentasi Moromi

Nilai pH menggambarkan kandungan asam suatu bahan pangan. Perubahan nilai pH selama fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium dapat dilihat pada Gambar 9. Perubahan pH moromi dipengaruhi oleh pertumbuhan BAL. Hasil ini sesuai dengan hasil analisis pertumbuhan BAL selama fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium yang dapat dilihat pada Gambar 6. Dari Gambar 6, dapat dihubungkan dengan analisis nilai pH moromi pada Gambar 9. Semakin tinggi populasi BAL maka asam laktat dan asam organik yang terbentuk semakin banyak dan pH moromi akan lebih rendah. Secara keseluruhan, pH selama fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium mengalami penurunan. Nilai pH moromi selama fermentasi moromi di luar laboratorium lebih rendah dibandingkan di dalam laboratorium. Selama tiga bulan fermentasi moromi di dalam laboratorium mengalami penurunan pH 6,45–5,24 dan di luar laboratorium 6,31–5,10. Fermentasi moromi di luar laboratorium memberikan kondisi suhu lebih tinggi dari pada fermentasi moromi di dalam laboratorium (Gambar 6). Fermentasi moromi dengan suhu dinaikkan sekitar 40-45°C akan meningkatkan hidrolisis enzimatis dari protein dan pati bahan baku (Huang dan Teng, 2004).

Nilai pH minggu ke-10 mengalami peningkatan, dimana populasi BAL mengalami penurunan. Asam laktat diproduksi oleh mikroflora dari gula sehingga menurunkan nilai pH (Yong dan Wood, 1976). Setelah pH turun

sekitar 5,0, *T. halophilus* tidak dapat tumbuh dan fermentasi alkohol oleh *Z. rouxii* dimulai (Sluis *et al.*, 2001). Penurunan pH selama fermentasi kemungkinan juga dihubungkan akumulasi dari asam lemak bebas, asam amino, dan peptida yang mengandung rantai cabang *carbolylic* sebagai hasil hidrolisis bahan baku dalam filtrat moromi. (Kim dan Lee, 2008).

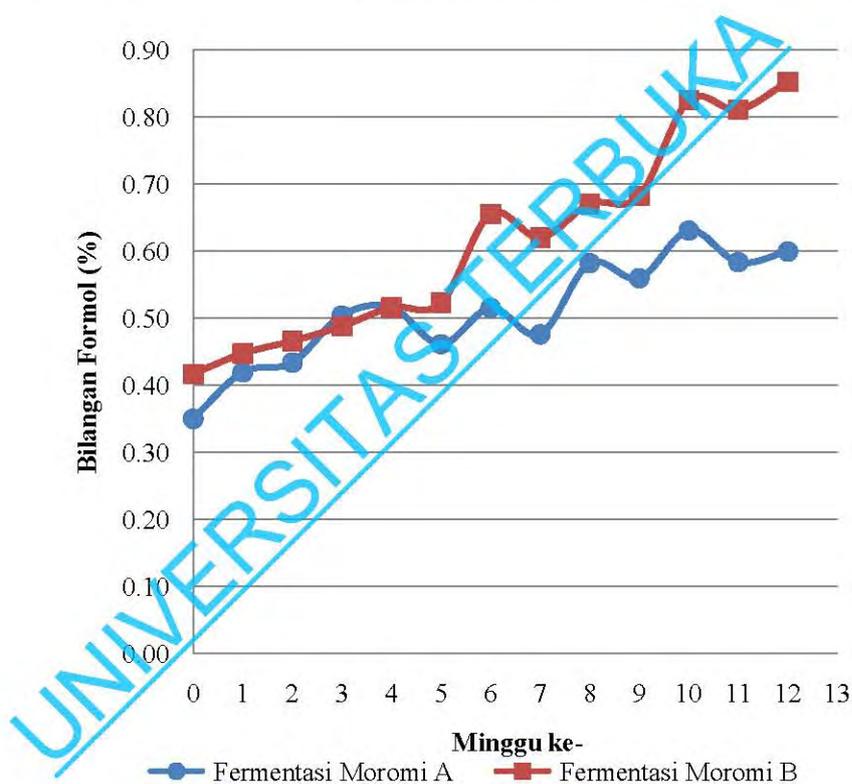


Gambar 9. Perubahan nilai pH selama fermentasi moromi

4. 2. 8. Bilangan Formol Selama Fermentasi Moromi

Bilangan formol menggambarkan jumlah asam amino bebas, amonia dan asam nukleat. Semakin tinggi nilai bilangan formol berarti semakin

banyak protein yang terurai selama fermentasi. Bilangan formol selama fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium dapat di lihat pada Gambar 10. Bilangan formol selama fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium mengalami peningkatan. Bilangan formol selama fermentasi moromi di luar laboratorium lebih tinggi sebesar 0,4–0,8% dibandingkan dengan fermentasi moromi di dalam laboratorium sebesar 0,3–0,5%.



Gambar 10. Perubahan bilangan formol selama fermentasi

Hal ini menunjukkan bahwa degradasi protein ke dalam larutan moromi selama fermentasi di luar laboratorium lebih banyak. Perlakuan dengan fermentasi moromi pada suhu tinggi yaitu di luar laboratorium (Gambar 5), meningkatkan hidrolisis enzimatik dari protein dan pati bahan

baku (Huang dan Teng, 2004). Peningkatan bilangan formol ini menandakan adanya aktivitas proteolitik dalam mendegradasi protein menjadi asam amino, peptida dan amonia.

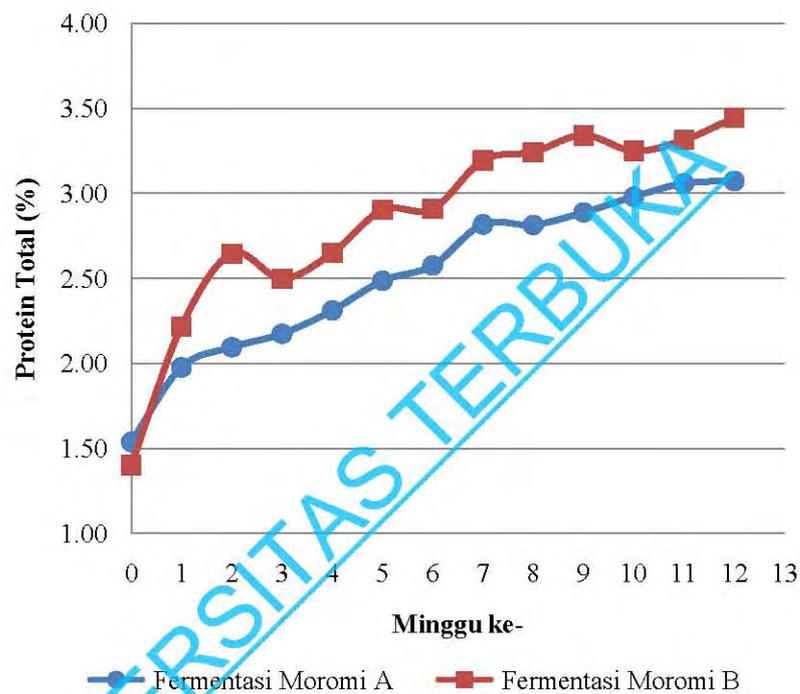
4. 2. 9. Protein Total Selama Fermentasi Moromi

Selama fermentasi, protein dari bahan baku akan terhidrolisis menjadi peptida dengan berat molekul kecil, asam amino dan amonia oleh protease yang diproduksi oleh *A. oryzae* dan *A. sojae* (Whitaker, 1978). Kandungan protein total merupakan parameter penting dalam menentukan kualitas kecap (Chou dan Ling, 1999). Perubahan kandungan protein total selama fermentasi moromi di dalam dan di luar laboratorium dapat dilihat pada Gambar 12.

Kandungan protein total filtrat moromi selama fermentasi mengalami kenaikan. Kandungan protein total filtrat moromi di luar laboratorium lebih tinggi dibandingkan dengan fermentasi moromi di dalam laboratorium. Kandungan protein total pada minggu ke-12 filtrat moromi di luar laboratorium sebesar 3,4% (b/v) dan moromi di dalam laboratorium sebesar 3,1% (b/v). Hal ini kemungkinan disebabkan karena aktivitas proteolitik yang dihasilkan oleh enzim protease, dimana aktivitas protease lebih tinggi pada fermentasi moromi di luar laboratorium. Fermentasi moromi dengan suhu dinaikkan sekitar 40-45°C akan meningkatkan hidrolisis enzimatik dari protein dan pati bahan baku (Huang dan Teng, 2004).

Selama proses fermentasi, peningkatan kandungan protein total filtrat moromi dalam fase cairan disebabkan karena proses hidrolisis dari koro

pedang. Peningkatan kandungan protein total filtrat moromi pada awal fermentasi dapat dihubungkan dengan proses osmosis yang berperan dalam pertukaran air dan komponen cairan nitrogen dari bahan baku (Beddows, 1985).

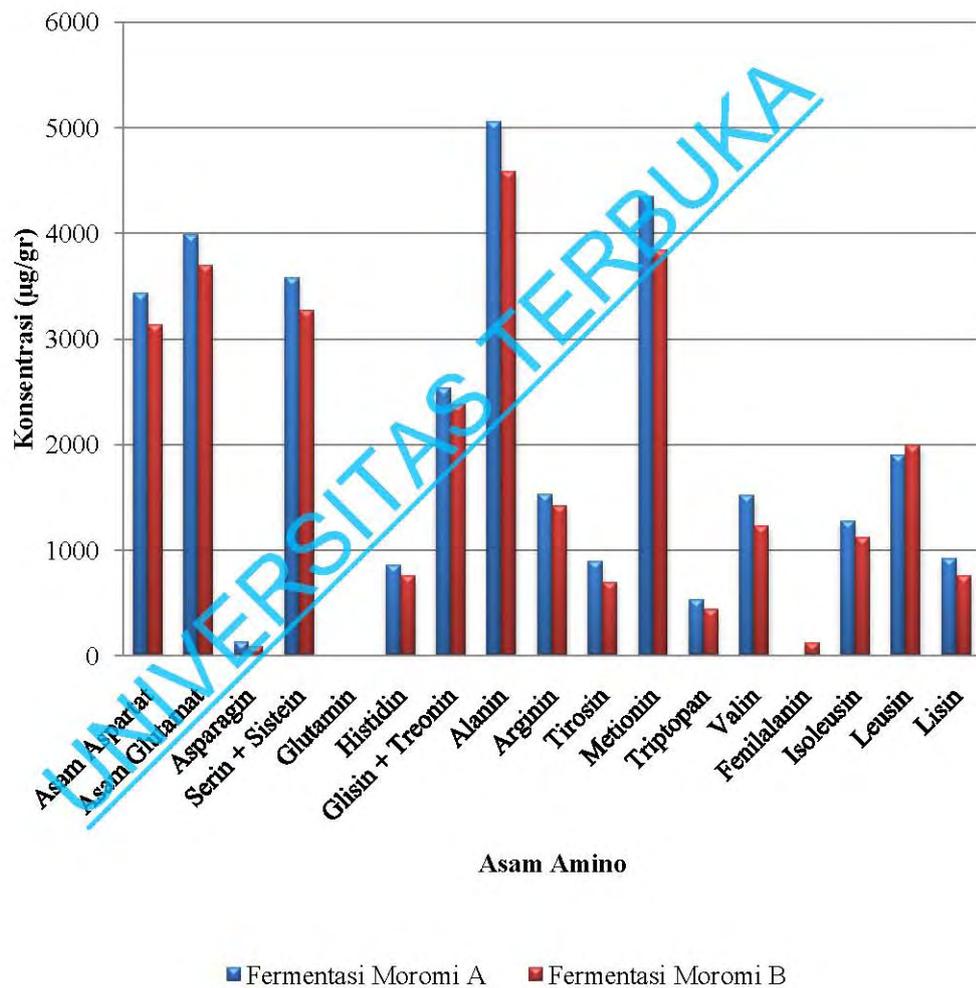


Gambar 11. Perubahan protein total selama fermentasi moromi

4. 2. 10. Profil Asam Amino Bebas pada Moromi

Produk makanan tradisional seperti kecap sengaja dilakukan fermentasi untuk mendegradasi komponen koro pedang yang digunakan agar memberikan flavor yang diharapkan. Gambar 12 memperlihatkan kandungan asam amino moromi pada fermentasi di dalam dan di luar laboratorium selama fermentasi 12 minggu. Kandungan asam amino bebas pada fermentasi

moromi di dalam laboratorium lebih tinggi dibandingkan pada fermentasi moromi di luar laboratorium. Selain itu, dibandingkan dengan bilangan formol dan protein total yang lebih tinggi pada fermentasi moromi di luar laboratorium dapat dikaitkan dengan enzim proteolitik yang berperan dalam fermentasi.



Gambar 12. Komposisi asam amino bebas pada moromi

Moromi di dalam dan di luar laboratorium mengandung beberapa asam amino alanin, metionin, asam glutamat, serin+sistein, asam aspartat,

glisin+treonin, leusin, valin, arginin, histidin, tirosin, isoleusin, lisin, triptopan dan asparagin. Sedangkan moromi pada fermentasi di luar laboratorium terdapat fenilalanin dan moromi di dalam laboratorium tidak terdeteksi. Moromi fermentasi di dalam dan di luar laboratorium tidak terdeteksi glutamin. Enam asam amino moromi selama 12 minggu fermentasi, konsentrasi dari alanin, metionin, asam glutamat, serin+sistein dan asam aspartat tinggi pada fermentasi di dalam dan di luar laboratorium. Asam amino yang berkontribusi penting dalam pembentukan flavor kecap adalah asam glutamat dan aspartat (Nishimura dan Kato, 1988; Sarkar *et al.*, 1997). Asam glutamat dan aspartat diduga berpengaruh terhadap rasa gurih kecap manis yang berinteraksi dengan NaCl moromi membentuk garam glutamat dan garam aspartat. Asam glutamat dan aspartat dalam bentuk bebas menimbulkan rasa asam dan umami dan dalam bentuk Na-glutamat dan Na-aspartat rasa gurih kedua asam ini meningkat (Kato *et al.*, 1989).

Selama fermentasi moromi, asam-asam amino digunakan oleh mikroflora dan berkontribusi untuk pembentukan flavor. Asam-asam amino tersebut dikonversi oleh enzim bakteri asam laktat yaitu transaminase menjadi senyawa-senyawa flavor pada fermentasi moromi. Beberapa asam amino esensial yang dibutuhkan oleh bakteri asam laktat adalah leusin, isoleusin, valin, asam glutamat, arginin, histidin, triptopan dan fenilalanin (Fukushima, 2004). Asam amino berkontribusi terhadap pembentukan komponen flavor kecap. Sebagai misal, tipe flavor dari asam glutamat adalah

meaty/ daging. Glisin, alanin, serin dan treonin memberikan rasa *sweet*/ manis, sedangkan valin, fenilalanin dan histidin memberikan rasa *bitter*/ pahit (Kim dan Lee, 2007).

4. 2. 11. Flavor Moromi

Karakteristik dari flavor kecap tergantung pada cara proses produksi, seperti bahan baku, cara fermentasi dan strain mikroflora. Komponen flavor dianalisis pada penelitian ini untuk mengetahui flavor seperti kecap kedelai dari kecap koro pedang yang dihasilkan. Analisis komponen flavor moromi koro pedang belum ada penelitian terdahulu, sehingga menggunakan acuan komponen flavor pada kecap kedelai. Terbentuknya flavor pada moromi merupakan akibat dari aktivitas mikroflora (BAL dan yeast) selama fermentasi berlangsung. Flavor yang khas dari kecap adalah flavor manis dan gurih.

Komponen flavor penting yang pertama ditemukan pada kecap kedelai adalah *furfuryl* alkohol. Kemudian ditemukan komponen flavor penting pada kecap adalah *4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-furanone* (HEMF), *2,3-butanediol*, *2-phenyl ethanol*, *ethyl palmitate*, *isoamyl alcohol* dan *ethyl linoleate*. HEMF adalah komponen flavor paling penting berkontribusi terhadap pembentukan flavor kecap yang memberikan aroma manis dan *caramel-like*. Komponen flavor lain yang penting adalah *4-ethyl guaiacol*, *2-phenylethanol*, *2,6-dimethylpyrazine*, *acetoin*, *acetol*, *3-methylthio-1-*

propanol (methionol), *3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one (matol)*, *butyllactone* dan *vanillin asetat* (Fukushima, 2004).

Komponen flavor moromi koro pedang pada fermentasi moromi di luar laboratorium memperlihatkan lebih banyak yang terbentuk dibandingkan dengan fermentasi moromi di dalam laboratorium (Lampiran 17). Fermentasi moromi di luar laboratorium memberikan kondisi suhu lebih tinggi dari pada fermentasi moromi di dalam laboratorium (Gambar 5). Semakin tinggi suhu pada fermentasi moromi meningkatkan reaksi kimia dan pertumbuhan mikroflora. Flavor moromi yang terbentuk meningkat. Komponen flavor yang terbentuk pada moromi dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Komponen flavor yang terbentuk pada moromi

Senyawa	Komponen	
	Fermentasi Moromi A	Fermentasi Moromi B
Alkohol	7	7
Asam	7	7
Alkana	-	1
Aldehid	3	4
Phenol	2	2
Keton	1	-
Pirazin	1	-
Furan	2	2
Furanon	1	1
Komponen lain	21	24
Jumlah	45	48

Tujuh komponen flavor alkohol yang terbentuk pada moromi koro pedang di dalam laboratorium adalah *1-butanol (sweet, cereal)*; *propylene*

glycol sweet); *1-propanol (sweet)*; *1-propanol, 2-methyl-*; *1-butanol, 3-methyl-*; *1-octen-3-ol (mushroom-like, sweet)* dan *1-propanol, 3-(methylthio)- (sweet)*. Sedangkan tujuh komponen flavor alkohol yang terbentuk pada moromi koro pedang di luar laboratorium adalah *1-butanol (sweet, cereal)*; *propylene glycol (sweet)*; *1-propanol (sweet)*; *1-propanol, 2-methyl-*; *1-butanol, 3-methyl-*; *2-pentanol (burnt)* dan *1-octen-3-ol (mushroom, sweet)*. Lee *et al.*, (2006) melaporkan bahwa komponen alkohol yaitu *ethanol (alcoholic)*, *1-butanol, 3-methyl- (medicinal/ metallic)*, *1-octen-3-ol (mushroom)* dan *phenylethyl alcohol (flowery/sweet)* merupakan komponen yang berpengaruh pada flavor kecap kedelai. Secara umum, metabolisme dari mikroflora, pemotongan gugus karbonil dan degradasi asam lemak tidak jenuh adalah tiga jalur pembentukan alkohol selama fermentasi kecap (Lee *et al.*, 2006).

Pembentukan komponen flavor alkohol seperti isobutyl alkohol, isoamyl alkohol, methionol dan 2-phenylethanol oleh *Z. rouxii*, dibentuk dari pemotongan gugus karbonil dan kemudian dipotong menjadi asam α -keto. Asam α -keto sebagian besar dibentuk dalam dua jalur. Jalur pertama adalah jalur biosintesis asam amino dan jalur kedua adalah jalur katabolisme asam amino yang disebut jalur Ehrlich. Dalam jalur Ehrlich, asam α -keto dibentuk dengan cara deaminasi atau transaminasi dari asam amino ekstraseluler (Sluis *et al.*, 2001).

Komponen flavor asam yang terbentuk pada moromi koro pedang di dalam laboratorium adalah *ethyl acetate*, *acetic acid*, *propanoic acid* (*sweet, fruity*), *propanoic acid, 2-methyl-*, *butanoic acid, 3-methyl-*, *butanoic acid, 2-methyl-* dan *butanoic acid* (*sour, unpleasant*). Sedangkan komponen flavor asam yang terbentuk pada moromi koro pedang di luar laboratorium adalah *acetic acid*, *propanoic acid*, *propanoic acid, 2-methyl-*, *butanoic acid, 3-methyl-* (*sweet-like*), *butanoic acid, 2-methyl-*, *butanoic acid* (*sour*) dan *undecanoic acid* (*cereal, coconut-like, sweet*). Asam asetat merupakan komponen utama asam yang berkontribusi dalam pembentukan flavor kecap (Yanfang dan Wenyi, 2009). Moromi koro pedang di dalam dan di luar laboratorium terdapat komponen asam asetat. Asam pentanoat juga merupakan komponen penting dalam pembentukan flavor kecap, tetapi tidak terdeteksi pada moromi di dalam dan di luar laboratorium pada penelitian ini.

Komponen flavor aldehid yang terbentuk pada moromi koro pedang di dalam laboratorium adalah *hexanal*, *octanal* (*fatty, caramel-like*) dan *benzaldehyde* (*roasted nutty*). Sedangkan flavor aldehid yang terbentuk pada moromi koro pedang di luar laboratorium adalah *propanal*, *3-(methylthio)-* (*green, savory*), *benzaldehyde* (*roasted nutty*), *2-furancarboxaldehyde*, *5-methyl-* (*soy sauces, sweet*), *benzeneacetaldehyde* (*cereal, honey-like*) dan *benzaldehyde, 2-methyl-* (*soy sauces, sweet*). Komponen flavor keton yang terbentuk pada moromi koro pedang di dalam laboratorium adalah *3-hydroxy-3-methyl-2-butanone* (*sweet, caramel-like*). Sedangkan moromi koro pedang

di luar laboratorium tidak terbentuk komponen flavor keton. Menurut Estrella *et al.*, (2004) menyatakan bahwa komponen aldehid dan keton merupakan komponen intermediet yang tidak stabil yang dengan mudah diturunkan menjadi alkohol.

Komponen flavor phenol yang terbentuk pada moromi koro pedang di dalam dan di luar laboratorium adalah *phenol*, *2-methoxy-* (*spicy, cereal*) dan *phenol* (*burnt, cereal, green*). Empat komponen penting yang membentuk flavor sedap dalam fermentasi moromi yaitu *phenol*, *2-methoxy-phenol* (*guaiacol*), *2-methoxy-4-vinyl phenol* dan *4-ethylphenol*. *Phenol* dan *4-ethylphenol* terbentuk dari degradasi *lignin glycoside* selama fermentasi (Kobayashi dan Sugawara, 1999), *2-methoxy-4-vinyl phenol* mengkarakteristik kedelai dimasak, sedangkan *2-methoxy-phenol* (*guaiacol*) merupakan produk degradasi termal dari lignin berikatan dengan *phenolic carboxylic acids* (Chung, 1999).

Komponen flavor pirazin yang terbentuk pada moromi koro pedang di dalam laboratorium adalah *pyrazine*, *methyl-* (*coffee, cereal*). Komponen flavor pirazin tidak terbentuk pada moromi koro pedang di luar laboratorium. Komponen flavor furan yang terbentuk pada moromi koro pedang di dalam dan di luar laboratorium adalah *furfural* (*cooked potatoes*) dan *2-furanmethanol*. Komponen flavor furanon yang terbentuk pada moromi koro pedang di dalam dan di luar laboratorium adalah *2(5H)-furanone* (*sweet burnt, caramel*).

Moromi koro pedang di luar laboratorium membentuk komponen flavor yang kompleks yaitu manis dan gurih (Lampiran 17). Dari Lampiran 17, dapat dilihat bahwa di antara banyak komponen pembentuk flavor pada moromi, moromi di luar laboratorium terbentuk flavor gurih yang memberikan sensasi *coconut-like* yaitu *undercanoic acid*. Moromi di dalam laboratorium tidak terbentuk flavor gurih. Ini berarti bahwa fermentasi moromi di luar laboratorium dapat meningkatkan transaminasi asam amino oleh BAL pada moromi. Flavor gurih merupakan hasil dari transaminasi asam aspartat, asam glutamat dan asam-asam amino siklis-aromatis oleh bakteri asam laktat pada moromi (Liu, 2004).

Komponen pembentuk flavor manis pada moromi dapat dilihat pada Tabel 11. Jumlah komponen flavor manis moromi di luar laboratorium lebih banyak dan konsentrasi sebagian dari komponen manis tersebut lebih besar. Ini berarti bahwa fermentasi moromi di luar laboratorium dapat meningkatkan flavor manis moromi. Hal ini dikarenakan jumlah yeast pada moromi di luar laboratorium lebih banyak dari jumlah yeast pada moromi di dalam laboratorium. Flavor manis terbentuk sebagai hasil dari fermentasi alkohol oleh yeast (Liu, 2004).

Tabel 11. Komponen flavor manis pada moromi

Komponen flavor	Area (%)		Odorant
	Fermentasi	Fermentasi	
	Moromi A	Moromi B	
<i>1-Butanol</i>	0.0597	1.2693	<i>sweet, cereal</i>
<i>Propylene glycol</i>	51.3197	23.6774	<i>sweet</i>
<i>1-Propanol</i>	0.6038	0.8212	<i>sweet</i>
<i>1-Octen-3-ol</i>	0.6147	0.2520	<i>mushroom-like, sweet</i>
<i>1-Propanol, 3-(methylthio)-</i>	16.4602	-	<i>sweet</i>
<i>Propanoic acid</i>	0.4274	1.0559	<i>sweet, fruity</i>
<i>Butanoic acid, 3-methyl-</i>	0.4070	0.3213	<i>sweet-like</i>
<i>2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-</i>	-	3.3704	<i>soy sauces, sweet</i>
<i>Benzeneacetaldehyde</i>	-	1.3461	<i>cereal, honey-like</i>
<i>Benzaldehyde, 2-methyl</i>	-	9.8389	<i>soy sauces, sweet</i>
<i>3-Hydroxy-3-methyl-2-butanone</i>	1.8481	-	<i>sweet, caramel-like</i>
<i>2(5H)-Furanone</i>	0.3047	0.1232	<i>sweet burnt, caramel</i>

Dalam fermentasi moromi ada komponen-komponen flavor yang tidak kalah penting yaitu komponen *heterocyclic*. Komponen *heterocyclic* merupakan flavor yang walaupun kandungannya kecil tetapi mempunyai sifat menimbulkan flavor kuat (*powerful aromatic*). Tujuh belas komponen flavor *heterocyclic* yaitu *methyl pyrazine*, *2,5-dimethyl pyrazine*, *2,6-dimethyl*

pyrazine, 2-ethyl-6-methylpyrazine, trimethylpyrazine, tetrahydro-3-methyl-5-oxo-2-furancarboxylic, tetrahydro-2,2-dimethyl-5-(1-methylethyl)-furan, 2-furanmethanol, 2(5H)-furanone, 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (HDMF), 4-benzoyloxy-2H-pyran-3-one, 3-hydroxy-2,6-dimethyl-4H-pyran-4-one, 3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one, 1-(1H-pyrrol-2yl)-ethanone, 2-carboxaldehyde-1H-pyrrole) dan 3-phenyl-pyridine (Yanfeng dan Wenyi, 2009).

Pada penelitian ini, komponen penting pada kecap *4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-furanone* (HEMF) tidak terbentuk pada moromi koro pedang di dalam dan di luar laboratorium. HEMF tidak dijumpai dalam penelitian ini karena populasi yeast tergolong rendah. Menurut Huang dan Teng (2004), HEMF merupakan komponen yang dibentuk karena jumlah populasi yeast pada moromi sangat tinggi. Jalur biosintesis HEMF adalah *pentose-phosphate cycle* oleh *Z. rouxii*.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5. 1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Fermentasi koji efektif mengurangi kadar HCN.
2. Berdasarkan pengamatan suhu, perlakuan perbedaan kondisi fermentasi moromi di luar laboratorium sekitar 32–45°C memberikan suhu lebih tinggi dibandingkan dengan fermentasi moromi di dalam laboratorium sekitar 28–29°C.
3. Suhu fermentasi berpengaruh terhadap karakteristik moromi. Fermentasi moromi di luar laboratorium lebih cepat menurunkan nilai pH serta meningkatkan bilangan formol dan protein total dalam filtrat moromi dan mempercepat pertumbuhan yeast. Fermentasi moromi di luar laboratorium juga menghasilkan komponen utama flavor yang lebih tinggi serta lebih banyak komponen flavor lain yang terbentuk.

5.2. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian komposisi asam amino pada awal fermentasi moromi sehingga diketahui perubahan asam amino selama fermentasi.
2. Fermentasi kecap koro pedang lebih baik dilakukan di luar laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Agbede, J. O., dan V. A. Aletor. 2005. *Studies Of The Chemical Composition And Protein Quality Evaluation Of Differently Processed Canavalia ensiformis and Mucuna pruriens Seed Flours*. Journal of Food Composition and Analysis. 18 : 89–103.
- Anonim. 1995. AOAC (*Association of Official Agricultural Chemistry*). Official Methods of Analysis. AOAC, Washington D. C.
- Anonim. 2011. Rencana SNI. *Kecap Kedelai Manis*. Pusat Standarisasi Indonesia, Jakarta.
- Arora, S. K. 1995. *Composition of Legumes Grains*. Dalam Sridhar, K. R., Seena, S (ed.). 2006. *Nutritional and antinutritional significance of four unconventional legumes of the genus Canavalia*. *Food Chemistry*. 99 : 267-288.
- Bau , H. M., C.F.Vallaume., F. Evard., E.Quemener., J.P. Nicolas., dan L. Mejean. 1994. *Effect of solid state fermentation using Rhizophus oligosporus sp. T-3 constituents of defatted rape seed meal*. Dalam Sridhar, K. R., Seena, S (ed.). 2006. *Nutritional and antinutritional significance of four unconventional legumes of the genus Canavalia*. *Food Chemistry*. 99 (2) : 267-288.
- Beddows, C.G. 1985. *Fermented fish and fish products*. Dalam Wood BJB (ed.) *Microbiology of fermented foods*. Elsevier Applied Science Publishers, London. 2 : 1–39.
- Beuchat, L.R. 1995. *Application of biotechnology to indigenous fermented foods*. *Journal Food Technology*. 49 (1) : 97-99.
- Blank, I. 1997. *Gas-chromatography-Olfactometry in food aroma analysis*. Dalam R. Marsili (ed.). *Techniques for analyzing food aroma* (293–330). Marcel Dekker, New York.
- Caplice, E., dan G.F. Fitzgerald. 1999. *Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation*. *International Journal of Food Microbiology*. 50 : 131-149.
- Chou, C., dan M. Ling. 1999. *Biochemical changes in soy sauce prepared with extruded and traditional raw materials*. *Journal Food Research International*. 31 (6-7) : 487-492.

- Chung, H.Y. 1999. *Volatile flavor components in red fermented soybean (Glycine max) curds*. Journal Agric. Food Chem. 47: 1803-1809.
- Djien, K. S. 1982. *Foods Firstly Fermented by Moulds, Followed by a Fermentation with a Mixture of Bacteria and Yeast*. Dalam Rose, A. H. (ed.). *Fermented Foods. Economic Microbiology*. Academic Press, Florida.
- D'Mello, J.P.F., T. Acamovic., dan A.G. Walker. 1985. *Nutritive value of jackbeans (Canavalia enformis (L.) DC.) for young chicks*. Dalam Sridhar, K. R., Seena, S (ed.). 2006. *Nutritional and antinutritional significance of four unconventional legumes of the genus Canavalia*. Food Chemistry. 99, (2) : 267-288.
- Ekanayake, S., E.R. Jansz., dan B.M. Nair. 2004. *Literature review of and underutilized legume: Canavalia gladiata L.* Plant Foods for Human Nutrition. 55 (4) : 305-321.
- Estrella, F.G., M. Carboell., P.Gaya., dan M. Nunze. 2004. *Evolution of the volatile components of ewes raw milk amorano cheese: Seasonal variation*. Int. Dairy Journal. 14: 701-711.
- Fischer, C., dan T.R. Scott. 1997. *Food Flavours Biology and Chemistry*. RSC Paperbacks, USA.
- Fukushima, D. 2004. *Industrialization of fermented soy sauce production centering around Japanese shoyu*. Dalam K. H. Steinkraus (ed.), *Industrialization of indigenous fermented foods* (1-88). Marcel Dekker, New York.
- Handajani, S. 1993. *Analisa Sifat Fisis-Khemis Beberapa Biji Kacang-Kacangan, Kekerasan, Kualitas Tanak, Protein, dan Kandungan Mineralnya*. Lembaga penelitian Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Handajani, S., dan Windi. A. 1996. *Analisa Sifat Fisis Khemis Beberapa Biji Kacang-Kacangan, Kekerasan, Kualitas Tanak, Protein, dan Mmineralnya*. Laporan Penelitian Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Huang, T-C., dan D-F. Teng. 2004. *Soy Sauce: Manufacturing and Biochemical Changes*. Dalam Hui, Y.H., Lisbeth Meunier-Goddik, Ase Solvejg Hansen, Jytte Josephsen, Wai-Kit Nip, Peggy S. Stanfield, dan Fidel Toldra (ed.). *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*. Marcel Dekker, New York.

- Iwasaki, K-I., M.Nakajima., dan H. Sasahara. 1993. *Rapid continuous lactic acid fermentation by immobilised lactic acid bacteria for soy sauce production*. Proc. Biochem. 28 : 39-45.
- Jansen M., J.H. Veurink., G-JW. Euverink., dan L. Dijkhuizen. 2003. *Growth of the salt-tolerant yeast Zygosaccharomyces rouxii in microtiter plates: effects of NaCl, pH and temperature on growth and fusel alcohol production from branched-chain amino acids*. FEMS Yeast Res. 3: 313-318.
- Jeong, S. Y., S. J. Chung., D. S. Suh., B. C. Suh., dan K. O. Kim. 2004. *Developing a descriptive analysis procedure for evaluating the sensory characteristic of soy sauce*. Journal of Food Science. 69: 319-325.
- Kanetro B., dan S. Hastuti. 2006. *Ragam Produk Olahan Kacang-Kacangan*. Universitas Wagsa Manggala Press, Yogyakarta
- Kato, H., M. R. Rhue., dan T. Nishimura. 1989. *Role of free amino acids and peptides in food taste*. Dalam R. Teranishi, R. G. Buttery, dan F. Shahidi (ed.). *Flavor chemistry: trends and developments* (pp. 158-174). American Chemical Society, Washington.
- Kim, J.S., dan Y.S. Lee. 2008. *A study of chemical characteristics of soy sauce and mixed soy sauce: Chemical characteristics of soy sauce*. Eur Food Res. Technol. 227: 933-944.
- Lee., S.M. Seo, Young-suk., dan B.C. Kim. 2006. *Volatile Compounds in Fermented and Acid-hydrolyzed Soy Sauces*. Journal Food Sci. 71(3): 146-156.
- Liu, K. 2004. *Soy Sauce as Natural Seasoning*. Dalam Liu, K (ed.). *Soybeans as Functional Foods and Ingredients*. AOCS Press, Amerika.
- Kobayashi, A., dan E. Sugawara. 1999. *Flavor components of shoyu and miso Japanese fermented soybean seasonings*. Dalam Shahidi F, Ho CT (ed.), *Flavor chemistry of ethnic foods* (5-14). New York. Plenum Press.
- Luh, B.S. 1995. *Industrial production of soy sauce*. Journal Ind. Microbiol. 14 : 467-471.
- Maradja, M. 1976. *Kacang-kacangan*. PT. Karya Nusantara. Jakarta.

- Mohan., dan K. Janardhanan. 1994. *The biochemical composition and nutrient assessment of less known pulses of the genus Canavalia*. Dalam Sridhar, K. R., Seena, S. 2006. *Nutritional and antinutritional significance of four unconventional legumes of the genus Canavalia*. *Food Chemistry*. 99 (2) : 267-288.
- Nishimura, T., dan H. Kato. 1988. *Taste of free amino acids and peptides*. *Food Rev. Int.* 4 : 175-194.
- Nunomura, N., dan M. Sasaki. 1986. *Soy Sauce*. Dalam Reddy, N. R., Pierson, M. D. dan Salunkhe, D. K. (ed.). *Legume-based Fermented Foods*. CRC Press, Inc., Florida.
- _____. 1992. *The shelf life of soy sauce*. Dalam G. Charalambous (ed.). *Shelf life studies of foods and beverages: chemical, biological, physical and nutritional aspects*. Elsevier Science, The Netherlands. 391-408.
- _____. 2003. *Fermented foods/soy(soya) sauce*. Dalam Caballero B, Trugo L, Finglas PM (ed.). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, 2nd edn*. Academic Press, London. 2359-2369.
- Onishi, H. 1990. *Yeast in fermented foods*. Dalam *Yeast Technology*. Springer-Verlag, Berlin.
- Rachmawanti, D., dan S. Handajani. 2008. *Kandungan Asam Sianida, Asam Fitat, dan Potensi Antoksidatif Koro Putih (Phaseolus lunatus)*. Laporan Penelitian. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Rolling, W.F.M., W. Henk., dan V. Van. 1996. *Characterization of Tertragenococcus halophila Populations in Indonesian Soy Mash (Kecap) Fermentation*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(4):1203-120.
- Rubatzky, V.E., dan M. Yamaguchi. 1997. *Sayuran Dunia: Prinsip, Produksi dan Gizi Jilid II*. ITB, Bandung.
- Salunkhe, D.K., dan S.S. Kadam. 1990. *Hand Book of World Food Legumes*. Vol. 1 CRC Press.
- Sarkar, P.K., L.J. Jones., G.S. Craven., S.M. Somerset., dan C. Palmer. 1997. *Amino acid profiles of kinema, a soybean-fermented food*. *Food Chem*. 59: 69-75.

- Seo, J.S., H.G. Chang., W.D. Ji., E.J. Lee., M.R. Choi., H.J. Kim., dan J.K. Kim. 1996. *Aroma components of traditional Korean soy sauce and soybean paste fermented with the same meiju*. Journal Microbiol. Biotech. 6(4): 278-285.
- Siddhuraju, P., dan K. Becker. 2001. *Species/variety differences in biochemical composition and nutritional value of Indian tribal legumes of the genus Canavalia*. Dalam Sridhar, K. R., Seena, S. 2006. *Nutritional and antinutritional significance of four unconventional legumes of the genus Canavalia*. Food Chemistry. 99 (2) : 267-288.
- Slamet, D.S. 1978. *The Nutrient and Amino Acid Contents of Kecap dalam Aimma Jaya Isnariani, 1993. Mikroflora dan Aflatoksin pada Kedelai Hitam dan Koji dalam Proses Pembuatan Kecap*. Skripsi Jurusan Pengolahan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Sluis, C. V. D., J. Tramper., dan R. H. Wijffels. 2001. *Enhancing and accelerating flavor formation by salt-tolerant yeasts in Japanese soy-sauce processes*. Trends in Food Science and Technology. 12: 322-327.
- Su, N-W., M-L. Wang., K-F. Kwok., dan M-H. Lee. 2005. *Effects of Temperature and Sodium Chloride Concentration on the Activities of Proteases and Amylases in Soy Sauce Koji*. J. Agric. Food Chem. 53: 1521-1525.
- Wedhastri, S. 1990. *Pemerungan Kadar Glukosida Sinaogenik Biji Koro Benguk (Mucuna pruriens, D.C.) oleh Aktivitas Fermentasi Aspergillus oryzae, A. sojae, Rhizopus oligosporus dan R. oryzae*. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Whitaker, J. R. 1978. *Biochemical changes occurring during the fermentation of high-protein foods*. Journal Food Technology. 32(5) : 175-180.
- Winarno, F. G., S. Fardiaz., dan D. Daulay. 1973. *Indonesian Fermented Foods*. Bogor Agricultural University, Indonesia.
- Wood, B. J. B. 1994. *Technology transfer and indigenous fermented foods*. Food Research International. 27 : 269-280.
- Wu, T. Y., M. S. Kan., L. F. Siow., dan L. K. Iniandy. 2010. *Effect of temperature on moromi fermentation of soy sauce with intermittent aeration*. African Journal of Biotechnology. 9 (5) : 702-706.

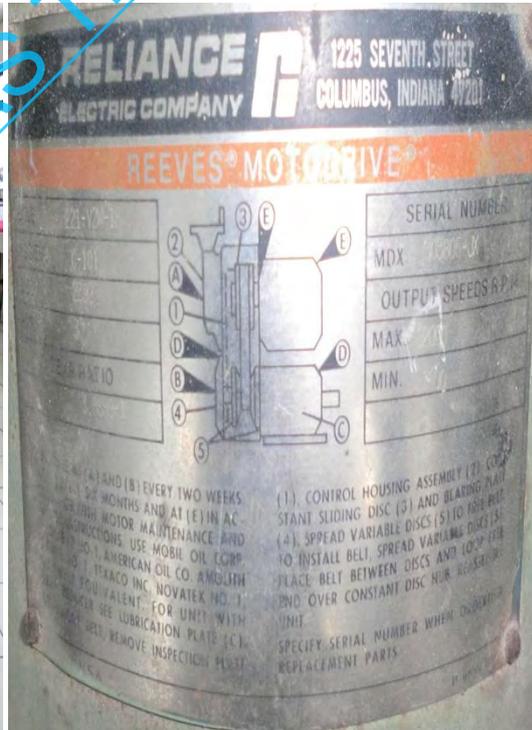
- Yanfang, Z., dan T. Wenyi. 2009. *Flavor and taste compounds analysis in Chinese solid fermented soy sauce*. African Journal of Biotechnology. 8 (4): 673-681.
- Yokotsuka, T. 1986. *Soy sauce biochemistry*. Dalam Chichester CO, Mrak EM, Schweigert BS (ed.). *Advances in food research*. Academic Press, Orlando. 30 : 195–329.
- Yong, F.M., dan B.J.B. Wood. 1976. *Microbial succession in experimental soy sauce fermentations*. Journal Food Technology. 11: 525-536.

UNIVERSITAS TERBUKA

LAMPIRAN

UNIVERSITAS TERBUKA

Lampiran 1. Spesifikasi Alat Desintegrator



Lampiran 2. Penentuan HCN (Sudarmadji *et al.* 1981)

1. Sebanyak 5 gram sampel dimasukkan ke dalam labu takar 250 mL, kemudian ditambahkan dengan aquades sebanyak 200 mL, kemudian dikocok-kocok, setelah itu ditambahkan lagi aquades hingga tepat 250 mL, kemudian dikocok lagi.
2. Dari larutan di dalam labu takar tersebut, diambil sebanyak 1 mL dan dicampur bersama NaOH 0.1N sebanyak 1 mL dan asam pikrat basa 0.5% sebanyak 5 mL di dalam sebuah tabung reaksi. Kemudian dididihkan selama 30 menit, dan di vortex. Hasilnya kemudian dibaca dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 480 nm.
3. Kurva standar dibuat dengan melarutkan 30 mg KCN ke dalam 100 mL aquades, kemudian dari larutan tersebut diambil sebanyak 10 mL, dan diencerkan lagi menjadi 100 mL.

Lampiran 3. Bilangan formol dari AOAC (Anonim, 1995)

1. Timbang sampel dalam Erlenmeyer 1-5 g.
2. Tambahkan 3 tetes indikator PP, 2 mL kalium oksalat, dan ditambahkan 100 mL aquades.
3. Titrasi dengan NaOH 0,1 N sampai berwarna merah muda.
4. Tambahkan 1 mL formaldehid.
5. Titrasi dengan NaOH 0,1 N sampai berwarna merah muda dan hitung volume.
6. Protein terlarut dalam sampel kemudian dihitung.

$$\% \text{ Bilangan formol} = \frac{\text{mL NaOH} \times \text{N NaOH}}{\text{mg sampel}} \times 14,008 \times 100\%$$

UNIVERSITAS TERBUKA

Lampiran 4. Protein total dengan mikro Kjeldahl dari AOAC (Anonim, 1995)

1. Timbang sampel 0,2 - 0,5 g dan masukkan ke dalam labu Kjeldahl, kapasitas 50 mL, tambahkan 0,5 - 1 g katalisator dengan pembungkusan kertas saring, kemudian tambahkan 3 mL H₂SO₄ pekat.
2. Pendestruksian di ruang asam sampai larutan menjadi jernih. Kemudian didinginkan.
3. Setelah dingin dilakukan pemindahan sedikit – sedikit ke tabung distilasi dengan penambahan 10 mL aquadest.
4. Kemudian lakukan destilasi dengan 20 mL NaOH.Na₂S₂O₄.
5. Kemudian destilat ditampung dengan Erlenmeyer yang telah berisi 5 mL asam borat 4% + BCG – MR.
6. Titrasi larutan yang diperoleh dengan 0,02 N HCl.
7. % protein total dalam sampel kemudian dihitung.

Perhitungan jumlah protein total:

$$\text{Jumlah \% protein total} = \frac{\text{mL HCl} \times \text{N HCl}}{\text{mg sampel}} \times 14,008 \times f_k \times 100\%$$

f_k = faktor konversi (6,25)

Lampiran 5. Prosedur analisis HPLC asam amino bebas moromi

1. Ditimbang sampel moromi 10 mL dan dimasukkan kedalam tabung tertutup.
2. Ditambahkan dengan HCL 6N sebanyak 10 mL kemudian homogenkan.
3. Dihidrolisis pada suhu 110 °C selama 12 jam.
4. Didinginkan pada suhu ruang kemudian dinetralkan dengan NaOH 6N.
5. Ditambahkan Pb Acetat 40% sebanyak 2,5 mL dan asam oksalat 15% sebanyak 1 mL.
6. Ditambahkan aquabidest sebanyak 50 mL pada sampel moromi.
7. Diambil 3 mL kemudian disaring dengan millex 0,45 µm.
8. Untuk injeksi ke HPLC diambil larutan yang telah disaring dengan millex sebanyak 50 µL sampel + 950 µL OPA, divortek. Reaksikan selama 3 menit.
9. Diinjeksikan 20 µL ke HPLC.
10. Kondisi HPLC

Kolom : Eurospher 100-5 C18, 250x4, 6mm dengan precolumn

P/N: I115Y535

Eluen : A = BufferAsetat 0,01 M pH 5,9

B = (MeOH:Buffer Asetat 0,01 M pH 5,9: THF-> 80:15:5)

λ : Ext : 340 nm Em : 450 nm

Program Gradien :

T	Flow	B %
0	1,5	30
3	1,5	30
25	1,5	100
25,02	1,5	30

UNIVERSITAS TERBUKA

Lampiran 6. Prosedur analisis flavor moromi

Prosedur analisis flavor moromi sebagai berikut. Diambil 6 gram moromi, lalu dimasukkan ke dalam dalam vial SPME 22 ml. Sampel dipanaskan dalam *waterbath* dengan suhu 65°C selama 30 menit dengan fibre SPME (DVB/ PDMS) dalam vial sebagai proses ekstraksi flavor dari sampel. Setelah proses ekstraksi 30 menit dalam *waterbath*, fibre diinjeksikan ke GCMS. Selama diinjeksikan, *sneefer* mengidentifikasi aroma yang muncul melalui *sneefing port* yang tersambung dengan GCMS. Hasil identifikasi *sneefer* kemudian disesuaikan dengan hasil GCMS.

UNIVERSITAS TERBUKA



Lampiran 7. Data pengukuran suhu moromi selama fermentasi moromi

Minggu	Perlakuan		Senin				Rabu				Jum'at			
			A1	A2	B1	B2	A1	A2	B1	B2	A1	A2	B1	B2
M-1	Pagi	Tepi	28	28	34	34	28	28	37	37	28	28	34	34
		Tengah	28	28	34	34	28	28	37	37	28	28	34	34
		Tepi	28	28	34	34	28	28	37	37	28	28	34	34
	Siang	Tepi	28	28	38	38	28	28	39	39	28	28	36	36
		Tengah	28	28	38	38	28	28	39	39	28	28	36	36
		Tepi	28	28	38	38	28	28	39	39	28	28	36	36
	Sore	Tepi	28	28	38	38	28	28	39	39	28	28	35	35
		Tengah	28	28	38	38	28	28	37	37	28	28	35	35
		Tepi	28	28	38	38	28	28	37	37	28	28	35	35
M-2	Pagi	Tepi	28	28	32	32	29	29	33	33	29	29	33	33
		Tengah	28	28	32	32	29	29	33	33	29	29	33	33
		Tepi	28	28	32	32	29	29	33	33	29	29	33	33



	Siang	Tepi	28	28	36	36	29	29	45	45	29	29	43	43
		Tengah	28	28	36	36	29	29	45	45	29	29	43	43
		Tepi	28	28	36	36	29	29	45	45	29	29	43	43
	Sore	Tepi	28	28	34	34	29	29	43	43	29	29	41	41
		Tengah	28	28	34	34	29	29	43	43	29	29	41	41
		Tepi	28	28	34	34	29	29	43	43	29	29	41	41
M-3	Pagi	Tepi	29	29	32	32	29	29	32	32	29	29	32	32
		Tengah	29	29	32	32	29	29	32	32	29	29	32	32
		Tepi	29	29	32	32	29	29	32	32	29	29	32	32
	Siang	Tepi	29	29	40	40	29	29	38	38	29	29	36	36
		Tengah	29	29	40	40	29	29	38	38	29	29	36	36
		Tepi	29	29	40	40	29	29	38	38	29	29	36	36
	Sore	Tepi	29	29	39	39	29	29	36	36	29	29	34	34
		Tengah	29	29	39	39	29	29	36	36	29	29	34	34
		Tepi	29	29	39	39	29	29	36	36	29	29	34	34
M-4	Pagi	Tepi	29	29	36	36	29	29	32	32	29	29	33	33
		Tengah	29	29	36	36	29	29	32	32	29	29	33	33
		Tepi	29	29	36	36	29	29	32	32	29	29	33	33



	Siang	Tepi	29	29	43	43	29	29	40	40	29	29	43	43
		Tengah	29	29	43	43	29	29	40	40	29	29	43	43
		Tepi	29	29	43	43	29	29	40	40	29	29	43	43
	Sore	Tepi	29	29	43	43	29	29	40	40	29	29	40	40
		Tengah	29	29	43	43	29	29	40	40	29	29	40	40
		Tepi	29	29	43	43	29	29	40	40	29	29	40	40
M-5	Pagi	Tepi	29	29	33	33	29	29	33	33	29	29	32	32
		Tengah	29	29	33	33	29	29	33	33	29	29	32	32
		Tepi	29	29	33	33	29	29	33	33	29	29	32	32
	Siang	Tepi	29	29	43	43	29	29	44	44	29	29	42	42
		Tengah	29	29	43	43	29	29	44	44	29	29	42	42
		Tepi	29	29	43	43	29	29	44	44	29	29	42	42
	Sore	Tepi	29	29	41	41	29	29	43	43	29	29	40	40
		Tengah	29	29	41	41	29	29	43	43	29	29	40	40
		Tepi	29	29	41	41	29	29	43	43	29	29	40	40
M-6	Pagi	Tepi	29	29	36	36	29	29	39	39	29	29	34	34
		Tengah	29	29	36	36	29	29	39	39	29	29	34	34
		Tepi	29	29	36	36	29	29	39	39	29	29	34	34



	Siang	Tepi	29	29	40	40	29	29	43	43	29	29	43	43
		Tengah	29	29	40	40	29	29	43	43	29	29	43	43
		Tepi	29	29	40	40	29	29	43	43	29	29	43	43
	Sore	Tepi	29	29	40	40	29	29	41	41	29	29	43	43
		Tengah	29	29	40	40	29	29	41	41	29	29	43	43
		Tepi	29	29	40	40	29	29	41	41	29	29	43	43
M-7	Pagi	Tepi	29	29	36	36	29	29	34	34	29	29	34	34
		Tengah	29	29	36	36	29	29	34	34	29	29	34	34
		Tepi	29	29	36	36	29	29	34	34	29	29	34	34
	Siang	Tepi	29	29	43	43	29	29	43	43	29	29	40	40
		Tengah	29	29	43	43	29	29	43	43	29	29	40	40
		Tepi	29	29	43	43	29	29	43	43	29	29	40	40
	Sore	Tepi	29	29	41	41	29	29	40	40	29	29	40	40
		Tengah	29	29	41	41	29	29	40	40	29	29	40	40
		Tepi	29	29	41	41	29	29	40	40	29	29	40	40
M-8	Pagi	Tepi	29	29	34	34	29	29	35	35	29	29	35	35
		Tengah	29	29	34	34	29	29	35	35	29	29	35	35
		Tepi	29	29	34	34	29	29	35	35	29	29	35	35



	Siang	Tepi	29	29	43	43	29	29	43	43	29	29	45	45
		Tengah	29	29	43	43	29	29	43	43	29	29	45	45
		Tepi	29	29	43	43	29	29	43	43	29	29	45	45
	Sore	Tepi	29	29	40	40	29	29	43	43	29	29	43	43
		Tengah	29	29	40	40	29	29	43	43	29	29	43	43
		Tepi	29	29	40	40	29	29	43	43	29	29	43	43
M-9	Pagi	Tepi	29	29	34	34	29	29	34	34	29	29	34	34
		Tengah	29	29	34	34	29	29	34	34	29	29	34	34
		Tepi	29	29	34	34	29	29	34	34	29	29	34	34
	Siang	Tepi	29	29	43	43	29	29	43	43	29	29	43	43
		Tengah	29	29	43	43	29	29	43	43	29	29	43	43
		Tepi	29	29	43	43	29	29	43	43	29	29	43	43
	Sore	Tepi	29	29	41	41	29	29	41	41	29	29	42	42
		Tengah	29	29	41	41	29	29	41	41	29	29	42	42
		Tepi	29	29	41	41	29	29	41	41	29	29	42	42
M-10	Pagi	Tepi	29	29	34	34	29	29	35	35	29	29	35	35
		Tengah	29	29	34	34	29	29	35	35	29	29	35	35
		Tepi	29	29	34	34	29	29	35	35	29	29	35	35



	Siang	Tepi	29	29	45	45	29	29	45	45	29	29	44	44
		Tengah	29	29	45	45	29	29	45	45	29	29	44	44
		Tepi	29	29	45	45	29	29	45	45	29	29	44	44
	Sore	Tepi	29	29	42	42	29	29	44	44	29	29	44	44
		Tengah	29	29	42	42	29	29	44	44	29	29	44	44
		Tepi	29	29	42	42	29	29	44	44	29	29	44	44
M-11	Pagi	Tepi	29	29	35	35	29	29	34	34	29	29	35	35
		Tengah	29	29	35	35	29	29	34	34	29	29	35	35
		Tepi	29	29	35	35	29	29	34	34	29	29	35	35
	Siang	Tepi	29	29	45	45	29	29	43	43	29	29	44	44
		Tengah	29	29	45	45	29	29	43	43	29	29	44	44
		Tepi	29	29	45	45	29	29	43	43	29	29	44	44
	Sore	Tepi	29	29	43	43	29	29	43	43	29	29	43	43
		Tengah	29	29	43	43	29	29	43	43	29	29	43	43
		Tepi	29	29	43	43	29	29	43	43	29	29	43	43
M-12	Pagi	Tepi	29	29	35	35	29	29	35	35	29	29	35	35
		Tengah	29	29	35	35	29	29	35	35	29	29	35	35
		Tepi	29	29	35	35	29	29	35	35	29	29	35	35



Siang	Tepi	29	29	45	45	29	29	44	44	29	29	45	45
	Tengah	29	29	45	45	29	29	44	44	29	29	45	45
	Tepi	29	29	45	45	29	29	44	44	29	29	45	45
Sore	Tepi	29	29	44	44	29	29	43	43	29	29	44	44
	Tengah	29	29	44	44	29	29	43	43	29	29	44	44
	Tepi	29	29	44	44	29	29	43	43	29	29	44	44

Keterangan:

A1 : Fermentasi moromi di dalam laboratorium ulangan 1

A2 : Fermentasi moromi di dalam laboratorium ulangan 2

B1 : Fermentasi moromi di luar laboratorium ulangan 1

B2 : Fermentasi moromi di luar laboratorium ulangan 2

UNIVERSITAS TERBUKA

Lampiran 8. *Analysis of variance* (anova) kadar HCN sebelum dan sesudah fermentasi koji

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: HCN

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	19954.811(a)	1	19954.811	138921.176	.000
Intercept	29774.710	1	29774.710	207285.236	.000
Sampel	19954.811	1	19954.811	138921.176	.000
Error	.287	2	.144		
Total	49729.809	4			
Corrected Total	19955.099	3			

a R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

Lampiran 9. *Analysis of variance* (anova) perbandingan bilangan formol/ protein total sebelum dan sesudah fermentasi koji

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Perbandingan bilangan formol/ protein total

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.017(a)	1	.017	48.554	.020
Intercept	.180	1	.180	499.464	.002
Sampel	.017	1	.017	48.554	.020
Error	.001	2	.000		
Total	.198	4			
Corrected Total	.018	3			

a R Squared = .960 (Adjusted R Squared = .941)

**Lampiran 10.** Data hasil analisis pH moromi

Sampel	Minggu ke-												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Moromi A	6.45	5.99	5.85	5.78	5.71	5.63	5.56	5.50	5.33	5.25	5.32	5.30	5.24
Moromi B	6.31	5.94	5.83	5.77	5.70	5.55	5.47	5.43	5.25	5.19	5.25	5.20	5.10

Lampiran 11. Data hasil analisis bilangan formol

Sampel	Minggu ke-												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Moromi A	0.3502	0.4195	0.4340	0.5042	0.5163	0.4613	0.5157	0.4761	0.5823	0.5600	0.6309	0.5839	0.5993
Moromi B	0.4170	0.4476	0.4661	0.4881	0.5163	0.5233	0.6557	0.6201	0.6707	0.6825	0.8251	0.8108	0.8528

**Lampiran 12.** Data hasil analisis protein total

Sampel	Minggu ke-												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Moromi A	1.5387	1.9766	2.0957	2.1754	2.3116	2.4865	2.5764	2.8182	2.8160	2.8886	2.9813	3.0586	3.0742
Moromi B	1.4025	2.2184	2.6469	2.5004	2.6504	2.9036	2.9095	3.1948	3.2440	3.3424	3.2508	3.3158	3.4449

Lampiran 13. Data hasil pertumbuhan bakteri proteolitik pada moromi

Sampel	Minggu ke-												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Moromi A	3.46E+04	1.80E+07	1.41E+08	1.99E+08	1.36E+08	1.31E+08	1.39E+09	2.38E+10	8.62E+08	1.35E+10	1.50E+11	1.78E+09	1.12E+08
Moromi B	1.75E+05	2.05E+07	1.51E+08	2.34E+08	3.73E+07	2.37E+08	1.63E+09	3.41E+09	4.33E+08	1.14E+10	1.60E+11	1.07E+10	1.29E+10

**Lampiran 14.** Data hasil pertumbuhan BAL pada moromi

Sampel	Minggu ke-												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Moromi A	0.00E+00	2.20E+03	2.45E+05	1.55E+06	1.18E+06	1.31E+06	7.03E+05	7.15E+06	1.26E+07	6.98E+06	2.70E+06	2.21E+05	7.48E+05
Moromi B	0.00E+00	3.25E+04	2.81E+05	2.72E+06	5.23E+05	2.37E+06	2.71E+06	9.95E+06	1.43E+07	9.08E+06	1.77E+06	1.77E+06	3.36E+06

Lampiran 15. Data hasil pertumbuhan yeast pada moromi

Sampel	Minggu ke-												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Moromi A	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	5.50E-01	0.00E+00	2.10E+01	1.79E+02	9.70E+02
Moromi B	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	9.14E+00	9.80E+01	9.75E+01	1.18E+03	8.95E+02	1.05E+04	1.58E+05	3.85E+05

Lampiran 16. Data hasil analisis HPLC asam amino moromi

Senyawa Asam Amino Bebas	Konsentrasi dalam Sampel ($\mu\text{g}/\text{gr}$)	
	Moromi A	Moromi B
Asam Aspartat	3434.00	3135.00
Asam Glutamat	3985.00	3699.00
Asparagin	126.00	84.00
Serin + Sistein	3581.00	3269.00
Glutamin		
Histidin	860.00	754.00
Glisin + Trionin	2537.00	2376.00
Alanin	5053.00	4587.00
Arginin	1523.00	1418.00
Tirosin	896.00	693.00
Metionin	4344.00	3843.00
Triptopan	526.00	435.00
Valin	1516.00	1231.00
Fenilalanin		119.00
Isoleusin	1276.00	1122.00
Leusin	1896.00	1992.00
Lisin	917.00	757.00



Lampiran 17. Komponen flavor moromi

RT (mnt)	Compound	% Area		Odorant
		Moromi A	Moromi B	
<i>alcohols</i>				
6.5485	<i>1-Butanol</i>	0.0597	1.2693	<i>sweet, cereal</i>
7.6627	<i>Propylene glycol</i>	51.3197	23.6774	<i>sweet</i>
8.6102	<i>1-Propanol</i>	0.6038	0.8212	<i>sweet</i>
9.153	<i>1-Propanol, 2-methyl-</i>	0.2283	0.1146	-
10.5171	<i>1-Butanol, 3-methyl-</i>	2.0960	2.5610	-
11.8263	<i>2-Pentanol</i>	-	0.0159	<i>burnt</i>
13.4653	<i>1-Octen-3-ol</i>	0.6147	0.2520	<i>mushroom-like, sweet</i>
17.4379	<i>1-Propanol, 3-(methylthio)-</i>	16.4602	-	<i>sweet</i>
<i>acids</i>				
7.3573	<i>Ethyl acetate</i>	0.0917	-	-
13.6616	<i>Acetic acid</i>	8.3657	25.0269	-
14.7289	<i>Propanoic acid</i>	0.4274	1.0559	<i>sweet, fruity</i>
15.0688	<i>Propanoic acid, 2-methyl-</i>	0.2618	0.4029	-



16.4659	<i>Butanoic acid, 3-methyl-</i>	0.4070	0.3213	<i>sweet-like</i>
16.4739	<i>Butanoic acid, 2-methyl-</i>	0.5684	0.7447	-
19.2903	<i>Butanoic acid</i>	0.0707	0.0772	<i>sour, unpleasant</i>
23.4675	<i>Undecanoic acid</i>	-	4.1919	<i>cereal, coconut-like, sweet</i>
Aldehydes				
9.2822	<i>Hexanal</i>	0.2148	-	-
11.7212	<i>Octanal</i>	9.9789	-	<i>fatty, caramel-like</i>
13.979	<i>Propanal, 3-(methylthio)-</i>	-	14.7746	<i>green, savory</i>
15.0268	<i>Benzaldehyde</i>	1.8420	3.7808	<i>roasted nutty</i>
15.601	<i>2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-</i>		3.3704	<i>soy sauces, sweet</i>
16.621	<i>Benzeneacetaldehyde</i>	-	1.3461	<i>cereal, honey-like</i>
16.837	<i>Benzaldehyde, 2-methyl-</i>	-	9.8389	<i>soy sauces, sweet</i>
Phenols				
19.9395	<i>Phenol, 2-methoxy-</i>	0.4591	0.3476	<i>spicy, cereal</i>
21.7685	<i>Phenol</i>	0.0961	0.0756	<i>burnt, cereal, green</i>
Ketone				
8.625	<i>3-Hydroxy-3-methyl-2-butanone</i>	1.8481	-	<i>sweet, caramel-like</i>



<i>pyrazine</i>				
11.571	Pyrazine, methyl-	0.0867	-	<i>coffee, cereal</i>
<i>Furans</i>				
14.0893	<i>Furfural</i>	3.2009	5.2821	<i>cooked potatoes</i>
18.0427	<i>2-Furanmethanol</i>	0.3936	0.5287	-
<i>Furanone</i>				
9.3877	<i>2(5H)-Furanone</i>	0.3047	0.1232	<i>sweet burnt, caramel</i>
<i>unknown compounds</i>				
3.19	<i>unknown</i>	√	-	<i>coffee, cereal, sour</i>
4.48	<i>unknown</i>		√	<i>sweet, caramel</i>
5.79	<i>unknown</i>	-	√	<i>sweet</i>
6.21	<i>unknown</i>	-	√	<i>cereal</i>
6.43	<i>unknown</i>	√	-	<i>earthy</i>
6.57	<i>unknown</i>	-	√	<i>green</i>
6.78	<i>unknown</i>	√	-	<i>soy sauces</i>
7.04	<i>unknown</i>	-	√	<i>savory</i>
7.35	<i>unknown</i>	-	√	<i>cereal, coconut-like</i>
7.48	<i>unknown</i>	-	√	<i>caramel</i>



7.74	<i>unknown</i>	√	-	<i>green, bean-like</i>
8.82	<i>unknown</i>	-	√	<i>chocolate-like, nutty</i>
9.97	<i>unknown</i>	-	√	<i>green, unpleasant</i>
12.45	<i>unknown</i>	√	-	<i>nutty</i>
13.52	<i>unknown</i>	-	√	<i>sweet potatoes</i>
13.64	<i>unknown</i>	√	-	<i>sweet, savory</i>
13.78	<i>unknown</i>	-	√	<i>potatoes, cereal</i>
14.23	<i>unknown</i>	-	√	<i>cooked potatoes</i>
14.3	<i>unknown</i>	√	-	<i>green, cereal</i>
14.36	<i>unknown</i>	√	-	<i>sweet, spoiled</i>
14.83	<i>unknown</i>	√	-	<i>sweet, cereal</i>
14.9	<i>unknown</i>	√	-	<i>cooked potatoes</i>
15.11	<i>unknown</i>	√	-	<i>soy sauces, condiment</i>
15.76	<i>unknown</i>	√	-	<i>burn, coffee</i>
15.85	<i>unknown</i>	√	-	<i>cereal, sweet</i>
16.04	<i>unknown</i>	-	√	<i>cooked potatoes</i>
16.24	<i>unknown</i>	-	√	<i>fruity, tarry</i>
16.53	<i>unknown</i>	-	√	<i>bean</i>



16.6	<i>unknown</i>	-	√	<i>cereal</i>
16.71	<i>unknown</i>	-	√	<i>sweet, coconut-like</i>
17.84	<i>unknown</i>	√	-	<i>cereal</i>
18.69	<i>unknown</i>	-	√	<i>sweet, floral</i>
19.4	<i>unknown</i>	√	-	<i>cereal, burn</i>
19.46	<i>unknown</i>	-	√	<i>bean</i>
19.55	<i>unknown</i>	-	√	<i>sweet</i>
20.48	<i>unknown</i>	√	-	<i>sweet, caramel</i>
20.64	<i>unknown</i>	√	-	<i>cereal, creamy, cooked potatoes</i>
21.27	<i>unknown</i>		√	<i>roasted nutty</i>
21.59	<i>unknown</i>	√	-	<i>cooked potatoes</i>
22.83	<i>unknown</i>	-	√	<i>sweet, cereal</i>
24.03	<i>unknown</i>	√	-	<i>sweet</i>
25.05	<i>unknown</i>	-	√	<i>creamy</i>
25.15	<i>unknown</i>	√	-	<i>caramel</i>
25.2	<i>unknown</i>	-	√	<i>acid</i>
26.35	<i>unknown</i>	√	-	<i>cereal</i>