

**ANALISIS KADAR PROTEIN TERLARUT HASIL FERMENTASI DAUN
KEDELAI EDAMAME (*Glycine Max* (L) Merr) OLEH *Rhizopus oryzae*
DENGAN PENAMBAHAN TEPUNG KEDELAI**

SKRIPSI

Asal :	Hadiah	Klass
Terima : gl :	03, 11, 2007	47.29
No. induk :		Lin
Pengkatalog :		a

Oleh :

Lia Linanda
NIM 021810401005

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER**

2007



**ANALISIS KADAR PROTEIN TERLARUT HASIL FERMENTASI DAUN
KEDELAI EDAMAME (*Glycine max* (L) Merr) OLEH *Rhizopus oryzae*
DENGAN PENAMBAHAN TEPUNG KEDELAI**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (SI)
dan mencapai gelar Sarjana Sains

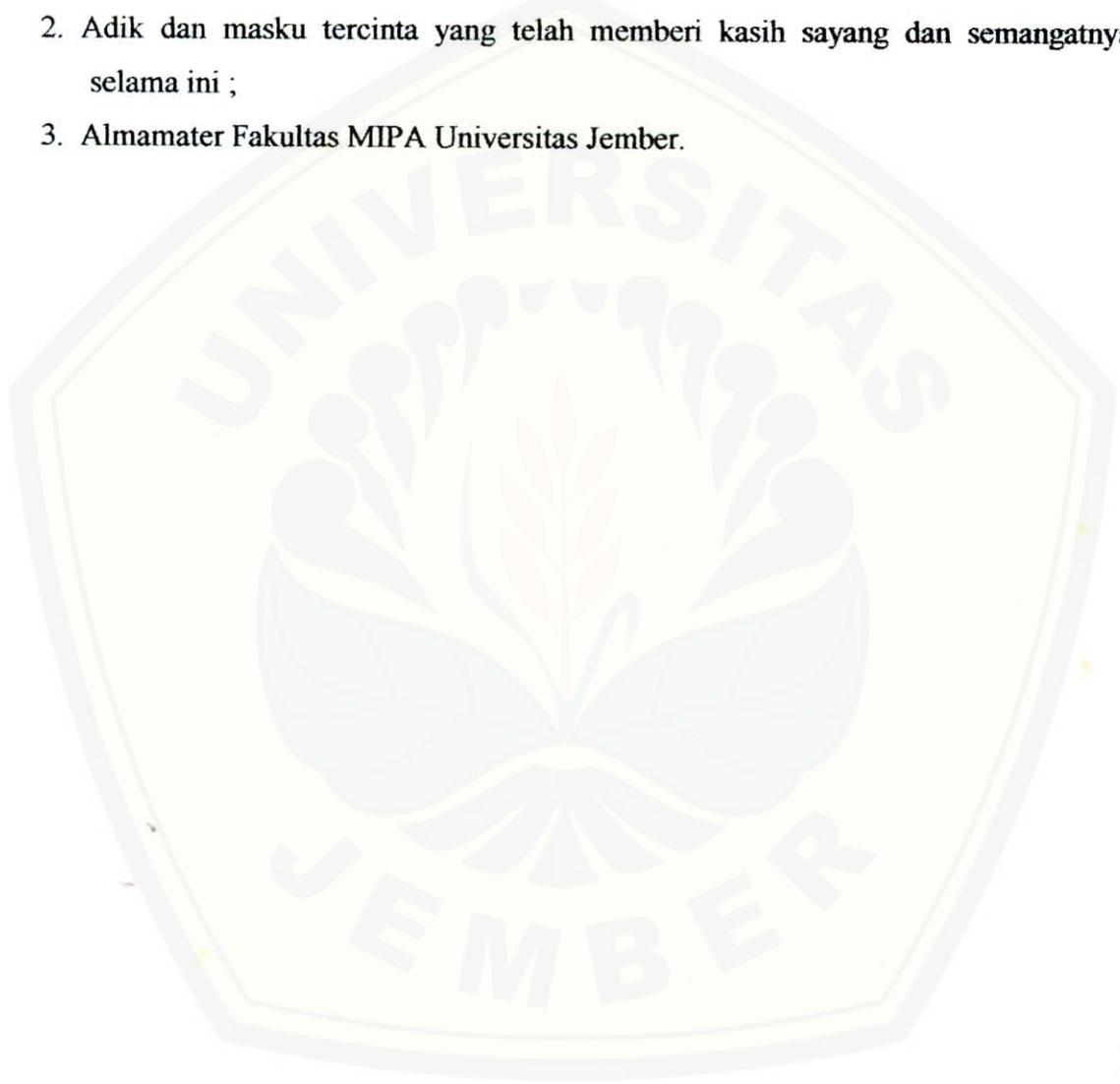
Oleh
Lia Linanda
NIM 021810401005

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2007**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Dawami Mahmud dan Ayahanda Miswi tercinta, yang telah mendoakan dan memberi semangat serta kasih sayang selama ini;
2. Adik dan masku tercinta yang telah memberi kasih sayang dan semangatnya selama ini ;
3. Almamater Fakultas MIPA Universitas Jember.



MOTTO

Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan^{*)}

Tuntutlah ilmu, tapi tidak melupakan ibadah, dan kerjakanlah ibadah tapi tidak melupakan ilmu^{**)}

Jangan malu menyatakan tidak tahu bila memang tidak tahu dan pelajarilah yang tidak diketahui^{**)}



^{*)}Al-Hikmah. 2006. Alqur'an dan Terjemahannya. Bandung: Penerbit Diponegoro.

^{**)} Ali Usman dan Dahlan. 2005. Hadist Qudsi. Bandung: Penerbit Diponegoro

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Lia Linanda

NIM : 021810401005

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul: *Analisis Kadar Protein Terlarut Daun Kedelai Edamame (Glycine max(L) Merr) Hasil Fermentasi oleh Rhizopus oryzae dengan Penambahan Tepung Kedelai* adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi mana pun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 7 Maret 2007

Yang menyatakan,



Lia Linanda
NIM 021810401005

SKRIPSI

**ANALISIS KADAR PROTEIN TERLARUT HASIL FERMENTASI DAUN
KEDELAI EDAMAME (*Glycine max* (L) Merr) OLEH *Rhizopus oryzae*
DENGAN PENAMBAHAN TEPUNG KEDELAI**

Oleh
Lia Linanda
NIM 021810401005

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama: Drs. Rudju Winarsa, M.kes.

Dosen Pembimbing Anggota: Drs. Siswanto, M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul *Analisis Kadar Protein Terlarut Daun Kedelai Edamame (Glycine max(L) Merr) Hasil Fermentasi oleh Rhizopus oryzae dengan Penambahan Tepung Kedelai* telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam pada:

hari : RABU

tanggal: 07 MAR 2007

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

Tim Penguji

Ketua,



Drs. Rudju Winarsa, M.Kes.
NIP 131 832 331

Sekretaris,



Drs. Siswanto, M.Si.
NIP 132 046 350

Anggota I,



Drs. Sutoyo, M.Si.
NIP 131 993 435

Anggota II,



Esti Utarti, SP, M.Si.
NIP 132 243 344

Mengetahui
Dekan,



Ir. Sumadi, M.S.
NIP 130 368 784

RINGKASAN

Analisis Kadar Protein Terlarut Daun Kedelai Edamame (*Glycine max* (L) Merr) Hasil Fermentasi oleh *Rhizopus oryzae* dengan Penambahan Tepung Kedelai; Lia Linanda, 021810401005; 2007: 24 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

Kedelai edamame merupakan produk unggulan ekspor nonmigas yang berpotensi untuk dikembangkan dalam masa yang akan datang. Selain polong, bahan ikutan lain yang dihasilkan setiap panen adalah jerami kedelai. Jerami ini terdiri dari batang, ranting, dan daun. Jerami kedelai yang berupa daun biasanya digunakan sebagai pakan ternak. Namun hal tersebut menyebabkan kualitas nutrisi kurang baik. Oleh karena itu untuk meningkatkan kualitas nutrisi, pada penelitian ini memanfaatkan proses fermentasi. Proses fermentasi menggunakan *Rhizopus oryzae* diharapkan dapat menghasilkan olahan yang lebih baik yaitu dapat meningkatkan protein terlarutnya. Tujuan penelitian adalah mengetahui kadar protein terlarut hasil fermentasi daun kedelai edamame oleh *R. oryzae* dengan penambahan tepung kedelai.

Penelitian dilaksanakan dalam beberapa tahapan yaitu tahap pertama adalah pembuatan inokulum meliputi peremajaan isolat dan perhitungan kepadatan spora. Tahap kedua adalah pembuatan media starter dan fermentasi utama yang meliputi persiapan media, inokulasi dan perhitungan kepadatan spora pada media starter. Tahap yang ketiga adalah fermentasi utama yang dilakukan selama 0, 2, 4, 6, 8, dan 10 hari. Selanjutnya pada tahap keempat yaitu analisis protein terlarut hasil fermentasi daun kedelai edamame yang meliputi preparasi sampel, pengukuran kadar protein terlarut sampel, dan pembuatan kurva standar protein. Tahapan yang terakhir yaitu analisis protein total hasil fermentasi daun kedelai edamame yang meliputi tiga cara yaitu destruksi, destilasi, dan titrasi.

Hasil penelitian menunjukkan kepadatan spora optimal *R. oryzae* pada media PDA terjadi pada hari ke 3 yaitu $3,514 \times 10^8$ sel/ml, sedangkan kepadatan spora optimal pada media starter yaitu pada hari ke 4 sebesar $1,18 \times 10^8$ sel/ml. Kadar protein terlarut pada perlakuan tertinggi pada hari ke -8 yaitu 25,89 mg/g sedangkan pada kontrol sebesar 13,28 mg/g.

Fermentasi daun kedelai edamame oleh *R. oryzae* dengan penambahan tepung kedelai dapat memacu pertumbuhan dan perkembangan mikrob, sehingga dapat meningkatkan kadar protein terlarut. Kadar protein terlarutnya mengalami peningkatan sampai hari ke-8 yaitu sebesar 25,89 mg/g, sedangkan pada kontrol (tanpa penambahan tepung kedelai) mengalami peningkatan sampai hari ke -4 yaitu sebesar 13,28 mg/g.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul *Analisis Kadar Protein terlarut Daun Kedelai Edamame (Glycine max(L) Merr) Hasil Fermentasi oleh Rhizopus oryzae dengan Penambahan Tepung Kedelai*. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Drs. Rudju Winarsa, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Utama, dan Drs. Siswanto, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota;
2. Drs. Sutoyo, M.Si., selaku Dosen Penguji I, dan Esti Utarti, S.P., M.Si., selaku Dosen Penguji II;
3. Drs. Retno Wimbaningrum, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama menjadi mahasiswa;
4. Ir. Endang Sulistyowati, selaku Teknisi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA yang telah menyediakan alat dan bahan selama penelitian;
5. Suudah Hasanah, S.Si yang telah memberikan bantuan dan semangatnya selama ini;
6. Rekan kerja selama penelitian ini yaitu Devi, Hadi, Shofie serta seluruh teman-temanku angkatan 2002;
7. Hibah PHK A2 yang telah mendanai penelitian ini.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Maret 2007

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan masalah	2
1.3 Tujuan dan Manfaat	3
1.3.1 Tujuan	3
1.3.2 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Kedelai Edamame (<i>Glycine max</i> (L) Merr)	4
2.2 Fermentasi	5
2.3 <i>Rhizopus oryzae</i>	6
BAB 3. METODE PENELITIAN	7
3.1 Waktu dan Tempat	7
3.2 Alat dan Bahan	7
3.3 Rancangan Penelitian	8

3.4 Pelaksanaan Penelitian	8
3.4.1 Pembuatan Inokulum	8
3.4.2 Pembuatan Starter dan Media Fermentasi Utama	9
3.4.3 Fermentasi Daun Kedelai Edamame (Fermentasi Utama)..	10
3.4.4 Analisis Protein Terlarut Hasil Fermentasi Daun Kedelai Edamame	10
3.4.5 Analisis Kadar Protein Total Hasil Fermentasi Daun Edamame	11
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	13
4.1 Kepadatan Spora <i>R. oryzae</i>	13
4.2 Protein Terlarut dan Protein Total	15
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	18
5.1 Kesimpulan	18
5.2 Saran	18
DAFTAR PUSTAKA	19
LAMPIRAN	22

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Hasil Perhitungan Spora dan Pengukuran pH	22
A.1 Rata-rata Kepadatan Spora <i>R. oryzae</i> pada Media PDA	22
A.2 Rata-rata Kepadatan Spora <i>R. oryzae</i> pada Substrat Daun Edamame dengan Penambahan Tepung Kedelai	22
A.3 Rata-rata pH Substrat Daun Kedelai Edamame	22
B. Komposisi Bahan	23
B.1 Komposisi Media PDA	23
B.2 Komposisi Reagen <i>Coomassie Brilliant Blue</i>	23
C. Cara Menghitung Spora dengan Menggunakan Hemasitometer	23
D. Kurva Standar Protein	24

BAB 1. PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang

Kedelai edamame merupakan produk unggulan ekspor nonmigas yang berpotensi untuk dikembangkan dalam masa yang akan datang. Kedelai edamame dipanen pada saat polong masih muda dan berwarna hijau. Waktu panen kedelai edamame relatif singkat, yakni dipanen pada umur 58-70 hari setelah tanam (Suprpto, 1998). Pada luasan yang sama, produktivitas kedelai edamame lebih tinggi dibandingkan kedelai lokal. Kedelai lokal hanya mampu menghasilkan 1,1 -1,5 ton, sedangkan kedelai edamame bisa menghasilkan 3,5 ton untuk setiap hektarnya (Zufrizal, 2003).

Selain polong, bahan ikutan lain yang dihasilkan pada setiap panen adalah jerami. Jerami yang dimaksud meliputi batang, ranting, dan terutama daun. Jerami tersebut biasanya digunakan sebagai pakan ternak besar, selebihnya dikeringkan dan ditimbun untuk pupuk organik. Menurut Tillman, *et al.* (1989) pada daun kedelai mengandung protein sebesar 20,4%. Selain itu pula dari sektor pakan ternak masih membutuhkan bahan baku dalam jumlah cukup besar. Oleh karena itu jerami kedelai sangat berpeluang untuk diolah dan dikembangkan sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pakan ternak.

Pengolahan bahan baku pakan tersebut dapat memanfaatkan proses fermentasi. Proses fermentasi dapat menyederhanakan senyawa kompleks, sehingga dapat meningkatkan kualitas nutrisi (Mahfudz, 2005). Siswono (2002) menyatakan bahwa adanya proses fermentasi menyebabkan struktur kimia bahan-bahan yang tadinya bersifat kompleks dapat terurai menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana sehingga lebih mudah dicerna. Selain itu sekaligus dapat mengawetkan bahan organik antara lain limbah hijauan pertanian (Erowati, 2003).

Proses fermentasi dapat menggunakan mikroorganisme seperti bakteri, jamur, dan kapang. Kapang adalah mikroorganisme yang sering digunakan untuk fermentasi. *Rhizopus oryzae* merupakan salah satu kapang yang dimanfaatkan untuk proses fermentasi bahan pangan. Selama ini *R. oryzae* digunakan sebagai inokulum untuk pembuatan tempe. Salah satu keunggulan *R. oryzae* adalah mempunyai enzim ekstraseluler satu di antaranya adalah protease yang memiliki aktivitas proteolitik yang besar (Ambjah, 2004). Kemampuan tersebut dapat digunakan sebagai inokulum pada fermentasi daun kedelai edamame dengan harapan hasil olahannya menjadi lebih baik yaitu dapat meningkatkan kandungan protein terlarut.

Fermentasi bahan pangan, pada fermentasi kacang kedelai tanpa penambahan bahan lainnya dengan menggunakan *R. oryzae* dapat menghasilkan tempe dengan kadar protein yang cukup tinggi. Namun fermentasi bahan pakan, tanpa penambahan bahan lainnya, dengan menggunakan *R. oryzae* masih belum diketahui pengaruhnya. Oleh karena itu dalam penelitian ini memanfaatkan proses fermentasi dengan penambahan tepung kedelai pada lama fermentasi yang berbeda. Menurut Hardianto (2003) Penambahan tepung kedelai dapat mendukung pertumbuhan, dan perkembangan mikroorganisme pada substrat daun kedelai edamame agar proses fermentasinya jauh lebih efisien sehingga dapat meningkatkan kadar protein terlarut.

Berdasarkan uraian di atas maka perlu dilakukan penelitian tentang pengolahan daun kedelai edamame dengan penambahan tepung kedelai. Pengolahan daun kedelai edamame tersebut dapat memanfaatkan proses fermentasi dengan menggunakan *R. oryzae*.

1.2 Perumusan Masalah

Daun kedelai edamame merupakan salah satu sumber protein bagi pakan ternak dengan kadar protein sebesar 20,4%. Selanjutnya *R. oryzae* merupakan salah satu kapang yang mempunyai aktivitas proteolitik dan sering digunakan dalam fermentasi bahan pangan. Apakah aktivitas proteolitik tersebut dapat menyebabkan

peningkatan kadar protein terlarut daun kedelai edamame hasil fermentasi oleh *R. oryzae* dengan penambahan tepung kedelai?

Penelitian ini dilakukan pada lama fermentasi 0, 2, 4, 6, 8, dan 10 hari. Penambahan tepung kedelai dilakukan pada satu konsentrasi yaitu dengan konsentrasi 5%, dan selain analisis protein terlarut dengan menggunakan metode Bradford, juga dilakukan pengukuran kadar protein total yang dianalisis dengan menggunakan metode Kjeldahl sehingga didapatkan data pendukung.

1.3 Tujuan dan Manfaat

1.3.1 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar protein terlarut hasil fermentasi daun kedelai edamame oleh *R. oryzae* dengan penambahan tepung kedelai.

1.3.2 Manfaat

Hasil dari penelitian ini diharapkan mampu memberikan sumbangan pemikiran di bidang ilmu pengetahuan terutama bidang nutrisi ternak. Salah satunya yaitu dengan memanfaatkan limbah pertanian khususnya daun kedelai edamame yang belum dimanfaatkan secara optimal.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kedelai Edamame (*Glycine max* (L) Merr)

Kedelai edamame adalah tanaman jenis sayur-sayuran yang termasuk famili Leguminosae. Kedelai edamame ini merupakan introduksi dari Jepang, Thailand, dan Taiwan. Keunggulan kedelai edamame adalah memiliki cita rasa yang manis dan polong berukuran besar (Fachruddin, 2000).

Kedelai merupakan sumber protein nabati. Kedelai dapat digunakan sebagai bahan makanan (tahu, tempe, kecap, tauco, taoji, susu kedelai, tauge) (Somantri, 2004). Astawan (2004) menyatakan, bahwa mutu protein kedelai termasuk paling unggul dibandingkan dengan jenis tanaman lain, bahkan hampir mendekati protein hewani. Hal ini disebabkan oleh banyaknya asam amino essensial yang terkandung dalam kedelai. Seperti arginin, fenilalanin, histidin, isoleusin, leusin, metionin, treonin, dan triptofan.

Selain itu, dalam biji kedelai juga mengandung zat besi, kalsium, vitamin A, B, B1, B2, dan B12. Kandungan serat kedelai yang sangat tinggi, membantu merangsang metabolisme dan dapat menurunkan kadar kolesterol dalam darah (Asiamaya, 2006). Namun selain biji, terdapat bagian organ lain dari kedelai yang mempunyai kandungan protein yang cukup tinggi yaitu pada daunnya, kandungan proteinnya sebesar 20,4%, sehingga daun kedelai ini bisa dimanfaatkan untuk bahan baku pakan ternak. Adapun kandungan nilai gizi pada daun dan biji kedelai seperti pada Tabel 2.1 sebagai berikut.

Tabel 2.1 Komposisi Nilai Gizi Daun dan Biji Kedelai (%)

Organ	Air	Protein	Lemak	Serat	Abu	Ca	P
Daun	76,4	20,4	3,3	28,1	10,9	1,63	0,96
Biji	14,0	42,7	20,1	6,9	6,8	0,35	0,57

Sumber : Tillman, *et al* (1989)

2.2 Fermentasi

Fermentasi dalam bahan pangan adalah perubahan kimia dalam bahan pangan yang disebabkan oleh aktivitas enzimatik yang dihasilkan oleh mikroorganisme (Buckle *et al*, 1987). Oleh karena itu, fermentasi oleh mikroorganisme antara lain kapang mengakibatkan perubahan tekstur, cita rasa, dan aroma bahan pangan sebagai akibat dari pemecahan kandungan-kandungan bahan pangan tersebut (Tejasari, 2005).

Hasil-hasil fermentasi tergantung pada jenis bahan pangan (substrat), kondisi lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan dan metabolisme mikroorganisme tersebut (Winarno, 1980). Senyawa yang dapat dipecah dalam proses fermentasi terutama adalah karbohidrat, sedangkan asam amino hanya dapat difermentasi oleh beberapa jenis bakteri tertentu (Fardiaz, 1989).

Pada proses fermentasi, mikroorganisme membutuhkan energi yang berasal dari substratnya. Mikroorganisme yang berperan dalam proses fermentasi harus mampu tumbuh pada substrat dan mudah beradaptasi dengan lingkungannya, serta harus mampu mengeluarkan enzim-enzim penting yang dapat melakukan perubahan yang dikehendaki secara kimia (Afrianti, 2004).

Kapang dianggap sebagai pabrik penghasil zat gizi, sebab proses fermentasi oleh kapang dapat meningkatkan nilai nutrisi, beberapa kali lipat lebih banyak dibandingkan bahan asalnya (Siswono, 2002). Pada pustaka yang sama menyatakan bahwa kapang dapat mengeluarkan enzim lipase dan protease yang aktif selama proses fermentasi. Demikian pula pada proses fermentasi daun kedelai edamame, dapat memungkinkan terjadi perubahan-perubahan pada daun terfermentasi sehingga menghasilkan nutrisi beberapa kali lipat dari bahan asalnya.

Kapang merupakan mikroorganisme yang berperan penting dalam proses fermentasi. Sebagai contoh adalah fermentasi kedelai dengan menggunakan kapang yang dapat menghasilkan tempe. Dalam proses fermentasi dapat merombak senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana, sehingga protein dalam biji kedelai lebih mudah dicerna (Sardjoko, 1991).

2.3 *R. oryzae*

Menurut Alexopoulos dan Mims (1979), klasifikasi *R. oryzae* sebagai berikut :

- Divisi : Thallophyta
- Subdivisi : Zygomycotina
- Kelas : Zygomycetes
- Ordo : Mucorales
- Famili : Mucoraceae
- Genus : *Rhizopus*
- Spesies : *Rhizopus oryzae*

R. oryzae menghasilkan enzim ekstraselular yang mempunyai aktivitas hidrolitik seperti lipase, amilase, dan protease. Dikaitkan dengan protease dan substrat daun kedelai edamame yang memiliki kadar protein sebesar 20,4%, maka dimungkinkan jamur tersebut mampu memanfaatkan daun tersebut sebagai substrat pertumbuhannya. Menurut Sarwono (1991) *R. oryzae* dapat menguraikan protein menjadi komponen-komponen asam amino, sehingga bila produk tersebut dikonsumsi, maka akan lebih mudah dicerna dalam tubuh dan dapat memudahkan metabolisme dalam tubuh.

Rhizopus sp sebagian besar dapat bekerja pada suhu antara 25-37 °C dan kelembaban (RH) antara 65-86 % dengan keadaan mengandung oksigen bebas (aerobik) (Koswara, 1992). Pada suhu dan temperatur tersebut, *Rhizopus oryzae* dapat melakukan aktivitasnya dengan baik sehingga dapat mengeluarkan enzim-enzimnya untuk mendegradasi daun kedelai edamame.

R. oryzae adalah salah satu kapang yang digunakan dalam proses fermentasi tempe. Miselium dari kapang ini jauh lebih panjang dari pada genus *Rhizopus* lainnya, sehingga tempe yang dihasilkannya kelihatan lebih padat (Koswara, 1995). Dwijoseputro (1994) menyatakan bahwa *R. oryzae* dapat mengubah amilum menjadi dekstrosa dan memecah protein dan lemak yang ada didalam sel kedelai dan kacang.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Juli sampai Desember 2006. Analisis protein terlarut dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember, sedangkan analisis protein total dilaksanakan di Laboratorium Nutrisi Makanan Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang.

3.2 Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan terdiri atas mikrob, media, bahan tambahan, dan bahan kimia. Mikrob yang digunakan yaitu biakan murni *R. oryzae*. Media yang digunakan yaitu daun kedelai edamame, *Potato Dextrose Agar* (PDA). Bahan tambahan yang digunakan yaitu biji kedelai strain Galunggung. Bahan kimia yang digunakan yaitu *Coomassie Brilliant Blue G-250*, akuades, batu didih, etanol 95%, *phosphoric acid*, NaCl 0,85%, H_2SO_4 pekat, H_2SO_4 0,1 N, *seleniumgemisch*, etanol 96%, *methyl red*, *methyl blue*, NaOH 0,1 N, dan NaOH 40%.

Alat yang digunakan terdiri atas gelas-gelas, alat analisis, dan alat bantu lainnya. Gelas yang digunakan yaitu *beaker glass*, dan gelas ukur. Alat untuk analisis yang digunakan yaitu hemasitometer, pHmeter Jenway, alat destilasi. Alat bantu lainnya yang digunakan yaitu lampu Bunsen, sentrifugasi, tabung reaksi beserta rak tabung reaksi, labu didih Kjeldahl, nampan, cawan petri, kertas saring, autoklaf, labu Erlenmeyer, buret, jarum ose, spatula, pipet volume, pipet mikro, timbangan analitis, *magnetic stirer*, vorteks, dan aluminium foil.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan metode deskriptif. Tahap pertama adalah pembuatan inokulum meliputi peremajaan isolat dan perhitungan kepadatan spora. Tahap kedua adalah pembuatan media starter dan fermentasi utama yang meliputi persiapan media, inokulasi dan perhitungan kepadatan spora pada media starter. Tahap yang ketiga adalah fermentasi utama yang dilakukan selama 0, 2, 4, 6, 8, dan 10 hari. Selanjutnya pada tahap keempat yaitu analisis protein terlarut hasil fermentasi daun kedelai edamame yang meliputi preparasi sampel, pengukuran kadar protein terlarut sampel, dan pembuatan kurva standar protein. Tahapan yang terakhir yaitu analisis protein total hasil fermentasi daun kedelai edamame yang meliputi tiga cara yaitu destruksi, destilasi, dan titrasi.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Pembuatan Inokulum

a. Peremajaan Isolat

Peremajaan isolat *R. oryzae* dilakukan dengan menginokulasikan 1 ose biakan murni pada medium PDA miring dan diinkubasi pada 30 °C selama 72 jam. Langkah ini bertujuan untuk meremajakan isolat dan mengkondisikan kembali biakan sebelum digunakan untuk perlakuan.

b. Perhitungan Kepadatan Spora

R. oryzae diinokulasikan secara merata pada media PDA miring dan diinkubasi pada 30 °C. Perhitungan kepadatan spora dilakukan dengan menambahkan 5 ml akuades steril dalam inokulum kemudian dikerik. Hasilnya ditampung dalam labu Erlenmeyer dan dibuat pengenceran 10^{-1} . Kepadatan spora diukur dengan menggunakan Hemasitometer berdasarkan cara Hadioetomo (1993) yang dilakukan setiap hari berturut-turut sampai hari ke -7. Perlakuan tersebut diulang sebanyak 3 kali. Cara perhitungan diuraikan dalam lampiran C.

3.4.2 Pembuatan Starter dan Media Fermentasi Utama

a. Persiapan Media

1). Pembuatan Tepung Kedelai

Sebanyak 350 gram biji kedelai dicuci bersih, direndam selama semalam, sampai pH berkisar 5-6 kemudian ditiriskan. Setelah itu lalu disangrai sampai matang dengan api sedang sekitar 15 menit dan didinginkan, setelah itu dihaluskan.

2.). Persiapan Media Daun Kedelai Edamame

Bahan fermentasi yang berupa daun kedelai edamame terlebih dahulu di keringkan, kemudian dihancurkan dengan cara diremas dengan tangan. Sebanyak 7650 gram daun kedelai yang sudah kering, direndam selama dua malam yang bertujuan untuk memberikan kondisi asam sesuai dengan kondisi yang diinginkan untuk pertumbuhan *R. oryzae*. Setelah direndam, kemudian ditiriskan. Untuk perhitungan spora *R. oryzae*, jumlah daun kedelai edamame yang digunakan sebanyak 63 gram. Sedangkan bahan untuk media starter sebanyak 360 gram. Bahan fermentasi utama digunakan sebanyak 4800 gram yang dibagi menjadi 24 bagian, sehingga masing-masing bagian sebanyak 200 gram. Media fermentasi daun kedelai edamame tersebut ditambahkan tepung kedelai 5% sebagai perlakuan. Sedangkan pada kontrol, daun yang digunakan sebanyak 2400 gram dan dibagi sebanyak 12 bagian sehingga masing-masing bagian sebanyak 200 gram dan tanpa penambahan tepung kedelai.

3). Sterilisasi

Masing-masing bahan tersebut di tempatkan dalam kantong plastik tahan panas. Sterilisasi dilakukan dalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit dan dibiarkan semalam pada suhu ruang.

b. Inokulasi

Biakan *R. oryzae* diinokulasikan pada media PDA miring secara merata dan diinkubasi pada suhu 30 °C sesuai dengan waktu (hari) pertumbuhan optimum *R. oryzae* dari perhitungan spora pada media PDA. Biakan disuspensi dengan larutan

garam fisiologis lalu dikerik secara merata kemudian diinokulasikan pada media starter dengan perbandingan 1: 5, dan diinkubasi pada suhu 30 °C.

c. Perhitungan Kepadatan Spora pada Media Starter

Pengukuran kepadatan spora pada starter dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 1 gram starter dimasukkan dalam 9 ml akuades steril kemudian dibuat pengenceran 10^{-1} . Kepadatan spora diukur dengan menggunakan hemasitometer berdasarkan cara Hadioetomo (1993) yang dilakukan setiap hari sampai 7 hari. Pengukuran kepadatan spora ini bertujuan untuk mengetahui jumlah spora optimum pada starter yang akan dipakai sebagai inokulum pada proses fermentasi utama.

3.4.3 Fermentasi Daun Kedelai Edamame (Fermentasi Utama)

Fermentasi daun kedelai dilakukan dengan menginokulasikan *R. oryzae* dari biakan starter sebanyak 5% pada 200 gram media fermentasi utama, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 0, 2, 4, 6, 8, dan 10 hari. Perlakuan tersebut diulang sebanyak 4 kali.

3.4.4 Analisis Protein Terlarut Hasil Fermentasi Daun Kedelai Edamame

a. Preparasi Sampel

Analisis protein terlarut hasil fermentasi daun kedelai edamame dilakukan pada setiap perlakuan dengan menggunakan metode Bradford. Sebanyak 1 gram sampel dari setiap perlakuan terlebih dahulu ditumbuk sampai halus, lalu dilarutkan dalam 9 ml larutan garam fisiologis (NaCl 0,85%) dan disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Pengujian kadar protein terlarut dilakukan terhadap supernatan yang diperoleh dari proses sentrifugasi tersebut.

b. Pengukuran Kadar Protein Terlarut Sampel

Supernatan masing-masing sampel diencerkan terlebih dahulu, kemudian diambil sebanyak 0,5 ml lalu ditambahkan 5 ml reagen CBB, divortex dan didiamkan selama 2 menit. Pengukuran absorbansi sampel dilakukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm.

c. Pembuatan Kurva Standar Protein

Kurva standar protein digunakan untuk mengetahui kadar protein terlarut pada sampel. Pembuatan kurva standar protein dilakukan dengan menggunakan larutan standar BSA dengan konsentrasi 1 mg/ml. Selanjutnya dilakukan pengenceran hingga didapatkan konsentrasi 50, 75, 100, 125, 150, 175 $\mu\text{g/ml}$. Standar protein dibuat dengan cara mengambil masing-masing 0,5 ml dari tiap seri pengenceran BSA tersebut dan kemudian ditambahkan dengan 5 ml CBB, divortex dan didiamkan selama 2 menit. Pengukuran absorbansi larutan standar dilakukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm.

3.4.5 Analisis Kadar Protein Total Hasil Fermentasi Daun Kedelai Edamame

Analisis kadar protein total dilakukan dengan metode Kjeldahl. Prosesnya dibagi 3 tahapan yaitu destruksi, destilasi dan titrasi. Langkah-langkahnya sebagai berikut.

a. Destruksi

Pada proses destruksi ini dilakukan dengan cara menimbang kertas minyak terlebih dahulu, misal berat A gram. Lalu sampel yang digunakan sebanyak 0,3 gram dituang ke dalam kertas minyak dan ditimbang kembali, misal beratnya B gram. Sampel dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl, ditambah 1,4 gram katalisator dan batu didih. Kemudian ditambah 5 ml H_2SO_4 pekat dengan menggunakan dispenser. Didestruksi sampai warna menjadi hijau dan dibiarkan sampai dingin. Ditambah 60 ml akuades (dibagi 4 kali), kocok dan larutan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 300 ml.

b. Destilasi

Sebanyak 25 ml H_2SO_4 0,1 N dimasukkan ke dalam *beaker glass* 300 ml dengan menggunakan dispenser. Ditambahkan 3 tetes indikator campuran sampai warna menjadi ungu. Kemudian diletakkan *beaker glass* di bawah ujung alat destilasi (ujung alat destilasi harus masuk ke dalam cairan penampung, agar tidak ada NH_3 yang hilang). Ditambah 20 ml NaOH 40% dalam erlenmeyer hasil destruksi,

kemudian dengan cepat (agar tidak ada NH_3 yang hilang) pasang dalam alat destilasi. Selama proses destilasi ini warna tetap ungu. Destilasi selesai kalau di dalam erlenmeyer 300 ml mulai mendidih tidak lancar lagi.

c. Titrasi

Beaker glass yang berisi hasil sulingan dititrasi dengan NaOH 0,1 N sampai warna berubah menjadi hijau jernih, misal jumlah NaOH untuk titrasi C ml. Lalu buat blanko caranya sama tetapi tidak memakai sampel, misal untuk titrasi perlu D ml NaOH 0,1 N.

Perhitungan:

$$\text{Kadar Protein Total} = \frac{(D-C) \times n \text{ NaOH} \times 0,014 \times 6,25 \times 100\%}{B-A}$$

B-A

Keterangan :

- A = berat kertas minyak
- B = berat kertas minyak plus sampel
- C = jumlah NaOH untuk titrasi sampel
- D = jumlah NaOH untuk titrasi blanko
- n = jumlah larutan yang digunakan

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Fermentasi daun kedelai edamame oleh *R. oryzae* dengan penambahan tepung kedelai dapat memacu pertumbuhan dan perkembangan mikrob, sehingga dapat meningkatkan kadar protein terlarut. Kadar protein terlarutnya mengalami peningkatan sampai hari ke-8 yaitu sebesar 25,89 mg/g, sedangkan pada kontrol (tanpa penambahan tepung kedelai) mengalami peningkatan sampai hari ke -4 yaitu sebesar 13,28 mg/g.

5.2 Saran

1. Mengingat *R. oryzae* mempunyai aktivitas proteolitik yang baik pada daun kedelai edamame maka perlu diteliti produksi enzim dan aktivitasnya.
2. Proses fermentasi pada daun kedelai edamame oleh *R. oryzae*, perlu diterapkan pada substrat yang lain (limbah).
3. Perlu dilakukan optimasi proses fermentasi terhadap penambahan tepung kedelai pada konsentrasi yang berbeda.



DAFTAR PUSTAKA

- Afrianti, L. H. 2004. Keunggulan Makanan fermentasi. [serial on line]. <http://www.pikiran-rakyat.com/cetak/0604/24/cakrawala/lainnya02.htm>. [26 Maret 2006].
- Alexopoulus and Mims, C.W. *Introductory Mycology*. Edisi ketiga. Printed in the united States of America.
- Ambjah, K. 2004. Studi Perbandingan Aktivitas Proteolitik dan Amilolitik Kapang-kapang *Rhizopus* dan Isolasi Khamir dari Tempe. [serial on line]. Bogor: Departemen Biologi Institut Pertanian Bogor. http://www.bppt.go.id/index.php?option=com_content&task=view&id. [13 Desember 2006].
- Asiamaya. 2006. Kedelai. [serial on line]. http://www.asiamaya.com/jamuh/isi/kedelai_glycinemax.htm. [3 juli 2006].
- Astawan, M. 2004. Tiada Hari Tanpa Kecap. [serial on line]. <http://www.kompas.com/kesehatan/news/0404/11/143157.htm>. [1 April 2006].
- Buckle, Edwards, Fleet, Wootton. 1987. *Ilmu Pangan*. Terjemahan: Purnomo, dan Adiono. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Dwijoseputro. 1994. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Djambatan.
- Erowati, D. A. 2003. Drum Palstik Berpelat sebagai Silo Untuk Kemasan Kedap Udara Produk Silase Limbah Pertanian. [serial on line]. <http://www.iptek.net.id/ind/?ch=jsti&id=119> [18 maret 2006].
- Fachruddin, L. 2000. *Budidaya Kacang-kacangan*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Faika, Y. 2003. *Perbandingan Kualitas Tempe dari Bahan Baku Kedelai Edamame Muda dan kedelai edamame lokal*. Tidak Dipublikasikan. Skripsi. Jember: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- Fardiaz, S. 1989. *Mikrobiologi Pangan*. Bogor: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Institut Pertanian Bogor.
- Hadioetomo, R. S. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*. Jakarta: Gramedia.

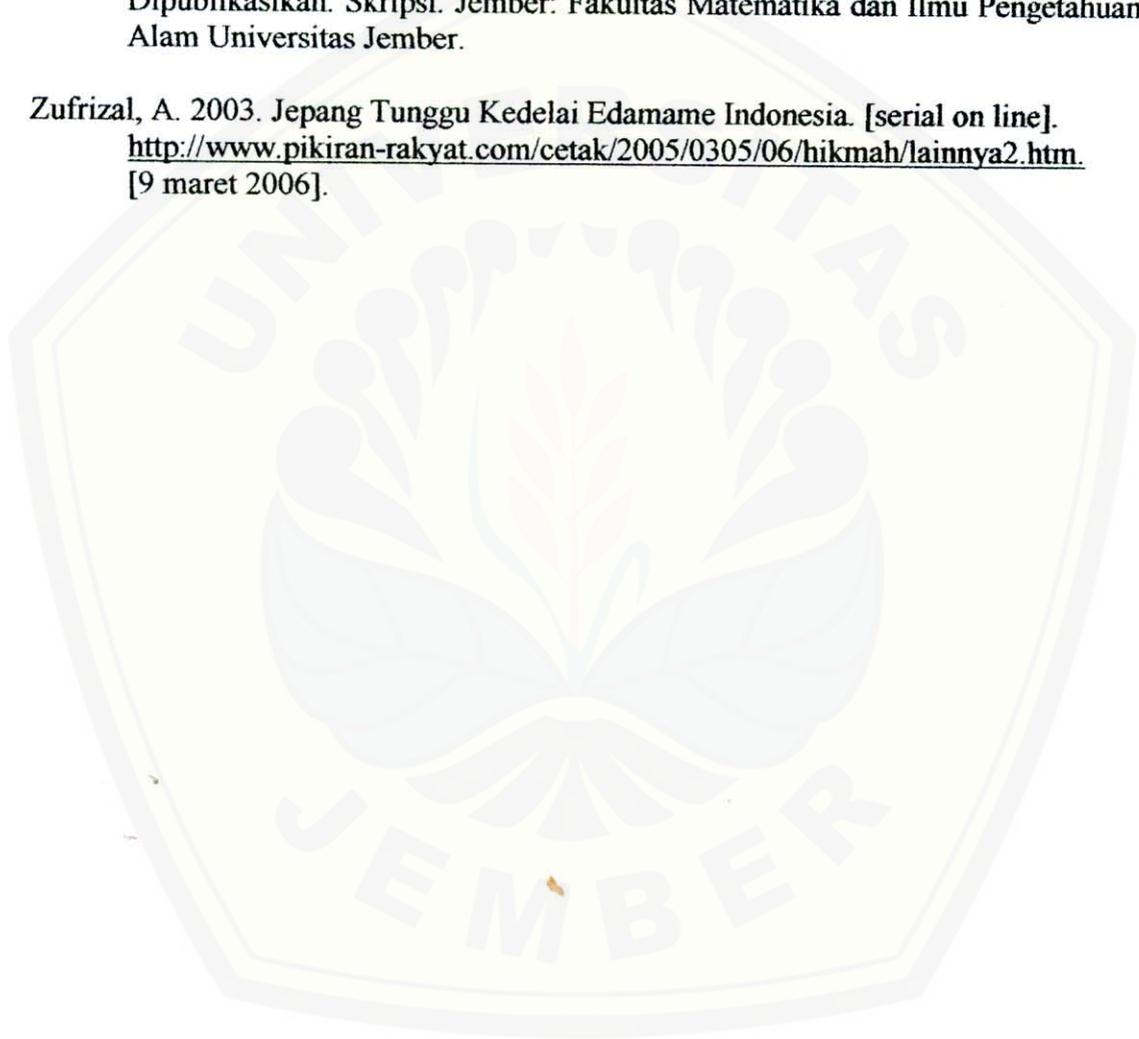
- Hardianto, R. 2003. Rakitan Teknologi Pakan Lengkap (Complete Feed) [serial online]. <http://www.bptp.jatim-deptan.go.id/baru-pakan.html>. [20 juni 2006].
- Koswara, S. 1992. *Teknologi Pengolahan Kedelai*. Jakarta: Pustaka Sinar Harapan.
- Mahfudz. 2005. Ampas Tahu Tingkatkan Produksi Broiler. [serial on line]. http://www.poultryindonesia.com/modules.php?name=New&file_aetcle&sid-1028. [31 maret 2006].
- Sardjoko. 1991. *Bioteknologi, Latar Belakang dan Beberapa Penerapannya*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Sarwono, B. 1991. *Membuat Tempe dan Oncom*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Saryono, Martina, dan Chainulfifah. 2002. Isolasi dan Karakteristik Jamur Penghasil Inulinase yang Tumbuh pada Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis*). [serial online]. [http://www.unri.ac.id/jurnal/jurnal_natur/vol_4_\(2\)/saryono.pdf](http://www.unri.ac.id/jurnal/jurnal_natur/vol_4_(2)/saryono.pdf). [3 maret 2007].
- Siswono. 2002. Oncom, Menutup Kekurangan Energi dan Protein. [serial online]. <http://www.gizi.net/cgi-bin/berita/fullnews.cgi?newsid1033967917,91183> [22 mei 2006].
- Suliantari & Rahayu, W.P. 1990. *Teknologi Fermentasi Umbi-umbian dan Biji-bijian*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat antar Universitas Pangan dan Gizi Institut Pertanian Bogor.
- Suprpto. 1998. *Bertanam Kedelai*. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Suriawiria, U. 1985. *Pengantar Mikrobiologi Umum*. Jakarta: Universitas Terbuka.
- Somantri, I. H. 2004. Mengenal Plasma Nutfah Tanaman Pangan. [serial online]. http://www.indobiogen.or.id/berita_artikel/mengenal_plasmanutfh.php [18 maret 2006].
- Syukur, S. 2004. Studi Pendahuluan Biokonversi Pati Menjadi Glukosa Secara Sel Mobil. [serial on line]. <http://digilib.itb.ac.id/go.php?id=jbptitbpp-gdl-s2-1983-sumaryatis-1734>. [6 Mei 2006].
- Tejasari. 2005. *Nilai Gizi Pangan*. Yogyakarta: Graha Ilmu.

Tillman, Hartadi, Reksohadiprodjo, Prawirokusumo, dan Lebdoesoekojo. 1989. *Ilmu Makanan Ternak Dasar*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press Fakultas Peternakan UGM.

Winarno, F. G. 1980. *Pengantar Teknologi Pangan*. Jakarta: PT Gramedia.

Yekti, N. A. 2005. *Analisis Kadar Protein Terlarut Hasil Fermentasi Daun Kedelai Edamame (Glycine max (L) Merril) oleh Aspergillus niger*. Tidak Dipublikasikan. Skripsi. Jember: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Zufrizal, A. 2003. Jepang Tunggu Kedelai Edamame Indonesia. [serial on line]. <http://www.pikiran-rakyat.com/cetak/2005/0305/06/hikmah/lainnya2.htm>. [9 maret 2006].



LAMPIRAN

A. Hasil Perhitungan Spora dan Pengukuran pH

A.1 Rata-rata Perhitungan Spora *R. oryzae* pada Media PDA

Inkubasi (Hari)	Jumlah Spora(sel/ml)
1	$2,05 \times 10^8$
2	$3,09 \times 10^8$
3	$3,51 \times 10^8$
4	$3,24 \times 10^8$
5	$2,97 \times 10^8$
6	$2,99 \times 10^8$
7	$3,11 \times 10^8$

A.2 Rata-rata Kepadatan Spora *R. oryzae* pada Substrat Daun Edamame dengan Penambahan Tepung Kedelai

Inkubasi (Hari)	Jumlah Spora(sel/ml)
1	$0,40 \times 10^8$
2	$0,72 \times 10^8$
3	$1,01 \times 10^8$
4	$1,18 \times 10^8$
5	$0,96 \times 10^8$
6	$0,98 \times 10^8$
7	$0,92 \times 10^8$

A.3 Rata-rata pH substrat Daun Kedelai Edamame

Inkubasi (Hari)	Perlakuan	Kontrol
0	5,69	5,77
2	7,46	6,83
4	7,64	7,21
6	7,74	7,51
8	8,12	7,28
10	7,78	7,33

B. Komposisi Bahan

B.1 Komposisi Media PDA

Komposisi	Jumlah (g/ml)
Kentang	200 g
Dektrosa	10 g
Agar	15 g
Akuades	1000 ml

B.2 Komposisi Reagen *Coomassie Brilliant Blue*

Bahan	Jumlah
<i>Coomassie Brilliant Blue</i> G-250	50 gr
Etanol 95%	25 ml
Phosphoric acid	85 %
Akuades	Sampai volume akhir 500 ml

C. Cara Perhitungan Spora dengan Menggunakan Hemasitometer

Dalam sejumlah petak yang mengandung spora dihitung jumlahnya, misalkan dalam pengamatan terdapat 500 spora dalam 80 kotak kecil. Cara perhitungannya sebagai berikut.

1. 80 kotak kecil mempunyai luas $0,2 \text{ mm}^2$. Jadi di dalam setiap mm^2 terdapat 500×5 atau 2500 spora.
2. Kedalaman cairan di bawah hemasitometer ialah 0,1 mm. Maka volume cairan yang tercakup oleh kotak berukuran 1 mm^2 ialah $0,1 \text{ mm}^3$. artinya terdapat $2500 \text{ spora}/0,1 \text{ mm}^3$ atau $25000 \text{ spora}/\text{mm}^3$.
3. $1 \text{ ml} = 1 \text{ cm}^3$ atau 1000 mm^3 . Maka jumlah spora yang terdapat di dalam suspensi asal ialah $2,5 \times 10^7 \text{ spora}/\text{ml}$.

D. Kurva Standar Protein

