

IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Bab ini menguraikan mengenai : (4.1) Hasil dan Pembahasan Penelitian Pendahuluan dan (4.2) Hasil dan Pembahasan Penelitian Utama.

4.1. Hasil dan Pembahasan Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan yang dilakukan yaitu menentukan waktu pertumbuhan optimum *Saccharomyces cerevisiae* dengan metode *counting chamber* setiap tiga jam selama 72 jam dalam media cair YPG untuk penambahan ke dalam ragi tape dan menentukan konsentrasi sumber nitrogen yang terbaik dalam pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*, sumber nitrogen yang digunakan adalah urea dengan konsentrasi 2.5%, 5%, dan 7.5% menggunakan inkubator dengan suhu 30⁰C sehingga waktu pertumbuhan optimum *Saccharomyces cerevisiae* yang ditambahkan dan konsentrasi urea terbaik yang digunakan untuk penelitian utama.

4.1.1 Penentuan pertumbuhan optimum

Penelitian pendahuluan yang pertama yaitu menentukan waktu pertumbuhan optimum *Saccharomyces cerevisiae* dengan metode *counting chamber* setiap tiga jam selama 72 jam dalam media cair YPG untuk penambahan ke dalam ragi tape. Pertumbuhan optimum mikroorganisme merupakan bagian penting dalam menghasilkan suatu produk pangan, karena dapat mempengaruhi hasil produk tersebut. Metode yang digunakan untuk mengetahui pertumbuhan optimum pada *Saccharomyces cerevisiae* yaitu metode perhitungan sel hidup dengan alat *counting chamber*. Perhitungan sel tersebut bertujuan untuk

mengetahui pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* . Hasil perhitungan sel dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Hasil Pengamatan Perhitungan Jumlah *Saccharomyces cerevisiae* pada Media Cair YPG

No.	Waktu (Jam)	pH	Suhu (⁰ C)	Jumlah (sel/ml)
1	0	7	30	1,8 x 10 ⁶
2	3	6	30	1,45 x 10 ⁶
3	6	6	30	3,55 x 10 ⁶
4	9	6	27	1,65 x 10 ⁶
5	12	5	27	2,6 x 10 ⁶
6	15	5	27	3,05 x 10 ⁶
7	18	5	26	3,9 x 10 ⁶
8	21	4	26	4,2 x 10 ⁶
9	24	5	27	4,6 x 10 ⁶
10	27	5	27	7,45 x 10 ⁶
11	30	5	26	8,35 x 10 ⁶
12	33	5	27	13,8 x 10 ⁶
13	36	5	27	14,8 x 10 ⁶
14	39	5	28	17,4 x 10 ⁶
15	42	5	27	12,3 x 10 ⁶
16	45	5	27	6,25 x 10 ⁶
17	48	5	28	2,8 x 10 ⁶
18	51	5	28	1,55 x 10 ⁶
19	54	5	27	8 x 10 ⁵
20	57	5	27	0

Berdasarkan perhitungan sel dengan metode *counting chamber* yang dapat dilihat pada Tabel 8 yaitu pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* pada saat pembiakkan awal (*starter*) jumlah selnya sebanyak 1,8 x 10⁶ sel/ml. Setelah tiga jam masa inkubasi dengan suhu 30⁰C mengalami penurunan hingga jumlahnya sebanyak 1,45 x 10⁶ sel/ml. Selanjutnya enam jam masa inkubasi dengan suhu 30⁰C mengalami kenaikan sehingga jumlahnya sebanyak 3,55 x 10⁶ sel/ml. Tetapi setelah sembilan jam masa inkubasi dengan suhu

27⁰C mengalami penurunan lagi hingga jumlahnya sebanyak $1,65 \times 10^6$ sel/ml. Selanjutnya setelah 12 jam masa inkubasi dengan suhu 27⁰C mengalami penurunan lagi hingga jumlahnya sebanyak $2,6 \times 10^6$ sel/ml dan mengalami kenaikan hingga 42 jam masa inkubasi pada suhu 27⁰C jumlahnya sebanyak $12,3 \times 10^6$ sel/ml. *Saccharomyces cerevisiae* mengalami penurunan pertumbuhan setelah 45 jam masa inkubasi dengan suhu 27⁰C mengalami penurunan lagi hingga jumlahnya sebanyak $6,25 \times 10^6$ sel/ml. penurunan tersebut berlanjut sampai jam ke-57 masa inkubasi dengan suhu 27⁰C.

Pada penelitian diatas masa inkubasi yang telah dilakukan pada khamir jenis *Saccharomyces cerevisiae* hanya bertahan selama 54 jam masa inkubasi dengan media YPG dengan suhu dimulai dari 30⁰C sampai suhu 26⁰C. Menurut hasil penelitian pada Tabel 8 pertumbuhan optimum pada khamir jenis *Saccharomyces cerevisiae* tidak ada karena suhu yang digunakan berbeda-beda yaitu 30⁰C - suhu 26⁰C. Sehingga tidak dapat dikatakan sebagai pertumbuhan optimum. Namun pada jam ke 33-39 jam masa inkubasi merupakan pertumbuhan maksimal dari penelitian pada Tabel 8 ini. Hal tersebut dapat berubah apabila suhu yang digunakan dinaikkan atau diturunkan sehingga suhu merupakan faktor yang penting dalam pertumbuhan suatu mikroorganisme. Beberapa kesalahan dalam penelitian ini yaitu suhu yang digunakan. Penggunaan suhu sebaiknya harus konstan atau tidak berubah-ubah sehingga dapat diketahui dengan pasti jumlah khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Selain itu tidak digunakan inkubator yang berstandar juga menjadikan suhu pada penelitian pada Tabel 8 tidak konstan atau selalu berubah-ubah.

Ketidaksesuaian pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* menurut hasil penelitian pada Tabel 8 memiliki beberapa penyebab atau faktor yang mempengaruhi. Faktor utama yaitu suhu, pada waktu di inkubasi suhu yang digunakan untuk memfermentasi ragi tape berkisar 30⁰C. Ketidakstabilan suhu tersebut dapat mempengaruhi hasil penelitian sehingga hasil yang didapat tidak sesuai dengan literatur dalam buku Fardiaz (1992).

Beberapa faktor lingkungan pangan seperti suhu penyimpanan, kemasaman (pH), aktivitas air (a_w), oksidasi reduksi (O-R), dan nutrisi berpengaruh terhadap laju pertumbuhan (Ray, 2004). Jika salah satu faktor misalnya suhu bervariasi dan semua faktor lain tetap selama pertumbuhan *strain* mikroorganisme, laju pertumbuhan dapat diukur. Hal tersebut dapat mencerminkan laju pertumbuhan tinggi atau waktu generasi pendek mikroorganisme pada suhu tertentu. Suhu tersebut mengacu pada suhu optimum pertumbuhan bakteri pada kondisi yang diberikan (Sopandi, dkk, 2014).

Sebelum dan sesudah laju pertumbuhan optimum, laju pertumbuhan lambat sampai laju pertumbuhan berhenti. Daerah kiri dan kanan dari titik pertumbuhan optimum adalah pertumbuhan minimum dari kisaran pertumbuhan bakteri (Sopandi, dkk, 2014).

Sel mikroba dapat terpapar oleh berbagai faktor, misalnya suhu di bawah kisaran pertumbuhan, sel mikroba tidak hanya berhenti untuk tumbuh, tetapi dapat juga terluka atau kehilangan viabilitas bergantung pada kondisi sel tersebut. Kisaran pertumbuhan optimum mikroorganisme dapat digunakan untuk

mempelajari inhibisi, reduksi, atau stimulasi pertumbuhan mikroba dalam pangan (Sopandi dkk., 2014).

Penempatan dalam suatu grafik mempunyai beberapa fitur yang merepresentasikan kondisi sel pada waktu yang berbeda. Populasi tidak mengalami perubahan (*fase lag*) pada kondisi awal. Selama kondisi awal, sel menyerap nutrisi dan meningkatkan ukuran sel. Walaupun populasi tidak berubah karena hanya terjadi perubahan ukuran sel, massa sel, dan kerapatan optis menunjukkan peningkatan. Setelah fase lag, jumlah sel mulai meningkat, pada awalnya perlahan kemudian meningkat sangat cepat. Sel-sel dalam populasi berbeda dalam awal laju metabolisme dan hanya beberapa yang berkembang biak, selanjutnya hampir semua sel berkembang biak. Fase ini disebut fase eksponensial atau fase logaritmik. Laju pertumbuhan pada fase eksponensial mengikuti urutan pertama kinetika reaksi dan dapat digunakan untuk menentukan waktu generasi. Setelah fase eksponensial, laju pertumbuhan melambat dan akhirnya populasi memasuki fase stationer. Pada fase ini, karena kekurangan nutrisi dan akumulasi produk ikutan atau limbah metabolisme, sebagian sel dari populasi mati dan sebagian masih melakukan pembelahan, sehingga stabilitas kehidupan dipertahankan. Jika dilakukan perhitungan jumlah sel dengan mikroskop atau pengukuran sel, jumlah dan massa sel menunjukkan peningkatan karena sel mati tetap ada atau utuh dan masih terhitung atau terukur. Setelah fase stationer, populasi memasuki fase kematian, laju sel yang mati lebih tinggi dibandingkan laju sel yang melakukan pembelahan. Dalam waktu yang lama (dapat beberapa

tahun) beberapa sel tetap masih hidup, tetapi bergantung pada *strain* atau jenis bakteri dan kondisi lingkungan (Sopandi dkk., 2014).

Jenis mikroorganisme yang digunakan adalah *Saccharomyces cerevisiae* yang termasuk jenis mikroorganisme dalam pangan yang bergenus khamir. Satu sel khamir akan menghasilkan kuncup yang berukuran awal lebih kecil dan masih menempel pada permukaan sel tetuanya. Setelah tumbuh membesar, sel baru yang berasal dari kuncup akan menghasilkan kuncup baru, sehingga membentuk suatu rangkaian seperti rantai kuncup yang menempel pada permukaan sel khamir tetuanya (Ray, 2004).

Menurut Sopandi, T., dan Wardah (2014), khamir *Saccharomyces cerevisiae* merupakan khamir yang telah digunakan secara luas dalam produksi roti, bir, dan minuman anggur, produksi enzim invertase, dan flavor beberapa pangan. Sel khamir berbentuk bulat, oval, atau bulat panjang, berkembang biak dengan kuncup, berkonjugasi dan membentuk askospora. *Strain* khamir secara umum dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu khamir bawah dan khamir atas. Khamir atas tumbuh sangat cepat pada suhu 20⁰C serta memproduksi alkohol dan CO₂. Khamir atas juga membentuk rumpun atau gumpalan karena produksi CO₂ yang cepat dan mengapung pada permukaan media. Sebaliknya, khamir bawah tumbuh lebih baik pada suhu 10-15⁰C tidak membentuk rumpun dan berada di bagian bawah media. Khamir atas dan bawah digunakan sesuai proses fermentasi yang diperlukan.

Keasaman atau pH medium merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme dan pembentukan produk dalam

proses fermentasi karena setiap mikroorganisme mempunyai kisaran pH optimal. Dalam penelitian ini keasaman atau pH awal media tidak diatur menjadi 4,5 tetapi pH nya sebesar 6. Menurut Fardiaz (1992) pH optimal khamir adalah 4,0-4,5. Hal tersebut dapat menjadi faktor hasil yang kurang maksimal. Namun dalam proses fermentasi terjadi penurunan pH karena di dalam proses fermentasi *Saccharomyces cerevisiae* selain menghasilkan etanol juga menghasilkan CO₂ dan asam-asam organik. Amerine dalam Sugiarto (1991) menyatakan bahwa perubahan pH dalam fermentasi disebabkan karena dalam aktivitasnya sel khamir selain menghasilkan etanol sebagai metabolit primer juga menghasilkan asam-asam organik seperti asam malat, asam tartarat, asam sitrat, asam laktat, asam asetat, asam butirat dan asam propionate sebagai hasil sampingan. Asam-asam ini menurunkan pH medium.

Setelah dibandingkan dengan hasil penelitian pendahuluan di atas bahwa suhu yang digunakan pada penelitian tersebut terlalu maksimal sehingga pertumbuhan pada jenis khamir *Saccharomyces cerevisiae* tidak terlalu optimal atau cepat. Hal tersebut diperkuat dengan data pengamatan perhitungan jumlah *saccharomyces cereviae* menggunakan metode *counting chamber* pada media cair YPG. Tetapi jika dibandingkan dengan ragi yang ada di pasar, proses fermentasi berlangsung lebih cepat.

Jika menggunakan ragi pasar proses inkubasi agar menghasilkan tape membutuhkan waktu 2-3 hari. Sedangkan dengan menggunakan ragi tape pada penelitian ini hanya membutuhkan waktu 24 jam saja, karena saat percobaan 48 jam tape sudah berubah menjadi asam atau kelebihan waktu fermentasi. Namun

jika dibandingkan rasa dan aroma tentu ragi pasar lebih baik dibandingkan ragi pada penelitian ini, karena jenis mikroorganismenya yang digunakan hanya jenis khamir *Saccharomyces cerevisiae* saja sedangkan di dalam ragi pasar terdapat *Chlamydomucor oryzae*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor sp*, *Candida sp*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces verdomanii*, dan lain-lain (Tim Ristek, 2007).

Sehingga hasil penelitian pendahuluan ini mengenai waktu optimum pertumbuhan khamir *Saccharomyces cerevisiae* yaitu 39 jam dengan jumlah sel hidup sekitar $17,4 \times 10^6$ sel/ml dan pH 5.

4.1.2. Penentuan Penambahan Konsentrasi Sumber Nitrogen Jenis Urea

Penelitian pendahuluan yang kedua yaitu dilakukan pembuatan ragi tape dengan penambahan urea dengan tiga konsentrasi berbeda yaitu 2.5% (u_1), 5% (u_2), dan 7.5% (u_3) menggunakan suhu inkubasi 30°C selama 33 jam waktu fermentasi. Kemudian dilakukan perhitungan jumlah sel khamir dengan metode *counting chamber* dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Hasil Pengamatan Perhitungan Jumlah *Saccharomyces cerevisiae* menggunakan Metode *Counting Chamber* pada Ragi Tape

No.	Konsentrasi urea	Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	pH	Jumlah (sel/ml)
1	2,5 %	25	6	$6,75 \times 10^8$
2	5,0 %	25	6	$3,55 \times 10^8$
3	7,5 %	25	6	$3,40 \times 10^8$

Berdasarkan hasil perhitungan pada jumlah *saccharomyces cerevisiae* menggunakan metode perhitungan jumlah sel hidup dengan alat *counting chamber* pada ragi tape yang dapat dilihat pada Tabel 9 bahwa ragi tape dengan penambahan konsentrasi urea 2.5 % sebesar $6,75 \times 10^8$ sel/ml, konsentrasi urea 5 % sebesar $3,55 \times 10^8$ sel/ml dan konsentrasi urea 7.5 % sebesar $3,40 \times 10^8$ sel/ml.

Sehingga konsentrasi urea yang terpilih adalah konsentrasi urea 2.5 % karena memiliki jumlah *Saccharomyces cerevisiae* terbanyak dibandingkan dengan konsentrasi 5 % dan 7.5%.

Hal ini terjadi karena jumlah enzim yang terdapat pada suspensi pati telah mengalami kejenuhan sehingga penambahan konsentrasi urea ke dalam suspensi pati tidak akan meningkatkan aktivitas enzim alfa-amilase dalam menghidrolisis pati. Menurut Whitaker (1996), penambahan konsentrasi urea akan meningkatkan kecepatan reaksi bila substrat tersedia secara berlebih. Namun peningkatan kecepatan reaksi akan semakin menurun untuk setiap penambahan konsentrasi urea. Olsen (1995) menambahkan bahwa peningkatan nilai glukosa akan mencapai titik batas, setelah titik itu terlampaui maka tidak akan terjadi perubahan nilai glukosa yang lebih tinggi lagi meskipun konsentrasi enzim ditambahkan dan waktu likuifikasi diperpanjang. Hal ini terjadi karena sisi aktif enzim telah jenuh oleh substrat sehingga tidak ada lagi substrat yang dapat melekat pada sisi aktif. Menurut Lehninger (1997), batas tersebut disebut sebagai kecepatan maksimum yaitu kecepatan ketika enzim telah jenuh dengan substrat. Pada saat itu tercapai kecepatan maksimum semua enzim terdapat dalam kompleks enzim substrat.

Nitrogen merupakan sumber nutrisi yang sangat penting. Nitrogen berfungsi sebagai penyedia asam nukleat dan asam amino tunggal serta vitamin yang dibutuhkan *yeast* untuk hidup. Sumber nitrogen yang digunakan dalam penelitian ini adalah Urea. Jumlah *Saccharomyces cerevisiae* yang dihasilkan dengan variasi konsentrasi sumber nitrogen pada nutrisi ditampilkan pada Gambar 6 dapat dilihat dengan menggunakan konsentrasi urea sebagai sumber nitrogen diperoleh

konsentrasi 2.5 % jumlah *Saccharomyces cerevisiae* tertinggi $6,75 \times 10^8$. Urea memiliki unsur nitrogen lebih tinggi dibandingkan *yeast extract* yang mengakibatkan *yeast* menyerap nitrogen dari urea lebih baik sehingga konsentrasi bioetanol yang dihasilkan juga lebih tinggi.

Pertumbuhan mikroba dicapai melalui sintesis komponen seluler dan energi. Nutrisi yang diperlukan untuk proses ini berasal dari lingkungan sel mikroba. Jika sel mikroba tumbuh dalam pangan, nutrisi tersebut dipasok dari pangan. Komponen yang dapat digunakan sebagai nutrisi mikroba termasuk karbohidrat, protein, lipida, mineral dan vitamin. Beberapa mikroba dalam pangan dapat memanfaatkan gula, alkohol, dan asam amino sebagai sumber energi (Jay, 2000). Air tidak dianggap sebagai nutrisi, tetapi sangat penting sebagai media reaksi biokimia yang diperlukan untuk sintesa massa sel dan energi (Ray, 2004).

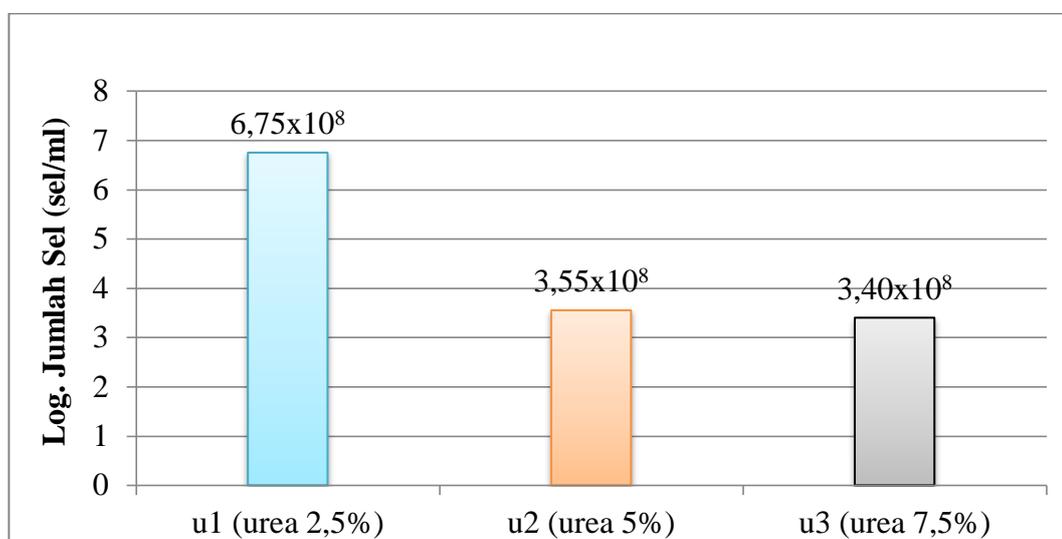
Komponen protein utama dalam pangan adalah protein sederhana, protein konjugasi, peptide, komponen nitrogen nonprotein (NPN) seperti asam amino, urea, amonia (NH_3), keratin, dan trimetilamin. Protein dan peptide adalah polimer dari berbagai asam amino tanpa atau dengan komponen organik lain, seperti karbohidrat atau inorganic seperti besi dan mengandung nitrogen sekitar 15-18%. Protein sederhana adalah polimer asam amino seperti albumin dalam telur, globulin dalam susu, glutelin dalam biji-bijian, prolamin dalam biji-bijian, dan albuminoid dalam kolagen otot (Sopandi dkk., 2014).

Slaughter (1998) melaporkan bahwa, semua mikroorganisme yang telah diteliti tampaknya dapat menggunakan amonia sebagai sumber nitrogen anorganik. Amonia terdapat sebagai bentuk garam amonia, sebagai contoh

ammonium sulfat dan urea. Pada fermentasi fungi, transfor ion amonium melalui sistem transfor aktif, misalnya pada *A. nidulans*, *P. chrysogenum*, dan *Saccharomyces cerevisiae*.

Asimilasi nitrat pada khamir dan kapang menggunakan proses yang sama, yaitu nitrat setelah ditransfor ke dalam sel, kemudian diubah menjadi amonium oleh enzim nitrat reduktase dan nitrit reduktase (Sivero, 2002). Enzim nitrat reduktase merupakan protein yang memerlukan kofaktor molibdopterin, haem-Fe, dan FAD. Sebagian besar fungi dapat menggunakan nitrat sebagai sumber nitrogen (Slaughter, 1988).

Sehingga pada penelitian pendahuluan mengenai konsentrasi urea yang terbaik pada konsentrasi 2,5%, 5%, dan 7,5% dapat disimpulkan bahwa konsentrasi urea 2,5 % memiliki jumlah sel hidup lebih banyak yaitu sebesar $6,75 \times 10^8$ sel/ml dibandingkan dengan konsentrasi urea 5% dan 7,5%. Hal tersebut dapat diamati pada gambar 6.



Gambar 6. Grafik Jumlah *Saccharomyces cerevisiae* dengan konsentrasi urea berbeda pada ragi tape

4.2. Hasil dan Pembahasan Penelitian Utama

Penelitian utama merupakan lanjutan dari penelitian pendahuluan, penelitian utama ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perbandingan konsentrasi penambahan urea dan *Saccharomyces cerevisiae* terhadap pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* pada produk ragi tape.

Ragi tape yang dihasilkan itu selanjutnya dilakukan analisis yang terdiri dari respon yang dilakukan pada penelitian utama meliputi analisis kimia, dan analisis mikrobiologi. Analisis kimia meliputi analisis kadar gula reduksi dengan metode luff school pada produk ragi tape. Sedangkan analisis mikrobiologi meliputi perhitungan jumlah mikroba dengan metode *counting chamber* pada produk ragi tape.

4.2.1. Analisis Kimia

Glukosa adalah suatu aldoheksosa dan mempunyai sifat dapat memutar cahaya terpolarisasi ke arah kanan. Darah manusia normal mengandung glukosa dalam jumlah atau konsentrasi yang tetap, yaitu antara 70-100 mg tiap 100 ml darah. Glukosa darah ini dapat bertambah setelah kita makan makanan yang mengandung karbohidrat, namun kira-kira 2 jam setelah itu jumlah glukosa darah akan kembali pada keadaan semula. Pada orang yang menderita *diabetes melitus* atau kencing manis, jumlah glukosa darah lebih dari 130 mg per 100 ml darah (Poedjiadi, 2005).

Berdasarkan analisis statistik terhadap kadar gula pereduksi metode luff school pada ragi tape yang dapat dilihat pada Lampiran 6, menunjukkan bahwa

perbandingan konsentrasi urea dan *Saccharomyces cerevisiae* berpengaruh terhadap kadar gula reduksi ragi tape.

Pengaruh Interaksi Perbandingan Konsentrasi Urea dan *Saccharomyces Cerevisiae* Terhadap Kadar Gula Reduksi Pada Ragi Tape

a (Konsentrasi Urea)	b (Konsentrasi <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)		
	b₁ (0,5 ml)	b₂ (0,75 ml)	b₃ (1,0 ml)
a ₁	7,423 A a	7,491 A a	7,367 A a
a ₂	7,621 A a	7,633 A a	7,848 A a
a ₃	8,489 B b	8,727 A b	8,862 A b

Keterangan :

a₁ = konsentrasi urea 2,5%

a₂ = konsentrasi urea 2%

a₃ = konsentrasi urea 1%

HB = Huruf Besar dibaca horizontal

Hk = Huruf Kecil dibaca vertikal

(Huruf yang sama pada garis dan kolom menyatakan tidak berbeda nyata)

Sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin sedikit jumlah urea dan semakin banyak jumlah *Saccharomyces cerevisiae* maka kadar gula reduksi pada ragi tape semakin besar dan sebaliknya semakin banyak jumlah urea dan semakin banyak jumlah *Saccharomyces cerevisiae* maka semakin rendah. Kadar gula reduksi terendah pada ragi tape ini terdapat pada kode sampel a₁b₁, dimana konsentrasi urea 2,5 % dan *Saccharomyces cerevisiae* 0,5 ml memiliki kadar gula reduksi dengan nilai rata-rata 7,423%. Sebaliknya pada kode sampel a₃b₃, dimana konsentrasi urea 1 % dan *Saccharomyces cerevisiae* 1 ml memiliki kadar gula reduksi yang sangat tinggi dengan nilai rata-rata 8,862 %. Hal ini diduga karena pengaruh sumber nitrogen untuk nutrisi mikroba yang digunakan berbeda-beda dan jumlah *Saccharomyces cerevisiae* yang digunakan juga berbeda-beda sehingga terlihat perbedaan yang signifikan.

Metode Kimia untuk menganalisis gula pereduksi secara lengkap dan mendetail telah diterbitkan oleh Hodge and Davis (1952). Metode Cu, kemungkinannya belum ada metode lain yang digunakan seperti pada penggunaan metode analisis terhadap gula reduksi yang berasal dari oksidasi oleh ion Cu. Pada semua metode Cu, reduksi Cu dan Oksidasi gula bukanlah suatu stoikhiometri. Sebelumnya, kondisi reaksi bisa digunakan untuk menghasilkan analisis secara kuantitatif, sehingga jumlah gula reduksi bisa di analisis berdasarkan Tabel kalibrasi (Pomeranz, 1994).

Oksidasi dari gula pereduksi oleh Cu-alkali pertama kali ditemukan oleh Trommer pada tahun 1841. Metode ini dikembangkan oleh Baresvil dengan menambahkan Natrium-Tartrat untuk mencegah pengendapan $\text{Cu}(\text{OH})_2$. Metode secara mendetail dikerjakan oleh Fehling pada tahun 1848 dan diperbaiki lagi oleh Soxhlet pada tahun 1878. Dua larutan disiapkan untuk menentukan gula reduksi menggunakan metode Fehling-Soxhlet. Salah satu larutan mengandung 34,64 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ per 500 mL, dan larutan lainnya mengandung 173 g garam Rochelle ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) dan 50 g NaOH per 500 mL (Pomeranz, 1994).

Ketika gula reduksi mengalami pembasaan pada suhu yang meningkat, gula tersebut terdegradasi dan beberapa dari produk degradasi tersebut mereduksi ion Cu dalam larutan menjadi endapan Cu_2O . Analisa kuantitatif menggunakan metode ini telah dikembangkan dengan memvariasikan komposisi dari larutan kupri hidroksida (Pomeranz, 1994).

Titration langsung oleh larutan iodine dijelaskan oleh Shaffer dan Hartman berdasarkan pada keberadaan kompleks oksalat yang terbentuk bersama ion kupri

dan endapan kupri-oksida bisa dititrasi oleh larutan iodat-iodid dalam suasana asam (Pomeranz, 1994).

Besarnya suatu konsentrasi yang akan didapatkan dari proses fermentasi tidak dapat ditentukan hanya berdasarkan konsentrasi gula reduksi awal karena proses fermentasi dipengaruhi oleh banyak faktor. Menurut Sutiari *dalam* Sugiharto (1991) faktor-faktor yang mempengaruhi fermentasi adalah kultur inokulum yang digunakan, lama fermentasi, suhu, pH medium, jumlah makro dan mikro nutrien yang ada dalam media fermentasi, konsentrasi media fermentasi, gula reduksi dan sebagainya. Konsentrasi etanol yang didapatkan pada penelitian ini cukup tinggi. Hal ini disebabkan karena dalam proses fermentasi terjadi proses pemecahan disakarida dan hidrolisa polisakarida menjadi monosakarida atau gula-gula reduksi yang dapat dimanfaatkan oleh sel *Saccharomyces cerevisiae* untuk aktivitas kehidupannya. Selama fermentasi terjadi penurunan konsentrasi gula reduksi karena dipakai oleh sel *Saccharomyces. cerevisiae*. Dalam rangka mempertahankan hidupnya sel *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan enzim tertentu yaitu kelompok enzim invertase yang berfungsi untuk memecah disakarida menjadi glukosa atau gula reduksi sehingga kadar gula reduksi di dalam media fermentasi bertambah. Peningkatan kadar gula reduksi ini menyebabkan peningkatan konsentrasi etanol.

Penggunaan jenis inokulum kering berpengaruh terhadap kadar gula reduksi tertinggi karena didalam ragi pasar mengandung berbagai jenis mikroorganisme yang dapat menghasilkan bermacam-macam enzim, dimana jenis enzim dan banyaknya enzim yang dihasilkan akan mempengaruhi laju fermentasi sehingga

dibandingkan dengan inokulum murni kering *Saccharomyces cerevisiae* yang hanya mengandung khamir saja, enzim yang dihasilkan ragi pasar relatif lebih bervariasi dibandingkan enzim yang dihasilkan inokulum murni.

4.2.2. Analisis Mikrobiologi

Analisis mikrobiologi yang dilakukan yaitu analisis menghitung jumlah *Saccharomyces cerevisiae* dengan metode *counting chamber*. Jumlah sel dalam suatu populasi dapat diukur dengan menghitung dibawah mikroskop, metode ini dinamakan *direct microscopic count*. Metode ini dapat digunakan untuk sampel padat ataupun sampel berbentuk cair. Metode ini menggunakan alat yang dinamakan *counting chamber*. Alat ini berupa lempeng gelas (*grid*) yang pada permukaannya dibuat petak-petak yang sangat kecil berbentuk bujur sangkar dengan luas dan kedalaman tertentu. Jumlah sel per unit luasan pada *grid* dapat dihitung secara langsung dibawah pengamatan dengan mikroskop sehingga menghasilkan ukuran jumlah sel per volume *chamber*. Untuk mengubah nilai ini menjadi jumlah sel/ml dilakukan dengan mengkonversi faktor volume dari sampel yang ada pada *chamber*.

Berdasarkan analisis statistik terhadap jumlah *Saccharomyces cerevisiae* dengan metode *counting chamber* pada ragi tape yang dapat dilihat pada Lampiran 7, menunjukkan bahwa perbandingan konsentrasi urea dan *Saccharomyces cerevisiae* berpengaruh terhadap jumlah mikroorganisme ragi tape.

Pengaruh Interaksi Perbandingan Konsentrasi Urea dan *Saccharomyces cerevisiae* Terhadap Jumlah Sel Pada Ragi Tape

a (Konsentrasi Urea)	b (Konsentrasi <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)		
	b₁ (0,5 ml)	b₂ (0,75 ml)	b₃ (1,0 ml)
a ₁	5,67 x 10 ⁹ A a	7,3 x 10 ⁹ A a	18 x 10 ⁹ B c
a ₂	10,6 x 10 ⁹ A a	6,2 x 10 ⁹ A a	6,3 x 10 ⁹ A a
a ₃	8,5 x 10 ⁹ A a	6,83 x 10 ⁹ A a	14,5 x 10 ⁹ B b

Keterangan :

a₁ = konsentrasi urea 2,5%

a₂ = konsentrasi urea 2%

a₃ = konsentrasi urea 1%

HB = Huruf Besar dibaca horizontal

Hk = Huruf Kecil dibaca vertikal

(Huruf yang sama pada garis dan kolom menyatakan tidak berbeda nyata)

Sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin sedikit jumlah urea dan semakin banyak jumlah *Saccharomyces cerevisiae* maka jumlah sel *Saccharomyces cerevisiae* pada ragi tape semakin besar dan sebaliknya semakin banyak jumlah urea dan semakin banyak jumlah *Saccharomyces cerevisiae* maka semakin rendah. Jumlah sel *Saccharomyces cerevisiae* terendah pada ragi tape ini terdapat pada kode sampel a₁b₁, dimana konsentrasi urea 2,5 % dan *Saccharomyces cerevisiae* 0,5 ml memiliki jumlah sel *Saccharomyces cerevisiae* dengan nilai rata-rata 5,67x10⁹ sel/ml. Sebaliknya pada kode sampel a₁b₃, dimana konsentrasi urea 2,5 % dan *Saccharomyces cerevisiae* 1 ml memiliki jumlah sel *Saccharomyces cerevisiae* yang sangat tinggi dengan nilai rata-rata 18x10⁹ sel/ml. Hal ini diduga karena pengaruh sumber nitrogen untuk nutrisi mikroba yang digunakan berbeda-beda dan jumlah *Saccharomyces cerevisiae* yang digunakan juga berbeda-beda sehingga terlihat perbedaan yang signifikan. Namun terdapat beberapa yang tidak sesuai dengan kesimpulan diatas seperti kode a₂b₂, a₃b₂, dan

a₁b₂ jumlahnya kecil karena terdapat kontaminan lain yang terdapat pada ragi tape kode tersebut. Hal tersebut diduga karena ruang fermentasi yang digunakan terlalu sedikit sehingga penyimpanan nampan ragi tape ditumpuk suhu dinampan paling atas panas sehingga muncul mikroorganisme lain. Selain itu dapat disebabkan oleh ruang fermentasi yang kurang steril.

Perbedaan jumlah konsentrasi urea sebagai sumber nitrogen dan jumlah *Saccharomyces cerevisie* menunjukkan bahwa hal tersebut dapat dijadikan faktor suatu produk ragi tape menjadi baik atau bahkan menjadi tidak baik. Seperti pada kode sampel a3b3 yang baik jumlah khamir maupun urea memiliki hasil jumlah sel yang baik yaitu sebesar $14,5 \times 10^9$ sel/ml. adapun beberapa sampel yang menunjukkan hasil yang tidak diharapkan. Hasil yang tidak sesuai dapat terjadi akibat dari proses fermentasi yang kurang sempurna seperti suhu inkubasi. Menurut Hidayat (2000), Tape yang dihasilkan setelah 45 jam dengan suhu antara 30-37⁰C mempunyai rasa yang lebihh manis dibandingkan pada suhu 26-30⁰C pada fermentasi lebih 144 jam kandungan alkohol menjadi tinggi. Optimasi konsentrasi ragi dan lama inkubasi pada fermentasi tape menunjukkan bahwa kadar gula reduksi tape tertinggi (14,59) jika digunakan konsentrasi ragi kurang dari 0,5 % dengan fermentasi maksimum 4 hari. Sedangkan menurut Menurut Sopandi, T., dan Wardah (2014), khamir atas tumbuh sangat cepat pada suhu 20⁰C serta memproduksi alkohol dan CO₂. Sebaliknya, khamir bawah tumbuh lebih baik pada suhu 10-15⁰C tidak membentuk rumpun dan berada di bagian bawah media.

Kenyataannya di lapangan suhu yang digunakan tidak lebih dari 30⁰C karena dikhawatirkan akan menyebabkan *Saccharomyces cerevisiae* mati atau terlalu cepat tumbuh. Namun apabila dihubungkan dengan dua sumber diatas tidak sepenuhnya dapat dijadikan acuan karena pada ragi tape ini hanya menggunakan satu jenis khamir saja yaitu *Saccharomyces cerevisiae* murni.

Saccharomyces cerevisiae ditumbuhkan dalam media yang mengandung sumber nitrogen urea dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Meskipun demikian, *Saccharomyces cerevisiae* memiliki pola pertumbuhan yang sama. Selama fase adaptasi, *Saccharomyces cerevisiae* tumbuh pada laju pertumbuhan spesifik maksimum (Standbury dan Whitaker, 1995). Setelah 22 jam waktu fermentasi, pertumbuhan mulai memasuki fase stasioner. Pada fase stasioner, populasi sel mencapai maksimum dan tidak bertambah lagi, namun populasi masih aktif secara metabolik untuk memproduksi metabolit sekunder (Standbury dan Whitaker, 1995). Pada fermentasi di atas jam ke-48, kurva pertumbuhan cenderung meningkat. Keadaan ini dapat dijelaskan karena pada akhir fermentasi, kultur sudah banyak berkurang dan sel-sel yang mati cenderung mengendap sehingga aerasi sedikit terganggu. Hal ini dapat menyebabkan tidak homogenya kultur pada saat pengambilan sampel yang sangat mempengaruhi pengukuran turbiditasnya. Pengukuran pertumbuhan berdasarkan kekeruhan atau turbiditas media relatif cepat dan mudah dilakukan, serta dapat digunakan untuk memperkirakan jumlah dan massa sel, tetapi tidak dapat membedakan sel yang hidup dan sel yang mati. Dengan demikian, fase kematian yang ditandai dengan penurunan kurva pertumbuhan tidak terlihat.

Ragi menghasilkan enzim pitase yang dapat melepaskan ikatan fosfor dalam *phitin*, sehingga dengan ditambahkan ragi tape dalam ransum akan menambah ketersediaan mineral (Widodo, 2011). Penjelasan lebih lanjut bahwa ragi bersifat katabolik atau memecah komponen yang kompleks menjadi zat yang lebih sederhana sehingga lebih mudah dicerna.

Khamir merupakan salah satu kelompok mikroorganisme yang banyak diteliti berkaitan dengan kemampuannya memfermentasi gula (Gadd, 1998). Kemampuan khamir memfermentasi gula dapat ditentukan oleh adanya suatu sistem transpor untuk gula dan sistem enzim yang dapat menghidrolisis gula dengan akseptor elektron alternatif selain oksigen, pada kondisi anaerob fakultatif (Moat dkk., 2002). Gula-gula tersebut diasimilasi melalui jalur glikolisis untuk menghasilkan asam piruvat. Asam piruvat dalam kondisi anaerob akan mengalami penguraian oleh piruvat dekarboksilase menjadi etanol dan nitrogen dioksida (Madigan dkk., 2002).

V KESIMPULAN DAN SARAN

Bab ini menguraikan mengenai (5.1) Kesimpulan dan (5.2) Saran.

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian pembuatan ragi tape dengan konsentrasi urea dan *Saccharomyces cerevisiae* terhadap pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Hasil penelitian pendahuluan didapatkan waktu pertumbuhan optimum pada jam ke-39 sebesar $17,4 \times 10^6$ sel/ml dan penambahan sumber nitrogen terbaik yaitu konsentrasi urea 2,5%.
2. Konsentrasi urea berpengaruh terhadap pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* dalam pembuatan ragi tape dimana semakin sedikit jumlah urea yang diberikan maka semakin besar jumlah sel raginya.
3. Konsentrasi *Saccharomyces cerevisiae* berpengaruh terhadap pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* dalam pembuatan ragi tape dimana semakin besar jumlah *Saccharomyces cerevisiae* yang diberikan maka semakin besar jumlah sel raginya.
4. Interaksi konsentrasi *Saccharomyces cerevisiae* dan konsentrasi urea berpengaruh terhadap pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* dalam pembuatan ragi tape sehingga dipilih kode a₁b₃ dengan nilai pH 5, kadar gula reduksi 7,367% dan jumlah sel 18×10^9 sel/ml sebagai ragi tape yang terbaik dalam penelitian ini.

5.2. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai suhu fermentasi yang baik bagi khamir *Saccharomyces cerevisiae* terhadap ragi tape yang ditambahkan inokulum murni.
2. Perlu disediakan ruangan yang khusus untuk penelitian mikrobiologi beserta fasilitas yang memadai seperti mikroskop yang lebih baik. Selain itu laboratorium sebaiknya dapat digunakan selama 24 jam untuk memantau pertumbuhan mikroba secara baik suhunya maupun kontaminannya.