II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Kecap Manis dan Prinsip Pembuatan Kecap

Kecap adalah bahan pangan yang dibuat melalui proses fermentasi kedelai yang ditambahkan bumbu, gula, dan garam untuk memberikan cita rasa makanan yang khas (Cahyadi, 2006). Kecap merupakan sumber protein yang cukup baik karena mengandung asam amino essensial yang cukup tinggi. Adanya proses fermentasi pada pembuatan kecap, zat-zat gizi dalam kecap akan menjadi lebih mudah dicerna, dan dimanfaatkan oleh tubuh (Astawan, 2004).

Kecap dengan kualitas yang baik ditentukan oleh kadar protein yang tinggi, kekentalan pada tingkat tertentu (tidak terlalu cair), warna coklat kehitam-hitaman, daya simpan yang lama dengan memanfaatkan kadar gula yang tinggi atau bahan pengawet, tidak adanya endapan pada kecap meski disimpan dalam waktu lama, serta cita rasa dan aroma khas kecap yang diperoleh melalui fermentasi oleh mikrobia (Suprapti, 2005). Aroma khas kecap tersebut muncul karena adanya alkohol yang dihasilkan oleh khamir *Saccharomyces cerevisiae* pada akhir fermentasi basah. Selain itu, *Aspergillus oryzae* juga berperan dalam menimbulkan aroma khas kecap tersebut, yaitu adanya penguraian protein menjadi amonia oleh protease yang dihasilkan *A. oryzae* (Ratnaningsih dkk., 2009).

Terdapat 3 cara pembuatan kecap, yaitu fermentasi, hidrolisis, dan kombinasi dari kedua cara sebelumnya. Pembuatan kecap dengan fermentasi

berprinsip pada penguraian protein, karbohidrat, dan lemak yang dilakukan oleh enzim yang dihasilkan mikrobia, menjadi senyawa yang lebih sederhana yang mempengaruhi aroma, cita rasa, dan komposisi kecap. Untuk cara hidrolisis pada dasarnya terjadi penguraian protein dengan asam sehingga dihasilkan peptida dan asam amino. Cara kombinasi pada pembuatan kecap dilakukan dengan menggabungkan kedua cara di atas, yaitu diawali dengan hidrolisis sebagian protein oleh asam dan dilanjutkan dengan proses fermentasi (Santoso, 2005).

B. Proses Pembuatan Kecap Tradisional dan Mikrobia yang Terlibat

Menurut Warisno dan Dahana (2010), pembuatan kecap manis dari kedelai diawali dengan pemilihan bahan baku yang baik, mencuci kedelai, dan merendamnya selama kurang lebih 8 jam. Kedelai yang telah direndam selanjutnya dicuci untuk menghilangkan lendir dan direbus agar kedelai lunak dan kulitnya terkelupas. Proses berikutnya adalah fermentasi dengan 2 tahap, yaitu fermentasi kering dan fermentasi basah. Kedelai yang telah difermentasi selanjutnya dimasak dengan air, gula, dan bumbu-bumbu, kemudian diaduk hingga mendidih dan tidak terdapat buih sebagai petunjuk bahwa kecap sudah jadi.

Fermentasi koji/kering dapat terjadi secara spontan atau dengan ditambahkan biakan murni yang dapat disebut dengan koji. Koji terbuat dari biakan murni suatu jenis kapang pada kedelai yang diolah dan dicampur dengan tepung yang telah disangrai (Widowati, 2016). Menurut Rahayu dkk. (1993), pada fermentasi kering, kapang yang digunakan umumnya *Rhizopus* sp.

dan *Aspergillus* sp. Menurut Rahayu (1985), pembuatan kecap selanjutnya adalah tahap fermentasi basah yang dapat disebut juga dengan fermentasi moromi. Pada tahap ini, koji/tempe dikeringkan, dan direndam dalam NaCl 20-30%.

C. Kapang dan Khamir

Kapang merupakan anggota kingdom fungi yang memiliki hifa. Pada dasarnya, kapang terdiri dari 2 bagian, yaitu miselium (kumpulan hifa) dan spora (sel resisten, istirahat atau dorman). Lebar hifa kapang berkisar 5-10 μm dan lebih besar dari bakteri (Coyne dan Mark, 1999). Menurut Fardiaz (1989), kebanyakan kapang bersifat mesofilik, yaitu tumbuh baik pada suhu kamar. Suhu optimum pertumbuhan kapang adalah sekitar 25 - 30^{o}C, tetapi beberapa dapat tumbuh pada suhu 35 - 37^{o}C.

Terdapat beberapa bagian tubuh kapang yang penting, seperti hifa, konidia, konidiofor, sporangium, sporangiofor, dan spora. Hifa merupakan filamen pada kapang yang terbentuk dari sel-sel, sedangkan hifa yang berkumpul dapat membentuk miselium. Hifa juga dapat terbentuk dari spora yang semakin membesar dan memanjang. Spora sendiri berfungsi sebagai alat reproduksi pada jamur (Siregar, 2002).

Spora juga dapat dibentuk dalam sporangium yang selanjutnya disebut sporangiospora. Sporangium yang besar juga dapat terbentuk oleh hifa fertile dan disebut sporangiofor (Gandjar dkk., 2002). Konidia merupakan spora yang bersifat non-motil dan terbentuk secara aseksual (Gandjar dkk., 1999). Konidia

umumnya memiliki bentuk yang beragam yang menunjukkan perbedaan antar spesies (Gandjar dkk., 2002).

Khamir merupakan fungi uniseluler dan berkembangbiak secara pertunasan. Ukuran khamir lebih kecil dari kapang, namun lebih besar dari bakteri, yaitu lebar berkisar antara 1-5µm dan panjang berkisar dari 5-30µm atau lebih. Biasanya sel khamir berbentuk telur, tetapi beberapa ada yang memanjang atau berbentuk bola. Setiap spesies mempunyai bentuk yang khas, namun sekalipun dalam biakan murni terdapat variasi yang luas dalam hal ukuran dan bentuk. Khamir tidak memiliki flagel atau organ-organ penggerak lainnya (Dwijoseputro, 2005).

Kapang dan khamir merupakan kelompok mikroorganisme yang dapat bersifat menguntungkan, karena kemampuannya dalam merombak senyawa organik komplek menjadi senyawa sederhana. Fungsi lain dari fungi adalah menghasilkan berbagai jenis enzim, vitamin, hormon tumbuh, asam-asam organik dan antibiotik. Namun, fungi juga dapat hadir sebagai kontaminan yang dapat mempengaruhi kualitas suatu makanan atau bahan pangan (Noverita, 2009).

Khamir dapat diidentifikasi melalui pengamatan morfologi koloni khamir, morfologi sel khamir, dan sifat biokimia (Barnett dan Pankhurst, 2000). Salah satu uji biokimia pada khamir adalah uji fermentasi karbohidrat, seperti glukosa, sukrosa dan laktosa. Hasil positif uji tersebut akan ditunjukkan oleh adanya pertambahan asam sehingga medium berubah menjadi kuning, serta terbentuknya gelembung gas CO_2 (Campbell dan Duffus, 1988).

D. *Aspergillus oryzae* yang Digunakan sebagai Koji

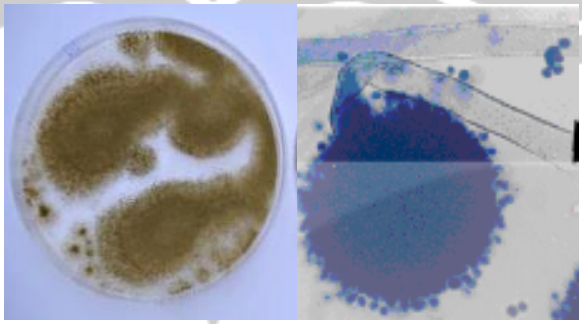
Koji merupakan kumpulan mikroorganisme dari satu strain mikroorganisme atau campuran beberapa jenis mikroorganisme yang mengandung enzim protease asam dan protease alkali, sehingga dapat memecah protein menjadi asam amino dan peptida (Wood, 1985). Menurut Yokotsuka (1982), ada beberapa kriteria kapang yang disarankan untuk digunakan sebagai koji, yaitu :

1. Kapang mampu membentuk spora yang banyak
2. Pertumbuhan kapang banyak dan cepat
3. Kapang dapat menghasilkan enzim yang memiliki aktivitas yang tinggi, seperti enzim maserase dan proteolitik
4. Konsumsi karbohidrat kapang selama pertumbuhan sedikit
5. Memiliki stabilitas genetik yang baik
6. Tidak toksik

Menurut Harti (2015), salah satu jenis kapang yang umum digunakan untuk fermentasi koji yaitu *A. oryzae*. Kapang ini hidup sebagai saprofit atau parasit dengan massa berbentuk benang atau filamen, multiseluler, bercabang-cabang, dan tidak berklorofil. Masing-masing benang disebut hifa, dan kumpulan hifa disebut miselium. Miselium *A. oryzae* bersekat-sekat. Koloni yang sudah menghasilkan spora warnanya menjadi coklat kekuning-kuningan, kehijau-hijauan, atau kehitam-hitaman, miselium yang semula berwarna putih sudah tidak tampak lagi (Suriawiria, 1986). Menurut Raper dan Fennel (1977), kedudukan taksonomi kapang *A. oryzae* yaitu :

Divisi : Eumyccophyta
Kelas : Deuteromycetes
Bangsa : Moniliales
Suku : Moniliaceae
Marga : *Aspergillus*
Jenis : *Aspergillus oryzae*

A. oryzae termasuk kapang bersepta, tidak menghasilkan spora seksual, konidiofor terletak bebas dan tumbuh ireguler, miselium bersih dan tidak berwarna serta bercabang (Frazier dan Westhoff, 1988). Pertumbuhan memerlukan kondisi aerobik, suhu optimum 35-37°C, pH optimum 4-6,5, substrat terutama karbohidrat dan kadar air harus tinggi (Suwaryono dan Ismeini, 1988). Menurut Crus dan Park (1982), *A. oryzae* dikenal sebagai jamur yang paling banyak menghasilkan enzim. Jamur ini mempunyai kelebihan dibanding mikrobia yang lain, antara lain bahwa enzim yang dihasilkan telah dimanfaatkan secara luas pada proses pengolahan pangan dan telah berstatus GRAS (*Generally Recognized as Safe*) dan enzim yang dihasilkan bersifat ekstraselular. Morfologi *A. oryzae* menurut Putri (2011) dan Vanderbilt (2012) dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Morfologi makroskopis (A) dan mikroskopis (B) *A. oryzae*
(Sumber : Putri, 2011 dan Vanderbilt, 2012)

E. Kontaminasi dan Kontaminan

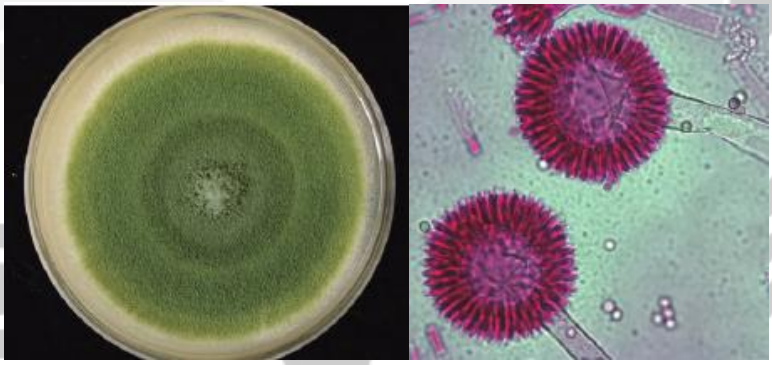
Menurut Amaliyah (2017), kontaminasi pada makanan merupakan munculnya keberadaan organisme atau bahan yang tidak diinginkan secara tidak sengaja dalam makanan. Selanjutnya bahan atau organisme tersebut dapat disebut sebagai kontaminan. Setiap produk makanan mulai dari proses pembuatan atau pengolahan hingga siap dikonsumsi memiliki kemungkinan terjadinya kontaminasi oleh mikrobia. Kontaminasi oleh mikrobia ini dapat berasal dari bahan mentah, lingkungan, peralatan yang digunakan, air, dan penjamah makanan.

Menurut Koswara (1992), kedelai yang akan diolah menjadi kecap melalui fermentasi umumnya melalui dua tahap, yaitu fermentasi kapang dan fermentasi garam. Selama fermentasi tersebut, terdapat beberapa jenis mikrobia yang mungkin muncul dengan atau tanpa disengaja, seperti *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oligosporus*, *Zygosaccharomyces*, dan *Hansenula.* Menurut Deswita dkk. (2013), kontaminasi dari Genus *Aspergillus* sangat luas sebarannya dengan berbagai macam warna, yaitu hijau, kuning, jingga, hitam atau coklat. Secara keseluruhan warna tersebut berasal dari warna konidianya. Keberadaan *Aspergillus sp.* pada sampel kecap manis dapat muncul dari bahan dasar kecap yaitu kedelai baik pada sebelum panen atau pasca panen dan dapat terbawa oleh udara, karena pada dasarnya kapang jenis ini mudah tumbuh pada semua substrat.

Menurut Syaifurrisal (2014), *A. flavus* memiliki koloni berwarna hijau muda dengan bentuk koloni granular dan kompak. Ciri-ciri mikroskopis *A. flavus* yaitu kapang jenis ini memiliki vesikel berbentuk bulat, konidiofor, phialids berada di atas vesikel, dan konidia yang bulat, halus, atau kasar (Koneman dkk., 1992). Berikut klasifikasi *A. flavus* menurut Samson dan Pitt (2000) :

Divisi : Ascomycota
Kelas : Eurotiomycetes
Bangsa : Eurotiales
Suku : Trichocomaceae
Marga : *Aspergillus*
Jenis : *Aspergillus flavus*

Morfologi makroskopis dan mikroskopis *A. flavus* menurut Campbell dkk. (2013) dapat dilihat pada Gambar 2.

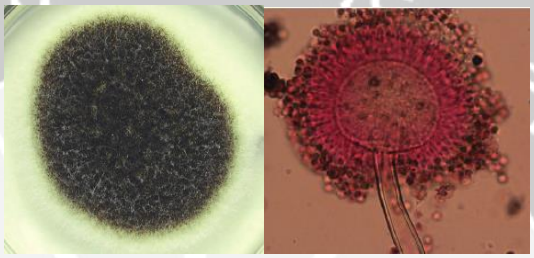


Gambar 2. Morfologi mikroskopis *A. flavus*
(Sumber : Campbell dkk., 2013)

A. niger memiliki ciri-ciri makroskopis berupa koloni berwarna hitam, sedang ciri-ciri mikroskopisnya memiliki vesikel berbentuk bulat, konidia berwarna coklat hingga hitam, kasar, dan bulat, serta konidiofor yang halus dan hitam (Larone, 2002). Menurut Zhao dkk. (2009), *A. niger* memiliki klasifikasi sebagai berikut :

Divisi : Ascomycota
Kelas : Eurotiomycetes
Bangsa : Eurotiales
Suku : Trichocomaceae
Marga : *Aspergillus*
Jenis : *Aspergillus niger*

Morfologi makroskopis dan mikroskopis *A. niger* menurut Campbell dkk. (2013) dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Morfologi mikroskopis *A. niger*
(Sumber : Campbell dkk., 2013)

R. oligosporus sangat jarang atau bahkan belum ditemui pada makanan selain makanan fermentasi. *R. oligosporus* tumbuh sangat lambat pada suhu 45^{o}C. Hingga saat ini tidak terdapat mikotoksin yang diketahui terdapat pada *R. oligosporus* (Pitt dan Hocking, 1985). *R. oligosporus* memiliki koloni berwarna abu-abu kecoklatan dan bagian tubuh berupa sporangiofor tunggal, sporangia, kolumela, sporangiospora, klamidospora, dan hifa (Wipradnyadewi, 2004). Berikut klasifikasi *R. oligosporus* menurut Lendecker dan Moore (1996):

Divisi : Zygomycota
Kelas : Zygomycetes
Bangsa : Mucorales
Suku : Mucoraceae
Marga : *Rhizopus*
Jenis : *Rhizopus oligosporus*

Morfologi mikroskopis *R. oligosporus* menurut Murders (2010) dapat dilihat pada Gambar 4.

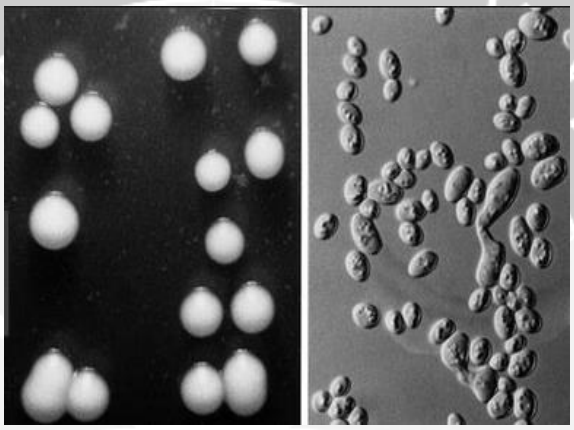
Gambar 4. Morfologi mikroskopis *R. oligosporus*
(Sumber : Murders, 2010)

Menurut Zunaidah dan Alami (2014), genus *Hansenula* termasuk golongan khamir. Khamir ini mampu berkembangbiak menggunakan spora dan alat perkembangbiakkannya disebut askospora. Genus *Hansenula* mampu membentuk *ascocarp* yang menyelimuti askospora. Menurut Widiastutik dan Alami (2014), genus *Hansenula* memiliki bentuk sel bulat, elips atau memanjang dengan *true* hifa atau pseudohifa mungkin terbentuk. Morfologi koloni *Hansenula* menurut Zunaidah dan Alami (2014) dapat dilihat pada Gambar 5.

Gambar 5. Morfologi koloni *Hansenula*
(Sumber : Zunaidah dan Alami, 2014)

Zygosaccharomyces adalah genus yang sering dianggap identik dengan pembusukan makanan karena daya tahan yang luar biasa terhadap pengawet makanan yang biasa digunakan seperti asam sorbat, asam benzoat, asam asetat

dan etanol (Thomas dan Davenport 1985). Menurut Steels dkk. (1999), *Zygosaccharomyces bailii* mampu tumbuh dalam konsentrasi pengawet makanan jauh melebihi yang normal, atau secara legal, ditemui dalam minuman, dan juga mampu beradaptasi dengan konsentrasi pengawet yang lebih tinggi. Morfologi *Z. bailii* menurut Pitt dan Hocking (2009) dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Morfologi koloni *Z. bailii*
(Sumber : Pitt dan Hocking, 2009)

Genus *Zygosaccharomyces* juga mengandung beberapa organisme osmotolerant yang paling dikenal, dan sebagian besar mampu tumbuh pada pH yang sangat rendah. Menurut Leandro dkk. (2011), *Zygosaccharomyces rouxii* merupakan mikrobia yang mengkontaminasi produk makanan seperti sirup gula, madu, jus buah, saus, minuman ringan berkarbonasi, *dressing salad* dan kecap. *Z. rouxii* juga digunakan dalam produksi cuka balsamik dan fermentasi alkohol dari beberapa bahan pangan, seperti kecap dan pasta miso (Dea'k, 2007). Morfologi koloni *Z. rouxii* menurut Goto (1983) dapat dilihat pada Gambar 7.

Gambar 7. Morfologi koloni *Z. rouxii*
(Sumber : Goto, 1983)

F. Standar Nasional Indonesia

Kualitas produk makanan di Indonesia umumnya mengacu pada Standar Nasional Indonesia. Kecap juga memiliki SNI yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Standar Nasional Indonesia Kecap Kedelai Manis

No.	Kriteria Uji	Satuan	Persyaratan
1.	Keadaan		
1.1	Bau	-	Normal, khas
1.2	Rasa	-	Normal, khas
2	Kadar protein (N x 6,25)	% (b/b)	Min. 1,0
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 mikrobia		
7.1	Bakteri coliform	APM/g	< 3
7.2	Kapang	koloni/g	Maks. 50
8	Aflatoksin*		
8.1	B_1	µg/kg	Maks. 15
8.2	Total aflatoksin	µg/kg	Maks. 20
Catatan: * hanya untuk cairan hasil fermentasi kedelai			