APLIKASI SONIKASI TERHADAP KARAKTERISTIK FISIKOKIMIA DAN MIKROBIOLOGI PADA PROSES FERMENTASI MOROMI KECAP

SKRIPSI

Oleh

NAILAH SALMA RAZITA

PROGRAM STUDI S-1 TEKNOLOGI PANGAN
FAKULTAS PETERNAKAN DAN PERTANIAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2026

APLIKASI SONIKASI TERHADAP KARAKTERISTIK FISIKOKIMIA DAN MIKROBIOLOGI PADA PROSES FERMENTASI MOROMI KECAP

Oleh

NAILAH SALMA RAZITA
NIM: 23020122130049

Salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Teknologi Pangan pada Program Studi S-1 Teknologi Pangan
Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro

PROGRAM STUDI S-1 TEKNOLOGI PANGAN
FAKULTAS PETERNAKAN DAN PERTANIAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2026

LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama	: Nailah Salma Razita
N I M	: 23020122130049
Program Studi	: S-1 Teknologi Pangan

dengan ini menyatakan sebagai berikut:

1. Skripsi yang berjudul: **Aplikasi Sonikasi Terhadap Karakteristik Fisikokimia dan Mikrobiologi pada Proses Fermentasi Moromi Kecap** dan penelitian yang terkait dengan skripsi ini merupakan karya penulis sendiri.
2. Setiap ide atau kutipan dari karya orang lain berupa publikasi atau bentuk lainnya dalam skripsi ini, telah diakui sesuai dengan standar prosedur disiplin ilmu.
3. Penulis juga mengakui bahwa skripsi ini dapat dihasilkan berkat bimbingan dan dukungan penuh dari Pembimbing yaitu: **Dr. Bhakti Etza Setiani, S.Pt., M.Sc.** dan **Hega Bintang Pratama Putra, S.T.P., M.Sc.**

Apabila di kemudian hari dalam skripsi ini ditemukan hal-hal yang menunjukkan telah dilakukannya kecurangan akademik, maka penulis bersedia agar gelar sarjana yang telah penulis dapatkan ditarik sesuai dengan ketentuan dari Program Studi S-1 Teknologi Pangan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro.

Semarang, Mei 2026

Penulis



Nailah Salma Razita

Mengetahui,

Pembimbing Utama	Pembimbing Anggota
Dr. Bhakti Etza Setiani, S.Pt., M.Sc.	Hega Bintang Pratama Putra, S.T.P., M.Sc.

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Judul Skripsi	:	APLIKASI SONIKASI TERHADAP KARAKTERISTIK FISIKOKIMIA DAN MIKROBIOLOGI PADA PROSES FERMENTASI MOROMI KECAP
Nama Mahasiswa	:	NAILAH SALMA RAZITA
Nomor Induk Mahasiswa	:	23020122130049
Program Studi/Departemen	:	S-1 TEKNOLOGI PANGAN / PERTANIAN
Fakultas	:	PETERNAKAN DAN PERTANIAN

Telah disidangkan di hadapan Tim Penguji
dan dinyatakan lulus pada tanggal ..20 MAY.. 2026

Pembimbing Utama

Dr. Bhakti Etza Setiani, S.Pt., M.Sc.

Pembimbing Anggota

Hega Bintang Pratama Putra, S.T.P., M.Sc.

Ketua Program Studi

Ahmad Ni'matullah Al-Baarri, S.Pt., M.P., Ph.D.

Ketua Panitia Ujian Akhir Program

Swastika Dewi, S.T.P., M.Sc.

Dekan

Prof. Sugiharto, S.Pt., M.Sc., Ph.D.

Ketua Departemen

Ahmad Ni'matullah Al-Baarri, S.Pt., M.P., Ph.D.

RINGKASAN

NAILAH SALMA RAZITA. 23020122130049. 2026. Aplikasi Sonikasi Terhadap Karakteristik Fisikokimia dan Mikrobiologi pada Proses Fermentasi Moromi Kecap (Pembimbing: **BHAKTI ETZA SETIANI** dan **HEGA BINTANG PRATAMA PUTRA**).

Produksi kecap secara tradisional mampu menghasilkan karakter sensoris yang khas, tetapi pembentukan komponen pembentuk mutu pada fase moromi berlangsung bertahap dan membutuhkan waktu panjang. Sonikasi intensitas rendah berpotensi membantu pelepasan substrat dan pelarutan komponen nutrisi selama fermentasi. Namun, paparan sonikasi yang terlalu sering pada media cair perlu diperhatikan karena dapat memberi tekanan mekanis pada enzim dan mikroorganisme. Oleh karena itu, penelitian ini mengkaji kombinasi sonikasi awal pada kedelai rebus dan sonikasi mingguan pada moromi sebagai upaya membantu pembukaan jaringan kedelai, meningkatkan pelepasan komponen terlarut, dan mendukung proses fermentasi moromi. Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus 2025 – Januari 2026 di Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang.

Penelitian diawali dengan pembuatan fermentasi moromi kedelai hitam menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan dua faktor, yaitu variasi perlakuan sonikasi (kontrol, sonikasi tahap moromi, dan kombinasi sonikasi awal-moromi) serta lama fermentasi (7, 14, 21, dan 28 hari). Tahap fermentasi moromi dilakukan selama satu bulan dengan pemberian perlakuan sonikasi secara berkala setiap minggunya. Pengujian kualitas fermentasi meliputi pengamatan nilai pH, Total Padatan Terlarut (TPT), Total Asam Tertitrasi (TAT), total Bakteri Asam Laktat (BAL), dan kadar formol nitrogen. Data hasil pengujian dianalisis menggunakan uji *Two-Way ANOVA* dengan *repeated measures* melalui program GraphPad Prism, dan dilanjutkan dengan uji *Tukey's multiple comparisons* apabila terdapat perbedaan yang signifikan. Data juga dimodelkan dengan regresi linier melalui Microsoft Excel 2021.

Hasil analisis fisikokimia menunjukkan bahwa penerapan sonikasi memberikan pengaruh yang nyata berupa peningkatan secara signifikan pada pelarutan Total Padatan Terlarut (TPT), akumulasi formol nitrogen, peningkatan produksi Total Asam tertitrasi (TAT), menjaga kestabilan pH moromi, dan menekan laju kematian populasi total Bakteri Asam Laktat (BAL). Nilai pH pada perlakuan sonikasi cenderung lebih rendah dibandingkan kontrol, namun tidak mengalami penurunan drastis karena adanya kapasitas *buffer* moromi.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT. yang telah melimpahkan segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan Skripsi dengan judul "Aplikasi Sonikasi Terhadap Karakteristik Fisikokimia dan Mikrobiologi pada Proses Fermentasi Moromi Kecap" tepat pada waktunya. Adapun tujuan penyusunan skripsi yaitu sebagai salah satu persyaratan untuk mendapatkan gelar Sarjana Teknologi Pangan di Departemen Pertanian, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang. Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Sugiharto, S.Pt., M.Sc., Ph. D. selaku Dekan Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro yang telah memberi fasilitas perkuliahan kepada penulis sebagai salah satu mahasiswa Fakultas Peternakan dan Pertanian untuk melakukan kegiatan perkuliahan.

   Ahmad Ni'matullah Al-Baarri, S.Pt., M.P., Ph.D. sebagai Kepala Departemen Pertanian dan Ketua Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro yang telah memberikan masukan dan arahan selama menjadi mahasiswa Teknologi Pangan.
2. drh. Siti Susanti, Ph.D. selaku Koordinator Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan dan Bapak Setya Budi Muhammad Abduh, S.Pt., M.Sc., Ph.D selaku Koordinator Laboratorium Rekayasa Pangan dan Hasil Pertanian yang telah memberikan fasilitas laboratorium kepada penulis untuk melakukan penelitian.
3. Dr. Bhakti Etza Setiani, S.Pt., M.Sc. sebagai dosen pembimbing pertama yang telah membantu proses pembimbingan dan penyusunan skripsi ini dengan memberikan masukan dan saran sehingga skripsi ini dapat selesai.
4. Bapak Hega Bintang Pratama Putra, S.T.P., M.Sc. sebagai dosen pembimbing kedua yang telah membantu proses penyusunan skripsi ini dari penyusunan

makalah seminar, mengurus pemberkasan penelitian, dan memberikan ilmu-ilmu baru untuk membantu penyusunan skripsi ini hingga selesai.

5. Bapak Setya Budi Muhammad Abduh, S.Pt., M.Sc., Ph.D. dan Bapak Masagus Haidir Tamimi, S.T.P., M.Sc. selaku dosen penguji ujian akhir skripsi yang telah berkenan menghadiri dan membantu berjalannya sidang skripsi.
6. Ibu Nurul Hasniah, S.T.P., M.Sc. selaku dosen panitia ujian akhir skripsi yang telah berkenan menghadiri dan membantu berjalannya sidang skripsi.
7. Ibuk, bapak, dan mas Idang yang selalu mendukung penulis dari awal perkuliahan hingga penyusunan skripsi selesai.
8. Saudari Dania Rahma Anandhini, Zahra Nafizha Amani, Nur Laely Fatimatuz Zahara, dan Athifah Eka Amilia selaku teman dekat selama perkuliahan yang selalu memberikan dukungan penuh kepada penulis dalam menyelesaikan perkuliahan dari awal hingga akhir.
9. Saudari Mentari Gita Rahmadhani selaku rekan penelitian seperjuangan yang telah membantu. mendukung dan mendampingi peneliti dalam proses penyusunan skripsi hingga selesai.
10. Anggota tim penelitian kecap, yaitu saudari Malinda dan Farah yang selalu memberikan dukungan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi.
11. Sahabat penulis, yaitu saudari Fika, Bintang, dan Fifing yang selalu memberi dukungan penuh terhadap penulis.
12. Saudari Ajeng selaku saudara yang telah menemani, membantu, mendukung, dan membersamai penulis selama menempuh kuliah di Kota Semarang.
13. Semua teman-teman kuliah, kepanitiaan, teman SMA, keluarga besar, serta pihak lainnya yang tidak dapat disebut satu per satu dan secara tidak langsung sudah membantu penulis dalam menyusun skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis dengan senantiasa menerima kritik dan saran yang diberikan oleh pembaca atas skripsi ini.

Semarang, Mei 2026

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

KATA PENGANTAR vi

DAFTAR ISI viii

DAFTAR TABEL x

DAFTAR ILUSTRASI xi

DAFTAR LAMPIRAN xii

BAB I. PENDAHULUAN 1

1.1. Latar Belakang 1

1.2. Tujuan dan Manfaat Penelitian 4

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA 5

2.1. Kecap Kedelai 5

2.2. Kedelai Hitam 8

2.3. Fermentasi Moromi 10

2.4. Sonikasi 12

2.5. pH 13

2.6. Total Padatan Terlarut 14

2.7. Total Asam 15

2.8. Total Bakteri Asam Laktat 16

2.9. Formol Nitrogen 18

BAB III. MATERI DAN METODE 19

3.1. Materi 19

3.2. Metode 20

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN 32

4.1. Nilai pH Moromi 32
4.2. Nilai Total Padatan Terlarut Moromi 38
4.3. Nilai Total Asam Moromi 43
4.4 Nilai Total Bakteri Asam Laktat 47
4.5. Nilai Formol Nitrogen Moromi 51

BAB V. SIMPULAN DAN SARAN 55

5.1. Simpulan 55
5.2. Saran 55

DAFTAR PUSTAKA 56

LAMPIRAN 65

RIWAYAT HIDUP 77

DAFTAR TABEL

Nomor Halaman

1. Syarat Mutu Kecap Kedelai 7
2. Zat Gizi Kedelai Hitam 10
3. Desain Rancangan Percobaan 21

DAFTAR ILUSTRASI

Nomor Halaman

1. Kecap Kedelai 5
2. Kedelai Hitam 9
3. Diagram Alir Penelitian..... 24
4. Grafik Batang Perbandingan Nilai pH Moromi 33
5. Perubahan Nilai pH Moromi Selama Fermentasi 36
6. Grafik Batang Perbandingan Nilai TPT Moromi 39
7. Perubahan Nilai TPT Moromi Selama Fermentasi 41
8. Grafik Batang Perbandingan Nilai TAT Moromi 43
9. Perubahan Nilai TAT Moromi Selama Fermentasi 45
10. Grafik Batang Perbandingan Nilai Total BAL Moromi 47
11. Perubahan Nilai Total BAL Moromi Selama Fermentasi 49
12. Grafik Batang Perbandingan Nilai Formol N Moromi 51
13. Perubahan Nilai Formol N Moromi Selama Fermentasi..... 53

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor Halaman

1. Data pH Moromi 65
2. Data Total Padatan Terlarut Moromi 66
3. Data Total Asam Tertitrasi Moromi 67
4. Data Total Bakteri Asam Laktat Moromi 68
5. Data Formol Nitrogen Moromi 69
6. Analisis Statistik pH Moromi 70
7. Analisis Statistik Total Padatan Terlarut Moromi 71
8. Analisis Statistik Total Asam Tertitrasi Moromi 72
9. Analisis Statistik Total Bakteri Asam Laktat Moromi 73
10. Analisis Statistik Formol Nitrogen Moromi 74
11. Dokumentasi Penelitian 75

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kecap merupakan salah satu produk pangan hasil fermentasi yang banyak digunakan sebagai pelengkap makanan di kawasan Asia, termasuk Indonesia. Kualitas akhir kecap dipengaruhi oleh berbagai faktor, salah satunya jenis bahan baku utama yang digunakan. Industri kecap di Indonesia banyak menggunakan kedelai hitam karena bahan ini memiliki karakteristik fisikokimia yang mendukung pembentukan warna, aroma, dan cita rasa kecap. Kedelai hitam memiliki kandungan protein yang berperan sebagai prekursor pembentukan senyawa cita rasa, serta warna alami yang dapat mendukung terbentuknya warna cokelat kehitaman pada produk akhir (Anwar *et al.*, 2023). Ciri utama kecap berkualitas dapat dilihat dari aroma khas dan rasa gurih atau umami yang kuat. Sifat sensoris tersebut tidak terbentuk secara langsung, melainkan melalui serangkaian reaksi biokimia selama fermentasi, terutama penguraian protein menjadi peptida dan asam amino bebas (Diez-Simon *et al*., 2020).

Serangkaian reaksi biokimia dalam produksi kecap berlangsung sejak tahap koji dan berlanjut secara intensif pada fase moromi. Moromi merupakan tahap fermentasi lanjutan berupa fermentasi cair dengan kadar garam tinggi yang berperan dalam perombakan bahan dan pembentukan karakter mutu akhir kecap (Zhao *et al.,* 2018). Meskipun metode tradisional mampu menghasilkan karakter sensoris yang kompleks, proses perombakan protein dan komponen kedelai pada

fase moromi berlangsung bertahap karena dipengaruhi oleh struktur jaringan kedelai, salinitas tinggi, serta aktivitas mikroorganisme dan enzim hidrolitik. Akibatnya, pembentukan komponen pembentuk mutu kecap, seperti peptida, asam amino, asam organik, dan komponen terlarut lainnya memerlukan waktu fermentasi yang panjang (Yang *et al.,* 2017). Kondisi ini menunjukkan adanya peluang untuk mengkaji teknologi pendukung yang dapat membantu pelepasan substrat dan meningkatkan efektivitas ekstraksi nutrisi selama fermentasi, salah satunya melalui penerapan sonikasi.

Salah satu teknologi yang berpotensi digunakan untuk mengoptimalkan proses fermentasi adalah sonikasi intensitas rendah. Gelombang ultrasonik bekerja melalui mekanisme kavitasi yang dapat menghasilkan gaya geser, turbulensi mikro, serta gangguan mekanis pada jaringan bahan. Efek tersebut dapat mengganggu struktur dinding sel bahan nabati seperti kedelai, sehingga komponen di dalam jaringan bahan lebih mudah terlepas ke medium cair (Umego *et al.,* 2021) Mekanisme tersebut dapat membantu membuka struktur bahan padat dan memfasilitasi pelepasan komponen terlarut ke dalam medium cair. Pemanfaatan sonikasi pada fermentasi kecap telah dilaporkan oleh Gao *et al.* (2020), yang menunjukkan bahwa pemberian sonikasi secara berkala pada fase moromi mampu meningkatkan akumulasi komponen nutrisi selama fermentasi. Temuan tersebut menunjukkan bahwa sonikasi berpotensi membantu proses perombakan substrat pada moromi namun masih berfokus pada aplikasi sonikasi selama fase moromi, sedangkan pemanfaatan sonikasi sebagai perlakuan awal pada bahan baku sebelum memasuki fase moromi belum banyak dikaji. Padahal, kedelai yang telah direbus

memiliki struktur yang lebih lunak dan terhidrasi sehingga pemberian sonikasi pada tahap ini berpotensi membuka jaringan bahan dan meningkatkan pelepasan substrat sejak awal fermentasi.

Perlakuan awal berupa sonikasi pada bahan padat telah dilaporkan mampu membuka pori-pori jaringan bahan dan meningkatkan pelepasan komponen terlarut sejak tahap awal (Ercan *et al.,* 2025). Jika struktur kedelai sudah lebih terbuka sejak awal, sonikasi mingguan pada moromi diharapkan cukup untuk membantu pelepasan substrat selama fermentasi tanpa memberi paparan mekanis yang terlalu sering pada mikroorganisme. Hal ini penting karena paparan gelombang mekanis yang berlebihan berpotensi menurunkan aktivitas enzim, menyebabkan kerusakan sel, atau memberikan stres fisik pada mikroorganisme fermentatif seperti bakteri asam laktat (Zhang *et al*., 2021). Oleh sebab itu, pengaturan waktu dan interval pemberian sonikasi perlu diperhatikan agar perlakuan tersebut mampu membantu pelepasan substrat tanpa memberikan tekanan berlebih pada mikroorganisme. Kombinasi perlakuan awal sonikasi pada kedelai rebus dan sonikasi mingguan pada moromi berpotensi menjadi strategi yang lebih seimbang dalam mendukung proses fermentasi.

Pengamatan parameter mutu moromi secara berkala diperlukan untuk menilai efektivitas perlakuan sonikasi. Efek mekanis sonikasi terhadap pelepasan komponen bahan dapat diamati melalui perubahan total padatan terlarut (TPT), sedangkan tingkat pemecahan protein dapat dievaluasi melalui formol nitrogen sebagai indikator terbentuknya senyawa nitrogen sederhana seperti peptida dan asam amino (Gao *et al.*, 2019). Peningkatan komponen terlarut dapat mendukung

aktivitas metabolisme dan viabilitas bakteri asam laktat (BAL), meskipun jumlah BAL selama fermentasi juga dipengaruhi oleh salinitas, akumulasi metabolit, tekanan lingkungan, dan paparan sonikasi. Aktivitas mikroba selama fermentasi dapat berkontribusi terhadap pembentukan asam organik yang tercermin pada perubahan total asam tertitrasi (TAT) (Wang *et al.,* 2023), sedangkan pH diamati untuk mengevaluasi keasaman aktif dan stabilitas asam basa moromi. Dengan demikian, pengukuran TAT dan pH bersifat saling melengkapi karena TAT menggambarkan total asam yang terakumulasi, sedangkan pH menunjukkan konsentrasi ion H^+ bebas yang menentukan kondisi medium fermentasi. Berdasarkan hal tersebut, penelitian mengenai kombinasi perlakuan awal sonikasi pada kedelai rebus dan penerapan sonikasi mingguan pada moromi perlu dilakukan untuk mengevaluasi pengaruhnya terhadap perubahan fisikokimia dan mikrobiologi moromi selama fermentasi.

1.2. Tujuan dan Manfaat Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh perlakuan sonikasi awal pada kedelai serta sonikasi mingguan pada moromi terhadap kualitas moromi selama empat minggu fermentasi meliputi pH, total padatan terlarut (TPT), total asam tertitrasi (TAT), total bakteri asam laktat (BAL), dan formol nitrogen. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai pengaruh penerapan sonikasi dalam proses fermentasi kecap. Selain itu, penelitian ini juga diharapkan dapat menjadi referensi dalam pengembangan proses fermentasi kecap di masa depan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kecap Kedelai

Kecap kedelai adalah bumbu cair yang mengandung mineral, vitamin, asam amino, peptida, serta berbagai senyawa organik yang terbentuk melalui fermentasi kedelai (atau bungkil kedelai) dan gandum sebagai bahan baku utama dengan bantuan mikroorganisme (Diez-Simon *et al.*, 2020). Produk kecap ini dikenal dengan nama Chiang-Yu di China, Shoyu di Jepang, Kanjang di Korea, Toyo di Filipina, dan See-Tew di Thailand. Ciri khas kecap kedelai Indonesia yang berbeda dengan negara lain yaitu kecap kedelai manis. Menurut Rohmah *et al.* (2024), kecap manis merupakan produk yang dibuat dari campuran kedelai hasil fermentasi, larutan garam, serta gula merah atau gula jawa yang berasal dari nira kelapa, dengan penambahan berbagai jenis rempah untuk meningkatkan cita rasa gurih dan memperkaya aromanya. Produk kecap kedelai dapat dilihat pada Ilustrasi 1.



Ilustrasi 1. Kecap Kedelai
Sumber: (Rafiqi *et al.*, 2024)

Zat gizi yang terkandung dalam kecap antara lain karbohidrat, protein, asam amino, lemak, vitamin, dan mineral. Selama proses fermentasi, protein kedelai mengalami hidrolisis menjadi peptida dan asam amino bebas yang berperan penting dalam pembentukan rasa gurih (umami) pada kecap (Pangestika *et al.*, 2022). Penelitian Cai *et al.* (2024) menunjukkan bahwa skor umami kecap berkorelasi positif dengan kadar nitrogen asam amino, yang mencerminkan tingkat degradasi protein selama fermentasi, sehingga senyawa hasil hidrolisis protein tersebut dapat digunakan sebagai indikator mutu sensori kecap. Dengan demikian, kadar protein dan turunannya menjadi parameter penting dalam menentukan kualitas kecap. Sejalan dengan pentingnya parameter tersebut, SNI 3543:2013 menetapkan kadar protein minimal 4% untuk kecap kedelai asin dan 1% untuk kecap manis sebagai salah satu persyaratan mutu produk. Selain protein, produk kecap juga wajib memenuhi serangkaian kriteria kelayakan fisikokimia, mikrobiologis, dan batas cemaran logam untuk menjamin keamanan konsumen. Rincian persyaratan mutu kecap kedelai secara lengkap berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI 3543:2013) disajikan pada Tabel 1.

Kecap diproduksi menggunakan lima bahan utama, yaitu kedelai sebagai sumber protein, gandum atau tepung terigu sebagai sumber karbohidrat, garam, air, serta kultur mikroba *Aspergillus oryzae/Aspergillus sojae* dan bakteri asam laktat halotoleran sebagai agen fermentasi (Devanthi dan Gkatzionis, 2019). Jenis kedelai yang umum digunakan dalam pembuatan kecap adalah kedelai hitam dan kedelai kuning, namun kecap kedelai hitam lebih disukai karena memiliki kandungan antosian, isoflavon, dan mineral Fe lebih tinggi (Sitawati *et al.*, 2020). Kedelai

hitam juga mampu memberikan warna hitam alami pada kecap yang diproduksi (Rinawati dan Yusuf, 2019). Kedelai hitam juga mengandung lemak jenuh dan lemak tak jenuh. Lemak tak jenuh ganda pada kedelai hitam yaitu asam linolenat atau asam lemak omega-3 yang biasa terdapat pada minyak ikan namun dapat ditemukan pada tanaman (Ningrumsari *et al.*, 2022).

Tabel 1. Syarat Mutu Kecap Kedelai

No	Kriteria Uji	Satuan	Persyaratan	
			Kecap manis	Kecap asin
1.	Keadaan			
1.1.	Bau	-	Normal, khas	Normal, khas
1.2.	Rasa	-	Normal, khas	Normal, khas
2.	Kadar protein (N x 6,25)	% (b/b)	Min. 1,0	Min. 4,0
3.	Kadar gula (dihitung sebagai sakarosa)	% (b/b)	Min. 30	-
4.	pH	-	3,5 – 6,0	3,5 – 6,0
5.	Cemaran logam			
5.1.	Timbal (Pb)	mg/kg	Maks. 1,0	Maks. 1,0
5.2.	Kadmium (Cd)	mg/kg	Maks. 0,2	Maks. 0,2
5.3.	Timah (Sn)	mg/kg	Maks. 40,0	Maks. 40,0
5.4.	Merkuri (Hg)	mg/kg	Maks. 0,05	Maks. 0,05
6.	Cemaran Arsen (As)	mg/kg	Maks. 0,5	Maks. 0,5
7.	Cemaran mikroba			
7.1.	Bakteri coliform	APM/g	<3	<3
7.2.	Kapang	Koloni/g	Maks. 50	Maks. 50
8.	Aflatoksin			
8.1.	B_1	µg/kg	Maks. 15	Maks. 15
8.2.	Total aflatoksin	µg/kg	Maks. 20	Maks. 20

Sumber: SNI 3543.1:2013; SNI 3543.2:2013.

Proses pembuatan kecap pada dasarnya dibagi menjadi dua cara, yaitu hidrolisis asam dan fermentasi tradisional. Hidrolisis asam adalah metode pembuatan kecap secara kimiawi dengan menggunakan larutan asam kuat berkonsentrasi tinggi untuk menguraikan protein kedelai dan gandum melalui pemanasan, sehingga menghasilkan kecap dalam waktu singkat dibandingkan

proses fermentasi tradisional (Diez-Simon *et al.*, 2020). Fermentasi merupakan proses degradasi protein melalui aktivitas enzim yang diproduksi oleh kapang, khamir, maupun bakteri sebagai mikroorganisme penyusun starter pada pembuatan kecap (Suri *et al.*, 2024). Perkembangan rasa dan warna selama fermentasi juga dipengaruhi oleh reaksi non-enzimatis seperti reaksi maillard, degradasi strecker, oksidasi lipid, dan esterifikasi (Diez-Simon *et al.*, 2019).

Metode fermentasi tradisional tetap menjadi pilihan utama dalam produksi kecap karena menghasilkan kualitas sensori yang lebih baik sekaligus lebih aman, meskipun proses hidrolisis asam lebih cepat. Dari sisi rasa, kecap hasil fermentasi memiliki karakter yang lebih kompleks, seperti umami alami, manis, dan aroma karamel khas yang terbentuk dari proses biologis dan sulit ditiru dengan cara kimia (Diez-Simon *et al.,* 2020). Selain itu, metode fermentasi tidak menimbulkan risiko pembentukan senyawa berbahaya seperti pada hidrolisis asam yang menggunakan asam kuat dan suhu tinggi sehingga dapat menghasilkan senyawa toksik seperti 3-Monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) dari reaksi dengan lipid (Rustia *et al.*, 2021). Karena senyawa ini berbahaya bagi kesehatan dalam jangka panjang, metode fermentasi tetap dianggap sebagai cara paling aman dan menjadi standar utama dalam produksi kecap.

2.2. Kedelai Hitam

Kedelai hitam (*Glycine max* (L.) Merrill yang bersinonim dengan *Glycine soja*) merupakan komoditas leguminosa penting dari famili *Fabaceae* yang secara luas dimanfaatkan dalam industri pangan, salah satunya sebagai bahan baku

pembuatan kecap. Tanaman kedelai dapat tumbuh optimal pada suhu antara 25 C hingga 30 C (Laili, 2022). Biji kedelai hitam dapat dilihat pada Ilustrasi 1. Berdasarkan silsilah kekerabatan dalam dunia tumbuhan, kedelai hitam termasuk ke dalam klasifikasi taksonomi berikut:

Kingdom : Plantae

Divisio : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida

Ordo : Fabales

Famili : Fabaceae

Genus : *Glycine*

Spesies : *Glycine max* (L.) Merr.



Ilustrasi 2. Kedelai Hitam
Sumber: (Jati, 2022)

Kedelai hitam memiliki morfologi tanaman yang mirip dengan kedelai berbiji kuning, namun memiliki keunggulan genetik berupa pigmentasi hitam pekat pada lapisan epidermis kulit bijinya (Bhartiya *et al.*, 2025). Pigmentasi ini memengaruhi warna biji, serta berhubungan dengan kandungan senyawa bioaktif

yang lebih tinggi dan daya simpan yang lebih baik (Ramos *et al.*, 2026). Kedelai hitam merupakan sumber yang kaya akan protein, karbohidrat, serat pangan, lemak, vitamin (seperti vitamin B, C, dan E), serta mineral (seperti natrium (Na), kalium (K), fosfor (P), dan besi (Fe)) (Li *et al.*, 2023). Rincian komposisi zat gizi pada kedelai hitam secara lebih lengkap dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Zat Gizi Kedelai Hitam

Zat Gizi	Jumlah (%)
Air	8,25
Abu	5,43
Lemak	19,90
Protein	43,34
Karbohidrat	31,34

Sumber: Esteves *et al.* (2022)

Kedelai hitam juga mengandung senyawa antosianin yang tinggi pada kulit bijinya. Senyawa antosianin mayor yang ditemukan adalah *cyanidin-3-O-glucoside* berkisar antara 198 μg/g sampai 26334.54 μg/g (Choi *et al.*, 2020). Senyawa ini berperan kuat sebagai agen penangkal radikal bebas, anti-inflamasi, dan hepatoprotektif. Selain antosianin, kedelai hitam merupakan sumber kelompok isoflavon yang mencakup genistein, daidzein dengan konsentrasi tertinggi, serta glisitein dengan konsentrasi terendah (Li *et al.*, 2023). Genistein dan daidzein merupakan antioksidan primer yang sangat efektif dalam menekan peroksidasi lipid dan stres oksidatif (Pratama *et al.*, 2020).

2.3. Fermentasi Moromi

Fermentasi moromi merupakan tahap kedua dalam fermentasi kecap. Pada tahap ini, koji yang telah terbentuk direndam dalam larutan garam dengan

konsentrasi tinggi, biasanya sekitar 18–22% (b/v). Kondisi garam yang tinggi ini berfungsi sebagai faktor seleksi alami yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen dan pembusuk, serta mendukung pertumbuhan mikroba yang tahan garam atau halofilik (Devanthi dan Gkatzionis, 2019). Selama proses fermentasi, terjadi perubahan jenis mikroorganisme dominan. *Tetragenococcus halophilus* muncul pada tahap awal fermentasi dan menghasilkan banyak asam sehingga pH moromi terus menurun. Pertumbuhannya mulai terhambat ketika pH turun di bawah 5,0. Pada tahap ini, *Zygosaccharomyces rouxii* mulai berkembang dan melakukan fermentasi alkohol yang berperan dalam pembentukan aroma khas kecap (Devanthi *et al.*, 2018). Selama fase pematangan, *Starmerella etchellsii* menjadi dominan dan menghasilkan fenol volatil yang memperkaya cita rasa kecap (Wang *et al.*, 2023). Interaksi antar mikroorganisme tersebut membantu menjaga kestabilan fermentasi dan mencegah kontaminasi selama proses pematangan yang berlangsung lama.

Perubahan mikroorganisme dalam moromi terjadi bersamaan dengan proses penguraian dan perubahan senyawa oleh enzim terhadap substrat secara intens. Enzim hidrolitik seperti amilase dan protease yang dihasilkan oleh *Aspergillus oryzae* pada tahap koji tetap aktif selama fermentasi moromi dan berperan dalam menguraikan komponen kompleks kedelai menjadi senyawa yang lebih sederhana (Jo *et al.*, 2022). Karbohidrat diuraikan menjadi gula sederhana sebagai sumber energi mikroorganisme, sedangkan protein dihidrolisis menjadi peptida dan asam amino bebas. Senyawa-senyawa sederhana utamanya asam amino seperti asam

glutamat menjadi prekursor penting dalam pembentukan rasa umami, aroma, serta warna khas kecap (Pangestika *et al.*, 2021).

Lama waktu fermentasi moromi menentukan berlangsungnya proses perombakan nutrisi dan aktivitas mikroba. Enzim akan terus bekerja memecah komponen padat kedelai menjadi senyawa yang lebih sederhana dan mudah larut. Proses ini menyebabkan nilai Total Padatan Terlarut (TPT) dan kadar Formol Nitrogen cenderung meningkat seiring bertambahnya waktu fermentasi (Zhu *et al.*, 2022). Ketersediaan nutrisi yang semakin meningkat kemudian menjadi sumber substrat bagi pertumbuhan Bakteri Asam Laktat (BAL) untuk menghasilkan berbagai asam organik. Akumulasi asam ini menyebabkan nilai total asam tertitrasi meningkat secara bertahap sehingga pH moromi menurun mencapai kondisi yang lebih stabil pada akhir masa fermentasi (Ferng *et al.*, 2019).

2.4. Sonikasi

Sonikasi adalah sebuah teknologi pemrosesan non-panas yang memanfaatkan gelombang suara ultrasonik untuk mempercepat berbagai proses fisik dan kimia pada suatu bahan. Prinsip kerja utama sonikasi adalah menciptakan efek kavitasi, yaitu terbentuknya gelembung-gelembung kecil di dalam cairan yang kemudian pecah karena pengaruh gelombang ultrasonik berfrekuensi tinggi (Zhang *et al.*, 2019). Oleh sebab itu, sonikasi dapat digunakan untuk mempercepat perpindahan massa, memecah dan melepaskan partikel, merusak membran sel, atau bahkan mengubah struktur senyawa. Frekuensi ultrasonik pada kisaran 20–100 kHz dalam pengolahan pangan digunakan untuk ekstraksi senyawa bioaktif,

emulsifikasi, proses pemasakan, pengurangan rasa pahit (*debittering*), serta mempercepat proses sintesis (Jadhav *et al.*, 2021).

Teknologi sonikasi dalam fermentasi moromi kecap dapat diterapkan sebagai metode yang berpotensi mempengaruhi proses perubahan biokimia selama fermentasi. Getaran kavitasi yang dihasilkan oleh sonikasi dapat merusak dan melonggarkan struktur dinding sel kedelai sehingga komponen protein dalam lebih mudah terlepas ke dalam medium. Kondisi ini mempermudah enzim protease dan enzim proteolitik lainnya untuk menghidrolisis protein menjadi peptida dan asam amino sehingga proses pelepasan asam amino bebas dapat meningkat selama fermentasi berlangsung (Gao *et al.*, 2019). Selain itu, penerapan sonikasi pada moromi dilaporkan mampu meningkatkan pelepasan senyawa pembentuk rasa dan kualitas sensori kecap (Gao *et al.*, 2019).

2.5. pH

Derajat keasaman (pH) merupakan parameter yang menunjukkan tingkat keasaman atau kebasaan suatu larutan berdasarkan konsentrasi ion hidrogen (H^+). Mikroorganisme menghasilkan asam organik seperti asam laktat, asam asetat, asam sitrat selama fermentasi berlangsung (Zhang *et al.*, 2022). Akumulasi asam ini menyebabkan pH produk menurun. Penurunan pH tidak hanya berfungsi menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen, tetapi juga memengaruhi aktivitas enzim karena setiap enzim memerlukan kisaran pH tertentu untuk bekerja secara optimal (Oleghe *et al.*, 2025).

pH pada fermentasi moromi berperan penting dalam perubahan mikroorganisme dan pembentukan aroma. Nilai pH berkisar antaar 6,0 – 6,4 saat awal perendaman koji dalam larutan garam (Wang *et al,,* 2023). Bakteri asam laktat halofilik seperti *Tetragenococcus halophilus* kemudian tumbuh dan menghasilkan asam laktat sehingga pH menurun hingga stabil pada kisaran 4,5–5,0 (Li *et al.*, 2023). Lingkungan asam tersebut memicu pertumbuhan khamir yang memanfaatkan karbohidrat dan menghasilkan alkohol serta berbagai senyawa rasa dan aroma khas melalui berbagai jalur metabolisme. Penerapan sonikasi dapat membantu menjaga kondisi fermentasi tetap stabil dengan membantu pemecahan nutrisi dan menekan pertumbuhan mikroorganisme pengganggu (Zheng *et al.*, 2024). Hal ini mengakibatkan bakteri asam laktat dapat memproduksi asam organik lebih konsisten.

2.6. Total Padatan Terlarut

Total Padatan Terlarut (TPT) menunjukkan jumlah seluruh zat yang larut dalam suatu cairan. Komponennya meliputi gula, asam organik, asam amino, garam mineral, dan vitamin. Nilainya biasanya diukur menggunakan refraktometer dan dinyatakan dalam derajat Brix (°Brix) berdasarkan prinsip pembiasan cahaya setelah cahaya melewati sampel (Thuy *et al.*, 2024). Nilai TPT pada moromi umumnya meningkat seiring bertambahnya waktu fermentasi, berbeda dengan beberapa jenis fermentasi lain yang menunjukkan penurunan nilai TPT. Peningkatan nilai TPT pada fermentasi moromi dipengaruhi oleh proses hidrolisis

makromolekul menjadi senyawa yang lebih sederhana oleh mikroorganisme, yang kemudian larut ke dalam media fermentasi (Lubis, 2019).

Penerapan sonikasi dapat membantu meningkatkan pelarutan komponen bahan ke dalam media fermentasi. Penelitian Yu *et al.* (2024) melaporkan bahwa paparan gelombang ultrasonik selama pematangan kecap mampu meningkatkan kadar padatan terlarut (*soluble solids*). Efek kavitasi dari sonikasi akan melonggarkan struktur sel kedelai sehingga cairan intraseluler lebih mudah keluar dan kontak antara substrat dan enzim menjadi lebih luas. Kondisi ini membantu proses pemecahan makromolekul selama fermentasi berlangsung lebih efektif sehingga berkontribusi terhadap peningkatan nilai TPT. Standar Nasional Indonesia (SNI) 01-3543-1999 menyebutkan bahwa kadar TPT minimal pada kecap kedelai yaitu sebesar 10%.

2.7. Total Asam

Total asam menggambarkan jumlah keseluruhan asam yang terbentuk selama proses fermentasi pada produk pangan. Hubungan antara total asam dengan pH adalah bertolak belakang, yaitu semakin tinggi total asam maka menghasilkan nilai pH yang semakin rendah. Tingginya total asam dan rendahnya pH pada moromi disebabkan oleh aktivitas bakteri asam laktat yang menghasilkan asam organik (Li *et al.*, 2023). Asam organik yang terbentuk selama tahap fermentasi adalah asam L-malat, asam L-laktat, asam asetat, asam sitrat, asam suksinat, dan asam fumarat (Zhang *et al.*, 2024).

Jumlah asam organik selama fermentasi moromi dipengaruhi oleh kondisi fermentasi dan lama waktu fermentasi. Bakteri asam laktat (BAL) memanfaatkan nutrisi yang tersedia dan menghasilkan asam organik sehingga nilai total asam tertitrasi meningkat. Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi akumulasi asam organik adalah perlakuan sonikasi. Penelitian Cao *et al.* (2025) melaporkan bahwa pemberian gelombang ultrasonik pada cairan berbasis kedelai dapat meningkatkan akumulasi senyawa asam organik. Hasil serupa juga dilaporkan oleh Kim *et al.* (2022) yang menemukan bahwa penerapan sonikasi pada produk fermentasi kedelai menyebabkan nilai *titratable acidity* meningkat selama fermentasi. Hal ini diduga berkaitan dengan efek kavitasi dari gelombang ultrasonik yang dapat membantu pelepasan nutrisi dari bahan sehingga bakteri dapat memanfaatkan nutrisi dengan lebih baik.

2.8. Total Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan jenis bakteri yang umum ditemukan dalam berbagai produk makanan dan minuman fermentasi. Ciri khas bakteri ini adalah mampu mengubah karbohidrat atau gula menjadi asam laktat sebagai hasil akhir (Bintsis, 2018). BAL merupakan bakteri gram-positif yang tidak membentuk spora dan sangat tahan dalam lingkungan asam. Produksi asam laktat oleh bakteri ini sangat bermanfaat karena dapat menurunkan derajat keasaman (pH) makanan secara drastis. Selain itu, aktivitas BAL juga membantu memecah komponen makanan agar lebih mudah dicerna dan menghasilkan berbagai senyawa turunan

yang memberikan rasa gurih serta aroma khas pada produk akhir (Elhalis *et al.*, 2023).

Populasi BAL pada fermentasi moromi memegang peranan penting khususnya saat fase awal fermentasi. Lingkungan moromi yang memiliki kadar garam sangat tinggi mengakibatkan hanya BAL jenis tertentu yang tahan garam (halofilik) yang dapat bertahan hidup, dengan spesies utamanya adalah *Tetragenococcus halophilus* (Li *et al.*, 2022). Pada bulan pertama fermentasi, total jumlah BAL akan meningkat pesat karena mereka aktif memakan sisa gula dari bahan baku dan mengubahnya menjadi asam laktat (Gao *et al.*, 2019). Peningkatan jumlah BAL ini mengakibatkan kondisi moromi menjadi asam (mencapai pH sekitar 4,5 hingga 5,0). Kondisi asam yang diciptakan oleh populasi BAL merupakan syarat utama agar ragi (khamir) pembentuk aroma sedap pada kecap dapat tumbuh dan bekerja dengan baik pada tahap fermentasi selanjutnya (Wang *et al.*, 2023).

Jumlah BAL akan menurun semakin lama waktu fermentasi karena akumulasi asam organik menyebabkan pH semakin rendah dan kondisi lingkungan menjadi kurang mendukung bagi pertumbuhan bakteri. Selain itu, ketersediaan nutrisi juga semakin berkurang (Devanthi dan Gkatzionis, 2019). Penerapan sonikasi secara berkala juga dapat mempengaruhi perubahan jumlah BAL selama fermentasi karena paparan gelombang ultrasonik yang terjadi berulang kali dapat memberikan tekanan pada sel mikroba. Menurut Goh *et al.* (2017), efek kavitasi dari gelombang ultrasonik dapat merusak struktur sel bakteri dan menyebabkan kematian sel jika intensitasnya terlalu tinggi. Oleh karena itu, penurunan jumlah

BAL selama fermentasi dipengaruhi oleh kombinasi kondisi lingkungan yang semakin asam, keterbatasan nutrisi, serta efek fisik dari perlakuan sonikasi.

2.9. Formol Nitrogen

Formol nitrogen merupakan parameter yang digunakan untuk mengukur jumlah asam amino bebas sebagai hasil pemecahan protein selama fermentasi. Metode ini mengukur ion H^+ yang dilepaskan dari reaksi antara formaldehid dan gugus amino melalui titrasi dengan NaOH (Ciou *et al.*, 2020). Peningkatan nilai formol nitrogen selama fermentasi terjadi akibat proses hidrolisis protein yang dipengaruhi oleh efek sinergis antara aktivitas autolitik enzim dan aktivitas mikroorganisme (Peralta *et al.*, 2021). Selain itu, kadar formol nitrogen pada kecap sangat dipengaruhi oleh aktivitas protease toleran garam yang berperan dalam penguraian protein selama fermentasi (Gao *et al.*, 2019).

Enzim protease akan memecah protein menjadi asam amino seiring bertambahnya waktu fermentasi sehingga nilai formol nitrogen cenderung meningkat. Penerapan sonikasi dapat membantu proses tersebut karena gelombang ultrasonik dapat melonggarkan struktur protein sehingga lebih mudah diakses oleh enzim. Hal ini sejalan dengan penelitian Yang *et al.* (2024) yang melaporkan bahwa perlakuan sonikasi pada produk fermentasi dapat meningkatkan kadar amino nitrogen. Pada produk fermentasi kedelai, kandungan formol nitrogen sering digunakan sebagai indikator mutu dan tingkat kematangan produk (Zhao *et al.*, 2023).

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus 2025–Januari 2026 di Laboratorium Ilmu dan Nutrisi Pakan, Laboratorium Rekayasa Pangan dan Hasil Pertanian, serta Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang.

3.1. Materi

Bahan baku utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah kedelai hitam varietas Malika dari kabupaten Sleman yang didapatkan melalui *e-commerce Shopee*. Bahan tambahan yang digunakan berupa starter *Aspergillus oryzae* bubuk yang didapatkan melalui *e-commerce Shopee*, garam, NaOH 0,1N, phenolftalein 1% (Rofa), buffer pH 4, buffer pH 7, buffer pH 10, de Man Rogosa Agar (MRSA) (Himedia), $CaCO_3$, NaCl fisiologis 0,85%, aquades, kalium oksalat, dan formaldehid. Alat yang digunakan dalam penelitian ini mencakup tampah, toples, sonikator tipe waterbath (Power Sonic 405) beaker glass (IWAKI), erlenmeyer (IWAKI), gelas ukur (IWAKI), labu ukur (IWAKI), pipet tetes, corong gelas, pH meter (OHAUS), digital refraktometer (ATAGO), buret basa, laminar air flow, inkubator (B-One), serta XLSTAT versi 2021 dan Graph Pad Prism 10.

3.2. Metode

Metode penelitian mencakup rancangan penelitian, prosedur penelitian, pengujian parameter, dan analisis data. Parameter yang diuji adalah pH, total padatan terlarut, total asam tertitrasi, total bakteri asam laktat (BAL), dan kadar formol N pada moromi kecap.

3.2.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang diterapkan adalah desain eksperimental dengan rancangan percobaan menggunakan Rancangan Acak lengkap (RAL) faktorial yang terdiri atas dua faktor dalam waktu (*repeated measures*). Faktor pertama adalah perlakuan sonikasi yaitu kontrol tanpa sonikasi (P0), sonikasi pada tahap moromi (P1), dan kombinasi sonikasi pada kedelai setelah perebusan dengan sonikasi pada tahap moromi (P2). Faktor kedua adalah faktor pengamatan berulang pada unit percobaan yang sama berupa lama fermentasi, yaitu 7 hari (T1), 14 hari (T2), 21 hari (T3), dan 28 hari (T4). Dengan demikian, terdapat 3 perlakuan sonikasi dengan 7 ulangan, sehingga diperoleh 21 unit percobaan yang diamati berulang pada 4 waktu pengamatan. Total data pengamatan yang diperoleh adalah 84 data untuk setiap parameter. Sonikasi pada tahap moromi dilakukan secara berkala setiap minggu, yaitu pada hari ke-3, 10, 17, dan 24 fermentasi. Parameter yang diamati dalam penelitian ini meliputi pH, Total Padatan Terlarut (TPT), Total Asam Tertitrasi (TAT), total Bakteri Asam Laktat (BAL), serta nitrogen terlarut yang dianalisis menggunakan metode formol N.

Tabel 3. Desain Rancangan Percobaan

Perlakuan	Ulangan	Waktu Fermentasi (Hari)			
		T1 (7 hari)	T2 (14 hari)	T3 (21 hari)	T4 (28 hari)
P0	1	P0T1U1	P0T2U1	P0T3U1	P0T4U1
	2	P0T1U2	P0T2U2	P0T3U2	P0T4U2
	3	P0T1U3	P0T2U3	P0T3U3	P0T4U3
	4	P0T1U4	P0T2U4	P0T3U4	P0T4U4
	5	P0T1U5	P0T2U5	P0T3U5	P0T4U5
	6	P0T1U6	P0T2U6	P0T3U6	P0T4U6
	7	P0T1U7	P0T2U7	P0T3U7	P0T4U7
P1	1	P1T1U1	P1T2U1	P1T3U1	P1T4U1
	2	P1T1U2	P1T2U2	P1T3U2	P1T4U2
	3	P1T1U3	P1T2U3	P1T3U3	P1T4U3
	4	P1T1U4	P1T2U4	P1T3U4	P1T4U4
	5	P1T1U5	P1T2U5	P1T3U5	P1T4U5
	6	P1T1U6	P1T2U6	P1T3U6	P1T4U6
	7	P1T1U7	P1T2U7	P1T3U7	P1T4U7
P2	1	P2T1U1	P2T2U1	P2T3U1	P2T4U1
	2	P2T1U2	P2T2U2	P2T3U2	P2T4U2
	3	P2T1U3	P2T2U3	P2T3U3	P2T4U3
	4	P2T1U4	P2T2U4	P2T3U4	P2T4U4
	5	P2T1U5	P2T2U5	P2T3U5	P2T4U5
	6	P2T1U6	P2T2U6	P2T3U6	P2T4U6
	7	P2T1U7	P2T2U7	P2T3U7	P2T4U7

Model matematis rancangan percobaan yang digunakan adalah sebagai berikut:

$Yijk = \mu + \alpha i + \beta j + (\alpha\beta)ij + \Sigma ijk$

Keterangan:

$Yijk$ = Nilai pengamatan pada perlakuan sonikasi ke-i, lama fermentasi ke-j, dan ulangan ke-k

μ = Nilai tengah umum

αi = Pengaruh faktor sonikasi ke-i

βj = Pengaruh faktor lama fermentasi ke-j

$(\alpha\beta)ij$ = Pengaruh interaksi antara aktor sonikasi dan lama fermentasi

Σijk = Galat percobaan pada perlakuan sonikasi ke-i, waktu fermentasi ke-j, dan ulangan ke-k.

Perumusan hipotesis dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

a. Pengaruh Faktor Sonikasi

Hipotesis empiris yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

H0: Tidak terdapat pengaruh perlakuan sonikasi terhadap pH, TPT, TAT, total BAL, dan nitrogen terlarut pada fermentasi moromi.

H1: Sekurang-kurangnya terdapat satu pengaruh perlakuan sonikasi terhadap pH, TPT, TAT, total BAL, dan nitrogen terlarut pada fermentasi moromi.

Secara statistik, hipotesis empiris tersebut dapat dijabarkan sebagai berikut:

H0: $\alpha 0 = \alpha 1 = \alpha 2$

H1: $\alpha 0 \neq \alpha 1 \neq \alpha 2$, sekurang-kurangnya terdapat satu pengaruh perlakuan sonikasi terhadap pH, TPT, TAT, total BAL, dan nitrogen terlarut pada fermentasi moromi.

b. Pengaruh Lama Fermentasi

Hipotesis empiris yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

H0: Tidak terdapat pengaruh perlakuan lama fermentasi terhadap pH, TPT, TAT, total BAL, dan nitrogen terlarut pada fermentasi moromi.

H1: Sekurang-kurangnya terdapat satu pengaruh perlakuan lama fermentasi terhadap pH, TPT, TAT, total BAL, dan nitrogen terlarut pada fermentasi moromi.

Secara statistik, hipotesis empiris tersebut dapat dijabarkan sebagai berikut:

H0: $\beta 1 = \beta 2 = \beta 3 = \beta 4$

H1: $\beta 1 \neq \beta 2 \neq \beta 3 \neq \beta 4$, sekurang-kurangnya terdapat satu pengaruh perlakuan lama fermentasi terhadap pH, TPT, TAT, total BAL, dan nitrogen terlarut pada fermentasi moromi.

c. Interaksi Kedua Faktor

Hipotesis empiris yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

H0: Tidak terdapat interaksi antara perlakuan sonikasi dan lama fermentasi terhadap pH, TPT, TAT, total BAL, dan nitrogen terlarut pada fermentasi moromi.

H1: Sekurang-kurangnya terdapat interaksi antara perlakuan sonikasi dan lama fermentasi terhadap pH, TPT, TAT, total BAL ,dan nitrogen terlarut pada fermentasi moromi.

Secara statistik, hipotesis empiris tersebut dapat dijabarkan sebagai berikut:

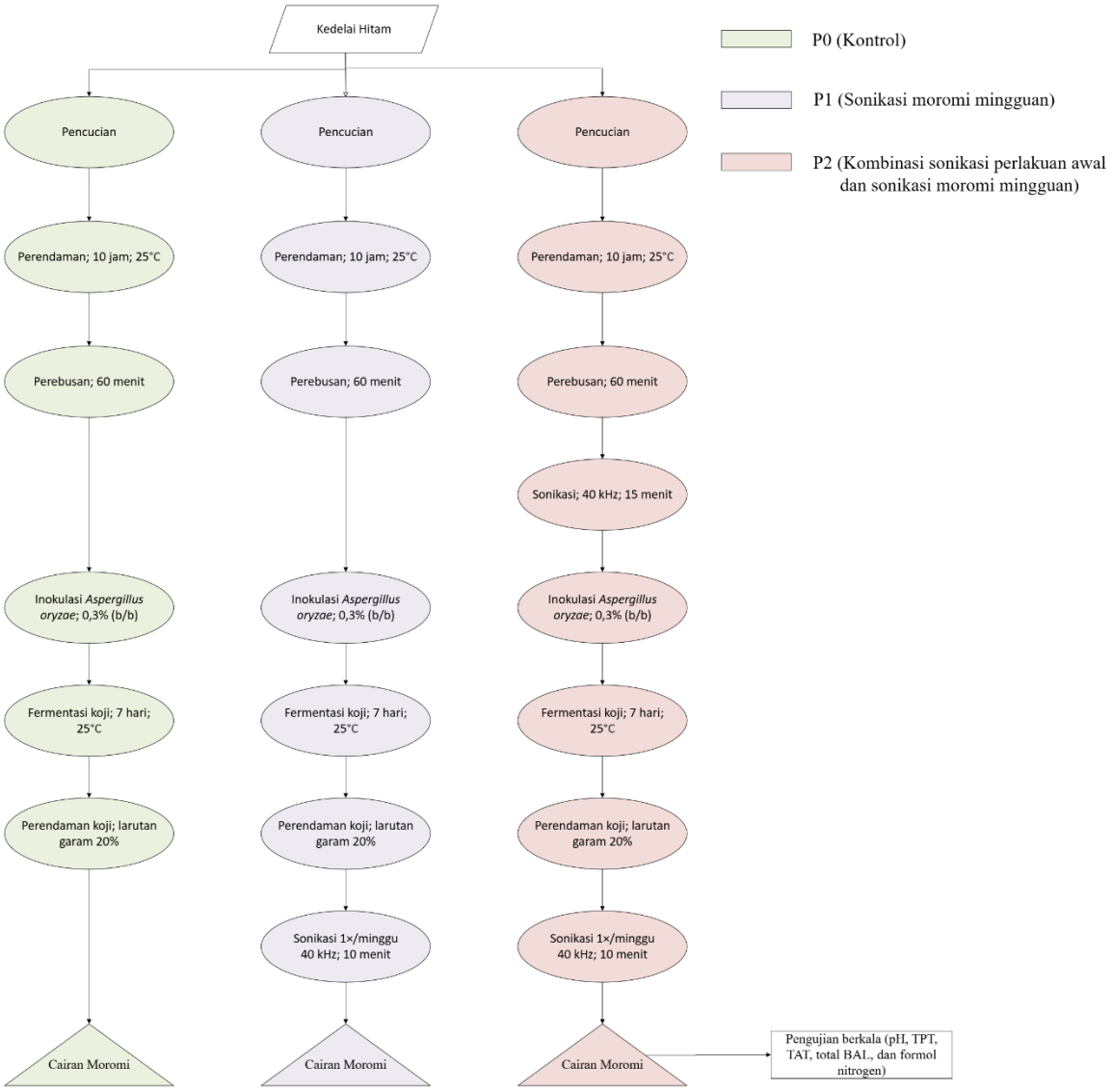
H0: $(\alpha\beta)01 = (\alpha\beta)02 = (\alpha\beta)03 = (\alpha\beta)04 = (\alpha\beta)11 = (\alpha\beta)12 = (\alpha\beta)13 = (\alpha\beta)14 = (\alpha\beta)21 = (\alpha\beta)22 = (\alpha\beta)23 = (\alpha\beta)24$

H1: $(\alpha\beta)01 \neq (\alpha\beta)02 \neq (\alpha\beta)03 \neq (\alpha\beta)04 \neq (\alpha\beta)11 \neq (\alpha\beta)12 \neq (\alpha\beta)13 \neq (\alpha\beta)14 \neq (\alpha\beta)21 \neq (\alpha\beta)22 \neq (\alpha\beta)23 \neq (\alpha\beta)24$, sekurang-kurangnya terdapat interaksi antara perlakuan sonikasi dan lama fermentasi terhadap pH, TPT, TAT, total BAL, dan nitrogen terlarut pada fermentasi moromi.

3.2.2. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan meliputi beberapa tahapan utama, yaitu persiapan bahan, pembuatan fermentasi moromi kacang kedelai hitam, pemberian perlakuan sonikasi sesuai dengan perlakuan yang ditentukan, serta pengujian

berbagai parameter selama proses fermentasi. Prosedur penelitian disajikan pada Ilustrasi 3.



Ilustrasi 3. Diagram Alir Penelitian

Keterangan: P0 (Kontrol); P1 (Sonikasi moromi mingguan); P2 (Kombinasi sonikasi perlakuan awal dan sonikasi moromi mingguan).

3.2.1.1 Fermentasi Moromi. Pembuatan moromi mengacu pada metode Liu *et al.* (2020) dengan beberapa modifikasi. Kedelai hitam terlebih dahulu disortasi untuk memisahkan kotoran serta biji yang rusak. Setelah itu, kedelai dicuci menggunakan air mengalir sebanyak tiga kali hingga bersih. Kedelai yang telah bersih kemudian

direndam dalam air pada suhu ruang selama 10 jam. Tahap perendaman ini bertujuan untuk meningkatkan kadar air dalam biji, melunakkan jaringan, serta mempermudah proses pemasakan dan penetrasi air ke dalam jaringan kedelai. Setelah proses perendaman selesai, kedelai direbus selama 60 menit hingga matang secara merata. Perebusan dilakukan untuk melunakkan bahan, menurunkan jumlah mikroorganisme kontaminan, serta meningkatkan ketersediaan nutrisi bagi kapang. Kedelai yang telah direbus kemudian ditiriskan dan dibagi ke dalam beberapa kelompok perlakuan. Pada perlakuan kontrol (P0) dan perlakuan pertama (P1), kedelai langsung didinginkan hingga mencapai suhu 40 °C. Sementara itu, pada perlakuan kedua (P2), kedelai terlebih dahulu diberikan perlakuan sonikasi sebagai *pre-treatment* menggunakan sonikator tipe *waterbath* dengan frekuensi 40 kHz selama 15 menit, kemudian didinginkan hingga suhu 40 °C. Perlakuan ini bertujuan untuk membantu membuka struktur jaringan bahan sehingga senyawa di dalam sel lebih mudah dilepaskan sesuai dengan penelitian Ercan *et al.* (2025).

Tahap selanjutnya adalah fermentasi koji sebagai tahap awal fermentasi. Kedelai dari masing-masing perlakuan diinokulasi dengan kapang *Aspergillus oryzae* sebanyak 0,3% (b/b) dari berat bahan. Inokulum dicampurkan hingga merata agar spora tersebar secara homogen pada seluruh substrat. Setelah itu, kedelai disebarkan secara merata pada wadah fermentasi dan diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari hingga terbentuk koji. Koji yang telah jadi selanjutnya direndam dalam larutan garam 20% dengan perbandingan 1:4 (b/v). Tahap perendaman ini merupakan fermentasi tahap kedua yang disebut moromi. Fermentasi moromi dilakukan selama satu bulan (28 hari).

3.2.1.2 Perlakuan Sonikasi. Fermentasi moromi dari kedua perlakuan (P1 dan P2) diberikan perlakuan sonikasi rutin secara berkala selama fermentasi berlangsung. Sonikasi pada fase moromi ini dilakukan dengan mengacu pada penelitian Gao *et al.* (2020) yang disesuaikan dan dimodifikasi sesuai kebutuhan, yakni sonikasi diberikan setiap minggu selama 10 menit dengan frekuensi 40 kHz dan suhu sonikasi 30°C, tepatnya pada hari ke-3, ke-10, ke-17, dan ke-24. Pengambilan sampel dilakukan empat hari setelah perlakuan sonikasi mingguan, yaitu pada hari ke-7, 14, 21, dan 28.

3.2.3. Pengujian Parameter

Preparasi sampel untuk pengujian mengacu pada penelitian Pangestika *et al.* (2021) dengan modifikasi yang dilakukan dengan memisahkan padatan dan cairan moromi menggunakan kain saring dengan cara diperas. Cairan yang diperoleh kemudian diambil sebanyak 30 mL dan disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 4000 rpm selama 1 jam. Setelah proses sentrifugasi, sampel difiltrasi kembali menggunakan kertas saring berukuran 200 *mesh*. Filtrat yang dihasilkan selanjutnya digunakan untuk analisis total padatan terlarut (TPT), total asam, dan formol nitrogen. Sementara itu, pengujian pH dan total bakteri asam laktat (BAL) dilakukan menggunakan sampel moromi asli tanpa melalui proses penyaringan.

3.2.3.1. pH. pH diukur dengan pH meter sesuai prosedur AOAC (1995). Sebelum dilakukan pengukuran, pH meter dikalibrasi terlebih dengan larutan buffer pH 4, 7, dan 10. Elektroda dibilas aquades dan dikeringkan. Kemudian elektroda dicelupkan

ke dalam 10 mL sampel hingga muncul nilai pH yang konstan pada alat tersebut. Angka yang ditunjukkan oleh pH meter merupakan nilai pH pada sampel moromi.

3.2.3.2. Total Padatan Terlarut. Total padatan terlarut diukur menggunakan alat refraktometer sesuai dengan SNI 01-3546-2004. Total padatan terlarut dari moromi kecap ditentukan menggunakan refraktometer genggam digital pada suhu 25°C dan dikalibrasi menggunakan aquades. Sebanyak 1–2 tetes sampel diteteskan pada prisma refraktometer, lalu hasilnya dinyatakan dalam °Brix sebagai jumlah kandungan total padatan terlarut.

3.2.3.3. Total Asam. Uji total asam dilakukan dengan metode titrasi berdasarkan AOAC (2000). Air moromi kecap sebanyak 50mL disaring menggunakan kertas saring lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer sebanyak 20 mL. Tambahkan 2 tetes indikator PP, kemudian dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N hingga mengalami perubahan warna. Perhitungan total asam dihitung dengan rumus :

Total Asam (%) = $\frac{V1\ x\ N\ x\ B\ x\ fp}{V2\ x\ 1000}$ x 100%

Keterangan:

B : Berat molekul asam laktat sebagai asam ekuivalen (90)

N : Normalitas NaOH

FP : Faktor pengenceran (10)

V_1 : Volume NaOH yang digunakan (ml)

V_2 : Volume sampel yang dititrasi (ml)

3.2.3.4. Total Bakteri Asam Laktat. Pengujian total bakteri asam laktat dilakukan mengikuti prosedur yang telah dilakukan Rohman *et al.* (2019) dengan modifikasi. Media yang digunakan adalah de Man Rogosa Sharpe Agar (MRSA) yang

ditambahkan $CaCO_3$ 1%. Media dilarutkan menggunakan akuades kemudian dipanaskan di atas *hotplate* dengan bantuan *stirrer* hingga larutan menjadi jernih. Selanjutnya media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Pengujian dilakukan secara aseptik di dalam *Laminar Air Flow*. Sebanyak 1 mL sampel dimasukkan ke dalam 9 mL larutan NaCl fisiologis 0,85% sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1}. Pengenceran berseri dilakukan dengan cara yang sama hingga mencapai 10^{-6}. Selanjutnya, 1 mL suspensi dari tiga pengenceran terakhir (10^{-4}, 10^{-5}, dan 10^{-6}) dimasukkan ke dalam cawan petri steril dan dilakukan secara duplo. Sebanyak ±15 mL media MRSA bersuhu sekitar 45–50°C kemudian dituangkan ke dalam cawan petri. Cawan digerakkan secara perlahan membentuk angka delapan agar sampel dan media tercampur merata. Setelah media memadat, cawan petri diinkubasi dalam posisi terbalik pada suhu 37°C selama 48 jam. Jumlah koloni BAL dihitung pada cawan yang memiliki 30–300 koloni menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC). Nilai total BAL dinyatakan sebagai *Standard Plate Count* (SPC) dengan cara mengalikan jumlah koloni yang terbentuk dengan faktor pengenceran, sehingga diperoleh jumlah bakteri asam laktat per mL sampel. Perhitungan total BAL dilakukan dengan rumus:

$$\text{Jumlah mikroba (CFU/ml)} = \text{jumlah koloni x } \frac{1}{Faktor\ pengenceran}$$

Selanjutnya nilai tersebut dikonversi ke bentuk logaritmik:

$$\text{Log Total BAL} = \log_{10}(\text{CFU/ml})$$

3.2.3.5. Formol Nitrogen. Pengujian formol nitrogen mengacu pada Sudarmadji *et al.* (1997) dengan modifikasi. Pengujian formol nitrogen dilakukan dengan memasukkan 10 mL sampel moromi ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan

20 mL aquadest, 0,4 mL kalium oksalat, dan 2–3 tetes indikator fenolftalein. Larutan kemudian dititrasi menggunakan NaOH 0,1 N hingga terbentuk warna merah muda. Setelah titrasi pertama selesai, ke dalam larutan ditambahkan 2 mL formaldehid 40% dan kembali ditambahkan 2–3 tetes indikator fenolftalein. Selanjutnya larutan dititrasi kembali dengan NaOH 0,1 N hingga muncul warna merah muda. Volume titrasi yang diperoleh kemudian dicatat dan digunakan untuk menghitung kadar formol nitrogen.

Perhitungan dilakukan menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ N} = \frac{Titrasi\ formol\ x\ N\ NaOH\ x\ 14{,}008\ x\ FP}{Volume\ sampel\ (ml) x\ 1000} \text{ x } 100\%$$

Keterangan:

Titrasi formol = titrasi sampel – titrasi blanko

FP = Faktor pengenceran (10)

N NaOH = Normalitas NaOH (0,1)

3.2.4. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengujian nilai pH, TPT, TAT, total BAL, dan nitrogen terlarut dianalisis secara statistik menggunakan sidik ragam dua arah (*Two-Way* ANOVA) dengan *repeated measures* (*mixed-design*) menggunakan *software* GraphPad Prism 10 for Windows dan pemodelan dengan regresi linier menggunakan Microsoft Excel 2021. Penggunaan *software* GraphPad bertujuan untuk mempermudah visualisasi data. Uji *Two-Way* ANOVA bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan sonikasi, lama fermentasi, serta interaksi antara kedua faktor terhadap parameter yang diamati. Apabila hasil analisis menunjukkan

perbedaan yang signifikan, maka dilanjutkan dengan uji Tukey's *multiple comparisons* untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Nilai signifikansi ditetapkan pada taraf kepercayaan 95% ($P < 0,05$). Pemodelan regresi linier bertujuan untuk menggambarkan arah dan laju perubahan parameter selama fermentasi.

Pemodelan regresi linier bertujuan untuk memetakan arah dan mengevaluasi laju perubahan tiap parameter selama masa fermentasi. Pendekatan pemodelan kinetika ini diaplikasikan menggunakan model reaksi orde nol untuk menggambarkan kecenderungan perubahan parameter fermentasi yang diasumsikan berlangsung secara linier terhadap waktu pengamatan. Model persamaan orde nol dinyatakan melalui persamaan matematis berikut:

$$y = y_0 \pm kt$$

Dalam persamaan tersebut, nilai y sebagai nilai parameter pada waktu tertentu, y_0 sebagai intercept atau nilai awal teoritis dari persamaan regresi, k sebagai konstanta laju perubahan, dan t sebagai waktu fermentasi. Apabila nilai k positif, maka parameter mengalami peningkatan selama fermentasi, sedangkan apabila nilai k negatif, maka parameter mengalami penurunan selama fermentasi. Nilai k diperoleh dari kemiringan garis atau slope hasil regresi linier. Karena pengamatan dalam penelitian ini tidak dimulai dari hari ke-0, melainkan dari hari ke-7 hingga hari ke-28, maka y_0 tidak diartikan sebagai nilai aktual hari ke-0, tetapi sebagai nilai teoritis atau intercept dari persamaan regresi. Kesesuaian model dievaluasi berdasarkan nilai koefisien determinasi (R^2), dengan nilai yang

mendekati 1 menunjukkan bahwa perubahan parameter semakin mengikuti pola linier selama waktu pengamatan.