

FERMENTASI BIAK RENDAM MOLASES DENGAN *Aspergillus niger* UNTUK PRODUKSI ASAM SITRAT

Anne Carolina^a, Abubakar Sidik^b, Iman P. Maksu^b, Saadah D. Rachman^b, Agus Safari^b, & Safri Ishmayana^{b*}

^aDepartemen Hasil Hutan, Fakultas Kehutanan, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

^bDepartemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Jln. Raya Bandung-Sumedang km. 21, Jatinangor, Sumedang 45363

*Alamat Korespondensi: ishmayana@unpad.ac.id

Abstrak: Asam sitrat terdapat melimpah di alam dan dihasilkan sebagai salah satu zat antara pada siklus asam sitrat saat karbohidrat dioksidasi menjadi karbondioksida. Asam sitrat merupakan penyebab rasa asam pada berbagai buah seperti jeruk, nanas dan pir. Karena kelarutannya yang tinggi, rasanya yang enak dan toksisitasnya yang rendah maka asam sitrat banyak digunakan dalam industri makanan, minuman dan obat-obatan. Salah satu metode yang digunakan untuk produksi asam sitrat adalah dengan metode fermentasi. *Aspergillus niger* merupakan salah satu mikroorganisme yang dapat digunakan pada proses produksi asam sitrat. Produksi asam sitrat pada penelitian ini dilakukan dengan tahap pemeliharaan *A. niger* pada media agar miring, aktivasi kultur *A. niger* dalam inokulum dan produksi asam sitrat dalam media fermentasi yang mengandung 20, 25, 30 dan 35% konsentrasi molase dengan metode biak rendam. Analisis yang dilakukan mencakup perubahan pH, berat kering sel, konsumsi gula pereduksi, serta konsentrasi asam sitrat yang dihasilkan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa asam sitrat paling banyak diproduksi pada media yang mengandung 30% molase, yaitu diperoleh 85,8 g/L asam sitrat.

Kata kunci: *Aspergillus niger*, asam sitrat, molase

Abstract: Citric acid is naturally present in nature as one of intermediate in citric acid cycle when carbohydrate oxidized to carbon dioxide. It is responsible for sour taste in oranges, pineapples, and pear. Because of its high solubility, tasty taste, and very low toxicity, citric acid is widely used in foods, beverages, and medicines industries. One of methods than can be used for citric acid production is fermentation and *A. niger* is one of the microorganisms than can be used for this purpose. Citric acid production in the present study was conducted through the following steps: growing of *A. niger* on agar slants, activation of *A. niger* in inoculums for starter culture, and production of citric acid using fermentation media containing 20, 25, 30 and 35% of molasses in submerged culture. The product was analysed for its pH, dry cell weight, reducing sugar content and citric acid produced. The results of the present study indicate that the highest citric acid was produced when 30% molase used resulting 85.8 g/L citric acid.

Keywords: *Aspergillus niger*, citric acid, molases

PENDAHULUAN

Asam sitrat merupakan salah satu bahan aditif yang dikenal luas pada berbagai kalangan industri, termasuk industri pangan dan farmasi (Soccol *et al.*, 2006; Vandenberghe *et al.*, 1999). Senyawa ini dapat diproduksi dengan memanfaatkan aktivitas mikroorganisme melalui proses fermentasi, baik secara fermentasi padat, biak rendam (Darouneh *et al.*, 2009; Pallares *et al.*, 1996; Manafaati 2011) ataupun dengan menggunakan sel yang teramobilisasi (Demirel *et al.*, 2005).

Banyak mikroorganisme yang dapat digunakan dalam proses produksi asam sitrat, seperti *Penicillium glaucum*, *Candida tropicalis*, *A. niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus nidulans*, *Hansenula anomala* dan *Yarrowia lipolytica* (Max *et al.*, 2010; Soccol *et al.*, 2006; Vandenberghe *et al.*, 1999). Namun, diantara mikroorganisme tersebut *A. niger* merupakan mikroorganisme utama yang digunakan di industri untuk produksi asam sitrat karena menghasilkan lebih banyak asam sitrat per satuan

waktu dan juga kemampuannya untuk memproduksi asam sitrat dari bahan yang murah (Soccol *et al.*, 2006).

Molase merupakan hasil samping industri pengolahan gula yang kaya akan kandungan karbohidrat, termasuk sukrosa, glukosa dan fruktosa (Teclu *et al.*, 2009). Karena kandungan karbohidratnya, maka molase sangat potensial untuk digunakan sebagai sumber karbon pada proses produksi asam sitrat (Darouneh *et al.*, 2009; Ul-Haq *et al.*, 2002).

Pada penelitian ini dilakukan produksi asam sitrat dengan menggunakan substrat molase yang diperoleh dari industri gula PG II Jatitujuh, Majalengka, Jawa Barat dengan menggunakan *A. niger* yang diperoleh dari Labtek-X Institut Teknologi Bandung. Metode fermentasi yang digunakan pada penelitian ini adalah metode biak rendam dengan variasi konsentrasi molase yang ditambahkan ke dalam media fermentasi.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah air suling, asam sitrat standar, asam asetat, tembaga sulfat pentahidrat, dekstrosa (glukosa), feroamonium sulfat, asam klorida, asam oksalat, asam sulfat, kalium dihidrogen fosfat, asam fosfat, kalium ferisianida, mangan sulfat, natrium klorida, natrium hidroksida, amonium sulfat, dan seng sulfat. Kesemua bahan kimia diperoleh dari Merck.

Pembiakan *A. niger* pada agar miring

A. niger ditumbuhkan pada media agar miring PDA (*potato dextrose agar*). Sebanyak 200 g kentang dicuci bersih dan dipotong kecil kemudian direbus dengan 1 L air suling selama 1 jam. Sebanyak 500 mL kaldu kentang kemudian disaring kemudian kedalamnya ditambahkan 20 g glukosa, 15 g serbuk agar-agar dan diencerkan sampai volume 1 L dengan air suling. Kemudian dipanaskan sampai larut lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan disterilkan dengan autoklaf.

Agar yang telah padat kemudian ditanami dengan *A. niger* dari stok dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30°C hingga terbentuk spora. Setelah itu disimpan dalam lemari es pada suhu 4°C dan siap digunakan untuk pembuatan inokulum spora.

Penjernihan molase

Sebanyak 200, 250, 300 dan 350 gram molase pekat ditimbang dan dilarutkan dalam 500 mL air suling, diasamkan dengan asam klorida 4 M sampai pH 4 kemudian ditambah air suling sampai volume 1 L. Hasilnya merupakan larutan molase dengan konsentrasi masing-masing 20, 25, 30 dan 35% (b/v). Untuk memisahkan pengotor dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1040 g selama 30 menit.

Media inokulasi

Untuk membuat kultur starter, sebanyak satu ose spora *A. niger* dimasukkan secara aseptis ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi media cair dengan komposisi 5% molase, 2,06 g/L ammonium sulfat, 1,2 g/L kalium dihidrogen fosfat, 5 ppm tembaga sulfat, 25 ppm feroamonium sulfat, 25 ppm seng sulfat, 25 ppm mangan sulfat, dan 100 ppm kalium ferisianida. pH awal diatur dengan penambahan HCl 1 M atau NaOH 1 M. Biakan ini dikocok selama dua hari dengan kecepatan 200 rpm.

Produksi asam sitrat

Media fermentasi disiapkan dengan mengambil molase yang telah dijernihkan sesuai dengan konsentrasi yang telah disebutkan sebelumnya. pH media diatur dengan penambahan asam klorida 4 M sampai mencapai pH 2. Ke dalam masing-masing larutan dengan konsentrasi molase yang berbeda ditambahkan 2,06 g/L ammonium sulfat, 0,11 g/L kalium dihidrogen fosfat, 0,5 g/L magnesium sulfat, 0,5 ppb feroamonium sulfat, 20 ppb seng sulfat, 3 ppb mangan sulfat, dan 100 ppm kalium ferisianida.

Media ini kemudian di sterilisasi dengan *autoclave*. Kultur inokulum diambil secara aseptis sebanyak 5% (v/v) dan dimasukkan ke dalam media fermentasi, kemudian di kocok dengan kecepatan 200 rpm pada suhu ruang selama 8 hari. Proses fermentasi diikuti dengan memantau perubahan yang terjadi pada media yang meliputi pH, berat kering sel, konsentrasi gula pereduksi dan konsentrasi asam sitrat.

Setiap 24 jam, sampel diambil kemudian ditentukan nilai pH dengan pH meter, berat kering sel dengan metode gravimetri dan konsentrasi gula pereduksi yang tersisa pada media dengan metode Somogyi-Nelson (Somogyi 1952; Nelson 1944). Kadar asam sitrat yang dihasilkan pada media ditentukan pada jam ke 144 (Ali *et al.*, 2002) dengan metode KCKT.

Penentuan kadar asam sitrat

Asam sitrat ditentukan dengan metode KCKT menggunakan kolom nukleosil 10 C18 dengan detektor UV pada panjang gelombang 214 nm. Fasa gerak yang digunakan adalah buffer $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ pH 2,4 dengan laju alir 0,8 mL/menit. Sebelum penentuan standar asam sitrat dan sampel, kolom dicuci dengan mengalirkan metanol 100%, diikuti dengan metanol-air (70:30). Semua fase gerak terlebih dahulu dilakukan *degassing* selama 30 menit. Konsentrasi standar asam sitrat yang digunakan adalah 10 mg/L dan sampel disuntikkan ke instrumen setelah disaring dengan saringan milipore 0,45 μm .

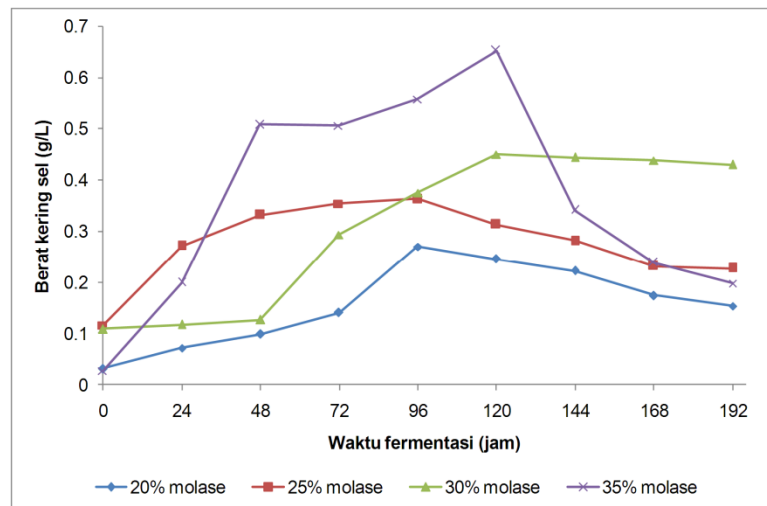
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan sel *A. niger*

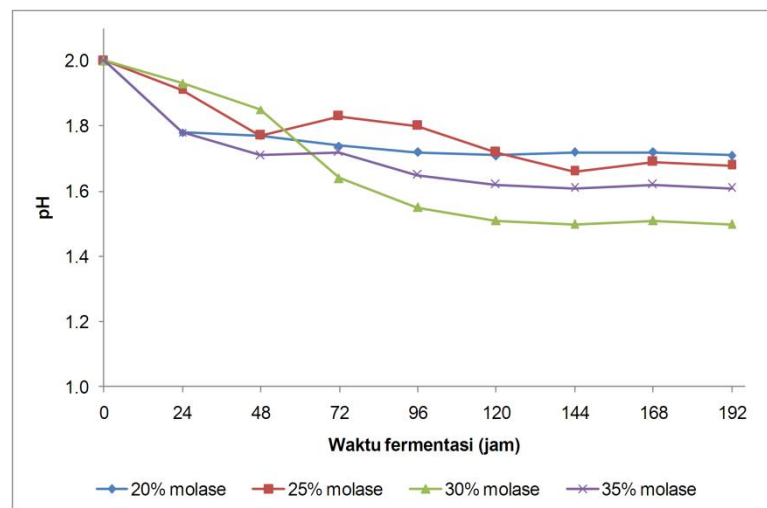
Waktu optimum inkubasi untuk menghasilkan asam sitrat bervariasi pada setiap organisme dan juga ditentukan oleh kondisi fermentasinya. Menurut Ali *et al.* (2002), pada fermentasi asam sitrat secara lompok, produksi asam sitrat dimulai setelah fase lag (adaptasi) yang biasanya berlangsung selama 2 hari dan produksi asam sitrat mencapai maksimum pada permulaan fase stasioner atau akhir fase eksponensial (6 hari).

Pada percobaan ini, *A. niger* ditumbuhkan terlebih dahulu pada media inokulum, sehingga ketika ditumbuhkan pada media fermentasi, fase adaptasinya relatif singkat, atau bahkan ada yang langsung memasuki fase eksponensial seperti ditunjukkan pada Gambar 1.

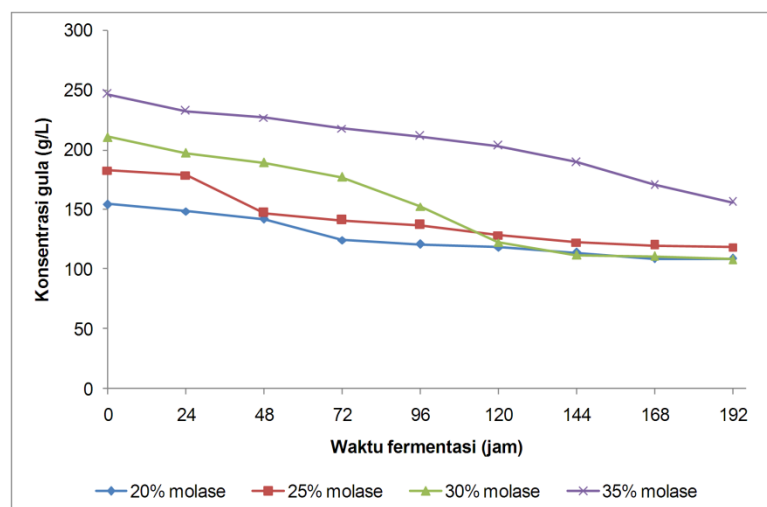
Pada konsentrasi molase 20% (b/v) terlihat bahwa *A. niger* langsung mengalami fase eksponensial dan mencapai puncak pertumbuhan pada jam ke-120, diikuti oleh penurunan berat kering sel yang menandakan memasuki fase kematian pada jam ke-144. Sementara itu, pada konsentrasi molase 25% (b/v), meskipun sama-sama tidak mengalami fase adaptasi, terlihat bahwa pertumbuhan sel tertinggi dicapai pada jam ke-96, diikuti penurunan berat kering sel pada jam ke-120. Pada variasi 30 dan 35% (b/v) terlihat bahwa fase eksponensial berlangsung sampai jam ke-144, dan setelah itu diikuti oleh penurunan berat kering sel.



Gambar 1 Kurva pertumbuhan *A. niger* berdasarkan berat kering sel. Fermentasi dilakukan dengan metode biak rendam dengan kecepatan pengocokan 200 rpm pada suhu kamar.



Gambar 2 Perubahan pH selama proses produksi asam sitrat dengan *A. niger*. Fermentasi dilakukan dengan metode biak rendam dengan kecepatan pengocokan 200 rpm pada suhu kamar.



Gambar 3 Perubahan kadar gula pereduksi selama proses produksi asam sitrat dengan *A. niger*. Fermentasi dilakukan dengan metode biak rendam dengan kecepatan pengocokan 200 rpm pada suhu kamar.

Hasil pengukuran berat kering sel menunjukkan bahwa konsentrasi gula dapat memengaruhi pertumbuhan sel. Secara umum, konsentrasi gula yang tinggi dapat memicu pertumbuhan sel.

Perubahan pH

Menurut Poesponegoro & Liang (1991), proses fermentasi asam sitrat dua tahap memerlukan pH awal yang rendah untuk merangsang akumulasi asam sitrat. Penerapan pH awal media yang rendah ini hanya efektif apabila fermentasinya dilakukan dengan proses dua tahap karena pH rendah cenderung menghambat perkecambahan spora dan pertumbuhan *A. niger*. Selain itu, Shadafza *et al.* (1976) juga mengemukakan bahwa pH awal yang tinggi dapat memicu akumulasi produk lain, yaitu asam oksaloasetat.

Hasil pengukuran pH media fermentasi ditunjukkan pada Gambar 2. Pada media fermentasi yang mengandung 20% (b/v) molase memperlihatkan perubahan pH yang terus menurun. Rentang perubahan pH selama fermentasi dalam waktu 192 jam adalah dari pH 2,00 ke pH 1,71. Pada jam ke-24 dan ke-48, pH media turun dengan cukup tajam dari 2,00 menjadi ~1,78, namun untuk selanjutnya pH relatif konstan. Hal ini dimungkinkan terjadi karena adanya aksi penyangga pH karena adanya asam-asam lemah yang terbentuk yang membentuk buffer dengan garamnya.

Pada variasi konsentrasi molase 25% (b/v), penurunan pH terjadi dari 2,00 menjadi ~1,68. Sedangkan pada konsentrasi molase 30 dan 35%, terjadi penurunan pH dari 2 menjadi ~1,51 dan ~1,61. Seperti halnya pada variasi molase 20% (b/v), setelah jam ke-144 nilai pH semua perlakuan relatif konstan.

Perubahan kadar gula pereduksi

Gula pereduksi dalam media digunakan oleh *A. niger* sebagai sumber energi untuk pertumbuhan dan aktivitas biokimia lainnya. Semakin besar konsentrasi gula dalam media, maka diharapkan asam sitrat yang terbentuk juga semakin banyak. Hal ini harus ditunjang dengan pengendalian terhadap pertumbuhan sel oleh pembatasan nutrisi, terutama oleh logam-logam runtu.

Seperti ditunjukkan pada Gambar 3, konsumsi gula pereduksi terbesar teramati pada konsentrasi awal molase 30% (b/v) yang setara dengan ~246 g/L gula pereduksi. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi gula pereduksi, maka semakin tinggi tingkat konsumsi gula oleh *A. niger*. Namun kondisi ini terjadi sampai suatu konsentrasi tertentu dimana jika konsentrasi ini terus ditingkatkan, justru akan menurunkan tingkat konsumsi gula pereduksi. Fenomena ini juga teramati pada proses produksi bioetanol dengan menggunakan ragi *Saccharomyces cerevisiae*, dimana konsentrasi gula yang terlalu tinggi justru menurunkan tingkat konsumsi gula karena adanya cekaman osmotik terhadap sel ragi (Ishmayana *et al.*, 2011).

Produksi asam sitrat

Penentuan pengaruh konsentrasi gula yang berbeda pada produksi asam sitrat oleh *A. niger* dilakukan pada konsentrasi molase awal yang berbeda, yaitu 20, 25, 30 dan 35% yang masing-masing setara dengan 154,50; 182,67; 210,63 dan 246,50 g/L. Asam sitrat yang dihasilkan diidentifikasi dan ditentukan kadarnya dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan kolom nukleosil 10 C18, fasa gerak buffer fosfat pH 2,4 dan laju alir 0,8 mL/menit. Detektor yang digunakan adalah detektor UV pada panjang gelombang 214 nm.

Kadar asam sitrat ditentukan pada waktu fermentasi 144 jam. Hasil fermentasi menunjukkan bahwa pada jam ke-144 pH media semua kondisi fermentasi yang diuji sudah mencapai pH terendah. Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Ali *et al.* (2002) dan Ul-Haq *et al.* (2002) juga menemukan bahwa produksi asam sitrat tertinggi diperoleh pada waktu 144 jam. Berdasarkan pertimbangan tersebut, maka sampel pada waktu fermentasi 144 jam diambil dan ditentukan kadar asam sitratnya. Hasil analisis KCKT ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil penentuan konsentrasi asam sitrat dengan KCKT menggunakan kolom nukleosil 10 C18, fasa gerak buffer fosfat pH 2,4, laju alir 0,8 mL/menit dan detektor UV pada panjang gelombang 214 nm.

Konsentrasi molase dalam media (% b/v)	Waktu retensi (menit)	Luas Area	Konsentrasi Asam sitrat (g/L)
Asam sitrat	5,614	$1,18 \times 10^4$	10,00
20	5,652	$3,50 \times 10^4$	29,57
25	5,593	$7,64 \times 10^4$	64,55
30	5,532	$9,92 \times 10^4$	83,79
35	5,712	$2,10 \times 10^4$	17,76

Keterangan: Asam sitrat adalah standar asam sitrat

Hasil KCKT menunjukkan bahwa konsentrasi asam sitrat yang diproduksi pada media fermentasi dengan konsentrasi molase awal 20, 25, 30 dan 35% (b/v) masing-masing sebesar 29,57; 64,55; 83,79 dan 17,76 g/L. Hasil ini menunjukkan bahwa asam sitrat paling tinggi diperoleh pada konsentrasi awal molase 30% (b/v) sesuai dengan data konsumsi gula pereduksi.

Kesesuaian substrat yang tersedia juga mempengaruhi konsentrasi asam sitrat yang terbentuk. Hossain *et al.* (1984) menemukan bahwa substrat terbaik untuk menghasilkan asam sitrat berturut-turut adalah sukrosa, glukosa, fruktosa dan laktosa. Sedangkan galaktosa tidak menyebabkan terakumulasinya asam sitrat. Molase yang digunakan pada penelitian ini mengandung sukrosa, glukosa dan fruktosa (Teclu *et al.*, 2009), sehingga sesuai untuk digunakan pada proses produksi asam sitrat.

KESIMPULAN

Kondisi terbaik untuk produksi asam sitrat dengan metode fermentasi biak rendam adalah dengan menggunakan konsentrasi awal molase 30% (b/v) yang setara dengan 210,63 g/L gula pereduksi. Sebanyak 83,79 g/L asam sitrat dihasilkan dengan kondisi tersebut.

Ucapan Terima Kasih

Kami mengucapkan terima kasih kepada Bapak U. Djuahria dan Maman Tardi untuk bantuan teknis yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Darouneh, E., Alavi, A., Vosoughi, M., Arjmand, M., Seifkordi, A. & Rajabi, R. (2009). Citric acid production: Surface culture versus submerged culture, *African Journal of Microbiology Research*, 3(9), 541-545.
- Demirel, G., Yaykaşli, K.O. & Yaşar, A. (2005). The production of citric acid by using immobilized *Aspergillus niger* A-9 and investigation of its various effects, *Food Chemistry*, 89, 393-396.
- Hossain, M., Brooks, J.D. & Maddox, I.S. (1984). The effect of the sugar source on citric acid production by *Aspergillus niger*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19, 393-397.
- Ishmayana, S., Learmonth, R.P. & Kennedy, U.J. (2011). Fermentation performance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in media with high sugar concentration, *Proceeding of the 2nd International Seminar on Chemistry*, Jatinangor, 24 November 2011. pp. 379-385.
- Manfaati, R. (2011). Pengaruh komposisi media fermentasi terhadap produksi asam sitrat oleh *Aspergillus niger*, *Jurnal Fluida*, 8(1), 23-27.
- Max, B., Salgado, J.M., Rodríguez, N., Cortés, S., Converti, A. & Domínguez, J.M. (2010). Biotechnological production of citric acid, *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 862-875.
- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, *Journal of Biological Chemistry*, 153, 375-380.
- Pallares, J., Rodríguez, S. & Sanromán, A. (1996). Citric acid production in submerged and solid state culture of *Aspergillus niger*, *Bioprocess Engineering*, 15, 31-33.
- Poesponegoro, M. & Liang, O.B. (1991). Fermentasi asam sitrat dari tetes tebu secara biak rendam dengan *Aspergillus niger*, *Jurnal Kimia Terapan Indonesia*, 1(2), 35-40.
- Shadafza, D., Ogawa, T. & Fazeli, A. (1976). Comparison of citric acid production from beet molasses and date syrup with *Aspergillus niger*, *Jornal of Fermentation Technology*, 54, 67-75.
- Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P., Rodríguez, C. & Pandey, A. (2006). New perspective for citric acid production and application, *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 141-149.
- Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination, *Journal of Biological Chemistry*, 195, 19-23.
- Teclu, D., Tivchev, G., Laing, M. & Wallis, M. (2009). Determination of the elemental composition of molase and its suitability as a carbon source for growth of sulphate-reducing bacteria, *Journal of Hazardous Material*, 161, 1157-1165.
- Ul-Haq, I., Ali, S., Qadeer, M.A. & Iqbal, J. (2002). Citric acid fermentation by mutant strain of *Aspergillus niger* GCMC-7 using molase based medium, *Electronic Journal of Biotechnology*, 5(3), 125-132.
- Vandenberghe, L.P., Soccol, C.R., Pandey, A. & Lebeault, J-M. (1999). Microbial production of citric acid. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42(2), 263-276.