

# FERMENTASI ASAM SITRAT DARI TETES TEBU, SECARA BIAK-RENDAM DENGAN *Aspergillus niger*

Milono Poesponegoro<sup>1)</sup> dan Oei Ban Liang<sup>2)</sup>

1) Puslitbang Kimia Terapan - LIPI, Jl. Cisitu-Sangkuriang, Bandung

2) Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganeca 10, Bandung

## INTISARI

Penelitian untuk menentukan kondisi optimum fermentasi asam sitrat dari tetes-tebu secara biak-rendam dengan kapang *Aspergillus niger* telah dilakukan. Dalam penelitian ini dipelajari pengaruh galur kapang *Aspergillus niger*, konsentrasi awal gula-pereduksi total dan pH medium pada akumulasi asam sitrat.

Fermentasi biak-rendam satu-tahap dilakukan dalam labu Erlenmeyer 300 ml yang mengandung 50 ml medium cair, di dalam inkubator-orbital pada 30°C dengan goyangan 200 putaran per-menit. Sedangkan fermentasi dua-tahap dilakukan pada alat fermentor yang mengandung 2.5 liter medium cair pada suhu 30°C dengan pH tetap, aerasi 1 volum/volum/ menit dan laju-aduk 700 putaran per menit. Proses fermentasi diikuti dengan memantau perubahan yang terjadi di dalam medium untuk nilai pH, konsentrasi gula-pereduksi total, berat kering biomassa kapang, serta konsentrasi asam sitrat, selama waktu fermentasi 7 hari.

Didapatkan bahwa galur kapang, konsentrasi gula-pereduksi total, dan pH medium mempengaruhi proses fermentasi asam sitrat dengan *Aspergillus niger*. *Aspergillus niger* ATCC 11414 merupakan galur terbaik diantara delapan galur yang diuji. Konsentrasi awal gula-pereduksi total (15 - 20%) dan pH medium yang rendah (kurang dari 3.0) adalah kondisi optimum untuk akumulasi asam sitrat oleh *Aspergillus niger* ATCC 11414.

## ABSTRACT

A study to determine the optimum condition of submerged citric acid fermentation of cane molasses with *Aspergillus niger* has been conducted. Effects of the strains of *Aspergillus niger*, initial concentration of total reducing sugars and initial pH of the medium on citric accumulation were investigated.

One-stage submerged culture fermentation process was carried out in a 300 ml Erlenmeyer flask which contained 50 ml liquid medium at 30°C, in an orbital shaker incubator operated at 200 rpm. While a two-stage submerged fermentation process was performed at 30°C in a stirred fermentor containing 2.5 liters of liquid medium at a constant pH, with 1 vvm aeration and agitation at a speed of 700 rpm. The fermentation process was followed by monitoring the changes in pH values, concentrations of total reducing sugars, dry weight of cellular biomass, and citric acid concentration in the culture medium, during 7 days of fermentation time.

It was obtained that strain of the mould, concentration of total reducing sugars as well as pH of the medium affected the submerged citric acid fermentation process with *Aspergillus niger*. *Aspergillus niger* ATCC 11414 was found to be the best strain among the eight strains tested. High

initial concentrations of total reducing sugars (15 - 20%) and low initial pH of the medium (less than 3.0) were the optimum conditions for citric acid accumulation by *Aspergillus niger* ATCC 11414.

## PENDAHULUAN

Sebagian besar asam sitrat komersial pada saat ini diproduksi secara fermentasi dari bahan substrat yang kaya karbohidrat. Paturau [2] menyatakan bahwa baik tetes-bit maupun tetes-tebu kequanya dapat digunakan sebagai bahan substrat untuk pembuatan asam sitrat.

Penggunaan tetes-tebu untuk produksi asam sitrat, dapat memperluas alternatif pemanfaatan tetes-tebu di Indonesia, yang selama ini hanya diekspor dan sebagian saja digunakan sebagai substrat dalam pembuatan etanol dan mono-sodium glutamat [3]. Kepustakaan yang ada tentang fermentasi asam sitrat dari tetes-tebu [4, 5, 6, 7, 8, 9] umumnya melaporkan hasil asam sitrat yang rendah. Selain dipengaruhi oleh galur kapang, fermentasi asam sitrat sangat sensitif terhadap perubahan dalam komposisi medium, terutama di dalam proses biak-rendam [10]. Telah sering dilaporkan bahwa kondisi optimum yang diperlukan untuk tahapan proses pertumbuhan mikroorganisme dan tahapan produksi asam sitrat berbeda. Hal ini menyebabkan timbulnya "proses fermentasi asam dua-tahap" sebagai alternatif "proses fermentasi asam sitrat satu-tahap".

Proses fermentasi asam sitrat satu-tahap adalah proses fermentasi asam sitrat dimana tahap-pertumbuhan mikroorganisme dan tahap-fermentasi untuk produksi asam sitrat dilakukan sekaligus pada satu medium. Sedangkan proses fermentasi asam sitrat dua-tahap adalah proses fermentasi asam sitrat dimana tahap-pertumbuhan mikroorganisme dan tahap-fermentasi untuk produksi asam sitrat dilakukan secara terpisah, dengan menggunakan dua macam medium yang berbeda komposisinya.

Di dalam tulisan ini dilaporkan hasil-hasil penelitian fermentasi asam sitrat dari tetes-tebu. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi optimum fermentasi asam sitrat dari tetes-tebu secara biak-rendam, dengan kapang *Aspergillus niger*. Dalam penelitian ini dipelajari pengaruh galur kapang *Aspergil-*



*lus niger*, konsentrasi awal gula-pereduksi total dan pH medium pada akumulasi asam sitrat.

## BAHAN DAN METODA

### Bahan kimia

Bahan-bahan kimia dengan mutu "pro-analisis", dan air bebas mineral (derajat resistensi 10 - 18 Megaohm-cm) telah digunakan dalam penelitian ini.

### Organisme

Kapang *Aspergillus niger* yang digunakan terdiri atas satu galur lokal (*Aspergillus niger Co*) dan tujuh galur *Aspergillus niger* penghasil asam sitrat [11] dari The American Type Culture Collection (ATCC). Pembiakan dan pemeliharaan kapang dilakukan pada medium "Potato Dextrose Agar" (PDA), dengan inkubasi 2 hari pada 30°C.

Suspensi spora kapang untuk inokulasi dibuat di dalam larutan 0.005% Tween-80 steril. Konsentrasi spora ditentukan dengan hematisometer di bawah mikroskop. Inokulasi dilakukan sebanyak  $10^3$  spora per-liter medium.

### Medium tetes-tebu

Tiga macam komposisi medium tetes-tebu (Tabel 1) telah digunakan di dalam penelitian ini. Medium tetes-tebu dibuat dari supernatan tetes-tebu. Tetes-tebu dijernihkan dengan jalan sentrifugasi (7000 putaran per-menit, 30 menit) setelah dilakukan pemanasan (121°C, 1 menit) pada pH 4.0.

Tabel 1 Komposisi medium tetes-tebu

Nutrien	Macam medium tetes-tebu		
	A	B	C
Tetes-tebu (gula-pereduksi total),	g/l 140	140	50
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	g/l 2.50	2.50	4.57
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,	g/l 1.00	0.07	1.73
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O,	g/l 0.25	0.20	1.84
pH Awal medium	4.0	4.0	4.0

Konsentrasi awal gula-pereduksi total "medium tetes-tebu pekat" diatur dengan cara mengencerkan supernatan tetes-tebu kental (25.0%) hingga konsentrasi yang dikehendaki. Sedangkan untuk "medium tetes-tebu encer", dilakukan dengan cara menambahkan larutan sukrosa pada larutan jernih tetes-tebu yang encer (7.5% gula-pereduksi total) hingga konsentrasi yang diinginkan.

### Fermentasi asam sitrat dengan proses biak-rendam

Fermentasi satu-tahap dilakukan dalam labu Erlenmeyer 300-ml yang mengandung 50 ml medium cair. Inkubasi dikerjakan selama 7 hari pada 30°C di dalam inkubator kocok-orbital, dengan goyangan 200 putaran per-menit. Fermentasi dilakukan dengan dua replikasi, kecuali dinyatakan lain, dan disertai dengan satu set medium tanpa inokulasi sebagai kontrol.

Fermentasi dua-tahap dengan medium tetes-tebu dilakukan pada fermentor bejana-aduk, EYELA M-160, dengan kondisi fermentasi sebagai berikut: suhu 30°C, aerasi 1 volum/volum/menit, dan laju-aduk 700 putaran per-menit. Pada tahap-pertumbuhan, kapang dibiakkan pada medium tetes-tebu C yang mengandung 5% gula-pereduksi total (Tabel 1) selama 4 hari pada 30°C.

Pada akhir tahap-pertumbuhan, ke dalam biak ditambahkan larutan 60% sukrosa steril hingga konsentrasi gula-pereduksi total di dalam medium menjadi sekitar 14%. Tahap produksi asam sitrat kemudian dilakukan pada 30°C selama kurang-lebih 7 hari. Selama tahap ini, keasaman medium dijaga tetap pada tingkat pH yang diinginkan, dengan menambahkan larutan 4N NaOH atau 4N HCl secara otomatis.

### Sterilisasi

Sterilisasi dilakukan pada 121°C selama 15 menit untuk medium, atau selama 20 menit untuk alat fermentor, di dalam otoklaf.

### Pengamatan hasil percobaan

Proses fermentasi diikuti dengan cara memantau perubahan yang terjadi di dalam cairan medium, terutama untuk nilai pH, konsentrasi gula-pereduksi total, konsentrasi biomassa kapang, dan konsentrasi asam sitrat. Contoh cairan medium masing-masing disaring dengan krus gelas masir (ukuran No.3) guna memisahkan biomassa kapang dari cairan mediumnya.

Penetapan kadar biomassa dilakukan dengan jalan penimbangan setelah miselium dikeringkan semalam pada 105°C di dalam alat pengering. Biomassa terlebih dahulu dicuci berturut-turut satu kali dengan 1 volum/volum air bebas mineral, satu kali dengan 1 volum/volum larutan 0.1 mol/l NaCl [12], dan kemudian dibilas satu kali dengan 1 volum/volum air bebas mineral.

Penetapan konsentrasi gula-pereduksi total ditentukan dengan metoda Shaeffer-Somogyi dari AOAC [13], setelah dilakukan "inversi" dengan HCl [14] terhadap cairan contoh yang dianalisis.

Sedangkan penetapan konsentrasi asam sitrat dilakukan dengan metoda kromatografi cair berkemampuan tinggi (HPLC), dengan menggunakan kolom  $\mu$  Bondapak, detektor dengan indeks refraksi 8 kali, serta larutan penyangga 2% (b/v) NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2.4 - 2.8). Penetapan dilakukan pada laju alir fase-gerak (metanol) 0.5 - 1.0 ml per-menit, dengan tekanan di dalam sistem 600 - 6000 psi. Sebelum disuntikkan pada alat HPLC, cairan contoh disaring terlebih dahulu dengan filter Sepak C<sub>18</sub> dari Waters.

## HASIL DAN DISKUSI

### Fermentasi asam sitrat satu-tahap

#### Pengaruh galur kapang *Aspergillus niger* pada fermentasi asam sitrat dari tetes-tebu

Dalam penelitian ini telah dilakukan pemilihan terhadap 8 buah galur *Aspergillus niger*, yang didasarkan pada hasil asam sitrat dan efisiensi pembentukannya: yaitu Y<sub>p</sub> (produksi asam sitrat per-unit gula-pereduksi total yang dikonsumsi, g/g); % konversi (produksi asam sitrat per-unit glukosa yang dikonsumsi, mol/mol x 100%); dP/X (produksi asam sitrat per-unit biomassa kapang, mg/g).



Tabel 2. Hasil fermentasi asam sitrat satu-tahap dari tetes-tebu (medium tetes-tebu A), dengan galur *Aspergillus niger*

Galur kapang <i>Aspergillus niger</i>	Konsumsi gula-pereduksi (g/l)	Produksi biomassa (g/l)	Produksi asam sitrat (g/l)	Efisiensi produksi asam sitrat		
				$Y_p$	dP/X	%-Konversi
ATCC 1015	92.85	45.060	6.661	0.072	147.8	6.15
ATCC 9142	96.96	47.110	9.047	0.093	192.0	8.00
ATCC 10577	112.75	45.040	1.790	0.017	39.7	8.00
ATCC 11414	89.45	53.630	9.245	0.103	172.4	8.86
ATCC 12846	57.00	37.660	0.094	0.002	2.5	0.15
ATCC 13794	62.40	21.835	0.099	0.002	4.5	0.14
ATCC 26550	111.85	31.385	3.281	0.029	104.5	2.52
Galur Co	105.65	34.665	2.088	0.020	60.2	1.69

**Keterangan:**

- 1) Data merupakan nilai rata-rata hasil dari percobaan fermentasi dengan 2 replikasi, pada 30°C selama 7 hari;
- 2)  $Y_p$ , adalah produksi asam sitrat per-unit gula-pereduksi total yang dikonsumsi (g/g); % konversi, adalah produksi asam sitrat per-unit gula-pereduksi total (sebagai glukosa) yang dikonsumsi (mol/mol x 100%); dP/X, adalah produksi asam sitrat per-unit biomassa kapang (mg/g).

Hasil pada Tabel 2 memperlihatkan bahwa fermentasi asam sitrat secara biak-rendam pada medium tetes-tebu A memberikan hasil asam sitrat (0.1 - 9.3 g/l) dan konversi (0.1 - 8.9%) yang bervariasi, tergantung galur *Aspergillus niger* yang dipakai.

Didapatkan bahwa *Aspergillus niger* ATCC 11414 memberikan hasil asam sitrat yang tertinggi, yaitu 9.3 g/l dengan tingkat konversi 8.9%. Disusul kemudian oleh *Aspergillus niger* ATCC 9142 yang memberikan hasil asam sitrat 9.1 g/l, dengan tingkat konversi 8.0%.

Demikian pula, *Aspergillus niger* ATCC 11414 memberikan koefisien hasil asam sitrat yang tertinggi ( $Y_p = 0.103$  g/g) daripada yang diberikan oleh *Aspergillus niger* ATCC 9142 ( $Y_p = 0.093$  g/g) ataupun oleh galur lainnya yang diuji ( $Y_p = 0.002 - 0.072$  g/g). Akan tetapi karena *Aspergillus niger* ATCC 11414 membentuk biomassa yang lebih banyak, galur ini memberikan produksi asam sitrat spesifik yang sedikit lebih rendah (172.4 mg/g) daripada kapang *Aspergillus niger* ATCC 9142 (192.0 mg/g).

Berdasarkan keempat indikator hasil asam sitrat tersebut diatas, dapat disimpulkan bahwa *Aspergillus niger* ATCC 11414 merupakan galur terbaik sebagai penghasil asam sitrat untuk fermentasi asam sitrat secara biak-rendam, dibandingkan 7 buah galur lainnya yang diuji.

Galur *Aspergillus niger* mempunyai karakteristik yang berbeda satu dengan lainnya, baik dalam morfologi, sifat biokimia maupun dalam kemampuannya untuk memproduksi asam sitrat [15, 9, 16]. Perlman [17] yang telah meneliti 75 galur *Aspergillus niger* melaporkan adanya variasi diantara mereka di dalam kemampuannya untuk memproduksi asam sitrat secara biak-rendam.

Kemampuan untuk memproduksi asam sitrat sangat spesifik sifatnya [10]. Cochrane [18] menyatakan bahwa untuk spesies

yang sama, permeabilitas sel dan kondisi lingkungan merupakan dua faktor yang sangat berpengaruh pada respirasi kapang. Jika laju-pertukaran material diantara sel dan lingkungannya merupakan faktor yang sangat berpengaruh dalam akumulasi asam sitrat, maka perbedaan kemampuan galur dalam memproduksi asam sitrat mungkin lebih disebabkan oleh perbedaan mereka di dalam permeabilitas membran sel daripada aktivitas enzimatisnya.

Hasil pada Tabel 2 menunjukkan bahwa komposisi medium tetes-tebu A tidak optimum untuk produksi asam sitrat. Oleh karena itu medium tetes-tebu B yang mempunyai kandungan fosfor lebih rendah (0.07 g/l  $KH_2PO_4$ ) kemudian dicoba pada tahap-penelitian selanjutnya, dengan menggunakan galur kapang yang terpilih (*Aspergillus niger* ATCC 11414).

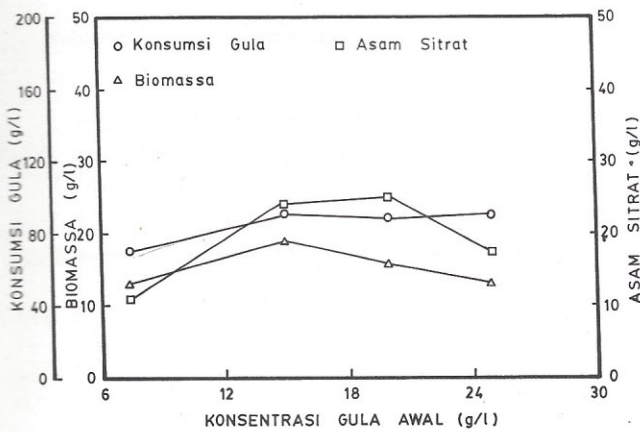
**Pengaruh konsentrasi awal gula-pereduksi total pada fermentasi asam sitrat**

Hasil penelitian dengan medium tetes-tebu B menunjukkan bahwa konsentrasi awal gula-pereduksi total dan pH awal medium keduanya mempunyai pengaruh yang besar pada fermentasi asam sitrat secara biak-rendam.

Hasil fermentasi dengan medium tetes-tebu B (Gambar 1 dan Tabel 3) mengungkapkan bahwa konsentrasi awal gula-pereduksi total 15 - 20% adalah optimum untuk produksi asam sitrat oleh *Aspergillus niger* ATCC 11414. Hasil ini sesuai dengan kepustakaan [16, 19, 10, 20, 15, 21, 22] yang menyatakan bahwa konsentrasi glukosa atau sukrosa yang tinggi (14 - 20%) diperlukan untuk memperoleh produksi asam sitrat yang optimal.

Pengaruh positif konsentrasi glukosa awal yang tinggi pada akumulasi asam sitrat mungkin berkaitan dengan adanya distorsi metabolisme di dalam *Aspergillus niger* [23]. Represi katabolit [23] diduga tidak terlibat pada mekanisme stimulasi





Gambar 1. Pengaruh konsentrasi awal gula-pereduksi total pada hasil fermentasi asam sitrat satu-tahap dari tetes-tebu, dengan menggunakan kapang *Aspergillus niger* ATCC 11414. (Yang dimaksud "gula" dalam hal ini adalah gula-pereduksi total)

akumulasi asam sitrat oleh kapang tersebut [16]. Hossain [24] melaporkan bahwa aktivitas piruvat karboksilase yang mengatalisis pembentukan oksalo-asetat (prekursor asam sitrat) di dalam *Aspergillus niger* meningkat dengan meningkatnya konsentrasi glukosa di dalam medium. Pentingnya fiksasi CO<sub>2</sub> tersebut oleh kapang *Aspergillus niger* dalam produksi asam sitrat juga telah dilaporkan oleh Cleland and Johnson [26].

Dalam hal penggunaan tetes-tebu, bahan substrat yang kaya karbohidrat ini perlu diencerkan (sekitar 2.5 - 3.5 kali) untuk memperoleh konsentrasi awal gula-pereduksi total sekitar 15% di dalam medium (medium tetes-tebu pekat), kecuali apabila

dilakukan pembubuhan glukosa atau sukrosa (medium tetes-tebu encer).

Sebagaimana ditunjukkan oleh hasil yang tertera pada Tabel 3, pada konsentrasi gula-pereduksi total menjadi lebih dari 15% di dalam medium tetes-tebu pekat, menyebabkan pertumbuhan kapang menjadi subur dengan hasil asam sitrat yang rendah. Sedangkan dalam medium tetes-tebu encer, pertumbuhan kapang tidak subur tetapi hasil asam sitratnya tinggi.

Hal ini mungkin disebabkan oleh tercegahnya kapasitas bufer [27], maupun konsentrasi elemen-runut dan inhibitor lainnya [4] di dalam medium untuk turun ke tingkat yang dapat ditoleransi oleh *Aspergillus niger* ATCC 11414 agar menghasilkan asam sitrat yang tinggi.

Pada kondisi percobaan yang digunakan, produksi optimum untuk asam sitrat adalah 21.5 dalam medium tetes-tebu pekat dengan tingkat konsentrasi 20.5%, dan 25.1% dalam medium tetes-tebu encer dengan tingkat konversi 24.2%.

#### Pengaruh pH medium pada fermentasi asam sitrat

Gambar 2 memperlihatkan bahwa proses fermentasi asam sitrat satu-tahap dari tetes-tebu dengan labu kocok memberikan pH awal medium yang optimum sekitar 4.0 - 4.5.

Pada pH optimum tersebut diperoleh hasil asam sitrat 25.5 - 26.5 g/l (Tabel 4), dengan tingkat konversi sekitar 20.0%, koefisien hasil asam sitrat (Y<sub>p</sub>) 0.23 g/g, dan produksi asam sitrat spesifik (dP/X) 1.3 g/g. Pada pH awal medium di bawah 3.0 tidak terjadi pertumbuhan maupun produksi asam sitrat oleh *Aspergillus niger* ATCC 11414.

Hasil yang diperoleh ini tidak sesuai dengan kepustakaan [15, 16, 21] yang menyatakan bahwa hasil asam sitrat yang

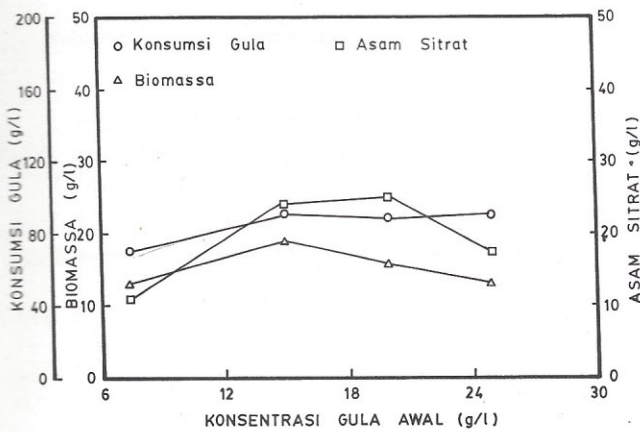
Tabel 3 Pengaruh konsentrasi awal gula-pereduksi total pada hasil fermentasi asam sitrat satu-tahap dari tetes-tebu (medium tetes-tebu B), dengan *Aspergillus niger* ATCC 11414

Konsentrasi awal gula-pereduksi total	Gula-pereduksi total (g/l)			Produksi biomassa (g/l)	Produksi asam sitrat (g/l)	Efisiensi produksi asam sitrat		
	Awal	Tersisa	Terpakai			Y <sub>p</sub>	dP/X	%-Konversi
7.5 % B <sub>1</sub>	76.59	5.91	70.59	12.978	10.997	0.138	850.0	13.36
15% B <sub>1</sub>	161.40	70.22	91.18	15.693	21.447	0.235	1366.7	20.17
	161.41	69.90	91.51	18.923	24.220	0.265	1280.1	22.69
20.0 % B <sub>1</sub>	216.30	102.93	113.37	29.828	7.473	0.066	250.5	5.65
	207.01	118.21	88.80	15.793	25.052	0.282	1586.3	24.19
25.0 % B <sub>1</sub>	246.02	89.43	156.59	27.241	7.091	0.045	260.3	3.83
	263.76	172.52	91.24	13.146	17.464	0.191	1328.5	16.41

#### Keterangan:

- 1) Data merupakan nilai rata-rata hasil dari percobaan fermentasi dengan 2 replikasi, pada 30°C selama 7 hari;
- 2) B<sub>1</sub>, medium tetes-tebu pekat; B<sub>2</sub>, medium tetes-tebu encer;
- 3) Y<sub>p</sub>, adalah produksi asam sitrat per-unit gula-pereduksi total yang dikonsumsi (g/g); % konversi, adalah produksi asam sitrat per-unit gula-pereduksi total (sebagai glukosa) yang dikonsumsi (mol/mol x 100%); dP/X, adalah produksi asam sitrat per-unit biomassa kapang (mg/g).





Gambar 1. Pengaruh konsentrasi awal gula-pereduksi total pada hasil fermentasi asam sitrat satu-tahap dari tetes-tebu, dengan menggunakan kapang *Aspergillus niger* ATCC 11414. (Yang dimaksud "gula" dalam hal ini adalah gula-pereduksi total)

akumulasi asam sitrat oleh kapang tersebut [16]. Hossain [24] melaporkan bahwa aktivitas piruvat karboksilase yang mengatalisis pembentukan oksalo-asetat (prekursor asam sitrat) di dalam *Aspergillus niger* meningkat dengan meningkatnya konsentrasi glukosa di dalam medium. Pentingnya fiksasi CO<sub>2</sub> tersebut oleh kapang *Aspergillus niger* dalam produksi asam sitrat juga telah dilaporkan oleh Cleland and Johnson [26].

Dalam hal penggunaan tetes-tebu, bahan substrat yang kaya karbohidrat ini perlu diencerkan (sekitar 2.5 - 3.5 kali) untuk memperoleh konsentrasi awal gula-pereduksi total sekitar 15% di dalam medium (medium tetes-tebu pekat), kecuali apabila

dilakukan pembubuhan glukosa atau sukrosa (medium tetes-tebu encer).

Sebagaimana ditunjukkan oleh hasil yang tertera pada Tabel 3, pada konsentrasi gula-pereduksi total menjadi lebih dari 15% di dalam medium tetes-tebu pekat, menyebabkan pertumbuhan kapang menjadi subur dengan hasil asam sitrat yang rendah. Sedangkan dalam medium tetes-tebu encer, pertumbuhan kapang tidak subur tetapi hasil asam sitratnya tinggi.

Hal ini mungkin disebabkan oleh tercegahnya kapasitas bufer [27], maupun konsentrasi elemen-runut dan inhibitor lainnya [4] di dalam medium untuk turun ke tingkat yang dapat ditoleransi oleh *Aspergillus niger* ATCC 11414 agar menghasilkan asam sitrat yang tinggi.

Pada kondisi percobaan yang digunakan, produksi optimum untuk asam sitrat adalah 21.5 dalam medium tetes-tebu pekat dengan tingkat konsentrasi 20.5%, dan 25.1% dalam medium tetes-tebu encer dengan tingkat konversi 24.2%.

#### Pengaruh pH medium pada fermentasi asam sitrat

Gambar 2 memperlihatkan bahwa proses fermentasi asam sitrat satu-tahap dari tetes-tebu dengan labu kocok memberikan pH awal medium yang optimum sekitar 4.0 - 4.5.

Pada pH optimum tersebut diperoleh hasil asam sitrat 25.5 - 26.5 g/l (Tabel 4), dengan tingkat konversi sekitar 20.0%, koefisien hasil asam sitrat (Y<sub>p</sub>) 0.23 g/g, dan produksi asam sitrat spesifik (dP/X) 1.3 g/g. Pada pH awal medium di bawah 3.0 tidak terjadi pertumbuhan maupun produksi asam sitrat oleh *Aspergillus niger* ATCC 11414.

Hasil yang diperoleh ini tidak sesuai dengan kepustakaan [15, 16, 21] yang menyatakan bahwa hasil asam sitrat yang

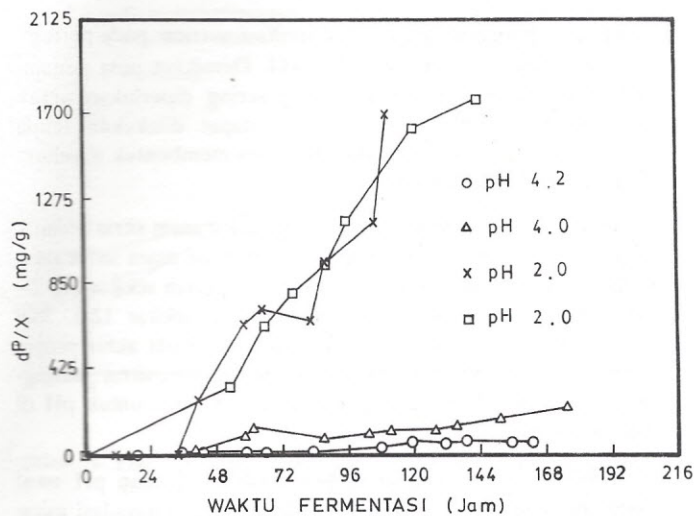
Tabel 3 Pengaruh konsentrasi awal gula-pereduksi total pada hasil fermentasi asam sitrat satu-tahap dari tetes-tebu (medium tetes-tebu B), dengan *Aspergillus niger* ATCC 11414

Konsentrasi awal gula-pereduksi total	Gula-pereduksi total (g/l)			Produksi biomassa (g/l)	Produksi asam sitrat (g/l)	Efisiensi produksi asam sitrat		
	Awal	Tersisa	Terpakai			Y <sub>p</sub>	dP/X	%-Konversi
7.5 % B <sub>1</sub>	76.59	5.91	70.59	12.978	10.997	0.138	850.0	13.36
15% B <sub>1</sub>	161.40	70.22	91.18	15.693	21.447	0.235	1366.7	20.17
	161.41	69.90	91.51	18.923	24.220	0.265	1280.1	22.69
20.0 % B <sub>1</sub>	216.30	102.93	113.37	29.828	7.473	0.066	250.5	5.65
	207.01	118.21	88.80	15.793	25.052	0.282	1586.3	24.19
25.0 % B <sub>1</sub>	246.02	89.43	156.59	27.241	7.091	0.045	260.3	3.83
	263.76	172.52	91.24	13.146	17.464	0.191	1328.5	16.41

#### Keterangan:

- 1) Data merupakan nilai rata-rata hasil dari percobaan fermentasi dengan 2 replikasi, pada 30°C selama 7 hari;
- 2) B<sub>1</sub>, medium tetes-tebu pekat; B<sub>2</sub>, medium tetes-tebu encer;
- 3) Y<sub>p</sub>, adalah produksi asam sitrat per-unit gula-pereduksi total yang dikonsumsi (g/g); % konversi, adalah produksi asam sitrat per-unit gula-pereduksi total (sebagai glukosa) yang dikonsumsi (mol/mol x 100%); dP/X, adalah produksi asam sitrat per-unit biomassa kapang (mg/g).





Gambar 3. Produksi spesifik asam sitrat selama tahap produksi dalam fermentasi asam sitrat dua-tahap, dari tetes-tebu pada pH medium yang berbeda. dP/X, produksi asam sitrat per-unit biomassa kapang (mg/g).

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa fermentasi dengan proses dua-tahap merupakan alternatif yang potensial untuk produksi asam sitrat. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang kedua hal tersebut diatas.

## KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tetes-tebu dapat digunakan sebagai substrat untuk produksi asam sitrat dengan proses fermentasi. Didapatkan bahwa strain kapang, konsentrasi gula-pereduksi total, dan pH medium mempengaruhi proses fermentasi asam sitrat dengan *Aspergillus niger*.

*Aspergillus niger* ATC 11414 merupakan galur terbaik untuk produksi asam sitrat secara fermentasi biak-rendam. Konsentrasi awal gula-pereduksi total (15 - 20%) dan pH medium yang rendah (kurang dari 3.0) adalah optimum untuk akumulasi asam sitrat oleh *Aspergillus niger* ATCC 11414.

Hasil penelitian ini juga menunjukkan keuntungan penerapan limitasi nutrien dalam merangsang akumulasi asam sitrat, dan fermentasi dua-tahap sebagai alternatif yang potensial untuk produksi asam sitrat.

## DAFTAR PUSTAKA

- Milono Poesponegoro, Disertasi untuk Doktor, ITB (1990).
- Paturau, J.M. "By-products of the cane sugar industry", Elsevier Publ. Co., London, 1969, Chapter 12
- Milono P., T. Soefyan, A.T.A. Karossi, A. Syahrul, D.S. Sinia, L.S. Broto, Sumarsono dan I. Bambang, "Potensi dan pemanfaatan tetes di Indonesia", Lembaga Kimia Nasional-LIPI, Bandung, 1984.

- Kundu, S., T. Panda, S.K. Majumdar, B. Guha and K.K. Bandyopadhyay, "Pretreatment of Indian cane molasses for increased production of citric acid", *Biotech. Bioeng.*, 26 : 1114 - 1121 (1984).
- Millis, N.F., B.H. Trumpy and M. Palmer, "The effect of lipids on citric acid production by an *Aspergillus niger* mutant", *J. Gen. Microbiol.* 30 : 365 - 379 (1963).
- Moyer, A.J., "Effect of alcohols in the mycological production of citric acid in surface and submerged culture. II. Fermentation of crude carbohydrates", *Appl. Microbiol.* 1 : 7 - 13 (1953b).
- Nakamura, I., M. Nakayama and T. Kobayashi, "Effects of organic acids and metal ions in molasses on itaconic acid fermentation with *Aspergillus terreus* K26", *J. Ferment. Technol.* 53 : 435-442 (1975).
- Ogawa, T. and A. Fazeli, "Additive effect of ferrocyanide treatment and step change of pH on citric acid production from Iranian beet molasses with *Aspergillus niger*", *J. Ferment. Technol.* 54 : 63 - 66 (1976).
- Perlman, D. and C.J. Sih, "Fungal synthesis of citric acid, fumaric, and itaconic acids", *Progress. Ind. Microbiol.* 2 : 167 - 193 (1960).
- Kubicek, C. and M. Rohr, "Citric acid fermentation", *CRC Critical reviews in Biotech.* 3 : 331 - 374 (1968).
- American Type Culture Collection, "Catalogue of Strains", vol I, Maryland, U.S.A, 1982.
- Rohr, M., O. Zehentgruber and C.P. Kubicek, "Kinetics of biomass and citric acid production by *Aspergillus niger* on a pilot plant scale", *Biotech. Bioeng.* (1981).
- American Official of Agricultural Chemists (AOAC), "Official Methods of Analysis of The Association of Official Agricultural Chemists" (Ed. W. Horwitz), 12<sup>th</sup> ed., A.O.A.C., Washington, 1975, pp. 574-575.
- Vogel, I., "Elementary Practical Organic Chemistry", Part. 3: Quantitative Organic Analysis, 2<sup>nd</sup> ed., Longman Group Limited, London, 1958, Chapter 27.
- Prescott, S.D. and C.G. Dunn, "Industrial Microbiology", McGraw-Hill Book Inc., New York, 1959, Chapter 28.
- Berry, D.R., A.R. Chmiel, and Z. Al Obaidi, "Citric acid production by *Aspergillus niger*", In "Genetics and physiology of *Aspergillus*" (Eds. J.E. Smith, and J.A. Patten), Academic Press, London, 1977, pp. 405 - 426.
- Perlman, D., "Citric acid production by various strains of *Aspergillus niger*", *Rep. Proc. 4th. Congr. Int. Microbiol.*, 546 (1947).
- Cochrane, V.W., "Physiology of Fungi", John Wiley and Sons, Inc., New York, 1963, Chapter 6-9.
- Currie, J.N. "Citric acid fermentation", *J. Biol. Chem.* 31 : 15 - 37 (1917).
- Lockwood, L.B., "Organic acid production", in "The Filamentous Fungi", vol.1. Industrial Mycology (Eds. J.E. Smith and D.R. Berry), Edward Arnold, 1975, Chapter 8.
- Rohr, M., C.P. Kubicek, and J. Kominek, "Citric acid", in "Biotechnology" Vol.3, (Ed. H. Dellweg), Verlag-Chemie, Weinheim, 1983, Chapter 3d.
- Rose, A.H. "Chemical microbiology", 2<sup>nd</sup> Ed., Butterworths, London, 1968.
- Edwards, V.H., "The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics", *Biotech. Bioeng.* 12 : 679 - 712 (1970).
- Paigen, K. and B. Williams, "Catabolite repression and other control mechanisms in carbohydrate utilization", *Adv. Microbiol. Physiol.* 4 : 252 - 324 (1970).
- Hossain, M., J.D. Brooks and I.S. Maddox, "The effect of sugar source on citric acid production by *Aspergillus niger*", *Appl. Microbiol. Biotech.* 19 : 383 (1984).
- Cleland, W.W. and M.J. Johnson, "Tracer experiments on the mechanism of citric acid formation by *Aspergillus niger*", *J. Biol. Chem.* 208 : 679 - 689 (1954).
- Shadafza, D., T. Ogawa, T. and A. Fazeli., "Comparison of citric acid production from beet molasses and date syrup with *Aspergillus niger*", *J. Ferment. Technol.* 54 : 67 - 75 (1976).