



TESIS

PRODUKSI ASAM SITRAT DARI SUBSTRAT MOLASE
PADA PENGARUH PENAMBAHAN
VCO (VIRGIN COCONUT OIL) TERHADAP
PRODUKTIVITAS
ASPERGILLUS NIGER ITBCC L₇₄ TERIMOBILISASI

disusun oleh :

Nama : Emmanuela Maria Widyanti

Nim : L4C008006

MAGISTER TEKNIK JURUSAN TEKNIK KIMIA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2010

Kata Pengantar

Puji dan syukur kami panjatkan pada Tuhan Yang Maha Esa, atas berkat dan karunia-Nya penyusun dapat menyelesaikan Tesis ini. Penulisan Tesis merupakan salah satu persyaratan yang harus dipenuhi untuk penyelesaian Program Magister Teknik Kimia Universitas Diponegoro Semarang.

Penyusun berusaha menyajikan dengan baik sesuai kemampuan. Namun keterbatasan pengetahuan dan kemampuan, penyusun menyadari masih banyak kekurangan. Untuk itu saran dan kritik sangat diharapkan.

Dengan penuh syukur penyusun menyampaikan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Bambang Pramudono, MS. , selaku Ketua Program Magister Teknik Kimia Universitas Diponegoro Semarang.
 2. Ir. Danny Soetrisnanto, M.Eng., selaku Pembimbing I.
 3. Dr. Ir. Abdullah, MS., selaku Pembimbing II.
 4. Suami dan anak-anak yang selalu memberi dukungan.
 5. Teman-teman Jurusan Teknik Kimia Polban yang memberikan masukan.
- Akhir kata penyusun berharap Tesis ini dapat bermanfaat bagi semua pihak

Semarang, Agustus 2010

Penyusun

ABSTRAK

Asam sitrat merupakan produk tambahan makanan yang sangat dibutuhkan, sesuai pengembangan industri makanan. Proses pembuatan secara batch, *fed-batch*, kontinyu dan semi kontinyu, dengan memanfaatkan mikroba. Penelitian dilakukan dengan mempergunakan *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ yang diimobilisasi dalam kolom imobilisasi, untuk mendapatkan produk dengan kemurnian tinggi. Media fermentasi menggunakan molase yang merupakan *by product* industri gula, karena kandungan gula masih cukup tinggi. Karakteristik molase dianalisis untuk mengetahui komposisinya, didapatkan dalam molase terdapat kandungan MgO, Fe, Mn, dan Zn masing-masing 0,37 %, 226 ppm, 31 ppm, dan 10 ppm, sedang kadar gula total sebesar 43,98 %, dan pH 5,6. Produktivitas sel akan meningkatkan hasil, maka ditentukan waktu optimum pertumbuhan sel, sehingga jumlah spora mencapai 10^5 - 10^8 /ml media, yang didapatkan pada 7 hari inokulasi dalam media PDA. Dalam media PDB dan molase waktu pertumbuhan fase eksponensial dicapai selama 1 hari 12 jam dan 1 hari 16,5 jam. Produktivitas sel pada waktu pertumbuhan optimum memberikan hasil yang baik, dilihat dari jumlah spora pada hari ke 7 mencapai $14,7 \times 10^7$ spora / ml media, selanjutnya kondisi ini digunakan untuk memproduksi asam sitrat, didapatkan pada hari ke 7 produksi asam total mencapai 0,166098 N dengan asam sitrat 0,0029 N (1,7415 %) dan yield sebesar 17,65 %, penurunan pH mencapai 3,94 dan berat sel kering 0,5041 gam/ml. Penurunan kadar gula 16,25 % - 8,44 %. Kenaikan berat sel kering menunjukkan adanya aktivitas sel. Untuk menaikkan kadar asam total dilakukan penambahan suplemen VCO, karena lemak dapat meningkatkan produktivitas. Dari variasi penambahan VCO (*Virgin Coconut Oil*) 0, 1, 2, 3, 4 % (v/v), kenaikan tertinggi didapatkan pada penambahan 3 % (v/v), . Data-data yang didapatkan pada proses batch, selanjutnya digunakan untuk kondisi sel terimobilisasi proses semi kontinyu. Produk asam total pada hari ke 21 mengalami peningkatan, dari 0,11326 N, dengan jumlah asam sitrat terkandung 6,82 % atau 0,00773 N dan yield sebesar 23,52 % tanpa penambahan VCO 3% menjadi 0,1298 N atau 0,0092 N (7,11 %) dan yield sebesar 28,02 % dengan penambahan VCO 3 % (v/v) .

ABSTRACT

Citric acid needed is food additive in food industry development. Processed of citric acid is batch, fed-batch, semi continue and continue made use of microorganism. The research was used immobilized *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ in immobilized column to obtained high pure product. Fermentation medium is molasses which by product sugar industry, because sugar content in molasses is higher. Characteristic of molasses was analyzed to be known MgO, Fe, Mn and Zn content. The content were approximately 0,37%, 226 ppm, 31 ppm and 10 ppm, content of sugar is 43,98 % and pH 5,6. Productivity of cell will be incread product, and then to be determined to grow of optimum time is fine product with total spora on seven days reached $14,7 \times 10^7$ spora/ml medium, with total acid reached 0,16609 N and citric acid content is 0,0029 N (1,7415 %) and yield 17,65 %, pH 3,94 and biomass 0,5041 gr/ml and sugar content is 8,44 %. Increasing of biomass showed of activity cell. To be increasing total acid content was added suplemen VCO, because fat can be increased productivity. Variation of added VCO 0, 1, 2, 3, 4 %, the greatest of total acid is increased 3 % (v/v) VCO reached 100 %. Datas on batch process to be made for immobilized cell on semi-continue process. Total acid product on 21th is 0,11326 N with total acid 0,00773 N (6,82 %) and yield 23,52 % with increased 3 % (v/v) VCO total acid is 0,1298 N with total acid 0,0092 N (7,11 %) and yield 28,02 %.

DAFTAR ISI

	Hal
Kata Pengantar	i
Abstrak	ii
Daftar Isi	iii
Daftar Tabel	v
Daftar Gambar	vi
Daftar Lampiran	viii
Bab I	
Pendahuluan :	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Identifikasi Masalah	6
1.3 Perumusan Masalah	7
1.4 Tujuan Penelitian	8
1.5 Manfaat Penelitian	8
Bab II	
Tinjauan Pustaka :	10
2.1 Molase Sebagai Bahan Baku Pembuatan Asam Sitrat	10
2.2 Pemanfaatan Molase	10
2.3 Manfaat Asam Sitrat	11
2.4 Pembuatan Asam Sitrat Dengan Proses Fermentasi	11
2.5 Proses Produksi Asam Sitrat	16
2.6 Metode Produksi	16
2.7 Imobilisasi Sel	18
Bab III	
Metode Penelitian	23
3.1 Kerangka Percobaan	23
3.2 Peralatan Yang Digunakan	24
3.3 Bahan Yang Digunakan	25
3.4 Diagram Perancangan Proses	25
3.5 Prosedur Percobaan	30
BAB IV	
Hasil dan Pembahasan	35

	4.1 Analisis dan Penentuan Karakteristik dari Molase	35
	4.2 Penentuan Jumlah Spora <i>A. niger ITBCC L₇₄</i>	37
	4.3 Penentuan Waktu Pertumbuhan <i>A. niger ITBCC L₇₄</i> dalam media PDB	38
	4.4 Penentuan Waktu Pertumbuhan <i>A. niger ITBCC L₇₄</i> dalam media molase	40
	4.5 Kurva Produksi Asam sitrat pada t_7 dalam media molase	42
	4.6 Pengaruh Penambahan Suplemen terhadap Produksi Asam sitrat	46
	4.7 Produksi Asam total maksimum <i>A.niger ITB CC L₇₄</i> Sel Terimobilisasi dengan proses batch	48
	4.8 Proses Produksi Asam sitrat pada Sel Terimobilisasi dan Proses Semi Kontinyu	50
	4.9 Hasil Analisis Produksi Asam sitrat Secara Batch Dan Semi Kontinyu	51
BAB V	Kesimpulan dan Saran	52
	5.1 Kesimpulan	52
	5.2 Saran	53
BAB VI	Ringkasan	54
	Daftar Pustaka	55
	Lampiran	

DAFTAR TABEL

		Hal
Tabel 1.1	Komposisi Molase	2
Tabel 2.1	Bahan Support Sitis	18
Tabel 3.1	Bahan-bahan Yang Digunakan	25
Tabel 3.2	Matrik Percobaan pada Tahap Persiapan : penentuan kurva pertumbuhan optimum	28
Tabel 3.3	Matrik Percobaan pada Tahap Persiapan : penentuan waktu produksi t_{56}	28
Tabel 3.4	Matrik Percobaan pada Tahap Pelaksanaan : penentuan produksi asam sitrat pada t_{56}	28
Tabel 3.5	Matrik perbandingan produksi asam sitrat pada penambahan <i>VCO</i> dan <i>olive oil</i>	29
Tabel 3.6	Matrik Percobaan pada Proses Kontinyu dengan Sel Imobilisasi	29
Tabel 4.1	Hasil Analisis Molase untuk pH dan Unsur Kelumit	36
Tabel 4.2	Hasil Pengujian Kadar Gula dalam Molase	36
Tabel 4.3	Hasil Analisis Yield Asam Sitrat pada Variasi Penambahan VCO	46
Tabel 4.4	Perbandingan Hasil Analisis Yield Asam Sitrat pada Proses Batch dan Semi Kontinyu	51

DAFTAR GAMBAR

		Hal
Gambar 2.1	Diagram <i>Aspergillus</i> William Williams Co.Bo	14
Gambar 2.2	Morfologi <i>Aspergillus niger</i>	15
Gambar 2.3	Gambaran Umum Proses Pernafasan Keseluruhan	17
Gambar 2.4	Daur Asam Trikarboksilat (Krebs) sebagai Bagian Utama Penghasil Metabolisme Energi	17
Gambar 3.1	Diagram Alir Percobaan pada Tahap Persiapan	27
Gambar 3.2	Diagram Alir Percobaan pada Tahap Pelaksanaan	27
Gambar 3.3	Rangkaian Peralatan Pada Proses Imobilisasi <i>Aspergillus niger L74</i>	34
Gambar 3.2	Spesifikasi Bioreaktor Pembentuk Asam Sitrat	35
Gambar 4.1	Kurva Pertumbuhan <i>Aspergillus niger ITBCC L74</i> dalam PDA terhadap waktu	37
Gambar 4.2	Spora <i>Aspergillus niger ITBCC L74</i> dari mikroskop	38
Gambar 4.3	Kurva Pertumbuhan <i>Aspergillus niger ITBCC L74</i> dalam PDB terhadap waktu	39
Gambar 4.4	Kurva Pertumbuhan <i>Aspergillus niger ITBCC L74</i> dalam media molase terhadap waktu (<i>shake flash-technique</i>)	40
Gambar 4.5	Kurva Pertumbuhan <i>Aspergillus niger ITBCC L74</i> dalam media molase terhadap waktu (<i>aeration vessel</i>)	42
Gambar 4.6	Kurva Produksi Asam total dan Berat sel kering Terhadap Waktu	43
Gambar 4.7	Kurva Produksi Asam total dan pH terhadap waktu	43
Gambar 4.8	Kurva Produksi Asam total dan Penurunan Kadar gula terhadap waktu	44
Gambar 4.9	Kurva Asam total, Berat sel kering, pH dan Penurunan Kadar gula terhadap waktu	45

Gambar 4.10	Kurva Produksi Asam pada penambahan Suplemen	47
Gambar 4.11	Kurva Produksi Asam total maksimum pada <i>Aspergillus niger</i> ITBCC L ₇₄ sel terimobilisasi dengan proses batch	48
Gambar 4.12	Kurva Produksi Asam total dan pH terhadap waktu	49
Gambar 4.13	Kurva Produksi Asam total tanpa dan dengan Penambahan VCO	50

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A : Data-data Pengamatan

Lampiran B : Hasil Analisis

Lampiran C : Gambar Peralatan

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Pemanfaatan asam sitrat di industri cukup besar, dengan persentase sebagai berikut : industri makanan dan minuman sekitar 70 %, industri farmasi 12 %, dan sisanya 18 % digunakan pada berbagai industri. Besarnya pemanfaatan asam sitrat pada industri makanan dan minuman karena sifat asam sitrat menguntungkan dalam pencampuran, yaitu kelarutan relatif tinggi, tak beracun dan menghasilkan rasa asam yang disukai. Kegunaan lain, yaitu sebagai pengawet, pencegah kerusakan warna dan aroma, menjaga turbiditas, penghambat oksidasi, penginvert sukrosa, penghasil warna gelap pada kembang gula, jam dan jelly, pengatur pH (Sumo dkk., 1993).

Pemanfaatan yang cukup besar tersebut mendorong peneliti melakukan berbagai percobaan untuk mendapatkan hasil yang menguntungkan, seperti percobaan yang dilakukan pada dua dasa warsa terakhir pada pemanfaatan mikroorganisme, dengan cara mengambil enzim yang terdapat dalam mikroorganisme tersebut (Sumo dkk., 1993) untuk mencapai produktivitas tinggi dengan pemilihan proses yang sesuai, kondisi operasi, dan penambahan nutrisi.

Pemilihan bahan baku juga perlu dilakukan, sehingga secara ekonomi akan menguntungkan, salah satu pertimbangan yaitu dengan pemanfaatan molase, mengingat molase masih mempunyai kandungan gula tinggi (Dellweg, 1983). Sebagai bahan baku yang dapat digunakan untuk memproduksi bahan lain yang mempunyai nilai ekonomi lebih tinggi, maka perlu diketahui karakteristik dari molase, sehingga dapat memenuhi kualitas yang sesuai

Tabel. 1.1. Komposisi molase (Dellweg, 1983) :

Komponen	Analisa	%
Air	Gravimetri	20
Senyawa organik		
Gula :		
Sakarosa	Somoghi – Nelson	32
Glukosa	Somoghi – Nelson	14
Fruktosa	Somoghi – Nelson	16
Senyawa nitrogen	Kjeldahl	10
Senyawa anorganik		
SiO ₂	Titrimetri	0,5
K ₂ O	Titrimetri	3,5
CaO	Titrimetri	1,5
MgO	Titrimetri	0,1
P ₂ O ₅	Titrimetri	0,2
Na ₂ O	Titrimetri	-
Fe ₂ O ₃	Titrimetri	0,2
Al ₂ O ₃	Titrimetri	-
Residu soda dan karbonat (sebagai CO ₂)		1,6 0,4
Residu sulfat (sebagai SO ₃)		

Disamping itu Indonesia merupakan salah satu negara dengan produksi gula tinggi, dan jumlah molase di Indonesia mencapai 1,3 juta ton/ tahun, yang akan mengalami peningkatan sampai 1,8 juta ton/tahun dengan dihidupkannya kembali pabrik-pabrik gula (Associataed Corporate Secretary, PT Perkebunan Nusantara XI). Meskipun saat ini kebutuhan molase cukup besar, yaitu digunakan di industri alkohol, MSG, dan penggunaan gasohol, tetapi potensi produksi asam sitrat dari molase juga perlu diperhitungkan.

Produksi asam sitrat naik dengan penambahan nutrisi, karena akan meningkatkan metabolisme sel yang menyebabkan aktivitas sel bertambah, sehingga produksi asam sitrat meningkat.

Salah satu penelitian yang dilakukan untuk memproduksi asam sitrat adalah dengan melakukan isolasi sel untuk menggantikan organisme penghasil produk dalam fermentasi. Penggunaan sel dalam proses fermentasi sebagai molekul bebas dan terlarut dalam air, kurang menguntungkan, karena sel hanya dapat digunakan untuk satu kali reaksi dan sel tersebut sulit dipisahkan dari produk dan substrat (Sumo dkk., 1993). Dengan sel terimobilisasi pemakaian sel mudah ditangani, aktivitas dan peningkatan spesifitas katalis dapat diatur, juga sel tersebut dapat dipakai berulang dan mudah dipisahkan. Proses dapat dilakukan secara *batch*, *fed-batch*, *repeated batch*, *semi continue* maupun *continue*. Dengan cara tersebut keuntungan yang didapat lebih besar (Sa'id, 1987).

Sel terimobilisasi adalah suatu sel yang dilekatkan pada suatu bahan inert dan tidak larut dalam bahan tersebut, misal dalam sodium alginat atau kalsium alginat. Dengan sistem ini, sel dapat lebih tahan terhadap perubahan kondisi seperti pH, juga temperatur. Sistem ini juga membantu sel berada di tempat tertentu selama berlangsungnya reaksi sehingga memudahkan proses pemisahan dan memungkinkan untuk dipakai lagi di reaksi lain (Sumo dkk., 1993).

Imobilisasi sel berkembang setelah imobilisasi enzim, tetapi dalam teknologi terdapat hambatan pada regenerasi koenzim dan keterbatasan metode yang dapat diterapkan untuk menyusun molekul enzim dalam rangkaian tertentu, sehingga dapat melakukan tahapan reaksi katalitis enzim yang berkesinambungan. Untuk mencegah hambatan tersebut dilakukan penelitian-penelitian, sehingga terjadi pengembangan pada imobilisasi sel, yang dapat digunakan sebagai biokatalis. Hal ini memungkinkan untuk melakukan imobilisasi seluruh sel dan menjaga sel tetap hidup (*viabel*). Dalam prakteknya metode yang digunakan adalah menjebak sel dalam gel dengan adsorpsi, pengontrolan perlu dilakukan untuk mencegah inaktivasi dari aktivitas metabolisme

yang penting, sehingga pemisahan biokatalis dari produk lebih mudah dan membuat biokatalis lebih stabil (Sumo dkk., 1993).

Berdasarkan keadaan tersebut, banyak penelitian dilakukan untuk mendapatkan asam sitrat dengan kualitas baik dan rendemen tinggi, juga dilakukan penelitian dengan penambahan bahan yang dapat meningkatkan kualitas asam sitrat, penambahan nutrisi, pengaturan kondisi operasi.

Penelitian yang dilakukan oleh Millis dkk. (1963) tentang pengaruh beberapa jenis lemak yang ditambahkan pada substrat dengan volume tidak sama, berpengaruh pada produksi asam sitrat, tergantung dari sifat lemak tersebut dalam kandungan asam lemak jenuh dan tidak jenuh, pengaruh fisik, sumber enzim, hydrogen aseptor.

Sankpal dkk. (2001) melakukan penelitian untuk mengetahui produktivitas produk asam sitrat secara imobilisasi dengan menggunakan proses batch dalam recycle reaktor dan botol goyang yang dilakukan pada fermentasi secara kontinyu, untuk kondisi pengontrolan pada kultivasi menggunakan udara kaya oksigen sehingga dihasilkan asam sitrat dalam waktu 26 hari.

Adham (2001) dalam penelitiannya, melakukan penambahan nutrisi untuk menaikkan pembentukan asam sitrat, berupa minyak almond, caster, maize, nigella, olive, peanut, soybean, sunflower sebanyak 2 – 4 % yang ditambahkan pada *Aspergillus niger*, terjadi kenaikan yield asam sitrat dalam waktu 12 hari.

Peneliti lain, Ali (2002), membahas tentang : proses fermentasi *submerged* (terendam) pada molase menggunakan *Aspergillus niger* secara batch dengan menggunakan parameter proses fermentasi, meliputi : laju oksigen, pH, temperatur inkubasi yang digunakan pada bahan baku molase dengan kadar 15 % dan proses dijalankan dalam 144 jam, dalam penelitian dilakukan pengontrolan *trace mineral* yang ada, didapatkan asam sitrat maximum mencapai $99,56 \pm 3,5$ g/l.

Penelitian terus dilakukan dengan topik yang bervariasi untuk mendapatkan produktivitas yang tinggi, seperti penelitian dengan menggunakan *stock culture* *Aspergillus niger* dengan proses fermentasi selama 144 jam secara kontinyu

menggunakan tower reaktor pada yeast yang diisolasi (Viegas dkk., 2002). Variabel yang digunakan meliputi : penurunan total gula, konsentrasi feeding, *recycle flow*, waktu tinggal dan perbandingan diameter/tinggi reaktor, dari 19 percobaan setelah dilakukan pengukuran hasil yang meliputi : konsentrasi total penurunan gula dalam feeding dan waktu tinggal dalam reaktor, ternyata tidak berpengaruh pada hasil yang didapat.

Selanjutnya, Demirel dkk. (2004) melakukan penelitian untuk menaikkan produktivitas asam sitrat pada pengaruh penambahan nutrisi dalam media produksi, dengan melakukan pengaturan proses fermentasi. Penelitian yang dilakukan yaitu meliputi : pengaruh periode fermentasi, penambahan konsentrasi nitrogen, konsentrasi sukrosa, penggunaan kembali sel imobilisasi, penambahan etanol dan metanol pada produksi asam sitrat menggunakan *Aspergillus niger*, didapatkan yang berpengaruh adalah penambahan methanol dan etanol.

Penentuan kinetika produksi asam sitrat dilakukan untuk menghitung biokinetika produksi asam sitrat menggunakan *Aspergillus niger* yang dilakukan pada larutan sukrosa murni sebagai bahan baku, variabel yang digunakan meliputi : konsentrasi sukrosa, pH dan konsentrasi nutrisi. Hasil yang paling menguntungkan didapatkan pada konsentrasi sukrosa 15 % (Narayana dkk., 2006).

Penelitian yang mendasarkan bahwa produktivitas asam sitrat dipengaruhi oleh adanya mineral Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} . Didapat hasil bahwa produksi asam sitrat menggunakan *Aspergillus niger* dengan variasi penambahan konsentrasi *trace metal*, yaitu : Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} (Guilherme dkk., 2007), mempunyai laju produktivitas terus naik sampai proses fermentasi selama 10 hari, dan mengalami penurunan sampai proses fermentasi selama 20 hari.

Dari beberapa penelitian tersebut berbagai usaha dilakukan agar produktivitas asam sitrat naik, sehingga proses fermentasi terjadi dalam waktu yang cukup pendek sehingga menurunkan biaya produksi, mengingat kebutuhan asam sitrat terus meningkat sejalan perkembangan produk makanan.

Untuk mencapai produktivitas tinggi dan menguntungkan secara ekonomi, dilakukan penelitian dengan menggunakan bahan baku yang merupakan *by product*, penambahan nutrisi untuk meningkatkan metabolisme sel dan dilakukan metode imobilisasi sel.

Pemilihan molase sebagai bahan baku telah dijelaskan diatas, sedangkan penambahan nutrisi akan digunakan VCO (*Virgin Coconut Oil*), mengingat produksi VCO cukup besar dan pemanfaatan masih terbatas pada kesehatan dan ekspor, yaitu mencapai 3,4 % total produksi (Anonim, 2006), sehingga perlu ditingkatkan penggunaannya.

Tambahan suplemen diharapkan meningkatkan metabolisme sel dan menaikkan produksi asam sitrat, dengan variabel penambahan 0, 1, 2, 3, 4 % substrat (Nchad, 2001), yang dilakukan dalam pembuatan inokulum pada sel bebas dan sel terimobilisasi.

1.2. Identifikasi masalah

Berdasarkan penelitian-penelitian yang sudah ada, dilakukan variasi perubahan variabel proses dan pengaruh penambahan nutrisi untuk mempersingkat pembentukan asam sitrat, tetapi untuk mendapatkan produk dengan kemurnian tinggi yang tidak tercampur dengan biokatalis belum diperhatikan.

Salah satu cara mendapatkan kemurnian tinggi, dapat dilakukan dengan menggunakan proses imobilisasi sel, sehingga produk yang didapat mudah dipisahkan, selain pemilihan bahan baku yang mengandung gula tinggi, sebagai hal yang harus dipenuhi pada pembentukan asam sitrat, juga pengaruh kandungan *trace mineral*.

Molase, dapat digunakan sebagai bahan baku pembentuk asam sitrat, mengingat molase merupakan *by product* pabrik gula yang cukup banyak dan kandungan gula dalam molase masih cukup besar (Dellweg, 1983), disamping itu pemanfaatan saat ini hanya dalam pembuatan alkohol, MSG dan gasohol.

Selain bahan baku, dilakukan pemilihan biokatalis, yaitu *Aspergillus niger*, juga proses yang dipilih dan penambahan suplemen pada media fermentasi (Rahman, 1992). Hasil asam sitrat yang didapatkan pada penambahan suplemen VCO, dibandingkan dengan penelitian sebelumnya, yaitu pada pembentukan asam sitrat yang didapatkan dengan penambahan suplemen minyak zaitun (*olive oil*).

Pertimbangan lain, yaitu produksi asam sitrat di Indonesia masih terbatas menggunakan bahan baku onggok dengan proses fermentasi permukaan pada media padat, maka perlu dilakukan penelitian dalam produksi asam sitrat dari bahan cair dengan fermentasi terendam (*submerged*). Untuk menekan biaya dalam penggunaan biokatalis, dilakukan proses imobilisasi sel, menggunakan *Aspergillus niger* L74 yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi ITB. Bandung, sedangkan untuk meningkatkan produksi asam sitrat dilakukan penambahan suplemen, yaitu VCO yang diharapkan dapat meningkatkan dan mempercepat produksi asam sitrat.

1.3. Perumusan Masalah

Pemanfaatan minyak zaitun (*olive oil*) sebagai nutrisi untuk produksi asam sitrat telah dibuktikan, bahkan mampu meningkatkan produktivitas. Jenis minyak lain, yaitu VCO diharapkan dapat memberikan efek yang sama. Namun waktu produksi optimum dan besarnya pengaruh, kemungkinan berbeda bila dibandingkan dengan minyak zaitun (*olive oil*), karena perbedaan jumlah carbon dan komposisi asam lemak jenuh dan tidak jenuh yang berbeda. Untuk itulah perlu dilakukan penelitian produktivitas asam sitrat bila dilakukan pada proses dan kondisi operasi sama untuk mendapatkan asam sitrat.

Disamping itu, penelitian diterapkan pada proses batch dan semi kontinyu yang berbeda, dengan melakukan kajian proses semi kontinyu pada data-data operasi batch, apabila pembentukan asam sitrat tanpa penambahan suplemen dilakukan pada waktu produksi optimum.

1.4. Tujuan Penelitian

1. Menentukan waktu optimum pertumbuhan spora mencapai $10^5 - 10^8$ spora/ml.
2. Menentukan waktu produksi optimum dalam pembentukan asam sitrat dengan mempergunakan inokulum *free cell* (sel bebas) dari *Aspergillus niger ITBCC L₇₄* pada proses batch dan sel terimobilisasi pada proses batch pada kondisi operasi sama.
3. Menentukan produktivitas *Aspergillus niger ITBCC L₇₄* pada substrat molase dalam menghasilkan asam sitrat dengan menentukan berat sel kering, penurunan kadar gula dan penurunan pH.
4. Membandingkan produktivitas *Aspergillus niger ITBCC L₇₄* pada substrat molase dalam menghasilkan asam sitrat dengan kajian penambahan suplemen VCO dan *olive oil* (data sekunder) pada proses batch menggunakan inokulum sel bebas.
5. Mengkaji perilaku sel terimobilisasi dalam kolom imobilisasi berbasis pada data-data operasi batch dan sel bebas.
6. Menentukan produktivitas *Aspergillus niger ITBCC L₇₄* dengan penambahan suplemen VCO optimum pada sel terimobilisasi dalam kolom imobilisasi.

1.5. Manfaat Penelitian

Penambahan VCO sebagai suplemen diharapkan dapat mempersingkat pembentukan asam sitrat, sesuai penelitian yang dilakukan Adham (2002) pada penambahan suplemen *olive oil*. Kemungkinan adanya perbedaan produktivitas,

perlu dibandingkan dengan meneliti komposisi yang ada pada VCO dan *olive oil*. Selain itu penentuan produktivitas asam sitrat pada sel terimobilisasi dengan operasi semi kontinyu diharapkan memberikan keuntungan pada produksi secara komersial. Beberapa industri melakukan proses produksi asam sitrat secara fermentasi permukaan (*surface fermentation*) dengan bahan baku padat. Dengan metoda tersebut produktivitas bio-katalis semakin menurun sehingga perlu diganti, juga produk masih tercampur dengan bio-katalis, imobilisasi sel diharapkan menghasilkan produk yang lebih murni, selain itu penggunaan sel yang diimobilisasi diharapkan lebih tahan terhadap perubahan kondisi, seperti pH, kontaminan, goyangan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Molase Sebagai Bahan Baku Pembuatan Asam Sitrat

Molase merupakan hasil samping pembuatan gula, industri yang biasa memanfaatkan adalah pabrik alkohol dan MSG. United Molasses mendefinisikan molase sebagai “*end product*” pembuatan gula yang tidak mengandung lagi gula yang dapat dikristalkan dengan cara konvensional (United Molasses, Olbrich, 1973).

Pemilihan molase sebagai bahan baku didasarkan pada hal-hal berikut :

1. Memanfaatkan limbah industri menjadi produk yang bersifat komersial
2. Kandungan gula dalam molase masih cukup tinggi
3. Pabrik gula di Indonesia cukup banyak, sehingga limbah molase yang dikeluarkan juga banyak.
4. Produk asam sitrat yang didapatkan dalam industri menggunakan limbah padat, sehingga perlu diusahakan pembuatan asam sitrat dari bahan cair secara komersial.

Kandungan gula dalam molase pada 75 % bahan kering sebesar 62 % (Dellweg, 1983).

2.2. Pemanfaatan Molase

Molase yang merupakan *by product* yang dihasilkan dari sisa proses produksi gula, berwarna coklat dan berbentuk cairan kental. Bahan ini tidak dapat dihilangkan warnanya meskipun sudah mengalami pengenceran atau penambahan zat aditif. Sampai saat ini pemanfaatan masih terbatas pada industri alkohol dan MSG, meskipun beberapa peneliti memanfaatkan pada pembuatan gasohol, maka perlu dilakukan usaha pemanfaatan produk lain, karena penambahan pabrik-pabrik gula, diikuti peningkatan dari molase. Salah satu alternatif adalah pemanfaatan sebagai bahan baku pembuatan asam sitrat, yang perlu mengalami pelakuan awal untuk

menghilangkan logam-logam tertentu dengan menambahkan bahan kimia sebelum disterilisasi, sehingga logam-logam akan mengendap atau dapat juga dilakukan pemurnian menggunakan *cation exchange* (Rahman, 1992).

2.3 Manfaat asam sitrat

Asam sitrat merupakan salah satu asam organik yang banyak digunakan dalam industri makanan dan minuman (60 % dari total produksi), antara lain berfungsi sebagai pemberi rasa asam, antioksidan dan pengemulsi. Flavor sari buah, ekstrak sari buah, es krim, marmalade diperkuat dan diawetkan dengan menambahkan asam sitrat. Selain itu juga banyak digunakan dalam industri farmasi, kosmetik dan detergent. Dalam industri farmasi (10 % dari total produksi), digunakan sebagai bahan pengawet dalam penyimpanan darah atau sebagai sumber zat besi dalam bentuk Feri-sitrat. Dalam industri kimia (25 % dari total produksi), digunakan sebagai antibiuh dan bahan pelunak (Rahman, 1992).

2.4. Pembuatan Asam Sitrat dengan Proses Fermentasi

2.4.1. Medium yang berpengaruh

Pembentukan asam sitrat secara fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor yang dapat memberikan pengaruh pada komposisi medium, baik komponen makro maupun *trace element* yang dapat mempengaruhi proses ekskresia asam sitrat oleh mikroba. Akumulasi asam sitrat dapat terjadi apabila medium fermentasi kekurangan satu atau lebih unsur-unsur nutrient penting, antara lain dengan cara membatasi konsentrasi salah satu dari unsur-unsur P, Mn, Fe atau Zn (Crueger dan Crueger, 1984).

Kandungan gula juga merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi pembentukan asam sitrat, berdasarkan penelitian 15-25 % larutan gula dapat diubah secara fermentasi (Narayama dkk., 2006). Pembentukan asam sitrat dapat dilakukan

dari bahan-bahan yang mengandung gula seperti: pati kentang, hidrolisat pati, sirup glukosa, sukrosa, sirup gula tebu, dimana 2/3 kandungan sukrosa telah berubah menjadi gula inversi, molase tebu dan molase bit, yang digunakan sebagai sumber karbohidrat. Berdasarkan penelitian, produksi asam sitrat maksimum biasanya dicapai pada konsentrasi gula 14-22 % (w/v). Sumber karbon yang digunakan juga berpengaruh pada aktivitas mikroba.

Sumber nitrogen dapat menggunakan ammonium sulfat atau ammonium nitrat. Penggunaan ammonium lebih baik karena selama pemanfaatannya sebagai sumber nitrogen, pH akan turun. Penambahan terbaik dilakukan saat laju produksi asam sitrat mulai menurun. Pengaruh ini berkaitan dengan peranan ion NH_4^+ dalam mekanisme keteraturan akumulasi asam sitrat, karena penambahan NH_4^+ tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan (Rahman, 1992). Selain itu adanya fosfat, ion logam perlu dibatasi, tetapi konsentrasi fosfat tidak perlu dibatasi, hanya sebaiknya pada konsentrasi rendah. Konsentrasi fosfat naik dapat mengakibatkan pembentukan asam-asam (*sugar acid*) tertentu dan merangsang pertumbuhan dan menurunkan fiksasi CO_2 .

Selain komposisi logam, yang juga berpengaruh adalah *trace mineral*, meliputi : Cu, Mn, Mg, Fe, Zn dan Mo, jumlah dalam ppm. Pada konsentrasi lebih tinggi dari konsentrasi optimal, logam kelumit (*trace mineral*) bersifat toksik, maka perlu diatur sebesar 0,05-0,5 ppm untuk Fe, tetapi juga tergantung substrat (*starting material*), misal sukrosa murni, jumlah Fe 2,0 ppm; sedang penambahan Cu saling berpengaruh pada penambahan Fe.

Umumnya proses dimulai pada pH 5, dalam waktu 48 jam pertama (tahap tropofase), pH turun menjadi kurang dari 3, karena metabolisme ammonium. Untuk hasil yang baik, terutama pada kultur terendam, pH diturunkan sampai kurang dari 2, saat pertumbuhan berhenti.

Aerasi, pada fermentasi merupakan faktor penting (Rahman, 1992). Produksi asam sitrat ditingkatkan dengan peningkatan aerasi, bila pemberian udara dihentikan selama beberapa menit, produksi asam sitrat akan berhenti dan tidak dapat

dikembalikan ke tingkat semula walau aerasi dilanjutkan. Pengaruh penghentian aerasi terhadap produksi tergantung tahap penghentian dan lama penghentian.

Faktor lain, pada bahan dengan kontaminan tinggi umumnya perlu ditambah alkohol (Demirel, 2004), pengaruh logam kelumit yang mempengaruhi produksi asam sitrat dilakukan dengan penambahan metanol, etanol, n-propanol, isopropilalkohol atau metil asetat dengan jumlah 1-5 % (v/v).

2.4.2. Produksi Inokulum

Untuk mempertahankan aktivitas inokulum dalam memproduksi asam sitrat jumlah besar, yaitu : beberapa cara perlu dilakukan, meliputi :

- Isolasi Galur

Aspergillus niger dapat diisolasi dari tanah, kemudian dilakukan seleksi dengan cara membuat beberapa subkultur pada media padat atau cair dan dilakukan pengujian sampai diperoleh subkultur yang potensial. Untuk seleksi dapat dilakukan dengan 2 cara, yaitu : teknik spora tunggal dan *metode passage*.

- Propagasi spora

Untuk mendapatkan produk yang potensial, ada beberapa cara yang dapat digunakan untuk menghasilkan spora, yaitu:

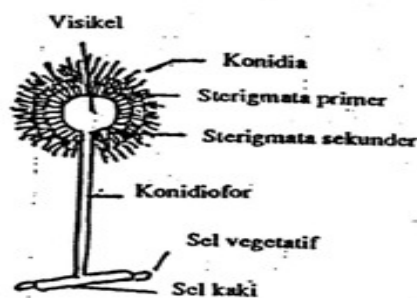
1. Menumbuhkan kapang dalam medium sporulasi cair
2. Menumbuhkan kapang dalam media agar yang sesuai. Setelah permukaan penuh spora, kemudian dipanen dan ditambahkan karbon aktif atau dibilas larutan garam.
3. Kapang ditambahkan pada substrat padat, misal bekatul. Setelah spora berkembang dapat langsung diinokulasikan atau ditambah larutan tertentu, sehingga diperoleh larutan suspensi spora (Rahman, 1992).

2.4.3. Kapang pembentuk Asam Sitrat

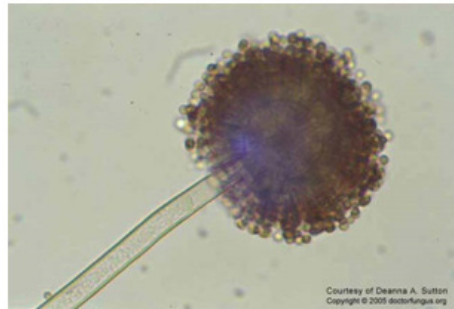
Pada awalnya kapang pembentuk asam sitrat yang dikenal adalah *Penicillium* dan *Mucor*, ditemukan oleh Wehmer pada tahun 1893, sampai diketemukan *Aspergillus niger* oleh Currie pada tahun 1917, merupakan jenis kapang terbaik penghasil asam sitrat.

Karakteristik Genus *Aspergillus niger*

Miselium terdiri dari hifa yang bercabang-cabang dan bersekat, berwarna terang atau tidak berwarna (Doelger dan Prescott, 1934), sebagian kedalam dan sebagian keluar. Sel kaki kadang didalam medium dan kadang diluar, lebih besar dari bagian lain serta berdinging lebih tebal. Dari sel kaki timbul batang *konidiofor* yang tumbuh tegak lurus. Apeks atau ujung sebelah atas membentuk visikel yang membesar dan ditumbuhi *sterigmata primer* dan *sekunder*, serta menghasilkan *konidia* yang terbentuk oleh pemanjangan atau pembelahan sel *sterigmata* (Gambar 2.1). Sedangkan morfologi *Aspergillus niger* diperlihatkan pada gambar 2.2.



Gambar 2.1 Diagram *Aspergillus* William Wilkins Co. Bo
(Doelger dan Prescott, 1934)



Gambar 2.2 *Aspergillus niger*

Sumber: http://www.doctorfungus.org/imageban/images/Dsutton_05feb/A_niger1.jpg

Kepala spora bervariasi dalam pengaturan warna, ukuran dan bentuk, contohnya pada *Aspergillus terricola* var. *americana* berbentuk setengah bola, *Aspergillus clavatus* berbentuk ellips, *Aspergillus vulvipes* berbentuk kolumnar, bentuk dan karakteristik lain masih banyak. Pada umumnya kapang *Aspergillus niger* dapat ditemui dimana-mana, terutama pada tanah di daerah tropis dan subtropis serta dapat diisolasi dari bermacam substansi, termasuk biji-bijian.

Galur untuk memproduksi asam sitrat cukup banyak, tetapi hanya mutan *Aspergillus niger* dan *Aspergillus wentii* yang banyak digunakan untuk memproduksi asam sitrat secara komersial. Secara alami asam sitrat merupakan produk metabolisme primer, tidak diekskresi oleh mikroorganisme dalam jumlah yang cukup berarti dan penggunaan *Aspergillus niger* dapat menekan produk-produk samping yang tidak diinginkan seperti : asam oksalat, asam isositrat dan asam glukonat (Rahman, 1992).

Dalam pembentukannya terdapat beberapa komponen medium yang diketahui berpengaruh terhadap fermentasi asam sitrat, meliputi : konsentrasi gula tinggi, konsentrasi fosfat rendah, pH rendah (dibawah 2,0), tekanan oksigen tinggi dan tidak terdapat unsur Mn^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} . Dari kondisi tersebut perlu dilakukan upaya untuk mempertahankan kondisi yang berpengaruh dalam memproduksi asam sitrat.

2.5. Proses Produksi Asam Sitrat

Asam sitrat merupakan senyawa alami yang banyak terdapat pada berbagai jenis tanaman, terutama buah-buahan. Sejak tahun 1893 ditemukan bahwa asam sitrat dapat dihasilkan oleh jenis-jenis fungi yang berfilamen, tetapi proses fermentasi baru dipraktekkan pada tahun 1923. Dengan adanya peningkatan kebutuhan sebesar 10.400 ton produksi asam sitrat dunia, sekitar 80% atau 8.600 ton diproduksi melalui proses fermentasi dengan mempergunakan *Aspergillus niger* (Rahman, 1992).

2.6. Metode Produksi

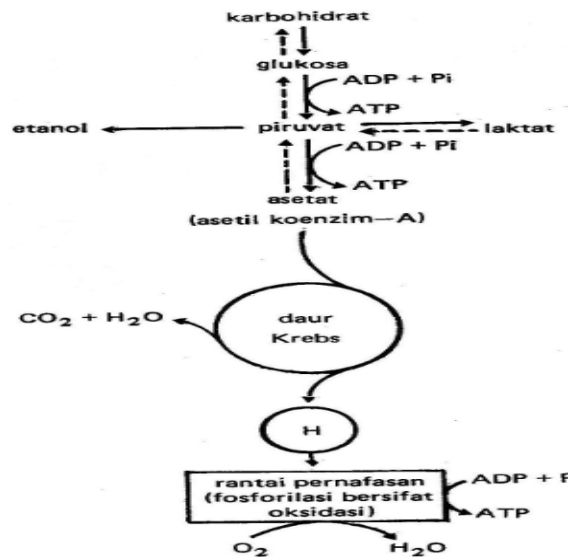
Asam sitrat merupakan metabolit primer, terbentuk sebagai senyawa antara selama proses katabolisme melalui siklus *Meyerhof-Embden*, siklus pentosa dan siklus asamtrikarboksilat. Ada 3 metode yang dapat digunakan untuk proses produksi asam sitrat, yaitu: proses fermentasi langsung, transformasi mikrobial, dan proses sintesa enzimatik, yang terus mengalami perkembangan sesuai kebutuhan.

Dalam produksi dikenal proses metabolisme sel dan metabolisme energi, sehingga energi kimia yang terkandung dalam struktur molekul glukosa dibebaskan dalam bentuk yang bermanfaat untuk melangsungkan berbagai kerja biologi dalam sel. Glukosa merupakan bahan bakar utama pada hampir semua mikroorganisme yang kaya energi. Proses penguraian glukosa menjadi piruvat, alkohol, laktat, CO₂ dan air berlangsung melalui beberapa metabolisme. Satu macam jasad hidup dapat melakukan satu atau lebih jalur metabolisme penguraian glukosa.

Proses penguraian glukosa menjadi piruvat, alkohol, laktat, atau CO₂ dan air dapat berlangsung melalui beberapa jalan metabolisme, tergantung keadaan lingkungan, keadaan sel, atau macam jasadnya. Satu macam jasad hidup dapat

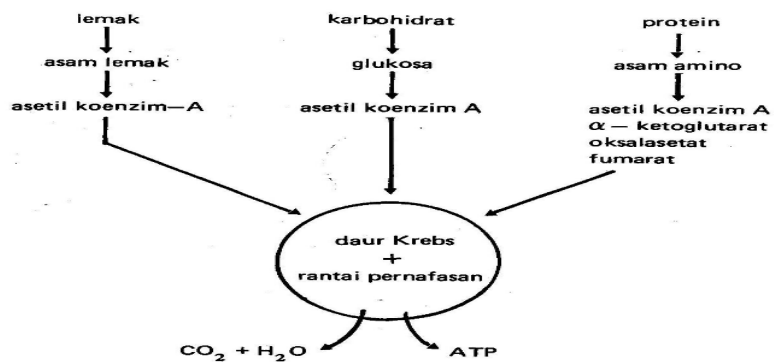
melakukan satu atau lebih jalur metabolisme penguraian glukosa, tergantung kepeperluan dan proses penguraian tersebut (Wirahadikusumah, 1988).

Proses penguraian glukosa secara umum diperlihatkan sebagai berikut :



Gambar 2.3 Gambaran umum proses pernafasan keseluruhan

Proses penguraian karbohidrat menjadi piruvat, disebut glikolisis atau jalur metabolisme Embden-Meyerhoff. Daur asam sitrat dapat digambarkan sebagai berikut:



Gambar 2.4 Daur asam trikarboksilat (Krebs) sebagai bagian utama penghasil metabolisme energi.

Kegiatan daur asam trikarboksilat terdapat dalam sel hewan, tumbuhan, dan jasad renik yang aerob, merupakan metabolisme penghasil energi yang utama. Jasad anaerob tidak menggunakan metabolisme daur ini sebagai penghasil energinya (Wirahadikusumah, 1988).

2.7. Imobilisasi sel

Imobilisasi sel berarti membatasi atau melokalisir sel, sehingga dapat digunakan berkali-kali, dilakukan imobilisasi karena diperlukan proses isolasi sel, sehingga sel dapat ditahan dalam reaktor. Dalam penggunaan sel bebas, maka sel tersebut tidak bisa digunakan lagi bila proses telah selesai, sedangkan dengan imobilisasi proses selanjutnya tidak perlu menggunakan sel yang baru, tetapi dilakukan dengan menghilangkan impuritas yang tidak diinginkan saja, juga menahan aktivitas sel yang lebih lama (Sumo dkk., 1993).

Beberapa metode imobilisasi sel dapat diklasifikasikan dalam 3 kelas umum, yaitu : metode kimia, ikatan kovalen dibentuk oleh sel, dan metode fisika, dengan interaksi lebih lemah atau penahanan sel yang melingkupi. Dengan cara kimia ikatan kovalen dari sel dilakukan dengan menggunakan support yang tidak larut dalam air. Beberapa bahan yang dapat digunakan sebagai support sintetis sebagai berikut:

Tabel 2.1 Bahan support sintetis (Prescott dan Dunn, 1949)

Support sintetis	Support alami
Polimer basa Acrylamida	Agarose(Sepharose)
Polimer basa Maleic anhidrida	Cellulosa
Polimer basa Methacrilic acid	Dextran (Sephadex)
Polypeptida	Gelas
Polimer basa Styrena0	Starch

Beberapa keuntungan proses imobilisasi sel dibandingkan sel tradisional :

- Meningkatkan produktivitas fermentor dengan menaikkan massa jenis sel dan penggunaan laju alir tinggi pada operasi sinambung tanpa adanya kegagalan sel
- Tidak terjadinya kegagalan sel
- Stabilitas sel/enzim dapat diperbaiki
- Dapat dibuat untuk tujuan khusus
- Tidak terjadi penahanan produk akhir
- Enzim/sel dapat dipergunakan lagi
- Mengurangi resiko kontaminasi sehingga kemurnian enzim lebih tinggi dan produk yang didapat lebih baik
- Reaksi memerlukan ruangan yang lebih kecil, sehingga mengurangi biaya perancangan fermentor dan mempermudah dalam pengendalian proses fermentasi
- Operasi berlangsung secara sinambung, sehingga lebih praktis
- Kontrol reaksi lebih baik dapat dicapai.

Beberapa ahli menggolongkan metode imobilisasi dengan tiga kelompok, yaitu : metode *carrier binding*, metode *cross linking*, dan metode *entrapping* (Sa'id, 1987). Pada metode *carrier binding*, enzim diikatkan pada suatu matriks yang bersifat tidak larut dalam air. Sebagai matriks dapat digunakan bahan organik maupun anorganik. Bila menggunakan metode ini, hal yang perlu diperhatikan adalah (Chibata, 1978) pemilihan matriks dan pengikatan enzim pada matriks tersebut. Teknik pengikatan enzim pada matriks dapat dilakukan berdasarkan adsorpsi fisik, gaya elektrostatik atau ikatan kovalen.

Metode *cross linking* didasarkan pada pembentukan ikatan intermolekuler antara molekul-molekul enzim. Gugus fungsional dalam molekul enzim yang biasa digunakan untuk pembentukan ikatan intermolekuler adalah gugus α -amino pada asam amino terminal, gugus β -amino dari lisin, gugus fenolik dari tirosin, gugus sulhidril dari sistein dan gugus imidazole dari histidin.

Pada metode *entrapping*, immobilisasi, enzim/sel didasarkan pada penempatan enzim di dalam kisi dari suatu polimer atau di dalam membran yang bersifat semi permeabel. Bila enzim ditempatkan dalam kisi, maka metode yang digolongkan adalah jenis kisi, sedang bila ditempatkan dalam membran yang bersifat semipermeabel, maka metodenya digolongkan ke dalam jenis mikrokapsul (Chibata, 1978). Selain itu metode immobilisasi dapat digolongkan sebagai berikut :

- Adsorpsi
- Penjeratan dalam matriks polimer
- Penjeratan dalam membran

Teknik immobilisasi yang paling baik adalah yang memenuhi kriteria utama tidak terjadi perubahan konformasi enzim dan tidak mengganggu gugus fungsi di pusat aktif enzim sehingga enzim tetap dapat berfungsi. Metode penjebakan enzim lebih banyak digunakan karena enzim ada dalam keadaan bebas dan tidak terikat pada bahan pendukung sehingga secara relatif fungsi katalitik dan struktur alami molekul enzim tidak mengalami gangguan guncangan (Wirahadikusumah, 1988).

Karakteristik yang harus dimiliki oleh penjerat/pembawa immobilisasi sel, antara lain :

- a. Mudah digunakan serta ukuran dan porositas media penjerat dapat dikontrol, terutama pada skala industri.
- b. Media penjerat berbentuk matrik stabil pada kondisi fermentasi (temperature dan pH optimum).
- c. Harga murah dan mudah didapat.
- d. Mempunyai sifat mekanik yang stabil, sehingga dapat tahan dalam waktu yang lama dalam reaktor yang digunakan.
- e. Penjerat harus inert terhadap mikroorganisme yang akan dijerat.
- f. Substrat, produk, dan metabolisme lain harus dapat berdiffusi secara bebas dengan media penjerat.

Natrium alginat merupakan bahan yang digunakan sebagai penjerat sel, spesifikasi sebagai berikut :

Alginat merupakan koloid ganggang (fikokoloid) yang dapat diekstrak dari ganggang coklat (*phasophyceae*), terutama anggota *laminariates*, berbentuk asam alginat atau natrium alginat. Asam alginat adalah suatu getah selaput membran (*membrane mucilage*). Garam alginat dapat larut dalam air, seperti natrium alginat, potassium alginat, dan ammonium alginat, sedikit larut dalam air, sedang kalsium alginat tidak larut dalam air.

Umumnya alginat berbentuk serbuk putih kekuningan dan kadang-kadang dalam bentuk pasta yang merupakan senyawa organik kompleks dengan selulosa atau polisakarida. Senyawa alginat dapat dimurnikan sebagai garam natrium alginat dengan alginat atau garam alginat yang lain.

Karakteristik natrium alginat :

1. Berbentuk serbuk berwarna putih atau kekuningan, tidak berbau, dan tidak berasa. Secara umum susut pengeringan tidak lebih dari 22 %.
2. Larut lambat dalam air membentuk larutan koloid yang kental, berwarna putih pucat sampai coklat kekuningan. Tidak larut dalam alkohol, kloroform dan eter, serta larutan air yang mengandung lebih besar dari 30 % alkohol. Variasi mutu natrium alginat ditentukan oleh variasi viscositas, antara 20-400 cp dari larutan 1 % pada suhu 20 °C.
3. Larutan alginat stabil pada pH 4 sampai 10.
4. Natrium alginat harus disimpan dalam wadah yang terlindung dari cahaya, bentuk larutan tidak boleh disimpan pada wadah logam.
5. Alginat sebagai hydrophylic polysakarida menyerap uap air dari udara.

Keuntungan proses immobilisasi sel dibandingkan dengan fermentasi tradisional, adalah:

1. Meningkatkan produktivitas fermentor dengan meningkatkan massa jenis sel, dapat menggunakan laju alir yang tinggi pada operasi sinambung tanpa ada kegagalan sel. Dengan dibentuknya suspensi bakteri menjadi sel imobilisasi,

bakteri akan cenderung tertahan pada media penjerat sehingga tidak akan terbawa saat menggunakan laju alir umpan pada operasi sinambung. Selain itu tertahannya bakteri pada media penjerat menyebabkan massa jenis sel meningkat.

2. Tidak ada produk samping
3. Mengurangi resiko kontaminasi karena laju difusi yang cepat dan massa jenis sel yang tinggi.
4. Mengurangi harga desain fermentor dan memperbaiki serta mempermudah kontrol pada proses kontinyu (Sumo dkk., 1993).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Kerangka Percobaan

Penelitian dilakukan dengan metoda percobaan melalui beberapa tahap proses, sehingga tujuan penelitian untuk mendapatkan produk dengan kualitas dan kuantitas sesuai yang diharapkan. Diagram alir percobaan disajikan dalam gambar 3.1 dan 3.2.

Tahapan percobaan yang dilakukan adalah sebagai berikut :

3.1.1 Tahap 1 adalah penentuan karakteristik media fermentasi.

Media fermentasi yang digunakan, yaitu molase, dengan mengetahui komposisi yang terkandung dapat ditentukan nutrient yang perlu ditambahkan agar sesuai. Analisis meliputi : komposisi kadar gula, kandungan logam-logam (Fe, Mg, Mn dan Zn) dan pH.

3.1.2 Tahap 2 merupakan tahap persiapan, meliputi:

- Penentuan jumlah spora dan waktu pertumbuhan optimum dari biokatalis yang digunakan, yaitu *Aspergillus niger ITBCC L74* berupa sel bebas dalam media pertumbuhannya dan media produksi.
- Penentuan aktivitas biokatalis dengan sel bebas dalam menghasilkan produk asam sitrat pada hari ke 7 dengan melakukan perhitungan berat sel kering, kadar asam total, penurunan kadar gula dan pH.
- Penentuan aktivitas biokatalis dengan sel imobilisasi pada waktu produksi optimum dengan melakukan perhitungan kadar asam total dan pH.

3.1.3 Tahap 3 merupakan tahap pelaksanaan, meliputi:

- Penentuan aktivitas biokatalis dalam memproduksi asam sitrat tanpa dan dengan variasi penambahan suplemen *VCO* 1, 2, 3, 4 % (v/v) pada waktu produksi hari ke 7, ditentukan kadar asam sitrat dalam asam total, penurunan kadar gula, pH dan yield.
- Penentuan aktivitas biokatalis berupa sel bebas, tanpa dan dengan penambahan suplemen *VCO* dan membandingkan produk yang dihasilkan oleh peneliti lain dengan penambahan suplemen *olive oil*.
- Penentuan aktivitas biokatalis yang diimobilisasi dengan mengatur kondisi proses sesuai pembentukan produk pada proses semi kontinyu.
- Penentuan aktivitas biokatalis yang diimobilisasi pada proses semi kontinyu dengan penambahan dan tanpa penambahan suplemen.

3.2 Peralatan yang digunakan

1. Kolom imobilisasi
2. Pompa peristaltik
3. *Hot plate*
4. Mikroskop
5. *Counting chamber*
6. HPLC
7. *Incubator Shaker*
8. Oven
9. *Microcentrifuge*
10. *Centrifuge*
11. pH meter
12. *Laminar Flow*
13. *Autoclave*
14. Timbangan analitis
15. Potensiometer

3.3 Bahan yang digunakan:

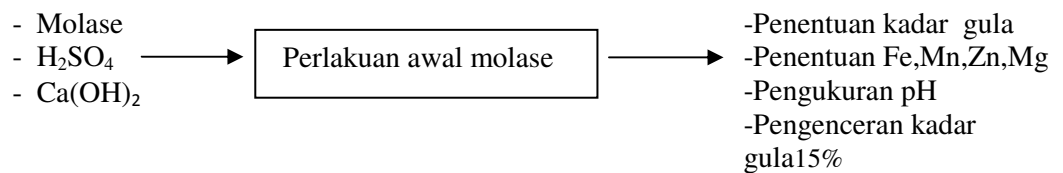
Tabel 3.1 Bahan-bahan yang digunakan :

No.	Jenis bahan	Jumlah	Asal
1.	Kentang	860 gram	
2.	Mikroba A.niger L74	1 tabung	Lab. Mikrobiologi ITB
3.	Dekstrosa	86 gram	Merck
4.	Agar	4,8 gram	Merck
5.	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,95 gram	Merck
6.	CaCO ₃	0,86 gram	Merck
7.	Ca(OH) ₂ 1 N	3200 ml	Merck
8.	H ₂ SO ₄ 1 N	40 ml	Merck
9.	Molase 15 %	4 liter	PSA Palimanan
10.	Na Alginat 8 %	250 ml	Merck
11.	CaCl ₂ 2 %	250 ml	Merck
12.	Aquadest		Lab. Polban

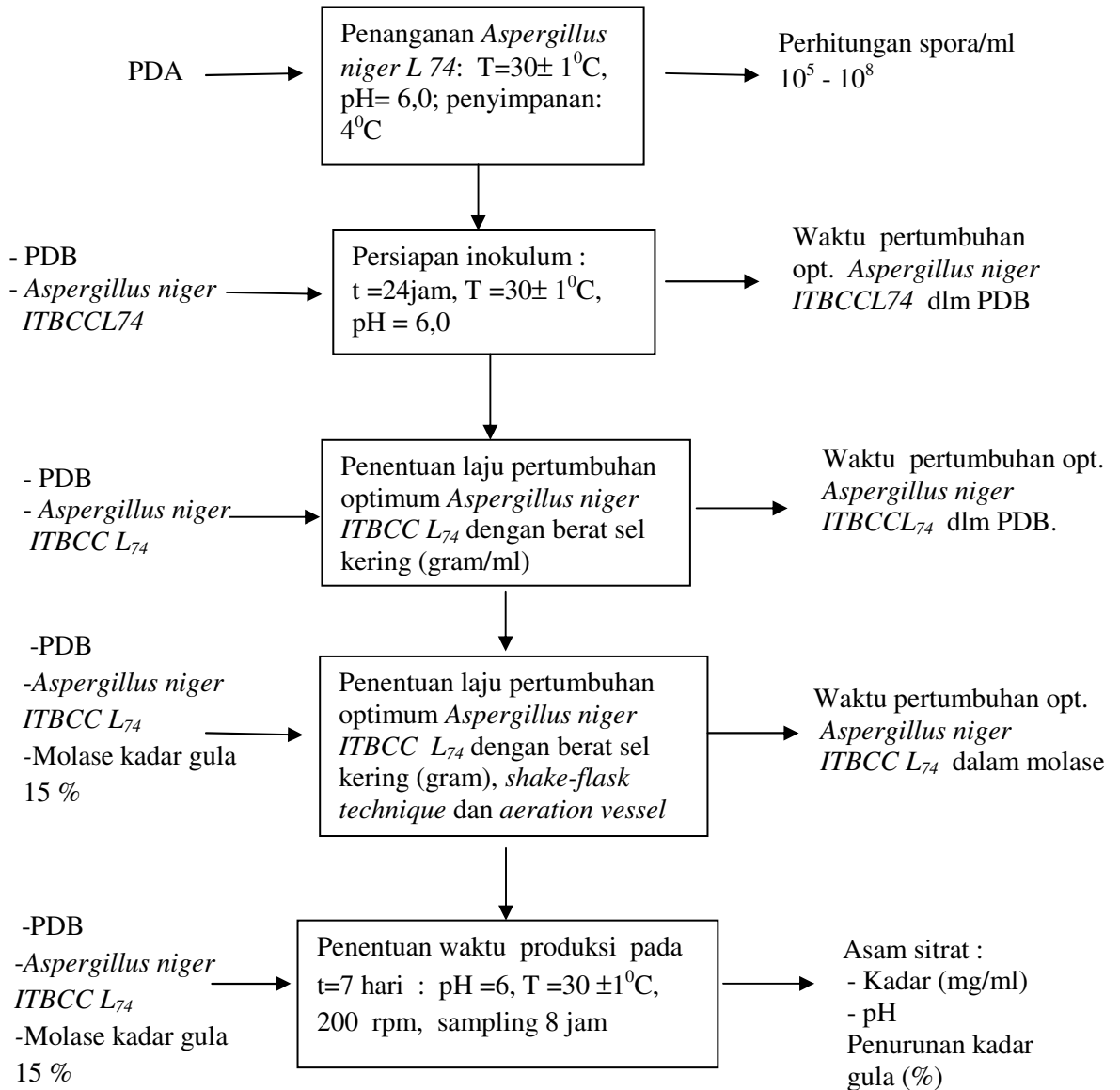
3.4 Diagram perancangan proses:

3.4.1 Tahap persiapan:

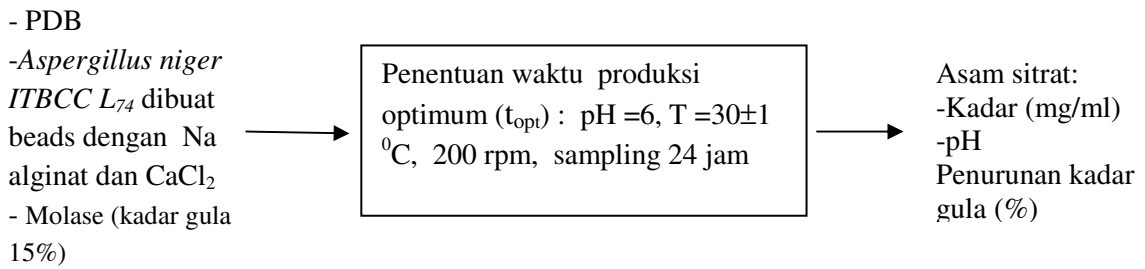
a) Perlakuan awal terhadap molase



b) Penanganan *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄



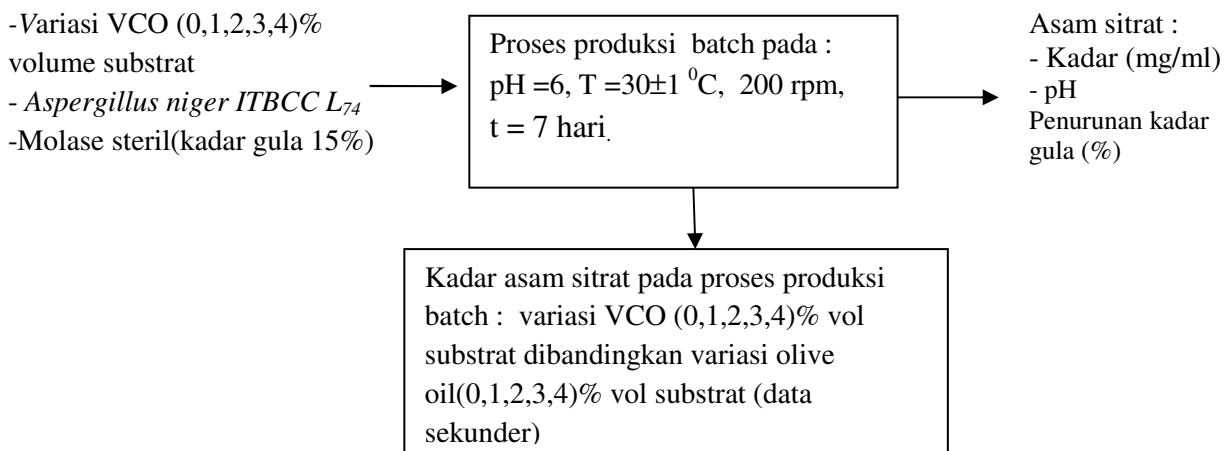
c) Penentuan waktu optimum *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ terimobilisasi (proses batch)



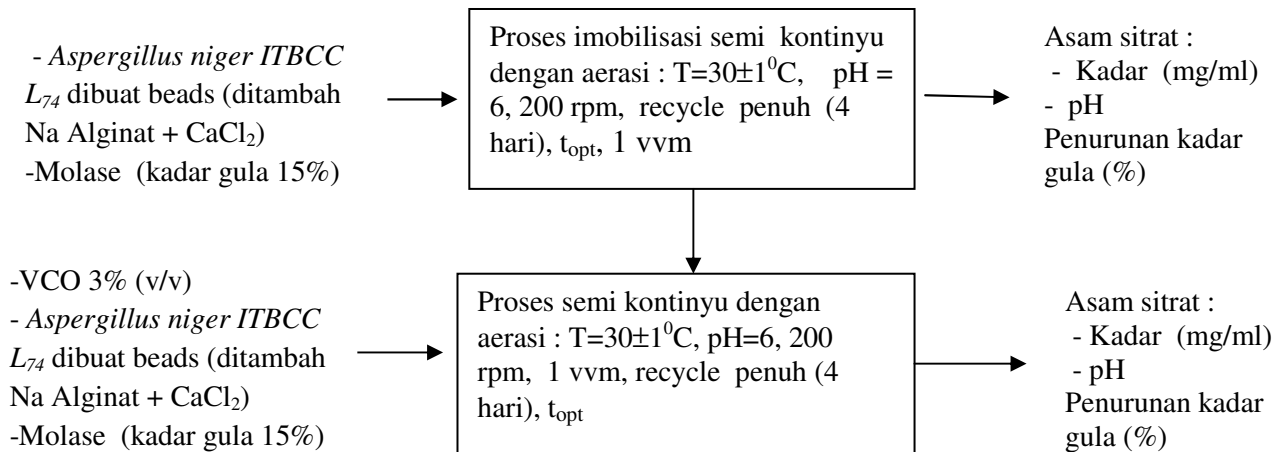
Gambar 3.1 Diagram alir percobaan pada tahap persiapan

3.4.2 Tahap pelaksanaan :

a) Proses produksi batch



c) Proses produksi semi kontinyu



Gambar 3.2 Diagram alir percobaan pada tahap pelaksanaan

3.4.3 Rancangan Penelitian

Tabel 3.2 Matrik percobaan pada tahap persiapan : penentuan kurva pertumbuhan optimum

Ru	<i>Asp. Niger L74</i>	Media	Yang diukur	Proses	Hasil
1.	1 tabung	PDA	Σ sel		Σ sp. opt
2.	1 tabung	PDA	Σ sel		
3.	Σ sp. opt	PDB	Berat sel kering	Tanpa	Brt sel _{opt(1)}
4.	Σ sp. opt	PDB	Berat sel kering	Aerasi	
5.	Brt sel _{opt(1)}	Molase kadar gula 15 %	Berat sel kering	Tanpa	Brt sel _{opt(2)}
6.	Brt sel _{opt(1)}	Molase kadar gula 15 %	Berat sel kering	Aerasi	
7.	Brt sel _{opt(1)}	Molase kadar gula 15 %	Berat sel kering	Dengan	Brt sel _{opt(3)}
8.	Brt sel _{opt(1)}	Molase kadar gula 15 %	Berat sel kering	Aerasi	

Tabel 3.3 Matrik percobaan pada tahap persiapan : penentuan waktu produksi (t_{56})

Run	<i>Asp. Niger L74</i>	Media	Yang diukur	Proses	Hasil
1.	Brt sel _{opt(1 dan 2)}	Molase kadar gula 15 %	- Kadar As.sitrat - pH - penurunan kadar gula	Tanpa aerasi,	t_{56} sel bebas
2.	Brt sel _{opt(1 dan 2)}	Molase kadar gula 15 %	- Kadar As.sitrat - pH - penurunan kadar gula	Tanpa aerasi,	t_{opt} sel imobilisasi <i>batch</i>

Tabel 3.4 Matrik percobaan pada tahap pelaksanaan : penentuan produksi asam sitrat pada t_{56}

Run	Waktu	Variabel		<i>Asp. niger L74</i>	Yang diukur	Hasil	Proses
		Vol VCO (v/v %)	Konsentrasi <i>Asp.Niger L74</i> dgn v/v (%)				
1.	$t_{(opt)1}$	0	15				
2.	$t_{(opt)1}$	1	15				
3.	$t_{(opt)1}$	2	15	Sel bebas		As.sitrat _(opt 1)	Batch
4.	$t_{(opt)1}$	3	15				
5.	$t_{(opt)1}$	4	15				

Kondisi media : Molase = 15 %

pH = 6,0

Suhu = 30 ± 1 °C

rpm = 200

Jumlah spora = $10^5 - 10^8$

Waktu inokulasi = 8,5 hari

Proses tanpa aerasi

Tabel 3.5 Matrik perbandingan pada tahap pelaksanaan : kadar asam sitrat penambahan variasi VCO dan penambahan variasi olive oil (data sekunder)

Run	Waktu	Variabel		Yang Ditentukan	Asp. niger	Proses
		Konsentrasi <i>Asp.Niger L74</i> dgn v/v (%)	Vol Olive oil (data sekunder) / VCO (v/v %)	Kadar As.sitrat (mg/ml)		
1.	t ₅₆	15	0			
2.	t ₅₆	15	1			
3.	t ₅₆	15	2			
4.	t ₅₆	15	3			
5.	t ₅₆	15	4			
6.	t ₅₆	15	0		Sel bebas	Batch
7.	t ₅₆	15	1			
8.	t ₅₆	15	2			
9.	t ₅₆	15	3			
10.	t ₅₆	15	4			

Tabel 3.6 Matrik percobaan pada proses semi kontinyu dengan sel imobilisasi

Run	Variabel	Konsentrasi <i>Asp. Niger L74</i> dgn v/v (%)	Yang diukur		Hasil	Proses
			pH	Kadar As.sitrat (mg/ml)		
1.	0	15			As.sitrat _{(opt)3}	Semi kontinyu dengan aerasi
2.	As.sitrat _{(opt)2}	15			As.sitrat _{(opt)4}	Semi kontinyu dengan aerasi

Kondisi media : Molase = 15 %

pH = 6,0

Suhu = 30 ± 1 °C

rpm = 200

Jumlah spora = 10^5 - 10^8

Waktu inokulasi = 8,5 hari

Aerasi = 1 vvm

3. 5. Prosedur Percobaan:

3 5. 1 Tahap persiapan

1. Perlakuan terhadap molase

a. Analisis dan penentuan komposisi kimia dari molase antara lain pH, kadar gula, dan kandungan ion (Fe^{3+} , Mn^{3+} , Zn^{2+} , Mg^{2+}).

b. Perlakuan awal (*pretreatment*) terhadap larutan molase, dilakukan dengan penambahan bahan kimia, dengan cara sebagai berikut :

Larutan molase ditambah dengan H_2SO_4 1N, kemudian dinetralisasi dengan air kapur $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 1N sampai pH 6,0. (Hidayat, 2008)

2. Perlakuan terhadap *Aspergillus niger* ITBCC L_{74}

a. Persiapan dan penanganan mikroorganisme

Kultur murni *Aspergillus. Niger* ITBCC L_{74} ditumbuhkan di dalam media agar miring PDA (*Potatoes Dextrose Agar*) pada suhu inkubasi 30 ± 1 °C, pH 6,0 sebagai *stock culture*. Jamur tersebut dikembang biakkan setiap 4 minggu dan penyimpanan pada suhu 4 °C.

b. Perhitungan jumlah spora optimum dari *Aspergillus niger* ITBCC L_{74}

Tahap ini bertujuan untuk mendapatkan jumlah spora dari *Aspergillus niger* ITBCC L_{74} dengan kisaran 10^5 – 10^8 spora/ml. Metoda yang digunakan adalah metode sampling setiap 24 jam selama 7 hari. Perhitungan spora dengan menggunakan *counting chamber*.

c. Pembuatan inokulum

Aspergillus niger ITBCC L₇₄ yang mengandung jumlah spora $10^5 - 10^8$ spora/ml dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 250 ml yang berisi PDB dengan menggunakan jarum ose secara aseptis. Inokulasi dilakukan selama 24 jam, pada suhu $30 \pm 1^\circ\text{C}$ dan pH 6,0.

d. Penentuan laju pertumbuhan optimum pada media PDB (*Potatoes Dextrose Broth*)

Media yang digunakan adalah PDB (*Potatoes Dextrose Broth*), terdiri dari kentang 200 g/l, dextrose 20 g/l, CaCO_3 0,2 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l dan aquadest 1 liter dengan pH 5,6. Laju pertumbuhan *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ ditentukan melalui kurva pertumbuhan. Metode yang digunakan adalah perhitungan berat sel kering (gram/ml).

e. Penentuan laju pertumbuhan optimum *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ di dalam media molase, dengan kadar gula 15 % ditentukan pada kurva pertumbuhan secara *shake flash - technique* dan *aeration vessel*. Metode yang digunakan adalah perhitungan berat sel kering (gram/ml).

f. Penentuan produksi asam sitrat menggunakan sel bebas pada waktu 7 hari (t_{56})

Media produksi yang digunakan untuk produksi asam sitrat adalah molase steril dengan kadar gula 15% sebanyak 400 ml (pH 6,0) dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 2 liter yang diambil 1,5 ml setiap sampling. Kemudian ditambahkan *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ sebanyak 15% dari volume total secara aseptis. Kondisi operasi pada suhu $30^\circ \pm 1^\circ\text{C}$, pengadukan 200 rpm. Sampling dilakukan setiap 24 jam selama 8 hari. Ditentukan kadar asam total, pH dan penurunan kadar gula serta identifikasi asam sitrat dengan HPLC.

g. Pembuatan beads pada *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄

Inokulum dengan volume tertentu (15 % volume substrat) ditambah dengan Na alginat 8% dengan perbandingan 1:1, kemudian dibuat beads dengan menggunakan siring volume 2 ml (diameter ± 2 mm), selanjutnya dimasukkan dalam CaCl₂ 2 % secara aseptis sampai semua tercelup dan aktivasi pada CaCl₂ 2 % selama 48 jam.

h. Penentuan waktu optimum produksi asam sitrat pada sel yang diimobilisasi

Media produksi yang digunakan untuk produksi asam sitrat adalah molase steril dengan kadar gula 15% sebanyak 400 ml (pH 6,0) dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 2 liter, ditambahkan dengan *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ sebanyak 15% dari volume total yang dibuat beads. Sampling dilakukan setiap 24 jam sebanyak 20 ml, proses secara batch, kondisi operasi pada suhu $30^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, pengadukan 200 rpm. Ditentukan kadar asam total, penurunan kadar gula dan pH serta identifikasi asam sitrat pada waktu optimum dengan HPLC.

i. Pembuatan kolom imobilisasi dengan kapasitas volume substrat 400 ml dan *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ volume 300 ml dibuat beads. Dimensi dari kolom imobilisasi sebagai berikut : diameter 45 mm dan tinggi 330 mm, sehingga perbandingan diameter dan tinggi 1: 6 atau lebih (Bu 'Lock, dkk, 1987).

3.5.2 Tahap pelaksanaan

a. Produksi asam sitrat dengan substrat molase sebanyak 100 ml dalam erlenmeyer 500 ml ditambahkan *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ konsentrasi 15 % dan VCO dengan variasi 0,1, 2, 3, 4 % volume substrat, dicari kadar asam total dan pH pada waktu proses 7 hari (t_{56}). Dalam tahap pelaksanaan

ini, kondisi operasi yang digunakan adalah : suhu $30\pm 1^{\circ}\text{C}$, pH 6,0, digoyang pada 200 rpm.

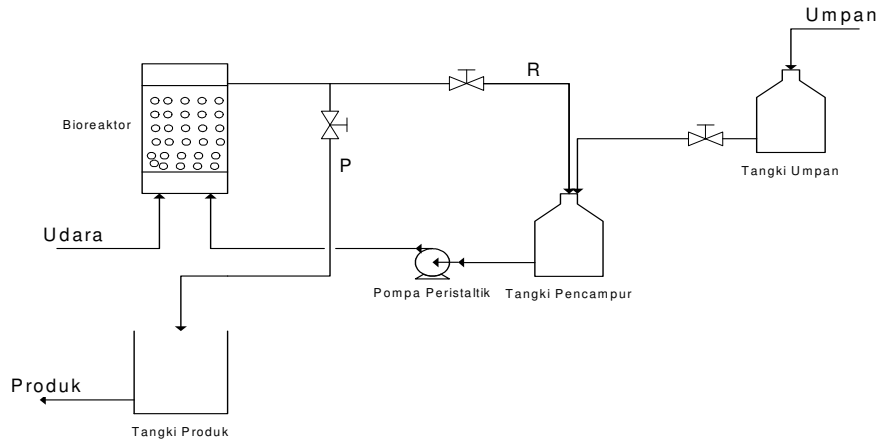
- b. Membandingkan kadar asam sitrat yang didapatkan dari molase dengan penambahan *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ dengan VCO dan *Aspergillus niger* yang ditambah dengan *Olive oil* (dari data sekunder) untuk mengetahui kemampuan VCO dalam meningkatkan aktivitas *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ memproduksi asam sitrat.
- c. Pembuatan beads *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ tanpa dan dengan penambahan VCO 3 % (v/v).
- d. Melakukan perangkaian peralatan seperti pada gambar 3.1.
- e. Proses pada sel yang diimobilisasi dalam kolom imobilisasi secara semi kontinyu, proses dilakukan pada laju aerasi 1 vvm, volume beads 75% volume kolom. Setelah recycle penuh selama 4 hari, selanjutnya dilakukan sampling setiap 24 jam sampai hari ke 21. Ditentukan kadar asam total dan pH, penurunan kadar gula serta identifikasi asam sitrat pada produksi hari ke 21.
- f. Proses menggunakan imobilisasi sel yang telah ditambah VCO 3 % (v/v) dalam kolom imobilisasi secara semi kontinyu, proses dilakukan dengan laju aerasi 1 vvm, volume beads 75% volume kolom. Setelah recycle penuh selama 4 hari, selanjutnya dilakukan sampling setiap 24 jam. Ditentukan kadar asam total, pH, penurunan kadar gula dan identifikasi asam sitrat dengan HPLC pada waktu produksi hari ke 21.

3.5.3 Tahap Analisis

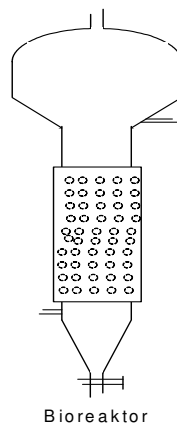
Analisis terhadap asam sitrat yang dihasilkan meliputi :

1. Pengukuran pH dengan menggunakan pH meter dan potensiometer
2. Kadar asam total (N) menggunakan potensiometer dan identifikasi asam sitrat (N) dengan HPLC
3. Penentuan penurunan kadar gula menggunakan metoda Luff Schoorl

Rangkaian peralatan pada proses imobilisasi *Aspergillus niger* L74 :



Gambar. 3.3 Rangkaian peralatan produksi asam sitrat secara imobilisasi sel



Gambar. 3.4 Spesifikasi bioreaktor pembentuk asam sitrat (Bu 'Lock dan Kristiansen, 1987)

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses produksi asam sitrat memberikan hasil maksimum, bila pemilihan biokatalis dan karakteristik bahan baku memenuhi komposisi yang sesuai dalam menaikkan aktivitas biokatalis untuk menghasilkan produk. Karakteristik penting agar komposisi nutrient dari media fermentasi dapat dipenuhi, meliputi kadar gula total, unsur-unsur kelumit (*trace mineral*), kandungan oksigen, selain kondisi proses yang harus dipenuhi, seperti suhu, kecepatan pengadukan dan pH media fermentasi.

Karakteristik bahan baku dilakukan, sehingga dapat ditentukan nutrient yang harus ditambahkan, juga perlakuan awal terhadap bahan baku yang akan digunakan sebagai media fermentasi. Selain itu suhu perlu diatur sehingga aktivitas biokatalis mampu mendegradasi gula yang ada menjadi produk yang diinginkan, pengadukan bertujuan menjamin ketersediaan oksigen dalam media fermentasi, sehingga pengaturan laju pengadukan dapat menaikkan aktivitas biokatalis, dan menaikkan produksi asam sitrat, sedang pH disesuaikan kondisi optimum pertumbuhan biokatalis.

4.1 Analisis dan Penentuan Karakteristik dari Molase

Analisis dan penentuan karakteristik dari molase bertujuan untuk mengetahui kadar gula awal dan kandungan ion-ion logam (Fe^{2+} , Mn^{3+} , Zn^{2+}) yang ada di dalam molase. Hasil analisis perlu dilakukan untuk mengatur perlakuan terhadap molase, yang merupakan media fermentasi, dan metoda yang harus dilakukan sehingga molase tersebut layak digunakan sebagai substrat dalam produksi asam sitrat.

Hasil pengujian Laboratorium molase yang diperoleh dari PT. PG. Rajawali II Unit PSA Palimanan dapat dilihat pada tabel 4.1 dan 4.2.

Tabel 4.1 Hasil analisis molase untuk pH dan unsur sekelumit

No.	Analisis	Nilai	Satuan	Alat yang digunakan
1.	pH	4,8		pH meter
2.	Kadar air	24,25	%	Oven
3.	MgO	0,37	%	AAS
4.	Fe	226	Ppm	AAS
5.	Mn	31	Ppm	AAS
6.	Zn	10	Ppm	AAS

(Sumber: Balai Penelitian Tanaman dan Sayuran, 2010)

Tabel 4.2 Hasil pengujian laboratorium

No	Analisis	Kadar (%)
1.	Gula reduksi	15,28
2.	Gula sukrosa	28,70
3.	Gula total	43,98

(Sumber: Balai Penelitian Tanaman dan Sayuran, 2010)

Berdasarkan tabel 4.1 dan 4.2 diperoleh kandungan MgO, Fe, Mn, dan Zn masing-masing 0,37 %, 226 ppm, 31 ppm, dan 10 ppm sedang kadar gula total sebesar 43,98 %. Pengenceran molase perlu dilakukan untuk memperoleh media dengan kadar gula sebesar 15 %. Kandungan ion logam perlu dikurangi sehingga tidak mengganggu kemampuan biokatalis dalam mendegradasi gula.

Penurunan ion logam, terutama Fe dalam molase dilakukan dengan cara mereaksikan dengan H₂SO₄ 1 N, penetralan dilakukan dengan penambahan air kapur (Ca(OH)₂), kemudian didiamkan semalam. Setelah melalui sentrifugasi diperoleh molase murni yang selanjutnya diproduksi untuk fermentasi.

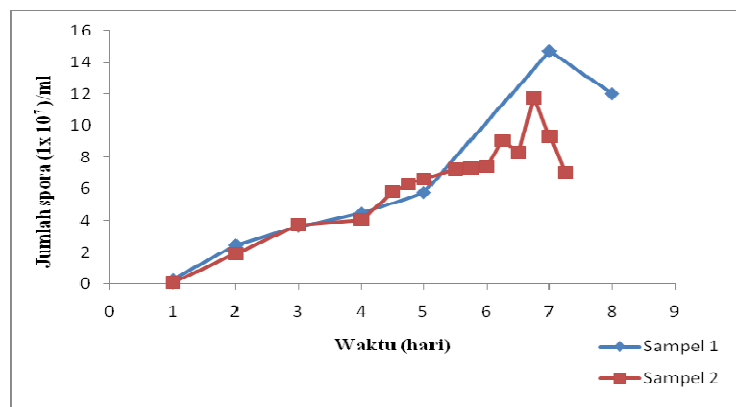
Biokatalis yang digunakan perlu dipilih, sehingga produksi asam sitrat tinggi, dalam penelitian digunakan *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄, hasil isolasi dari Laboratorium Mikrobiologi Teknologi Bioproses ITB.

Produksi biomassa, dengan menentukan berat sel kering (g/ml) menunjukkan aktivitas *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄, yang berpengaruh dalam menaikkan produksi

asam sitrat, maka perlu dicari kondisi optimum dari pertumbuhan *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄, yaitu jumlah spora, waktu pertumbuhan optimum, pH dari media.

4.2 Penentuan jumlah spora *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄

Tahap ini bertujuan mendapatkan waktu optimum dalam memperoleh spora *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ sesuai dengan literatur, pada kisaran $10^5 - 10^8$ spora/ml (Adham, 2001; Lotfy, dkk, 2006; dan Hidayat, 2008)). Penentuan ini dilakukan secara duplo dengan sampling setiap 24 jam dan 6 jam selama 7 hari dengan menggunakan metoda *counting chamber* dan dihitung dibawah mikroskop. Jumlah spora *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ ditentukan pada kurva pertumbuhannya, yaitu saat berada fasa eksponensial seperti yang ditunjukkan pada gambar 4.1.

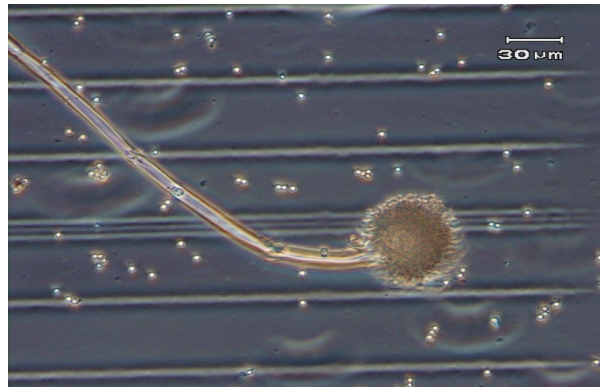


Gambar. 4.1 Kurva pertumbuhan *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ dalam media PDA terhadap waktu

Gambar 4.1 menunjukkan perhitungan jumlah spora *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄, sampel 1 terjadi pertumbuhan spora maksimum pada hari ke 7, sebanyak $14,7 \times 10^7$ spora/ml media, sedang sampel 2 dengan melakukan sampling setiap 6 jam, didapatkan bahwa pertumbuhan maksimum terjadi pada hari ke 6,75 dengan jumlah spora sebanyak $11,77 \times 10^7$ spora/ml media, tetapi jumlah spora pada hari ke 7 masih cukup tinggi dibandingkan dengan jumlah spora jam yang lain, yaitu sebanyak $9,33 \times$

10^7 spora/ml. Jumlah ini sesuai dengan literatur, sehingga dapat digunakan sebagai acuan dalam pengambilan *Aspergillus niger* ITBCC L_{74} dalam memproduksi asam sitrat. Selanjutnya pemanenan *Aspergillus niger* ITBCC L_{74} dilakukan pada hari ke 7 setelah penggesekan.

Pengamatan *Aspergillus niger* ITBCC L_{74} dengan jumlah spora $8-9 \times 10^7$ spora/ml dilihat dengan menggunakan mikroskop pada pembesaran 40×10 seperti ditunjukkan pada gambar 4.2.



Gambar 4.2 Spora *Aspergillus niger* ITBCC L_{74} dilihat dari mikroskop

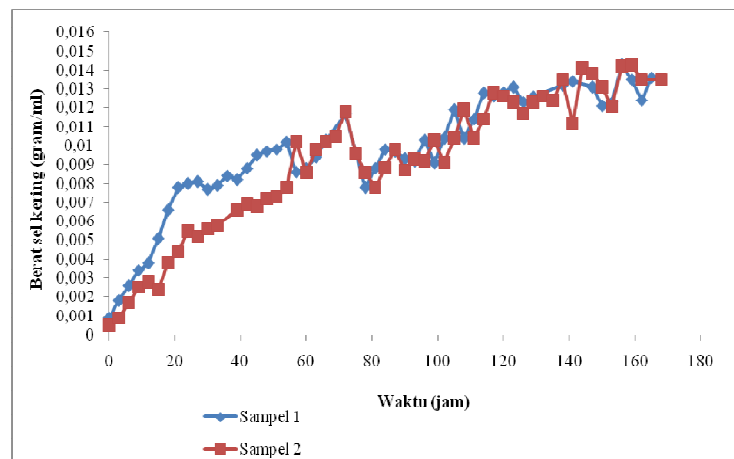
Gambar 4.2 sesuai dengan gambar *Aspergillus niger* dalam literatur seperti gambar 2.2, sehingga dapat digunakan dan ditentukan dalam pembuatan inokulum dalam media PDB (*Potatoes Dextrose Broth*) dalam produksi asam sitrat.

4.3 Penentuan waktu pertumbuhan *Aspergillus niger* ITBCC L_{74} dalam media PDB (*Potatoes Dextrose Broth*):

Penentuan laju pertumbuhan maksimum bertujuan penyesuaian dari *Aspergillus niger* ITBCC L_{74} dengan lingkungan barunya, yaitu media cair PDB. Kondisi operasi yang digunakan adalah kondisi optimum *Aspergillus niger* ITBCC L_{74} dalam produksi asam sitrat, yaitu suhu 30°C , kecepatan 200 rpm, dan pH 6,0 secara *batch* pada kultur terendam (*submerged fermentation*) (Adham, 2001).

Percobaan dilakukan secara duplo dengan melakukan sampling setiap 3 jam selama 7 hari, digunakan untuk menentukan berat sel kering (g/ml), proses dilakukan dalam fermentor dengan perbandingan volume starter dan fermentor 1:5 (Stanbury P.F., 1984).

Hubungan antara berat sel kering (g/ml) *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ terhadap waktu (jam) ditunjukkan pada gambar 4.3.



Gambar 4.3 Kurva pertumbuhan *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ dalam media PDB terhadap waktu

Kondisi ini sel hanya mengalami 2 fase, yaitu fase eksponensial dan fase stasioner, terjadi pada t_0 sampai t_{72} , berat sel kering pada t_{72} sebanyak 0,117 gr/ml untuk sampel 1 dan 0,118 g/ml untuk sampel 2, meskipun jumlah sel kering pada t_{156} tinggi, sebanyak 0,0143 g/ml untuk sampel 1 dan 0,0142 g/ml untuk sampel 2, tetapi pada kurva terlihat pada t_{156} pertumbuhan sel sudah berada pada fase stasioner, demikian juga pada t_{99} sampai t_{123} berat sel kering cukup tinggi, tetapi pertumbuhan sel sudah berada pada fase stasioner. Penentuan waktu pertumbuhan maksimum adalah pada t_{36} , karena pada saat ini pertumbuhan sel pada kondisi terbaik. Demikian juga terlihat pada sampel 2 kondisi tidak jauh berbeda dengan sampel 1. Selanjutnya dilakukan inokulasi sel selama 1 hari 12 jam, yang merupakan waktu pertumbuhan maksimum untuk *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ dalam media PDB.

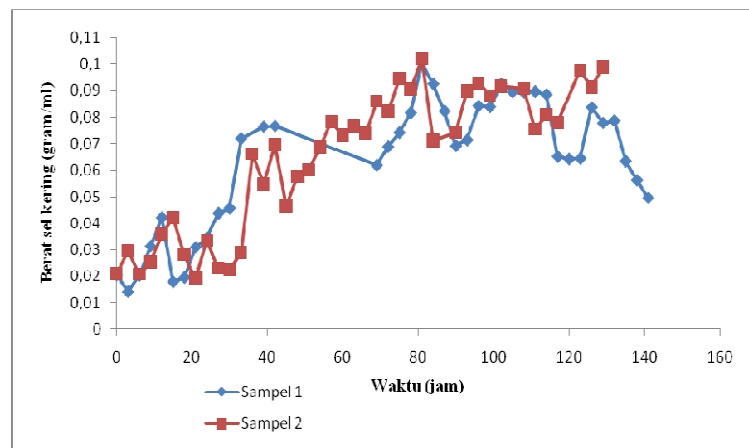
4.4 Penentuan waktu pertumbuhan *Aspergillus niger* ITBCC L_{74} dalam media molase :

Penentuan ini dilakukan dengan dua cara, yaitu:

1). Aerasi dengan menggunakan *shake-flask technique*

Teknik ini umumnya digunakan pada skala laboratorium. Proses dilakukan dalam erlenmeyer 2 liter dengan volume *starter* 400 ml. Perbandingan volume starter dan volume erlenmeyer sebesar 1:5, karena dengan perbandingan tersebut penyediaan oksigen yang disuplai sudah memenuhi syarat untuk suatu fermentasi terendam dalam skala laboratorium (Standbury P.F., 1984). Inkubasi dilakukan pada kondisi berikut : kecepatan 200 rpm, suhu 30°C, pH 6,0, proses selama 7 hari secara *batch*.

Penentuan laju pertumbuhan maksimum *Aspergillus niger* ITBCC L_{74} dilakukan dengan menggunakan metoda berat sel kering (g/ml). Sampling dilakukan setiap 6 jam selama 7 hari, seperti yang ditunjukkan pada gambar 4.4.



Gambar 4.4 Kurva pertumbuhan *Aspergillus niger* ITBCC L_{74} dalam media molase terhadap waktu

Pertumbuhan sel di media molase, terlihat pada sampel 1 hanya mengalami fase eksponensial dan fase stasioner dengan kondisi sebagai berikut, fase eksponensial terjadi pada t_0 sampai t_{81} , karena jumlah sel kering pada t_{81} paling tinggi 0,1006 g/ml untuk sampel 1 dan 0,1022 g/ml untuk sampel 2, meskipun pada kondisi tersebut kurva menunjukkan pada fase stasioner, tetapi pada fase eksponensial t_{69} berat sel kering sangat kecil, yaitu 0,0619 gr/ml untuk sampel 1 dan 0,086 gr/ml untuk sampel 2. Kondisi pada sampel 2 memperlihatkan hal yang tidak berbeda, yaitu t_{81} berat sel kering tertinggi, maka selanjutnya waktu pertumbuhan maksimum pada media molase ditentukan selama 1 hari 16,5 jam. Setelah fase eksponensial kurva mengalami penurunan, karena nutrisi semakin habis sehingga sel mengalami fase stasioner, yaitu jumlah sel yang hidup sama dengan sel yang mati dan selanjutnya sel semakin banyak yang mati atau berada pada fase kematian, yang ditunjukkan pada kurva yang semakin menurun. Dari ke 3 kondisi tersebut untuk selanjutnya pada penentuan waktu produksi optimum dilakukan dengan penanaman sel pada media PDA selama 7 hari, kemudian inokulasi pada media PDB 1 hari 12 jam dan dilanjutkan pada media molase selama 1 hari 16,5 jam.

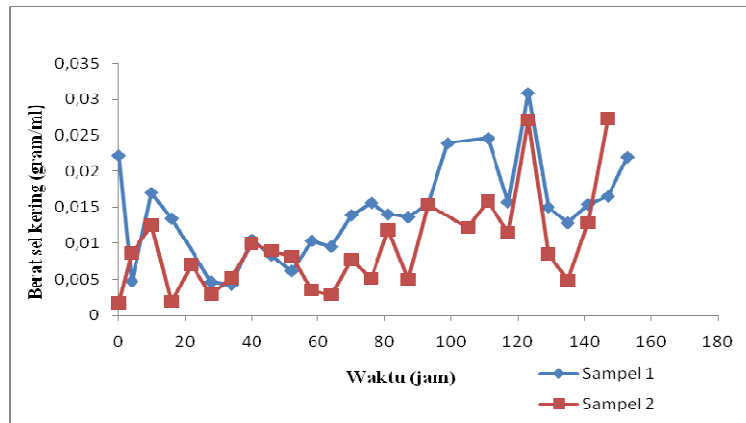
Penentuan waktu produksi asam sitrat tanpa penambahan suplemen, dalam hal ini VCO dilakukan selama 10 hari 4,5 jam sejak dilakukan penggesekan dalam media PDA.

2). Dengan metoda tangki aerasi (*aeration vessel*)

Tahap ini 600 ml *starter* dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 1 liter. Kemudian udara disuplai dengan alat pompa udara dengan laju alir udara sekitar 0,6 liter/menit, inkubasi pada kecepatan 200 rpm, suhu 30°C, dan pH 6,0.

Tahap ini dilakukan menggunakan metoda berat sel kering (g/ml). Percobaan dilakukan secara duplo dengan melakukan sampling setiap 6 jam

selama 7 hari. Laju pertumbuhan maksimum *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ ditunjukkan pada gambar 4.5.



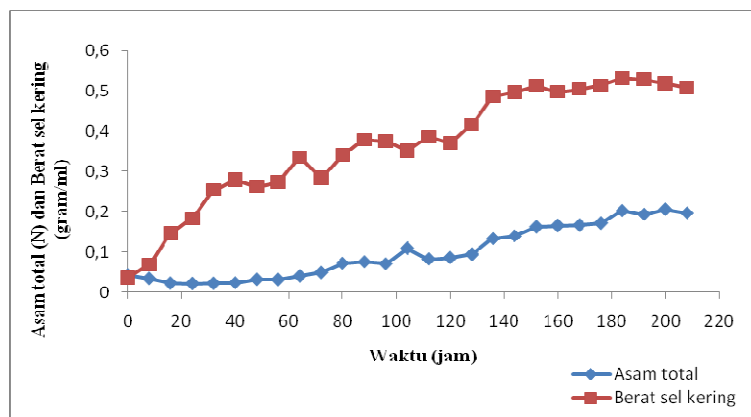
Gambar 4.5 Kurva pertumbuhan *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ dalam media molase terhadap waktu

Gambar 4.5 memperlihatkan hasil yang kurang baik, untuk sampel 1 maupun sampel 2, sel kering tidak terlalu banyak, sehingga kemungkinan aktivitas sel juga kurang baik dan tentu berpengaruh pada hasil yang didapatkan. Data-data yang ada tidak menemukan fase eksponensial, baik pada sampel 1, maupun sampel 2, meskipun dalam ke 2 percobaan telah dilakukan kondisi sama, tetapi keadaan tersebut kurang menguntungkan pada pertumbuhan spora karena kondisi tersebut penerapan yang sering digunakan pada *pilot* dan *industrial scale fermentation* dengan aerasi sebagai pengganti fungsi goyangan (Stanbury P.F.,1984).

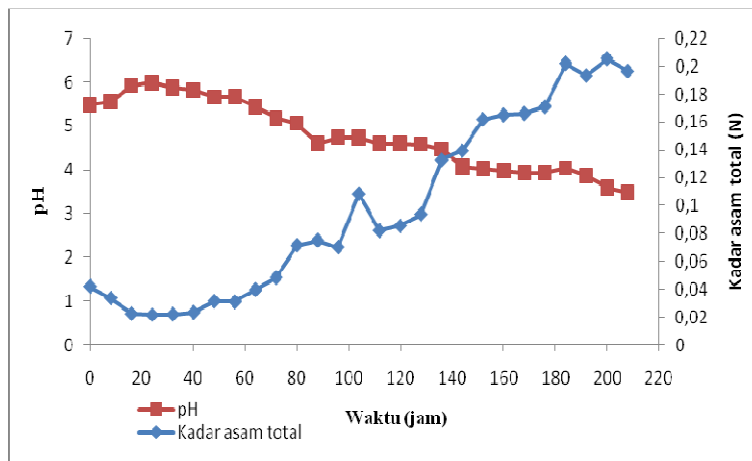
4.5 Kurva produksi asam sitrat pada t₇ (t pada hari ke 7) dalam media produksi molase

Tahap ini dilakukan dalam skala laboratorium secara *batch* pada kultur terendam (*submerged fermentation*). Sampling dilakukan setiap 24 jam selama 9 hari. Kondisi pada hari ke 7 produksi asam sitrat ditunjukkan melalui pengukuran

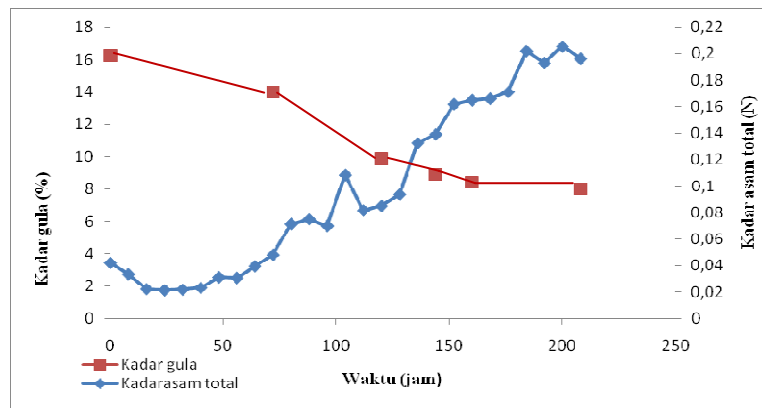
biomassa (berat sel kering, g/ml), penurunan pH, peningkatan konsentrasi asam (N), penurunan kadar gula (%) dan identifikasi asam sitrat menggunakan HPLC. Pemisahan antara biomassa dan produknya dilakukan dengan cara penyaringan. Produk dalam bentuk filtratnya digunakan untuk menentukan penurunan pH, penentuan konsentrasi asam total (N), penurunan kadar gula (%) dan identifikasi asam sitrat seperti yang ditunjukkan pada gambar 4.6, 4.7, dan 4.8.



Gambar 4.6 Kurva produksi asam total dan berat sel kering terhadap waktu



Gambar 4.7 Kurva produksi asam total dan pH terhadap waktu



Gambar 4.8 Kurva produksi asam total dan penurunan kadar gula terhadap waktu

Gambar 4.6, 4.7, dan 4.8 menunjukkan *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ mampu mendegradasi molase menjadi asam, diperlihatkan adanya peningkatan konsentrasi asam total dan penurunan pH dalam media fermentasi. Waktu produksi asam sitrat pada hari ke 7 didapatkan berat sel kering 0,5041 g/ml dan produksi asam total sebanyak 0,166098 N pada pH 3,94, meskipun pH produksi asam sitrat terbaik sekitar 2,3 tidak tercapai, tetapi penurunan pH dari sekitar 5,6 sampai 3,94 menunjukkan proses fermentasi berlangsung dan molase didegradasi *Aspergillus niger* menjadi asam sitrat karena adanya asam proteolitik dalam *Aspergillus niger*.

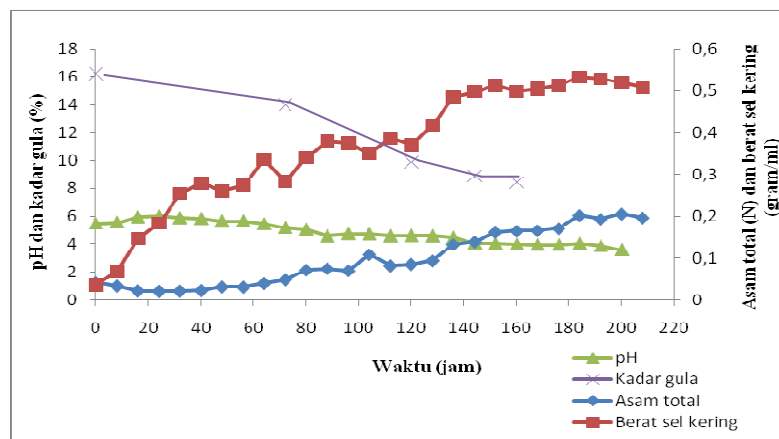
Peneliti sebelumnya mendapatkan waktu optimum fermentasi asam sitrat selama 9 hari (Lotfy dkk, 2006), 10 hari (Guilherme, A.A, dkk, 2007), dan 11 hari (Adham, 2001), penelitian disini didapatkan waktu produksi optimum terjadi pada hari ke 7,7 dengan berat sel kering 0,5322 g/ml dan asam total 0,202145 N.

Pola pertumbuhan *A. niger* ITBCC L₇₄ dengan pembentukan produk termasuk dalam pola pertumbuhan sel yang berasosiasi. Asam sitrat merupakan produk langsung dari suatu jalur katabolik (metabolit primer) seperti yang ditunjukkan pada gambar 4.9.

Dari hasil analisa menggunakan HPLC dengan menggunakan standard asam sitrat murni, didapatkan bahwa dalam asam total mempunyai kandungan asam sitrat (data pada lampiran B).

Gambar 4.8 memperlihatkan hasil yang berlawanan, kadar gula awal dibuat 15 %, tetapi ternyata hasil analisa dengan metode *Luff Schoorl* didapatkan kadar gula sebesar 16,25 %, pengaruh *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ terjadi proses fermentasi, sehingga kadar gula mengalami penurunan dari 16,25 % menjadi 8,004 % pada hari ke 8,7 (t₂₀₈). Penurunan terjadi karena karbohidrat dikonsumsi oleh sel sebagai sumber karbon, dan terjadi perubahan menjadi asam. Dalam proses tersebut gula yang terkonversi sebesar 50,74 %.

Proses fermentasi tersebut digabungkan sehingga terlihat kondisi yang jelas, yaitu pertumbuhan sel berasosiasi dengan pembentukan produk. Kondisi pH dan kadar gula juga mengalami penurunan, yang menunjukkan adanya perubahan karbohidrat (pH : 5,6 - 3,94) menjadi asam dan terdapat gula yang terkonversi menjadi asam sitrat. Digambarkan pada gambar 4.9.



Gambar 4.9 Kurva asam total, berat sel kering, pH dan penurunan kadar gula terhadap waktu

4.6 Pengaruh Penambahan Suplemen terhadap Produksi Asam Sitrat

Minyak banyak mengandung asam-asam lemak bebas jenuh (*saturated fatty acids*) dan tak jenuh (*unsaturated fatty acids*) yang dapat meningkatkan metabolisme *Aspergillus niger*. VCO (*virgin Coconut Oil*) adalah minyak yang mengandung $\pm 55\%$ asam lemak jenuh (asam laurat).

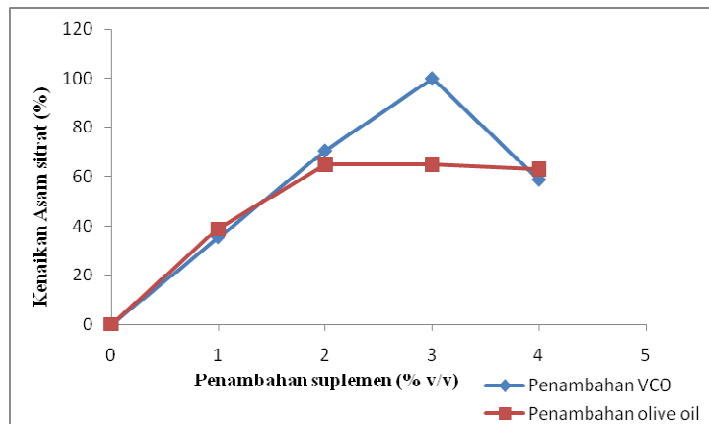
Berdasarkan kenyataan diatas maka dalam tahap ini dilakukan fermentasi asam sitrat tanpa dan dengan penambahan VCO 1, 2, 3, dan 4 % (v/v). Yield yang didapatkan dalam produksi asam sitrat tanpa dan dengan penambahan VCO 1, 2, 3, 4 % (v/v) dengan penentuan kadar gula setelah proses 7 hari diperlihatkan pada tabel 4.3 :

Tabel 4.3 Hasil Analisis Yield Asam Sitrat Pada Variasi Penambahan VCO

No.	Kode sampel	Kadar gula awal (%)	Gula total (invert) (%)	Kadar asam sitrat (%)	Yield (%)
1.	Tanpa VCO	16,25	6,384	1,7415	17,65
2.	VCO 1 % (v/v)	16,25	6,757	2,2310	23,50
3.	VCO 2 % (v/v)	16,25	6,482	2,6176	26,80
4.	VCO 3 % (v/v)	16,25	6,068	3,0879	30,33
5.	VCO 4 % (v/v)	16,25	7,321	2,6818	30,03

Hasil yang didapatkan dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Millis N.F.(1963) terhadap *beet-molasses* yang ditambah *olive oil* dalam memproduksi asam sitrat.

Kurva kenaikan produksi asam sitrat pada variasi penambahan VCO (*Virgin Coconut Oil*) dan *olive oil* ditunjukkan pada gambar 4.10 yang membandingkan produksi asam sitrat dari molase tebu dengan penambahan VCO dan *beet-molasses* yang ditambah dengan *olive oil*.



Gambar 4.10 Kurva produksi asam pada penambahan suplemen terhadap waktu

Gambar 4.10 memperlihatkan kenaikan aktivitas *Aspergillus niger* yang ditambah dengan *olive oil* dan VCO, pengaruh penambahan lemak dipengaruhi oleh komposisi asam lemak jenuh dan asam lemak tidak jenuh. Kadar asam lemak jenuh tinggi berhubungan pada jumlah atom karbon yang ada, sehingga berpengaruh pada inhibitor dari sel, yang pasti dapat mempengaruhi aktivitas sel dalam memproduksi asam. Karbon dibutuhkan untuk memproduksi asam dan dikonsumsi oleh mikroba untuk kehidupannya. Meskipun menurut Millis tidak berpengaruh pada biomassa, tetapi aktivitas sel dapat menaikkan kadar yield asam yang dihasilkan.

Olive oil mempunyai kandungan asam lemak tak jenuh sebanyak $\pm 39,2\%$ (oliumolivarum.blogspot.com/2009/11/), sedang asam lemak tak jenuh pada VCO sangat kecil, yaitu $\pm 8\%$ (www.etalase-muslim.com/product). Komposisi tersebut berpengaruh pada jumlah karbon yang terkandung (misal palmitat atom karbon 16, oleat atom karbon 18).

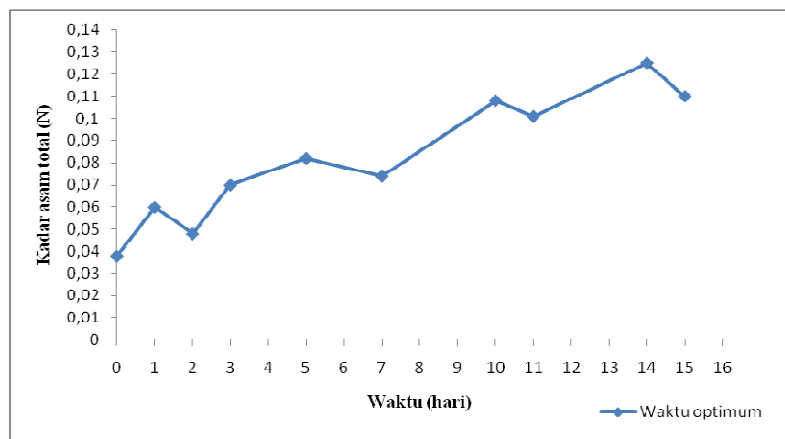
Penggunaan VCO sebagai suplemen memungkinkan digunakan dalam menaikkan produksi asam sitrat, karena kenaikan tertinggi didapatkan sebesar 100% , sedang penambahan *olive oil* kenaikan tertinggi sebesar $64,81\%$. Penelitian dengan penambahan jenis minyak yang lain perlu dilakukan, misal minyak wijen (kandungan

asam lemak tak jenuh 85,8%) atau minyak jagung (kandungan asam lemak tak jenuh 86,4 %) (Ketaren S., 1986).

Data-data dari proses batch dengan *submerged fermentation* digunakan sebagai dasar dalam melakukan penelitian proses kontinyu menggunakan *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ yang diimobilisasi dengan kondisi proses sama, sebagai aerasi digunakan pompa udara dengan laju alir 1 vvm, substart dipanaskan menggunakan hot plate pada suhu 30 °C.

Penentuan waktu fermentasi secara kontinyu perlu dilakukan untuk mengetahui waktu produksi optimum asam sitrat menggunakan *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ yang diimobilisasi. Penelitian dilakukan dengan melakukan proses batch menggunakan *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ yang diimobilisasi dalam *incubator shaker* dengan kondisi proses sama dengan proses batch dan sel bebas, yaitu : kecepatan 200 rpm, suhu 30 °C dan pH 6,0.

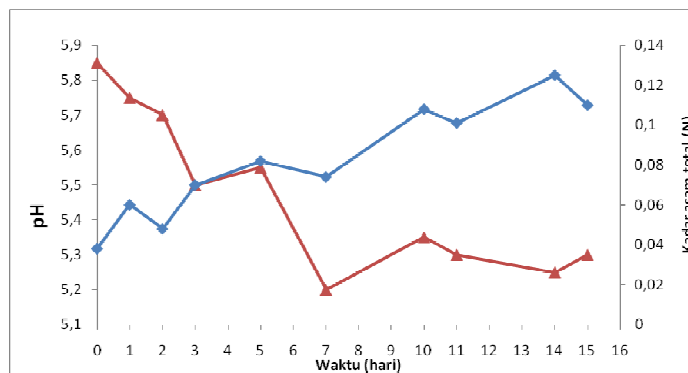
4.7 Produksi asam total maksimum pada *Aspergillus niger* ITB CC L74 sel terimobilisasi dengan proses batch



Gambar 4.11 Kurva produksi asam total maksimum pada *Aspergillus niger* ITB CC L74 terimobilisasi dengan proses batch

Produksi asam total dalam proses batch dan semi kontinyu menggunakan sel *Aspergillus niger* ITB CC L74 yang diimobilisasi, lebih lama dibandingkan pada proses batch dan sel bebas, sehingga perlu dicari kondisi untuk memperbesar hasil dan mempunyai kemurnian tinggi, yang menguntungkan dalam segi kualitas dan kuantitas. Penambahan suplemen VCO, diharapkan mampu mempercepat dan memperbanyak hasil asam sitrat, karena lemak selain dapat digunakan sebagai anti buih, dapat menaikkan hasil tanpa mempengaruhi jumlah sel kering. Pemilihan VCO didasarkan produksi di Indonesia sangat besar dan penggunaan baru di bidang kesehatan. Kondisi optimum menghasilkan asam total 0,125 N.

Hubungan antara produksi asam total dan pH diperlihatkan pada gambar 4.12, sebagai berikut :

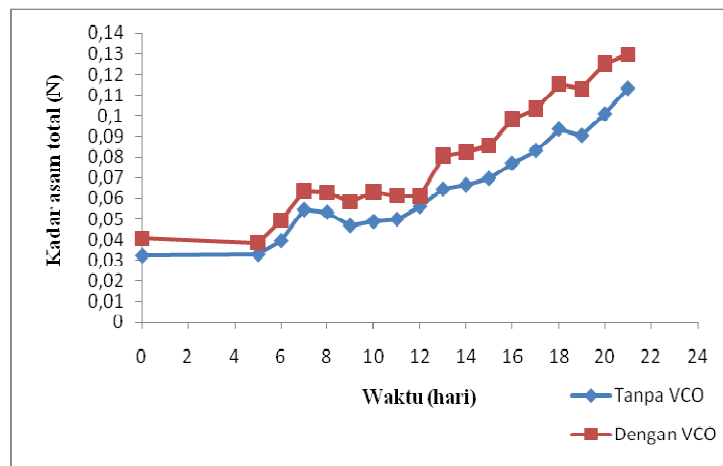


Gambar 4.12 Kurva produksi asam total dan pH terhadap waktu

Kurva produksi asam dan pH diperlihatkan pada gambar 4.12, meskipun terjadi penambahan asam tetapi pH tidak mengalami penurunan, karena dalam proses *fed-batch* substrat terus ditambahkan sehingga volume substrat tetap, mengakibatkan tidak terjadi penurunan pH. Pada keadaan tersebut aktivitas sel terus berjalan, berarti produksi asam terus terjadi, meskipun kenaikan kadar asam tidak sebesar pada proses batch dan sel bebas, tetapi pada proses kontinyu mempunyai keuntungan dalam pemisahan hasil dan penggunaan sel imobilisasi dapat digunakan lebih dari satu kali.

Grafik menunjukkan pada hari ke 15 produksi asam sitrat mengalami penurunan, sehingga ditentukan produksi maksimum pada hari ke 14, selanjutnya proses kontinyu dilakukan lebih dari 14 hari, untuk mengetahui hasil asam total yang didapat sampai hari ke 14 dan seterusnya.

4.8 Proses produksi asam sitrat pada sel terimobilisasi dan proses semi kontinyu



Gambar 4.13 Kurva produksi asam total dengan penambahan VCO dan tanpa VCO terhadap waktu

Gambar 4.13 memperlihatkan adanya kenaikan produksi asam total pada penambahan VCO, produksi asam total mengalami kenaikan dari t_1 sampai t_{21} , meskipun kenaikan tidak terlalu tinggi, pada hari ke 21, saat proses dihentikan hasil asam total sebesar 0,11326 N dengan jumlah asam sitrat 0,00773 N (6,82 %) dan yield sebesar 23,52 % tanpa penambahan VCO 3% (v/v) menjadi 0,1298 N, kandungan asam sitrat 0,0092 N (7,11 %) dan yield sebesar 28,02 % pada penambahan VCO 3 % (v/v) atau kenaikan rata-rata sebesar 22,22 %. Penentuan jumlah spora optimum dan waktu pertumbuhan optimum dapat memberikan kondisi yang tepat dalam melakukan inokulasi dalam pembuatan inokulum, yaitu 8,5 hari. Selain itu data-data pada proses batch memungkinkan diterapkan pada proses semi kontinyu, baik pada sel bebas maupun sel terimobilisasi dalam kolom imobilisasi.

4.9 Hasil analisis produksi asam sitrat secara batch dan semi kontinyu

Perbandingan produksi asam sitrat secara batch dengan sel bebas dan semi kontinyu pada sel terimobilisasi tanpa dan dengan penambahan VCO diperlihatkan pada tabel 4.4.

Tabel 4.4 Perbandingan Hasil Analisis Yield Asam Sitrat Pada Proses Batch dan Semi Kontinyu

No.	Waktu Produksi (hari)	Kode sampel	Kadar gula awal (%)	Gula total (invert) (%)	Kadar asam sitrat (%)	Yield (%)
1.	7	Sel bebas (tanpa VCO)	16,25	6,384	1,7415	17,65
2.	7	Sel bebas VCO 3 % (v/v)	16,25	6,068	3,0879	30,33
3.	21	Sel imobilisasi (tanpa VCO)	16,25	7,702	2,0109	23,52
4	21	Sel imobilisasi VCO 3 % (v/v)	16,25	8,238	2,2450	28,02

Data analisis menunjukkan waktu produksi asam sitrat secara batch dan sel bebas dengan penambahan VCO lebih pendek dibandingkan produksi asam sitrat secara semi kontinyu dengan sel terimobilisasi, tetapi keuntungan pemakaian sel terimobilisasi sebagai biokatalis dalam berapa kali produksi perlu dilakukan penelitian.

Penambahan VCO sebesar 3 % (v/v) dapat menaikkan produksi asam sitrat, meskipun tidak terlalu tinggi, maka perlu dilakukan penelitian dengan variasi penambahan VCO dan penggunaan jenis lemak yang lain.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

Dalam produksi asam sitrat dari molase dengan melihat pengaruh penambahan VCO terhadap *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ yang diimobilisasi, pada proses batch dan kontinyu, terlihat pengaruh positif pada hasil yang didapatkan, meskipun pengaruh tidak terlalu besar.

5.1 KESIMPULAN:

1. Penentuan waktu optimum pertumbuhan spora terjadi pada hari ke 7 dengan jumlah $14,7 \times 10^7$ spora/ml, memenuhi dalam penentuan jumlah spora $10^5 - 10^8$ spora/ml.
2. Penentuan waktu optimum inokulasi pada proses batch, selama 7 hari dan waktu pertumbuhan dalam PDB selama 36 jam, sedang pada sel terimobilisasi dengan proses batch selama 14 hari, kondisi tersebut dapat menjadi dasar saat melakukan inokulasi dan penambahan VCO terbaik, yaitu 3 % (v/v).
3. Kondisi proses yang dilakukan pada proses batch dengan melakukan analisa variabel yang berpengaruh pada produktivitas *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ dalam menghasilkan produk, mendapatkan data yang memenuhi, yaitu pertumbuhan berat sel kering 0,5041 gram/ml berasosiasi dengan jumlah asam total 0,166098 N atau asam sitrat sebanyak 0,0046 N (2,7960 %) dan penurunan pH dari 5,6 menjadi 3,7, juga penurunan kadar gula 16,25 % menjadi 8,004 % atau gula terkonversi sebesar 50,74 % dapat digunakan sebagai dasar dalam pencapaian produk yang maksimum.
4. Pengaruh penambahan VCO sebagai suplemen dengan membandingkan penambahan *olive oil* yang telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya, memungkinkan dalam penggunaan suplemen untuk menambah aktivitas *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ dalam menaikkan asam sitrat. Penggunaan

dengan pengaruh terbesar terjadi pada penambahan 3 % (v/v), yaitu kenaikan sebesar 100 % pada hari ke 7.

5. Berdasar data-data pada proses batch, ditentukan waktu produksi asam total pada sel terimobilisasi, didapatkan waktu produksi optimum pada proses batch pada hari ke 14 dengan asam total sebesar 0,125 N dan pH 5,20.
6. Pada proses kontinyu dengan sel *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ yang diimobilisasi dan diproduksi selama 21 hari, kandungan asam total sebesar 0,11326 N atau asam sitrat sebesar 0,00773 N (6,82 %) dengan yield sebesar 23,52 %. Sedangkan hasil yang didapatkan pada penambahan VCO 3 % (v/v), sebanyak 0,12980 N untuk asam total atau 0,0092 N (7,11 %) asam sitrat dengan yield sebesar 28,02 %.

5.2 SARAN:

1. Proses pemurnian produksi asam sitrat yang dihasilkan perlu dilakukan pada penelitian selanjutnya, sehingga analisa asam sitrat lebih akurat.
2. Pemasangan jaket yang digunakan pada kolom imobilisasi dibuat permanen, sehingga pengaturan suhu lebih akurat.
3. Penentuan asam sitrat yang diproduksi menggunakan data-data hasil analisa menggunakan HPLC, sehingga data yang diberikan lebih teliti.

BAB VI

RINGKASAN

Molase merupakan *by product* industri gula dengan kandungan gula cukup tinggi, yang merupakan persyaratan dalam produksi asam sitrat. Berdasarkan hal tersebut, maka dilakukan penelitian penggunaan molase sebagai substrat dalam produksi asam sitrat. Biokatalis digunakan *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄, merupakan hasil isolasi Laboratorium Mikrobiologi Teknologi Bioproses ITB.

Aspergillus niger merupakan biokatalis yang mampu mendegrasi gula menjadi asam sitrat dengan kondisi proses sesuai media pertumbuhannya, yaitu pH 6,0, pengadukan 200 rpm dan suhu 30 °C.

Penelitian dilakukan untuk mengetahui kemampuan *Aspergillus niger* dengan penambahan suplemen VCO 3 % (v/v) yang diimobilisasi dalam produksi asam sitrat. Penentuan kondisi proses dilakukan berdasarkan data-data pada proses secara batch.

Produksi maksimum dapat dicapai bila kondisi proses memenuhi, maka dilakukan analisis karakteristik molase, yaitu kandungan logam, diperoleh : kandungan MgO, Fe, Mn, dan Zn masing-masing 0,37 %, 226 ppm, 31 ppm, dan 10 ppm, sedang kadar gula total sebesar 43,98 %, dan pH 5,6. Karakteristik penting dilakukan untuk menentukan kondisi proses yang memenuhi dalam produksi asam sitrat. Pencapaian produksi maksimum, ditentukan pada waktu pertumbuhannya.

Berdasarkan literatur proses pembuatan asam sitrat meliputi : batch, *fed-batch*, semi kontinyu dan secara kontinyu, dengan memanfaatkan mikroba. Penelitian disini menggunakan *Aspergillus niger* ITBCC L₇₄ yang diimobilisasi dalam kolom imobilisasi, untuk mendapatkan produk dengan kemurnian tinggi. Produktivitas sel akan meningkatkan hasil, maka ditentukan waktu optimum pertumbuhan sel, sehingga jumlah spora mencapai 10⁵-10⁸/ml media, yang didapatkan pada 7 hari inokulasi dalam media PDA. Dalam media PDB dan molase waktu pertumbuhan fase eksponensial dicapai selama 1 hari 12 jam dan 1 hari 16,5 jam. Produktivitas sel pada waktu pertumbuhan optimum memberikan hasil yang baik, dilihat dari jumlah spora pada hari ke 7 mencapai 14,7 x 10⁷ spora / ml media, sedang produksi asam sitrat pada hari ke 7 mencapai 1,7415 % dan yield sebesar 17,65 %, penurunan pH mencapai 3,94 dan berat sel kering 0,5041 gam/ml. Kenaikan berat sel kering menunjukkan adanya aktivitas sel. Untuk menaikkan kadar asam total dilakukan penambahan suplemen VCO dengan variasi penambahan VCO (*Virgin Coconut Oil*) 0, 1, 2, 3, 4 % (v/v), kenaikan terbesar didapatkan pada penambahan 3 % (v/v), sebesar 100 %. Data-data yang didapatkan pada proses batch, selanjutnya digunakan untuk kondisi sel terimobilisasi proses semi kontinyu. Produk asam total yang didapatkan pada hari ke 21, saat proses dihentikan sebesar 0,11326 N dengan jumlah asam sitrat 0,00773 N (6,82 %) dan yield sebesar 23,52 % tanpa penambahan VCO 3% (v/v) menjadi 0,1298 N dengan kandungan asam sitrat 0,0092 N (7,11 %) pada penambahan VCO 3 % (v/v) dan yield sebesar 28,02 %.

Daftar Pustaka

Adham, 2001, "Attempt at improving citric acid fermentation by *Aspergillus niger* in beet- molasses", *Bioresource Technology*, hal 97 – 100.

Ali, Ikram, Qadeer, Iqbal, 2002. "Production of Citric Acid by *Aspergillus niger* Using Cane Molasses in a Stirred Fermentor" , *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol 5, No.3.

Bu 'Lock dan Kristiansen, 1987, "Basic Technology", Academic Press Inc. London.

Crueger W. dan A. Crueger, 1984, "Biotechnology : A Textbook of Industrial Microbiology", Sinauer Ass. Inc., Sunderland-Sci. and Tech. Inc. Madison

Chibata, 1978, " Immobilized Enzymes, Research and Development", Kodansha Ltd, Tokyo.

Chauhary, A.Q. dan Pirt, SJ. 1966, " The influence of metal complexing agents on citric acid production of *Aspergillus niger*", *J. Gen Microbial*, 43, 71-81.

Dellweg, 1983, (ed) "Biotechnology", Vol 3, Chemie, Weinheim,

Demirel, Yaykasli, Yasar, 2004, "The production of citric acid by using immobilized *Aspergillus niger* A-9 and investigation of its various effects", *Food Chemistry*, hal 393 – 396.

Doelger and Prescott, 1934, "Industrial Engineering Chemical", Copyright 1934 by the American Chemical Society.

Guilherme, Pinto, Rodrigues, 2007. "Optimization of Trace Metal Concentration on Citric Acid Production by Aspergillus niger NRRL 2001", *Food Bioprocess Technol*, hal 246 – 253.

Hidayat, 2008. "*Fermentasi Asam Sitrat*". <http://www.google.com/>

Ikram, Ali, Qadeer, Iqbal, 2002. "Citric Acid Fermentation by mutant strain of Aspergillus niger GCMC-7 using molasses based medium", *Electronic Journal of Biotechnology*, vol 5 No.2.

Lotfly, Ghanem, Helow, 2007. "Citric Acid Production by a novel *Aspergillus niger* Isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies", *Bioresource Technology* 98, hal 3464 – 3469.

Lidya, Bevi dan Nancy Siti Dj. 2000. "*Dasar Bioproses*". Bandung: Polban

Ketaren S., 1986, "Pengantar Teknologi : Minyak dan Lemak Pangan", UI-Press.

Millis, Trumpy, Palmer, 1963, "The Effect of Lipids on Citric Acid Production by an *Aspergillus niger* Mutant", *J. gen. Microbiol* 30, hal 365-379.

Narayana, Kishore, Reddy, 2006, " Biokinetic Studies on Citric Acid Production Using *Aspergillus niger* in Batch Fermentor", *Indian Chemical Engineer*, Vol. 4 No.4, hal 217 – 229.

Poeponegoro dan Milono, 2005. "*Pengaruh Limitasi Nutrien pada Fermentasi Asam Sitrat secara Biak-Rendam dengan Kapang Aspergillus niger ATCC 11414*". Bandung : ITB Central Library.

Rahman, 1992, "Produksi Metabolit Primer", Penerbit ARCAN, Jakarta.

Sumo, Sumantri, Subono, 1993, "Prinsip Bioteknologi", PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.

Sankpal, Joshi, Kulkarni, 2001, "Citric acid production by *Aspergillus niger* immobilized on cellulose microfibrils : influence of morphology and fermenter conditions on productivity", *Process Biochemistry*, hal 1129 – 1139.

Sa'id, 1987, "Penerapan Teknologi Fermentasi", PT. Mediyatama Sarana Perkasa, Jakarta.

Standury, Peter dan Allan Whitaker. 1984. "*Principles of Fermentation Technology*". Oxford England: Pergamon Press

United Molasses, 1973, Olbrich.

Viegas, R. Andietta, M.G. Andritta, 2002, "Use of Tower Reactors for Continuous Ethanol Production", *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, Vol. 19 no.2.

Wirahadikusumah, 1985, "Biokimia : Metabolisme energi, karbohidrat dan lipid", Penerbit ITB, Bandung.

