

KEMAMPUAN *Aspergillus wentii* DALAM MENGHASILKAN ASAM SITRAT

Ririn Puspadewi, Rina Anugrah, Della Sabila

Fakultas Farmasi Universitas Jenderal Achmad Yani Cimahi
Corresponding author e-mail: ririn.puspadewi@lecture.unjani.ac.id

ABSTRAK

Kegunaan asam sitrat dalam industri makanan, minuman dan farmasi sangat besar salah satunya adalah sebagai pengawet. Beberapa mikroorganisme diketahui dapat menghasilkan asam sitrat melalui proses fermentasi, diantaranya adalah *Aspergillus wentii* dengan memanfaatkan glukosa yang berasal dari karbohidrat sebagai bahan utama. Berdasarkan hal ini maka telah dilakukan penelitian untuk melihat kemampuan *Aspergillus wentii* dalam menghasilkan asam sitrat dengan menggunakan kulit singkong sebagai sumber karbohidrat. Hasil fermentasi antara *Aspergillus wentii* dan kulit singkong dilakukan uji keberadaan asam sitrat secara reaksi kimia. Untuk mengetahui jumlah asam sitrat yang dihasilkan digunakan spektrofotometer UV-Vis. Analisis kualitatif menunjukkan bahwa supernatan hasil fermentasi mengandung asam sitrat. Secara kuantitatif asam sitrat dapat dihasilkan pada masa inkubasi selama enam hari sebesar 0,312 % b/v.

Kata Kunci : Asam sitrat, *Aspergillus wentii*, fermentasi, kulit singkong.

ABSTRACT

The use of citric acid in the food, beverage and pharmaceutical industries is wide, one of them is as a preservative. Some microorganisms are known to produce citric acid through the fermentation process, such as Aspergillus wentii. Aspergillus wentii uses carbohydrate as glucose source in fermentation. This research is conducted to evaluate the ability of Aspergillus wentii to produce citric acid using cassava skin as carbohydrate. The level of citric acid is tested using UV-Vis spectrophotometer. The result showed that citric acid is found in supernatant. Optimal incubation of fermentation is in six days and the level of citric acid is 0,312 % b/v

Keywords : citric acid, *Aspergillus wentii*, fermentation, cassava skin

PENDAHULUAN

Asam sitrat adalah salah satu asam organik penting dalam kehidupan manusia, karena cukup banyak digunakan dalam dunia industri. Sekitar 70% dari asam sitrat yang dihasilkan digunakan dalam industri makanan dan minuman untuk berbagai keperluan, sedangkan 12% digunakan dalam industri obat-obatan dan sekitar 18% untuk kegunaan industri lainnya (Kareem SO dan Rahman RA, 2011).

Permintaan yang tinggi oleh banyak industri sehingga produksi asam sitrat menjadi meningkat dan diproduksi massal di seluruh dunia. Secara alami asam sitrat terdapat dalam buah-buahan seperti jeruk, nanas, pir dan sebagainya. Asam sitrat juga dapat dihasilkan melalui proses kimia dan proses mikrobiologi (Iqbal Q, 2008).

Indonesia mulai memproduksi asam sitrat pada tahun 1993 melalui proses fermentasi. Banyak mikroba yang dapat membentuk asam sitrat sebagai metabolit primer, antara lain adalah

Aspergillus niger, *A. wentii*, *A. clavatus*, *Penicillium luteum*, *P. citrinum*, *Mucor piriformis*, *Paecilomyces divaricatum*, *Citromyces pfefferianus*, *Candida guilliermondii*, *Saccharomycopsis lipolytica*, *Trichoderma viride*, *Arthrobacter paraffineus*, dan *Corynebacterium* sp. Namun sampai saat ini, hanya *Aspergillus niger* yang paling sering digunakan untuk produksi asam sitrat (Soetrisnanto, dkk, 2013). Penelitian dari National Chemical Laboratory, Pune, India juga menyatakan bahwa *Aspergillus wentii* dapat memproduksi asam sitrat (Biswas S, dkk, 2011).

Dalam proses fermentasi, asam sitrat merupakan produk metabolit primer yang terbentuk dari siklus TCA ('Tricarboxylic Acid Cycle'). Glukosa merupakan sumber karbon utama dalam produksinya. Pada sebagian besar mikroba, 80% glukosa dipecah melalui reaksi-reaksi dalam lintasan 'Embden Meyerhof Parnas' (EMP). Asam piruvat yang merupakan produk akhir dari lintasan EMP akan dioksidasi

lebih lanjut dan kemudian dengan bantuan enzim dekarboksilase membentuk asetat (dekarboksilasi). Asetat yang terbentuk berikatan dengan koenzim-A menghasilkan Acetyl-CoA. Selanjutnya Acetyl-CoA dan oksaloasetat yang merupakan salah satu senyawa antara siklus TCA berkondensasi membentuk asam sitrat dengan bantuan enzim pengoksidasi nitrat sintase (Haryani K, 2011).

Di Indonesia, singkong atau ubi kayu merupakan makanan pokok ke tiga setelah padi dan jagung. Produksi rata-ratanya kurang dari 14 ton per hektar, di tahun 1988 Indonesia memproduksi 13 juta ton, dan ini menjadikan Indonesia sebagai produser singkong terbesar kedua di dunia setelah Brazil (Tisnadjadja Dj, 1996).

Dalam pemanfaatan singkong, sering kali menghasilkan limbah kulit singkong. Kulit singkong masih mengandung karbohidrat seperti pati yang merupakan sumber karbon yang baik untuk berbagai proses fermentasi. Sehingga kulit singkong dapat sebagai alternatif lain sumber karbon pada produksi asam sitrat secara fermentasi. Tujuan dilakukan penelitian ini adalah melihat kemampuan *Aspergillus wentii* dalam menghasilkan asam sitrat melalui proses fermentasi dengan menggunakan limbah kulit singkong sebagai substrat.

METODE PENELITIAN

Bahan. Substrat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit singkong, asam sulfat, media 'Potato Dextrose Agar' (PDA), media 'Potato Dextrose Broth' (PDB), amonium klorida, kalium dihidrogen fosfat, magnesium klorida, kalsium klorida, perak nitrat, asam sulfat pekat, natrium hidroksida p.a, indikator phenolphthalein, asam oksalat p.a, alkohol 70%, piridin p.a, asetat anhidrida p.a, asam sitrat p.a, aquabidestilata, kertas saring Whatman no.1. Kultur kapang *Aspergillus wentii* yang diperoleh dari koleksi Institut Pertanian Bogor, nomor koleksi IPBCC 10649/Bio-236.

Alat. Gelas piala, erlenmeyer, gelas ukur, labu takar, tabung reaksi, cawan petri, spatula, batang pengaduk, bunsen, kaki tiga dan kasa, kawat ose, erlenmeyer, pH meter, 'rotary shaker incubator', autoklaf, kapas steril, corong gelas, pipet tetes, pipet volume, krus, timbangan analitik, buret dan statif, spektrofotometer visible (Camspec Model M150), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800 Pharmaspec), blender, oven, inkubator, lemari es.

Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Aspergillus wentii*. Media PDB sebanyak 30 mL dimasukkan ke dalam masing-masing 15 botol penampung yang telah disterilisasi. Starter *Aspergillus wentii* yang telah diremajakan disuspensikan ke dalam air steril sebanyak 10%, kemudian suspensi starter dimasukkan ke dalam masing-masing 15 botol penampung yang berisi media PDB. Satu buah botol penampung dijadikan kontrol (tanpa inkubasi). Botol penampung ditutup menggunakan kapas sumbat dan ditutup dengan alumunium foil, kemudian diinkubasi dalam 'rotary shaker incubator' dengan kecepatan pengadukan 150 rpm pada suhu kamar. Pengamatan dilakukan setiap 24 jam selama 14 hari dengan menimbang berat sel kering. Data berat sel kering yang ditimbang merupakan gambaran jumlah populasi sel kapang pada setiap fase pertumbuhan. Berat sel kering diperoleh dengan cara menyaring sel kapang dengan menggunakan kertas saring Whatman no.1, dan kemudian sel kapang di oven pada suhu 105°C hingga didapatkan bobot tetap. Kurva pertumbuhan dibuat dengan membuat grafik hubungan antara berat sel kering (g) dengan waktu (hari) (Haryani K, 2011).

Penyiapan Substrat Cair Limbah Kulit Singkong. Kulit singkong yang telah dibersihkan dan dipotong-potong ditimbang sebanyak yang dibutuhkan dan diblender kemudian dimasak dengan H₂SO₄ 4% selama 2 jam pada suhu 80°C untuk memecah karbohidrat menjadi glukosa⁽¹⁹⁾. Setelah dimasak sari kulit singkong disaring. Filtrat dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang bersih untuk masing-masing konsentrasi. Ditambahkan amonium klorida 0,167 %, kalium dihidrogen fosfat 0,008 %, dan magnesium fosfat 0,05 % sebagai nutrisi. Selanjutnya erlenmeyer yang berisi medium tersebut ditutup dengan kapas sumbat serta dilapisi dengan alumunium foil, lalu disterilisasi dalam autoklaf pada temperatur 121°C selama 15 menit (Rahmawati A, 2010).

Proses Fermentasi. Proses fermentasi dilakukan dengan menambahkan sebanyak 10% suspensi starter *Aspergillus wentii* dalam air steril secara aseptis ke dalam masing-masing labu erlenmeyer yang berisi substrat kulit singkong. Campuran diinkubasi ke dalam 'rotary shaker incubator' dengan kecepatan pengadukan 150 rpm pada suhu kamar dan difermentasikan hingga fasa stasioner. Cairan hasil fermentasi yang diharapkan mengandung asam sitrat

kemudian disaring dan di sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan kapang dari larutan (Rahmawati A, 2010).

Uji Kualitatif Asam Sitrat

- (i) Larutan supernatan hasil fermentasi direaksikan dengan kalsium klorida yang kemudian dididihkan selama beberapa menit, akan dihasilkan suatu endapan kristalin kalsium sitrat. Jika larutan natrium hidroksida ditambahkan kepada larutan yang dingin yang mengandung kalsium klorida berlebihan, terjadi pengendapan segera dari kalsium sitrat yang amorf.
- (ii) Larutan supernatan hasil fermentasi dipanaskan dengan asam sulfat pekat, dilepaskan karbonmonoksida dan karbondioksida, dan larutan perlahan-lahan akan berubah warna menjadi gelap akibat pemisahan karbon dan belerang dioksida dilepaskan.
- (iii) Larutan supernatan hasil fermentasi direaksikan dengan perak nitrat, maka akan terbentuk endapan yang putih dan seperti dadih susu. Endapan larut dalam larutan ammonia encer dan larutan ini mengalami hanya sedikit sekali reduksi menjadi perak setelah dididihkan (Setiono L, 1985)

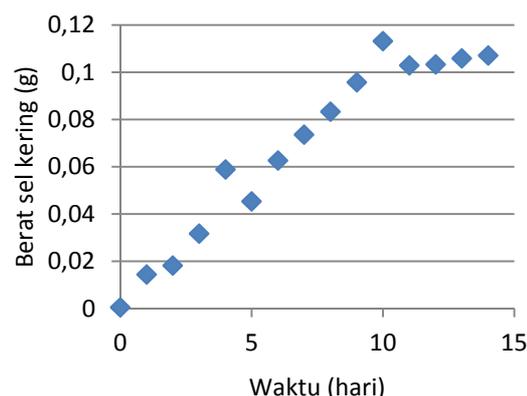
Isolasi Asam Sitrat. Isolasi asam sitrat dilakukan dengan cara 10 mL supernatan diendapkan dengan kalsium klorida, kemudian endapan yang terbentuk disaring. Reaksi pengendapan diulangi pada filtrat hingga tidak terbentuk lagi endapan (pengendapan asam sitrat sempurna). Endapan yang diperoleh ditambahkan sedikit natrium klorida 0,1 N, kemudian disaring kembali. Endapan dibilas dengan aquadest dan ditambahkan asam sulfat 1 N hingga terbentuk endapan kalsium sitrat dan filtratnya adalah asam sitrat (Ovelando R, dkk, 2013).

Pengukuran Asam Sitrat dalam Sampel. Hasil isolasi asam sitrat diambil sebanyak 3 mL, ditambahkan 1,3 mL piridin, dikocok sampai rata, kemudian ditambahkan 5,7 mL asetat anhidrat dan dikocok dengan menggunakan vortex sampai merata. Campuran larutan diinkubasikan pada suhu 32°C selama 30 menit dan akan terbentuk warna kuning muda pada larutan. Dilakukan pembacaan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 407 nm. Nilai serapan yang diperoleh

diinterpolasikan ke dalam persamaan regresi linier kurva kalibrasi dan dihitung kadar asam sitrat dalam sampel (% b/v) (Boulet M dan Marier JR, 1958).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kurva Pertumbuhan *Aspergillus wentii*. Kurva pertumbuhan *Aspergillus wentii* diperoleh dari hasil pengukuran berat sel kering, yang menunjukkan bahwa *Aspergillus wentii* memasuki awal fase log pada hari ke-3 sampai hari ke-8 yang dicirikan dengan adanya pertumbuhan yang signifikan dari sel-selnya dilihat dari kenaikan berat sel kering. Pada hari ke-9 *Aspergillus wentii* mengalami fase berikutnya yaitu fase stasioner dan fase ini berlangsung sampai hari ke 14. Fase stasioner dilihat dari hasil berat sel kering yang konstan. Pada fase ini jumlah populasi sel konstan karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati (Yuliana N., 2008)



Gambar 1. Kurva pertumbuhan *Aspergillus wentii*

Dari kurva pertumbuhan yang dihasilkan, terlihat bahwa semakin lama inkubasi, maka berat sel kering semakin besar, kecuali pada hari ke 5. Pada hari ke 5 berat sel kering *Aspergillus wentii* mengalami penurunan. Hal ini kemungkinan terjadi karena kurangnya aerasi dan agitasi pada saat proses pengadukan. Sehingga sel-sel *Aspergillus wentii* yang seharusnya dihasilkan secara optimal pada fase log terhambat karena kurangnya asupan oksigen yang merupakan kebutuhan untuk pertumbuhan *Aspergillus wentii*.

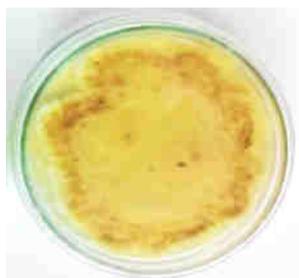
Substrat Cair Limbah Kulit Singkong. Untuk memecah karbohidrat yang terkandung dalam kulit singkong menjadi glukosa, kulit singkong dipanaskan dengan asam sulfat 4%

pada suhu 80°C selama 2 jam (Ferbriningrum PN, 2013).

Glukosa merupakan nutrisi karbon utama yang digunakan dalam produksi asam sitrat secara fermentasi. Dalam proses fermentasi, asam sitrat dibentuk melalui siklus TCA (*Tricarboxylic Acid Cycle*). Lintasan *Embden Meyerhof Parnas* (EMP) akan memecah glukosa melalui reaksi-reaksi dalam lintasan tersebut. Asam piruvat yang merupakan produk akhir dari lintasan EMP akan dioksidasi lebih lanjut dan kemudian dengan bantuan enzim dekarboksilase membentuk asetat (dekarboksilasi). Asetat yang terbentuk berikatan dengan koenzim-A menghasilkan Acetyl-CoA. Acetyl-CoA dan oksaloasetat dalam siklus TCA dengan adanya nitrat sintase akan berkondensasi membentuk asam sitrat (Haryani K, 2011).

Fermentasi. Dalam proses fermentasi dilakukan penambahan nutrisi untuk menunjang pertumbuhan *Aspergillus wentii*. Nutrisi yang ditambahkan adalah ammonium klorida, kalium dihidrogen fosfat, dan magnesium sulfat (Karow E, 1947). Amonium klorida berperan sebagai sumber nitrogen, sedangkan kalium dihidrogen fosfat dan magnesium sulfat berperan sebagai sumber mineral. Mikroba membutuhkan zat-zat nutrisi untuk sintesa komponen sel dan menghasilkan energi. Mineral dibutuhkan mikroba sebagai akseptor elektron dalam metabolisme glukosa dan gula lainnya (Malaka R, Metusalach, Abustam E, 2013).

Fermentasi dilakukan menggunakan starter *Aspergillus wentii* yang ditambahkan sebanyak 10%. Proses fermentasi dilakukan hingga hari ke 13. Pengambilan sampel hasil fermentasi dilakukan pada hari ke 3 yaitu awal fase log, hari ke 6 yaitu pertengahan fase log, hari ke 9 yaitu awal fase stasioner dan hari 13 yaitu fase stasioner. Hasil fermentasi disaring dan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan sel-sel kapang dari larutan hasil fermentasi.



Gambar 2. *Aspergillus wentii* yang digunakan pada proses fermentasi

Uji Kualitatif Asam Sitrat. Pengamatan asam sitrat secara kualitatif dilakukan dengan cara penambahan reaksi kimia terhadap supernatan hasil fermentasi menggunakan CaCl_2 , $\text{H}_2\text{SO}_{4(p)}$ dan AgNO_3 (Setiono L, 1985). Hasil reaksi menunjukkan bahwa supernatan positif mengandung asam sitrat. Supernatan hasil fermentasi direaksikan dengan kalsium klorida yang kemudian dididihkan selama beberapa menit dan menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya suatu endapan kristalin kalsium sitrat. Jika larutan natrium hidroksida ditambahkan kepada larutan yang dingin yang mengandung kalsium klorida berlebihan, terjadi pengendapan segera dari kalsium sitrat yang amorf (Setiono L, 1985).



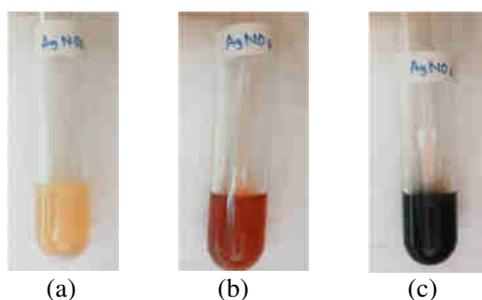
Gambar 3. Hasil reaksi kimia supernatan hasil fermentasi dengan penambahan kalsium klorida.

Reaksi berikutnya supernatan hasil fermentasi dipanaskan dengan asam sulfat pekat menunjukkan hasil positif berupa larutan yang berubah warna menjadi lebih gelap akibat pelepasan karbon (Setiono L, 1985).



Gambar 4. Hasil reaksi kimia supernatan hasil fermentasi dengan penambahan asam sulfat pekat.

Pengujian terakhir yaitu supernatan hasil fermentasi direaksikan dengan perak nitrat menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya endapan perak sitrat yang putih seperti dadih susu. Endapan kemudian larut dalam amonia encer, dan jika dididihkan larutan akan berubah warna menjadi gelap (Setiono L, 1985).



Gambar 5. Hasil reaksi kimia supernatan hasil fermentasi dengan penambahan perak nitrat; (a) terbentuk endapan putih; (b) endapan putih larut; (c) larutan setelah dipanaskan

Isolasi Asam Sitrat. Isolasi dilakukan dengan prinsip pengendapan dan filtrasi. Pengendapan asam sitrat menggunakan CaCl_2 , NaOH dan H_2SO_4 .

Penambahan natrium hidroksida berfungsi untuk membuat suasana menjadi basa sehingga endapan kristal kalsium sitrat lebih terlihat jelas (berbentuk amorf) (Setiono L, 1985). Hasil pengendapan kalsium sitrat dan kalsium fosfat (dipisahkan dengan penyaringan (filtrasi). Filtrat akhir yang didapat adalah asam sitrat yang telah diisolasi yang akan digunakan untuk pengujian kuantitatif asam sitrat.

Pengukuran Asam Sitrat dalam Sampel. Analisis kuantitatif asam sitrat dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan pembentukan kompleks menggunakan pereaksi piridin dan asetat anhidrat. Pembentukan kompleks dilakukan karena asam sitrat tidak memiliki gugus kromofor yang dapat terukur spektrum absorbannya pada spektrofotometer UV-Vis. Dari penentuan panjang gelombang maksimum yang dilakukan, terlihat bahwa larutan kompleks asam sitrat menunjukkan panjang gelombang maksimum pada 407 nm, tidak berbeda jauh dengan panjang gelombang maksimum pada literatur yaitu 420 nm (Boulet M dan Marier JR, 1958). Jika dilihat dari perbandingan spektrum larutan standar dan sampel, terlihat bahwa asam sitrat yang diperoleh masih belum terlalu murni.

Hasil analisis kuantitatif asam sitrat dari larutan fermentasi yang terbentuk hari ke 3 = 0,269% b/v , hari ke 6 = 0,312% b/v , hari ke 9 = 0,186% b/v , hari ke 13 = 0,308% b/v . Berdasarkan kurva pertumbuhan hari ke-6 merupakan fase log dimana jumlah metabolit yang dihasilkan oleh mikroorganisme akan meningkat sehingga pada hari ke-6 dari fase ini kemampuan *Aspergillus wentii* dalam menghasilkan asam sitrat lebih

besar dibanding dengan hari ke-3, ke-9 dan ke-13.

KESIMPULAN

Aspergillus wentii mampu menghasilkan asam sitrat melalui proses fermentasi dengan penambahan substrat limbah kulit singkong. Asam sitrat yang terbentuk paling banyak adalah pada fermentasi hari ke-6 sebanyak 0,312 % b/v .

DAFTAR PUSTAKA

- Biswas Supratim, Banerjee Pataki C, Mukherjee Siddhartha, Dey Rajib. 2013. Microbial Extraction of Cobalt and Nickel from Lateritic Chromite Overburden using *Aspergillus wentii*. *Agriculture and Biology Journal Of North Americ*. Jadavpur University. Kolkat.; 739.
- Boulet M dan Marier JR. Direct Determination of Citric Acid in Milk with an Improved Pyridine-Acetic Anhydride Method. 1958. Division of Applied Biology. National Research Council. Ottawa. Canada.
- Ferbriningrum PN. 2013. Pengaruh Konsentrasi Substrat Kulit Nanas dan Kecepatan Pengadukan terhadap Pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* untuk Produksi Asam Laktat. *Jurnal Rekayasa Kimia dan Lingkungan*. 9: 144-151.
- Haryani Kristinah. Studi Kinetika Pertumbuhan *Aspergillus niger* Pada Fermentasi Asam Sitrat dari Kulit Nanas Dalam Reaktor Air-Lift External Loop. 2011. Jurusan Teknik Kimia. Fakultas Teknik Universitas Diponegoro. Semarang, 7 : 48–52.
- Iqbal Qaiser. Quantification of Fungal Biomass Growth During Citric Acid Production by *Aspergillus niger* on Expanded Clay Solid Substrate. 2008. Department of Bioresource Engineering McGill University, Montréal;. Hal. 2.
- Kareem SO dan Rahman RA, Utilization of Banana Peels for Citric Acid Production by *Aspergillus niger*. 2011. *Agriculture and Biology Journal Of North America*.; 384-387.
- Karow Edward O dan Waksman Selman A. 1947. Production of Citric Acid in Submerged Culture. New Jersey Agricultural Experiment Station. Rutgers University. New Brunswick.
- Malaka Ratmawati, Metusalach, Abustam Effendi. 2013. Pengaruh Jenis Mineral

- Terhadap Produksi Eksopolisakarida dan Karakteristik Pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus* Strain Ropy dalam Media Susu. Fakultas Peternakan. Program Studi Teknologi Hasil Ternak. Universitas Hasanuddin. Fakultas Perikanan Universitas Hasanuddin.
- Ovelando Redho, Nabilla Mutiara A dan Surest Azhary A. 2013. Fermentasi Buah Markisa (*Passiflora*) Menjadi Asam Sitrat. Teknik Kimia. Universitas Sriwijaya. 1-7.
- Rahmawati Ani. Pemanfaatan Limbah Kulit Ubi Kayu (*Manihot utilissima* Pohl.) dan Kulit Nanas (*Ananas comosus* L.) Pada Produksi Bioetanol Menggunakan *Aspergillus niger*. 2010. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Setiono L. 1985. Vogel Buku Teks Analisis Anorganik Kualitatif Makro dan Semimikro. PT. Kalman Media Pusaka. Jakarta.
- Soetrisnanto Danny, Istadi, Nugroho Amin, Susanto Heru dan Widayat. 1998. Pembuatan Asam Sitrat dari Sagu dengan Cara Fermentasi pada Media Cair. Fakultas Teknik. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Tisnadjaja Djatdjat. Pemanfaatan Bahan Berpati Sebagai Bahan Baku Dalam Industri Asam Sitrat, 1996. Bogor Warta Biotek TH.X No.1.Puslitbang Bioteknologi-LIPI; Hal 3-5.
- Yuliana Neti. Kinetika Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Isolat T5 yang Berasal dari Tempoyak. 2008. Staf Pengajar Jurusan Teknologi Industri Pertanian. Fakultas Pertanian. Universitas Lampung.