

**FERMENTASI GLUKOSA OLEH *Aspergillus niger*
MENJADI ASAM GLUKONAT**



**Disusun Oleh:
Dra. H. Maria Ingrid, MSc.
Prof. Ign Suharto, APU.**

**Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat
Universitas Katolik Parahayangan
2012**

ABSTRAK

Asam glukonat adalah asam organik yang banyak digunakan dalam bidang farmasi, makanan, deterjen, tekstil, dan industri lainnya. Asam glukonat dihasilkan dari fermentasi glukosa secara aerobik oleh enzim glukosa oksidase dan glukosa dehidrogenase yang berasal dari *Aspergillus niger*.

Tujuan penelitian jangka panjang ialah mempelajari biomassa menjadi berbagai macam produk asam organik yang cukup mahal seperti biosirup, asam asetat, asam sitrat, asam glukonat, dan asam laktat. **Tujuan jangka pendek** ialah mempelajari transfer inokulum *Aspergillus niger* dari skala tabung reaksi ke bioreaktor 100 mL (erlenmeyer) dan berakhir ke bioreaktor kapasitas 2.000 mL, mempelajari pengaruh konsentrasi substrat glukosa dan inokulum, serta pengaruh pengadukan pada fermentasi glukosa oleh *A.niger*. **Target** yang akan dicapai ialah model transfer inokulum *A.niger* dan besaran kimia serta fisika yang dijadikan landasan teori untuk *scale up* bioreaktor ke skala *semi pilot plant* fermentasi aerobik.

Metode penelitian meliputi dua tahap, yaitu; **tahap pertama** pembuatan inokulum *A.niger* dari skala tabung reaksi ditransfer skala erlenmeyer 100 mL dan berakhir ke skala bioreaktor 2.000 mL, parameter yang diamati adalah penurunan konsentrasi substrat glukosa, pH dan berat sel kering. **Tahap kedua**, yaitu fermentasi aerobik glukosa oleh *A.niger* dalam biorektor skala 2.000 mL dengan inokulum 2% pada berbagai konsentrasi substrat dan kecepatan agitasi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa transfer *A.niger* pada tabung reaksi ke bioreaktor skala 100 mL tumbuh dan berkembang biak dengan baik. Transfer inokulum *A.niger* dari bioreaktor skala 100 mL ke skala 2.000 mL, maka *A.niger* tumbuh dan berkembang biak dengan baik, produk asam glukonat hasil fermentasi adalah 24,89 ppm pada bioreaktor skala 2.000 mL, konsentrasi glukosa berkurang dari 150 g/L menjadi 80,98 g/L dengan kecepatan pengadukan optimal 300 rpm dan menghasilkan pH 2,6.

Kata kunci : Glukosa, asam glukonat, *A.niger*, aerasi, pengadukan, *scaleup*

DAFTAR ISI

SAMPUL MUKA.....	i
ABSTRAK.....	ii
DAFTAR ISI.....	iii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tema Sentral Masalah.....	2
1.3 Hipotesis.....	2
1.4 Tujuan Penelitian.....	2
1.5 Target Penelitian.....	3
1.6 Urgensi Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Bahan Baku Asam Glukonat.....	5
2.2 Asam Glukonat.....	5
2.3 <i>Aspergillus niger</i>	10
BAB III METODE PENELITIAN.....	12
3.1 Metode Penelitian.....	12
3.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	12
3.3 Prosedur Penelitian.....	13
3.4 Tahap Persiapan Inokulum.....	13
3.5 Uji Coba Inokulum <i>A.niger</i> pada Bioreaktor Skala 2.000 mL.....	15
3.6 Analisis.....	15
3.7 Fermentasi Glukosa oleh <i>A.niger</i> pada Erlenmeyer 100 mL sebagai Bioreaktor.....	17
3.8 Fermentasi Glukosa oleh <i>A.niger</i> pada Bioreaktor 2.000 mL.....	17
3.9 Analisis Konsentrasi Glukosa Berat Sel Kering dan pH.....	18
BAB IV JADWAL PELAKSANAAN.....	20
4.1 Jadwal Pelaksanaan Penelitian.....	20
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	21
5.1 Hasil Penelitian Skala Bioreaktor 100 ml.....	21
5.2 Pengaruh Variasi Konsentrasi Inokulum dan Substrat terhadap pH.....	24
5.3 Pengaruh Variasi Konsentrasi Inokulum dan Substrat terhadap Berat Sel Kering....	25
5.4 Transfer Inokulum <i>A.niger</i> dari Skala Bioreaktor 100 mL ke Bioreaktor 2.000 mL.....	26
5.5 Analisis Asam Glukonat dengan HPLC.....	29

BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	32
6.1 Kesimpulan.....	32
6.2 Saran.....	32
DAFTAR PUSTAKA.....	33

1.2 Tema Sentral Masalah

Tema sentral masalah penelitian ini adalah adanya ketidakjelasan dan ketidakpastian mengenai pengaruh kadar glukosa dan inokulum *Aspergillus niger* dalam proses fermentasi aerobik dengan reaktor *batch* terhadap perolehan asam glukonat oleh tiadanya landasan teori yang jelas mengenai faktor variabel tersebut, dan sampai saat ini industri asam glukonat belum diproduksi secara komersial di Indonesia.

1.3 Hipotesis

Fermentasi glukosa menjadi asam glukonat dipengaruhi oleh kadar glukosa dan banyaknya inokulum *Aspergillus niger* serta kondisi fermentasi, yaitu aerasi, pH dan suhu fermentasi.

1.4 Tujuan Penelitian

1.4.1 Tujuan Penelitian Jangka Panjang

Mempelajari biomassa menjadi berbagai macam produk asam organik volume kecil, namun harganya mahal seperti biosirup, asam asetat, asam sitrat, asam glukonat, asam itakonik, dan asam laktat.

1.4.2 Tujuan Penelitian Jangka Pendek

1. Mempelajari transfer inokulum *A.niger* dari skala tabung reaksi ke skala bioreaktor 100 mL dan berakhir ke skala bioreaktor skala 2.000 mL dalam fermentasi glukosa oleh *A.niger*.
2. Mempelajari rancangan bioreaktor skala laboratorium untuk fermentasi substrat glukosa oleh *A.niger* menjadi asam glukonat dalam bentuk gambar teknik,
3. Mempelajari pengaruh konsentrasi substrat glukosa dalam proses fermentasi aerobik oleh *A. niger* secara *batch* terhadap perolehan asam glukonat,
4. Mempelajari pengaruh konsentrasi inokulum *A.niger* dalam proses fermentasi aerobik substrat glukosa oleh *A. niger* secara batch terhadap perolehan asam glukonat,

5. Mempelajari interaksi antara konsentrasi substrat glukosa dan konsentrasi inokulum *A. niger* dalam fermentasi glukosa oleh *A. niger* terhadap perolehan asam glukonat.

1.5 Target Penelitian

Target dicapai ialah model transfer inokulum *A.niger* dari skala kecil ke skala lebih besar diperoleh besaran parameter kimia dan fisika yang dijadikan landasan teori fermentasi aerobik substrat glukosa oleh *A.niger* ke *scaleup* bioreaktor yang lebih besar. Target penelitian ini didapat hasil (*invention*) besaran parameter kimia dan fisika yang selanjutnya dianalisis secara ilmiah diperoleh inovasi bioreaktor untuk fermentasi glukosa oleh *A.niger* menjadi asam glukonat.

1.6 Urgensi Penelitian

Biokonversi glukosa oleh mikroba menjadi asam organik lebih menguntungkan secara ekonomi jika substrat glukosa dikonversikan menjadi asam glukonat, karena asam glukonat termasuk volume kecil, namun harganya sangat mahal jika dibandingkan dengan harga asam organik lainnya.

Asam glukonat dan asam organik lain merupakan produk fermentasi terbesar ketiga di pasar dunia setelah antibiotik dan asam amino. Asam glukonat dapat diproduksi 60.000 ton tiap tahunnya, namun harganya sangat mahal sekitar Rp 120.000/kg, sehingga mempunyai nilai ekonomi untuk diterapkan pada industri tradisional, sebagai bahan koagulasi susu kedelai dan produk tahu (*Tofu*) karena cita rasa tahu lebih halus. Selain itu, asam glukonat banyak dimanfaatkan sebagai aditif untuk industri semen.^[6] Tarikan pasar (*market needs*) terhadap produk asam glukonat sangat besar. Berikut ini adalah tabel harga jual asam glukonat dan turunannya:

Tabel 1: Produk Turunan Asam Glukonat^[6]

Produk	Aplikasi Utama	Rata-Rata Harga	
		\$/kg	Rp/kg
Asam glukonat	Industri semen	1,20	10.924
Sodium glukonat	Industri semen	2,00	18.206
Sodium glukonat murni	Industri makanan	3,00	27.309
Kalsium glukonat dan gluko- delta- laktone	Industri makanan dan obat-obatan	8,50	77.376

(Konversi dollar ke rupiah pada tanggal 28 November 2011)

Jenis produk asam glukonat sangat dibutuhkan untuk industri:

1. Industri tahu (*Tofu*) sutera,
2. Industri obat-obatan dan
3. Industri farmasi, makanan sebagai aditif
4. Industri kimia seperti industri deterjen dan tekstil di Indonesia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bahan Baku Asam Glukonat

Sumber glukosa dapat diperoleh dari bahan baku singkong, ubi jalar, pati jagung, sagu yang terdapat melimpah di Indonesia. Biomassa ini merupakan sumber daya alam terbarui (*Renewable resources*) yang berfungsi sebagai sumber karbon untuk tumbuh dan berkembang biaknya mikroba, sehingga mampu menghasilkan berbagai macam produk bahan baku kimia industri, seperti asam organik yaitu asam asetat, asam glukonat, asam sitrat dan biomaterial.

Biomassa dan limbah lignosellulosa dapat diproses melalui teknologi proses kimia dan bioteknologi dimana biomassa dan limbah lignosellulosik menjadi selulosa, lignin, dan hemisellulosa. Perbedaan proses kimia dan bioteknologi bahwa proses bioteknologi dilakukan tahap demi tahap karena berhubungan dengan pertumbuhan mikroba pada kondisi suhu dan tekanan normal, sedangkan pada proses kimia berlangsung pada suhu dan tekanan dari rendah sampai tinggi.

2.2 Asam Glukonat

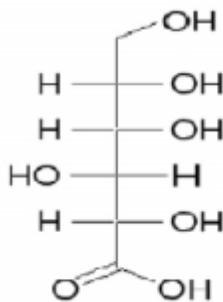
Asam Glukonat (*Pentahydroxycaproic acid*) merupakan asam organik yang sangat penting, banyak digunakan dalam bidang farmasi, makanan, detergen, tekstil dan industri lainnya, kebutuhan asam glukonat mencapai 60.000 ton per tahun..

Ada beberapa metode untuk menghasilkan asam glukonat, yaitu:

1. Reaksi oksidasi glukosa dengan larutan hipoklorit.
2. Reaksi oksidasi larutan glukosa dengan bromida
3. Fermentasi glukosa oleh enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang spesifik.

Proses fermentasi mempunyai beberapa keuntungan, selain harganya murah dapat menggunakan bahan baku yang terbarukan sebagai substrat.

Pada tahun 1880, pertama kalinya Boutroux menemukan bahwa bakteri asam asetat dapat digunakan untuk menghasilkan asam glukonat. Pada tahun 1922 Molliard mendeteksi asam glukonat dalam *Sterigmatocystis*, sekarang dikenal sebagai *Aspergillus niger*. Perkembangan lebih lanjut asam glukonat dapat dihasilkan dari mikroba seperti *Pseudomonas*, *Gluconobacter*, *Acetobacter* dan beberapa jenis jamur. Bernhauer melaporkan *A. niger* dapat menghasilkan asam glukonat lebih banyak bila dinetralkan dengan kalsium karbonat dan dilakukan pada pH lebih tinggi.



Gambar 2.1 Rumus Bangun Asam Glukonat

Asam glukonat terdapat dalam madu, jus buah, *wine*, dan berbagai produk fermentasi. Asam glukonat berfungsi membentuk ketajaman rasa, karena nilai pH yang rendah dapat mencegah kerusakan makanan oleh enzim dan mikroorganisme. Asam glukonat mempunyai rasa asam menyegarkan pada berbagai macam makanan seperti *wine*, jus buah dan mudah larut dalam air. Pembuatan asam glukonat dari substrat glukosa adalah melalui proses fermentasi aerobik oleh *Aspergillus niger*. Asam glukonat dapat dikembangkan untuk menghasilkan produk turunan seperti kalsium glukonat, sodium glukonat, dan gluko-delta-laktone. Gluko-delta-lakton merupakan salah satu bahan koagulan digunakan pada proses pembuatan tahu (*Tofu*).

2.2.1 Karakteristik Asam Glukonat

Asam glukonat ($C_6H_{12}O_7$) merupakan asam organik yang lemah, bersifat tidak korosif, tidak beracun, tidak berbau, tidak mudah menguap dan mudah mengalami biodegradasi. Wujudnya bewarna jernih kecoklatan dan mudah larut dalam air.

Dibanding dengan asam organik yang lain, asam glukonat memiliki tingkat keasaman yang rendah sehingga menghasilkan rasa asam lebih ringan dibanding asam organik yang lainnya.^[4]

Tabel 2.2 Karakteristik Umum Asam Glukonat^[4]

Asam Glukonat	
Sifat	tidak korosif, tidak menimbulkan iritasi, tidak beracun, tidak berbau, mudah dibiodegradasi, tidak mudah menguap
Massa Molekul relatif	196,16
Rumus Kimia	C ₆ H ₁₂ O ₇
Sinonim	2,3,4,5,6 - pentahydroxyhexanoic acid
pKa	3,7
Titik leleh	< 12°C
Titik didih	>100°C
Densitas	1,24 g/ml
Wujud	Jernih sampai coklat
Kelarutan	Larut dalam air
Rasa	Lembut, rasa segar

2.2.2 Pembentukan Asam Glukonat

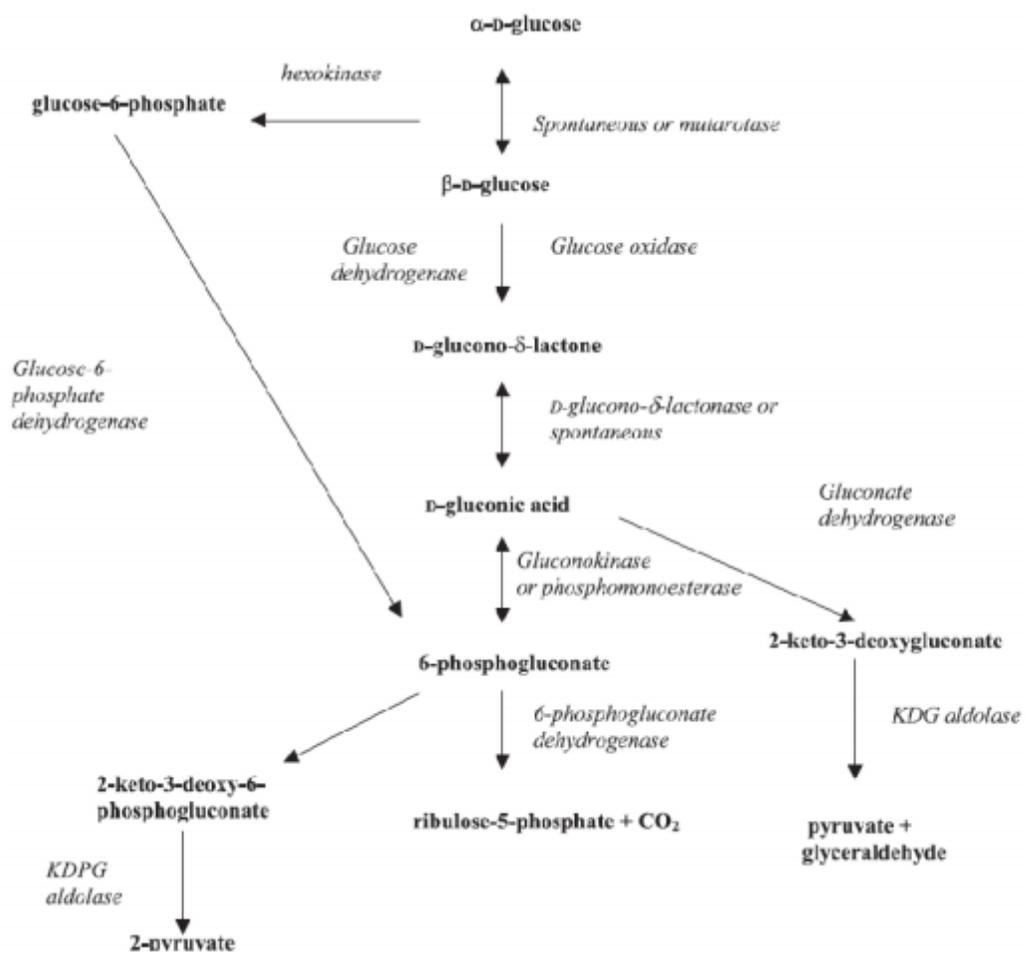
Asam D-glukonat adalah asam organik yang lemah, dihasilkan dari proses fermentasi D-glukosa oleh *Aspergillus niger* dengan cara aerobik. Produksi asam glukonat dengan bantuan mikroba merupakan metode yang lebih banyak dimanfaatkan oleh industri.

Tahap pertama terjadi proses mutarotasi dari α -D-glukosa menjadi β -D-glukosa oleh enzim *mutarotase*, tahap kedua adalah oksidasi β -D-glukosa menjadi *glucono- δ -lactone*, tahap berikutnya konversi *glucono- δ -lactone* menjadi asam glukonat.

Proses oksidasi D-glukosa menjadi *glucono- δ -lactone* dibantu oleh enzim *glucose oxidase* yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger*. *Glucose oxidase* merupakan

flavoprotein yang mengandung ikatan nonkovalen, merupakan homodimer dengan berat molekul sekitar 130-320 kDa. Enzim ini berperan sebagai katalis pada proses dehidrasi glukosa menjadi *glucono- δ -lactone*, dimana hidrogen ditransfer menuju FAD akan menghasilkan FADH₂, melalui proses oksidasi reduksi menghasilkan hidrogen peroksida, kemudian terurai menjadi oksigen dan air.^[4]

Jalur umum untuk pembentukan asam glukonat (*gluconate pathway*) adalah sebagai berikut^[4]:



Gambar 2.2. Jalur Umum Pembentukan Asam Glukonat^[4]

Glukosa oxidase merupakan sebuah glikoprotein. Enzim *glucose oxidase* dapat terbentuk dengan adanya kandungan glukosa yang cukup tinggi pada medium, stabil pada pH antara 4.0-6.0 dengan tersedianya oksigen yang cukup. Enzim ini tidak stabil

pada suhu diatas 50°C ^[4]. *Glucono- δ -lactone* terbentuk melalui proses oksidasi glukosa kemudian dihidrolisis menjadi asam glukonat. Hidrogen peroksida dihasilkan oleh oksidasi glukosa terdekomposisi menjadi air dan oksigen. Oksigen digunakan untuk proses biokonversi glukosa menjadi asam glukonat serta untuk pernapasan mikroba^[4]. Kondisi optimum diperlukan dalam pembentukan asam glukonat^[4], yaitu pada konsentrasi glukosa antara 110 - 250 g/L, sumber nitrogen dan fosfor dengan konsentrasi sangat rendah (20 mM), pH medium antara 4,5 – 6,5 dan membutuhkan kecepatan aerasi yang tinggi.

Pembentukan asam glukonat dipengaruhi oleh pH medium kultur serta kecukupan oksigen. Kecepatan aerasi dan kecepatan pengadukan merupakan dua faktor yang berperan dalam memenuhi kebutuhan oksigen untuk pembentukan asam glukonat. *Aspergillus niger* memproduksi asam organik lemah seperti asam sitrat, asam glukonat, dan asam oksalat. Akumulasi produk dipengaruhi oleh rentang pH dari medium nutrisi, jika nilai pH dibawah 3,5 akan dihasilkan asam sitrat melalui siklus TCA. pH medium untuk memproduksi asam glukonat berada pada rentang 4,5 sampai 7,0. Pada pH 5,5 dianggap sebagai pH optimum untuk *Aspergillus niger*.

2.2.3 Kegunaan Asam Glukonat

Asam glukonat dan produk turunannya memiliki banyak kegunaan dalam bidang kimia, farmasi, makanan, minuman, tekstil dan industri lainnya. Dalam industri makanan, asam glukonat dapat dijadikan sebagai pengawet. Asam glukonat dapat digunakan untuk melarutkan fosfat, aditif pada semen yang digunakan dalam industri konstruksi agar tahan terhadap kondisi cuaca yang ekstrim, selain itu dimanfaatkan sebagai pembersih pada kaleng aluminium.^{[4],[5]} Asam glukonat dapat menghasilkan produk-produk turunan seperti kalsium glukonat, sodium glukonat, besi glukonat, dan *glucono- delta- lactone*.

Tabel 2.2. Produk Turunan dari Asam Glukonat dan Aplikasinya^[4]

Komponen	Manfaat
Sodium glukonat	<ol style="list-style-type: none"> 1. Deterjen 2. Metallurgi 3. Zat aditif pada semen 4. Industri tekstil 5. Industri kertas
Kalsium glukonat	<ol style="list-style-type: none"> 6. Terapi kalsium 7. Nutrisi binatang
Besi glukonat	<ol style="list-style-type: none"> 8. Penyembuhan anemia
Gluko delta lactone	<ol style="list-style-type: none"> 9. Koagulan pada protein kedelai dalam proses pembuatan tahu 10. Pengembang dalam pembuatan roti 11. Penguat rasa dalam proses pembuatan daging seperti pembuatan sosis. 12. Pembentuk struktur dari <i>cheese curd</i> 13. Meningkatkan stabilitas panas pada susu

2.3 *Aspergillus niger*

Aspergillus niger merupakan fungi dari *ascomycota* yang berfilamen, mempunyai hifa, ercabang-cabang dan bersekat, berwarna terang atau tidak bewarna, dan ditemukan melimpah di alam. Fungi diisolasi dari tanah, sisa tumbuhan, dan udara di dalam ruangan. *Aspergillus niger* tumbuh optimum pada suhu 35-37 °C, dengan suhu minimum 6-8 °C dan suhu maksimum 45-47 °C. Proses pertumbuhan fungi ini adalah aerobik. *Aspergillus niger* memiliki warna dasar putih atau kuning dengan lapisan konidiospora yang tebal, berwarna coklat gelap. Dalam metabolisme *Aspergillus niger* dapat menghasilkan asam sitrat. *Aspergillus niger* dapat tumbuh dengan cepat sehingga banyak digunakan secara komersial dalam produksi asam sitrat, asam glukonat, dan pembuatan beberapa enzim seperti amilase, pektinase, amiloglukosida, dan selulosa. Pada umumnya *Aspergillus niger* dapat ditemui dimana-mana, terutama pada tanah di daerah tropis dan subtropis serta diisolasi dari bermacam substansi, termasuk biji-bijian.

2.3.1 Klasifikasi *Aspergillus niger*

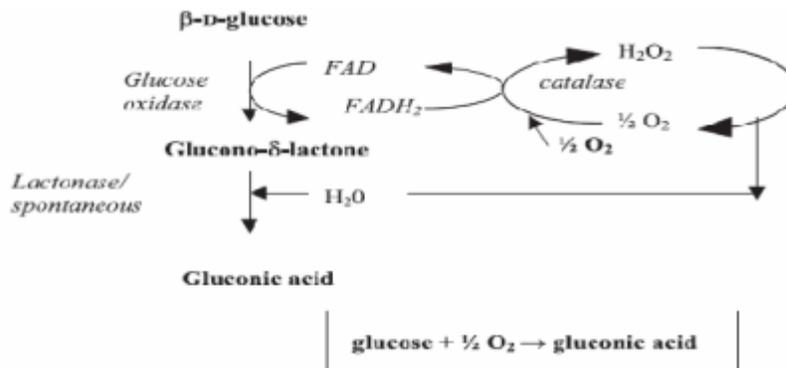
Berikut ini adalah tabel klasifikasi ilmiah *Aspergillus niger*.

Tabel 2.4. Klasifikasi *Aspergillus niger*

Domain	Eukaryota
Phylum	Ascomycota
Kelas	Eurotiomycetes
Ordo	Eurotiales
Famili	Trichocomaceae
Genus	Aspergillus
Spesies	Aspergillus niger

2.3.2 Peranan *Aspergillus niger* dalam Pembentukan Asam Glukonat

Aspergillus niger dapat menghasilkan enzim yang diperlukan untuk mengubah glukosa menjadi asam glukonat, enzim tersebut adalah glukosa oksidase, katalase, laktonase, dan mutarotase. Enzim mutarotase berfungsi untuk mempercepat reaksi perubahan α -D-glukosa menjadi β -D-glukosa dalam larutan. Enzim glukosa oksidase berperan melepaskan dua atom hidrogen dan mengoksidasi glukosa membentuk Glucono- δ -lactone, enzim katalase berperan menguraikan hidrogen peroksida, menghasilkan air dan oksigen, Kemudian dengan bantuan enzim laktonase Glucono- δ -lactone dihidrolisis menjadi asam glukonat.^[4]



Gambar 2.3. Proses Oksidasi Asam Glukonat oleh *Aspergillus niger*^[4]

BAB III

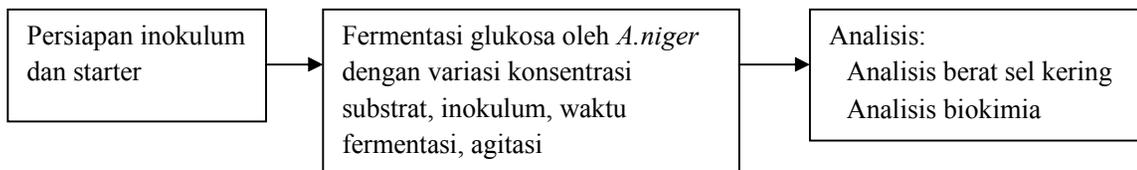
METODE PENELITIAN

3.1 Metode Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi tiga tahap, yaitu; tahap persiapan inokulum, tahap fermentasi glukosa, dan analisis kimia dan mikrobiologi.

Tahap persiapan awal digunakan untuk pembuatan inokulum dan stater, dan pembuatan kurva standar glukosa. Tahap fermentasi bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi substrat, waktu fermentasi dan inokulum *A.niger* terhadap perolehan berat sel kering dan perubahan pH . Analisis kimia yang dilakukan adalah analisis glukosa dengan *dinitrosalicylic acid* (DNS), dan *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC).

Bagan penelitian disajikan sebagai berikut:



Gambar 3.1 Bagan Kerja Penelitian

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan baku penelitian ini mencakup bahan-bahan utama yang digunakan dalam fermentasi asam glukonat yang terdiri atas medium sumber karbon dan sumber nitrogen

1. Sumber karbon : glukosa (*dextrose monohydrat*)
2. Sumber nutrisi : $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 , KCl , $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$ *yeast extract* dan pepton.

Bahan kimia penelitian ini mencakup bahan-bahan yang digunakan untuk pengaturan kondisi operasi fermentasi dan analisa hasil fermentasi

1. Bahan kimia pengatur pH : $NaOH$ dan HCl .
2. Bahan kimia untuk analisis : Analisis glukosa menggunakan reagen DNS,

potassium sodium tartarate 40% (w/v), Analisis kadar asam menggunakan asam oksalat, NaOH, indikator fenolftalein.

3.2.2 Peralatan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Peralatan pembuatan medium: gelas ukur, gelas kimia, erlenmeyer, tabung reaksi.
2. Peralatan untuk sterilisasi : autoklaf, kompor pemanas.
3. Peralatan untuk pembuatan inokulum : erlenmeyer, cawan, ose, *shaker*.
4. Peralatan untuk fermentasi : erlenmeyer, *shaker*.
5. Peralatan untuk analisis : kuvet, spektrofotometer, cawan, oven, timbangan analitis, tabung reaksi, pembakar spiritus, sentrifuge, *micro centrifuge-tube*

3.3 Prosedur penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari persiapan awal, yaitu; membuat biakan murni *Aspergillus niger* dan inokulum, kemudian tahap fermentasi asam glukonat. Fermentasi dilakukan pada erlenmeyer berkapasitas 100 ml dengan suhu fermentasi 30°C, pH 5,5 , kecepatan pengadukan 200 rpm, dan konsentrasi glukosa 100 g/L. Variasi yang dilakukan adalah variasi konsentrasi inokulum yaitu 0.15% , 0.20% , dan 0.25%(v/v). Waktu fermentasi dilakukan selama 7 hari, kemudian dianalisis setiap hari untuk mengetahui perubahan konsentrasi glukosa, pH, berat sel kering, dan kadar asam total.

3.4 Tahap Persiapan Inokulum

Percobaan pendahuluan bertujuan untuk menyiapkan larutan starter yang akan digunakan dalam proses fermentasi asam glukonat. Selanjutnya dilakukan fermentasi substrat glukosa oleh *A.niger* menjadi asam glukonat pada tabung erlenmeyer 50 ml dengan variabel kadar inokulum sebesar 0,15%; 0,20%; 0,25%(v/v) dari volume total. Fermentasi dilakukan selama enam hari, kemudian hasil fermentasi dianalisis setiap hari untuk mengetahui perubahan dan penurunan konsentrasi substrat glukosa, perubahan nilai pH, pembentukan berat sel kering, dan kadar asam total. Hasil percobaan ini digunakan untuk memperkirakan waktu fermentasi menjadi produk asam glukonat, waktu fermentasi digunakan pada percobaan selanjutnya.

3.4.1 Pembuatan Starter

1. *Aspergillus niger* yang telah dikembangbiakkan pada medium PDA digores dan dicampurkan dalam *aquades* steril.
2. Larutan starter diperiksa kepekatannya melalui mikroskop dengan bantuan alat haemositometer
3. Skala pengenceran yang dipakai adalah 10^7 . Bila larutan starter terlalu pekat, maka dilakukan pengenceran terlebih dahulu

3.4.2 Fermentasi Glukosa oleh *Aspergillus niger*

1. Erlenmeyer kapasitas 50 mL sebanyak 14 buah digunakan sebagai tempat medium yang terdiri dari campuran glukosa dan nutrisi sebagai pertumbuhan jamur.
2. Setiap erlenmeyer kapasitas 50 mL diisi masing-masing dengan nutrisi 0.0975 g/l KH_2PO_4 , 0,0975 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0975 g/l KCl, 0.39 g/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.2301 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.17 g/L *yeast extract*, 0.78 g/l *peptone*.
3. 14 tabung reaksi masing-masing diisi dengan 10 mL larutan glukosa 10% dan 15% (w/v) dari volume total.
4. Erlenmeyer yang masing-masing berisi nutrisi dan larutan glukosa disterilisasi pada suhu 120 °C selama 20 menit pada *autoclave*.
5. Setelah steril dicampurkan larutan glukosa dan nutrisi dalam Erlenmeyer. Larutan starter diambil dengan variasi konsentrasi 0,15%; 0,2%; 0,25% (v/v) dan dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer yang telah berisi medium.
6. Isi tabung erlenmeyer difermentasi selama 6 hari, dan tiap hari diukur pH, kadar glukosa, berat sel kering. Tabung erlenmeyer di *shaker* pada temperatur 30°C dan kecepatan pengadukan 200 rpm.
7. Setelah proses fermentasi supernatan pada hasil fermentasi disaring dengan kertas saring. Supernatan digunakan untuk dianalisis konsentrasi glukosa, pH. Biomassa digunakan untuk analisis berat sel kering.

3.5 Uji Coba Inokulum *A.niger* pada Bioreaktor Skala 2.000 mL

Uji coba inokulum *A. niger* dalam penelitian ini adalah fermentasi glukosa pada bioreaktor berkapasitas 2.000 mL dengan suhu fermentasi 30°C, pH 5,5 kecepatan pengadukan skala 8 pada *hot plate*, dan kecepatan aerasi 0,9 vvm. Lama proses fermentasi disamakan dengan percobaan utama yaitu enam hari.

1. Satu (1) L medium cair terdiri atas 0.25 g/l KH_2PO_4 , 0,25 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g/l KCl, 1 g/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.59 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g/L *yeast extract*, 2 g/l peptone.
2. Medium dimasukkan ke dalam bioreaktor dan disterilisasi dalam autoclave pada suhu 120° selama 20 menit
3. Inokulum 2,0%(v/v) dari volume total dimasukkan ke medium.
4. Larutan glukosa konsentrasi 150 g/L dalam erlenmeyer, disterilisasi pada suhu 120°C selama 20 menit. Pembuatan larutan glukosa berada pada tempat terpisah sebelum kemudian dicampurkan dengan medium
5. Bioreaktor disiapkan untuk proses fermentasi dengan kondisi sebagai berikut; Fermentasi diatur pada suhu 30°C, kecepatan aerasi 0, 9 vvm, pH 5.5, dan kecepatan agitasi skala 8.
6. Setelah fermentasi berakhir, supernatan dan biomassa dipisahkan dengan cara filtrasi. pH supernatan dan kadar total asam diukur sedangkan kadar glukosa diukur dengan HPLC.

3.6 Analisis

3.6.1 Analisis Kadar Glukosa dengan Metode Dinitrosalicylic Acid (DNS)

1. Reagen DNS dibuat dengan bahan sebanyak 10 g asam Dinitrosalisilat, 2 g phenol, 0.5 g natrium sulfat dan 10 g NaOH dalam 100 mL akuades.
2. Dari campuran tersebut, diambil 3 ml dan dimasukkan dalam sepuluh buah tabung reaksi.
3. Dibuat larutan glukosa standar dengan konsentrasi 100 sampai 1000 ppm, masing-masing diambil 3 ml dan dicampur dengan 3 mL pereaksi DNS dalam tabung reaksi.

4. Larutan diaduk agar homogen, kemudian dipanaskan pada suhu 90°C sampai berubah warna menjadi merah bata. Setelah berubah warna ditambahkan 1ml *Potassium sodium tartrate* 40%(w/v) ke masing-masing tabung reaksi untuk menstabilkan warna
5. Supernatan hasil fermentasi disentrifugasi, dipipet 3 ml dan ditambahkan 3 ml reagen DNS, dilakukan dengan cara yang sama dengan standar.
6. Setelah larutan didinginkan sampai suhu ruangan diukur absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.
7. Data yang diperoleh dimasukkan ke persamaan linier dari kurva standar glukosa untuk menghitung konsentrasi glukosa pada sampel hasil fermentasi

3.6.2 Mengukur pH

1. Disiapkan instrumen pH meter untuk mengukur nilai pH. pH meter dikalibrasi dengan larutan *buffer* pH 7 dan pH 4 agar pengukuran lebih akurat.
2. Supernatant hasil fermentasi disiapkan pada suhu kamar dan dimasukkan dalam tabung reaksi untuk diukur nilai pH .

3.6.3 Mengukur Berat Sel Kering

1. Biomassa sel hasil fermentasi dengan berat tertentu dipindahkan ke cawan penguapan.
2. Biomassa dengan berat tertentu dikeringkan dalam oven pada 80°C selama 24 jam.
3. Biomassa yang sudah kering dan beratnya konstan, ditimbang dan ditetapkan berat sel kering.

3.6.4 Analisis Glukosa dengan HPLC

Semua komponen alat HPLC dinyalakan termasuk komputer, pompa dan detektor.

Fase gerak H₂SO₄ 5,0 mM (*eluen*) disiapkan dan dihubungkan dengan HPLC

Kondisi operasi yang digunakan adalah pada suhu 60°C, tekanan 6,1 MPa, dan laju alir eluen 0,6 mL/menit.

Sample diencerkan dan disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 120.000 rpm.

Sample diinjeksikan ke vial dengan mikropipet.

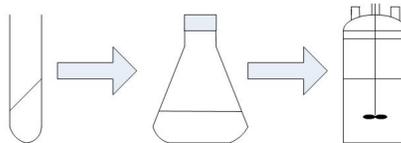
3.7 Fermentasi Glukosa oleh *Aspergillus niger* pada Erlenmeyer 100 mL Sebagai Bioreaktor

3.7.1 Persiapan Inokulum *Aspergillus niger*

Suspensi spora *Aspergillus niger* disiapkan dengan cara melarutkan 39g PDA dalam 1000 mL air, kemudian disterilisasi pada suhu 120 °C selama 20 menit. Setelah PDA mengeras, digoreskan *A.niger* pada PDA untuk dikembang-biakkan. Spora *A.niger* kemudian dipindahkan ke *aquades* steril dengan faktor pengenceran 10^7 .

3.7.2 Tahap Pembuatan Medium

Medium yang digunakan adalah glukosa dan nutrisi bagi pertumbuhan jamur *Aspergillus niger*. Larutan glukosa dengan variasi konsentrasi 10 % dan 15 %(w/v) dari volume total dimasukkan ke dalam erlenmeyer kapasitas 50 mL sebanyak 14 buah. Nutrien dimasukkan ke dalam 14 tabung erlenmeyer. Adapun nutrisi terdiri atas; 0,0975 g/L KH_2PO_4 ; 0,0975 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0975 g/L KCl; 0,39 g/l $\text{Ca}(\text{NO}_2)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,2301 g/L $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$; 1,17 g/L yeast extract; 0.78 g/L peptone. Tabung erlenmeyer yang berisi larutan glukosa dan tabung erlenmeyer yang berisi nutrisi disterilisasi pada suhu 120 °C selama 20 menit. Larutan glukosa, nutrisi, dan inokulum dicampurkan, dengan variasi konsentrasi inokulum berturut-turut 0.15%, 0.2%, 0.25% (v/v) dari volume total.

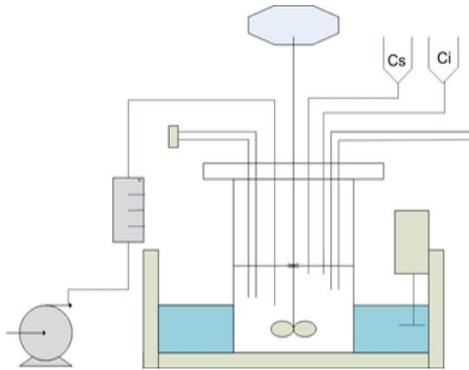


Gambar 3.2 Transfer *A.niger* dari Tabung Reaksi ke Erlenmeyer Skala 100 mL dan Bioreaktor Skala 2000 mL

3.8 Fermentasi Glukosa oleh *Aspergillus niger* pada Bioreaktor 2.000 mL

Percobaan dilakukan dengan menggunakan reaktor *batch* dengan volume total 2 L. Nutrisi yang digunakan yaitu $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , KCl, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yeast extract dan pepton dengan konsentrasi substrat glukosa 150 g/L. Nilai pH fermentasi mula-mula diatur dalam rentang 5,5. Variasi yang dilakukan dalam

percobaan ini yaitu kecepatan agitasi pada 200 rpm, 250 rpm, 300 rpm dan 350 rpm. Kecepatan aerasi dan temperature dijaga pada 0,9 vvm dan 30°C dengan konsentrasi inokulum 2,0 %v/v.



Gambar 3.3 Fermentasi Aerobik Glukosa oleh *A.niger* pada Bioreaktor

3.9 Analisis Konsentrasi Glukosa, Berat Sel Kering dan pH

3.9.1 Analisis Konsentrasi Glukosa

Analisis glukosa menggunakan metode *Dinitro Salisylic Acid* (DNS). Reagen DNS diambil 3 ml kemudian dimasukkan dalam sepuluh tabung reaksi. Larutan glukosa dibuat dengan konsentrasi glukosa 100 sampai 1000 ppm, kemudian diambil masing-masing 3mL dan dicampur dalam tabung reaksi yang berisi reagen DNS, diaduk supaya homogen kemudian dipanaskan pada suhu 90°C sampai berubah warna menjadi merah bata. Setelah berubah warna ditambahkan 1ml *Potassium sodium tartrate* 40%(w/v) ke masing-masing tabung reaksi. Setelah didinginkan sampai suhu ruangan diukur absorbansi masing-masing larutan dengan spektrofotometer cahaya tampak pada panjang gelombang maksimum. Kurva standar glukosa dibuat dengan menggunakan data absorbansi vs konsentrasi. Supernatan hasil sentrifugasi sampel fermentasi diambil 3 ml dan ditambahkan 3 ml reagen DNS, larutan dipanaskan sampai berubah warna menjadi merah bata, kemudian ditambahkan 1 ml *Potassium sodium tartrate* 40% untuk menstabilkan warna. Setelah larutan didinginkan sampai suhu ruangan diukur absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer cahaya tampak dengan menggunakan panjang gelombang maksimum. Dari data yang didapat kemudian dimasukkan ke persamaan

linier dari kurva standar glukosa untuk mengetahui konsentrasi glukosa dari sampel hasil.

3.9.2 Mengukur Berat Sel Kering

Dalam proses fermentasi asam glukonat, *A.niger* akan memanfaatkan glukosa dan oksigen sehingga menjadi *biomassa*. *Biomassa* diperlukan tetap tumbuh sehingga dapat menghasilkan enzim-enzim yang diperlukan untuk mendukung proses oksidasi glukosa menjadi asam glukonat. Perlu dilakukan analisis berat sel kering untuk mengetahui tingkat kesuburan *biomassa* selama proses fermentasi. Berat sel kering diperoleh dengan cara mengeringkan sampel *biomassa* hasil sentrifugasi pada suhu 80°C selama 24 jam. Berat sel kering dihitung dari selisih antara berat tabung yang berisi *biomassa* kering dengan berat tabung sentrifugasi kosong.

3.9.3 Mengukur pH

Supernatan yang telah dipisahkan dari *biomassa* sel diukur nilai pH dengan menggunakan instrumen pH meter. Sebelum digunakan, pH meter perlu dikalibrasi dengan larutan buffer pH 7,0 dan pH 4,0 untuk meningkatkan ketelitian dalam proses analisis.

BAB IV

JADWAL PELAKSANAAN

4.1 Jadwal Pelaksanaan Penelitian:

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Teknik Kimia UNPAR, waktu pelaksanaan dari bulan April sampai Desember 2012

Tabel 4.1. Jadwal Pelaksanaan Penelitian

No	Kegiatan	April-Juni			Juli-September			Oktober-Desember		
1	Studi literatur									
2	Persiapan bahan dan alat									
3	Persiapan inokulum dan percobaan kondisi fermentasi									
4	Variasi konsentrasi substrat, inokulum, agitasi, waktu fermentasi									
5	Analisis hasil									
6	Penyelesaian laporan									

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian Skala Bioreaktor 100 mL

5.1.1 Hasil Transfer Inokulum *A.niger* dari Tabung Reaksi ke Skala Erlenmeyer 100 mL

Persiapan inokulum *A.niger* dari tabung reaksi ke erlenmeyer 100 mL dilakukan pada kondisi suhu 30°C, waktu fermentasi 7 hari dengan nutrien dengan alat shaker ditunjukkan bahwa *A.niger* tumbuh dan berkembang biak dengan baik. Pada fermentasi glukosa oleh *A.niger* dengan bioreaktor skala 2.000 mL yang berisi substrat glukosa sebesar 1.000 mL pada suhu 30°C, nilai pH awal 5.5, dan variasi konsentrasi glukosa yaitu 100 g/L dan 150 g/L, dan variasi konsentrasi inokulum yaitu 0,15%, 0,2%, 0,25%(v/v) ditunjukkan bahwa hasil data percobaan seperti tertera pada tabel 5.1

Tabel 5.1: Analisis Pengaruh Variasi Konsentrasi Inokulum *A.niger* dan Konsentrasi Glukosa 100 g/L dan 150 g/L dalam Erlenmeyer 100 mL terhadap Penurunan Substrat Glukosa

waktu fermentasi (hari)	Konsentrasi glukosa (g/L)					
	[glukosa] = 100 g/L			[glukosa] = 150 g/L		
	[I] = 0,15%	[I] = 0,2%	[I] = 0,25%	[I] = 0,15%	[I] = 0,2%	[I] = 0,25%
0	100	100	100	150	150	150
1	91.31	84.18	70.1	113.85	89.69	66.19
2	74.13	59.52	43.41	81.33	43.69	52.65
3	27.67	30	25.2	70.97	18	17.93
4	11.16	10.35	9.32	42.03	17.93	17.68
5	8.44	8.13	6.19	32.84	17.08	16.89
6	5.16	4.23	4.08	18.6	16.42	16.24

Tabel 5.2: ANOVA pada Konsentrasi Substrat Glukosa 100 g/L

Analisis varian					
Sumber varian	Df	Ss	ms	F hitung	F tabel
cuplikan	2	304.42	152.21	3.64	5.28
waktu fermentasi	5	15180.26	3,036	72.68	
error	10	417.67	41.77		
total	17	15902.35	3230.032		

Pada analisis ANOVA dihasilkan bahwa pengaruh konsentrasi inokulum berturut-turut 0,15%; 0,20% dan 0,25%(v/v) pada konsentrasi substrat glukosa 100 g/L tidak berbeda nyata, jadi percobaan selanjutnya dipilih konsentrasi inokulum 0,15%. Analisis statistik berdasarkan tingkat kepercayaan 90%.

Pada uji ANOVA pengaruh konsentrasi inokulum dalam konsentrasi substrat glukosa 150 g/L terhadap penurunan konsentrasi substrat glukosa sangat berpengaruh, karena hal ini terjadinya proses inhibisi substrat glukosa dan reaksi kimia antara enzim (E) dan substrat (S) membentuk ES yang tidak langsung membentuk produk (P), namun terbentuk enzim substrat inhibitor atau ESi. Konsentrasi substrat glukosa 150 g/L merupakan konsentrasi substrat glukosa maksimum dan hal ini didukung oleh pendapat dari Atkinson^[1].

5.1.2 Analisis Pengaruh Variasi Konsentrasi Inokulum dalam Erlenmeyer Kapasitas 100 mL Terhadap Perubahan pH

5.1.2.1 Metode Analisis Statistik ANOVA

Tabel 5. Pengaruh Konsentrasi Substrat Glukosa 100 g/L dan 150g/L terhadap Penurunan Nilai pH

Waktu fermentasi (hari)	Nilai pH					
	[Glukosa] = 100 g/L			[glukosa] = 150 g/L		
	[I]= 0,15%	[I]= 0,2%	[I]=0,25 %	[I]=0,15 %	[I]=0,2 %	[I]=0,25 %
0	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
1	4.895	4.33	4.12	4.33	4.46	3.89
2	4.525	3.95	3.815	3.61	3.26	3.09
3	4.44	3.02	2.58	2.65	3.09	2.85
4	4.445	2.64	2.49	2.29	2.48	2.48
5	4.405	2.49	2.19	2.24	3.09	2.25
6	2.57	2.39	2.14	2.16	2.25	1.93

Tabel 5.4. ANOVA pada Konsentrasi Substrat Glukosa 100 g/L

Analisis varian					
Sumber varian	Df	Ss	ms	F hitung	F tabel
Cuplikan	2	5.908	2.954	14.84	5.28
waktu fermentasi	5	8.53	2.000	8.54	
Error	10	1.992	0.199		
Total	17	16.43	4.853		

Hasil uji statistik dengan ANOVA bahwa pengaruh konsentrasi inokulum *A.niger* terhadap perubahan nilai pH pada masing-masing variasi konsentrasi substrat glukosa dilakukan uji statistik. Melalui hasil perhitungan pada konsentrasi substrat 100 g/L, $F_{inokulum}$ lebih besar daripada F_{tabel} pada tingkat kepercayaan 90%. Hal tersebut menunjukkan bahwa variasi konsentrasi inokulum *A.niger* memberikan pengaruh pada perubahan nilai pH; pada konsentrasi substrat glukosa sebesar 100 g/L.

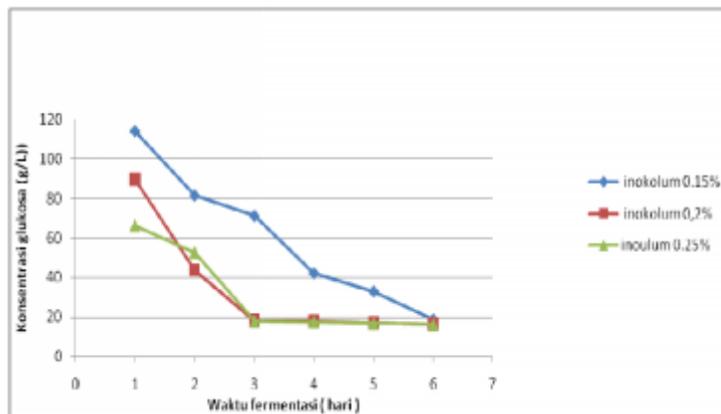
Melalui uji LSD didapatkan bahwa pada variasi konsentrasi 0,2% dan 0,25%(w/v) terhadap perubahan nilai pH tidak memberikan perbedaan signifikan. Pada konsentrasi substrat glukosa sebesar 150 g/L, F hitung inokulum mempunyai nilai lebih kecil dari pada F tabel, sehingga variasi konsentrasi inokulum *A.niger* tidak berpengaruh pada perubahan nilai pH.

Tabel 5.5. ANOVA pada Konsentrasi Substrat Glukosa 150 g/L terhadap Penurunan pH

Analisis varian					
Sumber varian	<i>Df</i>	<i>Ss</i>	<i>ms</i>	<i>F hitung</i>	<i>F tabel</i>
Cuplikan	2	0.39	0.195	3.42	5.28
waktu fermentasi	5	8.79	2	30.84	
Error	10	0.57	0.057		
Total	17	9.75	2.01		

F hitung cuplikan lebih kecil dari F tabel, jadi pada konsentrasi substrat glukosa 150 g/L, maka konsentrasi inokulum *A.niger* terhadap perubahan pH tidak berpengaruh.

5.1.2.2 Metode analisis grafis

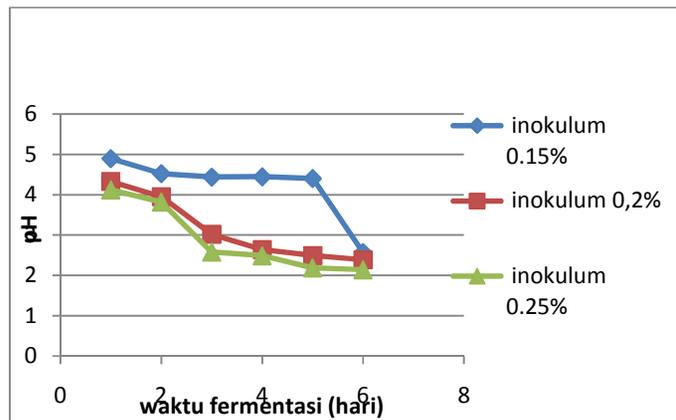


Gambar 5.1. Pengaruh Konsentrasi Inokulum *A.niger* pada Konsentrasi Glukosa 100g/L terhadap Penurunan Konsentrasi Substrat Glukosa.

Dari gambar 5.1 tersebut bahwa penurunan konsentrasi glukosa tercepat terdapat pada variasi konsentrasi substrat 100 g/L. Pada analisis statistik disimpulkan bahwa pada konsentrasi 100 g/L di dapatkan F_{hitung} inokulum yang lebih kecil dari F_{tabel} , maka hal ini berarti konsentrasi inokulum tidak berbeda nyata pada tiap variasi konsentrasi sehingga pada variasi inokulum 0,15% dikatakan yang terbaik. Pada konsentrasi substrat glukosa sebesar 100 g/L didapatkan $F_{inokulum}$ yang lebih besar pada F_{tabel} . Hal ini sesuai dengan pendapat Atkinson^[1] bahwa konsentrasi substrat glukosa maksimum 150 g/L dan pada konsentrasi substrat glukosa 150 g/L atau lebih terjadi ESi atau enzim substrat inhibitor sehingga mempengaruhi pembentukan produk asam glukonat.

5.2 Pengaruh Variasi Konsentrasi Inokulum dan Substrat terhadap pH

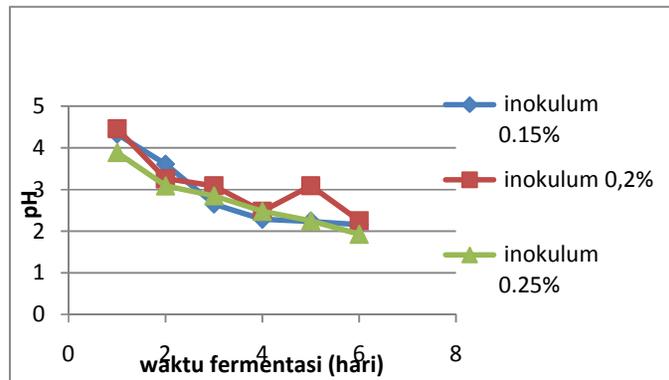
Pengaruh konsentrasi inokulum *A.niger* dan konsentrasi substrat glukosa mempengaruhi penurunan nilai pH selama proses fermentasi. Menurut studi pustaka, rentang pH asam glukonat adalah berkisar antara 3,5-2,0 dan nilai pH ini digunakan untuk menetapkan lama fermentasi.



Gambar 5.2 . Pengaruh Konsentrasi Inokulum *A.niger* terhadap Penurunan Nilai pH pada Konsentrasi Substrat Glukosa Sebesar 100 g/L

Pengaruh konsentrasi inokulum *A.niger* dan konsentrasi substrat glukosa sangat mempengaruhi penurunan nilai pH. Semakin besar konsentrasi inokulum, maka penurunan pH semakin cepat pada konsentrasi substrat glukosa 100 g/L dan 150g/L. Pada variasi konsentrasi substrat 150 g/L dan konsentrasi inokulum 0,25% didapatkan nilai pH kurang dari 2 sehingga rentang nilai pH ini akan terbentuknya asam sitrat.

Menurut literatur bila proses fermentasi glukosa oleh *A.niger* berada pada pH dibawah 2 mengacu terbentuknya siklus TCA untuk menghasilkan asam sitrat. Melalui hasil perhitungan pada konsentrasi substrat 100 g/L, F_{hitung} inokulum lebih besar daripada F_{tabel} . Hal tersebut menunjukkan bahwa variasi konsentrasi inokulum memberikan pengaruh pada perolehan pH konsentrasi substrat 100 g/L.



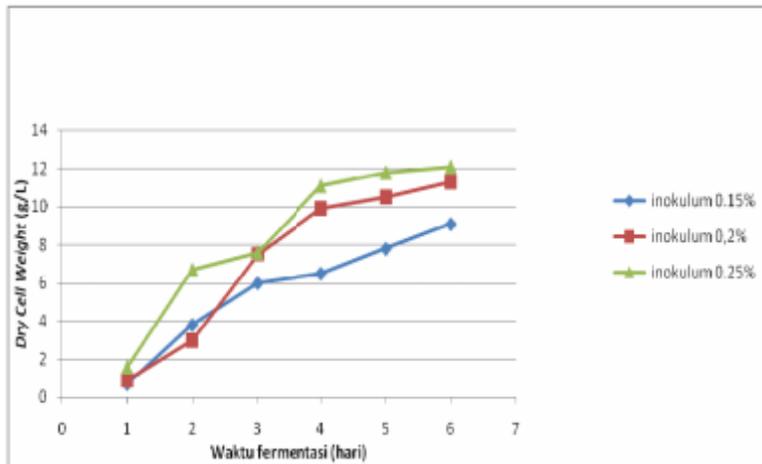
Gambar 5.3. Pengaruh Konsentrasi Inokulum *A.niger* terhadap Penurunan Nilai pH pada Konsentrasi Substrat Glukosa Sebesar 150 g/L

5.3 Pengaruh Variasi Konsentrasi Inokulum dan Substrat terhadap Berat Sel Kering (*dry cell weight*)

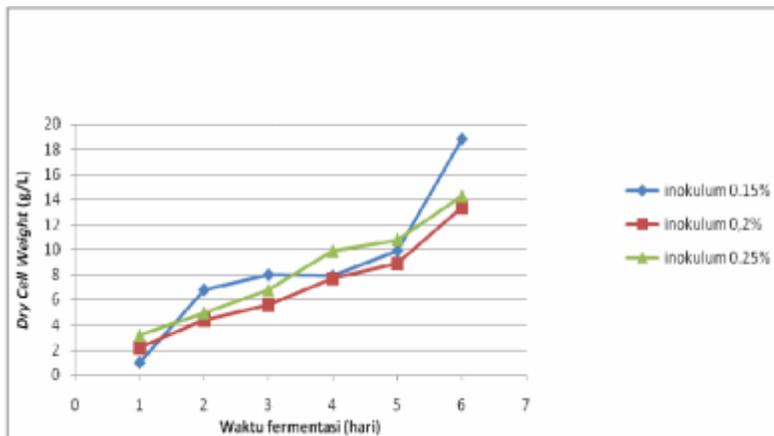
Fermentasi substrat glukosa oleh *A.niger* menjadi asam glukonat, maka *A.niger* dapat tumbuh dan berkembang biak dalam substrat glukosa sebagai sumber karbon untuk energi *A.niger* sehingga menghasilkan sel biomassa. Sel mikroba *A.niger* dianalisis konsentrasi berat sel keringnya. Berat sel kering ditentukan dengan cara mengoven *biomassa* hasil sentrifugasi sampel pada suhu 80°C selama 24 jam. Berat sel kering didapatkan dengan cara selisih antara berat tabung *sentrifuge* berisi biomassa kering dengan berat tabung kosong.

Tabel 5.6. Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Inokulum terhadap Berat Sel Kering

Waktu fermentasi (hari)	Dry Cell Weight (g/L)					
	[glukosa] = 100 g/L			[glukosa] = 150 g/L		
	[I] = 0,15%	[I] = 0,2%	[I] = 0,25%	[I] = 0,15%	[I] = 0,2%	[I] = 0,25%
0	0.1	0.16	0.23	0.11	0.15	0.2
1	1	2.2	3.2	0.7	0.9	1.6
2	6.8	4.4	5	3.8	3	6.7
3	8	5.6	6.8	6	7.5	7.6
4	7.9	7.7	9.9	6.5	9.9	11.1
5	9.9	8.9	10.8	7.8	10.5	11.8
6	18.8	13.4	14.3	9.1	11.3	12.1



Gambar 5.4. Pengaruh Konsentrasi Inokulum *A.niger* pada Konsentrasi Substrat 100 g/L terhadap Perolehan Berat Sel Kering



Gambar 5.5. Pengaruh Konsentrasi Inokulum *A.niger* pada Konsentrasi Substrat 150 g/L terhadap Perolehan Berat Sel Kering

Dari kurva tersebut diatas disimpulkan bahwa semakin turun konsentrasi substrat glukosa semakin cepat tumbuh dan berkembang biaknya *A.niger*, maka semakin menambah berat sel mikroba kering guna membentuk asam glukonat.

5.4 Transfer Inokulum *A.niger* dari Skala Bioreaktor 100 mL ke Bioreaktor 2.000 mL

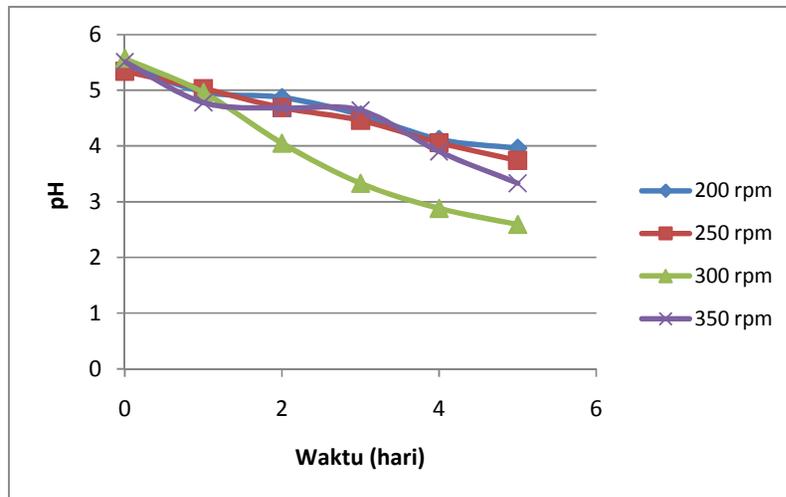
Pada teknologi fermentasi, maka transfer inokulum *A.niger* dari skala kecil ke bioreaktor skala besar dilakukan tahap demi tahap. Uji tumbuh dan berkembang biaknya

A.niger pada bioreaktor skala 100 mL ke bioreaktor skala 2.000 mL pada kondisi fermentasi substrat glukosa oleh *A.niger* yaitu konsentrasi inokulum 2,0 % yang mengacu pada premis dengan konsentrasi substrat glukosa 150 g/L. Berdasarkan literatur rentang pH untuk asam glukonat adalah pada rentang pH 2 – pH 4 dan pada kondisi ini bila fermentasi substrat glukosa oleh *A.niger* dilanjutkan sampai pH dibawah 2,0 akan terbentuk asam sitrat.

Persiapan inokulum *A.niger* dari erlenmeyer 100 mL ke skala bioreaktor 2.000 mL dilakukan pada kondisi suhu 30°C dengan waktu fermentasi 5 hari menggunakan bioreaktor dengan motor pengaduk dan dapat ditunjukkan bahwa *A.niger* tumbuh dan berkembang biak dengan baik. Pada fermentasi substrat glukosa oleh *A.niger* dengan bioreaktor skala 2000 mL yang berisi substrat glukosa 1500 mL pada suhu 30°C, nilai pH awal 5,5, konsentrasi glukosa 150 g/L, konsentrasi inokulum 2,0 %, kecepatan aerasi 0.9 vvm, dan variasi kecepatan pengadukan yaitu 200 rpm, 250 rpm, 300 rpm, dan 350 rpm.

Tabel 5.7 Perubahan Nilai pH Fermentasi pada Berbagai Kecepatan Pengadukan

Waktu (Hari)	Nilai pH			
	Kecepatan agitasi (rpm)			
	200	250	300	350
0	5,46	5,34	5,57	5,51
1	4,97	5,03	4,96	4,78
2	4,87	4,69	4,05	4,68
3	4,56	4,46	3,33	4,64
4	4,12	4,06	2,88	3,9
5	3,96	3,74	2,59	3,33



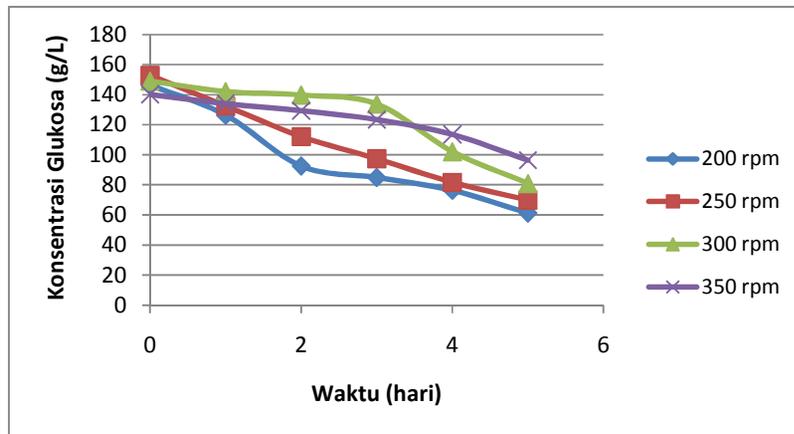
Gambar 5.6 Perubahan Nilai pH pada Berbagai Variasi Kecepatan Pengadukan dalam Bioreaktor Berkapasitas 2000 mL

Dari gambar 4.6 dapat dilihat bahwa pada hari kedua hingga hari ke enam fermentasi glukosa oleh *A.niger* telah berada pada rentang nilai pH 5 – 2 yang memungkinkan terbentuknya asam glukonat. Nilai pH yang paling maksimal yaitu 2,59 terdapat pada variasi pengadukan 300 rpm

5.4.1 Perubahan Konsentrasi Glukosa pada Variasi Kecepatan Pengadukan 200 rpm, 250 rpm, 300 rpm, dan 350 rpm

Tabel 5.8 Penurunan Konsentrasi Glukosa pada Berbagai Kecepatan Pengadukan

Waktu (hari)	Konsentrasi glukosa (g/L)			
	Kecepatan Agitasi (rpm)			
	200	250	300	350
0	146,41	152,82	149	140,16
1	126,32	132,44	142,02	134,08
2	92,55	112,10	139,71	129,3
3	84,91	97,33	133,66	123,47
4	76,43	81,63	102,03	113,56
5	61,28	69,87	80,98	96,44



Gambar 5.7 Perubahan Konsentrasi Glukosa pada Variasi Kecepatan Pengadukan dalam Bioreaktor Berkapasitas 2.000 mL

Dari gambar 4.7 dapat dilihat bahwa semakin kecil kecepatan pengadukan, semakin besar penurunan konsentrasi glukosa. Hal ini menunjukkan bahwa glukosa telah dirubah menjadi asam glukonat melalui bantuan dari *A.niger*. Penurunan konsentrasi glukosa terbesar terjadi pada kecepatan pengadukan 200 rpm. Semakin tinggi kecepatan pengadukan maka semakin tinggi gaya vortex atau gaya angkat oksigen terlarut dalam media fermentasi sehingga sulit untuk di konsumsi oleh sel mikroba.

5.5 Analisis Asam Glukonat dengan HPLC

Asam glukonat yang terbentuk dianalisis dengan metode analisis kimia instrumental HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*). Konsentrasi inokulum yang dipilih adalah 2% mengacu pada kondisi pada literatur dan konsentrasi glukosa 150 g/L. Kondisi HPLC yang dilakukan adalah sebagai berikut:

Kolom stasioner: *Aminex HPX87H*;

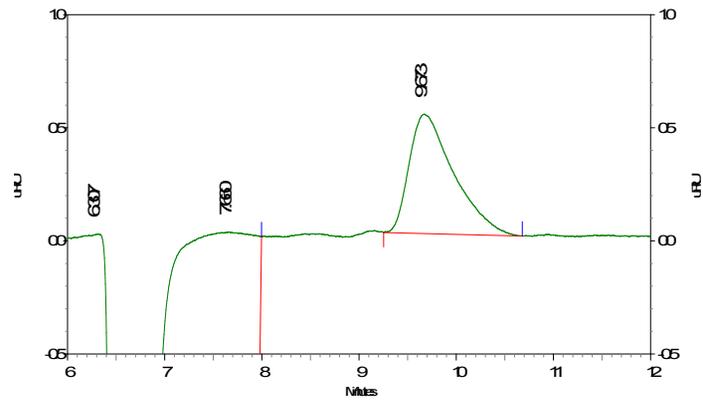
Fasa gerak : H₂SO₄ 5,0 mM;

Laju alir eluen : 0,6 ml/min;

Tekanan : 5,1 mPa

Suhu operasi : 60°C

5.5.1 Hasil analisis standar asam glukonat dengan HPLC

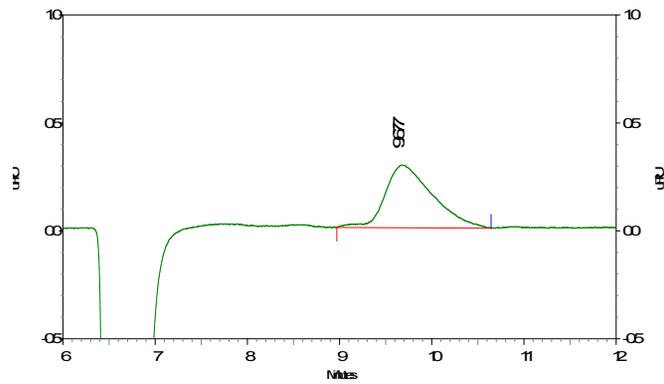


Gambar 5.8: Kurva Standar Asam Glukonat pada HPLC

Waktu retensi standar : 9,673 menit

Luas area : 134.602

5.5.2 Hasil Analisis Sampel Asam Glukonat dengan HPLC

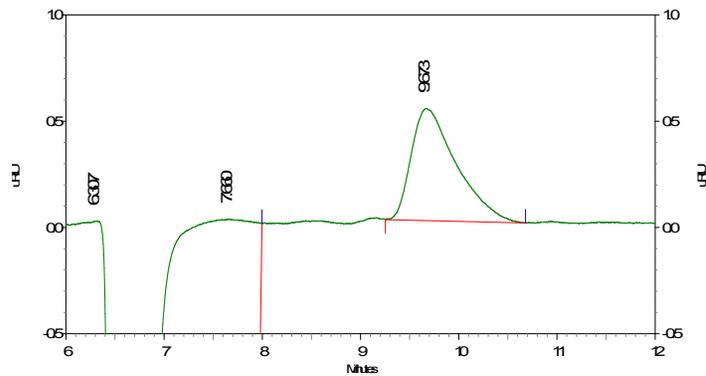


Gambar 5.9: Kurva Standar Sampel pada HPLC

Waktu retensi sampel : 9,667 menit

Luas area : 32.709

5.5.3 Metode spiking :



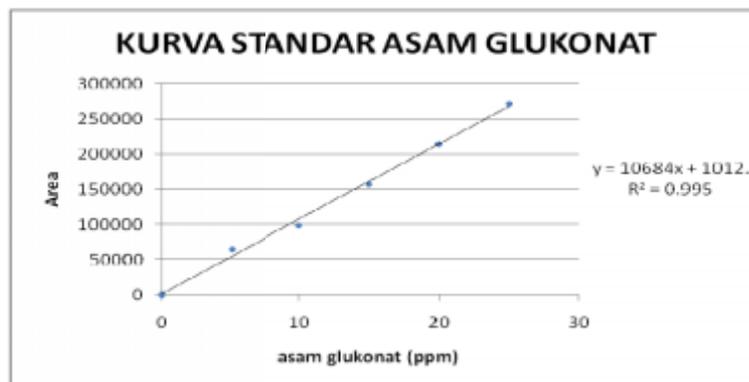
Gambar 5.10: Kurva Spiking HPLC

Waktu retensi standar : 9,713 menit

Luas area : 82.979

Tabel 5.9. Data analisis HPLC asam glukonat standar dan sample

asam glukonat (ppm)	luas area
0	0
5	64404
10	98951
15	157223
20	214682
25	272123
Sample	271890



Gambar 5.11: Kurva Linearisasi Standar Asam Glukonat dengan HPLC

Dari kurva standar diperoleh produk asam glukonat hasil fermentasi adalah 24,89 ppm pada bioreaktor skala 2000 mL

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil percobaan dimulai dari inokulum *A. niger* dalam tabung reaksi ke bioreaktor (erlenmeyer) kapasitas 100 mL dan berakhir ke 2000 mL disimpulkan bahwa:

6.1 Kesimpulan

1. Inokulum *A.niger* dapat tumbuh dan berkemabng biak pada bioreaktor erlenmeyer skala 100 mL.
2. Konsentrasi inokulum *A.niger* pada bioreaktor skala 100 mL yang optimal adalah 0,15% pada kosnetrasi substrat glukosa 100 g/L namun pada konsentrasi substrat glukosa 150 g/L terjadi inhibisi substrat glukosa dan reaksi kimia antara Ensim (E) dan substrat (S) membentuk ES yang tidak langsung membentuk produk (P), namun terbentuk ensim substrat inhibisi atau ESi. Konsentrasi substrat glukosa 150 g/L merupakan konsentrasi substrat glukosa maksimum dan hal ini didukung oleh pendapat dari Atkinson^[1].
3. Pada variasi konsentrasi inoculum *A.niger* memberikan pengaruh pada perubahan nilai pH konsentrasi substrat glukosa sebesar 100 g sedangkan pada konsentrasi substrat glukosa sebesar 150 g/L, nilai F hitung inokulum mempunyai nilai lebih kecil dari pada F tabel, sehingga variasi konsentrasi inokulum *A.niger* tidak berpengaruh pada perubahan nilai pH.
4. Penurunan konsentrasi glukosa terbesar adalah 61,28 g/L terjadi pada kecepatan pengadukan 200 rpm. Semakin tinggi kecepatan pengadukan maka semakin tinggi gaya vortex atau gaya angkat oksigen terlarut dalam media fermentasi sehingga sulit untuk di konsumsi oleh sel mikroba.
5. Produk asam glukonat hasil fermentasi adalah 24,89 ppm dari bioreaktor skala 2000 mL berdasarkan analisis kimia instrumental HPLC.

6.2 Saran

Pada fermentasi substrat glukosa oleh *A.niger* menjadi asam glukonat perlu dilakukan penurunan konsentrasi substrat glukosa dibawah 150 g/L agar tidak terjadi inhibisi substrat.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Atkinson, B and Mavituna, F [1983] **Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook**, Macmillan Publisher Ltd, England, pp.1015-1016.
- [2] Kamm. B., Gruber, P.R., Kamm, M. [2006]. **Biorefineries Industrial Processes and Products**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, KgaA, Weinheim, Germany.
- [3] Austin, G.T. [1984]. **Shreve's Chemical Process Industries**, 5th Edition, McGraw-Hill International Editions, New York, p 583.
- [4] Sumitra Ramachandran, P. F., Ashok Pandey, Christian Larroche [2006]. ***Gluconic Acid: Properties, Applications and Microbial Production***. **44**: 185-195.
- [5] A. A. Shindia, G. A. El-Sherbeny, et al. (2006). ***Production of Gluconic Acid by Some Local Fungi***. **34**(1): 22-29.
- [6] Singh, O. V. and R. Kumar. ***Biotechnological production of gluconic acid: future implications***. **75**: 713-722.
- [7] Akbarningrum Fatmawati, Rudy Agustriyanto, et al. [2009]. ***Kinetic Study of Gluconic Acid Batch Fermentation by Aspergillus niger***. **57**: 208-212.
- [8] H.Znad, J.Markos, et al. [2004]. ***Production of gluconic acid from glucose by Aspergillus niger: growth and non-growth condotions***. **39**: 1341-1345.
- [9] Shaikh.S.A and R. Trivedi. ***Gluconic Acid Production under Varying Fermentation Conditions by Aspergillus sp.***