

PEMBUATAN ASAM GLUKONAT DARI GLUKOSA DENGAN PROSES FERMENTASI MENGGUNAKAN *Aspergillus niger*

Latifah¹⁾, Sudaryati¹⁾ and Hariyono E²⁾

¹⁾ Program Studi Teknologi Pangan, UPN "Veteran" Jawa-Timur
@) Alumni Prodi Teknologi Pangan-UPN "Veteran" Jatim

ABSTRACT

*Gluconic acid is a product of the dehydrogenation of glucose, and used widely industry. Gluconic acid which is crystallized in the form- δ -lactone glukono can be used to substitute for yeast in bread making and other food industries. The more 50,000 tons of gluconic acid were produced by fermentation using *Aspergillus niger* of material containing glucose.*

*The purpose of this study to determine the best treatment volume and the fermentation time starter in the production of gluconic acid from glucose by fermentation with *Aspergillus niger*. This research used Completely Randomized Design (CRD) with factorial pattern consisting of 2 factors with 2 repetitions. The first factor is the length of fermentation (12 and 18, and 24 hours) and the second factor is the volume of starter (12, 16; and 20 mL) . The results showed that the best treatment there is the treatment of fermentation time 24 hours and the volume of 16 ml starter, which produces gluconic acid with a concentration = 7.405%, density = 1.1559 g / ml, pH = 3.4, biomass = 8.5580 gr .*

PENDAHULUAN

Asam glukonat merupakan produk fermentasi dari glukosa, dan merupakan asam organik yang banyak digunakan dalam industri saat ini. Dalam industri biasanya digunakan sebagai aditif pada makanan, antara lain: industri roti dan kue, pengolahan ikan, daging, keju dan tahu. Asam glukonat yang dikristalisasi dalam bentuk glukono- δ -lactone dapat digunakan untuk pengganti ragi pada pembuatan roti, penggumpal tahu, dan industri makanan lainnya (Kent, 1983).

Asam glukonat juga digunakan untuk *acidulant* (penambah asam) dalam industri. Lebih dari 50.000 ton asam glukonat diproduksi menggunakan *Aspergillus niger* dengan fermentasi submerged (kultur terendam) dari bahan yang mengandung glukosa (Michael, 2001).

Glukosa (*dextrose Monohydrat*) difermentasi menggunakan mikroorganisme *Aspergillus niger* secara aerobik dengan penambahan nutrisi-nutrisi yang dibutuhkan sehingga terbentuk asam glukonat. Asam glukonat tersebut akan dianalisis kadarnya, pH, densitas dan jumlah biomassa.

Proses fermentasi dipilih karena lebih mudah dan ekonomis dibandingkan proses lainnya. Pada proses ini lebih aman karena tidak menghasilkan reaksi samping yang dapat mencemari produk asam glukonat. Selain itu, biaya peralatan dapat ditekan karena tidak membutuhkan peralatan yang mahal seperti pada proses pembuatan asam glukonat lainnya.

Proses lain adalah dengan cara oksidasi dan elektrolisis, namun proses ini mempunyai banyak kerugiannya jika tidak dikontrol dengan secermat mungkin. Selain biaya yang dikeluarkan cukup besar, kita harus mengetahui kondisi reaksi optimal yang akan dihasilkan yield tertinggi (60 - 80%) dan juga harus mempertimbangkan hasil reaksi samping yang terbentuk. Kemudian pemisahan (isolasi) dan purifikasi hasil sangat sulit (Ullman, 1984).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Fatmawati, Agus Triyanto dan Lindawati (2009), dalam Studi Kinetik Asam Glukonat dengan *Aspergillus niger* metode *Batch Fermentation*, menghasilkan konsentrasi asam glukonat tertinggi 9,48% untuk

konsentrasi substrat 150 gram/L dengan waktu fermentasi 12 jam, dan biomassa sebesar 18,75 gram/L. Oleh karena itu perlu dikaji waktu optimal fermentasi asam glukonat dan volume starter yang ditambahkan.

Waktu fermentasi dapat berpengaruh terhadap konsentrasi produk hasil fermentasi. Untuk keperluan fermentasi, dipilih fase dimana mikroba mengalami pertumbuhan yang sangat cepat sehingga enzim yang dihasilkan maksimum, yaitu pada fase *logarithmic growth*. Setiap mikroba waktu fase pertumbuhannya berbeda-beda, sehingga pada proses fermentasi, waktu merupakan faktor penting yang perlu dikontrol (Anonim, 1987).

Sedangkan volume starter yang ditambahkan akan mempengaruhi waktu pembentukan asam glukonat. Prosentase volume starter mempengaruhi *lag phase* (fase adaptasi) yaitu semakin besar starter maka semakin pendek *lag phase*, sehingga cepat mencapai eksponensial yaitu kapang tumbuh dengan sempurna dan mampu beradaptasi dengan baik, sehingga glukosa dapat terkonversi dengan maksimal dan mulai terbentuknya produk. Jumlah mikroba yang digunakan harus tepat karena jika mikroba yang digunakan untuk mengkonversi glukosa menjadi asam glukonat sedikit maka kemampuan mikroba untuk fermentasi menjadi berkurang (Firman dan Aryantha, 2003). Inokulum yang terlalu sedikit mengakibatkan waktu fermentasi menjadi lama dan produktifitas menurun (Anonim, 2005).

Waktu dan starter merupakan faktor penting yang harus dikendalikan dalam proses fermentasi asam glukonat, jika waktu dan starter dikombinasikan dengan tepat maka akan terbentuk produk asam glukonat yang baik dan bernilai ekonomis. Untuk itu perlu dilakukan pembatasan waktu fermentasi dan banyak starter yang digunakan, karena jika waktu fermentasi singkat maka akan menghasilkan asam glukonat yang rendah, sebaliknya jika waktu terlalu lama maka terjadi *over time* sehingga asam glukonat tidak terbentuk secara optimal. Banyaknya starter juga mempengaruhi proses fermentasi, jika starter

yang ditambahkan sedikit maka asam glukonat yang terbentuk rendah karena mikroba yang ada tidak mampu merombak glukosa secara optimal, sebaliknya jika terlalu banyak starter maka terjadi kompetisi antar mikroba dalam mempertahankan hidup dan berkembang, sehingga asam glukonat yang dihasilkan tidak optimal.

Peneliti sebelumnya Trisnaning (2005) dalam pembuatan asam glukonat dari glukosa hasil hidrolisis tepung sagu dengan proses fermentasi, diperoleh hasil terbaik pada penambahan volume starter 16% dengan waktu fermentasi 30 jam yaitu 12,74% asam glukonat.

Menurut Ramachandran (2006), konsentrasi glukosa pada produksi asam glukonat antara 110-250 g/liter. Pada penelitian ini digunakan konsentrasi glukosa sebesar 150 gram/liter. Perlakuan penambahan volume substrat dan perbedaan waktu yang diberikan diduga memberikan pengaruh terhadap hasil asam glukonat. Pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan lama fermentasi dan volume starter terhadap kadar asam glukonat yang dihasilkan dan mengetahui perlakuan kombinasi terbaik penambahan starter dan waktu fermentasi pada proses pembuatan asam glukonat secara fermentasi dengan *Aspergillus niger*

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan-bahan yang digunakan:

Bahan baku yang digunakan untuk pembuatan asam glukonat adalah Glukosa (*Dextrose Monohydrate*), sedangkan bahan untuk nutrisi mikroorganisme seperti NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 . Kapang *Aspergillus niger* yang digunakan untuk fermentasi diperoleh dari Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Airlangga Surabaya.

Alat yang digunakan:

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah inkubator, vortex, waterbatch shaker, pH meter, timbangan analitik, piknometer, spektrofotometer, alat-alat gelas untuk proses fermentasi.

Rancangan Penelitian

Metode penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola

faktorial terdiri dari 2 faktor, dimana masing-masing faktor 3 level, perlakuan diulang sebanyak dua kali. Untuk faktor data yang diperoleh dianalisis dengan analisis ragam, bila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji DMRT (Gasperz, 1991).

Faktor I :

Lama Fermentasi (A1 = 12 jam; A2= 18 jam; A3= 24 jam)

Faktor II :

Volume Starter (B1= 12 ml; B2= 16 ml; B3= 20 ml)

Metode Penelitian

Tahap Persiapan (pembinaan *Aspergillus niger*)

Menyiapkan media agar (PDA) dalam media pembiakan kemudian mengambil spora *Aspergillus niger* dengan menggunakan ose dalam ruang steril di dekat nyala api lalu tanam pada media yang telah disiapkan, yaitu berupa tabung reaksi (agar miring) dan cawan petri. Kemudian disimpan dalam suhu ruang \pm 3 hari dan *Aspergillus niger* siap digunakan

Tahap Pembuatan Starter

Menyiapkan larutan starter berupa larutan gula dengan kadar 15% (150 gr/L) dalam beaker glass, dan ditambahkan nutrisi berupa KH_2PO_4 0,025 gram, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,025 gram, dan NH_4NO_3 0,1 gram. Diaduk sampai homogen, kemudian dimasukkan 2 ose *Aspergillus niger* hasil biakan (dalam ruang steril), ditutup dengan aluminium foil kemudian aluminium diberi lubang untuk pernafasan mikroba, starter di letakkan dalam *water bach shaker* dan Starter siap digunakan setelah 7 hari.

Tahap Fermentasi Asam Glukonat

Menyiapkan larutan substrat berupa glukosa dengan kadar 15% (15 gram/100 ml), ditambah mineral-mineral KH_2PO_4

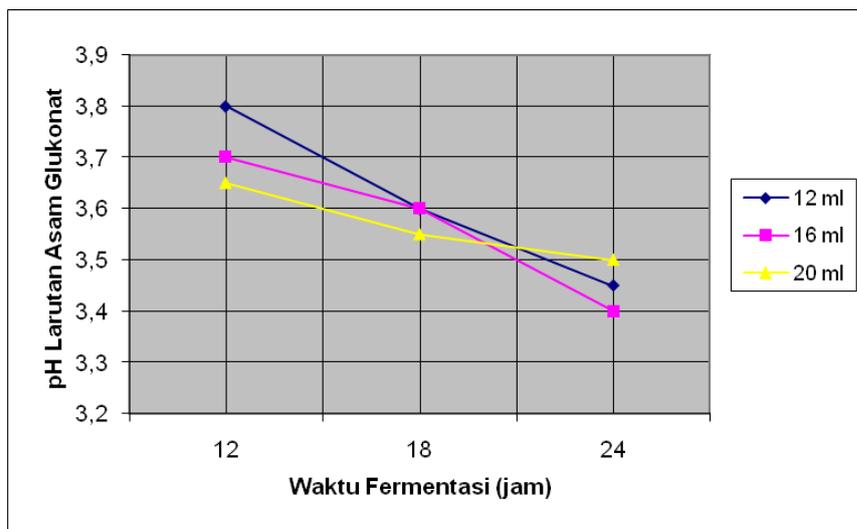
0,025 gram, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,025 gram, dan NH_4NO_3 0,1 gram, diaduk hingga homogen dan diatur pH larutan menjadi 5,5 unit pH. Kemudian dimasukkan starter yang telah disiapkan sesuai dengan perlakuan (12 ml, 16 ml dan 20 ml) ke dalam substrat dan diletakkan dalam "waterbach shaker", dengan waktu fermentasi sesuai dengan perlakuan (12, 18, 24 jam), setelah mencapai waktu yang telah ditentukan, beaker glass dikeluarkan dari "waterbath shaker". Kemudian dimasukkan ke dalam lemari pendingin untuk menghambat mikroba, dibiarkan selama 24 jam. Setelah itu saring untuk mengambil biomassa dan memperoleh filtrat.

Residu yang berupa biomassa dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 110°C untuk dikeringkan dan selanjutnya dihitung berat keringnya. Filtrat dianalisa kadar asam glukonatnya. Parameter yang diamati dalam penelitian ini yaitu: pH (Apriyanto, 1989), densitas (Anonim, 2005), kadar asam glukonat (AOAC, 1992) dan biomassa (Muljono, 1992).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Nilai pH

Berdasarkan hasil analisis ragam menunjukkan adanya interaksi yang nyata ($p \leq 0,05$) antara perlakuan waktu fermentasi dan volume starter terhadap pH asam glukonat. Dari hasil penelitian diperoleh pH larutan asam glukonat berkisar antara 3,4 – 3,8. Kombinasi perlakuan waktu fermentasi 12 jam dan volume starter 12 ml menghasilkan pH paling tinggi, sedangkan pH terendah didapatkan pada kombinasi perlakuan waktu fermentasi 24 jam dan volume starter 16 ml. Grafik kombinasi perlakuan waktu fermentasi dan volume starter terhadap pH larutan Asam Glukonat dapat dilihat pada Gambar 1.



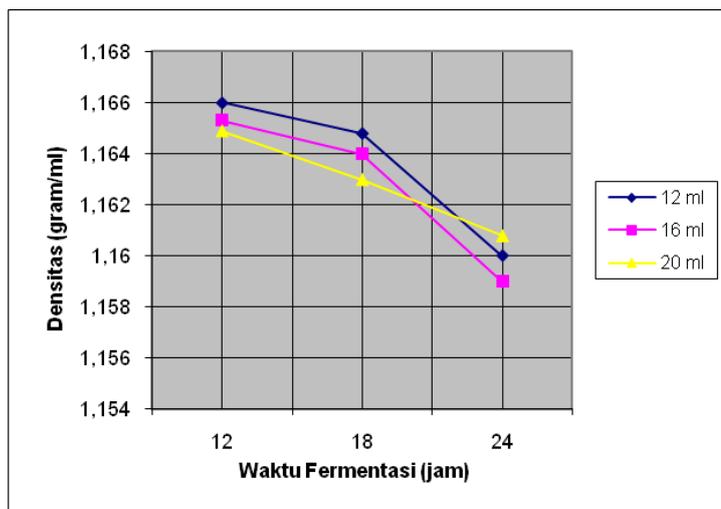
Gambar 1. Grafik antara waktu fermentasi dan volume starter terhadap pH asam glukonat

Semakin rendah waktu fermentasi dan volume starter maka semakin tinggi pH yang dihasilkan, hal ini disebabkan karena jumlah asam glukonat yang terbentuk masih sedikit, sehingga pH larutan belum begitu asam. Semakin tinggi waktu fermentasi dan volume starter maka pH yang dihasilkan semakin rendah, hal ini disebabkan karena kadar asam glukonat dalam larutan tinggi sehingga berpengaruh langsung terhadap penurunan pH. Aspek yang menghubungkan mikroorganisme penghasil asam glukonat (*Aspergillus niger*) dengan pH adalah bahwa perubahan pH dari medianya disebabkan karena aktivitas mikroorganisme itu sendiri, beberapa mikroorganisme dapat memproduksi asam yang membuat keadaan pH yang demikian rendah. Sebagian besar organisme dapat berfungsi dengan baik dalam selang pH 3-4 (Muljono, 1992). Menurut Presscot and Dunn (1981), pH

medium selama proses fermentasi asam glukonat akan turun dari 6 ke 3.

Nilai Densitas

Berdasarkan hasil analisis ragam menunjukkan adanya interaksi yang nyata ($p \leq 0,05$) antara perlakuan waktu fermentasi dan volume starter terhadap kadar asam glukonat yang terbentuk. Tabel 6. Dari hasil penelitian diperoleh densitas larutan asam glukonat berkisar antara 1,1590 gram/ml – 1,1660 gram/ml. Kombinasi Perlakuan waktu fermentasi 12 jam dan volume starter 12 ml menghasilkan densitas asam glukonat tertinggi, yakni 1,1660 gram/ml. Sedangkan densitas terendah didapatkan pada kombinasi perlakuan waktu fermentasi 24 jam dan volume starter 16 ml, yakni 1,1590 gram/ml. Grafik kombinasi perlakuan antara waktu fermentasi dan volume starter terhadap densitas larutan Asam Glukonat dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Grafik antara waktu fermentasi dan volume starter terhadap densitas asam glukonat

Semakin rendah waktu fermentasi dan volume starter maka densitas yang dihasilkan semakin tinggi, hal ini disebabkan karena masih sedikit asam glukonat yang terbentuk sehingga cairan glukosa masih pekat. Kepekatan ini yang menyebabkan densitas semakin besar.

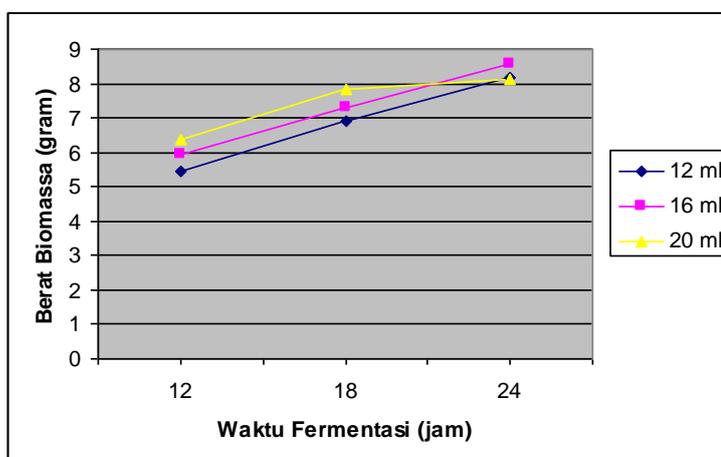
Semakin tinggi kadar asam glukonat maka semakin rendah densitas larutan karena asam glukonat menyebabkan larutan menjadi encer.

Pengukuran densitas menunjukkan bahwa asam glukonat mempunyai densitas 1,20 gr/ml, sedangkan glukosa sebesar 1,55 gr/ml. Semakin tinggi massa jenis suatu benda, maka semakin besar pula massa setiap volumenya (Anonim, 2009).

Nilai Biomassa

Berdasarkan hasil analisis ragam menunjukkan adanya interaksi yang nyata ($p \leq 0,05$) antara perlakuan waktu fermentasi dan volume starter terhadap berat biomassa yang terbentuk.

Dari hasil penelitian diperoleh berat biomassa berkisar antara 5,4345 gram - 8,5580 gram. Kombinasi perlakuan waktu fermentasi 12 jam dan volume starter 12 ml memberikan rata-rata biomassa terendah, sedangkan rata-rata biomassa tertinggi terdapat pada kombinasi waktu fermentasi 24 jam dan volume starter 16 ml. Grafik kombinasi perlakuan antara waktu fermentasi dan volume starter dapat dilihat pada Gambar 3.



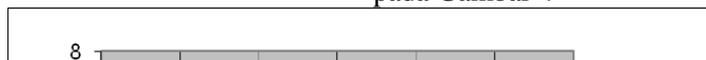
Gambar 3. Grafik antara waktu fermentasi dan volume starter terhadap berat biomassa

Semakin rendah waktu fermentasi dan volume starter maka berat biomassa semakin rendah, hal ini disebabkan karena pada kondisi tersebut merupakan awal fermentasi sehingga masih sedikit biomassa yang terbentuk. Semakin tinggi waktu fermentasi dan volume starter maka biomassa yang dihasilkan semakin tinggi. Besar-kecilnya jumlah biomassa berbanding lurus dengan asam glukonat yang dihasilkan.

Jika pertumbuhan mikroba dalam keadaan baik maka proses fermentasi dapat berlangsung dengan baik. Dengan demikian dihasilkan asam glukonat dan biomassa yang tinggi. Proses pertumbuhan mikroba sangat dinamik dan kinetiknya dapat digunakan untuk mengetahui produksi biomassa dalam suatu proses fermentasi (Firman dan Aryantha, 2003).

Kadar Asam Glukonat

Berdasarkan hasil analisis ragam menunjukkan adanya interaksi yang nyata ($p \leq 0,05$) antara perlakuan waktu fermentasi dan volume starter terhadap kadar asam glukonat yang terbentuk. Hasil penelitian menunjukkan kadar asam glukonat berkisar antara 5,446% - 7,405%. Kombinasi perlakuan waktu fermentasi 12 jam dan volume starter 12% memberikan rata-rata kadar asam glukonat terendah (5,446%), sedangkan rata-rata kadar asam glukonat tertinggi terdapat pada kombinasi waktu fermentasi 24 jam dan volume starter 16%, yaitu 7,405%. Grafik kombinasi perlakuan antara waktu fermentasi dan volume starter terhadap kadar asam glukonat dapat dilihat pada Gambar 4



Gambar 4. Grafik antara waktu fermentasi dan volume starter terhadap kadar asam glukonat

Semakin singkat waktu fermentasi dan semakin rendah volume starter maka kadar asam glukonat yang dihasilkan semakin rendah, hal ini disebabkan karena dalam selang waktu tersebut proses perombakan glukosa menjadi asam glukonat belum tercapai secara optimal atau dapat dikatakan masih dalam tahap awal proses pembentukan, sehingga kombinasi jumlah starter dan waktu fermentasi belum tepat.

Semakin lama fermentasi dan semakin tinggi volume starter menghasilkan kadar asam glukonat semakin tinggi, hal ini

disebabkan karena perombakan substrat selama proses terus berjalan seiring meningkatnya waktu fermentasi dan volume starter. Kenaikan kadar asam glukonat terjadi sampai selang waktu 24 jam karena pertumbuhan *Aspergillus niger* optimum pada jam tersebut. Sesuai pendapat Ramachandran (2006), pada fermentasi asam glukonat menggunakan *Aspergillus niger* dalam media kultur terendam (*submerged*) menghasilkan yield asam glukonat sampai 95% dalam waktu 24 jam.

Pada waktu fermentasi 24 jam dan volume starter 20 ml kadar asam glukonat sedikit menurun, hal ini disebabkan karena banyaknya mikroba menyebabkan terjadinya persaingan dalam mendapatkan makan/nutrisi untuk mempertahankan hidup sehingga mengakibatkan kinerja mikroba turun.

Jumlah mikroba yang digunakan harus tepat karena jika mikroba yang digunakan untuk mengkonversi glukosa menjadi asam glukonat sedikit maka kemampuan mikroba untuk fermentasi menjadi berkurang, begitupula jika mikroba yang digunakan berlebihan akan menghambat proses fermentasi dimana akan terjadi kematian pada mikroba (Firman dan Aryantha, 2003).

Secara umum faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroba adalah nutrisi yang terdapat dalam media dan faktor lingkungan. Faktor nutrisi meliputi tersedianya sumber karbon, nitrogen, vitamin, dan mineral (Gest, 2003).

A. KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan terjadi interaksi yang nyata antara perlakuan lama fermentasi dan volume starter terhadap kadar asam glukonat, pH, densitas dan biomassa yang dihasilkan. Kombinasi waktu fermentasi 24 jam dengan volume starter 16 ml menghasilkan asam glukonat terbesar yaitu 7,405%.

PUSTAKA

- Anonim, 1987, "Bioproses Dalam Industri Pangan". PAU Pangan dan Gizi UGM. Penerbit Liberty. Jogjakarta
- Anonim, 2005, <http://www.digilib.its.ac.id/detil.php> Tanggal diakses 19 Desember 2009.
- Anonymous, 2007, http://www.Fadliblog_Aspergillusniger.mht Tanggal diakses 20 April 2010.
- Anonymous, 2007, <http://www.Fermentasi.com> Tanggal diakses 19 Mei 2010
- Anonim, 2008, <http://www.riezz.wordpress.com> Tanggal diakses 19 Mei 2010
- Anwar, Ali, Sardar, 2008, "Citric Acid Fermentation of Hydrolysed Raw Starch by *Aspergillus niger* IIB-A6 in Stationary Culture", *Sindh Univ. Res. Jour. (Sci. Ser.)* Vol. 41
- Fatmawati, Agustriyanto dan Lindawati, 2009, "Kinetic Study of Gluconic Acid Batch Fermentation by *Aspergillus niger*". *World Academy of Science, Engineering and Technology*.
- Firman, dan Aryantha, 2003. "Eksplorasi dan Isolasi Enzim Glukosa Oksidase dari Fungi Imperfeksi (*Genus Penicillium dan Aspergillus*) Indigenus". KPP Ilmu Hayati LPPM ITB

- Gaspersz, V., 1991, "*Metode Perancangan Percobaan*", CV. Armico, Bandung.
- Kent A James, 1983, "*Riegel's Hand Book of Industrial Chemistry*", Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- Mangkusubroto, K. dan T. Listiari. 1987. "*Analisa Keputusan. Pendekatan Sistem dalam Manajemen Usaha dan Proyek*". ITB, Bandung.
- Michael J Waites, 2001, "*Industrial Microbiology An Intoduction*", Blackwell sciene. Oxford
- Muljono. J, 1992, "*Teknologi Fermentasi*", Rajawali Pers, Jakarta
- Muchtadi, D. 1992, "*Petunjuk Laboratorium Fisiologi Pasca Panen Sayuran dan Buah-buahan*", PAU Pangan dan Gizi. IPB. Bogor.
- Petruccioli, M. V. Pulci, F. 1993, "*Itaconic Acid Production by Aspergillus on Raw Starchy Materials*", Willey Online Library.
- Prescott and Dunn's, 1981, "*Industrial Microbiology 4th edition*", AVI Publishing Company Inc, Westport, Connecticut.
- Rahman, Ansori. 1989, "*Pengantar Teknologi Fermentasi*". Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi. PAU Pangan dan Giji. IPB Bogor
- Ramachandran Sumitra, Pierre Fontanille, Ashok Pandey, dan Christian Larroche, 2006. Gluconic Acid, Food Technol. Biotechnol. ISSN 1330-9862. FTB-1651
- Siagian, P. 1987. Penelitian Operasional. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Ulmann's, 1984, "*Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry vol A-12 5th edition*", Mc Graw Hill Book Company Inc, New york
- Whitaker, R.J. (1972), "*Principle of enzymology for the food science*". Mergel Dekker Inc, New York, 561-570.