

**PENGARUH pH AWAL MEDIA DAN LAMA FERMENTASI TERHADAP  
PRODUKSI KALSIMUM SITRAT DARI LIMBAH BREM DENGAN  
MENGUNAKAN *Aspergillus niger* ATCC 16404**

I Wayan Adi Wagestu<sup>1</sup>, Nyoman Semadi Antara<sup>2</sup>, G.P. Ganda Putra<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, UNUD

<sup>2</sup>Dosen Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, UNUD

E-mail: wagestuadi@yahoo.com<sup>1</sup>

E-mail koresponden: semadi.antara@unud.ac.id<sup>2</sup>

**ABSTRACT**

Brem waste has sugar content of 12% and its starch content is 10.8%. Components contained in the brem waste are expected to be able to be used to produce Ca-citrate. The purpose of this research was to find out the media's initial pH effect and fermentation time on Ca-citrate production from brem waste by using *Aspergillus niger* ATCC 16404. The research was an experimental research using the randomized block design with the factorial experiment pattern that consists of two factors. The first factor was the media's initial pH (3, 4, 5, and 6), and the second factor was the fermentation time (3, 5, and 7 days). The result showed that the initial pH of medium fermentation affected the medium pH after fermentation and production of Ca-citrate, but it didn't influence the total soluble solid of medium fermentation. Fermentation time influenced Ca-citrate production, final pH, and total soluble solid of fermentation medium. The fermentation with media's initial pH of 5 and the fermentation for 5 days was the best combination treatments to produce Ca-citrate which the production level was  $5,35 \pm 0,06$  g/L.

Keywords: *Aspergillus niger* ATCC 16404, brem waste flour, pH, fermentation time, Ca-citrate

**PENDAHULUAN**

Brem merupakan salah satu makanan tradisional hasil fermentasi beras ketan yang mempunyai cita rasa enak, tekstur tidak lembek, kering, dan mudah hancur di mulut. Ada 2 macam brem yang dikenal yaitu brem padat dan brem cair atau brem Bali. Bahan baku yang digunakan dalam pembuatan brem padat adalah beras ketan putih dan difermentasi dengan *Saccharomyces cerevisiae*. Proses pembuatan brem padat ada berbagai macam cara. Tetapi pada prinsipnya proses tersebut dibagi dalam beberapa tahap, yaitu beras ketan dicuci dan dikukus, kemudian diberi ragi dan difermentasi sehingga diperoleh tape ketan. Selanjutnya tape dipres sehingga diperoleh sari tape kemudian dimasak dan dikeringkan sehingga dihasilkan brem. Ampas sisa pengepresan tape ketan merupakan limbah brem yang masih mengandung pati 10,80% dan gula 12% (Margaretha *et al.*, 2015).

Limbah brem sebagian besar baru dimanfaatkan untuk pakan ternak saja, maka dari itu pemanfaatan limbah brem belum berjalan secara optimal. Hal ini menyebabkan sebagian besar sisa dari limbah brem yang tidak dimanfaatkan dibuang begitu saja dan dapat menyebabkan terjadinya pencemaran pada lingkungan. Dalam pengolahan brem akan diperoleh sari tape (cairan tape) sebanyak 75 % dari berat tape, sedangkan limbah atau ampasnya sebesar 25 % yang terdiri dari 12% gula dan pati 10,80%. Dengan kandungan gula dan pati yang masih tinggi tersebut, maka limbah brem dapat dimanfaatkan untuk diolah menjadi kalsium sitrat (Ca-sitrat).

Ca-sitrat merupakan produk antara dari produksi asam sitrat. Ca-sitrat dapat dihasilkan dengan menambahkan kalsium karbonat atau kalsium hidroksida ke dalam supernatant hasil fermentasi asam sitrat (Heding dan Gupta, 1975; Azhary *et al.*, 2013). Ca-sitrat umumnya digunakan dalam industri makanan sebagai zat aditif makanan, pengawet, dan meningkatkan rasa. Produksi Ca-sitrat didahului dengan proses fermentasi produksi asam sitrat. Semakin tinggi asam sitrat hasil fermentasi, maka Ca-sitrat yang dihasilkan juga semakin tinggi. Fermentasi produksi asam sitrat dapat dilakukan dengan *Aspergillus niger* pada medium yang mengandung glukosa. Pembentukan asam sitrat terjadi di dalam sel-sel hidup *A. niger* sebagai akibat aktivitas enzim intrasellular dan asam sitrat yang terakumulasi keluar dari sel secara difusi (Kapoor *et al.*, 1982).

Fermentasi kultur terendam (*submerged fermentation*) pada proses produksi asam sitrat memiliki beberapa kelebihan dibandingkan proses fermentasi pada media padat (*solid state fermentation*). Dengan proses kultur terendam, rendemen asam sitrat yang dihasilkan lebih tinggi, ongkos kerja dan pemeliharaan lebih rendah serta kontaminasi media dan produk lebih kecil (Paturau, 1981). Pada fermentasi sistem ini, setelah media dan nutrient diinokulasi dengan *Aspergillus niger*, maka dilakukan aerasi dan agitasi terkontrol. Waktu fermentasi pada sistem ini relatif pendek, yaitu 3-7 hari dengan suhu sekitar 25–30<sup>0</sup>C. Cairan terfermentasi dikeluarkan dan dimurnikan untuk mendapat asam sitratnya (Kapoor *et al.*, 1982). Ali *et al.* (2002) menyatakan bahwa proses fermentasi kultur terendam pada media 15% molase menggunakan *Aspergillus niger* secara batch selama 144 jam dapat menghasilkan asam sitrat maximum sebesar 99,56 ± 3,5 g/L. Produksi asam sitrat pada proses fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah jenis media, pH media, waktu fermentasi, suhu, aerasi, dan mikroorganisme yang digunakan (Friedrich *et al.* 1994).

Papagianni *et al.* (1999) menyatakan bahwa selain konsentrasi gula dan lama fermentasi, produksi asam sitrat juga dipengaruhi oleh pH pada media fermentasi karena beberapa enzim yang berperan dalam siklus tricarboxylic acid (TCA) sensitif terhadap pH.

Kondisi pH optimal untuk produksi asam sitrat adalah sekitar 4-6 selama fermentasi (Maulana, 2011), bila substrat yang digunakan berupa sukrosa, glukosa, dan tetes yang relatif murni maka dianjurkan menggunakan pH dibawah 3. Nilai pH yang lebih tinggi cenderung meningkatkan akumulasi asam oksalat, namun bila substrat yang digunakan tetes yang kurang murni dianjurkan menggunakan pH lebih tinggi, karena pH rendah menghambat pertumbuhan *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap tepung limbah brem yang berpotensi menghasilkan Ca-sitrat melalui proses fermentasi produksi asam sitrat. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh pH awal media dan lama fermentasi terhadap produksi Ca-sitrat dari limbah brem dengan menggunakan *Aspergillus niger* ATCC 16404 dan untuk mendapatkan berapa pH awal media dan lama fermentasi yang digunakan agar mendapatkan Ca-sitrat tertinggi.

## METODE PENELITIAN

### Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Bioindustri Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Laboratorium Analisis Pangan Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan, dan Laboratorium Mikrobiologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Udayana pada April sampai September 2016.

### Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : Erlenmeyer (Schoot 250 ml), timbangan analitik (Shimadzu/ATY 224), autoclave (Hirayama/HVE-50), *hot plate* (HP 220), pH meter (Senz pH digital tester), oven (Blue M), sentrifuge (K.3 Series/BRK 5436), refractometer (Atago), biuret, aluminium foil, kapas, tisu, botol sampel, incubator (Mommert), tabung reaksi (Iwaki Pirex), jarum ose, lampu bunsen, laminar (Kojair/SL-170), shaker (Health/H-MSR), dan alat-alat gelas.

### Bahan

Kultur kapang yang digunakan adalah *A. niger* ATCC 16404 yang diperoleh dari koleksi kultur Institut Pertanian Bogor (IPB), Bogor. Penggunaan kultur *A. niger* ATCC 16404 berdasarkan dari penelitian sebelumnya menyatakan bahwa *A. niger* dapat digunakan sebagai biokatalis dalam produksi asam sitrat secara fermentasi (Chau, 2002). Bahan sumber karbon yang digunakan pada penelitian ini adalah limbah brem hasil samping dari pembuatan brem yang memiliki perbandingan antara beras ketan putih dan hitam 1:9 merupakan hasil

pengepresan selama 3 jam. Limbah ini diperoleh dari perusahaan pembuatan brem yakni FA. Udiyana yang berlokasi di Jalan Danau Tondano, Denpasar Bali. Media yang digunakan untuk pertumbuhan kapang adalah media agar PDA. Sedangkan bahan-bahan kimia yang digunakan antara lain: NaOH, HCL, Ca (OH)<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, metanol, Urea, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, indikator PP, gliserol (Pronadisa), NaCl (Merck), alkohol 70% (Brataco chemika), aquades, buffer pH 4 dan buffer pH 7.

### **Pembuatan Tepung Limbah Brem**

Tahapan dalam pembuatan tepung limbah brem meliputi: pengering (*oven*), penggilingan dan pengayak. Proses pengeringan limbah brem dilakukan dengan cara dioven pada suhu 60°C selama 18 jam. Dari proses pengeringan ini dihasilkan limbah brem kering dengan kadar air 10%. Selanjutnya dilakukan proses penepungan, limbah brem kering digiling atau blender hingga halus. Setelah itu dilakukan proses pengayakan dengan ayakan sebesar 60 mesh (Subakti *et al.* 2015).

### **Persiapan kultur *A.niger***

Kultur *Aspergillus niger* ATCC 16404 dibuka dari tabung agar miring dan disegarkan dengan cara disebar kembali pada cawan petri yang telah diisi media PDA. Media diinkubasi selama 3-4 hari pada suhu 30°C dalam inkubator, lalu dilakukan penggoresan pada cawan petri yang telah diisi media PDA dan diinkubasi kembali selama 2-3 hari. Setelah 2-3 hari dilakukan penggoresan lagi pada media yang sama dan diinkubasi pada waktu dan suhu yang sama. Selanjutnya dilakukan penggoresan pada agar miring. Media diinkubasi kembali selama 3 hari pada suhu 30°C. Koloni *Aspergillus niger* ATCC 16404 siap digunakan untuk proses fermentasi. (Rahman, 1992 dalam Widyanti, 2010).

### **Hidrolisis Limbah Brem**

Hidrolisis bertujuan untuk meningkatkan kadar gula pada tepung limbah brem yang awalnya adalah 12%. Proses hidrolisis dilakukan secara kimiawi dengan menambahkan asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pekat ke dalam suspensi tepung limbah brem 30% sampai tercapai nilai pH 3-4. Selanjutnya dipanaskan pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 30 menit menggunakan autoclave (Betikul dan Adesina, 2013). Proses hidrolisis ini menghasilkan suspensi tepung limbah brem terhidrolisis dengan kadar gula 17%.

### **Persiapan Media Fermentasi**

Suspensi tepung limbah brem terhidrolisis ditambahkan (g/100ml): MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,02 g, CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O 0,293 g, dan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,186 g. Formulasi ini merupakan modifikasi media yang digunakan oleh Widyanti (2010). Semua bahan dicampur merata dan diatur pHnya sesuai

dengan perlakuan (pH 3, 4, 5, dan 6). Selanjutnya media disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit didalam autoclave.

### **Fermentasi Produksi Asam Sitrat**

Tahap fermentasi dilakukan secara kultur terendam (Udin, 1986). Ke dalam media fermentasi steril diinokulasikan starter kapang *Aspergillus niger* ATCC 16404 yang telah dibuat kemudian dilakukan fermentasi aerob dan pengadukan dengan *shaker*. Lama fermentasi yaitu 3 hari, 5 hari, dan 7 hari dengan suhu 30°C, dan dengan pH awal media 3, 4, 5, dan 6. Setelah fermentasi dilakukan pemisahan supernatant hasil fermentasi dengan sentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Selanjutnya, supernatant yang dihasilkan digunakan untuk produksi Ca-sitrat. Supernatan juga diamati pH dan total padatan terlarutnya.

### **Produksi Ca-Sitrat**

Produksi Ca-sitrat didahului dengan proses produksi asam sitrat. Supernatan hasil fermentasi dipresipitasi dengan menambahkan Ca(OH)<sub>2</sub> sampai tercapai pH 7 kemudian dipanaskan pada suhu mendidih selama 10 menit, sehingga terbentuknya endapan Ca-sitrat. Sampel yang sudah melalui proses pemanasan, kemudian didinginkan dan disentrifugasi selama 15 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 5.000 rpm untuk memisahkan endapan dan filtratnya. Selanjutnya dilakukan proses pencucian endapan Ca-sitrat menggunakan aquades sebanyak dua kali. Setelah melalui proses pencucian tersebut, endapan dikeringkan pada suhu 105°C sampai berat konstan. Endapan yang sudah kering ditimbang dan dicatat berat Ca-sitratnya. Produksi Ca-sitrat dinyatakan dalam gram Ca-sitrat yang dihasilkan per 1 liter media fermentasi (g/L).

### **Penentuan Total Padatan Terlarut**

Pengukuran total padatan terlarut dapat diukur dengan menggunakan refrakto meter. Alat refrakto meter dibersihkan dan distandarisasi dengan aquades. Kemudian sampel yang telah difermentasi diambil menggunakan pipet tetes, kemudian diteteskan pada refrakto meter. Angka yang ditunjukkan oleh refraktometer diamati dan hasil tersebut dicatat (Anonymous, 2010).

### **Penentuan Derajat Keasaman (pH)**

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter (Senz pH digital tester) (Anonymous, 2016). Alat pH meter yang telah dinyalakan dan distabilkan kemudian distandarisasi dengan larutan buffer pada pH 4 dan pH 7. Suhu sampel diukur dan pengatur suhu diset pada suhu tersebut. Elektroda dibilas dan dikeringkan dengan kertas tisu

kemudian dicelupkan kedalam sampel. Nilai pH meter dibiarkan hingga menunjukkan suatu angka yang stabil, angka ini dicatat sebagai nilai pH terukur.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Produksi Ca-Sitrat

Hasil analisi ragam menunjukkan bahwa perlakuan pH awal media dan lama fermentasi berpengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ), sedangkan interaksi kedua perlakuan berpengaruh tidak nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap Ca-sitrat hasil fermentasi limbah brem. Nilai rata-rata Ca-sitrat hasil fermentasi limbah brem dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai rata-rata produksi Ca-sitrat fermentasi limbah brem (g/L)

pH awal media	Lama Fermentasi (Hari)			Rata-rata
	3	5	7	
3	1,85 ± 0,01	4,14 ± 0,06	0,47 ± 0,04	2,15 ± 0,04d
4	2,48 ± 0,02	4,34 ± 0,08	1,33 ± 0,07	2,72 ± 0,06c
5	6,34 ± 0,06	7,45 ± 0,04	2,37 ± 0,04	5,35 ± 0,06a
6	2,36 ± 0,00	5,69 ± 0,04	1,47 ± 0,04	3,17 ± 0,03b
Rata-rata	3,26 ± 0,02b	5,35 ± 0,06a	1,41 ± 0,05c	

Keterangan: Data merupakan nilai rata-rata dari 2 kelompok dengan simpangan bakunya (SD). Huruf yang sama di belakang nilai rata-rata menunjukkan perbedaan yang tidak nyata pada uji beda Duncan 5%

Tabel 1 menunjukkan bahwa nilai rata-rata produksi Ca-sitrat hasil fermentasi limbah brem pada perlakuan pH awal media berbeda dan lama fermentasi yang juga berbeda. Ca-sitrat yang dihasilkan pada perlakuan pH awal media 5 mendapatkan nilai tertinggi (5,35 ± 0,06) dibandingkan dengan pH awal media 6 yaitu (3,17 ± 0,03) yang tidak berbeda nyata dengan 4 yaitu (2,72 ± 0,06) tetapi menunjukkan perbedaan yang nyata pada pH awal media 3 yaitu (2,15 ± 0,04). Perlakuan lama fermentasi dengan fermentasi 5 hari mendapatkan nilai tertinggi (5,35 ± 0,06) dibandingkan dengan lama fermentasi 3 hari yaitu (3,26 ± 0,02) dan lama fermentasi 7 hari (1,41 ± 0,05).

Hal ini menunjukkan bahwa nilai rata-rata produksi Ca-sitrat tertinggi terdapat pada perlakuan pH awal media 5 dan lama fermentasi 5 hari adalah sebesar 5,35 ± 0,06 g/L , sedangkan nilai rata-rata Ca-sitrat terendah terdapat pada pH awal media 3 adalah sebesar 2,13 ± 0,04 dan lama fermentasi 7 hari sebesar 1,41 ± 0,06 g/L. Nilai tertinggi kadar Ca-sitrat pada kondisi pH 5 diduga karena *Aspergillus niger* tumbuh secara optimal dan selama waktu

fermentasi 5 hari gula terkonversi menjadi asam oleh mikroba dalam cairan tepung limbah brem yang difermentasi. Hasil produksi asam sitrat tertinggi diperoleh dari waktu fermentasi 5 hari yaitu sebesar 4,46% (Azahry, 2013). Selama proses fermentasi, khamir, kapang, dan bakteri melakukan metabolisme sukrosa, yang menghasilkan asam-asam organik (Afifah, 2010). Berat Ca-sitrat yang telah diperoleh berdasarkan perlakuan terbaik kemudian dikonversikan menjadi berat asam sitrat ekuvalen dengan menggunakan perhitungan stoikiometri, sehingga diperoleh berat asam sitrat sebesar 4 g/L. Produksi asam sitrat terbaik pada konsentrasi molase 15% dan lama fermentasi 5 hari menghasilkan kadar asam sitrat sebesar 12,66 g/L dengan menggunakan *Aspergillus niger* NRRL – A - 11.264 (Udin, 1986).

**Total Padatan Terlarut**

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan lama fermentasi berpengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ), sedangkan perlakuan pH awal media dan interaksi kedua perlakuan berpengaruh tidak nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap TSS fermentasi limbah brem. Nilai rata-rata TSS fermentasi limbah brem dapat dilihat pada Tabel 2

Tabel 2. Nilai rata-rata TSS fermentasi limbah brem (%)

pH awal media	Lama Fermentasi (Hari)			Rata-rata
	3	5	7	
3	13,50 ± 0,70	12,25 ± 1,06	11,50 ± 0,70	12,42 ± 0,82a
4	14,00 ± 0,00	12,50 ± 0,70	12,25 ± 0,35	12,92 ± 0,82a
5	14,75 ± 0,35	12,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	13,25 ± 0,82a
6	14,25 ± 1,06	11,50 ± 0,70	12,50 ± 0,70	12,75 ± 0,82a
Rata-rata	14,13 ± 1,06a	12,06 ± 0,70b	12,31 ± 0,70b	

Keterangan: Data merupakan nilai rata-rata dari 2 kelompok dengan simpangan bakunya (SD). Huruf yang sama di belakang nilai rata-rata menunjukkan perbedaan yang tidak nyata pada uji beda Duncan 5%

Tabel 2 menunjukkan bahwa nilai rata-rata total padatan terlarut fermentasi limbah brem pada perlakuan lama fermentasi berbeda. Total padatan terlarut yang dihasilkan pada perlakuan lama fermentasi 3 hari mendapatkan nilai tertinggi (14,13% ± 1,06) dibandingkan dengan lama fermentasi 5 hari yaitu (12,06% ± 0,70) yang tidak berbeda nyata dengan lama fermentasi 7 hari yaitu (12,31% ± 0,70). Menurunnya total padatan terlarut terjadi selama proses fermentasi berlangsung, gula yang merupakan komponen dominan dalam medium dimetabolisme oleh kapang menjadi asam organik kemudian dimanfaatkan oleh kapang *Aspergillus niger* sebagai sumber karbon untuk memproduksi Ca-sitrat sehingga total padatan

terlarut menjadi menurun, hal ini diperkuat dengan pernyataan Sutarmi (2005), selama proses fermentasi khamir dan kapang melakukan metabolisme sukrosa menjadi asam-asam organik.

**Derajat Keasaman (pH)**

Hasil analisi ragam menunjukkan bahwa perlakuan pH awal media berpengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ), sedangkan perlakuan lama fermentasi dan interaksi kedua perlakuan berpengaruh tidak nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap pH akhir fermentasi limbah brem. Nilai rata-rata pH akhir fermentasi limbah brem dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai rata-rata pH akhir fermentasi limbah brem

pH awal media	Lama Fermentasi (Hari)			Rata-rata
	3	5	7	
3	5,23 ± 0,81	5,00 ± 0,84	4,80 ± 0,84	5,01 ± 0,01c
4	5,57 ± 0,47	5,40 ± 0,56	5,20 ± 0,56	5,39 ± 0,04b
5	6,22 ± 0,31	5,80 ± 0,14	5,60 ± 0,14	5,87 ± 0,07a
6	5,82 ± 0,96	5,55 ± 0,91	5,30 ± 0,84	5,56 ± 0,04a
Rata-rata	5,71 ± 0,63a	5,44 ± 0,61a	5,23 ± 0,59a	

Keterangan: Data merupakan nilai rata-rata dari 2 kelompok dengan simpangan bakunya (SD). Huruf yang sama di belakang nilai rata-rata menunjukkan perbedaan yang tidak nyata pada uji beda Duncan 5%

Hasil pengukuran pH media fermentasi ditunjukkan pada Tabel 3 menunjukkan bahwa nilai rata-rata pH akhir fermentasi limbah brem pada perlakuan pH awal media berbeda dan lama fermentasi yang juga berbeda. pH akhir fermentasi yang dihasilkan pada perlakuan pH awal media 5 mendapatkan nilai sebesar (5,87 ± 0,07) yang tidak berbeda nyata dengan pH awal media 6 yaitu (5,56 ± 0,04) tetapi menunjukkan perbedaan yang nyata pada pH awal media 4 yaitu (5,39 ± 0,04) dan pH awal media 3 yaitu (5,01 ± 0,01). Menurut Carolina *et al.* (2015), pada fermentasi asam sitrat menggunakan molase, penurunan pH terjadi selama waktu fermentasi. Hal ini dimungkinkan terjadi karena adanya reaksi penyangga pH, karena terbentuknya asam-asam lemah yang membentuk buffer dengan garamnya.



## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Berdasarkan data hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa perlakuan pH awal media dan lama fermentasi berpengaruh nyata terhadap kadar Ca-sitrat dan derajat keasaman (pH) akhir. Perlakuan pH awal media tidak berpengaruh nyata terhadap total padatan terlarut, tetapi perlakuan lama fermentasi yang berpengaruh nyata terhadap total padatan terlarut. Sedangkan interaksi antara perlakuan tidak berpengaruh terhadap kadar Ca-sitrat, total padatan terlarut, dan derajat keasaman (pH) akhir. Perlakuan pH awal media 5 dan lama fermentasi 5 hari menghasilkan Ca-sitrat tertinggi yaitu  $5,35 \pm 0,06$  g/l.

### Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai fermentasi Ca-sitrat dengan menambahkan faktor-faktor lain sebagai perlakuan seperti suhu, waktu hidrolisis, dan konsentrasi penambahan asam kuat saat hidrolisis yang digunakan dalam proses fermentasi untuk mendapatkan kadar Ca-sitrat yang lebih tinggi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afifah, N. 2010. Analisis kondisi dan potensi lama fermentasi medium kombucha (teh, kopi, rosela) dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen (*Vibrio cholerae* dan *Bacillus cereus*). Skripsi. Tidak dipublikasikan. Universitas Islam Negeri, Malang.
- Ali, S., U.H. Ikram, M.A. Qadeer, dan J. Iqbal, 2002. Production of citric acid by *Aspergillus niger* using cane molasses in a stirred fermentor. *Electronic Journal of Biotechnology* 5(3): 125-132.
- Azhary, H. R. Ovelando, M.A. Nabilla. 2013. Fermentasi Buah Markisa (*Passiflora*) Menjadi Asam Sitrat. *Jurnal Teknik Kimia*. 9(3): 15-21
- Betikul, E. dan O.A. Adesina. 2013. Optimization of sweet potato starch hydrolyzate production and its potential utilization as substrate for citric acid production. *British Biotechnology Journal* 3(2): 169-182.
- Carolina, A., A. Sidik, I.P. Maksum, S.D. Rachman, A. Safari, dan S. Ishmayana. 2015. Fermentasi biak rendam molases dengan *Aspergillus niger* untuk produksi asam sitrat. *Chimica et Natura Acta* 3(1): 25-29.
- Chau, L. 2002. Citric and Lactic acids fermentation from starch waste, The university of Queensland.

- Friedrich, J., A. Cimerman, dan W. Steiner. 1994. Concomitant biosynthesis of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes and citric acid on sucrosa. J. Enzym and Microbial Technology 16: 703-710
- Heding, L.G. dan Gupta, J.K. 1975. Improvement of condition for precipitation of citric acid from fermentation mash (*Communication to Editor*). Biotechnology and Bioengineering 17: 1363-1364.
- Kapoor, K.K., K. Chaudhary, dan P. Tauro. 1982. Citric acid. Di dalam Reed, G. (Ed) Industrial microbiology, 4th ed, P.709. AVI Publishing Company, Westport-Connceti – Cut.
- Maulna, N. 2011. Pabrik asam sitrat dari tepung tapioca dengan proses fermentasi. Skripsi. Tidak dipublikasikan. Fakultas Teknologi Industri. Universitas Pembangunan Nasional, Jawa timur
- Papagianni, M., M. Matthey, M. Berovic dan B. Kristiansen. 1999. *Aspergillus niger* morphology and citric acid production in submerged batch fermentation: effects of culture pH, phosphate and manganese levels. Food Technol Biotechnol 37:165–71.
- Paturau, J.M. 1981. By Product of Cane Sugar Industry. El – Sevier Publishing Company, Amsterdam.
- Rahman. 1992. Produksi metabolit primer. Penerbit ARCAN, Jakarta.
- Subakti, K.A.A., N.S. Antara, I.B.W. Gunam. 2015. Studi kemampuan *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus* untuk produksi asam lemak rantai pendek dari fermentasi tepung rebung bambu tabah (*Gigantochloa nigrociliata* Buse-Kurz). Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri 4(1): 45-51
- Sutarmi, M. 2005. Pengembangan produk kombucha probiotik berbahan baku teh hijau dan teh oolong. Skripsi. Tidak dipublikasikan. Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian, Bogor.
- Hasanudin, U. 1986. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap produksi asam sitrat dari tetes tebu dengan menggunakan *Aspergillus niger* NRRL. A- 11.264 pada sistem kultur tercelup. Skripsi. Tidak dipublikasikan. Fakultas Teknologi Pertanian IPB, Bogor.
- Widyanti, E.M. 2010. Produksi asam sitrat dari substrat molase pada pengaruh penambahan VCO (*Virgin Coconut Oil*) terhadap produktivitas *Aspergillus niger* itbcc 174 terimobilisasi. Tesis. Tidak dipublikasikan. Jurusan Teknik Kimia. Universitas Diponegoro, Semarang.