

Pengaruh Konsentrasi Substrat Tepung Limbah Brem dan Lama Fermentasi Terhadap Produksi Kalsium Sitrat dengan Menggunakan *Aspergillus niger* ATCC 16404

Gusti Putu Agus Darmataba¹, Nyoman Semadi Antara², G.P. Ganda Putra²

¹Mahasiswa Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, UNUD

²Dosen Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, UNUD

E-mail : gustidarmataba739@yahoo.com¹

E-mail koresponden: semadi.antara@unud.ac.id²

ABSTRACT

Dregs brem is a waste of manufacture brem, from basic materials are made to be brem, only about 75% has managed to become brem while the remaining 25% to waste, brem waste still contains 10% sugar and starch by 12%. This research was done to determine the effects of substrate concentration and fermentation time on the production of calcium citrate from waste brem by using *Aspergillus niger*. The research was experimental research, using a randomized block design factorial design, consisting of two factors. The first factor is the substrate concentration (25%, 30% and 35%), the second factor was the fermentation time (3, 5, and 7 days). The results showed that the concentrations of substrate and fermentation time very significant effect on the level of calcium citrate, total soluble solids and acidity (pH). The interaction of both treatment effect was not significant on the level of calcium citrate, total soluble solids and acidity (pH) fermented flour waste brem using *Aspergillus niger*. The average value is highest Ca-citrate in the treatment of substrate concentration of 30% amounting to 4.38 g/L and fermentation time 5 days amounted to 4.76 g/L.

Keywords: *Aspergillus niger*, flour waste Brem, substrate concentration, time of fermentation, calcium citrate

PENDAHULUAN

Ampas brem merupakan limbah dari pembuatan brem dengan bahan baku beras ketan, dari bahan dasar yang diproses hingga menjadi brem, hanya sekitar 75% yang berhasil menjadi brem sedangkan sisanya 25% menjadi limbah yang berupa ampas beras ketan yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber pakan alternatif ternak ruminansia. Pemanfaatan limbah dari hasil pertanian dapat meningkatkan produktivitas ternak dan nilai ekonomi bagi peternak. Selain untuk pakan ternak limbah brem juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku untuk pembuatan asam sitrat (Rahman, 1992).

Seiring dengan perkembangan teknologi yang semakin meningkat, ampas brem kini dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan kalsium sitrat (Ca-sitrat), karena ampas brem masih mengandung gula dan pati (Ulfa, 1996). Salah satu inovasi yang dapat dilakukan yakni memanfaatkan limbah brem untuk diolah menjadi kalsium sitrat (Ca-sitrat) mengingat kandungan gula yang terdapat dalam limbah brem cukup banyak. Senyawa karbon utama dalam memproduksi Ca-sitrat adalah glukosa.

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; Azari *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. 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).

Produksi asam sitrat pada proses fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah jenis media, pH media, waktu fermentasi, suhu, dan mikroorganisme yang digunakan. Faktor yang paling menentukan adalah media tumbuh (substrat) dan mikroorganisme yang digunakan (Friedrich *et al.*, 1994). Berdasarkan keadaan tersebut, banyak penelitian dilakukan untuk mendapatkan asam sitrat dengan kualitas baik dan rendemen tinggi, juga dilakukan penelitian dengan variasi konsentrasi substrat dan lama waktu fermentasi yang dapat meningkatkan produksi dan kualitas asam sitrat. Hasil penelitian 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 maksimum sebesar $99,56 \pm 3,5$ g/L.

Berdasarkan beberapa penelitian yang telah disebutkan di atas, dan potensi limbah brem yang masih mengandung gula dan pati, maka perlu dilakukan penelitian untuk menghasilkan asam sitrat dari limbah brem. Kadar gula dalam limbah brem yaitu sebesar 12% dan kadar pati pada limbah brem adalah sebesar 10% (Anonymous, 2016), jika dibandingkan dengan kadar gula pada molase yang mencapai 62% (Dellweg, 1983), maka konsentrasi substrat yang digunakan juga perlu ditambah agar mendapat hasil yang optimal.

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh konsentrasi substrat dan lama fermentasi terhadap produksi Ca-sitrat dari limbah brem dengan menggunakan *Aspergillus niger* dan mendapatkan berapa konsentrasi substrat dan lama fermentasi yang digunakan agar mendapatkan Ca-sitrat tertinggi.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

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

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: Erlenmeyer (School 250 ml), shaker (Healt/H-MSR), laminer(Kojair/SL-170), inkubator (Mommert), autoclave(Hirayama/HVE-50), timbangan analitik(Shimadzu/ATY 224), pH meter (Senz pH digital tester), sentrifuge (K.3 Series/BRK 5436), refraktometer (Atago), cawan petri, bunsen, pipet, tabung reaksi (Iwaki Pirex), jarum oshe, oven, hot plate, kapas, tissue, aluminium foil, dan alat-alat gelas lainnya.

Bahan

Kultur kapang yang digunakan adalah *A. niger* yang diperoleh dari koleksi kultur Institut Pertanian Bogor (IPB). Bahan sumber karbon yang digunakan pada penelitian ini adalah limbah brem segar hasil pengepresan. 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)₂, KH₂PO₄, FeSO₄.7H₂O, metanol, Urea, H₂SO₄, indikator PP, gliserol (Pronadisa), NaCl (Merck), alkohol 70% (Brataco chemika), aquades, buffer pH 4 dan buffer pH 7.

Rancangan Percobaan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental skala laboratorium yang dirancang menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) pola faktorial dengan 2 faktor. Faktor 1 adalah konsentrasi kadar substrat (K) yang terdiri dari 3 taraf yaitu: K1: 25 %, K2: 30 %, K3: 35 %. Faktor 2 adalah lama fermentasi (P) dengan 3 taraf yaitu: P1: 3 hari, P2: 5 hari, P3: 7 hari. Dari dua faktor tersebut diperoleh 9 kombinasi perlakuan, percobaan dilakukan dalam tiga kelompok sehingga mendapat 27 unit percobaan. Data yang diperoleh dari masing-masing unit tersebut kemudian dianalisis menggunakan sidik ragam. Jika perlakuan berpengaruh nyata terhadap parameter maka dilakukan uji lanjut yaitu dengan uji Duncan.

Proses Preparasi Limbah Brem

Langkah-langkah penepungan limbah brem, dimulai dari pengeringan menggunakan oven dengan suhu 60°C selama 18 jam, sehingga dihasilkan limbah brem kering dengan kadar air 10%, kemudian dilanjutkan dengan proses penggilingan menggunakan blender hingga halus, dan kemudian diayak menggunakan ayakan 60 mesh (Subakti *et al*, 2015).

Persiapan kultur *A. niger*

Kultur *Aspergillus niger* disebarkan 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 dan dibuatkan slide culture untuk pengamatan morfologinya. Media diinkubasi kembali selama 2-3 hari pada suhu 30°C. Koloni *Aspergillus niger* siap digunakan untuk proses fermentasi. (Rahman, 1992 *dalam* Widyanti, 2010).

Hidrolisis Tepung Limbah Brem

Hidrolisis bertujuan untuk meningkatkan kadar gula pada tepung limbah brem. Proses hidrolisis dilakukan secara kimiawi dengan menambahkan asam sulfat (H₂SO₄) pekat 96,1% sebanyak 20 tetes atau sampai tercapai pH 3-4. Selanjutnya dipanaskan pada suhu 121°C selama 15 menit menggunakan autoclave (Betikul dan Adesina, 2013). Tepung limbah brem hasil hidrolisis kemudian diukur kadar gulanya. Nilai rata-rata kadar gula setelah hidrolisis adalah sebesar 17%, dari kadar gula awal sebesar 12%.

Persiapan Media Fermentasi

Media Nutrient Broth modifikasi (NB-m) dibuat dengan formulasi (g/100ml): MgSO₄.7H₂O 0,02 g, Urea 0,293 g, KH₂PO₄ 0,186 g, dan tepung limbah brem sesuai konsentrasi (25%, 30% dan 35%). Kemudian semua bahan dicampurkan dan disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit didalam autoclave (Widyanti, 2010)

Fermentasi Produksi Asam Sitrat

Tahap fermentasi dilakukan secara kultur terendam (Udin, 1986) dengan menggunakan NB-m sebagai media tumbuh. Selanjutnya ditambahkan starter kapang *Aspergillus niger* ke dalam media fermentasi yang telah dibuat kemudian dilakukan fermentasi aerob dan pengadukan dengan cara dishaker. Lama fermentasi yaitu 3, 5, dan 7 hari dengan konsentrasi substrat masing-masing 25%, 30%, dan 35%, suhu 30°C, dan pH awal media adalah 5. Setelah proses fermentasi dilakukan proses sentrifugasi yang bertujuan memisahkan supernatant hasil fermentasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C, selanjutnya

dilakukan pengukuran pH dan total padatan terlarut pada supernatant yang akan digunakan untuk produksi Ca-sitrat.

Produksi Ca-Sitrat

Kalsium sitrat diproduksi dengan metode presipitasi, dengan cara asam sitrat diendapkan dengan menambahkan Ca(OH)_2 sampai tercapai pH 7 kemudian dipanaskan pada suhu mendidih selama 10 menit, sehingga terbentuknya endapan kalsium sitrat. Sampel yang sudah melalui proses pemanasan, kemudian didinginkan dan disentrifugasi selama 15 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 5000 rpm untuk memisahkan endapan dan filtratnya. Selanjutnya dilakukan proses pencucian endapan kalsium 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 kalsium sitratnya. (Azhary *et al.*, 2013).

Derajat Keasaman (pH)

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter (Action model 209 pH/n/V meter) (Sudarmadji *et al.*, 1997). Alat pH meter distabilkan setelah itu distandarisasi menggunakan larutan buffer pada pH 4 dan pH 7. Elektroda dibilas dan dikeringkan dengan kertas tisu kemudian dicelupkan ke dalam sampel. Nilai pH meter ditunggu sampai menunjukkan suatu angka yang stabil, kemudian nilai ini dicatat sebagai nilai pH terukur.

Total Padatan Terlarut

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

HASIL DAN PEMBAHASAN

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

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

Konsentrasi Substrat (%)	Lama Fermentasi (hari)			Rerata
	3	5	7	
25	1,48 ± 0,33	2,69 ± 0,84	1,73 ± 0,64	1,97 ± 0,69c
30	4,15 ± 1,08	6,71 ± 0,73	2,27 ± 0,26	4,38 ± 0,69a
35	3,07 ± 1,18	4,89 ± 0,75	1,41 ± 0,42	3,12 ± 0,69b
Rerata	2,90 ± 0,69b	4,76 ± 0,69a	1,80 ± 0,69c	

Keterangan : Data merupakan nilai rata-rata dari 3 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 konsentrasi substrat berbeda dan lama fermentasi juga berbeda. Ca-sitrat yang dihasilkan pada perlakuan konsentrasi substrat 30% mendapat nilai tertinggi (4,38 ± 0,69 g/L) yang berbeda nyata dengan konsentrasi substrat 35% yaitu (3,12 ± 0,69 g/L) dan konsentrasi substrat 25% (1,97 ± 0,69 g/L). Perlakuan lama fermentasi dengan fermentasi 5 hari mendapat nilai tertinggi (4,76 ± 0,69 g/L) yang berbeda nyata dengan lama fermentasi 3 hari yaitu (2,90 ± 0,69 g/L) dan lama fermentasi 7 hari yaitu (1,80 ± 0,69 g/L).

Tingginya kadar Ca-sitrat diduga karena pada kondisi pH 5 *Aspergillus niger* tumbuh secara optimal dan selama waktu fermentasi 5 hari gula terkonversi menjadi asam oleh mikroba dalam cairan tepung limbah brem yang difermentasi. Sukandar (2002) menyatakan produksi asam sitrat cenderung meningkat seiring dengan penambahan konsentrasi substrat. Hal ini karena penambahan vitamin, asam amino, dan mineral akan menstimulasi pertumbuhan dan biosintesis beberapa jenis produk metabolit (*growth factor*). Akan tetapi, dalam setiap substrat terdapat faktor pembatas (*limiting factor*) bagi jamur *Aspergillus niger* dalam merangsang pembentukan asam sitrat, sehingga pada penambahan substrat yang berlebih diperoleh penurunan perolehan asam sitrat. Ketersediaan mineral P dan N yang berlebih mengakibatkan metabolisme jamur terpusatkan pada pembentukan sel daripada pembentukan metabolit primer (dalam hal ini asam sitrat). Azhary (2013) menyatakan hasil produksi asam sitrat tertinggi diperoleh dari waktu fermentasi 5 hari yaitu sebesar 4,46%. Udin (1986) menyatakan 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. Konsentrasi substrat berpengaruh terhadap kadar Ca-sitrat hasil fermentasi limbah brem. Berdasarkan hasil penelitian dapat dilihat perbedaan rata-rata kadar Ca-sitrat dari masing-masing perlakuan. Pada perlakuan konsentrasi substrat 30% mendapat nilai tertinggi dibanding

konsentrasi substrat 25% dan 35%. Hal ini disebabkan karena pada konsentrasi 30% substrat dirombak dengan sempurna oleh *Aspergillus niger* dengan bantuan enzim untuk membentuk asam sitrat, sedangkan pada konsentrasi substrat 25% dan 35% terjadi penurunan kadar Ca-sitrat hasil fermentasi limbah brem, hal ini disebabkan substrat yang terlalu encer atau terlalu pekat, mikroorganisme dalam hal ini *Aspergillus niger* tidak bisa bekerja secara optimal (Agustian, 2005).

Derajat keasaman (pH)

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

Tabel 2. Nilai rata-rata pH media fermentasi limbah brem.

Konsentrasi Substrat (%)	Lama Fermentasi (hari)			Rerata
	3	5	7	
25	6,13 ± 0,32	5,07 ± 0,51	4,63 ± 0,51	5,28 ± 0,44b
30	6,17 ± 0,66	5,43 ± 0,30	5,13 ± 0,23	5,58 ± 0,44a
35	5,77 ± 0,20	4,80 ± 0,75	4,40 ± 0,52	4,99 ± 0,44c
Rerata	6,02 ± 0,44a	5,10 ± 0,44b	4,72 ± 0,44c	

Keterangan : Data merupakan nilai rata-rata dari 3 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 pH fermentasi limbah brem pada perlakuan konsentrasi substrat dan lama fermentasi berbeda. Kondisi pH fermentasi yang dihasilkan pada konsentrasi substrat 30% mendapat nilai sebesar (5,58 ± 0,44) yang berbeda nyata dengan konsentrasi substrat 25% sebesar (5,28 ± 0,44) dan konsentrasi substrat 35 % sebesar (4,99 ± 0,44). Perlakuan lama fermentasi 3 hari mendapatkan nilai sebesar (6,02 ± 0,44) yang berbeda nyata dengan lama fermentasi 5 hari sebesar (5,10 ± 0,44) dan lama fermentasi 7 hari sebesar (4,72 ± 0,44). 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. Penurunan pH terjadi karena terbentuknya beberapa asam sebagai hasil glikolisis dan siklus kreb, semakin lama waktu fermentasi semakin banyak produk yang terbentuk sehingga pH akan semakin asam.

Nilai pH juga dipengaruhi oleh produk yang dihasilkan selama proses fermentasi. Dalam penelitian ini, produk fermentasi yang dihasilkan adalah kalsium sitrat. Menurut Poesponegoro & Liang (1991), proses fermentasi asam sitrat memerlukan pH awal yang rendah untuk merangsang akumulasi asam sitrat. Namun penerapan pH awal media yang rendah ini cenderung menghambat perkecambahan spora dan pertumbuhan *A. niger*. Selain itu, Shadafza *et al.* (1976) juga mengemukakan bahwa pH awal yang tinggi dapat memicu akumulasi produk lain, yaitu asam oksaloasetat. Sehingga pada penelitian didapatkan nilai rata-rata pH tertinggi adalah pada konsentrasi substrat 30%, karena pada konsentrasi tersebut merupakan kondisi optimal bagi *Aspergillus niger* bekerja secara maksimal untuk menghasilkan Ca-sitrat.

Total Padatan Terlarut

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi substrat dan lama fermentasi berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) dan interaksi perlakuan berpengaruh tidak nyata ($P > 0,05$) terhadap TPT fermentasi limbah brem. Nilai rata-rata TPT fermentasi limbah brem dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai rata-rata TPT fermentasi limbah brem (% brix)

Konsentrasi Substrat (%)	Lama Fermentasi (hari)			Rerata
	3	5	7	
25	14,33 ± 1,15	12,33 ± 1,15	11,33 ± 1,15	12,67 ± 0,74c
30	15,33 ± 0,57	13,67 ± 1,52	11,67 ± 0,57	13,56 ± 0,74b
35	16,00 ± 0,00	14,00 ± 0,00	12,67 ± 0,57	14,22 ± 0,74a
Rerata	15,22 ± 0,74a	13,33 ± 0,74b	11,89 ± 0,74c	

Keterangan : Data merupakan nilai rata-rata dari 3 kelompok dengan simpangan bakunya (SD). Huruf yang sama di belakang nilai rata-rata menunjukkan perbedaan yang tidak nyata pada uji beda Duncan 5%.

Tabel 3 menunjukkan bahwa nilai rata-rata TPT fermentasi limbah brem pada perlakuan konsentrasi substrat dan lama fermentasi berbeda. Kondisi TPT fermentasi yang dihasilkan pada konsentrasi substrat 35% mendapat nilai sebesar (14,22 ± 0,74) yang berbeda nyata dengan konsentrasi substrat 30% sebesar (13,56 ± 0,74) dan konsentrasi substrat 25 % sebesar (12,67 ± 0,74). Perlakuan lama fermentasi 3 hari mendapatkan nilai sebesar (15,22 ± 0,74) yang berbeda nyata dengan lama fermentasi 5 hari sebesar (13,33 ± 0,74) dan lama fermentasi 7 hari sebesar (11,89 ± 0,74).

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.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Pelakuan konsentrasi substrat dan lama fermentasi berpengaruh sangat nyata terhadap kadar Ca-sitrat, derajat keasaman dan total padatan terlarut. Sedangkan interaksi antara kedua perlakuan berpengaruh tidak nyata terhadap kadar Ca-sitrat, derajat keasaman dan total padatan terlarut hasil fermentasi tepung limbah brem menggunakan *Aspergillus niger*.
2. Nilai rata-rata Ca-sitrat tertinggi terdapat pada perlakuan konsentrasi substrat 30% dan lama fermentasi 5 hari.

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 banyak.

DAFTAR PUSTAKA

- 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.
- 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: 703-71.

- 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, Bogor.
- 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-Conncteti – Cut.
- 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.
- Ulfa, B. 1996. Studi tentang penambahan tepung ubi kayu dan jenis gula dalam pembuatan dodol limbah brem. Skripsi. Tidak dipublikasikan. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. Fakultas Pertanian. Universitas Widyagama Malang.
- Widyanti, E.M. 2010. Produksi asam sitrat dari substrat molase pada pengaruh penambahan VCO (*Virgin Coconut Oil*) terhadap produktivitas *Aspergillus niger* Itbcc L74 terimobilisasi. Tesis. Tidak dipublikasikan. Jurusan Teknik Kimia. Universitas Diponegoro Semarang.