

KK
PS. 132/87
Sug
P.

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
PERPUSTAKAAN
"UNIVERSITAS AIRLANGGA"
SURABAYA

K... A

**PENGARUH pH
TERHADAP PEMBENTUKAN SITRAT OLEH ASPERGILLUS NIGER
DALAM MEDIA CZAPEK YANG DIMODIFIKASI**

TESIS

**DIAJUKAN UNTUK MEMENUHI PERSYARATAN
PENDIDIKAN PASCASARJANA PROGRAM GELAR
PROGRAM STUDI ILMU FARMASI**

L...
7F-20/87
09
P.



OLEH

SUGIJANTO

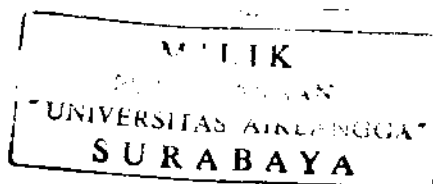
**UNIVERSITAS AIRLANGGA
FAKULTAS PASCASARJANA**

1987

27 MAY 1992

TESIS

**DIAJUKAN UNTUK MEMENUHI PERSYARATAN
PENDIDIKAN PASCASARJANA PROGRAM GELAR
PROGRAM STUDI ILMU FARMASI**



Oleh

Sugijanto

NIM : 2583102886

Disetujui oleh pembimbing

Dr. Noor Cholies Zaini.

NIP : 130355372

Dr. Gunawan Indrayanto.

NIP : 130541814

Ketua Program Studi

Dr. Fasich.

NIP:130517155

PANITIA PENILAI/ PENGUJI TESIS :

Ketua : Prof. Dr. Sutarjadi
Anggota : Prof. dr. Soewignjo Adipoetro
Dr. Noor Cholies Zaini
Dr. M. Zainuddin
Dr. Gunawan Indrayanto

P R A K A T A

Atas berkat rahmat Allah yang maha kuasa, tesis ini dapat diselesaikan untuk memenuhi persyaratan Pendidikan Pascasarjana Program Gelar, Program Studi Ilmu Farmasi, Fakultas Pascasarjana Universitas Airlangga. Untuk itu terima kasih yang sedalam - dalamnya saya sampaikan kepada :

Universitas Airlangga khususnya Fakultas Farmasi , yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti Program Pendidikan Pascasarjana dan Fakultas Pascasarjana yang telah mengelola program pendidikan Pascasarjana.

Tim Manajemen Program Doktor (TMPD) Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia, yang telah memberikan beasiswa selama pendidikan.

Jurusan Biologi Farmasi dan Jurusan Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, yang telah menyediakan fasilitas selama penelitian.

Badan Koordinasi Keluarga Berencana Nasional (B K K B N), yang telah memberikan bantuan biaya guna penyusunan tesis.

Perpustakaan Universitas Airlangga, dan Lembaga Biologi Nasional LIPI Bogor, yang telah menyediakan acuan - acuan yang sangat membantu selama penelitian.

Dr. Noor Cholies Zaini dan Dr. Gunawan Indrayanto, yang telah membimbing dan banyak memberikan saran selama penelitian.

Staf Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Gajah Mada dan LBN LIPI yang telah membantu memberikan informasi / penjelasan cara - cara fermentasi jamur *Aspergillus niger*.

Semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan . . . satu persatu, yang telah memberikan dorongan moral maupun material selama saya mengikuti program pendidikan Pasca - sarjana.

Istri, anak - anak dan seluruh keluarga yang memberikan pengertian serta dorongan hingga selesainya tesis ini.

Semoga Allah SWT memberikan balasan yang setimpal.
Amin.

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian produksi asam sitrat dalam kultur permukaan oleh Aspergillus niger menggunakan media Czapek yang dimodifikasi, dengan berbagai macam pH.

A. niger diperoleh sebagai hasil isolasi dari udara dalam laboratorium Analisis Farmasi UNAIR (1985). Media Czapek yang dimodifikasi mengandung gula 14 %, diatur pH nya dengan HCl 1 N, dibuat 5 macam media dengan pH 1, 2, 3, 4 dan 5.

Dalam media dengan pH awal = 1, tidak menunjukkan adanya pertumbuhan. Sedangkan dalam media dengan pH awal 2, 3, 4 dan 5 dari waktu ke waktu selama fermentasi menunjukkan adanya pertumbuhan, peningkatan normalitas asam, penurunan kadar gula reduksi sisa dan peningkatan kadar sitrat.

Dari data diperoleh bahwa A.niger hasil isolasi mampu tumbuh dan menghasilkan sitrat dalam media Czapek yang dimodifikasi dengan pH 2, 3, 4 dan 5 serta banyaknya asam sitrat yang dihasilkan dipengaruhi oleh pH awal. Dalam hal ini kadar sitrat tertinggi adalah 1,7725 g/100 ml media atau 71,51% terhadap total asam dalam media dengan pH awal 3 dan kadar sitrat terendah 0,9933 g /100 ml media atau 35,31% terhadap total asam yang diperoleh dalam media dengan pH awal 5, pada akhir fermentasi.

DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA	iii
ABSTRAK	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB :	
I. PENDAHULUAN	1
1. Latar belakang	1
2. Permasalahan	6
3. Tujuan Penelitian	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	8
1. Tinjauan tentang jamur	8
2. Tinjauan tentang <u>Aspergillus niger</u>	10
3. Tinjauan tentang fermentasi asam sitrat	13
2.1. Proses fermentasi "Koji"	14
3.2. Proses kultur cair "Shallow pan"	15
3.3. Proses "Submerged Culture"	15
3.4. Faktor-faktor yang mempengaruhi fer - mentasi asam sitrat	16
4. Tinjauan tentang asam sitrat	20
4.1. Sejarah singkat asam sitrat	20
4.2. Sifat-sifat fisika dan kimia asam si trat	21
4.2.1. Sifat fisika	21
4.2.2. Sifat kimia	22

4.3. Teori tentang pembentukan asam sitrat ...	23
4.4. Penetapan kadar asam sitrat	27
III. BAHAN, ALAT DAN METODA	30
1. Bahan	30
1.1. Bahan kimia	30
1.2. <u>Aspergillus niger</u>	30
1.3. Media	30
2. Alat	30
3. Metoda	31
3.1.1. Pembuatan media	31
3.1.2. Perbenihan <u>A. niger</u>	32
3.2. Fermentasi	33
3.2.1. Pembuatan media Czapek tanpa agar	33
3.2.1. Pertumbuhan/pembiakan spora, dalam media "Submerged Culture"	33
3.2.3. Pembuatan media untuk fermentasi kultur permukaan	34
3.2.4. Fermentasi kultur permukaan	35
3.3. Perubahan yang terjadi dan cara pengamat- an	35
3.3.1. Pertumbuhan miselia	36
3.3.2. Perubahan pH	36
3.3.3. Perubahan normalitas asam	37
3.3.4. Gula sisa dalam media fermentasi	37
3.3.5. Asam sitrat hasil fermentasi	39
3.3.5.1. Uji kualitatif asam sitrat	39
3.3.5.2. Uji kuantitatif/penentuan kadar asam sitrat	42

IV. HASIL PENELITIAN	45
1. Identifikasi/determinasi <u>A.niger</u>	45
2. Pertumbuhan miselia selama fermentasi	49
3. Perubahan pH selama fermentasi	54
4. Perubahan normalitas asam	56
5. Perubahan gula sisa(residu gula)selama fermentasi	58
6. Asam sitrat hasil fermentasi	60
6.1.Hasil uji kualitatif asam sitrat	60
6.2.Hasil-hasil penetapan kadar asam sitrat..	63
6.2.1.Pemilihan panjang gelombang maksimum..	63
6.2.2.Pembuatan kurva baku	65
6.2.3.Pembuatan kalibrasi/uji perolehan kembali asam sitrat	67
6.2.4.Penentuan kadar asam sitrat dalam contoh/sampel	68
6.2.5.Analisa varian	68
V. PEMBAHASAN	77
VI. KESIMPULAN	82
VII. SARAN - SARAN	83
VIII. RINGKASAN	84
IX. DAFTAR PUSTAKA	86

DAFTAR TABEL

TABEL	Halaman
1. Berat miselia dalam 50,0 ml media SMC yang siap difermentasikan dalam media "kultur permukaan"	49
2. Berat miselia rata-rata dari 5 replikasi selama fermentasi	51
3. pH rata-rata dari 5 replikasi selama fermentasi	54
4. Normalitas asam rata-rata dari 5 replikasi selama fermentasi	56
5. Kadar total gula reduksi sisa rata-rata dari 5 replikasi selama fermentasi	58
6. Hasil pengamatan absorbansi baku sitrat pada berbagai panjang gelombang	63
7. Pengamatan absorbansi dari berbagai macam kadar asam sitrat pada panjang gelombang 470 nm	65
8. Hasil perhitungan adanya korelasi linier antara kadar dan absorbansi serta persamaan garis regresinya.....	66
9. Perolehan kembali asam sitrat dalam media fermentasi	67
10. Kadar asam sitrat rata-rata(g/100 ml media) dari 5 replikasi selama fermentasi	68
11. Kadar sitrat dalam berbagai pH awal media dan umur/lamanya fermentasi disusun menurut analisa varian "Factorial in a Randomized Complete Block Design	71

12. Tabel perhitungan Anova	74
13. Harga rata-rata kadar sitrat (sampel) dari harga terkecil hingga terbesar dan beda dua harga rata-ratanya	76

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR	Halaman
1. Miselia dari <u>Aspergillus niger</u>	46
2. Konidiofora, vesikel dan sterigmata	46
3. <u>Aspergillus niger</u> tua, umur 7 - 8 hari	47
4. Konidia dari <u>Aspergillus niger</u> tua	47
5. Bagian ujung konidiofora dari <u>Aspergillus niger</u> tua	48
6. Kurva berat rata-rata miselia basah selama fer- mentasi	52
7. Kurva berat rata-rata miselia kering selama fermentasi	53
8. Kurva pH rata-rata selama fermentasi	55
9. Kurva normalitas asam rata-rata selama fermen- tasi	57
10. Kurva kadar total gula reduksi sisa rata-rata selama fermentasi	59
11. Hasil spektra merah infra dari asam sitrat sam- pel / hasil isolasi, dalam tablet KBr	61
12. Hasil spektra merah infra dari asam sitrat pem- banding, dalam tablet KBr	61
13. Hasil spektra merah infra dari kalsium sitrat sampel/ hasil isolasi, dalam tablet KBr	62
14. Hasil spektra merah infra dari kalsium sitrat pembanding dalam tablet KBr	62

15. Kurva absorpsi baku sitrat	64
16. Kurva kadar asam sitrat rata-rata selama fermentasi	69
17. Kurva perubahan-perubahan berat miselia kering, kadar sitrat, kadar total gula reduksi sisa, normalitas asam dan pH selama fermentasi dalam media pH awal 3	102

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN	Halaman
1. Komposisi kimia media Czapek - agar/Czapek Dox agar	91
2. Komposisi kimiawi media Czapek tanpa agar/ Czapek Dox Broth	91
3. Komposisi kimiawi media Czapek yang dimo - difikasi	92
4. Skema alat fermentasi untuk "submerged Cul- ture"	92
5. Pereaksi Luff Schoorl	93
6. Perhitungan berat miselium berdasarkan DO (densitas optik) pada $\lambda = 650 \text{ nm}$	94
7. Koefisien korelasi r_{xy} menurut derajat ke- maknaan 5 % dan 1 %	95
8. Tabel data menurut analisa varian "Facto - rial in a Randomized Complete Block Design	96
9. Tabel Anova untuk "Factorial in a Randomi - zed Complete Block Design"	97
10. Tabel harga q untuk perhitungan HSD test pada $\alpha = 0,05$	98
11. Tabel uji F dengan $\alpha = 0,05$	99
12. Jalur-jalur katabolisme gula dalam jamur dan beberapa metabolit sekundernya (Bu' lock, 1975)	100
13. Kadar sitrat rata-rata pada akhir fermen - tasi	101

BAB I

PENDAHULUAN

1. Latar belakang.

Mikroorganisme, seperti bakteri, jamur dan ganggang merupakan "living catalyst" yang memungkinkan sejumlah besar proses kimiawi dapat terjadi/berlangsung di lingkungan, misalnya dalam air dan tanah (Manahan, 1979). Menurut Dwidjoseputro, mikroorganisme memegang peranan yang penting sekali, bahkan eksistensinya merupakan prasyarat mutlak bagi terbinanya semua kehidupan yang lain (Dwidjoseputro, 1985).

Jamur/fungi termasuk mikroorganisme, kehidupannya tersebar luas di alam; di dalam tanah, pada buah-buahan di dalam air, pada bahan-bahan organik, bahan makanan dan udara. Sporenya banyak berterbangan di udara dan dengan mudah dapat tumbuh apabila jatuh di tempat-tempat yang lembab (Suriawiria, 1980).

Jamur merupakan sumber daya alam, terdiri atas ratusan marga dan ribuan jenis (Salle, 1965). Di alam peranannya sangat besar bagi kehidupan manusia, ada yang merugikan dan ada yang menguntungkan. Beberapa jamur bersifat patogen dan menyebabkan penyakit pada tanaman hewan ataupun manusia. Beberapa jenis lainnya ada yang tumbuh di dalam bahan pangan, sehingga mencemari bahan pangan dan dapat melakukan proses pembusukan. Bahkan ada yang melepaskan racun sebagai mikotoksin yang dapat menyebabkan gangguan fungsi hati, ginjal dan

susunan saraf pusat pada manusia maupun hewan (Buckle, 1985).

Bahkan obat - obat tradisional jamu - jamu tidak luput pula dari pencemaran jamur ini (Moegijanto, 1980).

Selain yang merugikan, banyak pula jamur yang menguntungkan manusia, misalnya jamur - jamur yang menghasilkan antibiotika, asam - asam organik, jamur yang digunakan untuk membuat roti, alkohol, tape, tempe oncom dan jamur yang enak dimakan (Suriawiria, 1980, Buckle, et al 1985 dan Dwidjoseputro, 1978).

Organisme ini dapat memecah bahan - bahan organik yang kompleks menjadi yang lebih sederhana (Buckle, et al. , 1985).

Aspergillus merupakan salah satu marga (genus) dari jamur, jenis - jenisnya banyak dijumpai di alam, mudah dikenal, dan mampu memecah bahan - bahan organik kompleks menjadi yang lebih sederhana.

Dalam sejarah perkembangan penelitian, menunjukkan bahwa sejumlah besar jamur mempunyai kemampuan untuk menghasilkan asam sitrat, misalnya : *Aspergillus niger*, *A. clavatus*, *Penicillium luteum*, *Paecilomyces divaricatum* *Ustulina vulgaris*, *Mucor piriformis* dan lain - lain jenis *Mucor*. (Prescott, 1959).

Hal ini sangat menarik, mengingat masa produksi yang relatif sangat singkat bila dibandingkan dengan asam sitrat yang diisolasi dari buah - buahan.

Asam sitrat, banyak digunakan dalam industri pa -

ngan, untuk mengatur pH makanan, sebagai antioksidan dan dalam pembuatan keju. Dalam farmasi digunakan untuk antikoagulan, sebagai campuran dalam sirup, eliksir, serbuk dan tablet effervescent, sebagai obat tetes mata dan juga digunakan sebagai dapar.

Selain itu juga digunakan dalam proses pembuatan resin, plastik, sebagai "sequestering agent" untuk menghilangkan runtuhan logam dan sebagai pereaksi / campuran pereaksi (Soine, 1961; The Merck Index, 1976).

Sebagai gambaran, perkiraan produksi sitrat dunia tahun 1974 lebih dari 90.000.000 kg pertahun (Lockwood,1974) Sedangkan di Indonesia berdasarkan data statistik Indonesia 1985, membutuhkan sitrat sebanyak 3.100 kg, dari impor selama Januari hingga Nopember 1985; hal ini berarti hampir tiga kwintal setiap bulannya.

Untuk memenuhi kebutuhan sitrat, antara lain dapat diusahakan dengan cara : (1) isolasi dari buah - buahan seperti jeruk dan nanas, (2) produksi asam sitrat melalui fermentasi jamur.

Cara fermentasi jamur mempunyai beberapa keuntungan, antara lain tidak tergantung pada musim, tidak memerlukan lahan yang sangat luas, dan waktu yang dibutuhkan untuk produksi relatif sangat singkat bila dibanding dengan isolasi dari buah - buahan.

Dalam produksi asam sitrat menggunakan jamur, dikenal adanya : (1) proses fermentasi "Koji", (2) proses kultur cair "shallow pan" dan (3) proses "submerged -

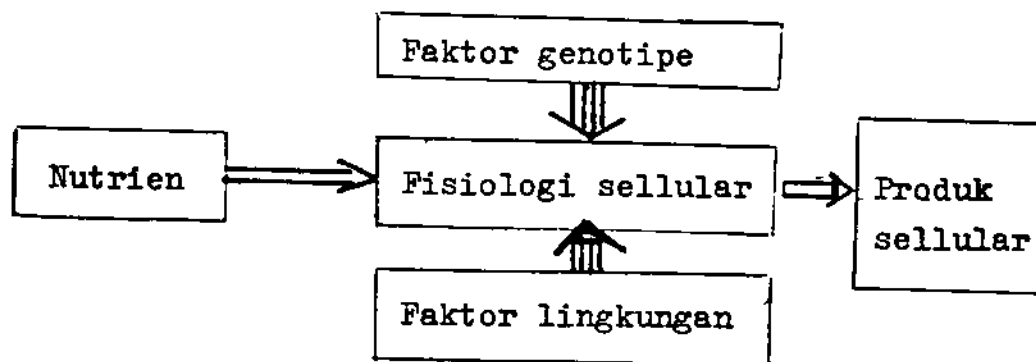
fermentation" (Lockwood, 1974).

Proses "Koji" menggunakan kultur padat steril, yang diratakan diatas lantai atau baki, dan memerlukan tempat yang cukup luas serta khusus.

Dalam proses "Submerged fermentation" / fermentasi terendam, diperlukan adanya peralatan khusus, aliran udara steril dan pengadukan terus - menerus selama fermentasi. Untuk proses kultur cair "shallow pan" tidak diperlukan tempat yang terlalu luas dan khusus seperti proses Koji, maupun aerasi khusus dan alat pengaduk khusus dalam proses "submerged fermentation".

Dalam kultur cair "shallow pan", miselium tumbuh diatas permukaan cairan, sehingga disebut pula kultur permukaan / "surface culture".

Produksi sitrat, hasil fermentasi / metabolisme mikroorganisme *Aspergillus*, dipengaruhi oleh faktor genotipe dan lingkungan, yang dapat digambarkan sebagai berikut : (Berry, 1974).



Menurut Curie, gula yang terbaik untuk produksi sitrat 125 - 150 gram/liter larutan, sedangkan Doelger dan Prescott menyebutkan 140 gram sukrosa tiap literanya.

Penggunaan NH_4NO_3 lebih dari 2,5 g/liter (sebagai sumber nitrogen untuk keperluan hidup dan pertumbuhan sel-sel), menyebabkan berkurangnya jumlah sitrat yang dihasilkan, dan meningkatnya pembentukan asam oksalat.

Porges menunjukkan fakta, bahwa penggunaan NaNO_3 sekitar 0,4 % lebih baik dari pada NH_4NO_3 ataupun $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, untuk menghasilkan asam sitrat.

Adanya Fe, menurut Perlmann dan kawan - kawan dapat mengstimulasi pertumbuhan miselium dan mempercepat pembentukan - pembentukan asam sitrat. Kadar Fe yang digunakan berkisar 0,1 - 10 mg/liter media (Prescott dan Dunn, 1959).

Pengaruh pH pada pertumbuhan jamur dan metabolismenya sangatlah kompleks. pH media berpengaruh pada kecepatan pertumbuhan dan beberapa proses kehidupan yang lain. Sebelum suatu nutrien digunakan, nutrien tersebut harus melewati dinding sel dan membran protoplasma lebih dahulu (Lilly dan Barnett, 1951).

Menurut Bull, pengaruh pH antara lain pada transpor dari nutrien, kelarutan nutrien, reaksi - reaksi enzim dan fenomena permukaan / "surface phenomena" (Bull dan Burshell 1975), Demikian pula menurut Berry, pengaruh ini terutama pada kelarutan garam - garam, keadaan terionkannya substrat, serta mempengaruhi permeabilitas dan fenomena

permukaan (Berry, 1975).

Menurut Shu dan Johnson, pH initial/pH awal media, yang optimum untuk produksi sitrat, adalah 2,2 - 4,2 (Prescott, 1959), demikian halnya Steffen menggunakan pH 2,5 - 4,0 dengan H_2SO_4 . Tetapi Doelger dan Prescott menyebutkan pH 1,60 - 2,20 dengan HCl, sedangkan Curie mendapatkan hasil yang baik dengan pH awal media 3,4 - 3,5 dengan HCl (Miall, 1975). Pemakaian pH yang rendah menghasilkan sitrat yang lebih besar, dapat memperkecil terjadinya oksalat dan kontaminasi bakteri dapat dihindari.

Media Czapek, banyak digunakan untuk pembiakan jamur. Komposisi kimiawinya terdiri atas karbohidrat (sukrosa) serta unsur-unsur yang diperlukan untuk pertumbuhan dan pembiakan.

Dengan melakukan modifikasi (media Czapek yang dimodifikasi) seperti lampiran 3, kadar sukrosanya dibuat 140 g/liter sebagai kadar optimum untuk menghasilkan sitrat menurut Doelger dan Prescott, perlu diteliti adanya pengaruh pH (dalam hal ini pH awal media) terhadap pembentukan sitrat oleh Aspergillus niger.

2. Permasalahan.

Mengingat adanya perbedaan dalam pemakaian pH awal media yang dianggap baik untuk menghasilkan sitrat yang optimum, dan adanya perubahan pH media selama fermentasi maka perlu dibuktikan apakah pH awal media benar-benar menyebabkan perbedaan jumlah sitrat yang dihasilkan oleh jamur Aspergillus niger yang sama dalam media Czapek yang

dimodifikasi .

3. Tujuan penelitian.

Berdasarkan uraian diatas, maka tujuan penelitian ini adalah untuk :

- (1) mengetahui kemampuan jamur Aspergillus niger yang diisolasi dari udara dalam laboratorium Analisis Farmasi Unair (1985) untuk tumbuh dan memproduksi sitrat dalam media Czapek yang dimodifikasi dengan berbagai pH awal .
- (2) meneliti beberapa karakteristik pertumbuhan/ beberapa perubahan yang terjadi selama fermentasi, yang berkaitan dengan pembentukan sitrat dalam media Czapek yang dimodifikasi pada berbagai pH awal .
- (3) menganalisis hasil sitrat pada berbagai pH awal dalam media Czapek yang dimodifikasi .

Dari hasil penelitian, diharapkan dapat memberikan manfaat bagi penelitian lebih lanjut, guna mencari kemungkinan penerapan metoda fermentasi untuk menghasilkan sitrat dengan jamur Aspergillus niger .

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

1. TINJAUAN TENTANG JAMUR.

Sejak adanya penemuan serta penyempurnaan mikroskop, jatuhnya teori abiogenesis, telah diyakini bahwa pembusukan itu disebabkan oleh mikroorganisme dan dibuktikannya bahwa penyakit itu disebabkan oleh bibit penyakit, maka ilmu yang mempelajari mikroorganisme menjadi maju dengan pesatnya (Dwidjoseputro, 1984).

Jamur yang termasuk mikroorganisme kehidupannya tersebar luas di alam, dan telah dikenal oleh manusia sejak dahulu kala, karena dalam kehidupan manusia sehari-hari senantiasa berhubungan dengan jamur. Makanan yang disimpannya dapat ditumbuhi jamur, pakaiannya dapat berjamur, perabot rumah tangganya dapat termakan oleh jamur. Demikian pula tanaman, hewan dan manusia tidak luput dari gangguan jamur. (Dwidjoseputro, 1978 ; Suriawiria, 1980 ; Buckle, et al, 1985).

Jamur dapat didefinisikan sebagai : tumbuhan yang berinti, berspora, tidak berklorofil, berupa sel atau benang bercabang - cabang, dengan dinding dari selulosa atau dari kitin, atau dari keduanya, dan pada umumnya berkembang biak secara aseksual dan seksual.

Tubuh jamur dapat berupa sel - sel yang lepas satu sama lain, dapat pula berupa beberapa sel yang bergandengan dan ada pula yang berupa benang, yang disebut hifa.

Hifa inipun ada yang bersekat, ada yang tidak. Hifa dapat

tumbuh dengan bercabang - cabang sehingga merupakan jaring - jaring yang disebut miselium.

Pada satu koloni jamur dapat dibedakan adanya hifa yang menjalar dan hifa yang menegak. Biasanya dari hifa yang menegak menghasilkan alat - alat pembiak yang umumnya disebut spora.

Beberapa jamur hidup saprofit, lainnya parasit, bahkan ada yang bersifat patogen.

Selain yang merugikan, ternyata banyak pula jamur yang menguntungkan dan dapat dimanfaatkan untuk keperluan manusia.

Jamur dapat menghasilkan metabolit yang penting untuk keperluan umat manusia.

Penelitian metabolit / metabolit sekunder dari jamur, masa lampau, sekarang dan yang akan datang beraspek sangat luas, antara lain meliputi :

- (a). Isolasi / karakterisasi kimia/tes biologi dari metabolit sekunder jamur.
- (b). Biosintesis metabolit sekunder jamur.
- (c). Enzimologi dari metabolisme dalam jamur.
- (d). Fisiologi jamur.
- (e). Biologi molekuler, serta studi tentang media yang cocok untuk menghasilkan metabolit sekunder yang optimal (Campbell, 1983).

Aktivitas biokimiawi dalam jamur banyak dikembangkan dalam dunia industri, misalnya dari Aspergillus Oryzae diperoleh preparat enzim yang dapat digunakan untuk

menghidrolisa tepung, selulosa dan polisakarida lain menjadi gula - gula yang larut, lebih lanjut dapat di-fermentasi menjadi alkohol oleh sel - sel ragi.

Demikian pula untuk produksi sitrat, dapat memanfaatkan jamur Aspergillus niger. (Salle, 1961).

2. TINJAUAN TENTANG ASPERGILLUS NIGER.

Karga *Aspergillus* dari jamur Klas *Ascomycetes*, jenis - jenisnya relatif umum terdapat di udara, dapat di temukan hampir di semua tempat, pada hampir semua tipe substrat. Dapat ditemukan pada pembusukan buah - buahan sayuran, biji - bijian, roti dan lain - lain bahan ma - kanan (Suriawiria, 1981, Buckle, 1985).

Aspergillus mempunyai miselium yang serupa tabung panjang bersekat - sekat dan dapat bercabang - cabang, ada yang berwarna jelas dan ada pula yang tidak berwar - na. Sebagian miselium berada dalam substrat dan sebagi - an lagi diatas substrat. Jaring - jaring miselium terdi - ri atas kumpulan hifa - hifa yang bersekat dan berinti banyak. Beberapa hifa ada yang tumbuh menegak dengan su - atu alas yang disebut sel kaki ("foot cell"). Pada sua - tu waktu ujung hifa yang menegak tersebut menggelembung yang dikenal dengan istilah vesikel ("vesicle").

Lebih lanjut sebagian atau seluruh permukaan vesikel di tutupi oleh batang - batang / tubuh serupa botol yang disebut sterigmata. Beberapa jenis *Aspergillus* mempu -

nyai dua lapisan sterigmata, maka yang berdekatan dengan vesikel disebut sterigmata primer dan lainnya disebut sterigmata sekunder, yang menghasilkan konidia dengan warna tertentu.

Dari beberapa jenis *Aspergillus* ada yang menghasilkan peritesia yaitu dinding tipis berbentuk bulat atau "flask" dan menghasilkan askospora. Askospora ini dibebaskan jika dinding tipis peritesia pecah. (Alexopoulos, 1962; Thom dan Raper, 1945 (reprinted 1951); Austwick, 1974 ; Dwidjoseputro, 1978).

Dalam medium Czapek/Czapek - Dox agar, *Aspergillus niger* mempunyai warna koloni permukaan coklat kehitaman, koloni bagian bawah berwarna kuning, dengan konidiofora maksimum 6 mm, diameter vesikel maksimum 100 um, mempunyai dua lapisan sterigmata dan ukuran konidianya bergaris tengah 5,5 - 8,0 um. (Austwick, 1974).

Klasifikasi *Aspergillus niger*, menurut Engler dan Prantl sebagai berikut : (Thom dan Raper, 1951).

Kelas : Ascomycetes

Bangsa : Plectascinae

Suku : Aspergillaceae

Marga : *Aspergillus*

Jenis : *Aspergillus niger*.

Kelas : Fungi Imperfecti (Deuteromycetes)

Kelas : Hyphomycetes

Bangsa : Mucedinae

Suku : Mucedinaceae

Suku : Aspergillae

Marga : Aspergillus

Jenis : Aspergillus niger

Penulis lainnya memasukkan klasifikasi sebagai berikut:

(Dwidjoseputro, 1978).

Dunia : Tumbuh - tumbuhan

Divisi : Mycota

Anak Divisi : Eumycotina

Kelas : Ascomycetes

Bangsa : Eurotiales (Plectascinae)

Suku : Eurotiaceae (Aspergillaceae)

Marga : Eurotium (Aspergillus)

Jenis : Aspergillus niger

Jenis Aspergillus niger banyak diteliti, sehubungan dengan mudahnya dijumpai hampir disemua tempat, dan pada berbagai substrat, serta adanya keuntungan yang dapat dimanfaatkan manusia, Aspergillus niger dapat digunakan untuk menguji runutan tembaga, magnesium, kalium dan molibdenum (Lilly dan Barnett, 1951).

Ward, tahun 1967 telah berhasil mendapatkan asam glukonat, garam - garam glukonat, glukonolakton, dan enzim glukosa aerode-hidrogenasa (glukosa oksidasa) dari

MILIK
PERPUSTAKAAN
"UNIVERSITAS AIRLANGGA"
S U R A B A Y A

biakan / fermentasi galur Aspergillus niger (Lockwood 1974).

Sebelumnya, Wehmer menganggap bahwa Aspergillus hanya dapat menghasilkan oksalat, tetapi sejak 1917, Curie telah membuktikan bahwa galur Aspergillus niger ada yang mampu menghasilkan oksalat dan sitrat, tergantung pada kondisi eksperimennya (Kiall, 1974).

3. TINJAUAN TENTANG FERMENTASI ASAM SITRAT.

Istilah fermentasi dapat didefinisikan sebagai proses perubahan kimia dari substrat organik, melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Istilah fermentasi umumnya dikaitkan dengan adanya sel-sel hidup, walaupun sebenarnya ada yang terjadi tanpa adanya sel-sel hidup (Prescott, 1959).

Menurut Winarno, fermentasi adalah suatu reaksi oksidasi reduksi didalam sistem biologis yang menghasilkan energi, dimana sebagai donor dan aseptor elektron digunakan senyawa organik.

Senyawa tersebut akan diubah oleh reaksi reduksi dengan katalis enzim menjadi suatu bentuk lain, misalnya aldehida dan dapat dioksidasi menjadi asam (Winarno, 1984) Fermentasi tergantung pada macam organisme yang terlibat, tipe substrat dan kondisi lingkungannya.

Untuk menghasilkan asam sitrat, fermentasi dengan jamur telah dirintis lama, sejak 1891, pertama kali ditunjukkan oleh Wehmer dengan menggunakan Citromyces

(*Penicillium*). Wehmer yakin bahwa sitrat hanya dihasilkan oleh *Citromyces* dan hasil fermentasi dari Aspergillus niger adalah asam oksalat.

Anggapan ini tumbang, setelah Curie (1917) berhasil menunjukkan bahwa sejumlah galur yang berbeda dari Aspergillus niger menghasilkan asam sitrat dan asam oksalat, tergantung kondisi eksperimennya. (Miall, 1974).

Dalam perkembangan fermentasi untuk menghasilkan sitrat, dikenal adanya proses : (1) fermentasi Koji, (2) Kultur cair "shallow pan" dan (3) "submerged fermentation".

3.1. Proses Fermentasi "Koji".

Proses fermentasi ini dikembangkan di Jepang, menggunakan media/kultur padat steril yang diratakan diatas lantai/baki dalam tempat khusus, di inokulasi dengan jamur. Cara ini dikenal sejak abad kedelapan, pertama kali untuk menghasilkan "sake" suatu minuman tradisional Jepang, memakai biakan Aspergillus oryzae. Cara ini diperkenalkan ke dunia Barat, mulai tahun 1891 oleh Takamine, untuk menghasilkan enzim diastase/amilase. (Miall, 1974).

Hisanaga dan Nakamura, 1966, memproduksi sitrat secara besar - besaran dengan proses fermentasi Koji menggunakan galur dari Aspergillus niger, dengan pH 1,8 - 2,0 dan suhu 28°C, dengan kultur dari kentang.

3.2. Proses kultur cair "Shallow pan".

Proses ini dikembangkan di Eropa dan Amerika, menggunakan kultur cair dalam wadah panci - panci yang dangkal. Pertama spora dibiakkan 24 jam, sehingga terbentuk miselium putih dalam media cair untuk pertumbuhan. Selanjutnya disebarakan pelan-pelan diatas permukaan kultur cair untuk fermentasi. Dapat pula dilakukan dengan pembiakan spora beberapa hari diatas permukaan media, kemudian miselia yang terjadi disaring, dipindahkan kedalam larutan fermentasi, didispersikan secara mekanis, atau langsung dari spora - spora Aspergillus niger disebarakan diatas kultur cair steril untuk fermentasi. Steffen melakukan dalam media dengan pH 2,5 - 4,0 untuk produksi sitrat (Lockwood, 1974).

3.3. Proses "Submerged fermentation"

Proses fermentasi ini terjadi diseluruh bagian cairan, Aspergillus niger dibiakkan didalamnya, dengan pengadukan dan pengaliran udara. Asam sitrat dapat terakumulasi dalam cara ini dengan larutan yang kekurangan fosfat. Pada waktu inokulasi, perlu penambahan CuSO_4 , untuk mendapatkan akumulasi sitrat, dan pH media diatur dibawah 3,5. Cara ini dikembangkan antara lain di Israel dan Inggris. (Lockwood, 1974).

3.4. Faktor-faktor yang mempengaruhi fermentasi asam sitrat.

Fermentasi dengan tiga macam proses diatas juga menyebabkan perbedaan dalam pengaturan media dan lingkungannya. Proses kultur cair "shallow pan" yang dikenal pula sebagai kultur permukaan, dapat dilakukan didalam Erlenmeyer yang ditutup rapat, didalamnya berisi media cairan, disterilkan dalam otoklaf. Faktor - faktor yang mempengaruhi fermentasi kultur permukaan ini adalah : (Prescott, 1959)

(1). Organisme.

Dari hasil percobaan yang telah dilakukan sejak awal penelitian Wehmer, kemudian Curie, Doelger dan Prescott, menunjukkan bahwa golongan jamur banyak yang menghasilkan asam sitrat.

Ada yang memberikan hasil sedikit dan ada pula yang banyak, serta ada yang menghasilkan senyawa - senyawa lain yang tidak diinginkan, Hal ini tergantung galur yang diperolehnya.

Galur dari jenis Aspergillus niger umumnya memberikan hasil yang memuaskan.

(2). Gula.

Beberapa senyawa organik, yang mengandung atom karbon 2,3,4,5,6,7 dan 12 dalam senyawa (prinsipnya gula - gula), dapat difermentasi menghasilkan sitrat.

Hasil maksimum diperoleh, jika gula yang dipakai sukrosa atau fruktosa dan kadang - kadang dari glukosa.

Umumnya, diperlukan gula berkisar 14 - 20% untuk menghasilkan sitrat yang optimum. Curie menyebutkan 125 - 150 g sukrosa per liter medium.

Doelger dan Prescott menggunakan 140 g sukrosa tiap literanya.

(3). Garam - garam anorganik.

Selain karbon, hidrogen dan oksigen sebagai karbohidrat, media fermentasi juga memerlukan : nitrogen, kalium, fosfor, sulfur dan magnesium sebagai garam anorganik. Elemen-elemen lain seperti besi, seng, tembaga, kalsium, mangan, dan molibdenum juga berpengaruh terhadap pertumbuhan jamur (Tomlinson, Campbell dan Trussel, 1950). Penggunaan NH_4NO_3 lebih dari 2,5g/liter, K_2HPO_4 diatas 1,50g/liter menyebabkan pembentukan sitrat berkurang dan asam oksalat bertambah. Herrick (1938) menggunakan K_2HPO_4 berkisar 0,03 - 0,1 % dan Magnesium sulfat hepta hidrat 0,01 - 0,05 %.

Porges memberikan fakta penggunaan NaNO_3 sekitar 0,4 % lebih baik dari pada NH_4NO_3 ataupun $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Adanya Fe, menurut Perlmann dan kawan-kawan (1946), dapat menstimulasi pertumbuhan miselium dan mempercepat pembentukan asam sitrat.

Kadar Fe yang digunakan berkisar 0,1 - 10 mg/liter media (Prescott dan Dunn, 1959).

(4). Keasaman (pH).

Pengaruh pH pada pertumbuhan jamur dan metabolismenya sangatlah kompleks. pH medium berpengaruh pada kecepatan pertumbuhan dan beberapa proses kehidupan yang lain. Sebelum suatu nutrien digunakan nutrien tersebut harus melewati dinding sel dan membran protoplasma lebih dahulu (Lilly dan Barnett, 1951).

Menurut Bull, pengaruh pH antara lain pada transport dari nutrien, kelarutan nutrien, reaksi-reaksi enzim dan fenomena permukaan (Bull dan Burshell, 1975). Demikian pula menurut Berry, pengaruh ini terutama pada kelarutan garam - garam, keadaan terionkannya substrat, serta mempengaruhi permeabilitas dan fenomena permukaan (Berry, 1975).

Menurut Shu dan Johnson, pH initial/ pH awal media yang optimum untuk produksi sitrat : 2,2 - 4,2 (Prescott, 1959), demikian pula Steffen menggunakan pH 2,5 - 4,0 dengan H_2SO_4 .

Tetapi Doelger dan Prescott menyebutkan pH 1,6 - 2,20 dengan HCl. Sedangkan Curie mendapatkan hasil yang baik dengan pH awal media 3,4 - 3,5 dengan asam yang sama. (Miall, 1975).

Keuntungan lain penggunaan pH yang rendah ialah

memperbesar hasil sitrat dan memperkecil terbentuknya oksalat, dan kontaminasi bakteri dapat dihindarkan; bahkan fermentasi dapat dilakukan tanpa sterilisasi, jika pH awal $\leq 2,20$.

Fernbach, dan kawan-kawan melakukan pada pH 1,80 tanpa sterilisasi. (Prescott dan Dunn, 1959, Miall, 1975).

(5). Suhu.

Suhu yang dipakai tergantung pada keadaan organisme dan kondisi fermentasi. Suhu yang biasa dipakai 25 - 35°C, tetapi Doelger dan Prescott menyatakan suhu optimum 26 - 28°C.

(6). Luas permukaan cairan dan volume media cair.

Dalam fermentasi, perubahan gula menjadi asam sitrat melibatkan enzim intraselular dalam sel-sel hidup yang dibuat dalam "mycelial mat". Gula masuk dalam sel secara osmosa, sedang asam sitrat dikeluarkan dari sel dengan cara difusi.

Kecepatan proses enzimatik dan difusi menentukan lamanya periode fermentasi. Doelger dan Prescott menunjukkan bahwa penggunaan tempat/wadah yang dalam dengan volume yang besar (luas permukaan cairan kecil), pembentukan asam sitrat menjadi lebih lambat.

(7). Oksigen.

Pemberian udara dalam jumlah besar memberikan

efek yang berlawanan terhadap hasil asam sitrat. Pemberian sedikit udara diatas miselium tidak memberikan pengaruh.

Pemberian udara 15 ml per menit dalam labu erlen - meyer memberikan hasil yang tidak berbeda dengan kontrol tanpa aliran udara.

(8). Lama fermentasi.

Dalam fermentasi untuk menghasilkan sitrat menggunakan panci atau wadah dengan medium cair yang dangkal, pada umumnya akan sempurna dalam 7 - 10 hari.

4. TINJAUAN TENTANG ASAM SITRAT.

4.1. Sejarah singkat asam sitrat.

Asam sitrat, pertama kali diisolasi dari buah jeruk dan dikristalkan oleh Scheele pada tahun 1784. Asam sitrat dapat ditemukan dalam buah-buahan seperti buahjeruk, nanas, per dan buah-buahan lainnya. Negara - negara Sisilia, Kalifornia, Hawai dan Indie Barat merupakan penghasil utama asam sitrat dari sumber alam, yakni dari buah jeruk dan nanas.

Pada tahun 1893, Wehmer menulis untuk pertama kalinya, asam sitrat hasil fermentasi jamur Citromyces pfefferianus dan C. glauber, dalam larutan su krosa yang berisi CaCO_3 .

Lebih lanjut juga ditemukan bahwa Penicillium luteum dan Mucor piriformis dapat menghasilkan sitrat. Tetapi Wehmer menganggap bahwa Aspergillus niger hanya menghasilkan asam oksalat.

Curie, pada tahun 1917, dari Departemen Pertanian Amerika Serikat berhasil menunjukkan bahwa strain Aspergillus niger merupakan jamur yang sesuai untuk pembuatan asam sitrat secara fermentasi.

Dalam tahun 1922, Italia memproduksi sitrat dari buah jeruk, sehingga 90 % kebutuhan akan sitrat didatangkan dari negara tersebut. Sitrat ini kebanyakan diekspor ke Amerika Serikat, Inggris dan Perancis. Sejak tahun 1927, sitrat yang diimpor oleh negara - negara tersebut berkurang, antara lain disebabkan oleh berkembangnya produksi asam sitrat secara fermentasi, dan meningkatnya tumbuh - tumbuhan jeruk penghasil sitrat di negara-negara tersebut. (Prescott dan Dunn, 1959, Miall, 1975 dan Berry, 1975).

4.2. Sifat - sifat fisika dan kimia asam sitrat.

4.2.1. Sifat fisika.

Asam sitrat yang diproduksi dapat berupa anhidrat ataupun monohidrat, tidak berwarna, tidak berbau, bening atau serbuk kristal putih.

Asam sitrat monohidrat pada suhu 75°C mulai melepaskan air kristalnya, dan berubah menjadi anhidrat pada suhu 135°C .

Asam sitrat anhidrat meleleh pada suhu 153°C .

Berat molekul asam sitrat anhidrat 192,12 dan asam sitrat monohidrat 210,14 (Kirk,1967;The Merck Index,1976; Martindale,1977).

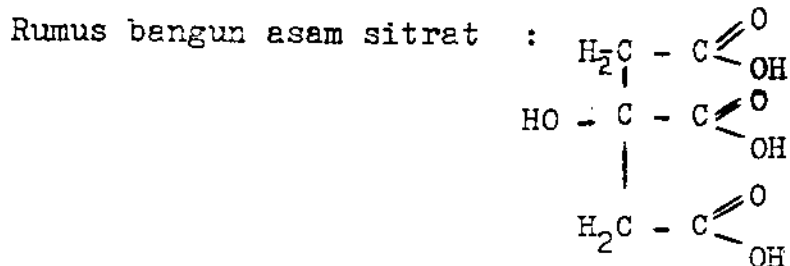
Asam sitrat,mempunyai tetapan disosiasi I = $8,2 \times 10^{-4}$ pada suhu 18°C ,tetapan disosiasi II dan III masing-masing $1,77 \times 10^{-5}$ dan $3,9 \times 10^{-7}$ (Kirk,1967; The Merck Index,1976).

Kristal asam sitrat anhidrat dihasilkan dari pemekatan larutan asam sitrat dalam air,dengan jalan pemanasan. Rata-rata suhu peralihan dari asam sitrat monohidrat ke asam sitrat anhidrat adalah $36,3^{\circ}\text{C} \pm 0,15^{\circ}\text{C}$ (Kirk,1967).

Satu bagian asam sitrat dapat larut,kurang dari satu bagian air, 1,5 bagian alkohol,2 bagian gliserol, 30 bagian eter, kurang dari satu bagian metanol (Kirk,1967; The Merck Index,1976; Martindale,1977).

4.2.2. Sifat Kimia.

Asam sitrat = asam -2 hidroksi, 1,2,3 propan trikarboksilat atau asam β hidroksi trikarboksilat. Rumus kimia asam sitrat anhidrat : $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, dan sebagai monohidratnya : $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$.



Jika asam sitrat dipanaskan bersama asam sulfat pekat, akan membentuk asam formiat, dan selanjutnya terurai jadi air dan CO; pada waktu yang bersamaan terbentuk asam aseton dikarboksilat yang selanjutnya terurai jadi aseton dan CO₂.

Asam sitrat dalam suasana netral, dengan larutan CaCl₂ tidak membentuk endapan, tetapi setelah dipanaskan, segera membentuk endapan putih "granular" dari kalsium sitrat. Pemanasan sitrat dengan merkuri sulfat dan penambahan larutan K₂MnO₄, membentuk kristal putih Hg₃O₂SO₄.2[CO(CH₂CO₂)₂]Hg. Larutan sitrat, dengan K₂MnO₄ suasana asam sulfat dan penambahan bromin, menghasilkan endapan putih, pentabromaseton (C₂HBr₅CO); asam - asam oksalat, tartrat, malat dan suksinat beserta garam-garamnya tidak mengganggu reaksinya. (Feigl, 1960; Treadwell, 1963; WHO, 1967; FEMA, 1979).

4.3. Teori tentang pembentukan asam sitrat.

Beberapa teori yang berkaitan dengan biosintesis / mekanisme pembentukan sitrat antara lain :

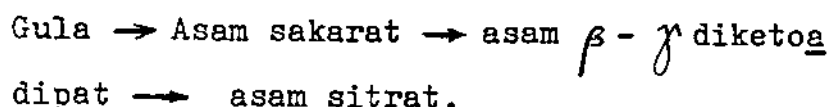
(Prescott dan Dunn, 1959).

(1). Raistrick dan Clark (1919) menggambarkan bahwa gula heksosa mengalami oksidasi menjadi asam sakarat, selanjutnya diubah menjadi asam α - γ diketoadipat, yang dihidrolisa lebih lanjut menjadi asam oksalasetat dan asam asetat.

Kombinasi asam asetat dan oksalasetat inilah yang menghasilkan asam sitrat.

Adanya hasil lain, asam oksalat, disebabkan oleh peruraian asam oksalasetat dan oksidasi asam asetat.

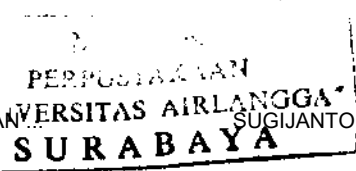
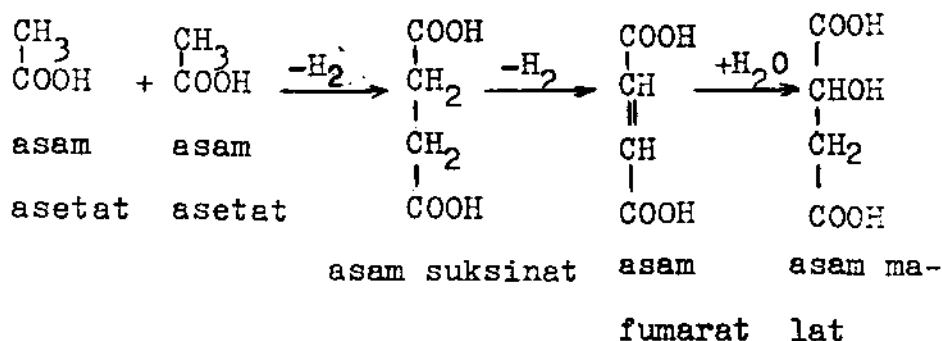
- (2). Franzen dan Schmitt (1925), menganggap bahwa asam sakarat sebagai dasar hasil intermediat:

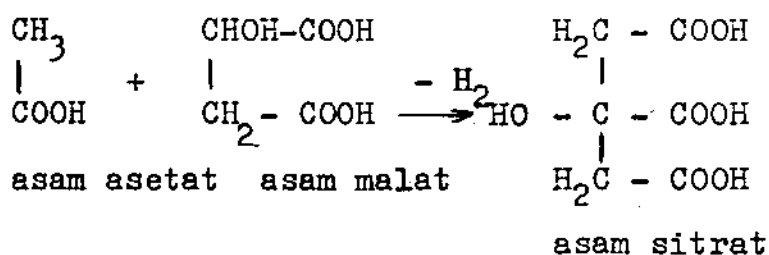


Teori ini didukung oleh Challenger (1927) berdasarkan penelitiannya dapat mengisolasi asam sakarat dari media yang berisi glukosa yang telah difermentasi oleh Aspergillus niger Tetapi Bernhauer tidak yakin/tidak percaya bahwa asam sakarat merupakan hasil intermediat dalam fermentasi sitrat.

- (3). Teori Chrzaszcz dan Tiukow.

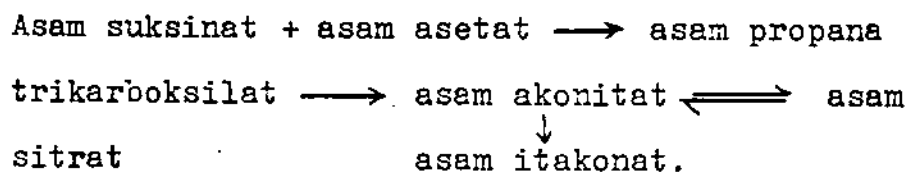
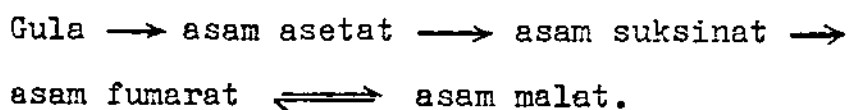
Berdasarkan penelitiannya (1930) bahwa jamur - jamur tertentu mempunyai kemampuan menghasilkan sitrat, bersama-sama dengan asam suk-sinat, asam fumarat dan asam malat dari asam asetat dan etanol, maka Chrzaszcz dan Tiukow memformulasikan pembentukan sitrat sbb :





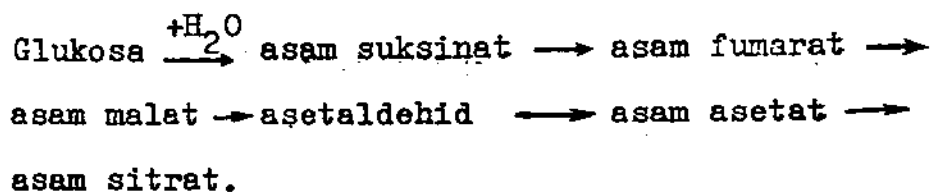
(4). Teori Bernhauer.

Menurut Bernhauer, dkk (1932), asam asetat dan etanol dibentuk dari gula-gula, berdasarkan skema Neuberg dalam produksi alkohol oleh ragi. Asam asetat diubah menjadi asam sitrat melalui pembentukan asam akonitat.



(5). Teori Gudlet.

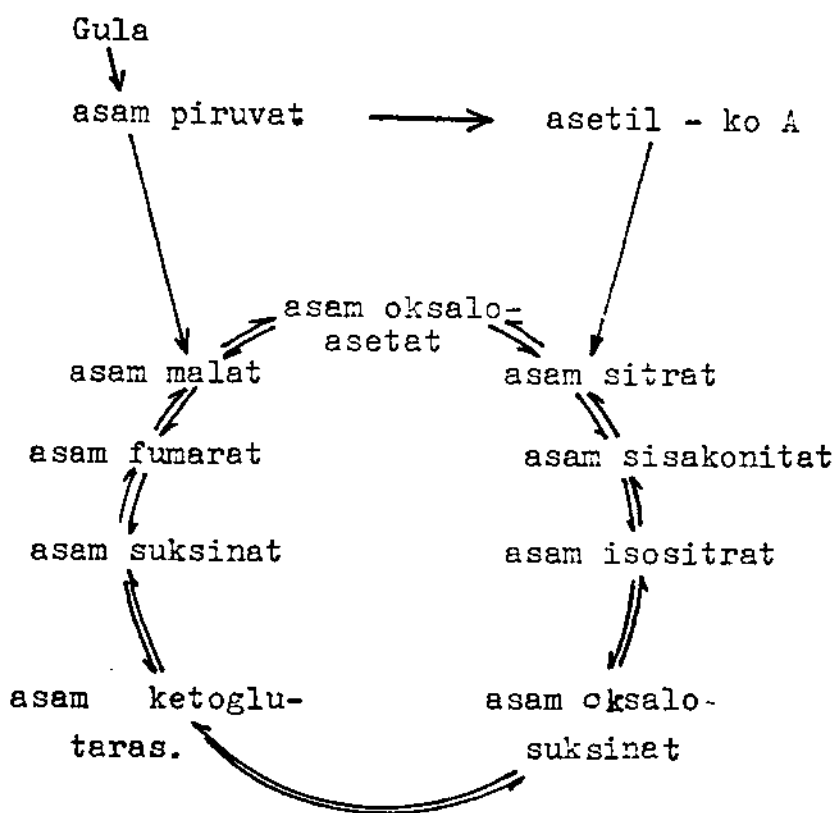
Berdasarkan fakta bahwa glukosa dapat diubah langsung menjadi molekul dengan 4 atom C, asam suksinat, dan molekul dengan 2 atom C, asetaldehid, Gudlet (1935) mengusulkan mekanisme sbb :



(6). Siklus asam trikarboksilat (Tricarboxylic acid cycle) = TCA = Siklus Krebs.

Lewis dan Weinhouse (1951), dengan memakai asam asetat berlabel dalam medium, menunjukkan bahwa asam sitrat dibentuk akibat kelebihan hasil selama kesalahan operasi dalam siklus Kreb.

Martin dan Ramakrishnan (1955) telah berhasil mencoba pembuatan sitrat dengan melibatkan enzim - enzim yang bekerja dalam Siklus Kreb, hasil ekstrak bebas sel - sel Aspergillus niger



Siklus Kreb.

4.4. Penetapan kadar asam sitrat.

Untuk penetapan kadar asam sitrat, dapat dilakukan dengan beberapa cara, antara lain :

(1). Cara Volumetri.

Asam sitrat dititrasi dengan larutan basa NaOH memakai indikator fenolftalein (NFXV, 1980; FI edIII, 1979;) atau/adapula yang menggunakan indikator biru timol (Evers, 1955; Garret, 19). Cara ini hanya dapat digunakan untuk penentuan kadar asam sitrat yang sudah di isolasi.

Dapat pula dengan pengendapan lebih dahulu sebagai timbal sitrat, setelah asam sitrat dibebaskan dari endapan dititrasi dengan basa alkali dan serium sulfat. (Jacobs, dan Wilkinson et al, 1934). Cara ini tidak dapat dilakukan apabila sitrat tercampur dengan oksalat.

(2). Pengukuran secara kolorimetri.

Asam sitrat dapat direaksikan dengan natrium molibdat membentuk kompleks asam molibdat α -hidroksi, yang selanjutnya bila direduksi akan membentuk senyawa "molibdenum biru" yang berwarna biru. (Matulis, et al, 1964). Selain sitrat, asam-asam hidroksi lainnya ikut terukur dengan cara ini, misalnya asam :

isositrat, malat dan laktat (Sumartini,1981)

Cara lain, asam sitrat diubah menjadi asam hidroksamat, kemudian direaksikan dengan FeCl_3 , akan memberikan warna merah sampai violet- (Collier,1955). Cara ini tidak spesifik karena asam - asam karboksilat, ester - ester amida - amida dan anhidrida dapat memberikan reaksi yang positif.

(3). Cara fluorometri. (Leininger dan Katz,1949).

Bila asam sitrat anhidrat dan Na_2CO_3 di campur dan direfluks dengan tionilklorida, ma ka terbentuklah akonitil-klorida.

Setelah kelebihan tionil-klorida diuapkan dalam ruang hampa, kemudian dialiri gas amoniak pada suhu kamar, dapat membentuk akonitamida.

Dengan penambahan asam sulfat 76 % dan pemanasan 165°C , terbentuklah asam sitrasinat.

Asam sitrasinat dengan amonia membentuk amonium sitrasinat yang berfluorsensi biru, dapat diukur dalam daerah sinar lembayung ultra.

Cara ini spesifik, tetapi pengerjaan rumit, perlu kondisi yang benar - benar kering.

(4). Cara kromatografi gas - cair.

Untuk cara ini diperlukan tahap isolasi lebih dahulu, misalnya dengan kromatografi penukar ion, kemudian diesterifikasi dengan metanol dalam asam.

Pembentukan ester ini sulit untuk menghasilkan jumlah yang kuantitatif apalagi bila dalam campuran terdapat asam hidroksi karboksilat dan asam karboksilat tak jenuh. (Morrison & Boyd, 1973).

(5). Gravitometri atau modifikasinya (kolorimetri).

Metode ini sangat teliti dan spesifik untuk penentuan kadar sitrat, terutama dengan adanya asam-asam yang lain.

Sampel sitrat dicampur asam sulfat dan KBr, ditambahkan tetes-demi tetes $KMnO_4$ hingga berlebihan.

Kemudian ditambahkan H_2O_2 untuk menghilangkan MnO_2 yang terbentuk, dan kelebihan $KMnO_4$.

Hasilnya berupa pentabromaseton yang dapat diukur secara gravimetri atau kolorimetri. (Evers 1955; AOAC 1975).

Cara gravimetri, memerlukan banyak alat perya - ring sintered glas bila banyak sampel yang diukur, sehingga kurang praktis, lagi pula perlu waktu yang lebih lama.

Cara kolorimetri dapat dilakukan dengan penambahan Na_2S (Perlman, 1944) ataupun Tiourea (Natelson, 1948) sehingga terbentuk warna kuning yang dapat diamati secara kolorimetri.

Cara ini dicoba pula oleh Sumartini, 1981 untuk penentuan kadar sitrat dalam hasil fermentasi.

BAB III

BAHAN, ALAT DAN METODE

1. Bahan

1.1. Bahan kimia

Semua bahan kimia yang digunakan adalah produksi E. Merck Darmstadt, dengan derajat "pro analisa", kecuali apabila disebutkan lain. Agar yang digunakan adalah Bacto Agar, Difco Centrified, Difco Laboratories, Detroit Michigan USA.

1.2. Aspergillus niger.

Jamur Aspergillus niger diperoleh dari udara dalam Laboratorium Analisis Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga (1985).

1.3. Media

Media yang digunakan adalah media Czapek - agar, untuk inokulasi dan isolasi jenis Aspergillus niger. Larutan Czapek (tanpa agar), untuk pertumbuhan spore membentuk miselium, dan media Czapek yang dimodifikasi (mengandung gula 14% - dan diatur pada pH tertentu) untuk fermentasi. Komposisi media-media ini dapat dilihat dalam lampiran 1, 2 dan 3.

2. Alat

Kotak tertutup yang dilengkapi dengan lampu lembayung ultra, digunakan untuk pengerjaan aseptis.

Autoclave portable SMIC, Model 7101 WS 2-84-64. (Otoklaf 20 liter), untuk sterilisasi media dan alat. Fermentor buatan sendiri, untuk pertumbuhan spora menjadi miselia, skema alat fermentor dapat dilihat dalam lampiran 4. pH meter Fischer Accumet Model 230A untuk mengatur pH dan mengamati perubahan pH larutan media. Spektronic 20 Bausch & Lomb. Spektrometer merah infra, Perkin Elmer Tipe 735 B.

3. Metoda.

3.1. Penyediaan inokulum.

Penyediaan inokulum dimaksudkan untuk memperoleh jenis *Aspergillus niger* yang akan digunakan dalam fermentasi.

3.1.1. Pembuatan media.

Media Czapek - agar dengan komposisi yang tertera dalam lampiran 1, dikerjakan sebagai berikut : semua zat selain gula dan agar, dilarutkan dalam air, kemudian agar-agar dimasukkan, direbus sambil diaduk hingga jernih, baru gulanya dimasukkan dan diaduk sampai larut. Media ini dibagi - bagi dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas steril, baru disterilkan dengan otoklaf pada suhu 121°C , tekanan ± 2 atm, selama 20 menit atau dengan uap air suhu 100°C selama 1 jam dan diulangi lagi sampai 3 kali setelah dibiarkan 24 jam. Media yang masih panas dituang ke dalam cawan petri steril, dibiarkan dingin, memadat, baru siap untuk perbenihan.

3.1.2. Perbenihan *Aspergillus niger*.

Sebuah cawan petri yang berisi media di biarkan terbuka di dalam laboratorium, maka setelah beberapa hari akan tumbuh adanya berbagai macam jenis jamur, tampak dari koloni dan warna miselia udaranya.

Dari spora yang diduga *Aspergillus niger* dipindahkan kedalam media baru, demikian diulang lagi, hingga diperoleh biakan koloni satu macam saja.

3.1.3. Determinasi *Aspergillus niger*.

Untuk memastikan bahwa jamur yang terisolasi adalah *Aspergillus niger*, maka dilakukan pengamatan, baik secara makroskopis maupun mikroskopis. Pengamatan makroskopis dilakukan setiap hari setelah waktu penanaman.

Hari pada saat dilakukannya penanaman dihitung sebagai hari pertama.

Pengamatan makroskopis meliputi :

- kapan mulai tumbuhnya
- kecepatan pertumbuhannya
- warna koloni yang terdiri atas :

warna miselia udara

warna miselia yang melekat pada permukaan media.

perubahan-perubahan lain yang terjadi selama pertumbuhan.

Setelah pertumbuhan sempurna (jamur *Aspergillus* cukup dewasa) barulah dilakukan pengamatan mi-kroskopis.

Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan mem-buat sediaan jamur dalam air/laktofenol.

Penggunaan laktofenol dapat mencegah penguapan dan pengerutan sel.

Yang termasuk dalam pengamatan ini antara lain :

- susunan morfologi jamur
- fragmen-fragmen yang dapat menunjukkan spe-sifikasinya.
- ukuran besarnya spora dan konidia.

(Thom dan Raper, 1951; Jutono, dkk, 1973; Dwidjoseputro, 1985).

3.2. Fermentasi.

3.2.1. Pembuatan media Czapek tanpa agar.

Media Czapek tanpa agar, dengan komposisi seperti lampiran 2, dibuat dengan cara menimbang seluruh bahan - bahan, dilarutkan dalam air suling yang baru dididihkan, kemudian dimasukkan fermentor dan distilkan bersama sama kapas steril dan larutan KOH nya, selama 20 menit dalam otoklaf pada suhu 121°C dan tekanan ± 2 atm.

3.2.2. Pertumbuhan/pembiakan spora, dalam media "submerged culture".

Secara aseptis, menggunakan ujung ja-

rum ose, diambil spora hasil biakan koloni tunggal, dimasukkan dalam media Czapek tanpa agar yang sudah disterilkan lebih dahulu. Kemudian dialiri udara steril dan dia-duk dengan pengaduk magnet, diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam dalam alat fermentor.

3.2.3. Pembuatan media untuk fermentasi kultur permukaan.

Media Czapek yang dimodifikasi seperti tertera dalam lampiran 3, dibuat sebanyak 3,5 liter.

Bahan-bahan ditimbang, dilarutkan dalam air yang baru dididihkan dan disterilkan, kemudian setelah dingin diatur pH nya dengan penambahan HCl 1N, diamatidengan pH meter hingga diperoleh pH = 1,0 dan ditambah air sampai volumenya 3,5 liter.

Larutan ini dipipet, dimasukkan kedalam labu erlemeyer volume 300 ml (45 buah), masing - masing sebanyak 75,0 ml; kemudian ditutup dengan aluminium foil dan ditali karet, lalu disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121°C , tekanan ± 2 atm, selama 20 menit.

Dengan cara yang sama, dilakukan untuk membuat media dengan pH 2, 3, 4 dan 5.

3.2.4. Fermentasi kultur permukaan

Hasil pembiakan spora dalam fermentor/ submerged culture berupa miselia yang terdispersi dalam media, diencerkan dengan air steril sebanyak volume yang sama (agar berat jenis cairan ini jauh lebih kecil dari berat jenis cairan media kultur permukaan). Kemudian dengan alat injektor dimasukkan ke dalam 40 buah media pH 1,0 sebanyak masing-masing 2,5 ml, pelan-pelan lewat dinding dalam erlemeyer.

Demikian pula, dari hasil biakan spora yang sama ini, dengan cara yang sama, ditanam ke dalam media pH 2, 3, 4 dan 5.

Semua erlenmeyer yang berisi media, baik yang ditanami Aspergillus niger maupun yang tidak (untuk kontrol), diinkubasikan pada suhu kamar, selama penelitian (15 hari).

3.3. Perubahan yang terjadi dan cara pengamatan

Selama fermentasi berlangsung, adanya penggunaan nutrisi dan pelepasan metabolit, maka terjadilah beberapa perubahan, seperti : pertumbuhan/banyaknya/beratnya miselia, perubahan pH, normalitas asam, gula sisa yang belum dikonsumsi dan kadar sitrat yang dihasilkan. Semua hal ini diamati dari media fermentasi pada umur 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 dan 15 hari,

Masing - masing dengan replikasi lima kali.

3.3.1. Pertumbuhan miselia.

Selama fermentasi pertumbuhan miselia diukur menurut cara Fris (1943) dan Day & Hervey (1946), melalui penyaringan dan pencucian lebih dahulu (Lilly dan Barnett, 1951).

Dalam wadah yang telah dipanaskan sebelumnya pada suhu penetapan selama 30 menit dan telah ditara, miselium basah ditimbang, lalu dikeringkan dalam almari pengering pada suhu 105°C sampai berat konstan (Farmakope Indonesia, Edisi III, 1979). Cara ini dikerjakan untuk semua kultur permukaan pada berbagai pH awal dan berbagai umur pengamatan. Khusus untuk mengetahui banyaknya miselia awal perbenihan dalam kultur permukaan, dapat dihitung berdasarkan pengamatan densitas optiknya (turbidimetri) pada λ 650 nm, atau berat miselia dari "submerged culture" yang siap ditanam, disaring 50,0 ml, dicuci, ditimbang dan dikeringkan seperti cara diatas, dengan replikasi lima kali.

3.3.2. Perubahan pH

Perubahan pH akibat penggunaan nutrisi dan pelepasan metabolit - metabolitnya, diamati, setelah kultur disaring, diukur dengan pH meter.

3.3.3. Perubahan normalitas asam.

Normalitas asam ditentukan dengan cara memipet sampel volume tertentu dan dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N menggunakan indikator fenolftalein. (Farmakope Indonesia, 1979, Garrat, Evers dan Smith, 1955).

3.3.4. Gula sisa dalam media fermentasi.

Gula ditentukan berdasarkan jumlah total dari gula reduksi, mengingat adanya hidrolisa selama sterilisasi & fermentasi.

Sebelum ditetapkan kadarnya, diuji lebih dahulu secara kualitatif sbb :

(1). Reaksi Kolisch.

Sedikit sampel diencerkan dengan air (1 : 10), dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah 2 tetes larutan 15 % α -naftol dalam alkohol, kemudian ditambah 5 ml H_2SO_4 pekat melalui dinding dalam tabung reaksi, pelan-pelan dan hati-hati. Terbentuknya cincin coklat antar dua permukaan cairan menunjukkan adanya gula-gula.

(2). Reaksi Fehling.

Sedikit sampel dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan campuran Fehling A + Fehling B sama banyak, kemudian dipanaskan, maka terbentuk warna merah-bata.

(3). Reaksi Ozazon.

Fenilhidrazin HCl 1 gram dicampur dengan natrium asetat $1\frac{1}{2}$ gram, ditambah sampel, kemudian dipanaskan dalam penangas air selama 45 menit.

Tabung reaksi beserta isinya diambil, biarkan mendingin pada suhu kamar, kemudian diamati kristalnya.

Setelah menunjukkan adanya gula-gula dilakukan uji kuantitatif dengan metode Luff Schoorl, terhitung sebagai kadar total gula setelah mengalami inversi.

Penentuan kadar dilakukan sebagai berikut:

Dipipet 5,0 ml sampel, ditambahkan 25 ml air dan 10 ml HCl 25 %, dipanaskan di atas penangas air pada suhu $67-70^{\circ}\text{C}$ selama 10 menit. Kemudian didinginkan cepat sampai suhu 20°C , dinetralkan dengan larutan NaOH 30 % memakai indikator fenolftalein, dipindahkan dalam labu ukur secara kuantitatif dan ditambah air sampai volume 100,0 ml, dikocok homogen.

Dipipet 10,0 ml, dimasukkan labu erlenmeyer, ditambah air 15 ml, larutan Luff Schoorl 25,0 ml (lampiran 5) dan beberapa butir batu didih.

Erlenmeyer dihubungkan dengan pendingin balik, dididihkan (diusahakan 2 menit sudah mendidih), selama 10 menit.

Kemudian didinginkan cepat-cepat dan selanjutnya ditambah 15 ml larutan KJ 20% dan dengan hati-hati ditambah 25 ml H_2SO_4 26,5%. Jodium yang dibebaskan dititrasi dengan larutan natrium tiosulfat 0,1 N, memakai indikator amilum 2 - 3 ml yang ditambahkan pada saat titrasi hampir berakhir.

Dengan cara yang sama, sampel diganti air, digunakan sebagai blanko.

Dari selisih antara titrasi blanko dan titrasi sampel, kadar total gula reduksi setelah inversi dapat dihitung menurut cara Luff - Schoorl . (Lees , 1971 ; Sudarmadji , 1976) .

3.3.5. Asam sitrat hasil fermentasi.

3.3.5.1. Uji kualitatif asam sitrat.

Sebelum dilakukan penentuan kadar, lebih dahulu diuji secara kualitatif, adanya asam sitrat.

Uji kualitatif dapat dilakukan sbb :

- (1). Sampel (yang berisi sitrat) bila dinetralkan, kemudian ditambah larutan kalsium klorida 10 %, tidak terja -

di endapan. Tetapi bila larutan dididihkan, maka terbentuklah endapan putih, kristal granular, yang tidak larut dalam NaOH, tetapi larut dalam asam asetat atau HCl.

- (2). Sampel ditambah larutan pereaksi merkuri sulfat berlebih, dididihkan, kalau perlu disaring. Setelah pendidihan ditambahkan beberapa tetes larutan pereaksi KMnO_4 , kelebihan KMnO_4 dihilangkan dengan penambahan H_2O_2 , akan memberikan endapan putih bila ada sitrat.
- (3). Sampel ditambah larutan H_2SO_4 (1:1) dan larutan KBr 37,5% sama banyak, ditambah tetes demi tetes larutan KMnO_4 5% sampai terbentuk endapan coklat, dibiarkan 5 menit. Kelebihan KMnO_4 dihilangkan dengan larutan H_2O_2 3%, maka terbentuklah endapan putih, bila terdapat sitrat didalam sampel. (Feigl, 1960; WHO, 1967; FFAA, 1979; BP, 1973 dan Treadwell, 1963)
- (4). Penentuan titik leleh & spektra merah-infra dari asam sitrat hasil isolasi. Isolasi sitrat dapat dilakukan sebagai berikut :

Larutan fermentasi disaring, filtratnya diambil dan dinetralkan dengan

larutan NaOH 10% (atau NH_4OH), ditambah larutan CaCl_2 10% (kalau perlu disaring) kemudian dipanaskan sampai mendidih, ditambahkan lagi larutan CaCl_2 hingga pengendapan sempurna. Selanjutnya di "aging" 30 menit diatas penangas air, lalu disaring panas, endapan dicuci dengan air panas. Endapan kalsium sitrat yang terjadi dapat pula diidentifikasi spektra merah infranya.

Untuk memperoleh sitrat, kalsium sitrat hasil isolasi direaksikan dengan asam sulfat 1 N sedikit berlebih, dibiarkan sebentar, endapan yang terjadi disaring. Filtrat dipekatkan diatas penangas air, dalam cawan penguap, lalu dipindahkan dalam lemari pemanas pada suhu 60°C . Kristal yang terjadi dilarutkan dalam air, ditambahkan norit, diaduk homogen, dan dipanaskan $60 - 70^\circ\text{C}$, kemudian disaring panas. Filtrat yang terjadi diuapkan dan dikristalkan dengan cara yang sama. (Tyler dan Schwarting, 1969; Kirk dan Othmer, 1967).

Dapat pula dimodifikasi, setelah terbentuk kristal, dilarutkan dalam metanol, ditambah norit, dipanaskan $60 - 70^\circ\text{C}$,

disaring panas, baru diuapkan metanolnya diatas penangas air.

3.3.5.2. Uji kuantitatif/penetapan kadar asam sitrat.

Untuk penetapan kadar asam sitrat, dilakukan secara spektrofotometri, melalui pembentukan pentabromoaseton lebih dahulu.

Cara penetapan kadar asam sitrat hasil fermentasi dilakukan sbb : (Natelson, 1948; Sumartini, 1981).

(a). Pembuatan kurva baku

Ditimbang teliti 120 mg asam sitrat dilarutkan dalam air sampai volume tepat 100,0 ml dalam labu ukur.

Dipipet 5,0 ml, dimasukkan dalam labu erlenmeyer 250 ml, diencerkan dengan air sampai volumenya 20 ml, ditambah 4 ml larutan H_2SO_4 (1:1) dan 4 ml larutan KBr 37,5 %.

Kemudian ditambah sedikit demi sedikit larutan $KMnO_4$ 5% sampai terbentuk endapan coklat (dilakukan dalam almari asam). Didiamkan 5 - 10 menit pada suhu kamar, bila endapan hilang ditambah lagi larutan $KMnO_4$ nya. Kelebihan $KMnO_4$ dan adanya $KMnO_2$, dihilangkan dengan larutan H_2O_2 3%. Agar pengendapan sempurna, labu-labu erlenmeyer diletakkan dalam almari es, atau

didiamkan semalam.

Endapan yang terjadi diekstraksi dengan 50 ml n-heksana selama 10 menit, lalu dibiarkan fasa n-heksana memisah dari fase air. Dipipet 2,0 ml fasa n-heksana, dimasukkan dalam tabung reaksi bertutup. Kemudian ditambah 5,0 ml larutan dioksan (1:1) dan 5,0 ml larutan tiourea 4% yang mengandung boraks 2%, dikocok 5 menit, dipusingkan selama 5 menit dan dibiarkan 5 menit.

Selanjutnya warna yang terjadi diamati pada panjang gelombang 470 nm (*).

Dengan cara yang sama dilakukan terhadap asam sitrat yang ditimbang teliti dari 150 mg sampai 400 mg, dan dilakukan pula blanko tanpa sitrat dengan cara yang sama.

(b). Pembuatan kalibrasi /uji perolehan kembali.

Pembuatan kalibrasi ini untuk menguji, apakah kurva baku yang dibuat, dapat digunakan untuk penentuan

(*). Pengamatan pada λ maksimum ini berdasarkan penentuan panjang gelombang maksimum, dari larutan yang dibuat dengan cara yang sama, diamati pada berbagai panjang gelombang.

kadar dalam media, karena mungkin ada pengaruh dari media.

Kedalam media tanpa sitrat, dilarutkan asam sitrat yang telah ditimbang teliti dan dimasukkan labu ukur secara kuantitatif ditambah media hingga 100,0 ml. Pengerjaan selanjutnya seperti cara (a) diatas dengan replikasi enam kali, memakai asam sitrat dengan berbagai macam berat.

(c). Pengukuran asam sitrat dalam contoh/sampel.

Sampel hasil fermentasi, setelah disaring, dipipet 5,0 ml, dimasukkan dalam labu erlenmeyer 250 ml, dan seterusnya dikerjakan sama seperti (a) diatas. Tiap penentuan kadar sampel, dilakukan pula baku/pembandingan yang baru.

3.4. Metoda analisa hasil-hasil percobaan .

Untuk mengetahui apakah absorbansi dapat digunakan sebagai dasar untuk penetapan kadar, maka diperlukan pembuktian adanya korelasi antara absorbansi (y) dan kadar (x), dengan rumus :

$$r_{xy} = \frac{n \cdot \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{\sqrt{\{n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2\} \{n \cdot \sum y^2 - (\sum y)^2\}}}$$

Bila ada korelasi ($r_{xy} > r_{tabel}$) (lihat lampiran 7), maka dilanjutkan dengan perhitungan persamaan garis regresi, dengan rumus : $y = Bx + a$; $B = \frac{n \cdot \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2}$; $A = \frac{y - B \cdot \sum x}{n}$

Untuk menguji ada-tidaknya perbedaan pengaruh pH media terhadap pembentukan sitrat, digunakan analisa varian "Factorial in a Randomized Complete Block Design". (lamp. 8&9)

BAB IV
HASIL PENELITIAN

1. Identifikasi/determinasi *Aspergillus niger*.

Hasil identifikasi jamur *Aspergillus niger*, sesuai dengan kunci determinasi (Thom dan Raper 1951, Dwidjoseputro, 1985; Autswick 1981).

Pengamatan makroskopis :

Jamur jenis ini pada media Czapek agar, dalam waktu 1 hari menunjukkan adanya bintik putih, setelah dua hari tampak miselia putih seperti kapas. Beberapa hari berikutnya pertumbuhan semakin menghebat. Miselia udara tampak berubah menjadi coklat kehitaman setelah hari ke empat, dimulai dari bagian, tengah koloninya. Bintik-bintik hitam ini makin lama/makin tua, semakin rapat dan makin berwarna hitam.

Miselial yang terbenam dalam media, berwarna kekuningan.

Pengamatan mikroskopis.

Pada pengamatan secara mikroskopis, ditemukan bahwa hifanya bersekat. Konidiofora yang terjadi panjang 5 - 6 mm, bagian ujungnya membulat sebagai vesikel. Permukaan vesikel ditumbuhi sterigmata biserial yang mendukung konidia. Konidia berbentuk bulat, berukuran 7 - 10 μ m dan berwarna gelap.

Konidia yang lepas dari sterigmata, ada yang masih bergandengan, ada pula yang sendiri - sendiri.



SS Photo

Gambar 1 . Miselia dari Aspergillus niger.

Bersekat dan berinti banyak. Umur 2-3 hari.

Pembesaran 100 kali .



SS Photo

Gambar 2. Konidiofora, vesikel dan sterigmata .

A. niger umur 4 hari , pembesaran 400 kali.



Gambar 3. A. niger tua, umur 7 - 8 hari .
Miselia, konidiofora, vesikel (ujung konidiofora yang membulat), sterigmata biserial, dengan konidia dibagian ujungnya. (pembesaran 100 kali)



Gambar 4. Konidia dari A. niger tua . (Pembesaran 200 kali)



SS Photo

Gambar 5. Bagian ujung konidiofora dari A. niger tua. Konidiofora, bagian ujungnya membulat sebagai vesikel, ditumbuhi sterigmata biserial dan terdapat konidia di bagian terluarnya . Pembesaran 700 kali .

2. Pertumbuhan miselia selama fermentasi.

Adanya pertumbuhan miselia, ditunjukkan oleh adanya perubahan jumlah/berat miselia dari waktu ke waktu selama fermentasi.

Berat miselia awal fermentasi dapat dilihat dalam tabel 1 atau lampiran 6.

Tabel 1 : Berat miselia dalam 50,0 ml media SMC yang siap difermentasikan dalam media "kultur permukaan".

Berat basah (gm)	Berat kering (gm)
0,2336	0,0028
0,1913	0,0022
0,2189	0,0026
0,2376	0,0030
0,2463	0,0030
$\Sigma x = 1,1277$	0,0136
$\bar{x} = 0,2255$	0,0027

Berat miselia rata-rata yang ditanam untuk fermentasi (2,5 ml) = 0,0113 gm basah, atau $1,35 \cdot 10^{-4}$ gm kering.

Dalam media dengan berbagai pH awal, semua miselia dapat tumbuh sebagai kultur permukaan, kecuali pada pH awal = 1 semuanya mati/tidak menunjukkan adanya pertumbuhan.

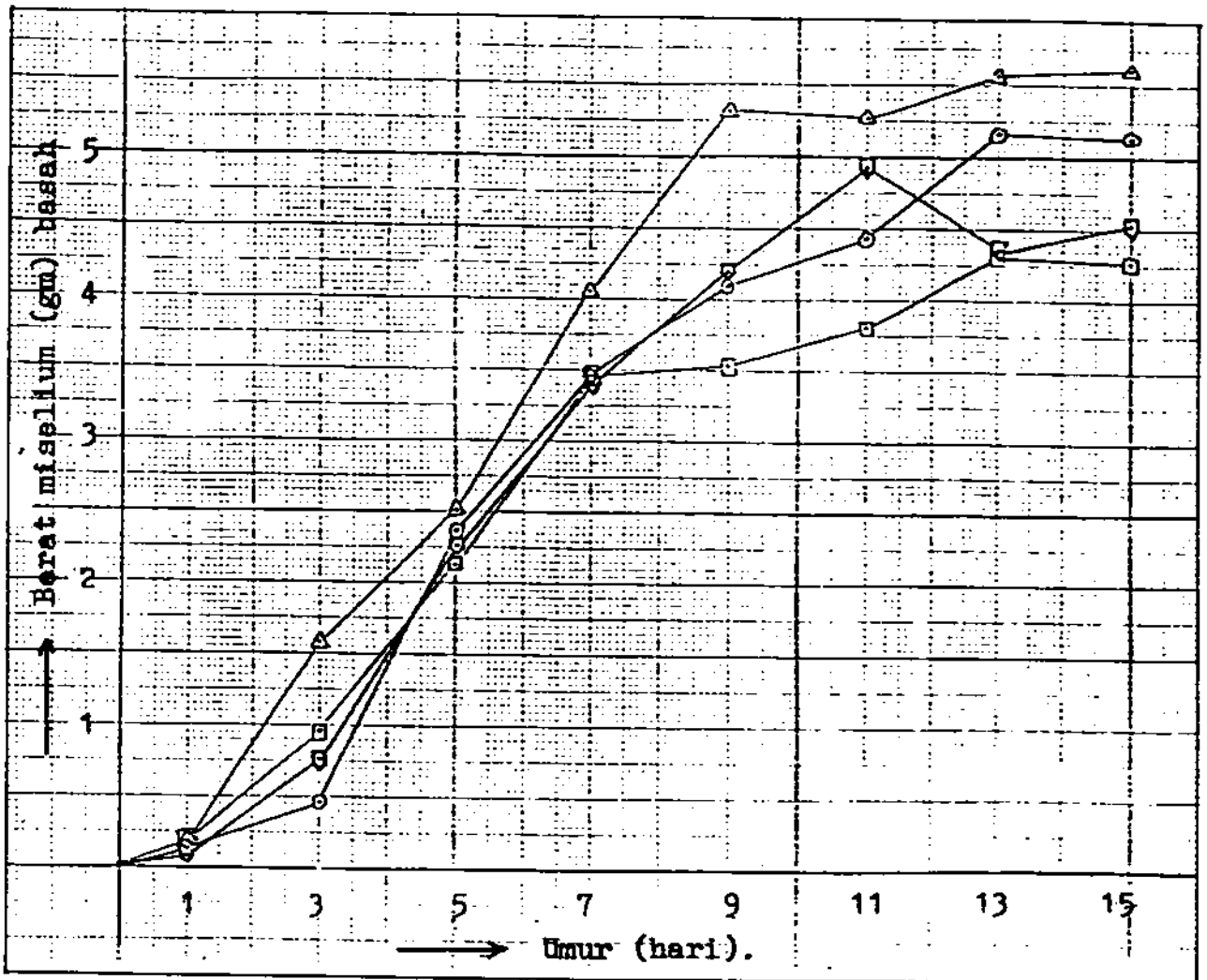
Pertumbuhan miselia selama fermentasi dalam media cair Czapek yang dimodifikasi dapat dilihat dalam tabel 2.

Tabel 2 : Berat miselia rata-rata dari 5 replikasi, selama fermentasi

Umur (hari)	Berat miselia rata - rata (gm)							
	pH 2		pH 3		pH 4		pH 5	
	basah	kering	basah	kering	basah	kering	basah	kering
1	0,1392	0,0140	0,1782	0,0310	0,2063	0,0322	0,1124	0,0404
3	0,4541	0,0902	1,5887	0,3442	0,9613	0,2168	0,7609	0,1534
5	2,3636	0,6624	2,5060	0,9618	2,1306	0,7925	2,2887	0,7833
7	3,4621	1,2128	4,0501	1,3973	3,4797	1,2054	3,4270	1,1946
9	4,1029	1,5120	5,3148	1,6800	3,5280	1,3833	4,1995	1,6333
11	4,4342	1,7478	5,2621	1,8621	3,8157	1,5394	4,9435	1,7960
13	5,1580	1,8505	5,5576	1,8737	4,3141	1,5699	4,3414	1,6924
15	5,1325	1,7872	5,6073	1,8702	4,2854	1,5518	4,5391	1,6488

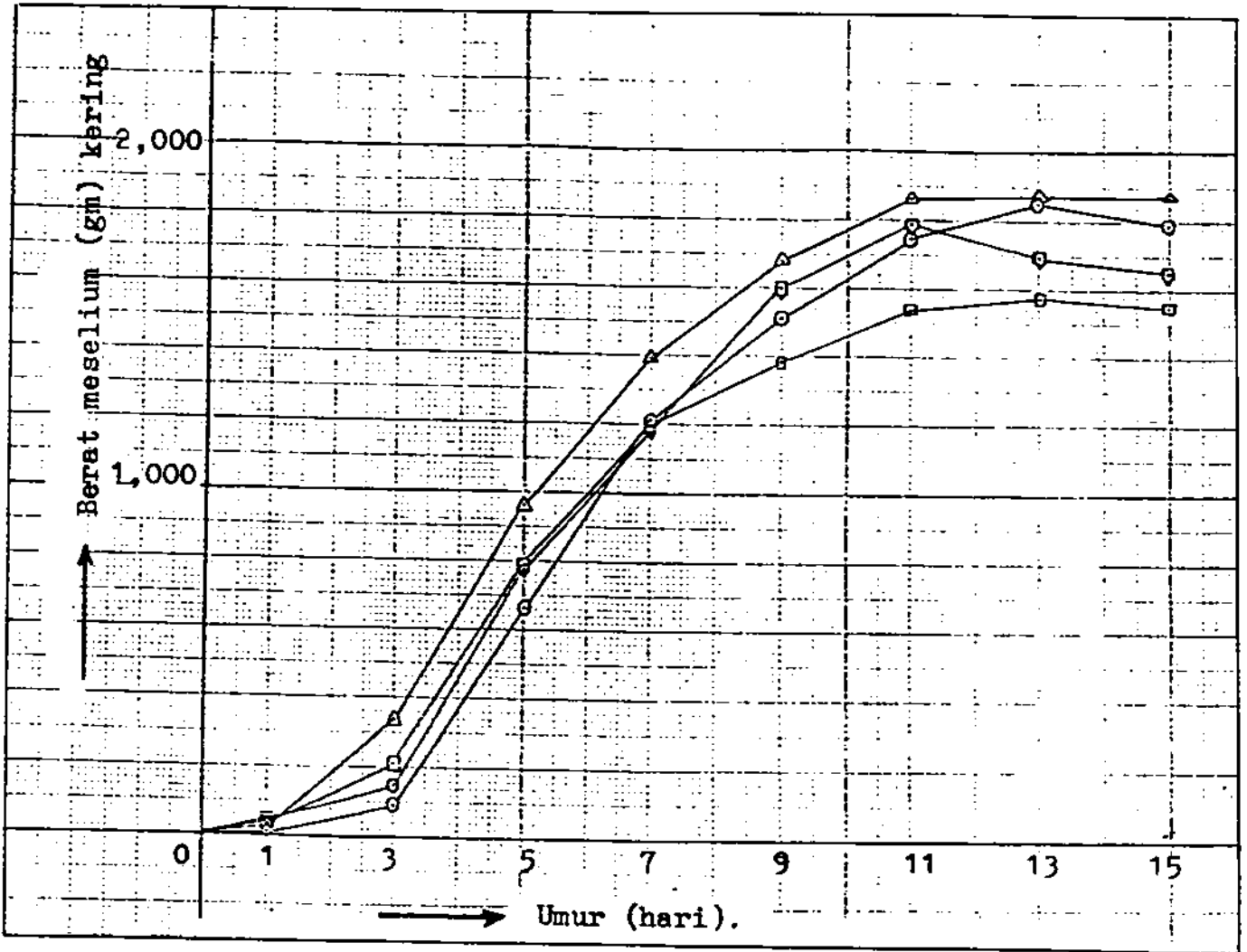
Berat miselia awal fermentasi = 0,0113 g basah atau $1,35 \cdot 10^{-4}$ g kering.

Hubungan antara lamanya fermentasi / umur dengan berat rata - rata miselia, menurut data dalam tabel 2, dapat dilihat pada gambar 6 dan 7.



Gambar 6. Kurva berat rata - rata miselia basah selama fermentasi.

- pH awal 2
- ▲—▲ pH awal 3
- ◻—◻ pH awal 4
- ◉—◉ pH awal 5



Gambar 7. Kurva berat rata - rata miselia kering selama fermentasi.

- pH awal 2
- △—△ pH awal 3
- pH awal 4
- ◇—◇ pH awal 5

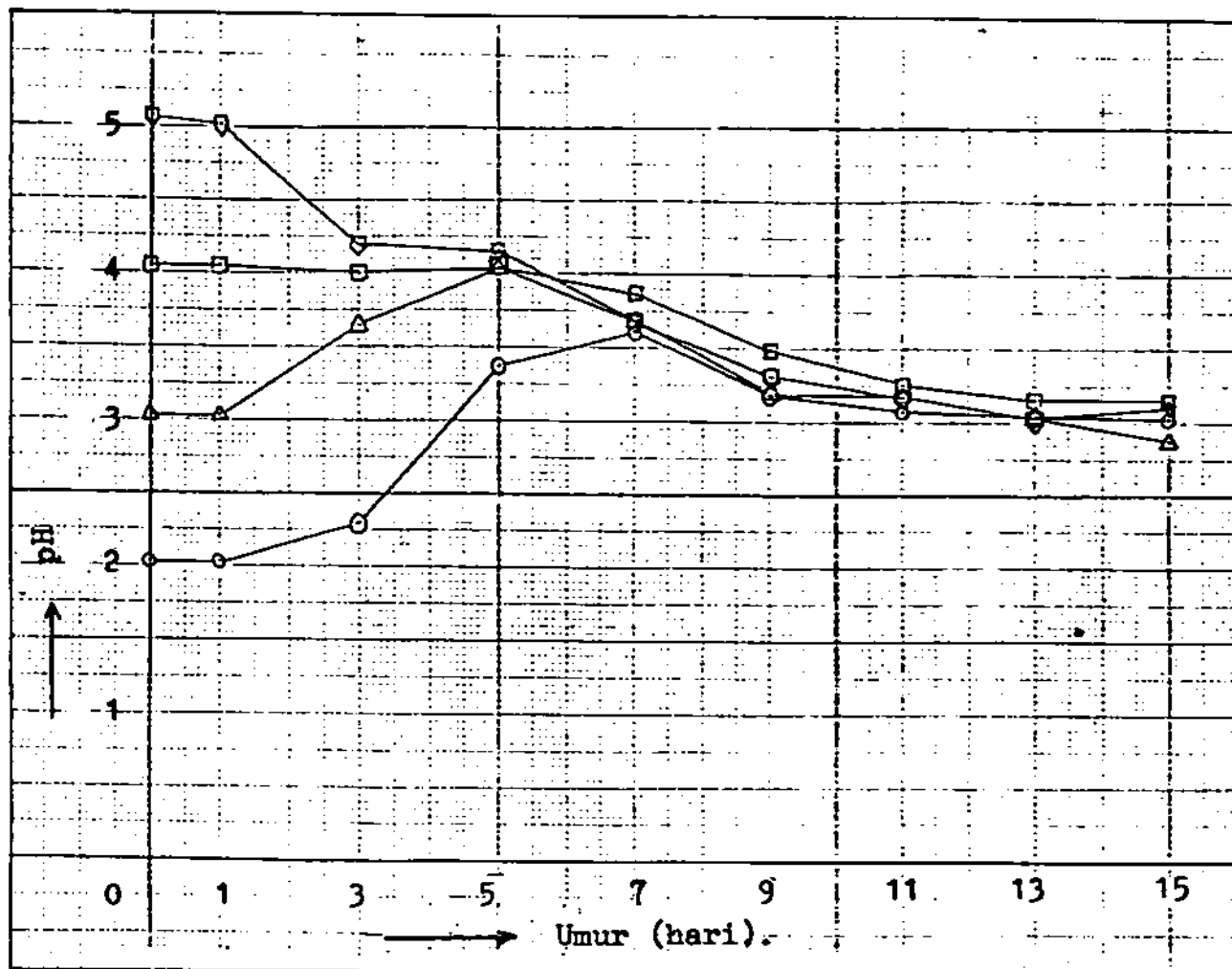
3. Perubahan pH selama fermentasi.

Selama fermentasi berlangsung, terjadi pula perubahan pH yang dapat dilihat dalam tabel berikut.

Tabel 3 : pH rata - rata dari 5 replikasi selama fermentasi.

Umur hari	pH rata - rata			
	pH awal 2	pH awal 3	pH awal 4	pH awal 5
0	2,03	3,04	4,05	5,08
1	2,03	3,04	4,05	5,01
3	2,30	3,65	4,00	4,20
5	3,38	4,03	4,01	4,14
7	3,60	3,69	3,86	3,66
9	3,19	3,20	3,49	3,32
11	3,07	3,16	3,25	3,18
13	3,03	3,02	3,15	3,05
15	3,02	2,88	3,15	3,12

Hubungan antara pH rata - rata dengan lamanya fermentasi / umur berdasarkan tabel 3, dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 8. Kurva pH rata - rata selama fermentasi

- pH awal 2
- △—△ pH awal 3
- pH awal 4
- ◇—◇ pH awal 5

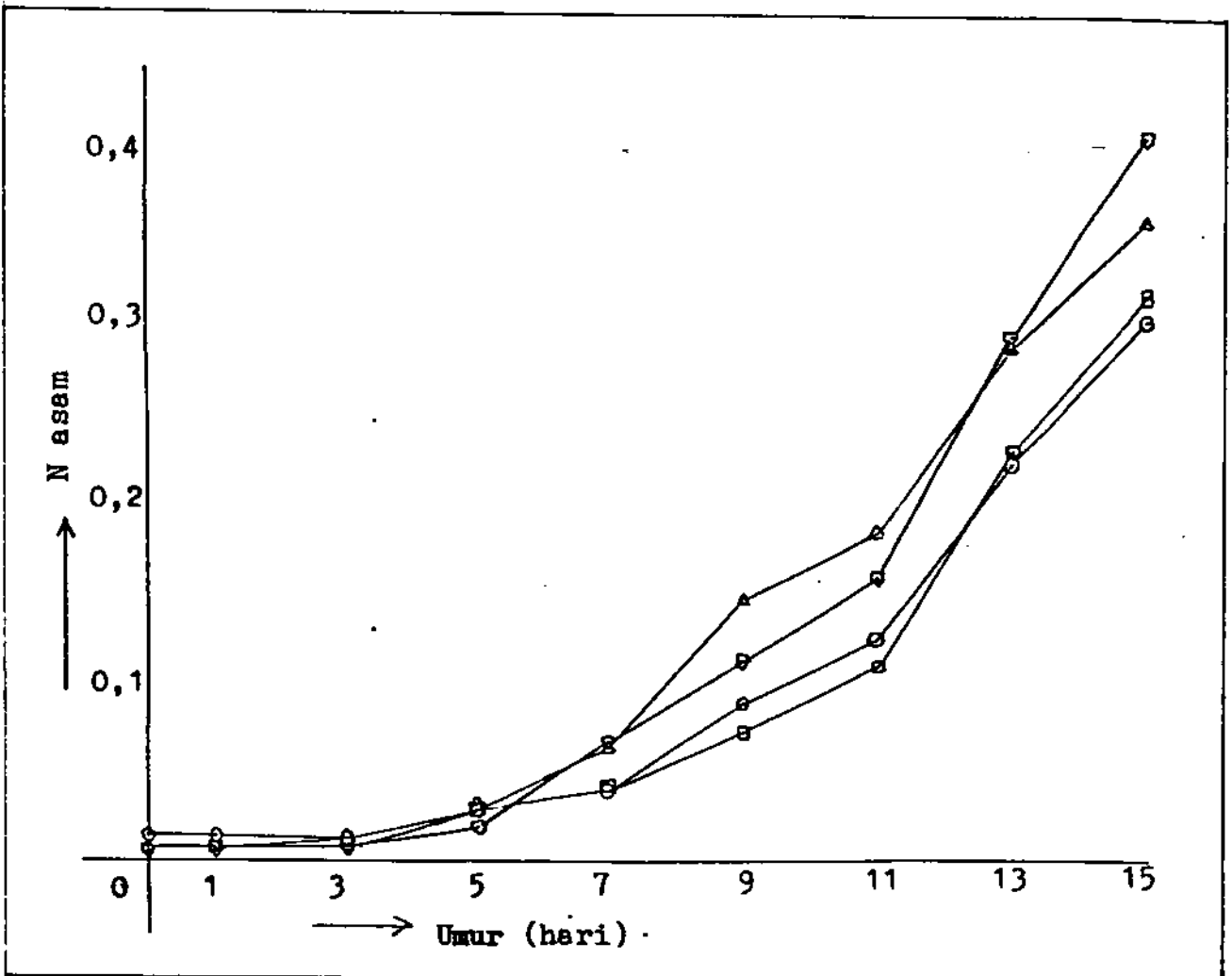
4. Perubahan normalitas asam.

Selama fermentasi berlangsung, normalitas asam dari media fermentasi juga mengalami perubahan. Perubahan normalitas asam yang terjadi ditabelkan dalam tabel 4.

Tabel 4 : Normalitas asam rata - rata dari 5 replikasi, selama fermentasi.

Umur' hari'	Normalitas asam			
	pH awal 2	pH awal 3	pH awal 4	pH awal 5
0	0,0147	0,0075	0,0064	0,0060
1	0,0149	0,0078	0,0069	0,0066
3	0,0131	0,0131	0,0104	0,0100
5	0,0286	0,0305	0,0326	0,0209
7	0,0396	0,0634	0,0429	0,0651
9	0,0885	0,1471	0,0720	0,1116
11	0,1240	0,1822	0,1089	0,1590
13	0,2201	0,2869	0,2283	0,2919
15	0,3009	0,3540	0,3135	0,4017

Hubungan antara normalitas asam rata - rata dengan lamanya fermentasi, menurut data dalam tabel 4, dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 9. Kurva normalitas asam rata - rata selama fermentasi.

○—○: pH awal 2 , ◻—◻ pH awal 4
 △—△: pH awal 3 , ◇—◇ pH awal 5

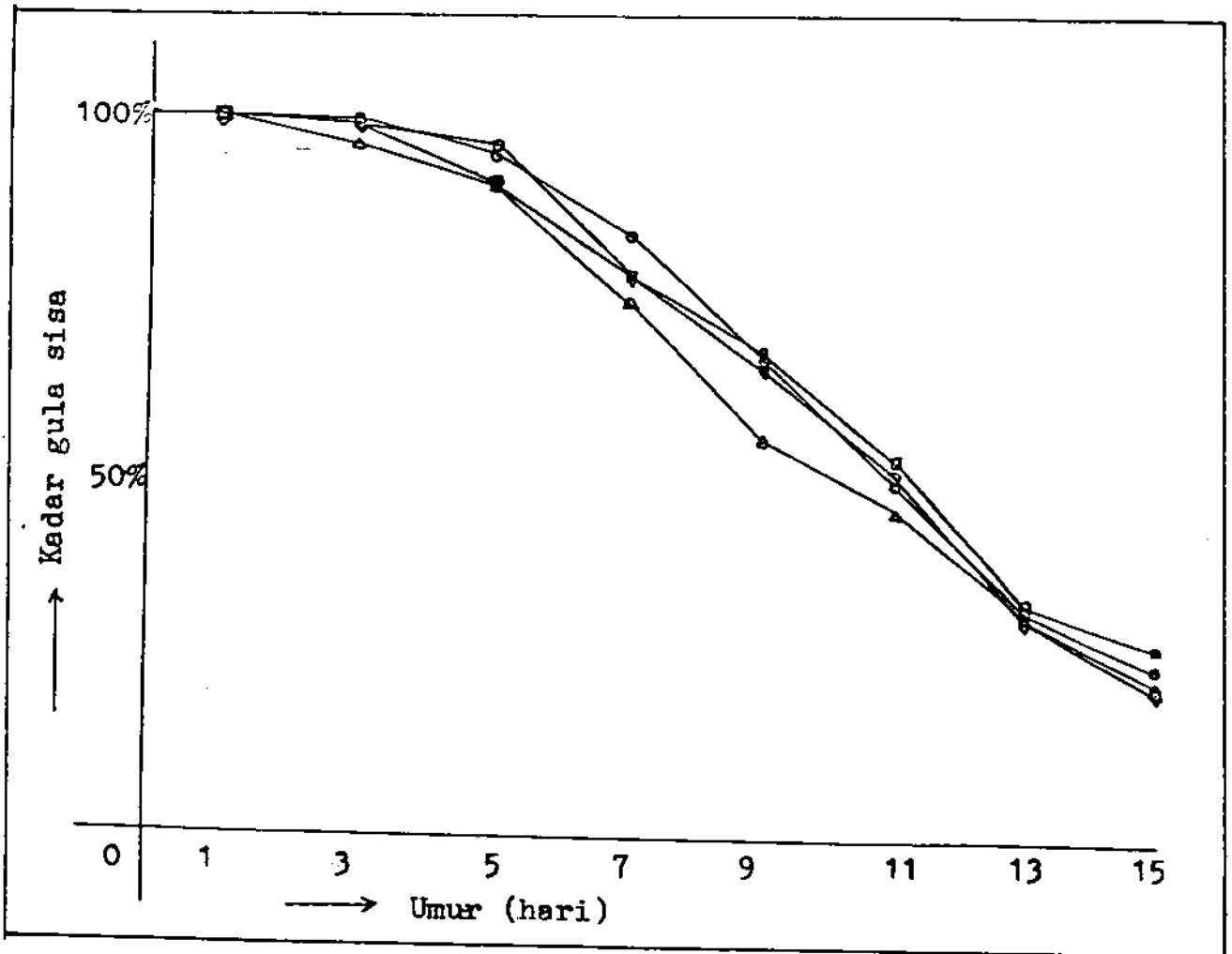
5. Perubahan gula sisa (residu gula) selama fermentasi.

Selama fermentasi/sampai percobaan selesai, masih menunjukkan adanya residu gula dalam semua media yang berarti tidak/belum menjadi metabolisme gula secara total. Dalam analisa kualitatif, memberikan reaksi yang positif terhadap: reaksi Molisch (terbentuk cincin coklat), reaksi Fehling (terbentuk endapan merah bata) dan reaksi Osazon (terbentuk kristal kekuningan). Dalam analisa kuantitatif, kadar gula sisa terhitung sebagai kadar total gula reduksi sisa rata-rata selama fermentasi dapat dilihat dalam tabel 5.

Tabel 5 : Kadar total gula reduksi sisa rata-rata dari 5 replikasi, selama fermentasi.

Umur'	Kadar total gula reduksi sisa(% berat)			
hari'	pH awal 2	pH awal 3	pH awal 4	pH awal 5
0	100	100	100	100
1	99,92	99,46	99,35	99,96
3	99,37	95,86	98,86	98,16
5	94,30	90,22	96,20	90,78
7	83,62	74,51	78,74	78,20
9	67,05	55,36	68,86	65,97
11	49,41	46,19	53,49	51,55
13	32,24	31,70	33,24	30,31
15	24,61	22,67	27,40	21,66

Hubungan antara kadar total gula reduksi sisa dengan lamanya fermentasi, menurut data dalam tabel 5 dapat dilihat pada gambar 10.



Gambar 10. Kurva kadar total gula reduksi sisa rata - rata selama fermentasi.

- pH awal 2
- △—△ pH awal 3
- pH awal 4
- ◇—◇ pH awal 5

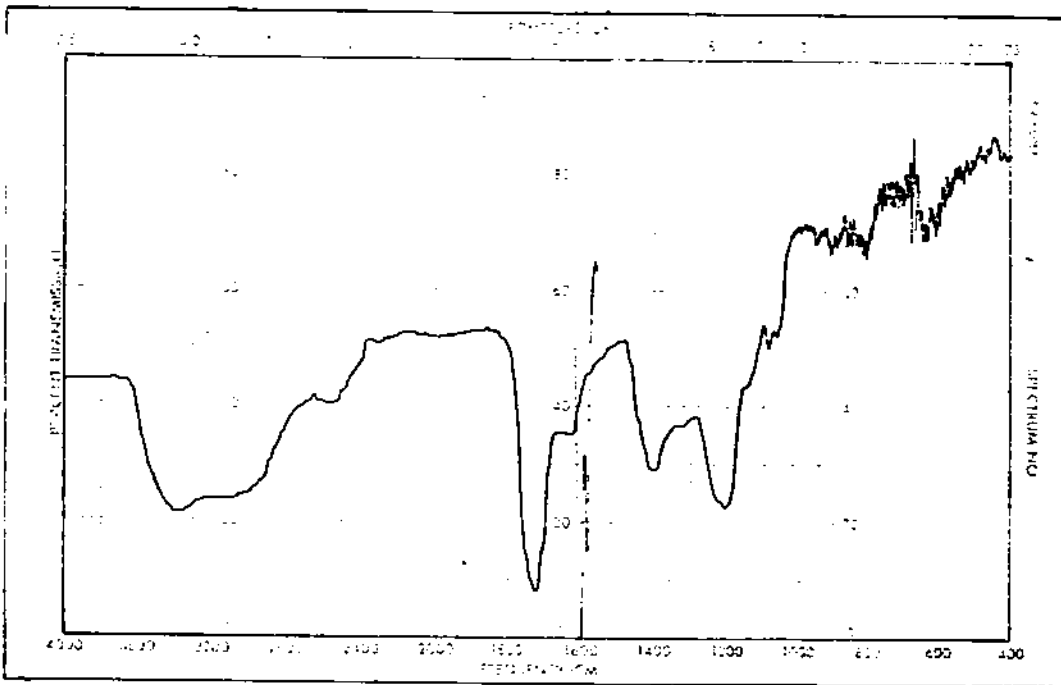
6. Asam sitrat hasil fermentasi.

6.1. Hasil uji kualitatif asam sitrat.

Dalam fermentasi kultur permukaan, galur Aspergillus niger yang diperoleh mampu menghasilkan asam sitrat. Sampai hari ke 5 dalam fermentasi, semua media dengan berbagai pH awal belum menunjukkan adanya asam sitrat. Pada hari ke 7, dalam semua media tersebut nampak adanya akumulasi sitrat. Adanya sitrat dapat ditunjukkan dengan uji kualitatif :

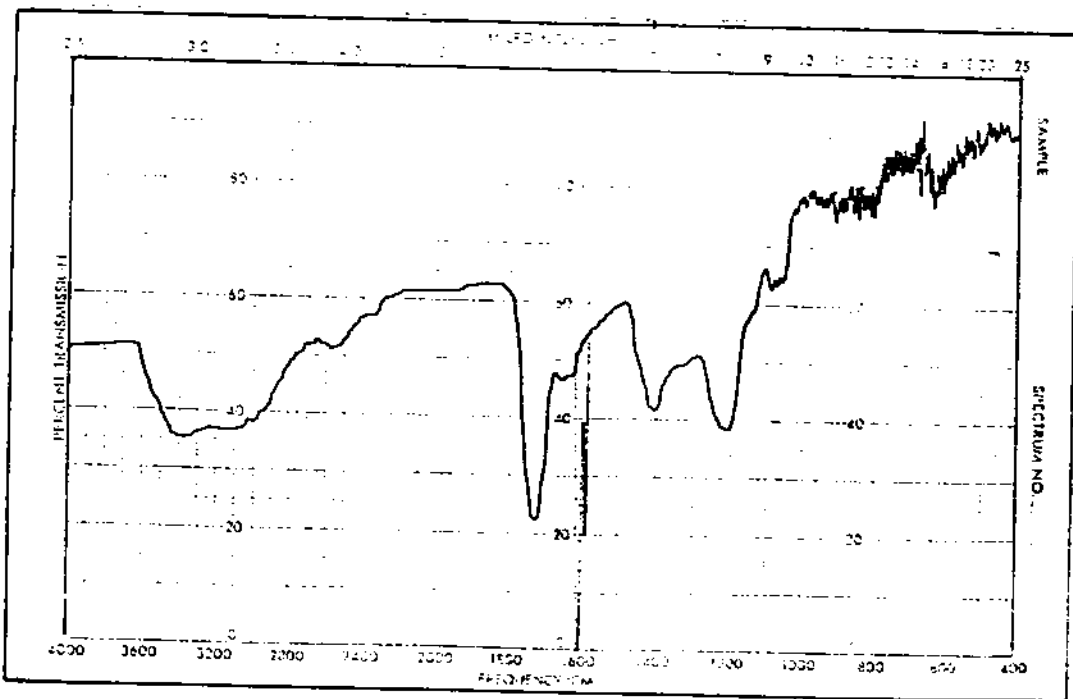
- (1). dalam suasana netral, dengan larutan CaCl_2 dan dididihkan terbentuk endapan granular putih, tidak larut dalam NaOH tetapi larut dalam asam asetat atau asam klorida,
- (2). dengan merkuri sulfat dan KMnO_4 membentuk endapan putih.
- (3). dengan adanya bromin dan KMnO_4 membentuk endapan putih.
- (4). hasil isolasi asam sitrat mempunyai titik lebur rata - rata $151 - 153^\circ\text{C}$ sesuai dengan pembandingan.
- (5). Hasil isolasi baik sebagai asam sitrat maupun kalsium sitrat mempunyai spektra merah infra yang identik dengan pembandingnya.

Hasil spektra merah infra asam sitrat maupun kalsium sitrat yang diisolasi dengan pembandingnya dapat dilihat dalam gambar 11, 12, 13 dan 14 .



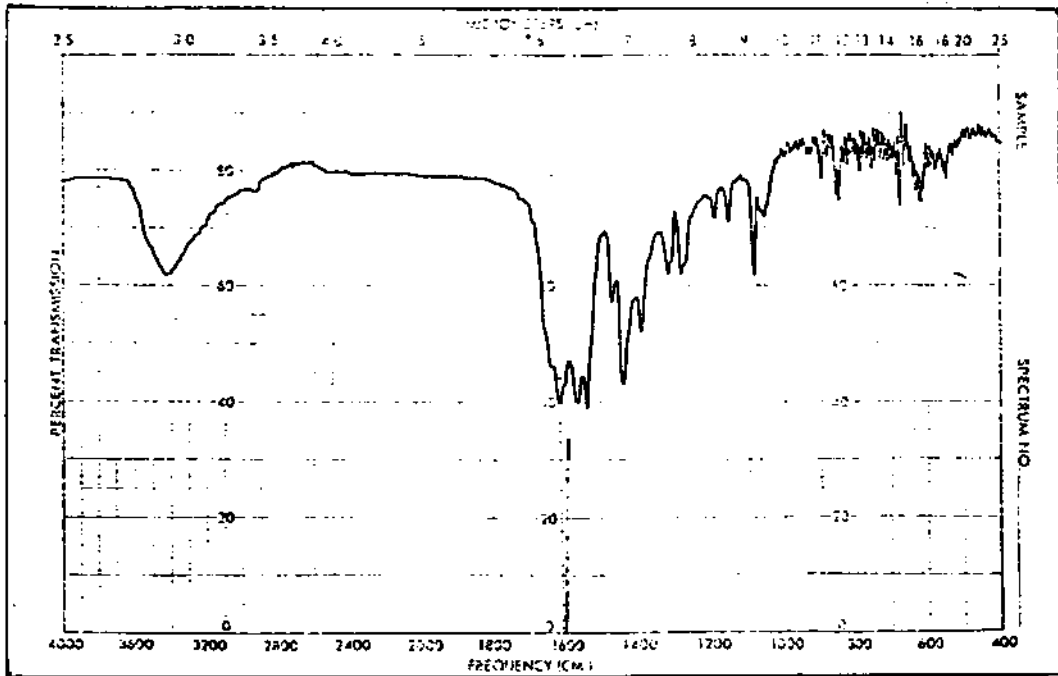
Gambar 11

Hasil spektra merah infra dari asam sitrat sampel/
hasil isolasi dalam tablet kalium bromida



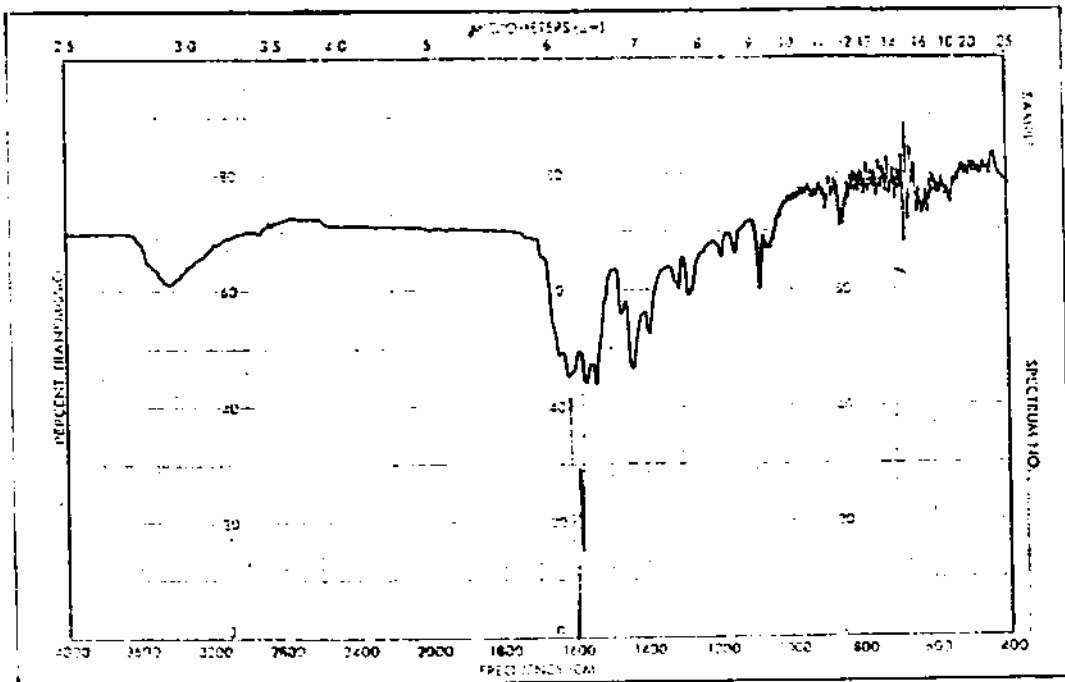
Gambar 12

Hasil spektra merah infra dari asam sitrat pembanding
dalam tablet kalium bromida



Gambar 13

Hasil spektra merah infra dari kalsium sitrat sampel/
hasil isolasi dalam tablet kalium bromida



Gambar 14

Hasil spektra merah infra dari kalsium sitrat pembeding
dalam tablet kalium bromida

6.2. Hasil - hasil penetapan kadar asam sitrat.

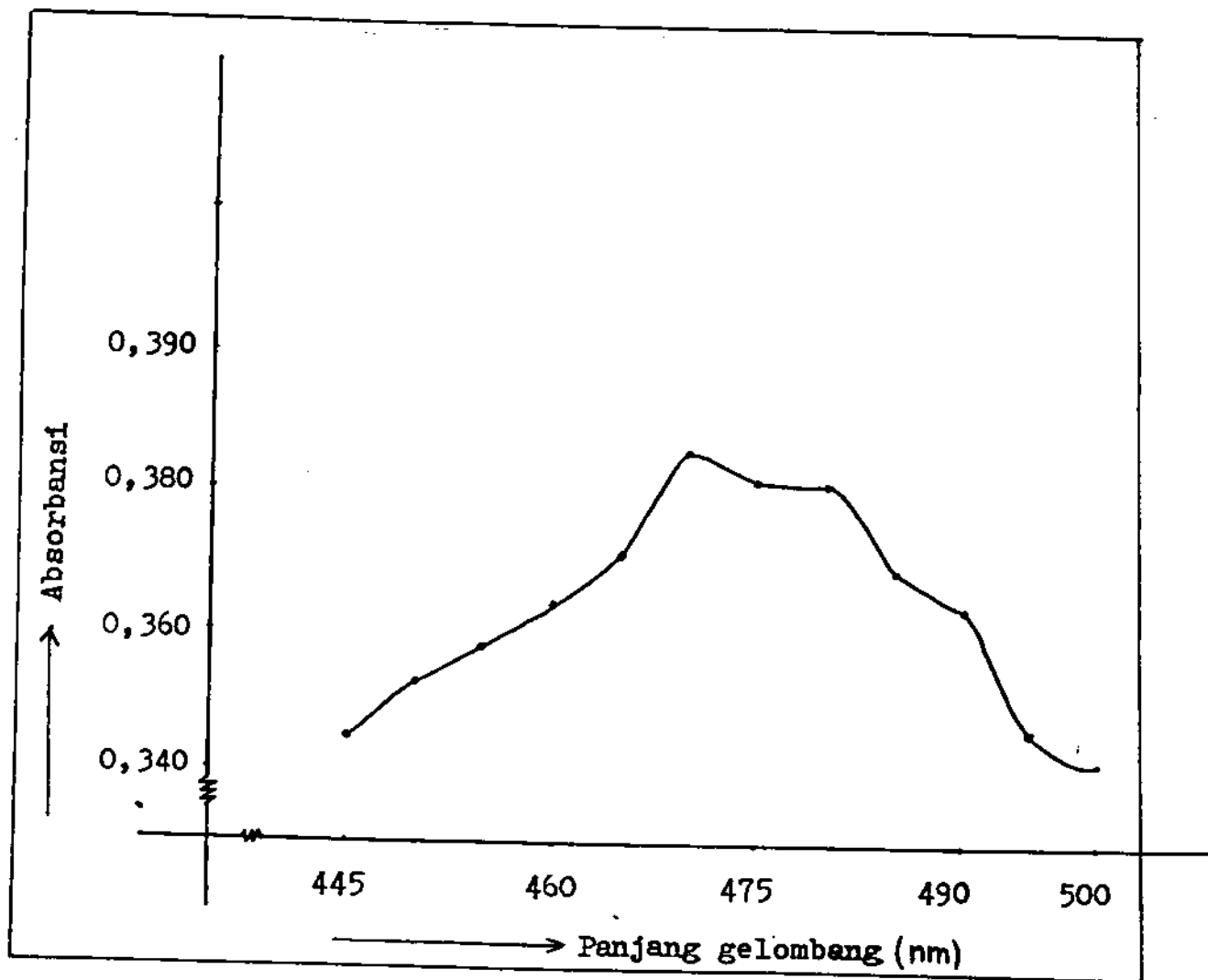
6.2.1. Pemilihan panjang gelombang maksimum.

Telah dilakukan percobaan dari larutan baku sitrat 0,1769 g/100 ml (atau dalam 2,0 ml fasa n heksana yang akan diamati mengandung 353,8 ug asam sitrat) diamati absorbansinya pada bermacam macam panjang gelombang. Hasilnya ditabelkan pada tabel 6 dan dibuat grafiknya pada gambar 10. Berdasarkan data tersebut, ternyata absorbansi terbesar/maksimum terjadi pada panjang gelombang 470. (*)

Untuk percobaan selanjutnya, digunakan pengamatan pada panjang gelombang maksimum 470 nm.

Tabel 6 : Hasil pengamatan absorbansi baku sitrat pada berbagai panjang gelombang

Panjang gelombang (nm)	Transmitansi	Absorbansi.
445	45,2	0,345
450	44,4	0,353
455	43,9	0,358
460	43,3	0,364
465	42,6	0,371
470	41,1	0,386 (*)
475	41,5	0,382
480	41,5	0,382
485	42,8	0,369
490	43,3	0,364
495	45,1	0,346
500	45,5	0,342



Gambar 15 : Kurva absorpsi baku sitrat

6.2.2. Pembuatan kurva baku.

Hasil - hasil pengamatan absorbansi dari berbagai macam kadar asam sitrat pada panjang gelombang 470 nm ditabelkan pada tabel 7.

Tabel 7 : Pengamatan absorbansi dari berbagai macam kadar asam sitrat pada panjang gelombang 470 nm.

No.	Asam sitrat			Absorbansi
	Dalam 100,0 ml larutan (gm)	Dalam 50,0 ml fasa n heksana (mg)	Dalam 2,0 ml fasa n heksana (μ g)	
1.	0,1189	5,945	237,8	0,276
2.	0,1523	7,615	304,6	0,314
3.	0,2132	10,660	426,4	0,418
4.	0,2741	13,705	548,2	0,565
5.	0,3050	15,250	610,0	0,620
6.	0,4260	21,300	852,0	0,868

Berdasarkan data tersebut, dibuktikan adanya korelasi linier antara kadar dan absorbansi serta penentuan persamaan garis regresinya. Hasil perhitungannya dapat dilihat dalam tabel 8.

Harga r_{xy} dari tabel untuk derajat bebas $DB = 6 - 2 = 4$ dan derajat kepercayaan $p = 0,05$ adalah 0,811 hingga : $r_{xy} > r_{xy}$ tabel.

(lampiran 7)

Tabel 8 : Hasil perhitungan adanya korelasi linier antara kadar dan absorbansi serta persamaan garis regresinya.

Kadar sitrat (μg) (X)	Absorbansi (Y)
237,8	0,276
304,6	0,314
426,4	0,418
548,2	0,565
610,0	0,620
852,0	0,868
$n = 6$	
$\sum x = 2979$	$\sum Y = 3,061$
$\bar{x} = 496,5$	$\bar{Y} = 0,510$
$\sum x^2 = 1729674,2$	$\sum Y^2 = 1,8065$
$\sum xY = 1766,9814$	
$A = 0,0204$	
$B = 9,8641 \cdot 10^{-4}$	
$r = 0,9978$	
$Y = 0,0204 + 9,8641 \cdot 10^{-4} x$	

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

maka dapat disimpulkan adanya korelasi antara variabel x dan y yang linier, dengan koefisien determinasi $r_{xy}^2 = 0,9956$.

Dengan adanya korelasi yang linier, ditentukan persamaan garis regresi sbb :

$$y = 0,0204 + 9,8641 \cdot 10^{-4} x$$

6.2.3. Pembuatan kalibrasi/uji perolehan kembali asam sitrat.

Didalam media yang ditambahkan sejumlah tertentu asam sitrat, ditentukan perolehan kembali asam sitratnya dapat dilihat dalam tabel 9.

Tabel 9 : Perolehan kembali asam sitrat dalam media fermentasi.

No.	Asam sitrat				
	Dalam 100,0 ml media (g)	Dalam 2,0 ml 'n heksana (µg).	Absorbansi	Percobaan kembali (µg) %	
1.	0,1731	346,2	0,368	352,4	101,18
2.	0,1827	365,4	0,381	365,6	100,05
3.	0,1865	373,0	0,407	391,9	105,07
4.	0,3108	621,6	0,627	614,9	98,92
5.	0,4039	807,8	0,790	780,2	96,58
6.	0,4251	850,2	0,848	839,0	98,68

Rata - rata perolehan kembali asam sitrat = 100,08 % dengan penyimpangan baku = 2,8867 %, dengan demikian metode spektrofotometri ini dapat digunakan untuk penentuan kadar sitrat dalam media fermentasi.

6.2.4. Penentuan kadar asam sitrat dalam contoh/sampel

Kadar asam sitrat yang dihasilkan selama fermentasi dapat dilihat dalam tabel 10.

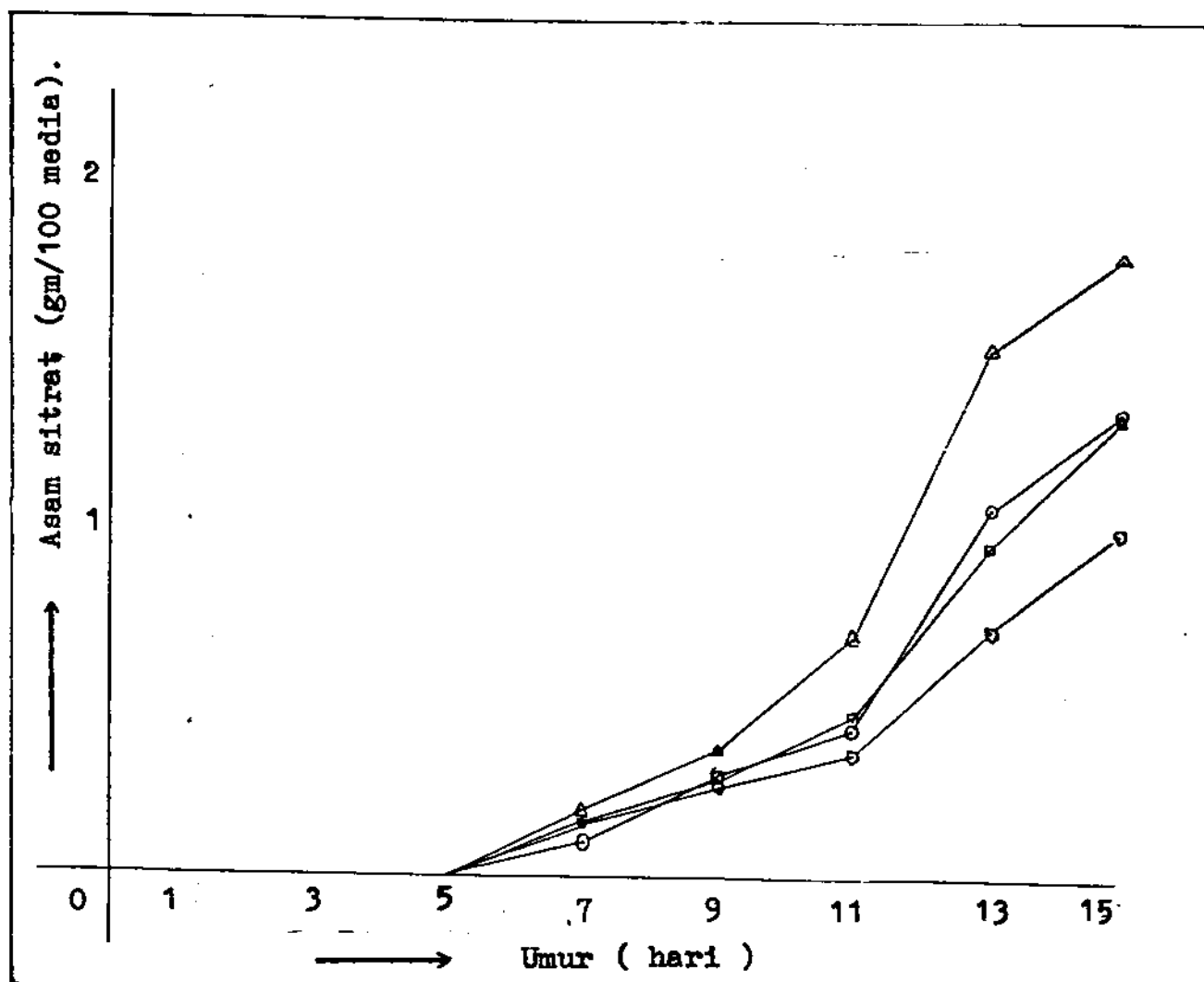
Tabel 10 : Kadar asam sitrat rata-rata (g/100 ml media) dari 5 replikasi selama fermentasi.

Umur (hari)	Kadar asam sitrat (gm/100 ml media)			
	pH awal 2	pH awal 3	pH awal 4	pH awal 5
0-5	0	0	0	0
7	0,0999	0,1882	0,1687	0,1561
9	0,2864	0,3596	0,2906	0,2623
11	0,4201	0,6843	0,4549	0,3585
13	1,0589	1,5000	0,9447	0,7091
15	1,3302	1,7725	1,3202	0,9933

Hubungan antara lamanya fermentasi/umur dengan kadar asam sitrat rata - rata dapat dilihat pada gambar 16

6.2.5. Analisa varian.

Dari keseluruhan hasil penentuan kadar asam



Gambar 16 : Kurva kadar asam sitrat rata - rata selama fermentasi.

- pH awal media 2
- △—△ pH awal media 3
- pH awal media 4
- ◇—◇ pH awal media 5

sitrat yang diperoleh, disusun menurut analisa varian model "Factorial in a Randomized Complete Block Design". Analisa varian kadar sitrat dalam berbagai pH awal media dan umur/lamanya fermentasi dapat dilihat dalam tabel 11. Rancangan dan rumus-rumus perhitungannya dapat dilihat dalam lampiran 8 s.d. 11.

lanjutan :

	0,1747	0,2896	0,4858	0,9521	1,5239	
	0,1716	0,2845	0,4796	0,9076	1,2051	
3. pH = 4	0,1701	0,3094	0,4696	0,9916	1,2345	
	0,1645	0,2683	0,4073	0,9207	1,3690	
	0,1625	0,3011	0,4321	0,9516	1,2685	
Σx	0,8434	1,4529	2,2744	4,7236	6,6010	15,8953
\bar{x}	0,1687	0,2906	0,4549	0,9447	1,3202	
SD	0,0051	0,0158	0,0338	0,0326	0,1296	
SE	0,0045	0,0141	0,0302	0,0292	0,1159	
	0,1610	0,2683	0,3576	0,7126	0,9294	
	0,1549	0,2518	0,3552	0,7286	0,8621	
4. pH = 5	0,1508	0,2739	0,3418	0,7090	1,0456	
	0,1544	0,2547	0,3696	0,6965	1,1327	
	0,1595	0,2629	0,3684	0,6989	0,9965	
Σx	0,7806	1,3116	1,7926	3,5456	4,9663	12,3967
\bar{x}	0,1561	0,2623	0,3585	0,7091	0,9933	
SD	0,0041	0,0092	0,0113	0,0128	0,1043	
SE	0,0037	0,0082	0,0101	0,0114	0,0932	
Total	3,0642	5,7575	9,5889	21,0639	27,0811	66,5556
Rata-2	0,1532	0,2879	0,4794	1,0532	1,3541	

Sel	:	a_1b_1	a_1b_2	a_1b_3	a_1b_4	a_1b_5
Total	:	0,4994	1,1948	2,1005	5,2947	6,6511
Rata-rata	:	0,0999	0,2864	0,4201	1,0589	1,3302
Sel	:	a_2b_1	a_2b_2	a_2b_3	a_2b_4	a_2b_5
Total	:	0,9408	1,7982	3,4214	7,5000	8,8627
Rata-rata	:	0,1882	0,3596	0,6843	1,5000	1,7725
Sel	:	a_3b_1	a_3b_2	a_3b_3	a_3b_4	a_3b_5
Total	:	0,8434	1,4529	2,2744	4,7236	6,6010
Rata-rata	:	0,1687	0,2906	0,4549	0,9447	1,3202
Sel	:	a_4b_1	a_4b_2	a_4b_3	a_4b_4	a_4b_5
Total	:	0,7806	1,3116	1,7926	3,5456	4,9663
Rata-rata	:	0,1561	0,2623	0,3585	0,7091	0,9933

$$\text{Korelasi} = K = C = \frac{(66,5556)^2}{100} = 44,2965$$

$$\begin{aligned} \text{JK}_{\text{total}} &= (0,1002)^2 + (0,1078)^2 + \dots + (0,9965)^2 \\ &\quad - 44,2965 = 69,3182 - 44,2965 \\ &= 25,0217 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK}_{\text{perlakuan}} &= \frac{(0,4994)^2 + (1,1948)^2 + \dots + (4,9663)^2}{5} \\ &\quad - 44,2965 \\ &= 69,1283 - 44,2965 \\ &= 24,8318 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK}_A &= \frac{(15,7405)^2 + (22,5231)^2 + (15,8953)^2 + (12,3967)^2}{25} \\ &\quad - 44,2965 = 46,4557 - 44,2965 \\ &= 2,1592 \end{aligned}$$

$$JK_B = \frac{(3,0642)^2 + (5,7575)^2 + \dots + (27,0911)^2}{20} = 44,2965 = 21,2814$$

$$JK_{AB} = 24,8318 - 2,1592 - 21,2814 = 1,3912$$

$$JK_{\text{residual}} = 25,0217 - 24,8318 = 0,1899$$

Dari perhitungan pada tabel 11, disusunlah tabel 12 sebagai tabel perhitungan Anova.

Tabel 12. : Tabel perhitungan Anova

Sumber variasi	DB	JK	RJK	F _{hitung}	F _{tabel}
1. A	3	2,1592	0,7197	303,1848	2,76
2. B	4	21,2814	5,3204	2241,3009	2,53
3. AB	12	1,3912	0,1159	48,8247	1,92
4. Perlakuan	(19)	(24,8318)			
5. Residual	80	0,1899	2,3738.10 ⁻³		
Total	99	25,0217			

Dari tabel 12, dapat dinyatakan bahwa :

1. Faktor pH awal media menunjukkan adanya perbedaan kadar sitrat yang bermakna. ($F_{\text{hitung}}^A > F_{\text{tabel}}$).
2. Faktor umur/lama fermentasi, menunjukkan adanya perbedaan kadar sitrat yang bermakna ($F_{\text{hitung}}^B > F_{\text{tabel}}$).
3. Interaksi antara umur/lama fermentasi dengan pH awal media memberikan pengaruh adanya perbedaan kadar sitrat yang bermakna. ($F_{\text{hitung}}^{AB} > F_{\text{tabel}}$).

Dengan adanya perbedaan kadar sitrat yang bermakna antar umur, antar pH awal media dan interaksi umur - pH awal media, maka uji H_0 dilanjutkan dengan HSD test, untuk mendapatkan hubungan antar masing - masing faktor.

Uji HSD (Tukey's HSD)

$$HSD = q_{\alpha, k, N-k} \cdot \sqrt{\frac{MSE}{n}}$$

$$\alpha = 0,05$$

$$k = 20$$

$$N = 100$$

$$N - k = 80$$

$$MSE = 2,3738 \cdot 10^{-3}$$

$$q = 5,19 \text{ (dari tabel)}$$

$$n = 5$$

$$HSD = 5,19 \sqrt{\frac{2,3738 \cdot 10^{-3}}{5}} = 0,1131$$

Bila selisih dari dua harga rata - rata kadar sitrat (sampel) lebih besar atau sama dengan 0,1131 gm berarti ada perbedaan yang bermakna. Untuk mengetahui kaitan antara masing - masing sampel, disusun harga rata - rata sampel dari harga terkecil hingga terbesar dan beda dua harga rata - ratanya, ditabelkan tabel 13.

Tabel 13. Harga rata - rata kadar sitrat (sampel) dari harga terkecil hingga terbesar dan beda dua harga rata - ratanya.

\bar{x}_1	\bar{x}_2	\bar{x}_3	\bar{x}_4	\bar{x}_5	\bar{x}_6	\bar{x}_7	\bar{x}_8	\bar{x}_9	\bar{x}_{10}
-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	----------------

MILIK
 PERPUSTAKAAN
 "UNIVERSITAS AIRLANGGA"
 SURABAYA

BAB V

P E M B A H A S A N

Telah dilakukan isolasi jamur jenis Aspergillus niger dari udara dalam laboratorium Analisis Farmasi Unair (1985), dengan karakter mempunyai hifa bersekat dengan konidiofora yang panjang, bagian ujungnya membulat sebagai vesikel yang ditumbuhi sterigmata biserial. Diatas sterigmata terdapat konidia 7 - 10 um dan berwarna gelap.

Jamur Aspergillus niger, hasil isolasi, setelah di fermentasikan dalam kultur permukaan menunjukkan adanya kemampuan menghasilkan asam sitrat, dalam berbagai media pH 2 sampai 5. Dalam media dengan pH = 1, tidak menunjukkan adanya pertumbuhan.

Sampai umur 5 hari, belum nampak adanya sitrat dalam media; tetapi pada umur 7 hari, akumulasi sitrat terjadi dalam media dan bertambah terus dari waktu ke waktu selama percobaan dilakukan, pada pH awal 2,3,4 dan 5. Peningkatan jumlah sitrat cukup menanjak pada umur 13 hari / pada daerah pertumbuhan stasioner.

Belum terakumulasinya sitrat, kemungkinan disebabkan oleh karena masih diperlukannya asam sitrat dalam siklus Kreb yang berkaitan dengan jalur - jalur lain untuk menghasilkan metabolit primer dan sekunder yang diperlukan untuk pertumbuhan dan kelangsungan hidup Aspergillus. Manitto menjelaskan bahwa dalam siklus asam trikarboksilat melibatkan berbagai macam asam, dan dari berbagai asam ini digunakan oleh sel - sel untuk menghasilkan berbagai metabolit primer dan sekunder (Manitto, 1981).

Menurut Martin dan Demain, belum/tidak terakumulasinya suatu intermediat karena adanya metabolisme primer yang dipertahankan keseimbangannya, untuk pertumbuhan. (Martin dan Demain, 1975).

Bu'lock juga memberikan gambaran kemungkinan jalur-jalur katabolisme gula dalam jamur dan beberapa metabolitnya (lihat lampiran 12) (Bu'lock 1975).

Terjadinya peningkatan/pertambahan jumlah sitrat yang cukup menanjak pada daerah pertumbuhan stasioner, sesuai teori yang ditulis Smith, bahwa : "jika pertumbuhan vegetatif menjadi terhenti (pada daerah stasioner), metabolit - metabolit sekunder yang digunakan dalam industri sering meningkat" (Smith, 1975).

Bila dikaji dari perubahan pH selama fermentasi, nampak terjadinya penurunan pH dari waktu - ke waktu dalam media dengan pH awal 5 dan 4, tetapi terjadi peningkatan lebih dahulu untuk media pH awal 3 sampai hari ke 5 dan pH awal 2 sampai hari ke 7, barulah terjadi penurunan pH pada hari berikutnya.

Tetapi bila diperhatikan normalitas asamnya, maka menunjukkan terjadinya peningkatan normalitas asam pada semua media dari waktu - ke waktu selama fermentasi.

Pateman dan Kinghorn menjelaskan adanya suatu jalur penting dalam jamur, yaitu reduksi nitrat melalui nitrit dan hidroksilamin menjadi amonia dalam rangkaian tahap reaksi yang melibatkan pemindahan elektron (Pateman &

Kinghorn, 1975). Ternyata disamping adanya pengaruh pH terhadap jamur, juga terdapat pengaruh jamur (hasil metabolitnya) terhadap lingkungan media.

Adanya perubahan pH dan N asam , disebabkan oleh ada - nya 4 proses metabolit yang berperan yakni :

- (1) pemanfaatan/pelepasan kation,
- (2) pemanfaatan/pelepasan anion,
- (3) adanya pembentukan dan pelepasan asam, dan
- (4) adanya pembentukan serta pelepasan basa, terutama NH_4OH (Lilly dan Bernett, 1951; Berry, 1975).

Konsumsi gula dari waktu ke waktu selama fermentasi tetap berlangsung, tampak dalam hasil bahwa residu gula (kadar total gula reduksi sisa) semakin kecil. Dikaitkan dengan terbentuk / terlepasnya sitrat dalam media, sampai hari ke lima, konsumsi gula dalam media dengan berbagai pH awal belum mencapai 10 %, ternyata sitrat belum terakumulasi dalam media.

Baru pada umur 7 hari, penggunaan gula lebih dari 16 % telah menunjukkan adanya akumulasi sitrat dalam media. Sampai akhir percobaan ternyata masih terdapat residu gula diatas 21 %, berarti belum sempurna jamur mengkonsumsi gula. Dalam media dengan pH awal = 3, setelah percobaan fermentasi selesai diperoleh kadar sitrat terba - nyak, mencapai 1,7725 g/100 ml media.

Hasil ini lebih rendah bila dibandingkan dengan yang di peroleh Doelger dan Prescott pada suhu kamar 28°C (3,84 g/100 ml media).

Tetapi masih lebih tinggi dari percobaan Suwarno 1980 yang menggunakan molases dengan kadar gula sama (1,2 gm sitrat dalam 500 ml media).

Kadar sitrat terbesar yang diperoleh dalam media pada pH awal = 3, bila diperhitungkan terhadap normalitas asam dalam media, hasilnya sebesar = 71,51%, berarti lebih besar dari hasil yang diperoleh Tristiani dan Hadioetomo (1987) dengan 4 macam galur Aspergillus niger yang diisolasinya (61,8 - 69,3 %) dan lebih rendah dari satu galur hasil isolasi A.niger yang tumbuh dalam buah anggur (79,5 %) yang diperolehnya.

Perbedaan hasil ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan nutrien, faktor lingkungan, belum sempurnanya fermentasi dan galur Aspergillus niger yang berbeda.

Dari hasil sitrat dalam berbagai media dengan pH awal yang berbeda, dalam analisis varian menunjukkan adanya perbedaan kadar sitrat yang bermakna antar umur, antar pH media dan interaksi umur - pH media.

Hal ini menunjukkan adanya pengaruh pH - media terhadap jumlah asam sitrat yang dihasilkan. Demikian pula terdapat pengaruh umur/lama fermentasi serta interaksi umur - pH media. Dengan uji HSD ($\alpha = 0,05$) diperoleh perbedaan yang bermakna apabila selisih dua harga rata-rata kadar sitrat sampel = 0,1131 gm.

Bila diperhatikan sejak terakumulasinya sitrat, dari waktu ke waktu selama fermentasi maka kadar sitrat da-

lam media dengan pH awal = 3 terdapat perbedaan yang bermakna dengan kadar sitrat dalam media lainnya, dan kadarnya pun paling tinggi dibanding lainnya.

Dalam kultur permukaan yang telah dilakukan, produksi sitrat optimum diperoleh dalam media dengan pH awal = 3. Kadar sitrat rata - rata terbesar = 1,7725 g/100 ml media, bila diperhitungkan terhadap banyaknya gula awal, = 12,66 %, bila diperhitungkan dari gula yang dikonsumsi = 16,35 % dan bila diperhitungkan terhadap kadar total asamnya = 71,51 %.

Kadar sitrat rata - rata terkecil pada akhir percobaan fermentasi terjadi dalam media dengan pH awal = 5, yakni = 0,9933 g/100 ml media atau 7,095% terhadap kadar gula awal atau 9,06 % terhadap gula yang dikonsumsi dan 35,31 % terhadap kadar total asamnya.

Selanjutnya untuk pH awal 2 dan 4 dapat dilihat dalam lampiran 13.

Pada pH awal = 3, selain kadar sitratnya terbesar, juga didapatkan kadar total asam selain sitrat dalam jumlah terkecil, sedangkan pada pH awal 5 diperoleh kadar sitrat terendah dengan kadar total asam lainnya terbesar. Pada pH awal 2 dan 4 tidak terdapat perbedaan yang bermakna dari kadar sitrat yang dihasilkan tetapi bila dilihat kadar total asam selain sitrat, pada pH awal 4 tampak lebih besar dari pH awal 2.

Berdasarkan fakta tersebut diatas dapat disimpulkan bahwa pH awal media benar - benar berpengaruh terhadap pembentukan sitrat oleh Aspergillus niger dalam kultur permukaan, media Czapek yang dimodifikasi .

BAB VI

K E S I M P U L A N

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan, bahwa :

1. Aspergillus niger hasil isolasi dari udara dalam labora-
torium Analisis Farmasi UNAIR (1985) mampu tumbuh dan
memproduksi asam sitrat dalam media Czapek yang dimodi-
fikasi pada pH awal 2, 3, 4 dan 5 , tetapi tidak tumbuh
dalam media dengan pH awal 1 .
2. Dari waktu ke waktu selama fermentasi terjadi pertumbuh-
an dalam media dengan berbagai pH awal (kecuali pH 1),
terjadi kenaikan normalitas asam, penurunan kadar gula
reduksi sisa dan terjadi peningkatan hasil sitrat .
3. Terdapat perbedaan yang bermakna dari kadar sitrat yang
dihasilkan dalam media Czapek yang dimodifikasi dengan
berbagai pH awal media .
4. pH media mempengaruhi hasil produksi asam sitrat, demi-
kian pula lamanya fermentasi dan interaksi pH media -
lama fermentasi berpengaruh terhadap hasil sitrat .
5. Kadar sitrat tertinggi = 1,7725 g/ 100 ml media atau
71,51% terhadap total asam diperoleh dalam media dengan
pH awal 3 ; sedangkan kadar sitrat terendah 0,9933 g /
100 ml media atau 35,31% terhadap total asam diperoleh
dalam media dengan pH awal 5 .

BAB VII

SARAN - SARAN

Adanya kenyataan bahwa pH media, umur/lama fermentasi dan interaksi keduanya berpengaruh terhadap hasil produksi sitrat, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut umur/lama fermentasi yang cocok untuk menghasilkan sitrat yang optimal.

Mengingat kadar sitrat yang dihasilkan oleh Aspergillus niger hasil isolasi yang diperhitungkan terhadap normalitas total asam dalam media lebih besar dari hasil yang diperoleh Tristiani dan Hadioetomo dengan 4 macam galur Aspergillus niger yang digunakan, tetapi lebih kecil dari hasil yang diperoleh Doelger dan Prescott maka perlu dicari media serta proses fermentasi yang cocok untuk mendapatkan kadar sitrat yang optimal.

Adanya metabolit - metabolit lain yang dihasilkan oleh A. niger baik yang dilepaskan dalam media maupun yang berada dalam miselia cukup menarik untuk diteliti lebih lanjut untuk dapat dimanfaatkan bagi kepentingan manusia.

BAB VIII

RINGKASAN

Jamur banyak dijumpai di alam, berperan penting dalam kehidupan. Jamur dapat menghasilkan metabolit yang penting untuk keperluan manusia. Salah satu jenis jamur adalah A. niger dengan salah satu metabolitnya asam sitrat.

Asam sitrat yang dihasilkan dipengaruhi oleh faktor genotipe dan lingkungan.

Dari berbagai jenis Aspergillus niger, ada yang mampu menghasilkan sitrat ada yang tidak. Demikian pula faktor lingkungan seperti pH media, ada yang menyebutkan pH awal yang optimum untuk produksi sitrat : 2,2 - 4,2 (Shu dan Johnson), Steffen menggunakan 2,5 - 4,0 , Doelger & Presscoot pH 1,6 - 2,2 dan Curie berhasil menggunakan pH 3.4 - 3.5.

Mengingat hal tersebut, dilakukan penelitian mampu tidaknya jamur Aspergillus niger yang diisolasi dari udara dalam laboratorium Analisis Farmasi Unair (1985) untuk tumbuh dan memproduksi sitrat dalam media Czapek yang dimodifikasi dengan berbagai pH awal, serta ada-tidaknya pengaruh pH terhadap produksi sitrat .

Dari hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa galur A. niger hasil isolasi, mampu memproduksi sitrat. Demikian pula, pH media juga mempengaruhi kadar sitrat yang dihasilkan. Dalam media dengan pH awal 1 ternyata A. niger hasil iso

lasi tidak dapat tumbuh. Dalam berbagai pH media ; 2 , 3 , 4 dan 5 menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna kadar sitrat yang dihasilkan.

Dalam media dengan pH awal = 3 , diperoleh kadar sitrat terbanyak dan kadar total asam selain sitrat - terkecil, sebaliknya dalam pH media 5 diperoleh kadar sitrat terkecil dan kadar total asam selain sitrat ter besar.

Dalam hal ini kadar sitrat tertinggi adalah 1,7725 g/ 100 ml media atau 71,51 % terhadap total asam, dan kadar sitrat terendah 0,9933 gm/100 ml media atau 35,31% terhadap total asam yang diperoleh pada akhir fermentasi.

BAB IX

DAFTAR PUSTAKA

- Alexopoulos, C.J. 1962. Introductory Mycology. 2nd Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York - London - Tokyo
- Austwick, P.K.C. 1974. Medically Important Aspergillus Species. Dalam Lennette, E.H. et al. Manual of clinical Microbiology 2nd Ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C. p. 550 - 556.
- Anonim. 1986. Statistik Indonesia 1985. Biro Pusat Statistik Jakarta - Indonesia (Januari 1986).
- Berry, D.R. 1975. The Environmental Control of The Physiology of Filamentous Fungi. Dalam Smith, J.E and D.R. Berry (Edit). The Filamentous Fungi. Vol. 1. Industrial Mycology. Edward Arnold. p. 16 - 31.
- Buckle, K.A. et.al. 1985. Ilmu Pangan. Penerbit Universitas Indonesia (UI - Press). Jakarta. p.23.
- Bull, A.T. and M.E. Bushell. 1976. Environmental Control of Fungal Growth. Dalam Smith, J.E. and D.R. Berry (Edit). The Filamentous Fungi. Vol 2. Biosynthesis and Metabolism. Edward Arnold. p. 1 - 25.
- Bu'Lock, J.D. 1975. Secondary Metabolism in Fungi and its Relationships to Growth and Development, Dalam Smith, J.E. and D.R. Berry (Edit). The Filamentous Fungi. Vol.1. Industrial Mycology. Edward Arnold. p. 33 - 45.
- Campbell, I.M. 1983. Fungal Secondary Metabolism Research Past, Present and Future. Journal of Natural Products. 46 (1). 60 - 70.
- Daniel, W.W. 1978. Biostatistics, A Foundation for Analysis in The Health Sciences. 2nd Ed. John Wiley & Sons. New York.

- Dwidjoseputro, D. 1978. Pengantar Mikologi. Penerbit Alumni. Bandung. p. 1 - 3.
- Dwidjoseputro, D. 1985. Dasar - Dasar Mikrobiologi. Penerbit Djambatan. Malang. p. 9
- Evers, N. and W. Smith. 1955. The Analysis of Drugs and Chemicals. Charles Griffin & Co. London. p. 297.
- Farmakope Indonesia. 1979. Ed.III. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. p. 807.
- Feigl, F. and R.E, Oesper. Spot Tests in Organic Analisis. Elsevier Publishing Company - Maruzen Company. Ltd. Riode Janeiro p. 308; 390; 439.
- F.F.A.A. 1979. The Japanese Standards of Food Additives. 4th Ed. FFAA, Japan. p. 146.
- Garrat, D.C. 1976 The Quantitative Analysis of Drugs 3rd Ed. Chapman & Hall, Ltd. Toppan Company. Ltd. Tokyo. p. 182 - 183.
- Gordon, H.T. 1951. Indirect Colorimetric Micro-oxidime - try of Organic Compounds. Analytical Chemistry. 23 12. p. 1853 - 1858.
- Jutono. dkk 1973. Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum. Departemen Mikrobiologi. Fakultas Pertanian U.G.M. Jogjakarta. p. 31 - 35. 99, 112 - 114.
- Kirk, R.E. and D.F. Othmer. 1967. Encyclopedia of Chemical Technology 2nd. Ed. Vol. 5.
- Lees, R. 1971 Laboratory Handbook of Methods of Food Analysis. Leonard Hill, London. p. 159 - 161.
- Leininger, E and S. Katz. 1949. Fluorometric Method for Determination of Citric Acid. Analytical Chemistry. 21 (7). 810 - 813.

- Lilly, V.G. and H.L. Barnett. 1951. Physiology of The Fungi. Mc. Graw - Hill Book Company, Inc. New York-Toronto - London. p 65 - 85, 277 - 281.
- Lockwood, L.B. 1974. Organic Acid Production, Dalam Smith J.E. and D.R. Berry (Edit). The Filamentous Fungi. Vol 1. Industrial Mycology. Edward Arnold.p. 145 - 150.
- Manahan, S.E. 1979. Environment Chemistry. 3rd Ed. Willard Grant Press. Boston - Massachusetts. p. 81 - 84
- Manitto, P. 1981. Biosynthesis of Natural Products. Ellis Horwood Limited. New York. p. 10 - 13, 156 - 157 , 158 - 159.
- Martin, J.F. A.L. Demain. 1978 Fungal Development and Metabolite Formation. Dalam Smith. J.E. and D.R. Berry (Edit). The Filamentous Fungi. Vol. 3 Developmental Mycology. Edward Arnol. p. 426 - 447.
- Martindale, The Extra Pharmacopoeia 1977, Wade, A. (Ed)The Pharmaceutical Press, London. p. 739 - 740.
- Misall , L.M. 1975. Historical Development of the Fungal Fermentation Industry, Dalam Smith, J.E. and D.R. Berry (Edit). The Filamentous Fungi. Vol. 1 Industrial Mycology. Edward Arnold p. 105 - 118.
- Patenan, J.A. and Kinghorn. 1976. Nitrogen Metabolism, dalam Smith, J.E. and D.R. Berry The Filamentous Fungi. Vol 2 Biosynthesis and Metabolism. Edward Arnold. p.159 - 173.
- Prescott, S.C. and C.G. Dunn. 1959. Industrial Microbiology. 3rd Ed. Mc Graw-Hill Book Company-Kogakusha Co.Ltd. New York. p.533 - 577.
- Salle, A.J. 1961 Fundamental Principles of Bacteriology. 5th Ed. Mc.Graw-Hill Book Company Inc. New York - Toronto - London p. 138 - 159.

- Shriner, R.L. et.al. 1964. The Systematic Identification of Organic Compounds. A Laboratory Manual. 5th Ed. John Wiley & Sons. Inc. New York - London - Sydney p. 307 - 382.
- Smith, J.E. 1975. The Structure and Development of Filamentous Fungi. Dalam Smith, J.E. and D.R. Barry. The Filamentous Fungi. Vol. 1 Industrial Mycology. Edward Arnold. London . p. 1 - 15.
- Soine, T.O. and C.O. Wilson 1961. Roger's Inorganic Pharmaceutical Chemistry. 7th Ed. Lea & Febiger. Philadelphia. p. 235 - 241.
- Sudarmadji, S dkk. 1976 Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian. Badan penerbit Bagian Pengolahan Hasil Pertanian. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Gajah Mada. p 11 - 12.
- Sumartini, Sri. 1981. Cara kolorimetri sederhana untuk Analisa asam sitrat dalam hasil fermentasi. Dalam Kumpulan Makalah Seminar Nasional Metoda Analisa Kimia, Bandung.
- Suriawiria, U. 1980. Mikrobiologi Umum. Departemen biologi FMIPA ITB, Bandung. p. 16 - 19, 50 - 59.
- Suriawiria, U. 1980. Mikrobiologi Lingkungan Terapan. Lembaga Politeknik P.U ITB Bandung. p. 99 - 100, 114, 115, 137.
- Suwarno. 1980. Perbandingan jumlah hasil pembuatan asam sitrat dari tetes tebu dengan A.niger dan A.flavus sebagai ragi. Skripsi FFUA. Surabaya.
- The Merck Index. 1976. An Encyclopedia of Chemical and Drugs. 9th Ed. Merck & Co, Inc. Rahway - New Yorck.
- Thom, C. and K.B. Raper. 1951 A Manual of Aspergilli The Williams & Wilkins Company, Baltimore.

- Tomlinson, N., J.J.R. Campbell and P.C. Trussel. 1950. The Influence of Zinc, Iron, Copper, and Manganese on the production of Citric acid by A.niger. Journal of Bacteriology. 61 (1). 17 - 25.
- Treadwell, F.P. and W.T. Hall. 1956 Analytical Chemistry - Vol. I Qualitative Analysis. John Wiley & Sons Inc. New York. p. 387 - 389.
- Tristiani, H. dan Ratna S. Hadioetomo. 1987. Isolasi dan Seleksi Galur - galur Aspergillus niger Penghasil Asam sitrat. Dalam Seminar Bioteknologi Indonesia Yogyakarta.
- Tyler, V.O and A.E. Schwarting. 1962. Experimental Pharmacognosy. Burgess Publishing Company, Minnesota. p. 56, 103.
- W.H.O. 1967, Specification for the Quality Control of Pharmaceutical preparations. 2nd Ed. of International Pharmacopoeia. W.H.O. Geneva. p. 669.

Lampiran 1. Komposisi kimia media Czapek - agar /
Czapek Dox Agar.

Komposisi	' g / liter
Sukrosa	' 30,0
Natrium nitrat	' 3,0
Magnesium sulfat	' 0,5
Kalium klorida	' 0,5
Besi (II) sulfat	' 0,01
Kalium monohidrogen fosfat	' 1,0
Agar - agar	' 13,0

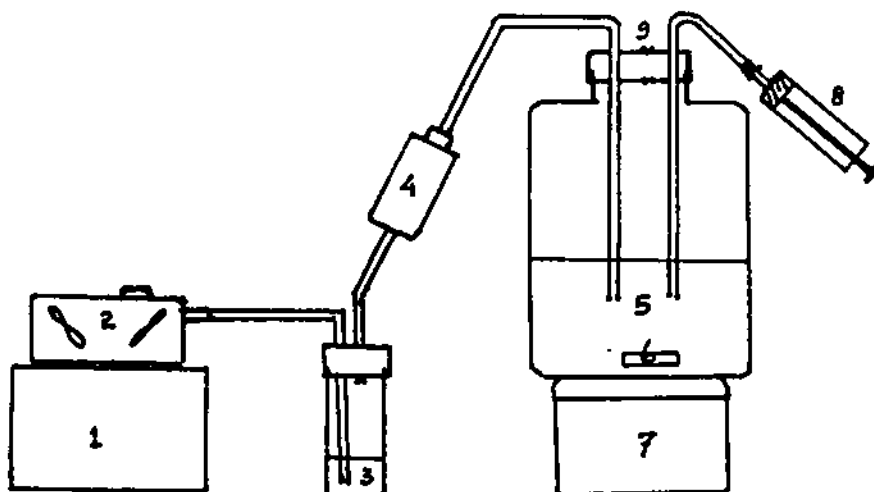
Lampiran 2. Komposisi kimiawi media Czapek tanpa
agar / Czapek Dox Broth.

Komposisi	' (g/ liter)
Sukrosa	' 30,0
Natrium nitrat	' 3,0
Magnesium sulfat	' 0,5
Kalium klorida	' 0,5
Besi (II) sulfat	' 0,01
Kalium monohidrogen fosfat	' 1,0

Lampiran 3. Komposisi kimiawi media Czapek yang dimodifikasi.

Komposisi	(g/ liter)
Sukrosa	140,0
Natriumnitrat	3,0
Magnesium sulfat	0,5
Kalium klorida	0,5
Besi (II) sulfat	0,01
Kalium monohidrogen fosfat	1,0
HCl 1 N	ad pH yang diinginkan

Lampiran 4. Skema alat fermentor untuk "Submerged Culture"



Keterangan :

- | | |
|-------------------|-------------------------------------|
| 1. Stavol | 6. "Magnetic bar" |
| 2. Pompa udara | 7. Pengaduk magnet/magnetic stirrer |
| 3. Larutan KOH 4N | 8. Injektor |
| 4. Kapas steril | 9. Lubang pengeluaran gas |
| 5. Media | |

Lampiran 5. : Pereaksi Luff Schoorl

Pereaksi terdiri dari :

- a). 25 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (terusi) yang tidak mengandung besi, dilarutkan dalam 100 ml air suling.
- b). 50 gram asam sitrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) dilarutkan dalam air suling 50 ml.
- c). 143,8 gram Na_2CO_3 tanpa air kristal, dilarutkan dalam 300 ml air suling mendidih.

Cara pembuatan :

Larutan asam sitrat (b) ditambahkan sedikit demi sedikit dalam larutan soda (c) yang sudah dingin sambil digojog hati - hati oleh karena pada pencampuran ini akan keluar CO_2 . Kemudian campuran ini ditambahkan larutan terusi, dan diencerkan dengan air suling sampai 1000 ml. Biarkan larutan ini selama satu malam , dan bila terjadi kekeruhan disaring.

Lampiran 6. Perhitungan berat miselium berdasarkan DO
(densitas optik) pada λ : 650 nm.

No.	Berat miselium kering (mg/ml) \bar{x}	Transmitansi	Absorbansi (A) Y
1	0,014	97,9	0,009
2	0,079	90,0	0,046
3	0,157	82,0	0,086
4	0,313	63,0	0,201
5	0,626	42,0	0,377

$$\begin{aligned}
 n &= 5 & \sum Y &= 0,719 \\
 \sum x &= 1,189 & \bar{Y} &= 0,1438 \\
 \bar{x} &= 0,2378 & \sum Y^2 &= 0,1921 \\
 (\sum x)^2 &= 1,4137 & (\sum Y)^2 &= 0,51696 \\
 \sum x^2 &= 0,5209 \\
 \sum xy &= 0,3163
 \end{aligned}$$

$$A = - 1,163 \times 10^{-3}$$

$$B = 0,6096$$

$$r = 0,9988$$

$$Y = 0,6096 x - 1,163 \times 10^{-3}$$

Transmitansi dari dispersi miselium yang siap difermentasikan : 93 93 92,5 92,5 92,5

$$\bar{T} = 92,7$$

$$(\bar{A}) = 0,0329$$

$$\bar{x} = 0,05589 \text{ mg/ml} = 1,3969 \cdot 10^{-4} \text{ gm}$$

kering / 2,5 ml.

Lampiran : 7

Koefisien korelasi r_{xy}

Menurut derajat kemaknaan 5% dan 1 %

CORRELATION COEFFICIENTS AT THE 5% AND 1% LEVELS OF SIGNIFICANCE					
Degrees of Freedom	5%	1%	Degrees of Freedom	5%	1%
1	.997	1.000	24	.388	.496
2	.950	.990	25	.381	.487
3	.878	.959	26	.374	.478
4	.811	.917	27	.367	.470
5	.754	.874	28	.361	.463
6	.707	.834	29	.355	.456
7	.666	.796	30	.349	.449
8	.632	.765	35	.328	.418
9	.602	.735	40	.304	.393
10	.576	.708	45	.286	.372
11	.553	.684	50	.273	.354
12	.532	.661	60	.250	.325
13	.514	.641	70	.232	.302
14	.497	.623	80	.217	.283
15	.482	.606	90	.205	.267
16	.468	.590	100	.195	.254
17	.456	.575	125	.174	.228
18	.444	.561	150	.159	.206
19	.433	.549	200	.138	.181
20	.423	.537	300	.113	.148
21	.413	.526	400	.095	.128
22	.404	.515	500	.083	.115
23	.396	.505	1.000	.062	.081

Dikutip dari : Snedecor, G.W. and W.G. Cochran .
 1974, Statistical Methods . Sixth
 Edition. The Iowa State University
 Press, Ames Iowa, U.S.A..p.557 .

Lampiran 8.

Tabel data sampel menurut analisa varian
 "Factorial in a Randomized Complete Block
 Design".

Faktor A	Faktor B				Total	Rata-rata
	1	2	...	b		
1	x_{111} . . x_{11n}	x_{121} . . x_{12n}	x_{1b1} . . x_{1bn}	$T_{1..}$	$\bar{x}_{1..}$
2	x_{211} . . x_{21n}	x_{221} . . x_{22n}	x_{2b1} . . x_{2bn}	$T_{2..}$	$\bar{x}_{2..}$
.
.
a	x_{a11} . . x_{a1n}	x_{a21} . . x_{a2n}	x_{ab1} . . x_{abn}	$T_{a..}$	$\bar{x}_{a..}$
Total	$T_{.1.}$	$T_{.2.}$...	$T_{.b.}$	$T_{...}$	
Rata-rata	$\bar{x}_{.1.}$	$\bar{x}_{.2.}$...	\bar{x}_{1b1}		$\bar{x}_{...}$

Rumus - rumus untuk perhitungan :

$$JK_{total} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n x_{ijk}^2 - C$$

$$JK_{perlakuan} = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b T_{ij}^2}{n} - C$$

$$JK_{residual} = JK_{total} - JK_{perlakuan}$$

$$JK_B = \frac{\sum_{j=1}^b T_{.j}^2}{an} - C \quad JK_A = \frac{\sum_{i=1}^a T_{i..}^2}{bn} - C$$

$$JK_{AB} = JK_{perlakuan} - JK_A - JK_B$$

$$C = \left(\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n x_{ijk} \right)^2 abn$$

Lampiran 9.

Tabel Anova untuk "Factorial in a Randomized Complete Block Design".

Sumber variasi	D.B.	Jk	RJK	F _{hitung}
1. A	a - 1	JK _A	RJK _A = $\frac{JK_A}{(a-1)}$	$\frac{RJK_A}{RJK_R}$
2. B	b - 1	JK _B	RJK _B = $\frac{JK_B}{(b-1)}$	$\frac{RJK_B}{RJK_R}$
3. AB	(a-1)(b-1)	JK _{AB}	RJK _{AB} = $\frac{JK_{AB}}{(a-1)(b-1)}$	$\frac{RJK_{AB}}{RJK_R}$
4. Perlakuan (P)	ab - 1	JK _P		
5. Residual	ab(n-1)	JK _R	RJK _R = $\frac{JK_R}{ab(n-1)}$	
Total	abn - 1	JK _T		

Lampiran 10: Tabel harga q untuk perhitungan
HSD test pada $\alpha = 0,05$

Error df	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	17.97	26.98	32.82	37.08	40.41	43.12	45.40	47.36	49.07
2	6.08	8.33	9.80	10.88	11.74	12.44	13.03	13.54	13.99
3	4.50	5.91	6.82	7.50	8.04	8.48	8.85	9.18	9.46
4	3.93	5.04	5.76	6.29	6.71	7.05	7.35	7.60	7.83
5	3.64	4.60	5.22	5.67	6.03	6.33	6.58	6.80	6.99
6	3.46	4.34	4.90	5.30	5.63	5.90	6.12	6.32	6.49
7	3.34	4.16	4.68	5.06	5.36	5.61	5.82	6.00	6.16
8	3.26	4.04	4.53	4.89	5.17	5.40	5.60	5.77	5.92
9	3.20	3.95	4.41	4.76	5.02	5.24	5.43	5.59	5.74
10	3.15	3.88	4.33	4.65	4.91	5.12	5.30	5.46	5.60
11	3.11	3.82	4.26	4.57	4.82	5.03	5.20	5.35	5.49
12	3.08	3.77	4.20	4.51	4.75	4.95	5.12	5.27	5.39
13	3.06	3.73	4.15	4.45	4.69	4.88	5.05	5.19	5.32
14	3.03	3.70	4.11	4.41	4.64	4.83	4.99	5.13	5.25
15	3.01	3.67	4.08	4.37	4.59	4.78	4.94	5.08	5.20
16	3.00	3.65	4.05	4.33	4.56	4.74	4.90	5.03	5.15
17	2.98	3.63	4.02	4.30	4.52	4.70	4.86	4.99	5.11
18	2.97	3.61	4.00	4.28	4.49	4.67	4.82	4.96	5.07
19	2.96	3.59	3.98	4.25	4.47	4.65	4.79	4.92	5.04
20	2.95	3.58	3.96	4.23	4.45	4.62	4.77	4.90	5.01
24	2.92	3.53	3.90	4.17	4.37	4.54	4.68	4.81	4.92
30	2.89	3.49	3.85	4.10	4.30	4.46	4.60	4.72	4.82
40	2.86	3.44	3.79	4.04	4.23	4.39	4.52	4.63	4.73
60	2.83	3.40	3.74	3.98	4.16	4.31	4.44	4.55	4.65
120	2.80	3.36	3.68	3.92	4.10	4.24	4.36	4.47	4.56
∞	2.77	3.31	3.63	3.86	4.03	4.17	4.29	4.39	4.47

Error df	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	50.59	51.96	53.20	54.33	55.36	56.32	57.22	58.04	58.83	59.56
2	14.39	14.75	15.08	15.38	15.65	15.91	16.14	16.37	16.57	16.77
3	9.72	9.95	10.15	10.35	10.52	10.69	10.84	10.98	11.11	11.24
4	8.03	8.21	8.37	8.52	8.66	8.79	8.91	9.03	9.13	9.23
5	7.17	7.32	7.47	7.60	7.72	7.83	7.93	8.03	8.12	8.21
6	6.65	6.79	6.92	7.03	7.14	7.24	7.34	7.43	7.51	7.59
7	6.30	6.43	6.55	6.66	6.76	6.85	6.94	7.02	7.10	7.17
8	6.05	6.18	6.29	6.39	6.48	6.57	6.65	6.73	6.80	6.87
9	5.87	5.98	6.09	6.19	6.28	6.36	6.44	6.51	6.58	6.64
10	5.72	5.83	5.93	6.03	6.11	6.19	6.27	6.34	6.40	6.47
11	5.61	5.71	5.81	5.90	5.98	6.06	6.13	6.20	6.27	6.33
12	5.51	5.61	5.71	5.80	5.88	5.95	6.02	6.09	6.15	6.21
13	5.43	5.53	5.63	5.71	5.79	5.86	5.93	5.99	6.05	6.11
14	5.36	5.46	5.55	5.64	5.71	5.79	5.85	5.91	5.97	6.03
15	5.31	5.40	5.49	5.57	5.65	5.72	5.78	5.85	5.90	5.96

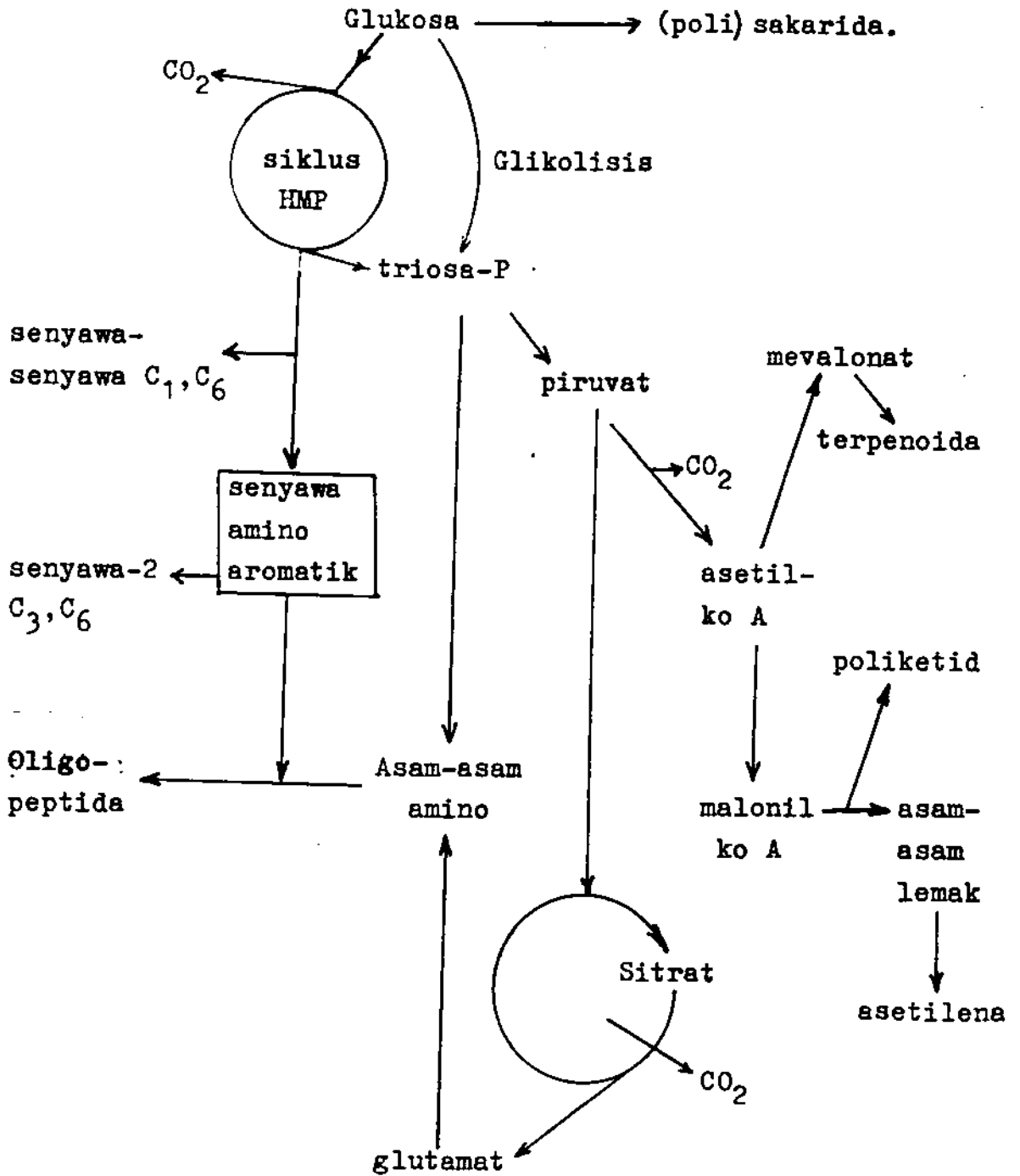
Error df	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
16	5.26	5.35	5.44	5.52	5.59	5.66	5.73	5.79	5.84	5.90
17	5.21	5.31	5.39	5.47	5.54	5.61	5.67	5.73	5.79	5.84
18	5.17	5.27	5.35	5.43	5.50	5.57	5.63	5.69	5.74	5.79
19	5.14	5.23	5.31	5.39	5.46	5.53	5.59	5.65	5.70	5.75
20	5.11	5.20	5.28	5.36	5.43	5.49	5.55	5.61	5.66	5.71
24	5.01	5.10	5.18	5.25	5.32	5.38	5.44	5.49	5.55	5.59
30	4.92	5.00	5.08	5.15	5.21	5.27	5.33	5.38	5.43	5.47
40	4.82	4.90	4.98	5.04	5.11	5.16	5.22	5.27	5.31	5.36
60	4.73	4.81	4.88	4.94	5.00	5.06	5.11	5.15	5.20	5.24
120	4.64	4.71	4.78	4.84	4.90	4.95	5.00	5.04	5.09	5.13
∞	4.55	4.62	4.68	4.74	4.80	4.85	4.89	4.93	4.97	5.01

$F_{.95}$

Denominator Degrees of Freedom	Numerator Degrees of Freedom								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.09	2.02	1.96
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88

Denominator Degrees of Freedom	Numerator Degrees of Freedom									
	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
1	241.9	243.9	245.9	248.0	249.1	250.1	251.1	252.2	253.3	254.3
2	19.40	19.41	19.43	19.45	19.45	19.46	19.47	19.48	19.49	19.50
3	8.79	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59	8.57	8.55	8.53
4	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66	5.63
5	4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	4.43	4.40	4.36
6	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	3.74	3.70	3.67
7	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	3.30	3.27	3.23
8	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	3.01	2.97	2.93
9	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	2.79	2.75	2.71
10	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	2.62	2.58	2.54
11	2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	2.49	2.45	2.40
12	2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43	2.38	2.34	2.30
13	2.67	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.34	2.30	2.25	2.21
14	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	2.22	2.18	2.13
15	2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20	2.16	2.11	2.07
16	2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15	2.11	2.06	2.01
17	2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.10	2.06	2.01	1.96
18	2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06	2.02	1.97	1.92
19	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93	1.88
20	2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99	1.95	1.90	1.84
21	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	1.92	1.87	1.81
22	2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.78
23	2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91	1.86	1.81	1.76
24	2.25	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.79	1.73
25	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82	1.77	1.71
26	2.22	2.15	2.07	1.99	1.95	1.90	1.85	1.80	1.75	1.69
27	2.20	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.84	1.79	1.73	1.67
28	2.19	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.82	1.77	1.71	1.65
29	2.18	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.81	1.75	1.70	1.64
30	2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79	1.74	1.68	1.62
40	2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.69	1.64	1.58	1.51
60	1.99	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.59	1.53	1.47	1.39
120	1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50	1.43	1.37	1.25
∞	1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.39	1.32	1.22	1.00

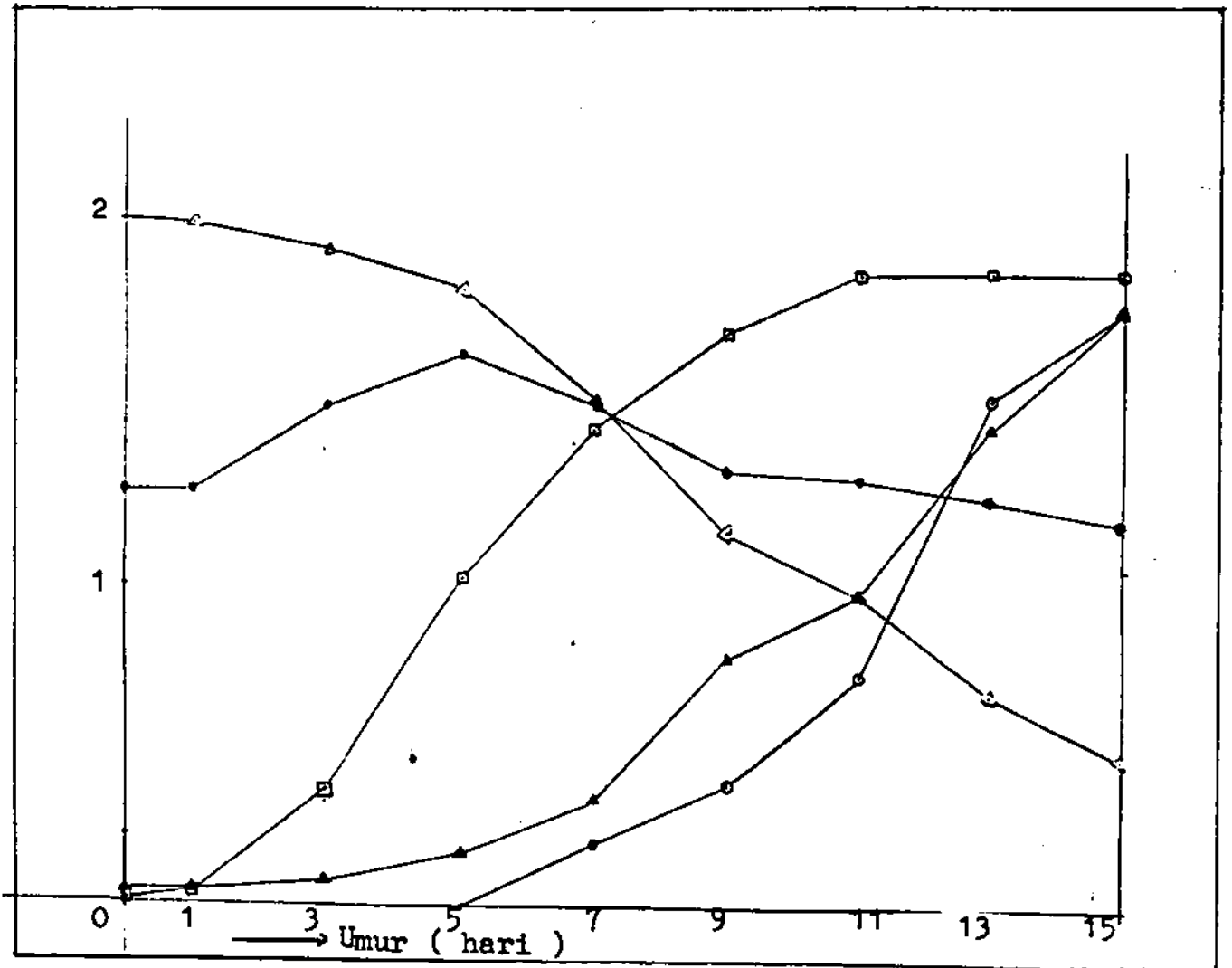
Lampiran 12 : Jalur - jalur katabolisme gula dalam jamur dan beberapa metabolit sekundernya. (Bu'lock, 1975).



Lampiran 13

Kadar sitrat rata - rata pada akhir fermentasi (umur 15 hari).

Media	Kadar sitrat			
	g/100 ml media,	(%) terhadap gula awal	(%) terhadap gula yang dikonsumsi	(%) terhadap total asam
pH awal 2	1,3302	9,50	12,60	63,14
pH awal 3	1,7725	12,64	16,37	71,51
pH awal 4	1,3202	9,43	12,99	60,14
pH awal 5	0,9933	7,10	9,06	35,31



Gambar 12. Kurva perubahan-perubahan: berat miselia kering, kadar sitrat, kadar total gula reduksi sisa, normalitas asam dan pH selama fermentasi dalam media pH 3.

- Berat miselia kering (gm)
- Kadar asam sitrat (gm/100 ml media)
- △—△ Kadar total gula reduksi sisa (%),
1 skala $\frac{\infty}{\infty}$ 50 %
- ▲—▲ Normalitas asam (1 skala $\frac{\infty}{\infty}$ 0,2 N)
- pH (1 skala $\frac{\infty}{\infty}$ 2,5).