



ISOLASI DAN SELEKSI MIKROB PENGHASIL ASAM SITRAT DARI BUAH - BUAHAN BUSUK

Siti Latifa Wulandari¹, Pesina Kaloik², Parue Lakobal³, Nelmin Wenda⁴

¹Agronomi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Amal Ilmiah Yapis Wamena
Jalan Trikora Hom-Hom Wamena, Jayawijaya, Papua
Email: latifawulandari812@gmail.com

ABSTRAK

Asam sitrat memiliki nilai ekonomis yang tinggi sebagai pengawet, pengemulsi, penyedap, zat penyerap dan penyangga yang banyak digunakan di banyak industri terutama dalam makanan, minuman, farmasi, dan produk kosmetik. Limbah sayuran seperti buah busuk dapat digunakan untuk menghasilkan asam sitrat. Hal ini disebabkan buah merupakan media kaya glukosa yang sangat baik bagi perumbuhan kapang dan khamir, beberapa khamir dan kapang yang terdapat pada buah dapat dimanfaatkan dalam industri pangan seperti dalam produksi wine. Tujuan ini untuk isolasi kapang penghasil asam sitrat dari berbagai sumber seperti buah-buahan busuk, serta menyeleksi isolat-isolat potensial untuk digunakan sebagai isolat penghasil asam sitrat. Metode yang digunakan metode tanam langsung pada media. Pertumbuhan kapang dan pembentukan zona asam diamati, dan koloni yang membentuk zona asam dimurnikan pada media cawan Prescott. Isolat yang memiliki nilai AU (Acid Unitage) relatif besar disimpan untuk digunakan pada percobaan fermentasi padat produksi asam sitrat. Hasil Penelitian ini berhasil diisolasi khamir, kapang, dan bakteri dari buah-buahan busuk. Berdasarkan uji nilai satuan asam didapatkan isolat khamir memiliki nilai satuan asam yaitu sebesar 2 cm dan bakteri sebesar 3.75 cm. Isolat khamir dan bakteri diketahui memiliki nilai total asam monohidrat yang sama yaitu sebesar 0.14%.

Kata Kunci: Asam sitrat, Buah-buahan, Khamir, Kapang, Fermentasi

ABSTRACT

Citric acid has a high economic value as a preservative, emulsifier, flavoring, absorbent and buffering agent which is widely used in many industries, especially in food, beverage, pharmaceutical, and cosmetic products. Vegetable waste such as rotten fruit can be used to produce citric acid. This is because the fruit is a medium rich in glucose which is very good for the growth of molds and yeasts, some yeasts and molds found in fruit can be used in food industry such as in wine production. This objective was to isolate citric acid-producing molds from various sources such as rotten fruits, as well as to select potential isolates to be used as citric acid-producing isolates. The method used is the direct planting method on the media. Mold growth and acid zone formation were observed, and colonies forming acid zones were purified on Prescott dish media. Isolates with relatively large AU (Acid Unitage) values were stored for use in solid fermentation experiments for citric acid production. Results of this study successfully isolated yeast, mold, and bacteria from rotten fruit. Based on the acid unit value test, it was found that the yeast isolate had an acid unit value of 2 cm and bacteria of 3.75 cm. Yeast and bacterial isolates are known to have the same total value of monohydric acid, which is 0.14%.

Keywords: Citric Acid, Fruits, Yeast, Mold, Fermentation

Submitted: 13/10/2021

Accepted: 20/11/2021

Published: 31/12//2021

Copyright © 2021 Siti Latifa Wulandari, Pesina Kaloik, Parue Lakobal, Nelmin Wenda
Lisencee Universitas Amal Ilmiah Yapis Wamena



CrossMark



Pendahuluan

Asam sitrat (asam 2-hidroksi-1,2,3-propanetriarboxilat, $C_6H_8O_7$) adalah asam organik lemah yang ditemukan banyak pada buah sitrus (jeruk dan lemon), asam sitrat memiliki titik leleh pada suhu $153\text{ }^{\circ}\text{C}$. asam sitrat memiliki nilai ekonomis yang tinggi sebagai pengawet, pengemulsi, penyedap, zat penyerap dan penyangga yang banyak digunakan di banyak industri terutama dalam makanan, minuman, farmasi, dan produk kosmetik [1].

Asam sitrat selain dihasilkan oleh tumbuhan juga dapat dihasilkan juga oleh mikroorganisme. Asam sitrat yang diproduksi oleh mikroorganisme merupakan hasil metabolisme primer, yang terjadi karena adanya ketidak teraturan metabolisme yang disebabkan oleh defisiensi genetik atau ketidak seimbangan metabolisme. Beberapa kapang, khamir, dan bakteri yang mampu menghasilkan asam sitrat antara lain *Penicillium luterum*, *P. purpurogenum*, *P. restrictum*, *P. janthinellum*, *P. citrinum*, *Paecilomyces divaricatum*, *Mucor piriformis*, *Trichoderma viride*, *Sacharomycopsis lipolitica*, *Arthrobacter paraffineus*, *Corynebacterium sp.* [2]. Produksi Asam sitrat secara fermentasi umumnya menggunakan agen mikroba terutama kelompok kapang seperti *Aspergillus niger* [3]. Beberapa penelitian menunjukkan limbah sayuran seperti buah busuk dapat digunakan untuk menghasilkan asam sitrat [4]. Hal ini diebabkan buah merupakan media kaya glukosa yang sangat baik bagi perumbuhan kapang dan khamir, beberapa khamir dan kapang yang terdapat pada buah dapat dimanfaatkan dalam industri pangan seperti dalam produksi wine [5].

Metode Penelitian

Isolasi dari buah-buahan busuk dengan metode tanam langsung

Sampel buah-buahan busuk dipotong seukuran $1 \times 1 \times 1\text{ cm}^3$ sebanyak 4 potong. Potongan sampel diletakan diatas media agar cawan Prescott, kemudian diinkubasi pada suhu $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 2-5 hari. Pertumbuhan kapang dan pembentukan zona asam diamati pada medium. Koloni yang membentuk zona asam dimurnikan pada media cawan Prescott. Isolat murni disimpan di dalam agar miring PDA.

Isolasi dari buah-buahan busuk dengan metode sebar

Sampel buah busuk dihaluskan sebanyak 1 g, lalu dicampur ke dalam larutan fisiologi 9 ml dan diencerkan secara serial sampai 10^{-3} . Sampel disebar sebanyak 0,1 ml dari pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-3} pada medium agar cawan Prescott, kemudian diinkubasi pada suhu $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 2-5 hari. Pertumbuhan kapang dan pembentukan zona asam diamati, dan koloni yang membentuk zona asam dimurnikan pada media cawan Prescott. Isolat murni disimpan di dalam agar miring PDA.

Seleksi isolat berdasarkan nilai satuan asam (Acid Unitage/ AU)

Isolat kapang yang diperoleh diinokulasikan di tengah dan isolat bakteri (jika didapatkan) diinokulasikan sebanyak empat titik pada media agar cawan. Isolat kemudian diinkubasi pada suhu $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 3 hari, lalu diukur diameter zona asam beserta diameter koloni kapang dan bakteri. Nilai satuan asam (Acid Unitage/ AU) dihitung dengan menggunakan rumus:

Diameter zona asam

Nilai AU = -----

Diameter koloni kapang

Isolat yang memiliki nilai AU relatif besar disimpan untuk digunakan pada percobaan fermentasi padat produksi asam sitrat.

Peremajaan Isolat pada media cair

Sebanyak 1 ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam 50 ml media TSB (*Tryptic soy broth*) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Isolat kapang diinokulasikan sebanyak 1 ose ke dalam 50 ml media PDB (*Potato dextrose broth*) dan diinkubasi selama 7x24 jam diatas shaker pada suhu ruang.

Fermentasi padat produksi asam sitrat

Onggok tapioka basah dan dedak dicampur dengan perbandingan 5:1, kemudian ditambahkan aquades hingga kadar air mencapai 65%. Sebanyak 30 g campuran tersebut dimasukan kedalam labu erlenmeyer 250 ml kemudian disterilkan. Inokulasikan suspensi isolat kapang dan bakteri yang telah ditumbuhkan pada media cair sebanyak 1 ml ke dalam medium onggok yang berbeda secara merata. Isolat kapang diinkubasi selama 7x24 jam dan isolat bakteri diinkubasi selama 24 jam di atas shaker pada suhu ruang $\pm 27\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Hasil fermentasi diaduk secara merata dan ditimbang sebanyak 10 g, kemudian dimasukan ke dalam labu erlenmeyer 300 ml baru. Sebanyak 200 ml aquades ditambahkan ke dalam labu erlenmeyer,

No	Isolat	Bentuk	Elevasi	Tepian	Opasitas	Warna	Permukaan
1	PS G 1	Circular	Raised	Rata	Non transparent	Putih	Licin
2	PS G 2	Circular	Flat	Rata	Non transparent	Kuning pucat	Licin

kemudian diaduk dan dipanaskan sampai mendidih. Hasil campuran disaring menggunakan kertas saring whatmen no 40 dan didinginkan pada suhu ruang. Sebanyak 10 ml filtrat hasil penyaringan dititrasi dengan NaOH 0.1 N dan dihitung total asam sebagai asam sitrat monohidrat dengan rumus:

$$\frac{b \times c \times 210 \times 20}{a \times 3}$$

$$\text{Total asam sitrat monohidrat} = \frac{\text{-----}}{a \times 3} \times 100 \%$$

Hasil dan Pembahasan

Isolasi dari buah busuk dengan metode tanam langsung

Dari hasil isolasi dengan menggunakan metode tanam langsung pada media Prescott didapatkan isolat khamir dari sampel rambutan, manggis, dan anggur busuk, sedangkan untuk kapang ditemukan dari hasil isolasi sampel belimbing busuk. Hasil pengamatan secara morfologis menunjukkan ciri-ciri isolat seperti pada tabel 1. Isolat khamir dari rambutan dan kapang dari belimbing dipilih untuk diuji kualitas zona asamnya.

Tabel 1. Karakter morfologi koloni kapang dan khamir hasil isolasi

No	Sampel	Warna	Bentuk	Tekstur	Keterangan
1	Rambutan	Putih kekuningan	Tidak ada hifa	Permukaan licin	Khamir
2	Belimbing	Putih	Filamen	Seperti Kapas	Kapang
3	Manggis	Putih kekuningan	Tidak ada hifa	Permukaan licin	Khamir
4	Anggur	Putih transparan	Tidak ada hifa	Permukaan licin	Khamir

Isolasi dari buah busuk dengan metode sebar

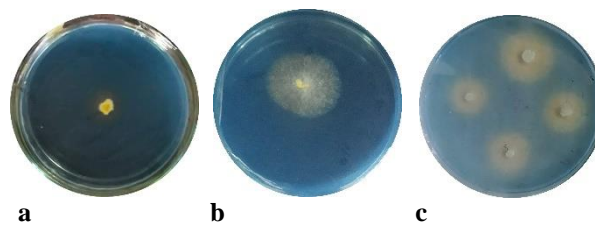
Dari hasil isolasi dengan menggunakan metode sebar didapatkan 2 koloni bakteri berbeda dari sampel pisang busuk. Morfologi koloni bakteri yang didapat ditunjukkan pada tabel 2. Satu isolat bakteri dipilih untuk diuji kualitatif zona asamnya.

Tabel 2. Karakter morfologi koloni bakteri hasil isolasi

Dari hasil isolasi terpilih 3 isolat yang akan digunakan untuk lanjut ke dalam seleksi nilai satuan asam, isolat yang digunakan adalah khamir (sampel rambutan), kapang (sampel belimbing), dan bakteri PSG 1 (sampel pisang).

Seleksi isolat berdasarkan nilai satuan asam (Acid Unitage/ AU)

Isolat yang mampu menghasilkan asam jika diinokulasikan pada media Prescott akan menghasilkan zona asam, zona asam terlihat dari adanya perubahan warna media di sekitar koloni menjadi warna kuning yang sebelumnya bewarna biru (gambar 1).



Gambar 1. Hasil isolat yang menunjukkan pembentukan zona asam, (a) khamir dari rambutan, (b) kapang dari belimbing (c) bakteri dari pisang.

Perhitungan nilai *acid unitage* (AU) diperoleh dengan cara mengukur diameter zona asam yang dihasilkan dan diameter koloni, diameter zona asam kemudian dikurangi dengan diameter koloni. Dari perhitungan nilai *acid unitage* (AU) (tabel 3) diketahui bahwa isolat khamir dan bakteri PSG 1 menghasilkan zona asam yang lebih besar dibandingkan isolat kapang, sehingga untuk uji fermentasi padat isolat yang digunakan adalah khamir asal rambutan dan bakteri PSG1.

Fermentasi padat produksi asam sitrat

Dua isolat yang memiliki nilai AU tertinggi diinokulasikan ke dalam media fermentasi padat berupa campuran onggok tapioka dan dedak steril. Dari hasil fermentasi isolat bakteri selama 24 jam dan isolat khamir selama 7 hari ditambahkan indikator PP dan dititrasi dengan NaOH 0.1 N, sehingga diketahui total asam sitrat monohidrat yaitu sebesar 0.14% dari kedua isolat.

Tabel 4. Hasil titrasi asam sitrat

No.	Isolat	Total asam sitrat monohidrat	Keterangan
1	Rambutan	0.14 %	Kapang
2	PSG 1	0.14 %	Bakteri

Fermentasi menggunakan mikroorganisme dibagi menjadi tiga yaitu fermentasi terendam, fermentasi permukaan dan fermentasi padat [6]. Fermentasi padat merupakan proses alternatif yang lebih baik dibandingkan dengan fermentasi terendam. Dalam proses ini, mikroorganisme akan menggunakan bahan limbah murah sebagai substrat. Bahan limbah yang dihasilkan dalam industri makanan dapat digunakan sebagai substrat oleh mikroorganisme untuk memproduksi asam sitrat, contohnya limbah tapioka yaitu onggok [7].

Aspergillus niger LPB 21 in Semi-Pilot Scale. *Brazil Archiv of Biol and Technol.*48: 29-36. doi: 10.1590/S1516-89132005000400004.

Kesimpulan

Dari Penelitian ini berhasil diisolasi khamir, kapang, dan bakteri dari buah-buahan busuk. Berdasarkan uji nilai satuan asam didapatkan isolat khamir memiliki nilai satuan asam yaitu sebesar 2 cm dan bakteri sebesar 3.75 cm. Isolat khamir dan bakteri diketahui memiliki nilai total asam monohidrat yang sama yaitu sebesar 0.14%.

Daftar Pustaka

- [1]. Penniston KL, Nakada SY, Holmes RP, Assimos DG. 2008. Quantitative Assessment of Citric Acid in Lemon Juice, Lime Juice, and Commercially-Available Fruit Juice Products. *Journal of Endourology*, 22(3): 567–570. doi:10.1089/end.2007.0304.
- [2]. Berovic M dan Legisa M. 2007. Citric acid production. *Biotechnol Annual Review*. 13:303-343. DOI: 10.1016/S1387-2656(07)13011-8.
- [3]. Oladele, K.O., Siew, Q.Y., Zakry, F.A.A., Lan, J.C., Ling, T. C. (2015). Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. *Frontiers in Life Scienc*
- [4]. Bera A, Verma S, dan Suneetha V. 2013. Estimation and economic analysis of citric acid extracted from vegetative wastes collected from Vellore. *Der Pharmacia Lettre*. 2013, 5(3):58-64.
- [5]. Ahmad RZ, Setyabudi DA, Wulandari NF. 2018. The Mold Causing Agent of Rotten Snake Fruit (*Salacca zalacca* (gaertn.) from Traditional Fruit Markets. *Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 197. doi :10.1088/1755-1315/197/1/012031.
- [6]. Gupta GK, De S, Franco A, Balu AM, and Luque R. 2015. Sustainable Biomaterials: Current Trends, Challenges and Applications. *Molecul.* 21(48). doi:10.3390/molecules21010048.
- [7]. Prado FC, Vandenberghe LPdS, Soccol CR. 2005. Relation between Citric Acid Production by Solid-State Fermentation from Cassava Bagasse and Respiration of