

PENGARUH PENAMBAHAN STARTER *ASPERGILLUS NIGER* TERHADAP KONSENTRASI ASAM ITAKONAT DENGAN SUBSTRAT GLISEROL DAN MOLASE

Marlinda^{1*}, Ramli² dan Mardhiyah Nadir³

^{1,2,3} Jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Samarinda

Jln. Ciptomangunkusumo Kampus Gg Lipan Samarinda Kaltim 75131

*Email : lin_syam@yahoo.co.id

ABSTRAK

Gliserol yang dihasilkan sebagai limbah biodiesel di Indonesia pada tahun 2015 sebesar 8,7 Juta KL selama ini kurang dimanfaatkan. Salah satu upaya pemanfaatannya adalah dengan dibuat menjadi asam itakonat. Asam itakonat dapat dimanfaatkan untuk pembentukan produk lain seperti polimer, serat, resin, deterjen, *cleaner* dan *dental adhesive*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan volume starter *aspergillus niger* terhadap konsentrasi asam itakonat yang dihasilkan dari proses fermentasi aerobik pada substrat modifikasi gliserol. Faktorial yang digunakan adalah volume starter *aspergillus niger* yang ditambahkan (8,12,16,20 dan 24 ml) pada substrat gliserol glukosa dan gliserol molase. Gliserol yang telah dimurnikan, sebanyak 500 ml dan dicampurkan dengan glukosa konsentrasi 100 g/L sebanyak 500 ml dan dimasukkan kedalam fermentor yang berisi 1000 ml larutan nutrisi (perlakuan diulangi untuk substrat gliserol molase). Proses fermentasi dilakukan pada kondisi fermentasi aerobik *aspergillus niger* dan berlangsung selama 9 hari. Hasil fermentasi lalu disaring dan dimurnikan dengan *rotary evaporator*. Hasil fermentasi ini berupa filtrat kemudian dianalisa konsentrasi asam itakonatnya menggunakan HPLC sedangkan residu dianalisa biomassa dengan metode pengeringan 110°C. Dari hasil analisa, diperoleh konsentrasi asam itakonat tertinggi dengan volume starter *aspergillus niger* 16 ml sebesar 46,27 g/L untuk substrat gliserol glukosa dan 27,35 g/L untuk gliserol molase. Berdasarkan hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa semakin besar volume starter *aspergillus niger* yang ditambahkan, semakin tinggi konsentrasi asam itakonat yang dihasilkan dari proses fermentasi aerobik pada substrat gliserol glukosa dan gliserol molase.

Kata kunci: asam itakonat, *aspergillus niger*, fermentasi, gliserol

ABSTRACT

Glycerol, which is produced as waste biodiesel up to 8.7 million KL in 2015 has not been properly utilized in Indonesia. One means of its utilization is conversion to itaconic acid. Itaconic acid can be utilized for the formation of other products such as polymer, fiber, resin, detergent, cleaner and dental adhesive. Research of itaconic acid production by fermentation methods using glycerol by-product of biodiesel as raw material + molase have been conducted before. The purpose of this study was to determine the effect of aspergillus niger mass addition on the concentration of itaconic acid which is produced by the fermentation process. Factorial used are aspergillus niger starter volum which are added (8, 12, 16, 20, 24 ml). Purified glycerol of 500 ml and mix glucose concentration 100 g/L of 250 ml was added to the fermentor containing 1000 ml of nutrient solution. Fermentation was carried out in aerobic conditions and lasted for fourteen days. Fermented product then filtered and purified by rotary evaporator. The result of this fermentation was then analyzed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) to determine the concentrations of itaconic acid. The analysis resulted the highest concentration of itaconic acid with 16 ml of aspergillus niger mass is 46,27 g/L for glycerol glucose substrate and 27,35 g/L for glycerol molase. Based on these results it can be concluded that the greater mass of aspergillus niger is added, the higher concentration of itaconic acid produced from the fermentation process mixing glycerol glucose and glycerol molase.

Keywords: *aspergillus niger*, fermentation, glycerol, itaconic acid

PENDAHULUAN

Pada pembuatan biodiesel, dihasilkan produk samping berupa gliserol dengan tingkat kemurnian yang rendah, yang biasa disebut

dengan *crude glycerol*. Produk ini dihasilkan sekitar 10-20 % dari total produk (Azis dkk., 2008). Menurut data Kementerian ESDM menunjukkan, produksi biodiesel di Indonesia

mencapai 8.7 Juta KL (ESDM, 2015). Sehingga dihasilkan sekitar 870.0400 KL gliserol dari proses pembuatan biodiesel di Indonesia pada tahun 2015.

Gliserol hasil samping biodiesel (GHB) umumnya mengandung komposisi yang bervariasi, tergantung dari jenis katalis yang digunakan untuk memproduksi biodiesel, (Fangxia, 2012). Namun pada umumnya, gliserol hasil samping pembuatan biodiesel mengandung komposisi 30% gliserol, 50% metanol, 13% sabun, 2% air, serta sekitar 2–3% garam (biasanya sodium atau potassium) dan 2–3% lainnya adalah pengotor (Rehman, 2008). GHB memiliki kadar gula alkohol (metanol & gliserol) yang terkandung di dalamnya cukup besar, sehingga membuat gliserol merupakan bahan baku yang baik dalam proses fermentasi dengan menggunakan mikroorganisme sebagai biokatalisator. Umumnya diperlukan proses pemurnian terlebih dahulu agar gliserol hasil samping biodiesel bisa digunakan sebagai bahan baku atau substrat untuk dapat meningkatkan nilai ekonomis dari GHB.

Gliserol atau sering disebut juga gliserin adalah senyawa murni, merupakan larutan tidak berwarna dan mempunyai rasa yang manis. Senyawa ini pertama kali ditemukan oleh Scheele pada tahun 1779 melalui pemanasan campuran minyak zaitun dan *litharge* yang kemudian diekstraksi dengan air (Kirk dan Othmer, 1971). Gliserol juga merupakan suatu senyawa yang mempunyai gugus hidroksil lebih dari dua atau merupakan tiga senyawa alkohol yang saling berkaitan (*tribasic alcohol*) dengan nama 1,2,3-propanatriol.

Proses peningkatan kemurnian gliserol yang sederhana dan relatif murah dilakukan oleh Farobie (2009) dengan cara mereaksikan gliserol kasar dengan sejumlah asam fosfat sampai terbentuk endapan garam kalium fosfat. Tujuan utama proses ini adalah untuk menetralkan sisa katalis basa (KOH) dengan asam fosfat. Proses ini berhasil meningkatkan kemurnian gliserol dari 50% menjadi 80%. Proses ini juga menghasilkan produk samping berupa garam kalium fosfat yang dapat digunakan sebagai pupuk. Selain garam kalium fosfat, produk lain yang dihasilkan pada saat pemurnian gliserol dengan menggunakan metode ini adalah asam lemak.

Permasalahan lingkungan dalam pengolahan biodiesel sehingga GHB digunakan sebagai sarana dalam peningkatan nilai ekonomisnya dalam pembentukan produk yang lebih bermanfaat. Salah satu pemanfaatan gliserol dapat dijadikan sebagai substrat dalam proses fermentasi untuk menghasilkan produk tertentu.

Pada penelitian ini akan dilakukan penambahan glukosa dan molase kedalam bahan baku substrat gliserol, penambahan ini dilakukan karena glukosa merupakan salah satu substrat yang paling sering digunakan dalam proses fermentasi, yang mampu bekerja dengan hampir seluruh jenis *Aspergillus sp.* Selain itu, glukosa merupakan jenis sakarida, sehingga bisa langsung diubah dalam proses glikolisis. Berbeda dengan laktosa ataupun maltosa yang merupakan bentuk disakarida sehingga harus melewati proses penguraian terlebih dahulu sebelum diproses pada proses fermentasi.

Asam itakonat adalah salah satu produk fermentasi yang menjanjikan dari kelompok asam organik untuk menggantikan monomer berbasis petrokimia. Asam itakonat umumnya dimanfaatkan untuk bahan pembuatan polimer, serta pembuatan resin. Akan tetapi GHB mempunyai beberapa kekurangan sebagai hasil samping biodiesel adalah kandungan gula yang ada didalamnya dalam bentuk gula alkohol (metanol dan gliserol) sehingga akan membuat substrat GHB tidak terlalu cukup memadai untuk kebutuhan nutrisi dan media tumbuh mikroorganisme untuk produksi asam itakonat.

Proses pembuatan asam itakonat dilakukan dengan metode fermentasi aerobik dengan menggunakan mikroorganisme jenis *Aspergillus Niger* dan *Aspergillus tereus*. Kinerja inokulum kedua jenis *aspergillus* ini hampir sama. Oleh karena itu pada penelitian ini akan dilakukan pembuatan asam itakonat dengan metode fermentasi aerobik menggunakan *Aspergillus Niger*. Inokulum *Asperhillus niger* berkaitan dengan jumlah banyak jamur yang berfungsi sebagai katalisator dalam proses pemecahan karbohidrat untuk menghasilkan asam itakonat .

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh dari penambahan starter jamur *Aspergillus Niger* terhadap proses fermentasi gliserol dan dan modifikasi gliserol menjadi Asam Itakonat.

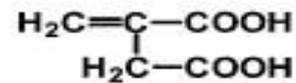
Fermentasi mempunyai pengertian suatu proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Untuk hidup semua mikroorganisme membutuhkan sumber energi yang diperoleh dari metabolisme bahan pangan dimana mikroorganisme berada di dalamnya. Bahan baku energi yang paling banyak digunakan oleh mikroorganisme adalah glukosa. Dengan adanya oksigen beberapa mikroorganisme mencerna glukosa dan menghasilkan air, karbon dioksida, dan sejumlah besar energi (ATP) yang digunakan untuk tumbuh. Ini adalah metabolisme tipe aerobik. Akan tetapi beberapa mikroorganisme dapat mencerna bahan baku energinya tanpa adanya oksigen dan sebagai hasilnya bahan baku energi ini hanya sebagian yang dipecah. Bukan air, karbondioksida, dan sejumlah besar energi yang dihasilkan, tetapi hanya sejumlah kecil energi, karbondioksida, air, dan produk akhir metabolik organik lain yang dihasilkan. Zat-zat produk akhir ini termasuk sejumlah besar asam laktat, asam asetat, dan etanol, serta sejumlah kecil asam organik volatil lainnya, alkohol dan ester dari alkohol tersebut. Pertumbuhan yang terjadi tanpa adanya oksigen sering dikenal sebagai fermentasi.

Substrat untuk fermentasi harus tersedia sepanjang tahun. Substrat yang berasal dari limbah tanaman musiman tidak mudah didapat, terutama bila periode pemanenannya pendek dan bahan tersebut mudah terkontaminasi dan menjadi buruk. Substrat yang baik untuk industri adalah yang relatif stabil dan dapat disimpan selama beberapa bulan. Jika sebagai substrat digunakan bahan buangan atau limbah suatu industri, mutu dan komposisinya sering bervariasi tergantung dari proses yang digunakan sebelumnya, harga substrat merupakan faktor penting dalam industri tetapi dalam pemilihan substrat harus diperhatikan jumlah karbon yang tersedia yang berbeda pada masing masing substrat. Faktor lain yang harus diperhatikan dalam pemilihan substrat adalah kecepatan aerasi dan atau agitasi, dimana kecepatan ini harus dinaikkan jika digunakan substrat yang lebih tereduksi (Suprihatin, 2010).

Aspergillus Niger merupakan fungi dari Ascomycota yang berfilamen mempunyai hifa, bercang-cabang dan bersekat, berwarna terang atau tidak berwarna, dan ditemukan melimpah

di alam. Fungi diisolasi dari tanah, sisa tumbuhan dan udara di dalam ruangan. *Aspergillus niger* tumbuh optimum pada suhu 35-37°C dengan suhu minimum 6-8°C dan suhu maksimum 45-47°C. proses pertumbuhan fungi ini adaah aerobic. *Aspergillus niger* memiliki warna dasar putih atau kuning dengan lapisan konidiospora yang tebal, berwarna coklat gelap. Pada Umumnya *Aspergillus Niger* dapat ditemukan dimana-mana, terutama pada tanah di daerah tropis dan subtropics serta diisolasi dari bermacam substrat termasuk biji-bijian (Ingrid dan Suharto, 2012).

Asam Itakonat adalah *Methylene butanedioic acid, methylene succinic acid, 3-carboxy-3-butanoic acid, propylenedicarboxylite acid* salah satu jenis asam organik yang dapat dengan mudah digabungkan untuk membentuk polimer dan dapat digunakan untuk menggantikan monomer berbasis petroleum dengan yang alami. asam itakonat memiliki 5 atom karbon, serta memiliki 2 gugus karboksilat. Adapun rumus molekul asam itakonat dapat dilihat pada Gambar 1.



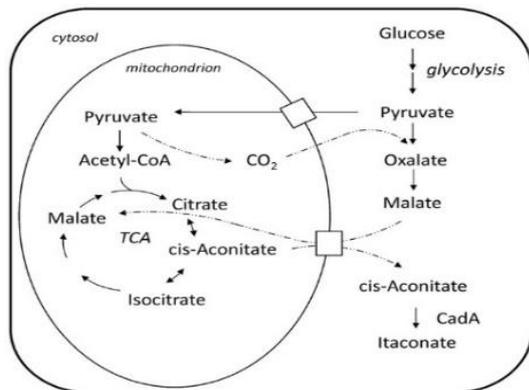
Gambar 1. Rumus Molekul asam itakonat

Asam itakonat merupakan asam organik tidak berwarna, memiliki kelarutan yang baik terhadap air serta titik didih yang tinggi yaitu 268°C . Asam itakonat dapat dimanfaatkan untuk pembentukan produk lain seperti polimer, serat, resin, deterjen, cleaner dan dental adhesive. Sifat sifat fisik dan kimia dari asam itakonat selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Sifat asam itakonat

Formula	:	C ₅ O ₄ H ₄
Berat molekul	:	130.1
Titik lebur	:	167-168°C
Titik didih	:	268°C
Kelarutan di air	:	83,103 g/L
Densitas	:	1.632 g/L
Warna	:	Bening
pH	:	2

Tahapan pembuatan asam itakonat dapat dilihat pada Gambar 2 dibawah ini:



Gambar 2. Tahapan Reaksi Pembentukan Asam Itakonat

Reaksi pembentukan asam itakonat dimulai dari substrat (bahan baku) seperti glukosa, molekul karbonnya diproses melalui tahap glikolisis menjadi piruvat. Kemudian jalur terbagi dan bagian dari karbon dimetabolisme untuk menjadi Asetil-CoA melepaskan molekul karbon dioksida. Bagian lain diubah menjadi oksaloasetat sehingga molekul karbon dioksida yang dilepas sebelumnya tergabung lagi. Pada tahap pertama dari siklus asam sitrat, terbentuk sitrat. Tahap selanjutnya yaitu, sitrat melepas H_2O sehingga menjadi cis-Aconitate. Pada tahap terakhir, cis-Aconitate masuk ke jalur / tahap khusus dan diurai oleh enzim Cis-Aconitate Decarboxylase (Cad). Di tahap ini terjadi reaksi dekarboksilasi yaitu reaksi kimia yang menyebabkan sebuah gugus karboksil ($-COOH$) terlepas dari senyawa semula menjadi karbon dioksida (CO_2) hingga terbentuk asam itakonat (Bentley and Thiessen, 1957). Asam Itakonat mempunyai banyak manfaat antara lain dapat digunakan sebagai penyedia polimer plastik, resin untuk pencampur cat, deterjen, cleaner, dan dental adhesive (wilke, 2011).

Produksi asam itakonat sensitif terhadap kandungan substratnya, seperti Fe, Mn, Cu, Zn, P dan N sehingga untuk memperoleh produksi yang maksimal perlu dilakukan pretreatment terhadap bahan baku yang akan digunakan untuk membuat substrat. Substrat yang sering digunakan adalah beet dan molase tebu. Substrat tersebut dipretreatment dengan *ion-exchange*. Selain itu, juga sering digunakan hasil dari hidrolisa pati dan gula sederhana, seperti glukosa dan fruktosa.

Proses fermentasi asam itakonat akan maksimal pada saat kandungan glukosa

terbatas, yaitu pada konsentrasi gula 100 – 150 g/L sehingga dapat dikatakan bahwa asam itakonat merupakan hasil dari metabolisme sekunder. Selama fermentasi, pH dijaga sekitar 2 pada suhu ruangan. Proses fermentasi ini merupakan fermentasi aerob. Oksigen ditambahkan selama proses fermentasi karena kondisi anaerob akan mengganggu pertumbuhan sel (wilke, 2001).

METODE

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain Fermentor aerobik, pH meter, Kertas Saring dan piknometer.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain Gliserol Hasil samping biodiesel (GHB), molase (limbah pabrik gula), *Aspergillus Niger sp.* Aquadest, NH_4NO_3 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, MgO , $Ca(OH)_2$, KH_2PO_4 , $CuNO_3$, Karbon aktif

Tahapan Penelitian

Pembuatan Starter atau Inokulum

Menyiapkan larutan gula 15% (150 g/L) dan ditambahkan nutrien berupa NH_4NO_3 0,1 gram, KH_2PO_4 0,025 g dan $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,025 g diaduk sampai homogen. Setelah itu memasukkan sekitar 2 ose *Aspergillus Niger* dan ditutup dengan aluminium foil dan diberi lubang untuk pernapasan mikroorganisme. Starter dibiarkan selama 7 hari.

Pembuatan Modifikasi Substrat

Substrat yang digunakan berupa gliserol hasil samping biodiesel yang akan dimodifikasi dengan glukosa konsentrasi 150g/L dengan perbandingan 1:1 dan dihomogenkan. Setelah itu diulangi pencampuran gliserol dengan molase (limbah pabrik gula) dengan konsentrasi 150g/L. Modifikasi substrat gliserol dengan glukosa dan molase akan digunakan sebagai substrat pada fermentor.

Pembuatan Asam itakonat

Pembuatan larutan nutrien (Jarry dan Seraudie, 1995) yaitu dengan memasukkan 1,2 g NH_4NO_3 , 0,3 g $MgSO_4$, 0,3 MgO , 0,315 g $CaOH$, 0,05 g KH_2PO_4 , 0,380 g $CuNO_3$ kedalam gelas kimia. Kemudian Menambahkan aquadest hingga mencapai 1 L. Penyesuaian pH dalam medium larutan hingga mencapai 2,8-3 dengan menambahkan larutan

asam nitrat.

Menyiapkan fermentor diisi dengan nutrisi yang telah dibuat sebanyak 1000 ml. kemudian fermentor diisi dengan perlakuan substrat gliserol sebanyak 500 ml dan ditambahkan perlakuan (glukosa dan molase 100g/L) sebanyak 500 ml (1:1) setelah tercampur substrat modifikasi gliserol diaduk sehingga terjadi pencampuran homogen. Kemudian menambahkan starter *Aspergillus Niger* sesuai dengan perlakuan (8, 12, 16, 20 dan 24 ml) dimasukkan kedalam fermentor yang telah berisi medium. Fermentor dilengkapi dengan pompa oksigen karena fermentasi berjalan secara aerobik. Fermentasi dilakukan selama 9 hari dan tiap hari dikontrol pH sekitar 2-3 dan diukur densitas. Setelah proses fermentasi selesai, kemudian larutan tersebut didinginkan selama 24 jam dengan suhu 10°C. Setelah itu larutan disaring menggunakan kertas saring. Hasil residu kemudian di timbang berat konstan untuk berat kering biomassa (gravimetri). Filtrat hasil saringan lalu di evaporasi menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 48 °C untuk mengurangi kotoran seperti air dan asam-asam organik yang lain. Hasil evaporasi ini lalu di analisa menggunakan HPLC untuk mengetahui konsentrasi asam itakonat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses pembuatan asam itakonat dengan substrat gliserol sebagai salah satu cara pemanfaatan gliserol hasil samping biodiesel (GHB), dan untuk memperbaiki kualitas GHB terlebih dahulu dimurnikan kemudian diberikan campuran glukosa dan molase untuk memperbaiki kualitas gliserol sebagai substrat untuk proses fermentasi *aspergillus niger*.

Proses fermentasi aerobik dengan laju udara konstan sekitar 0,4 L/min, menggunakan substrat modifikasi gliserol dengan cara pencampuran gliserol dengan (glukosa dan molase) dengan perbandingan volume 1:1. Proses fermentasi menggunakan starter *aspergillus niger* yang sebelumnya telah dibiakkan dengan menggunakan media biakan cair (starter). Waktu fermentasi aerobik yang digunakan untuk pembuatan asam itakonat selama 6 hari. Asam Itakonat yang dihasilkan didekati dengan metode pendekatan densitas asam itakonat, biomassa sel *aspergillus niger*

serta analisa kadar asam itakonat dengan menggunakan HPLC.

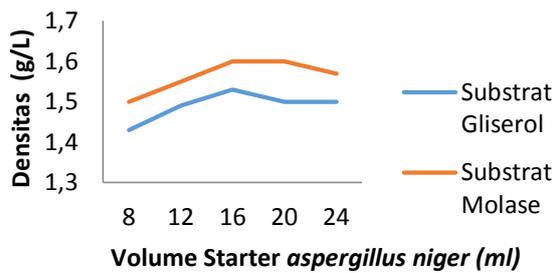
Densitas

Perlakuan penambahan starter *aspergillus niger* pada proses fermentasi aerobik dengan substrat pencampuran gliserol (glukosa dan molase 150 g/L) pada pembuatan asam itakonat berdasarkan data densitas terlihat nyata pengaruhnya. Data densitas kontrol asam itakonat sekitar 1,632 g/ml sedangkan data densitas glukosa sekitar 1,55 g/ml, molase sekitar 1,03 g/ml dan gliserol sekitar 1,24 g/ml. Perlakuan penambahan starter *aspergillus niger* terhadap densitas asam itakonat terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hubungan antara penambahan starter *aspergillus niger* terhadap densitas asam itakonat

Volume Starter (ml)	Densitas (g/ml)	
	Substrat Gliserol + Glukosa	Substrat Gliserol + Molase
8	1,50	1,43
12	1,55	1,49
16	1,60	1,53
20	1,60	1,50
24	1,57	1,50

Hubungan antara volume starter *aspergillus niger* dengan densitas asam itakonat terlihat bahwa semakin besar volume starter *aspergillus niger* maka densitas yang dihasilkan semakin mendekati densitas asam itakonat pada substrat gliserol dan molase. Volume starter optimum dihasilkan pada volume 16 ml baik untuk substrat gliserol glukosa dan gliserol molase, tetapi pada substrat gliserol glukosa untuk penambahan inokulan (starter) *aspergillus niger* pada pertambahan 20 ml masih mengalami fase stationer karena nutrisi dan lingkungan pada substrat mulai berkurang. Hubungan antara volume starter dan densitas asam itakonat terlihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Grafik Hubungan Volume Starter terhadap Biomassa sel pada substrat modifikasi gliserol

Penambahan densitas memberikan indikasi telah terbentuknya asam itakonat. Semakin besar penambahan starter *aspergillus niger* akan menghasilkan densitas yang lebih besar mendekati densitas kontrol untuk asam itakonat sekitar 1,63g/ml untuk semua jenis substrat modifikasi gliserol.

Semakin tinggi kadar asam itakonat yang dihasilkan maka densitas yang dihasilkan semakin besar karena dengan adanya asam itakonat membuat larutan semakin pekat. Pengukuran densitas menunjukkan bahwa densitas asam itakonat sekitar 1,63 g/ml sedangkan densitas gliserol sekitar 1,24 g/ml, glukosa 1,55 g/ml dan molase 1,03 g/ml. Semakin tinggi massa jenis suatu benda maka massa benda tersebut juga tinggi pada setiap satuan volume (anonim, 2016).

Selain faktor volume starter, jenis substrat dapat pula mempengaruhi pembentukan asam itakonat. Jenis substrat gliserol glukosa mempunyai glukosa yang lebih mudah digunakan oleh *aspergillus niger* sedangkan gliserol molase mempunyai kandungan pada molase yaitu sakarosa 30-40%, glukosa 9% dan fruktosa 12% serta kandungan yang lain dalam bentuk senyawa anorganik. Sehingga *aspergillus niger* merombak terlebih dahulu ke bentuk monosakarida selain itu masih adanya senyawa anorganik yang ada akan membuat kerja katalisis *aspergillus niger* berkurang sehingga densitas yang dihasilkan masih relatif lebih rendah dibandingkan dengan substrat gliserol glukosa.

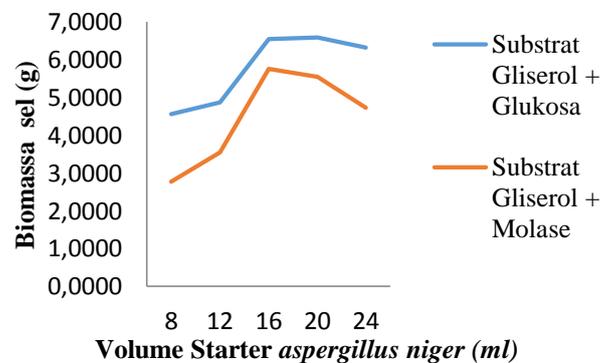
Biomassa

Pertumbuhan *aspergillus niger* sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan pada fermentor yaitu lingkungan substrat seperti suhu, pH, cahaya dan gelombang

elektromagnetik. Selain faktor lingkungan nutrisi merupakan faktor juga yang dapat mengganggu proses aktivitas mikrobial untuk dapat tumbuh sehingga menghasilkan produk asam itakonat yang tinggi.

Inokulum *aspergillus niger* adalah biokatalisator pada reaksi mikrobial substrat pencampuran gliserol (glukosa dan molase) dalam pembentukan asam itakonat. Pertumbuhan inokulum *aspergillus niger* sangat bergantung pada kondisi lingkungan dan nutrisi pada substrat. Parameter pertumbuhan *aspergillus niger* dapat terlihat pada kurva pertumbuhan yang terdiri dari fase lag (adaptasi), fase log (fase pertumbuhan), fase stationer (fase tetap tumbuh = mati) dan fase kematian dipercepat (fase penurunan pertumbuhan).

Hubungan antara biomassa *aspergillus niger* dengan volume starter terhadap substrat modifikasi gliserol terlihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Grafik Hubungan Volume Starter terhadap Biomassa sel pada substrat modifikasi gliserol

Hubungan antara biomassa dengan volume inokulum sesuai dengan kurva pertumbuhan bahwa pada penambahan volume starter 8ml masih mengalami fase adaptasi ini terjadi untuk campuran substrat gliserol glukosa dan pencampuran substrat gliserol molase. Penambahan inokulum *aspergillus niger* sebanyak 12-16 ml masih mengalami fase kenaikan populasi untuk campuran substrat gliserol dan glukosa maupun campuran gliserol molase karena di dalam substrat tersebut masih cukup tersedianya nutrisi bagi *aspergillus niger*.

Pada penambahan volume starter *aspergillus niger* 20-24 ml mengalami fase stationer pada pencampuran substrat gliserol

glukosa karena masih cukup tersedianya nutrisi tetapi karena jumlah mikroorganismenya semakin bertambah sehingga pertumbuhan dan kematian jumlahnya sama. Sedangkan pada pencampuran substrat glukosa molase pada volume starter 20-24 ml telah mengalami fase penurunan populasi atau fase kematian hal ini dapat disebabkan karena nutrisi organik yang ada didalam pencampuran gliserol molase mulai berkurang sedangkan jumlah mikroorganisme yang ada di dalam fermentor jumlahnya semakin banyak sehingga kompetitif *aspergillus niger* semakin besar dan degradasi disakarida menjadi monosakarida juga mulai menurun. Sehingga sangat terlihat pengaruh penambahan volume inokulum dan jenis substrat untuk menghasilkan pertumbuhan sel *aspergillus niger*.

Hubungan antara biomassa dengan volume starter terlihat pada substrat gliserol glukosa menghasilkan biomassa yang jauh lebih banyak dibandingkan gliserol molase pada volume yang sama. Pada volume starter 16 ml merupakan kondisi optimum yang dihasilkan pada kedua substrat.

Biomassa mengalami penurunan dengan penambahan inokulan yang lebih banyak pada substrat gliserol molase hal ini dapat disebabkan karena jumlah starter yang banyak tidak diimbangi dengan jumlah nutrisi dan kondisi lingkungan yang didapatkan pada substrat. Nutrisi yang dibutuhkan oleh *aspergillus niger* semakin berkurang sedangkan jumlah *aspergillus niger* semakin banyak sehingga akan terjadi kompetisi homogen pada *aspergillus niger* dan adanya senyawa anorganik dan gugus sakarosa pada molase yang membutuhkan perombakan ke gugus monosakarida sehingga akan mengurangi jumlah nutrisi yang ada didalam medium dan membutuhkan waktu fermentasi yang lebih lama. Beberapa kotoran dalam molase seperti adanya senyawa an organik yang akan mengganggu proses degradasi mikroorganisme untuk proses fermentasi asam itakonat.

Untuk substrat gliserol glukosa mengalami fase adaptasi pada penambahan 8 ml starter begitu juga terhadap gliserol molase, kemudian mengalami fase pertumbuhan atau fase logaritmik pada penambahan 12ml – 20ml untuk gliserol glukosa sedangkan gliserol molase hanya pada volume 12ml – 16ml setelah itu gliserol molase mengalami fase

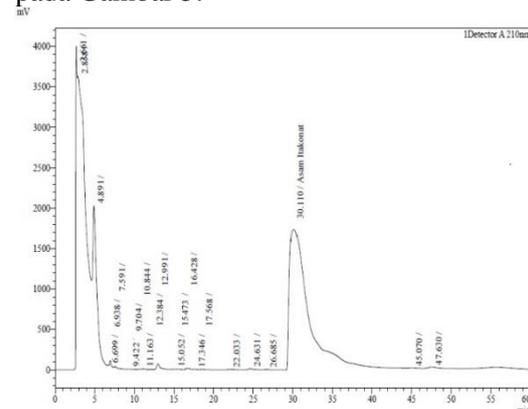
penurunan jumlah biomassa sedangkan untuk gliserol glukosa masih mengalami fase stationer. Dengan demikian substrat gliserol glukosa masih cukup memberikan faktor nutrisi dan lingkungan yang memenuhi sehingga fase penurunan jumlah mikroorganisme belum terjadi.

Kadar Asam Itakonat

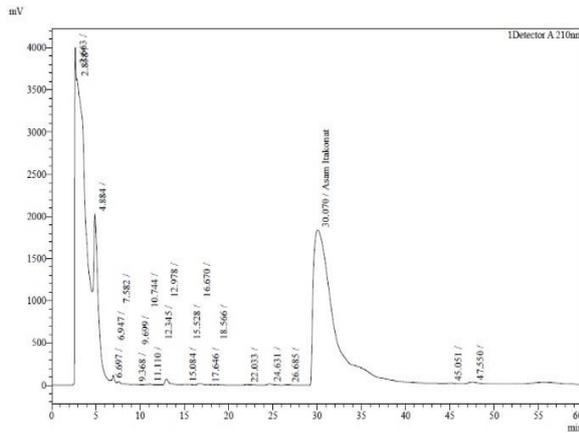
Fermentasi substrat gliserol yang telah dimodifikasi dengan pencampuran glukosa dan molase untuk menghasilkan produk asam itakonat dan meningkatkan kerja katalisis *aspergillus niger* dengan memberikan kondisi lingkungan serta nutrisi yang lebih banyak.

Pada analisa biomassa terlihat jumlah biomassa lebih banyak pada volume starter 16 ml untuk substrat gliserol glukosa dan gliserol molase. Sehingga dengan jumlah biomassa yang lebih banyak dapat meningkatkan aktivitas katalisis metabolit *aspergillus niger*. Kinerja sel inilah yang menjadi parameter dalam pembentukan asam itakonat selain itu faktor jenis substrat juga mempengaruhi proses katalisis. Jenis substrat gliserol glukosa mempunyai tingkat penyediaan sumber karbon yang tinggi dibandingkan substrat gliserol molase sehingga proses katalisis *aspergillus niger* pada gliserol glukosa lebih tinggi dibandingkan gliserol molase.

Pembentukan asam itakonat pada substrat modifikasi gliserol terlihat ada pengaruh dari perlakuan tersebut. modifikasi gliserol pada substrat dilakukan untuk memperbaiki proses katalisis *aspergillus niger* dalam menghasilkan metabolit dalam membantu proses pembentukan asam itakonat. Terbentuknya asam itakonat dapat dilihat pada hasil analisa kromatogram HPLC asam itakonat terlihat pada Gambar 5.



(a)

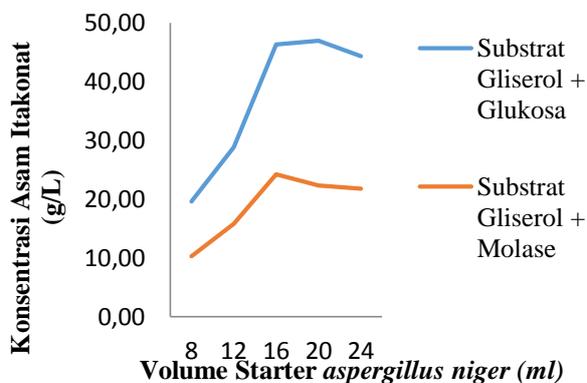


(b)

Gambar 5. Hasil Kromatogram Asam itakonat (a) substrat gliserol glukosa, (b) substrat gliserol molase

Terlihat dari gambar hasil kromatogram adanya puncak asam itakonat yang terbentuk pada kedua substrat tersebut. sehingga diindikasikan pada kedua jenis substrat tersebut dapat digunakan untuk membuat asam itakonat atau telah terbentuk asam itakonat dari kedua substrat pada volume starter 16 ml. Pada hasil kromatogram di atas terlihat pada retention time sekitar 30,110 menit telah terlihat peak asam itakonat dengan luas area sekitar 43,635 % untuk substrat gliserol glukosa dan luas area 43,335% untuk gliserol molase.

Pengaruh penambahan volume strater pada proses katalisis *aspergillus niger* untuk jenis substrat modifikasi gliserol terhadap pembentukan asam itakonat dapat dilihat dengan jelas kombinasi perlakuan pada Gambar 6.



Gambar 6. Grafik hubungan antara volume starter *aspergillus niger* pada substrat modifikasi gliserol terhadap konsentrasi asam itakonat.

Pengaruh volume starter terhadap pembentukan asam itakonat pada modifikasi gliserol terlihat bahwa semakin banyak volume starter *aspergillus niger* yang ditambahkan akan menghasilkan asam itakonat yang tinggi pula, tetapi kondisi optimum yang dihasilkan pada modifikasi substrat gliserol adalah 16 ml. Banyaknya starter yang ditambahkan mengindikasikan bahwa banyaknya *aspergillus niger* yang dapat membantu proses pembentukan asam itakonat. Asam itakonat yang dihasilkan pada *aspergillus niger* merupakan hasil metabolit sekunder atau reaksi berkelanjutan dari asam sitrat setelah itu sitrat melepas H_2O untuk pembentukan asam itakonat.

Keberadaan *aspergillus niger* pada kondisi pertumbuhan sangat dibutuhkan, pada 16 ml starter dapat menghasilkan asam itakonat yang lebih besar pada kedua substrat. Tetapi pada kondisi 20 ml untuk substrat gliserol glukosa masih mengalami nilai yang stabil (tetap) karena nutrisi yang ada pada substrat mulai berkurang sehingga enzim yang dihasilkan pada pmbutan gugus karboksilat pada pembentukan asam itakonat juga mengalami penurunan.

Jenis substrat juga mempengaruhi pembentukan asam itakonat, jenis substrat gliserol glukosa pada volume starter yang sama yaitu 16 ml menghasilkan asam itakonat yang lebih besar dibandingkan dengan substrat gliserol molase hal ini dapat disebabkan karena pada gliserol glukosa mempunyai struktur glukosa sederhana yaitu monosakarida sehingga sangat mudah *aspergillus niger* untuk melakukan tahap glikolisis asam piruvat dan melanjutkan dengan metabolisme asam itakonat. Sedangkan substrat glukosa molase asam itakonat yang dihasilkan masih rendah karena molase mempunyai komposisi sakarosa yang besar dibanding glukosa, dan sakarosa merupakan glukosa majemuk sehingga akan mengalami tahap glikolisis yang agak lambat karena harus proses perombakan substrat dari sakarosa menjadi glukosa. Dengan begitu hasil asam itakonat yang dihasilkan pun masih lebih sedikit.

Banyaknya jamur *aspergillus niger* yang digunakan harus sesuai karena jika *aspergillus niger* yang digunakan untuk mengkonversi glukosa menjadi asam itakonat sedikit maka kemampuan *aspergillus niger* untuk fermentasi menjadi berkurang, begitupula jika

aspergillus niger yang digunakan berlebihan maka akan menghambat proses fermentasi dimana akan terjadi kematian pada *aspergillus niger* (Firman dan Aryantha,2003). Sehingga optimum *aspergillus niger* yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 16 ml untuk 1000 ml nutrisi dan 1000 ml substrat.

Proses pembentukan asam itakonat adalah hasil metabolisme sekunder, sehingga sangat membutuhkan faktor nutrisi dan lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhan *aspergillus niger* sehingga akan memudahkan proses katalisis. Faktor lingkungan yang ada di dalam medium atau bioreaktor dijaga kondisinya tetap seperti laju alir udara sekitar 0,4 ml/min karena proses fermentasi aerobik, pH, suhu, cahaya dan gaya mekanik yang ada di dalam medium serta gelombang elektromagnetik.

Faktor nutrisi dan lingkungan inilah dapat dilihat pada Gambar 4, bahwa pada volume starter 16 ml untuk semua substrat mengalami fase pertumbuhan yang sangat cepat sehingga jumlah biomassa yang ada pun semakin banyak sehingga proses katalisis metabolime semakin besar sehingga produk asam itakonat yang dihasilkan semakin banyak atau konsentrasi asam itakonat yang dihasilkan semakin tinggi.

Asam itakonat dapat terbentuk dengan proses fermentasi aerobik *aspergillus niger* dengan substrat yang mengandung unsur nutrisi C,H dan O, dengan jumlah *aspergillus niger* yang tertentu sekitar 16 ml untuk media biakan cair dan substrat gliserol dengan dimodifikasi agar memperbaiki faktor nutrisi yang ada di gliserol dengan cara mencampur dengan glukosa dan molase. Modifikasi gliserol dengan menambahkan glukosa dan molase dengan konsentrasi glukosa sebesar 150 g/L dan difermentasi selama 9 hari.

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

SIMPULAN DAN SARAN

Hasil penelitian menunjukkan terjadinya interaksi yang nyata antara volume starter *aspergillus niger* terhadap kadar asam itakonat, densitas dan biomassa yang dihasilkan. Kombinasi perlakuan pada volume

starter *aspergillus niger* 16 ml merupakan kondisi optimum pada jenis substrat gliserol glukosa menghasilkan asam itakonat sebesar 46,27 g/L sedangkan untuk substrat gliserol molase sebesar 24,23 g/L.

Semakin tersedianya nutrisi dan faktor lingkungan yang memenuhi akan menghasilkan biomassa *aspergillus niger* semakin banyak sehingga proses katalisis berjalan dengan baik, begitu juga dengan kondisi substrat yang merupakan unsur C, H dan O merupakan unsur penting yang dibutuhkan mikroorganisme untuk melakukan pertumbuhan sehingga hasil metabolisme yang dihasilkan pun semakin banyak berupa asam itakonat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada P3M Polnes, Jurusan Teknik Kimia polnes dan Kemenristek Dikti yang telah memberikan pendanaan atas Skim Penelitian Produk Terapan. Sesuai Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA). Nomor: 042-06.1.401516/2017 tanggal 06 Desember 2016.

DAFTAR PUSTAKA

- Amina M. Ahmed El-Imam, Muinat O. Kazeem, Mutiat B. Odebisi, Mushaffa A.OKE, Azeezat O. Abidoye. 2010. Production Of Itaconic Acid from *Jatropha Curcas* Seed Cake by *Aspergillus Terreus*. Februari 29, 2016. <http://www.notulaebiologicae.ro>
- Appleby, D.B, 2005, " *Gliserol on The Biodiesel Handbook,*" AOCS Press
- Azis, Isalmi., et al. 2008. Pemurnian Gliserol Dari Hasil Samping Pembuatan biodiesel Menggunakan Bahan Baku Minyak Goreng Bekas. Jakarta : Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Syarif Hidayatullah. Februari 28, 2016
- Bentley, R., and C. P. Thiessen. 1957. *Biosynthesis of itaconic acid in Aspergillusterreus. III. The properties and reaction mechanism of cis-aconitic acid decarboxylase. J. Biol. Chem.* 226:703–720.
- Damara.D. (2015). Pembuatan Asam Itakonat menggunakan bahan baku gliserol dengan variasi massa glukosa.

- Politeknik Negeri Samarinda Jurusan Teknik Kimia. Samarinda
- Farobie O. 2009. Pemanfaatan Gliserol Hasil Samping Produksi Biodiesel Jarak Pagar sebagai Bahan Penolong Penghancur Semen. [Tesis]. Bogor : Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Firman, dan Aryantha, 2003. “Eksplorasi dan Isolasi Enzim Glukosa Oksidasedari Fungi Inperfekti (Genus *Penicillium* dan *Aspergillus*) Indigenus”. KPP Ilmu Hayati LPPM ITB
- Gandjar dkk. 2006. Mikrobiologi Dasar dan Terapan. Yayasan Obor Indonesia: 2006
- Hambali, E. dkk. 2007. Teknologi Bioenergi. Agro Media Pustaka. Jakarta
- Hart, Hanold. 1983. Kimia Organik Suatu Kuliah Singkat Edisi Keenam. Jakarta : Erlangga
- Jarry, A., Seraudie, Y. 1995. Production of itaconic acid by fermentation. US Pat. N° 5.457.040.
- Inggrid, M., & Suhartp, I.(2012). Fermentasi Glukosa oleh *Aspergillus Niger* menjadi Asam Glukonat. Universitas Katolik Parahayangan
- Kementerian Energi dan Sumber Daya Mineral, 2013. Program Percepatan Pemanfaatan Bahan Bakar Nabati. <http://www.esdm.go.id/siaran-pers/55-siaran-pers/6424-program-percepatan-pemanfaatan-bahan-bakar-nabati.html>, diakses pada 29 Februari 2016
- Knothe G, Van Gerpen J, Krahl J. 2005. The Biodiesel Handbook. Illinois: AOCS Press
- Lai, Long Shan, Chih-Sheng Hung, Chi-chu-Lo. 2007. Effect of Lactose and Glucose on Production of Itaconic Acid and Lovastatin by *Aspergillus Terreus* ATCC 20542. Chaoyang University of Technology
- Mardiansyah, D. 2012. Pembuatan Biodiesel dari Minyak Jarak Pagar. Medan. Universitas Sumatra Utara.
- M. I. Juy, J.A. Orejas, M.E. Lucca. 2010. *Study of itaconic acid production by Aspergillus terreus MJL05 strain with Different Variable.*
- National Biodiesel Board. 2010. *Uses of Methyl Esters, Glycerol. National Biodiesel Board Report Database. Washington DC, USA. www.Biodiesel.org/resources/reportsdatabase/reports/gen/19960901_GEN-051.pdf.* Diakses pada 18 Februari 2015
- Papanikolaou S, Aggelis G. *Modelling aspects of the biotechnological valorization of raw glycerol: production of citric acid by Yarrowia lipolytic and 1, 3-propanediol by Clostridium butyricu. J Chem Technol Biotechnol.* 2003;78:542–547. doi: 10.1002/jctb.831.
- Suprihatin. 2010. Teknologi Fermentasi. Surabaya: UNISA Press.
- Wilke, Th., 2001, “*Biotechnical Production of Itaconic Acid*”, *Appl Microbiol Biotechnol.*