

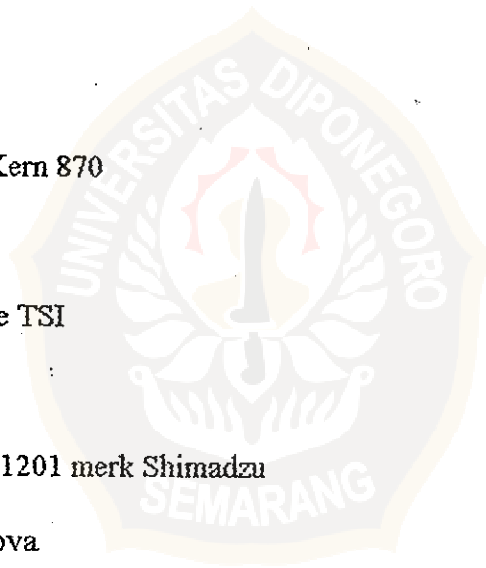
BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Peralatan yang digunakan :

- a. Alat-alat gelas yang diperlukan dalam preparasi
- b. Botol 150 mL
- c. Kapas
- d. Kertas Sampul
- e. Kertas Saring
- f. Jarum Osse
- g. Timbangan Listrik merk Kern 870
- h. pH meter
- i. Autoklaf Medical Prestige TSI
- j. Orbital Shaker TS-330 A
- k. Spektrofotometer Uv-Vis 1201 merk Shimadzu
- l. Pemanas Listrik merk Nuova
- m. Benang Kasur
- n. Sentrifuse 3400 rpm model 228



3.1.2 Bahan-bahan yang digunakan

- a. Biakan jamur *Aspergillus niger* 6088 IFO 6341 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi PAU-UGM
- b. Akuades
- c. Kecambah Kacang Hijau
- d. Gula Pasir
- e. Agar-agar
- f. Glukosa p.a
- g. Magnesium sulfat heptahidrat p.a
- h. Ammonium nitrat p.a
- i. Kalium dihidrogen fosfat p.a
- j. Kalsium klorida p.a
- k. Asam sulfat pekat
- l. Natrium hidroksida 0,1 N
- m. Asam klorida 0,1 N
- n. Natrium karbonat p.a
- o. Natrium hidrogen karbonat p.a
- p. Kalium natrium tartrat p.a
- q. Natrium sulfat p.a
- r. Kupri sulfat pentahidrat p.a
- s. Ammonium molibdat p.a
- t. Natrium arsenat heptahidrat p.a



- u. Air cucian beras
- v. Tepung tapioka

3.2 Sumber Karbohidrat

Sumber karbohidrat yang digunakan dalam penelitian adalah :

- a. Pasta pati dan pasta pati saring yang diperoleh dari air cucian beras
- b. Glukosa
- c. Tepung tapioka

3.3 Variabel Penelitian

a. Variabel Tetap

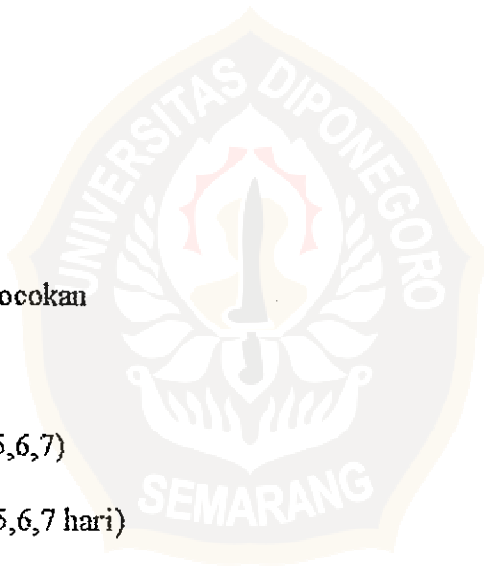
- Konsentrasi karbohidrat
- Jumlah biomassa awal
- Suhu dan kecepatan pengocokan

b. Variabel Berubah

- pH medium (pH 1,2,3,4,5,6,7)
- Waktu inkubasi (1,2,3,4,5,6,7 hari)

c. Variabel yang ditentukan

- Jumlah produksi asam sitrat
- pH akhir
- Konsentrasi gula akhir (dalam bentuk glukosa)
- Jumlah produksi biomassa



3.4 Preparasi Larutan

a. Pembuatan medium agar miring TEA (Taoge Ekstrak Agar)⁽¹³⁾

1. Sebanyak 100 g kecambah direbus dengan 1 L akuades selama \pm 2 jam
2. Rebusan kecambah kemudian disaring dan ditambahkan 60 g gula pasir kemudian direbus kembali sampai gula larut. Berikut tambahkan akuades sehingga volume larutan kembali seperti semula.
3. Ke dalam larutan ditambahkan agar-agar sebanyak 20 g, panaskan dalam penangas air selama 20 menit sambil diaduk sehingga semua agar-agar larut.
4. Sebanyak 5 mL larutan TEA dituang ke dalam tabung reaksi, tutup tabung dengan kapas dan kertas sampul, ikat dengan benang. Sterilkan medium dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 126°C , kemudian diamkan dalam posisi miring selama 24 jam pada suhu kamar. Medium siap digunakan.

b. Pembuatan medium pertumbuhan jamur⁽¹⁴⁾

1. Dilarutkan sebanyak 50 g glukosa; 2,06 g ammonium nitrat; 1,2 g kalium dihidrogen fosfat dan 0,5 g magnesium sulfat heptahidrat dengan akuades hingga volume larutan menjadi 1 L.
2. pH larutan diatur seperti yang dikehendaki dengan menambahkan HCl 0,1 N atau NaOH 0,1 N.
3. Dituang sebanyak 30 mL larutan yang tersebut (2) kedalam botol 150 mL, tutup botol dengan kapas dan kertas sampul, ikat dengan benang.

4. Sterilkan medium dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 126°C . Dinginkan dan diamkan medium selama 24 jam pada suhu kamar. Medium siap untuk digunakan.

c. Pembuatan medium fermentasi⁽¹⁴⁾

1. Dilarutkan sebanyak 150 g karbohidrat; 2,06 g ammonium nitrat; 1,2 g kalium dihidrogen fosfat dan 0,5 g magnesium sulfat heptahidrat dengan akuades hingga menjadi 1 L larutan. Atur pH larutan dengan menambahkan HCl/NaOH 0,1 N.
2. Sebanyak 25 mL larutan dituang kedalam botol 150 mL, tutup botol dengan menggunakan kapas dan kertas sampul, ikat dengan benang.
3. Sterilkan medium dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 126°C . Diamkan dalam suhu kamar selama 24 jam. Medium siap digunakan.

d. Pembuatan Reagen Nelson⁽¹⁵⁾

1. Reagen Nelson A

Sebanyak 12,5 g Na_2CO_3 , 12,5 g kalium natrium tartrat, 10 g NaHCO_3 , 100 g Na_2SO_4 dilarutkan dalam 350 mL akuades kemudian diencerkan hingga volume larutan 1 L.

2. Reagen Nelson B :

Dilarutkan 7,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam 50 mL akuades. Tambahkan 1 tetes H_2SO_4 pekat kedalam larutan.

3. Reagen Nelson dibuat dengan mencampur reagen Nelson A dan reagen Nelson B dengan perbandingan 25 : 1. Pencampuran dilakukan setiap akan digunakan.

e. Pembuatan Reagen Arsenomolibdat⁽¹⁵⁾

1. Dilarutkan 25 g ammonium molibdat dalam 450 mL akuades, kemudian ditambahkan kedalamnya 25 mL H₂SO₄ pekat .
2. Dilarutkan 3 g Na₂HAsO₄·7H₂O dalam 25 mL akuades lalu dituang larutan ini ke dalam larutan no. 1 diatas.
3. Simpan larutan dalam botol coklat dan inkubasi reagen selama 24 jam suhu 37°C.

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Penentuan Kadar Glukosa⁽¹⁵⁾

3.5.1.1 Penentuan panjang gelombang maksimum

- a. Dilarutkan glukosa sebanyak 10 mg dalam 100 mL akuades
- b. Dua tabung reaksi masing-masing diisi 1 mL larutan glukosa dan 1 mL akuades. tambahkan masing-masing 1 mL reagen Nelson, kemudian dipanaskan dalam penangas air selama 20 menit. Selanjutnya larutan didinginkan sampai suhu 25°C.
- c. Tambahkan 1 mL reagen Arsenomolibdat dan gojog sampai Cu₂O larut.
- d. Tambahkan 7 mL akuades, diukur serapannya dengan spektrometer Uv-Vis pada panjang gelombang 480-770 nm.

3.5.1.2 Pembuatan kurva standar

- a. Dilarutkan 20 mg glukosa dalam 100 mL akuades. Larutan kemudian diencerkan hingga konsentrasinya menjadi 2,4,6,8,10,12,14,16,18 dan 20 mg/100 mL.
- b. Sembilan tabung reaksi masing-masing diisi dengan 1 mL larutan glukosa dan 1 tabung diisi dengan 1 mL akuades. Tambahkan reagen Nelson sebanyak 1 mL, selanjutnya diperlakukan seperti pada penentuan panjang gelombang maksimum.

- c. Diukur serapannya dengan spektrometer Uv-Vis pada panjang gelombang maksimum.

3.5.1.3 Penentuan kadar glukosa sampel

Sebanyak 1 mL sampel dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah 1 mL reagen Nelson dan selanjutnya diperlakukan seperti langkah 3.5.1.2

3.5.2 Penanaman jamur *Aspergillus niger* dalam medium agar miring⁽¹⁶⁾

- a. Jarum osse dicelupkan pada alkohol 60 % lalu dipijarkan dalam nyala spiritus.
- b. Tutup tabung berisi biakan *Aspergillus niger* murni dan tabung berisi medium TEA dibuka, kemudian dipanaskan ujung kedua tabung dalam nyala spiritus.
- c. Dengan menggunakan ujung jarum osse diambil biakan murni kemudian ditanamkan ke dalam medium TEA dengan cara menggores dari pangkal ke ujung tabung secara zig-zag.
- d. Kedua tabung disterilkan kembali dengan cara dipanaskan ujungnya dalam nyala spiritus kemudian tutup kembali kedua tabung.
- e. Biakan dalam medium TEA diinkubasi pada suhu kamar.

3.5.3 Penanaman jamur *Aspergillus niger* dalam medium pertumbuhan⁽¹⁶⁾

- a. Jarum osse disterilkan dengan cara seperti tersebut di atas (langkah 3.5.3.a).
- b. Penutup tabung berisi biakan dalam medium TEA dan penutup tabung berisi air steril dibuka kemudian dipanaskan ujung kedua tabung tersebut dalam nyala spiritus.
- c. Dengan menggunakan ujung jarum osse diambil biakan kemudian disinggungkan pada permukaan air steril. Kocok tabung berisi air hingga biakan rata dalam air tersebut.

- d. Dibuka tutup botol medium pertumbuhan dan disterilkan dengan memanaskan mulut botol dalam nyala spiritus.
- e. Dengan menggunakan pipet steril dipindahkan 0,5 mL larutan jamur *Aspergillus niger* ke dalam medium pertumbuhan.
- f. Botol kemudian disterilkan kembali dalam nyala spiritus dan tutup kembali botol tersebut.
- g. Biakan diinkubasi dengan shaker goyangan 200 rpm pada suhu kamar selama 72 jam. Pertumbuhan diamati setiap 3 jam dengan menggunakan spektrometer Uv-Tampak pada panjang gelombang 620 nm

3.5.4 Pemindahan jamur *Aspergillus niger* ke dalam medium fermentasi⁽¹⁶⁾

- a. Botol berisi biakan *Aspergillus niger* dan botol berisi medium fermentasi dibuka penutupnya kemudian disterilkan dalam nyala spiritus.
- b. Dengan menggunakan pipet steril dipindahkan 2,5 mL biakan *Aspergillus niger* ke dalam medium fermentasi.
- c. Disterilkan kembali botol tersebut dalam nyala spiritus dan tutup kembali mulut botol.
- d. Fermentasi dilakukan selama 7 hari dengan menggunakan shaker goyangan 200 rpm pada suhu kamar.

3.5.5 Analisis hasil fermentasi

1. Dilakukan pengukuran pH akhir larutan
2. Larutan disentrifuse 3400 rpm selama 15 menit kemudian disaring untuk memisahkan jamur. Jamur yang diperoleh dicuci dengan akuades, dikeringkan kemudian ditimbang.

3. Dilakukan pengukuran glukosa yang tersisa dari proses fermentasi tersebut.
4. Untuk mendapatkan asam sitrat, filtrat dipanaskan dan ditambah kalsium klorida sehingga diperoleh garam kalsium sitrat. Larutan kemudian ditambah asam sulfat dan kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh mengandung asam sitrat yang akan mengkristal bila larutan didinginkan. Asam sitrat yang diperoleh disaring dan dikeringkan kemudian ditimbang.⁽³⁾
5. Dilakukan penentuan titik leleh dan analisa kualitatif terhadap asam sitrat hasil fermentasi.

