

11.3

**PENUNTUN DAN LAPORAN PRATIKUM
TEKNOLOGI FERMENTASI**

Oleh :

Dr. Ir. Alfi Asben, M. Si

Dr. Ir. Novelina, M.S

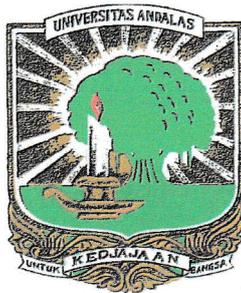
Risa Meutia Fiana, S. TP



**TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG**

2013

**PENUNTUN DAN LAPORAN PRATIKUM
TEKNOLOGI FERMENTASI**



Disusun Oleh :

Dr. Ir. Alfi Asben, M. Si

Dr. Ir. Novelina, M.S

Risa Meutia Fiana, S. TP

**Mengetahui
Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas Teknologi Pertanian**



**Dr. Ir. Novelina, M. S
NIP. 195611071986032001**

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Allah yang Maha Kuasa, karena atas rahmat dan karunia-Nya penuntun pratikum Teknologi Fermentasi ini dapat diselesaikan.

Pratikum Teknologi Fermentasi ini merupakan bahagian dari mata kuliah Teknologi Fermentasi yang diajarkan pada semester VI. Untuk dapat mengikuti perkuliahan dan pratikum mahasiswa/i telah harus mengikuti mata kuliah pendukung yang relevan seperti Mikrobiologi Umum, Mikrobiologi Pangan dan lainnya.

Penuntun pratikum ini menitik beratkan pada proses fermentasi, termasuk pembuatan produk fermentasi dan pengenalan fermentor. Topik-topik yang berhubungan dengan prosedur aseptis di laboratorium, isolasi, inokulasi dan pemeliharaan mikroba tidak dibahas dalam penuntun ini. Topik tersebut sudah didapatkan mahasiswa pada mata kuliah pendukung yang relevan seperti Mikrobiologi Umum dan Mikrobiologi Pangan.

Proses-proses analisa dari produk fermentasi yang dicobakan dalam penuntun pratikum ini juga dapat dilakukan oleh mahasiswa/i. Mahasiswa/i yang mengikuti pratikum ini juga telah harus menyelesaikan mata kuliah Kimia Analitik maupun Analisis Hasil Pertanian. Diharapkan penuntun pratikum Teknologi Fermentasi ini dapat melengkapi dan membantu dalam materi yang diberikan dalam kuliah.

Penuntun pratikum ini masih banyak kekurangannya. Oleh sebab itu, masukan dan kritikan yang konstruktif diharapkan untuk kesempurnaan dan kelengkapan dari penuntun pratikum ini.

Padang, Maret 2013

Tim Penyusun

DAFTAR ISI

	Halaman
Kata Pengantar	i
Daftar Isi	ii
Tata Tertib Kerja di Laboratorium Mikrobiologi	iii
I. KURVA PERTUMBUHAN	1
II. MINUMAN PROBIOTIK	12
III. ETANOL	15
IV. ASAM SITRAT	19
V. PIGMEN ANGGKAK	24
VI. PENGENALAN FERMENTOR	28
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	35

Tata Tertib Kerja Di Laboratorium Mikrobiologi

1. Pratikum diwajibkan mengenakan jas laboratorium yang bersih dan berwarna terang (putih).
2. Sebelum dan sesudah kerja, meja kerja dilap dengan desinfektan kemudian dikeringkan dengan lap yang bersih.
3. Sebelum dan sesudah bekerja, tangan dicuci dengan sabun sampai bersih. Kuku yang panjang harus mendapat perhatian khusus waktu membersihkan tangan. Pekerjaan ini harus diulangi sebelum dan sesudah kembali dari kamar kecil.
4. Selama berada di laboratorium tidak diperkenankan merokok, makan dan minum.
5. Semua mikroba yang terdapat di laboratorium harus diperlakukan sebagai mikroba patogen, karena itu tangan harus dijauhkan dari mulut, hidung dan mata.
6. Biakan mikroba yang tercecer harus segera dibersihkan dengan desinfektan dan dibuang ke tempat sampah yang disediakan.
7. Membawa biakan ke luar dan ke dalam laboratorium harus seizin petugas laboratorium.
8. Buanglah sampah-sampah yang tidak terkontaminasi di tempat yang disediakan.
9. Bila anda terkontaminasi atau terluka hubungi asisten anda dan petugas laboratorium.
10. Lup inokulasi dan jarum inokulasi harus disterilkan dengan cara memijarkan seluruh panjang kawatnya sebelum dan sesudah setiap penggunaan.
11. Bila pipet yang sama perlu digunakan lebih dari satu kali, janganlah langsung meletakkannya di atas meja diantara penggunaan tetapi letakkan pada penyangga pipet yang telah disediakan.
12. Api pembakar bunsen harus dikecilkan atau dimatikan pada waktu tidak digunakan.

13. Sebelum meninggalkan laboratorium, hal-hal berikut hendaknya benar-benar diperhatikan:

- a. Biakan-biakan yang tidak diperlukan lagi, serta alat bekas pakai harus diletakkan pada tempat yang disediakan.
- b. Pipet diletakkan pada tempat yang berisi desinfektan.
- c. Cawan peti, labu, tabung reaksi dan lain-lain yang telah dibersihkan diletakkan pada tempat yang disediakan.
- d. Alalt-alat lain dibersihkan dan diletakkkan pada tempat semula

14. Selesai melakukan pekerjaan dan sebelum meninggalkan ruangan laboratorium, sambungan listrik ke alat-alat yang tidak digunakan lagi, aliran air (kran air), aliran gas, pembakar bunsen, serta lampu spritus harus dimatikan.

I. KURVA PERTUMBUHAN

(Penentuan Laju Pertumbuhan Spesifik (μ) Koefisien Yield (Y_x/s) dan Y_p/s) pada Kultur *Batch*)

I.1 Pendahuluan

Pertumbuhan mikroorganisme dipengaruhi oleh adanya nutrisi dan faktor lingkungan. Bahan nutrisi yang digunakan mikroorganisme biasanya berupa senyawa sederhana yang tersedia secara langsung atau berasal dari senyawa yang kompleks yang kemudian dipecah oleh mikroorganisme menjadi senyawa yang sederhana melalui proses enzimatik. Bahan nutrisi dalam media ini dapat berupa cairan atau padatan setengah padat.

Pertumbuhan bakteri pada umumnya ditandai dengan empat fase yang khas, yakni periode awal yang tampaknya tanpa pertumbuhan (fase lamban atau lag phase) diikuti oleh suatu periode pertumbuhan yang cepat (fase log), kemudian mendatar (fase statis atau stationari phase), dan akhirnya diikuti oleh suatu penurunan populasi sel-sel hidup (fase kematian atau penurunan). Di antara setiap fase ini ada suatu periode peralihan yang menunjukkan lamanya waktu sebelum semua sel memasuki fase yang baru.

Pada kultur *batch*, bila suatu medium pertumbuhan diinokulasikan dengan sel mikrobial maka terjadi pertumbuhan sel yang apabila digambarkan dengan grafik hubungan antara kadar sel mikrobial, x (mg/l) lawan waktu inkubasi, t (jam) menunjukkan pola yang tipikal dengan tahapan-tahapan (fase) seperti Gambar 1.

Perbanyakan sel mikrobial berlangsung dengan cara penggandaan, setiap satu sel menjadi dua sel dalam suatu periode waktu yang konstant yang disebut waktu penggandaan atau 'doubling time' (t_d). Pada fase pertumbuhan logaritmik (selanjutnya disebut fase log), kecepatan pertumbuhan sel dinyatakan secara matematis sebagai berikut :

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \dots\dots\dots(1.1)$$

dinyatakan dengan $Y_{x/s}$ atau *growth yield* yang secara matematis ditulis sebagai berikut ini :

$$Y_{x/s} = \Delta x / \Delta s \dots\dots\dots(1.4)$$

Δx adalah kenaikan jumlah biomassa sebagai akibat digunakannya substrat sebanyak Δs . Pada kebanyakan bakteri dan yeast yang ditumbuhkan pada glukosa secara aerob mempunyai nilai $Y_{x/s}$ sebesar 0,4 – 0,6.

Pada pembentukan produk yang *growth associated* analogi dengan Persamaan 1.4 Dapat dipakai untuk menyatakan hubungan antara banyaknya produk yang dihasilkan dengan substrat yang dikonsumsi, $Y_{p/s}$

$$Y_{p/s} = \Delta p / \Delta s \dots\dots\dots(1.5)$$

Δp adalah kenaikan jumlah produk yang terbentuk sebagai akibat digunakannya substrat sebanyak Δs , dan $Y_{p/s}$ disebut koefisien hasil pembentukan produk.

I 2. Kurva pertumbuhan *Lactobacillus plantarum/ Lactobacillus bulgaricus*

I.2.1 Metodologi

A. Bahan dan Alat

Mikroorganisme : *Lactobacillus plantarum* UA3 (*Lactobacillus bulgaricus*)

Medium : Medium MRS

Bahan dan Peralatan : 250 mL medium MRS dalam labu Erlenmeyer 500 mL, kultur murni *L. plantarum* UA3 (*L. bulgaricus*), pipet ukur 1 mL steril, pipet ukur 10 mL steril, spektrofotometri, pereaksi DNS (penentuan glukosa), sentrifus, larutan NaOH 0.1N, larutan phenol, Buret, Erlemeyer 100 mL dan lain-lain.

B. Cara Kerja

1. Percobaan dimulai dengan mensentrifugasi 200 mL kultur *L. plantarum* (*L. bulgaricus*), yang berumur 18 jam. Suspensikan pelet yang diperoleh dengan 100 mL larutan NaCl 0.85% (100 mL suspensi sel *L. plantarum* (*L. bulgaricus*), ini dipakai untuk satu golongan).
2. Inokulasikan 12 mL suspensi sel *L. plantarum* (*L. bulgaricus*), ke dalam 300 mL medium MRS. Goyang hingga homogen dan segera diambil

sampel awal sebanyak 20 mL secara aseptis. Selanjutnya kultur diinkubasikan pada suhu inkubasi 30 °C atau suhu ruang (tanpa digoyang).

3. Sampel awal tersebut segera diukur pH dan absorbansinya pada panjang gelombang 660 nm, dan setelah itu sisa sampel disentrifugasi pada 3000 g selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh dianalisa kandungan glukosa dan asam laktatnya. Catat hasil pengukurannya.

Catatan: *apabila supernatan tidak bisa segera dianalisis, sampel disimpan dalam freezer sampai saatnya dilakukan analisis.*

4. Selanjutnya untuk setiap interval waktu tertentu diambil sampel berikutnya (interval waktu *sampling* ditentukan berdasarkan kadar glukosa awal) dan dilakukan pengukuran pH, absorbansi (660 nm), dan analisis kadar glukosa dan asam laktat seperti butir 3. Jangan lupa menghomogenkan kultur sebelum pengambilan sampel, dengan cara digoyang pelan-pelan.

C. Pengamatan :

1. Kadar biomassa dan glukosa dalam setiap sampel dihitung berdasarkan kurva standar masing-masing dengan memperhatikan faktor pengeceran yang biomassa dikerjakan. Kadar asam laktat dihitung menggunakan rumus yang ada (Lampiran).
2. Buat kurva hubungan antara **ln (kadar biomassa) vs waktu**. Berdasarkan kurva tersebut tentukan laju pertumbuhan spesifik (μ).
3. Buat juga kurva produksi biomassa, penggunaan substrat (glukosa) dan produksi asam laktat dengan melakukan plotting **kadar biomassa, kadar glukosa, dan kadar asam laktat vs waktu**.
4. Hitung *doubling time* (td) mikrobia tersebut.

I.2.3 Hasil dan Pembahasan

A. Hasil pengamatan

Hasil analisis *sampling* yang dilakukan ada waktu yang telah ditetapkan sebagai berikut :

No	Waktu sampling (jam ke)	Absoransi (kadar biomassa)	Gula pereduksi (g/L)	Asam laktat (%)
1.	0			
2.	0.5			
3.	1			
4.	1.5			
5.	3			
6.	4.5			
7.	6			
8.	9			
9.	12			
10.	24			
11.	26			

- Buat kurva pertumbuhan mikobia yang digunakan (*L. plantarum* / *L. bulgaricus*),

μ	td	Yx/s	Yp/s

I.3. Kurva pertumbuhan *Aspergillus niger* (*A. niger*)

I.3.1 Metodologi

A. Bahan dan alat

Biakan mikroba yang digunakan adalah *A. niger*. Bahan baku tepung sagu, tepung tapioka, tepung gaplek (*soluble starch*). Bahan kimia yang digunakan adalah PDA, Media Paszcynski *et. al.* (1982), kertas saring, reagen asam dinitro salisilat (*Dinitro salisilic acid/DNS*), Phenol, H₂SO₄, NaOH, dan HCl.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu: *autoclave*, *water bath shaker*, neraca analitik, spektrofometer UV-VIS, tabung reaksi, vortek, pH meter, inkubator, oven, mikropipet, beberapa jenis alat gelas seperti Erlenmeyer, gelas ukur, gelas piala, bunsen, jarum ose, spatula, pipet tetes, petridish, buret, sentrifuse, labu takar, gelas ukur dan lain-lainya.

B. Cara kerja

1. Kultur *A. niger* sebelum dipergunakan disegarkan dalam PDA. 3,7 gr PDA dilarutkan dalam 100 ml aquades, disterilkan. Media PDA dibuat miring pada tabung reaksi, dan diinokulasi *A.niger* (ukuran 0.5 x 0.5 cm), diinkubasi dalam inkubator pada suhu kamar (28-30°C) selama 4 hari.
2. Isolat *A. niger* yang diremajakan disuspensikan dalam media pertumbuhan awal yang sesuai secara terpisah. Satu tabung agar miring *A. niger* (pekerjaan No. 1) disuspensikan dengan 5 ml aquades steril. Digerus dan diaduk sehingga miselium dan spora tersuspensi secara sempurna.
3. Dalam 100 ml medium Paszcynski *et. al.* (1982) (*soluble starch/pati* sebagai substrat) diinokulasikan 5 ml suspensi isolat *A. niger*, difermentasi selama 7 hari. Dilakukan pengamatan dan *sampling* setiap 24 jam (termasuk jam ke 12 hari ke).

C. Pengamatan

1. Kadar biomassa (metode Pond *et al.* 1990) dan glukosa dalam setiap sampel dihitung berdasarkan kurva standar masing-masing dengan memperhatikan faktor pengeceran yang biomassa dikerjakan. Kadar asam laktat dihitung menggunakan rumus yang ada (Lampiran).
2. Buat kurva hubungan antara **ln (kadar biomassa) vs waktu**. Berdasarkan kurva tersebut tentukan laju pertumbuhan spesifik (μ).
3. Buat juga kurva produksi biomassa, penggunaan substrat (pati) dan produksi glukosa dengan melakukan plotting **kadar biomassa, kadar pati dan glukosa (total gula) vs waktu**.
4. Hitung *doubling time* (td) mikrobia tersebut

I.3.2 Hasil dan Pembahasan

A. Hasil pengamatan

Hasil analisis *sampling* yang dilakukan ada waktu yang telah ditetapkan sebagai berikut:

Waktu (hari)	Jumlah Biomassa	Glukosa / (Total gula) (g/L)	Pati (g/L)
0			
0.5			
1			
2			
3			
4			
5			
6			

- Buat kurva pertumbuhan *A. niger*

II. MINUMAN PROBIOTIK

II.1 Pendahuluan

Susu fermentasi adalah produk yang dihasilkan melalui fermentasi bakteri asam laktat, *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*, dengan atau tanpa penambahan bahan lain yang diizinkan.

Bakteri asam laktat termasuk bakteri yang menghasilkan sejumlah besar asam laktat sebagai hasil akhir dari metabolisme gula (karbohidrat). Asam laktat yang dihasilkan dengan cara tersebut akan menurunkan nilai pH dari lingkungan pertumbuhannya dan menimbulkan rasa asam. Ini juga menghambat pertumbuhan dari beberapa jenis mikroorganisme lain.

II.2 Metodologi

A. Bahan dan Alat

Bahan : Susu kedelai, susu skim, gula pasir, gum xanthan, starter kultur murni *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*.

Alat : Inkubator, autoclave, Bunsen, jarum ose, pH meter, lemari pendingin, timbangan analitik, alat gelas.

B. Cara Kerja

1. Pembuatan Media Agar Miring

- Larutkan PCA dalam 1000 ml aquades
- Didihkan sambil diaduk sampai larut seluruhnya
- Tuang 5 mL ke dalam tabung reaksi
- Sterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit
- Didinginkan dalam posisi miring
- Jika belum digunakan, simpan media pada lemari pendingin (suhu 4°C)

2. Pembuatan Starter

- Susu kedelai di tambahkan susu skim (b/v) 12 %, sukrosa (b/v) 5%, gum xanthan (b/v) 0,1 % ke dalam 100 mL susu kedelai dan setelah itu dilakukan pasteurisasi pada suhu 80°C selama 15 menit.

- Susu kedelai yang telah matang dimasukan ke dalam botol kaca yang telah disterilkan pada suhu 180 °C selama 60 menit, dan susu didinginkan sampai suhu 37 °C.
- Setelah suhu 37 °C, inokulasi masing-masing kultur murni *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* pada susu kedelai yang berbeda sebanyak 2 %, tutup wadah dengan aluminium foil yang telah disemprotkan dengan alkohol kemudian wadah ditutup lagi menggunakan penutup botol.
- Inkubasi starter pada suhu 37 °C selama 24 jam.

3. Pembuatan Produk

- Tambahkan susu skim (b/v) 12%, sukrosa 5% (b/v), gum xanthan (b/v) 0,1 g ke dalam 100 mL susu kedelai.
- Campuran dipanaskan pada suhu 80°C selama 5 menit kemudian didinginkan hingga suhu 37°C.
- Selanjutnya susu kedelai sebanyak 100 mL difermentasi di dalam botol kaca yang telah disterilisasi kering pada suhu 180°C selama 60 menit dengan menambahkan starter sebanyak 2 %.
- Botol ditutup rapat dan difermentasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- Fermentasi dihentikan dengan meletakkan produk minuman fermentasi susu kedelai pada suhu 5°C di dalam lemari pendingin.

C. Pengamatan

Amati Organoleptik (warna, aroma, penampakan), Viskositas, Derajat Keasaman, Bakteri Asam laktat awal dan Akhir.

II. 3 Hasil dan Pembahasan

A. Hasil Pratikum

Pengamatan	Hasil Pengamatan
Warna	
Aroma	
Penampakan	
Viskositas (dPa)	
Derajat Keasaman	
Bakteri Asam Laktat Awal	
Bakteri Asam Laktat Akhir	

III. ETANOL

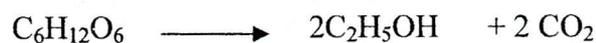
III.1 Pendahuluan

Etanol adalah nama kimia dari alkohol dengan rumus kimia C_2H_5OH yang banyak digunakan dalam industri kimia, kosmetika, industri minuman, dan sebagai bahan pelarut. Berbagai bahan dapat digunakan dalam pembuatan alkohol secara fermentasi, dan secara umum dibagi menjadi tiga yaitu bahan seperti gula, tetes atau cairan buah-buahan, bahan pati dan bahan selulosa. Gula umumnya dapat dimanfaatkan langsung sebagai sumber karbon, sedangkan pati dan selulosa harus dihidrolisis terlebih dahulu menjadi gula.

Beberapa jenis khamir yang dipakai dalam fermentasi etanol, dan yang sering digunakan adalah khamir *Saccharomyces cereviceae var ellipsoides*, karena mampu menghasilkan etanol dalam jumlah yang tinggi pada media yang sesuai dengan pertumbuhannya. Khamir lain yang dipakai adalah *Shizosaccharomyces* sp, *Saccharomyces uvarum*, *Khyveromyces* sp.

Tipe dan cirri suatu industri alkohol sangat dipengaruhi pertumbuhan mikroorganisme yang dipakai dalam fermentasinya. Mikroorganisme yang terpilih harus mampu menghasilkan etanol yang tinggi, toleran kadar etanol dalam substrat yang tinggi, mampu hidup pada suhu yang relatif tinggi dan tetap stabil pada pH rendah selama fermentasi.

Etanol dalam fermentasi diproduksi oleh khamir melalui metabolisme glukosa menurut jalur *Embden Meyerhoff-Parnas*. Secara teoritis setiap molekul gula akan diubah menjadi 2 molekul ethanol dan 2 molekul CO_2 seperti persamaan berikut :



III.2 Metodologi

A. Bahan dan Alat

Bahan : Larutan gula dari ampas sagu (air kelapa dan jambu air), PDA, PDB (*Potato Dextrose Broth*), $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)_3PO_4$, pupuk NPK, pupuk

ZA khamir *Saccharomyces cerevicea* var *ellipsoids* dan *Shizosaccharomyces* sp

Alat : Oven vakum, *autoclave*, pH meter, blender, alat-alat gelas, oven, inkubator, timbangan analitik, fermentor

B. Cara Kerja

1. Persiapan Bahan Baku

- Siapkan ampas sagu, kemudian keringkan dengan pengering matahari atau oven bersuhu 55°C sampai ampas sagu dapat digiling.
- Giling ampas sagu menggunakan blender sampai menjadi tepung dengan ukuran 80 mesh.
- Untuk air kelapa dilakukan pemekatan sampai kadar gula 10%.

2. Pembuatan Sirup Glukosa

Sirup glukosa dapat dibuat dengan metode hidrolisis asam atau enzimatis (ampas sagu), pemekaan (air kelapa dan juice jambu air) (telah disiapkan sebelumnya).

3. Persiapan Media

a. Agar miring

- Larutkan sejumlah PDA sambil dipanaskan.
- Tuangkan dalam tabung kemudian sterilisasi pada suhu 121°C selama 30 menit.
- Dinginkan sambil dimiringkan sehingga diperoleh agar miring PDA.

b. Media Inokulum

- Larutkan sejumlah PDB sambil dipanaskan
- Tuangkan dalam labu erlemeyer kemudian sterilisasi pada suhu 121°C selama 30 menit.
- Dinginkan hingga mencapai suhu kamar.

c. Medium Fermentasi

- Siapkan 200 ml sirup glukosa dalam fermentor
- Tambahkan 0,08 g pupuk NPK dan 0,3 g pupuk ZA
- Atur pH hingga pH mencapai 4,8 menggunakan $\text{Ca}(\text{OH})_2$

- Dinginkan hingga mencapai suhu kamar.

4. Proses Produksi

a. Peremajaan Kultur

- Biarkan masing-masing kultur pada agar miring PDA.
- Inkubasi selama 48 jam, pada kondisi aerobik dan suhu kamar.

b. Pembuatan Inokulum

- Biakan media inokulum (PDB) dengan menginokulasikan kultur hasil biakan pada PDA sebanyak 1-2 ose.
- Inkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam, dan kondisi aerobik.

5. Fermentasi

- Inokulasikan sebanyak 10 %(v/v) ke dalam media fermentasi
- Fermentasi berlangsung anaerobik, karena itu pasangkan pipa plastik pada labu erlemeyer yang ujungnya dibenamkan ke dalam air.
- Lakukan fermentasi selama 3-7 hari hingga siap panen. Sampling setiap 24 jam untuk mengukur kandungan gula sisa, etanol dan CO₂.
- Tahapan proses produksi selengkapnya dilihat pada Lampiran 3.

C. Pengamatan

Amati kandungan etanol, kandungan asam, pH akhir, dan kandungan gula sisa. Lakukan juga pasteurisasi kultur pada suhu 65 °C selama 30 menit, sehingga mikroorganisme menjadi inaktif.

III. 3 Hasil dan Pembahasan

A. Hasil Pratikum

Pengamatan	Kandungan
Kadar Etanol	
Kadar Asam	
pH Akhir	
Kadar Gula Sisa	
Kadar CO ₂	

Buat Kurva Hubungan Kadar Gula Sisa dengan Etanol

IV. ASAM SITRAT

IV.1 Pendahuluan

Asam sitrat (asam beta-dehidroksitrikarbalitat, asam dua hidroksi-1,2,3, propan trikarboksilat) adalah asam organik yang merupakan produk metabolit primer yang diproduksi dalam siklus Krebs.

Dalam industri pangan, asam sitrat berfungsi sebagai bahan pemacu rasa, pemberi rasa asam, antioksidan, dan pengemulsi. Asam sitrat banyak digunakan dalam industri pangan karena mempunyai kelarutan yang tinggi, rasa asam yang menyegarkan, dan sifat toksitas yang rendah.

Pembuatan asam sitrat secara komersial kini masih didominasi oleh *Aspergillus niger*, dengan keuntungan mudah penanganannya, bahan baku yang murah dapat digunakan, hasil yang diperoleh tinggi dan konsistensi sehingga proses produksi lebih ekonomis.

IV.2 Metodologi

A. Bahan dan Alat

Bahan : Tetes tebu (konsentrasi berbeda masing-masing kelompok), *Aspergillus niger*, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 , PDA, H_2SO_4 25 %

Alat : Inkubator suhu ruang, inkubator bergoyang, *autoclave*, sentrifuse, oven, pH meter, lemari pendingin, timbangan analitik, alat gelas.

B. Cara Kerja

1. Pemurnian Tetes Tebu

- Encerkan tetes tebu sampai pengenceran 10 x.
- Endapkan selama satu malam.
- Pisahkan kotoran dengan penyaringan.
- Ukurlah kadar gula total dalam tetes tebu.

2. Pembuatan Media

a. Media Agar Miring

- Larutkan 39 g PDA dalam 1000 ml aquades

- Didihkan sambil diaduk sampai larut seluruhnya.
- Tuang 5 mL ke dalam tabung reaksi.
- Sterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Didinginkan dalam posisi miring.
- Jika belum digunakan, simpan media pada lemari pendingin (suhu 4°C).

b. Media Fermentasi

- Siapkan media fermentasi dengan komposisi terlihat pada Tabel 1.
- Larutkan dalam air hingga larut sempurna
- Tuangkan dalam labu Erlenmeyer atau fermentor
- Dinginkan sampai suhu kamar

Tabel 1. Komposisi Media untuk Produksi Asam Sitrat

Komponen	Jumlah
Tetes tebu	14,2%
KH ₂ PO ₄	0,014 %
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 %
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,2 %
FeCl ₃	0,5 mg/liter media

3. Proses Produksi

- Inokulasikan kultur murni *Aspergillus niger* pada media agar miring
- Goreskan secara zig-zag pada permukaan agar miring
- Inkubasi selama 3 hari pada suhu 28-30°C
- Buatlah suspensi spora dengan mencampurkan spora dengan air suling steril.
- Inokulasi suspensi spora sebanyak 4% (v/v) dari volume media (stater)
- Inokulasi pada suhu 28-30°C sampai terbentuk miselia yang penuh spora kultur starter siap digunakan.
- Inokulasikan kultur (4%) ke dalam media produksi (250 mL).
- Inkubasi pada suhu 28-30°C dan dengan kecepatan agitasi 150 rpm selama 6 hari (dalam Erlenmeyer 500 mL)

4. Pemanenan

- Masukkan larutan hasil fermentasi ke dalam tangki pengendapan untuk memisahkan miselia.
- Jika miselia tidak mengendap, maka pisahkan penyaringan hingga diperoleh kultur bebas media.
- Tambahkan larutan kapur sehingga pH menjadi netral, lakukan pengukuran dengan pH meter.
- Panaskan larutan di atas penaggas air pada suhu 60°C selama 10 menit, sambil diaduk-aduk.
- Saring larutan dengan penyaring vakum.
- Residu adalah kalsium sitrat.

5. Pemurnian

- Masukkan Ca-Sitrat ke dalam gelas piala.
- Tambahkan larutan H₂SO₄ 25 % secara berlebih.
- Panaskan di atas penaggas air pada suhu 55-60°C.
- Pisahkan endapan CaSO₄ yang terbentuk dari larutan yang mengandung asam sitrat.
- Tambahkan 2% (b/v) arang aktif ke dalam larutan yang mengandung asam sitrat.
- Saring dengan penyaring vacuum, sehingga diperoleh larutan jernih.
- Pekatkan dan kristalkan larutan yang terjadi.
- Pisahkan kristal dengan menggunakan sentrifus kemudian keringkan dengan *oven vacuum*.
- Tahap proses pemurnian dan pemanenan selanjutnya lihat pada Lampiran.

C. Pengamatan

Amati kadar asam sitrat, rendemen asam sitrat, kadar gula dan derajat keasamaan.

IV. 3 Hasil dan Pembahasan

A. Hasil Pratikum

V. PIGMEN ANGKAK

V.1 Pendahuluan

Ada 2 (dua) macam pewarna yang biasa digunakan yaitu pewarna alami dan pewarna sintetis (buatan). Dalam penggunaannya pewarna sintetis lebih disukai karena memberikan warna yang indah, kestabilan yang tinggi, praktis serta mudah diperoleh. Namun beberapa pewarna buatan menimbulkan efek karsinogenik, sedangkan pewarna alami umumnya tidak.

Ada tiga macam sumber pigmen yang alami yaitu: hewan, tumbuhan dan mikroorganisme. Salah satu sumber pigmen mikroorganisme adalah *Monascus purpureus*. Angkak adalah pigmen hasil fermentasi dari *Monascus purpureus*.

Ada 6 macam pigmen yang dihasilkan oleh mikroorganisme tersebut yaitu *monoskorubin* (merah), *rubropuktarin* (merah), *monaskloflavin* (kuning), *angkaflavin* (kuning), *rubropunktamin* (unggu) dan *monaskorubramin* (unggu). Pigmen utama yang dihasilkan adalah *monaskorubramin* dan *monaskloflavin*.

Pigmen angkak mempunyai sifat kelarutan tinggi, warna yang stabil, mudah dicerna dan tidak bersifat karsinogenik. Pigmen angkak dapat diproduksi secara fermentasi padat dan cair, tetapi yang umumnya digunakan fermentasi padat. Berbagai bahan bisa digunakan sebagai substrat misalnya beras, jagung, singkong, tepung tapioka, gapek, ubi, sagu, terigu, kentang, campuran ongok dan ampas tahu.

V.2 Metodologi

A. Bahan dan Alat

Bahan : Ongkok, beras, tepung gapek, tepung kedelai, garam fisiologis,

methanol, sitrat, kapang *Monascus purpureus*

Alat : Inkubator, *autoclave*, timbangan analitik, alat-alat gelas.

B. Cara Kerja

1. Persiapan Kultur

- Siapkan biakan murni *Monascus purpureus*.
- Siapkan agar miring PDA.
- Inokulasikan biakan murni *Monascus purpureus* ke agar miring.
- Inkubasi pada suhu 27-32°C.
- Biarkan siap pakai setelah berumur minimal 25 hari.
- Lakukan askospora maupun konidia yang ada pada permukaan agar dengan menggunakan lup inokulasi.
- Tambahkan pada masing-masing tabung 10 mL larutan garam fisiologis.
- Saring suspensi yang dihasilkan secara aseptis dengan kertas Whatman No.1.
- Encerkan suspensi kultur sampai dengan volume 25 mL.

2. Persiapan Bahan

a. Pembuatan Larutan penyangga Sulfat (pH 5.8)

- Larutan A : 21 g $C_6H_5O_7 \cdot 7 H_2O$ dalam 1 liter air
- Larutan B : 29,41 g $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2 H_2O$ dalam 1 liter air.
- Campurkan 11,8 ml larutan A ke dalam 38,2 larutan B.
- Kocok dan encerkan hingga volume 100 mL

b. Persiapan Substrat

- Keringkan onggok (beras, tepung galek).
- Tumbuk dan ayak untuk memisahkan partikel yang besar.
- Tentukan kadar karbohidrat awalnya.
- Siapkan substrat yang mempunyai perbandingan karbohidrat onggok (beras, tepung galek) dibandingkan jumlah tepung kedelai 2 : 2.
- Basahi substrat dengan larutan sitrat hingga tercapai kadar air 55%.
- Siapkan substrat masing-masing 50 g ke dalam labu Erlenmeyer.
- Sterilkan pada suhu 121 °C selama 30 menit, kemudian dinginkan.

3. Produksi

- Inokulasikan 10 mL suspensi askospora ke dalam labu
- Inkubasi pada suhu 27-32°C
- Amati kultur setiap 2 hari sambil dikocok

- Fermentasi dihentikan sampai terbentuk warna

C. Pengamatan

Lakukan pengukuran kerapatan optik (OD) warna merah dan kuning, kelarutan pigmen, kadar gula pereduksi dan rendemen angkak.

V. 3 Hasil dan Pembahasan

A. Hasil pratikum

No	Pengamatan	Kandungan (hasil)
1.	Kerapatan optik Merah Kuning	
2.	Kelarutan pigmen	
3.	Gula pereduksi	
4.	Rendemen angkak	

B. Pembahasan

VI. FERMENTOR

VI.1 Pendahuluan

Wadah untuk berlangsungnya proses-proses fermentasi dikenal dengan fermentor. Perkembangan dari fermentor adalah wadah yang dikenal dengan bioreaktor atau reaktor biologis. Bioreaktor dapat dikatakan merupakan pusat setiap proses biologis yang diinginkan, karena di dalam bioreaktor tersebut dapat dibuat kondisi lingkungan yang sesuai sehingga proses biologis dapat berlangsung dengan baik.

Berbagai jenis dan ragam dari bioreaktor telah dibuat dan diproduksi. Perkembangan bioreaktor ini sangat pesat, terutama bioreaktor-bioreaktor untuk kultivasi cair yang mempunyai pengaduk seperti *stirred tank reactor*. Ditinjau dari spektrum strukturnya, cakupannya sangat luas mulai dari sederhana sampai yang canggih sehingga proses-proses yang berlangsung di dalamnya dapat dikontrol dengan menggunakan komputer.

Untuk dapat memproduksi produk-produk yang sesuai dengan tujuan, maka diperlukan instrumen-instrumen baik untuk pengontrol jalannya proses maupun instrumen yang berfungsi berjalannya proses dengan baik. Perkembangan instrumen-instrumen ini tentu sejalan dengan perkembangan bioreaktor itu sendiri. Fungsi-fungsi instrumen yang terdapat dalam bioreaktor ini sangat penting sekali untuk mendapatkan produk dengan hasil yang sesuai. Sesuai dengan perkembangan yang ada, instrumen yang semula adalah sesuatu yang sederhana sekarang telah berkembang dan dapat diatur dengan menggunakan komputer.

Instrumen-instrumen yang terdapat dalam bioreaktor banyak ragamnya. Untuk itu, instrumen ini dalam fungsinya dapat kita bagi menjadi: (1) Instrumen untuk pengukur lingkungan fisik, (2) instrumen untuk pengukur lingkungan kimia, (3) instrumen yang berfungsi untuk membantu terlaksananya proses fermentasi dengan baik dan, (4) instrumen-instrumen penunjang lainnya yang berada di luar bioreaktor.

VL2 Metodologi

C. Alat

Perlatan yang digunakan adalah seperangkat fermentor type EYELA (Japan)

D. Prosedur

Kegiatan ini merupakan suatu bentuk demonstrasi dan pengenalan alat fermentor substrat cair (*stirred tank reactor*). Pada demonstrasi fermentor akan dikenalkan dan didiskusikan peralatan (instrumen) yang terdapat dan berhubungan dengan fermentor, meliputi :

1. Instrumen kontrol (fisik dan kimia)
2. Instrumen kontrol di luar fermentor
3. Instrumen pendukung pada sistem fermentor

E. Pengamatan

Setiap pratikan memperhatikan dan mengikuti demonstrasi dengan baik dan serius, sehingga dapat memberikan, menggambarkan dan menjelaskan jenis-jenis instrumen dan peralatan pada fermenter STR pada akhir pratikum. Pratikan perlu mencatat hal-hal penting dari peralatan / instrumen yang ada pada fermentor.

VL 3 Hasil dan Pembahasan

A. Hasil

Hasil pratikum (fermentor tipe *Eyela*):

1. Instrumen kontrol lingkungan fisik meliputi :

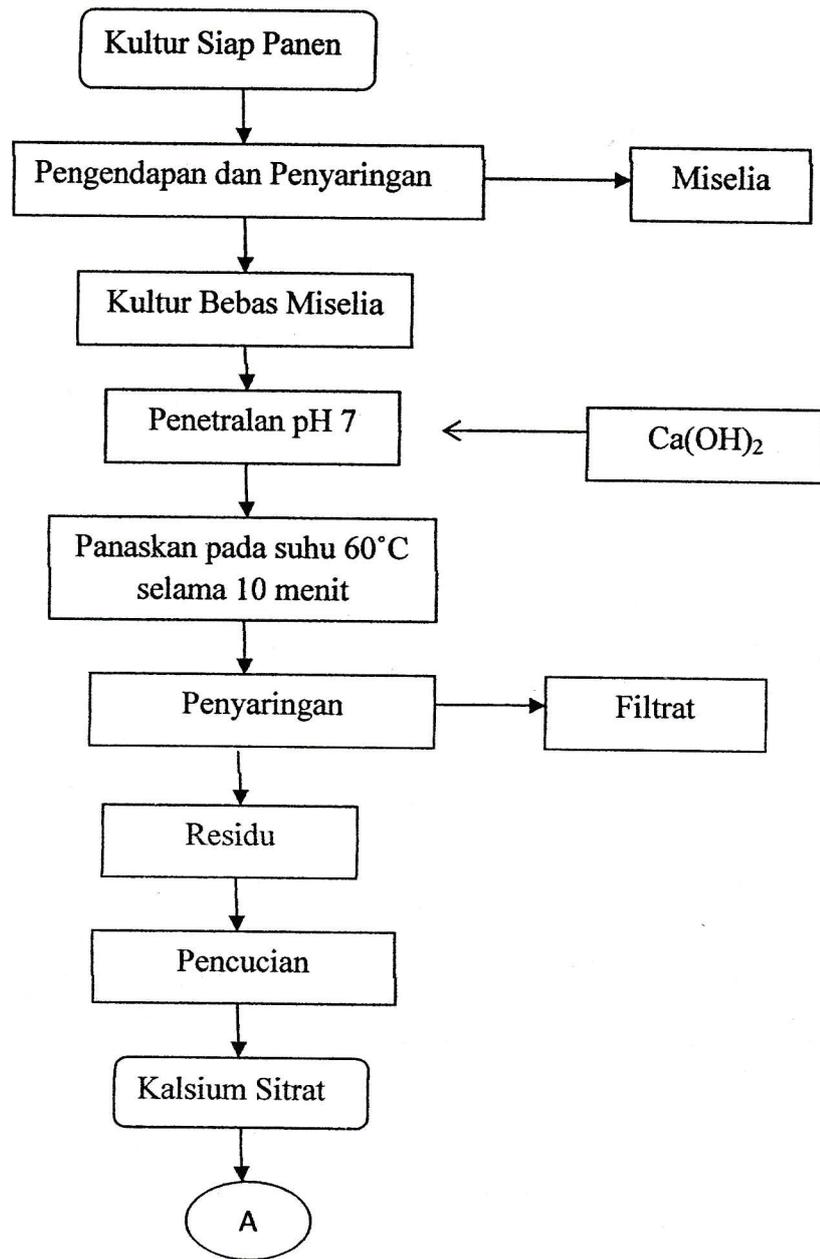
DAFTAR PUSTAKA

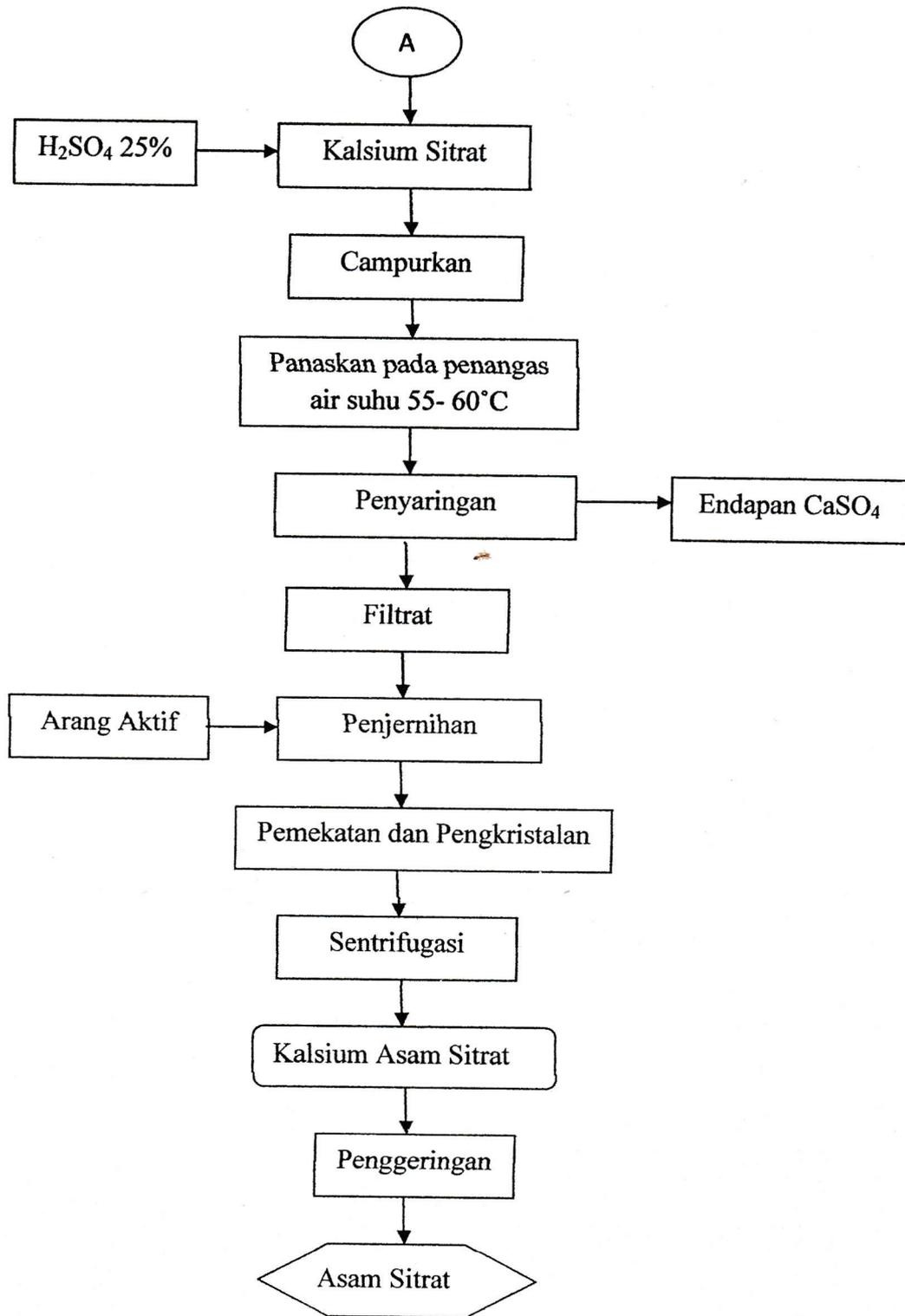
- Anas, Y dan Z. Zuki. 1981. *Penuntun Pratikum Analisis Pangan*. Departemen Teknologi Pertanian. Fakultas Pertanian Universitas Andalas. Padang.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemistry . 1991. *Official Methode of Analysis of Association of Official Analytical Chemistry 25th*. Publisher AOAC, Inch. Washington.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemistry. 1995. *Official Methode of Analysis of Association of Official Analytical Chemistry*. AOAC International, Washington.
- Asben, A. 2000. *Kajian dan Sistem Instrumentasi pada Bioreaktor Tangki Teraduk (Stirred Tank Reactor)*. Paper. Fakultas Pertanian Universitas Andalas. Padang
- Buckle, K. A., R. A. Edwards., G. H Fleet., dan M. Wooton. 1987. *Ilmu Pangan*. (H.P. Adiono; penerjemah). UI-press. Jakarta.
- Darwis, A. A, dan T. C. Sunarti. 1992. *Teknologi Mikrobial*. Petunjuk Laboratorium. Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB- Dirjen Dikti Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Bogor.
- Dubois M, KA Gilles, JK Hamilton, PA Rebers, F Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *J Anal Chem* 28(3): 350-356.
- Fardiaz, S. 1993. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Hoadioetomo, R. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*. Teknik dan Prosedur Dasar dalam Laboratorium. PT. Gramedia. Jakarta.
- Hasbullah. 2004. *Bahan Kerja Pratikum Teknologi Fermentasi* (tidak dipublikasikan). Fakultas Pertanian Universitas Andalas. Padang.
- Marniza. 1989. *Pembuatan Asam Sitrat dari Tetes Tebu dengan Menggunakan Aspergillus niger TC2.711/6*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian IPB. Bogor.
- Meutia, R. 2011. *Karakteristik Minuman Fermentasi Kecambah Kacang Hijau (*Phaseolus radiatu*)*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Andalas. Padang.
- Muchtadi, D. 1989. *Evaluasi Nilai Gizi Pangan*. PAU Pangan IPB- Dirjen Dikti Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Bogor.
- Paszczynki *et al.* 1982. A Simple Method of Affinity Chromatography for the Purification of Glucoamylase Obtained from *Aspergillus niger* C. *FEBS LETTERS*. 149(1):63-66

- Pons A, CG Dussap, dan JB Gross. 1990. Xanthan bath fermentation: Compared performance of a bubble column and a stirred tank fermentor. *Bioprocess Eng* 5: 107-114
- Sudarmadji, S., B. Harjono dan Suhadi. 1997. *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Liberty. Yogyakarta.
- Sudarsono, K. A. 1990. *Mempelajari Zat Warna Alami Angkak Dengan Substrat Fermentasi Ampas Tapioka (onggok) oleh Monascus Purpureus went.* Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian IPB. Bogor.
- Tim Pengelola Pratikum Teknologi Fermentasi. 2011. *Penuntun Pratikum Teknologi Fermentasi*. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Winarno, F.G dan E. Ivone. 2007. *Susu dan Produk Fermentasinya*. M-Brio Press. Bogor.

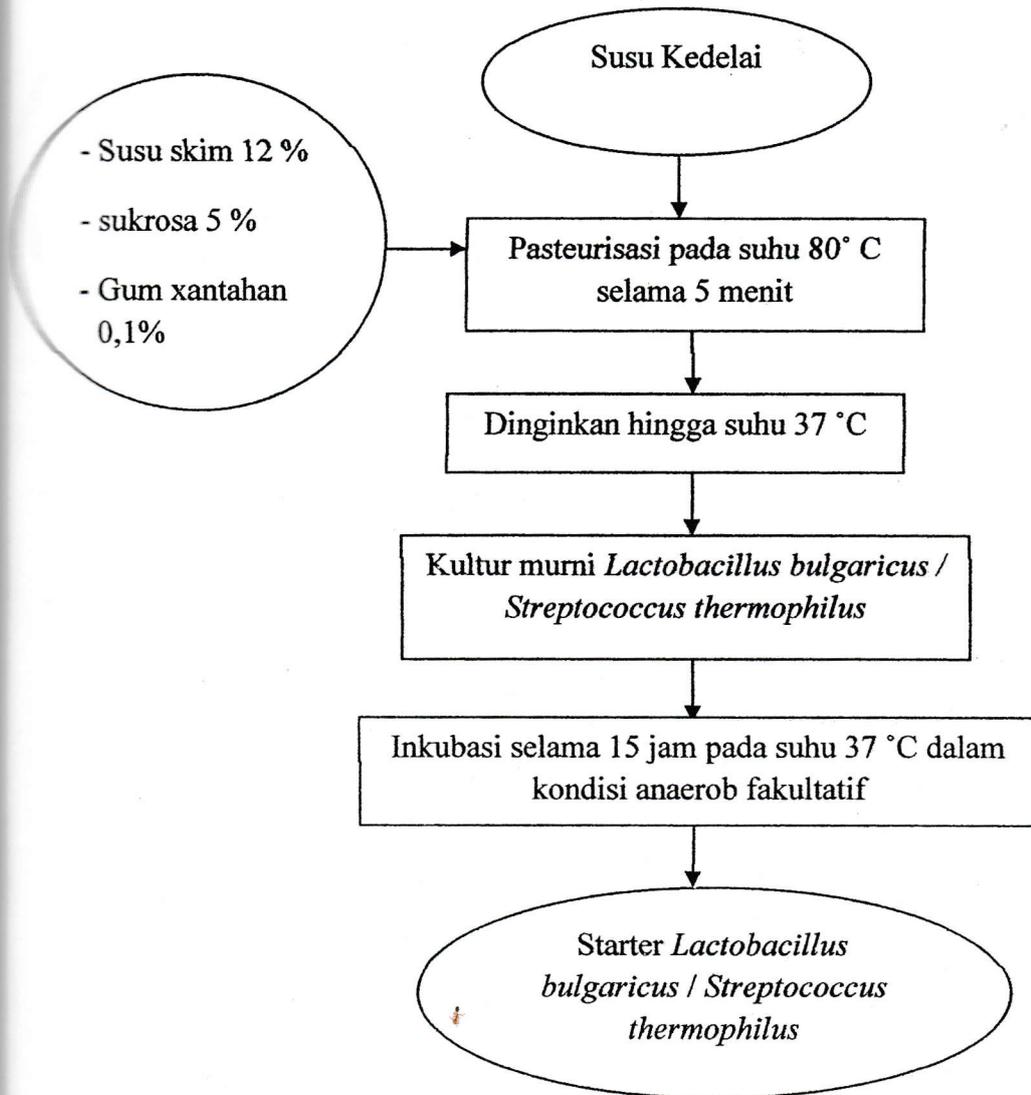
LAMPIRAN

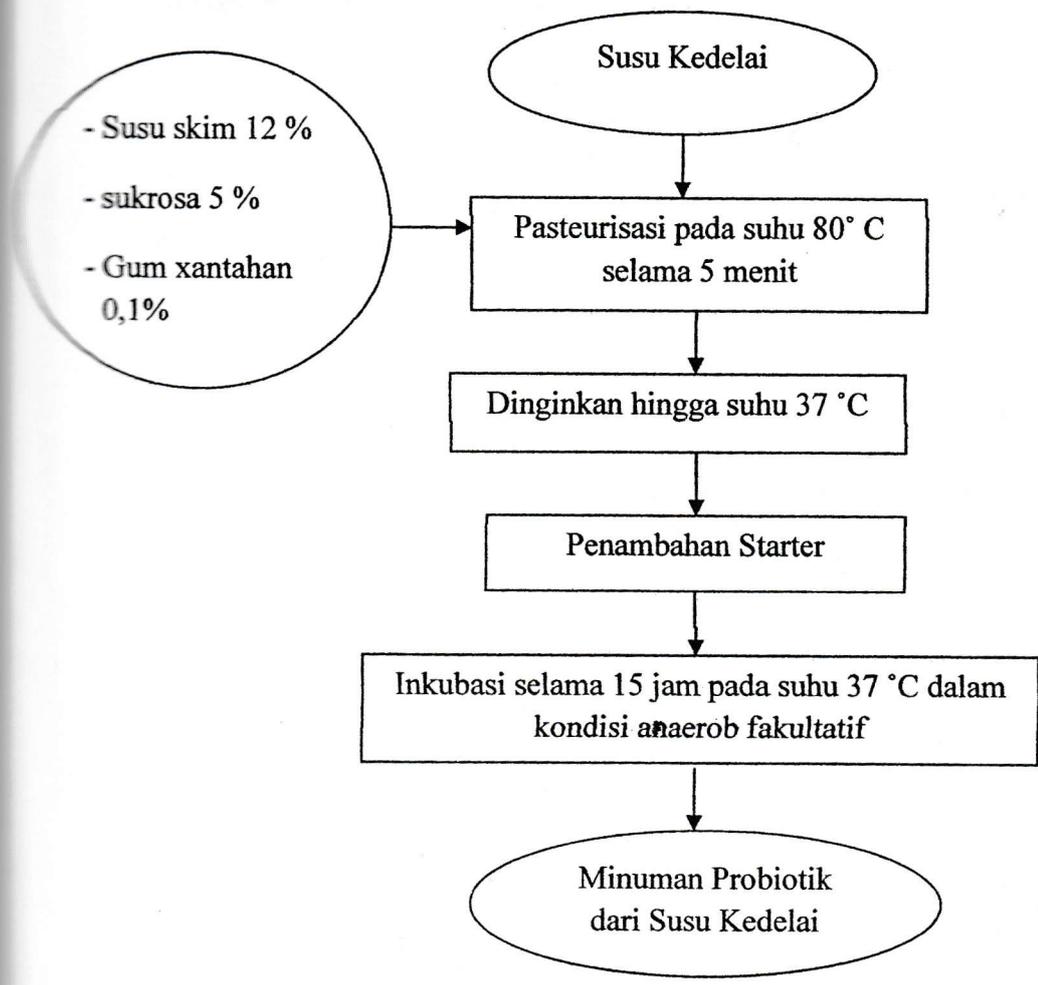
Lampiran 1. *Flowchart* dan Pemurnian Asam Sitrat



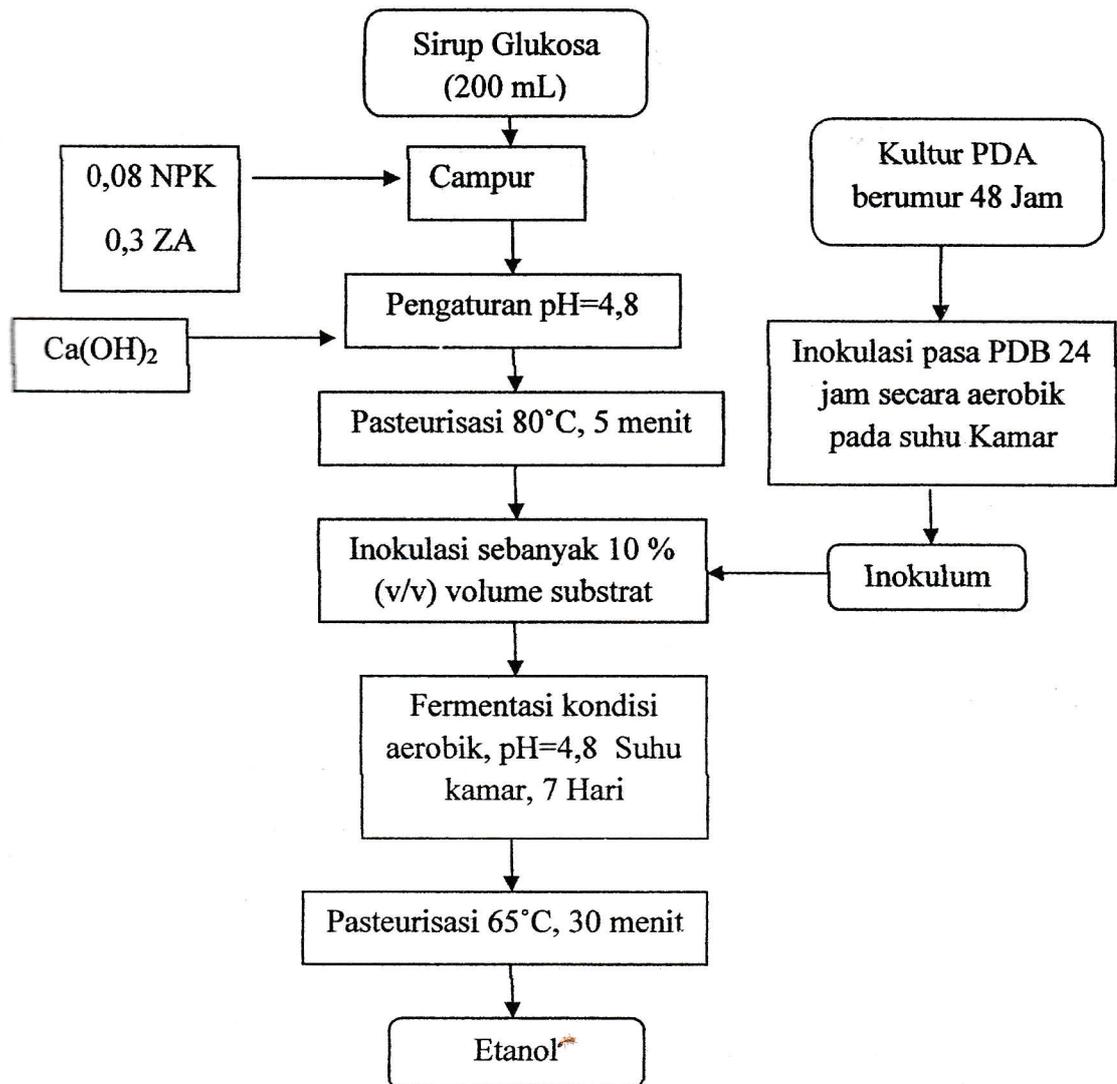


Lampiran 2. *Flow Chart* Tahapan Pembuatan Minuman Probiotik

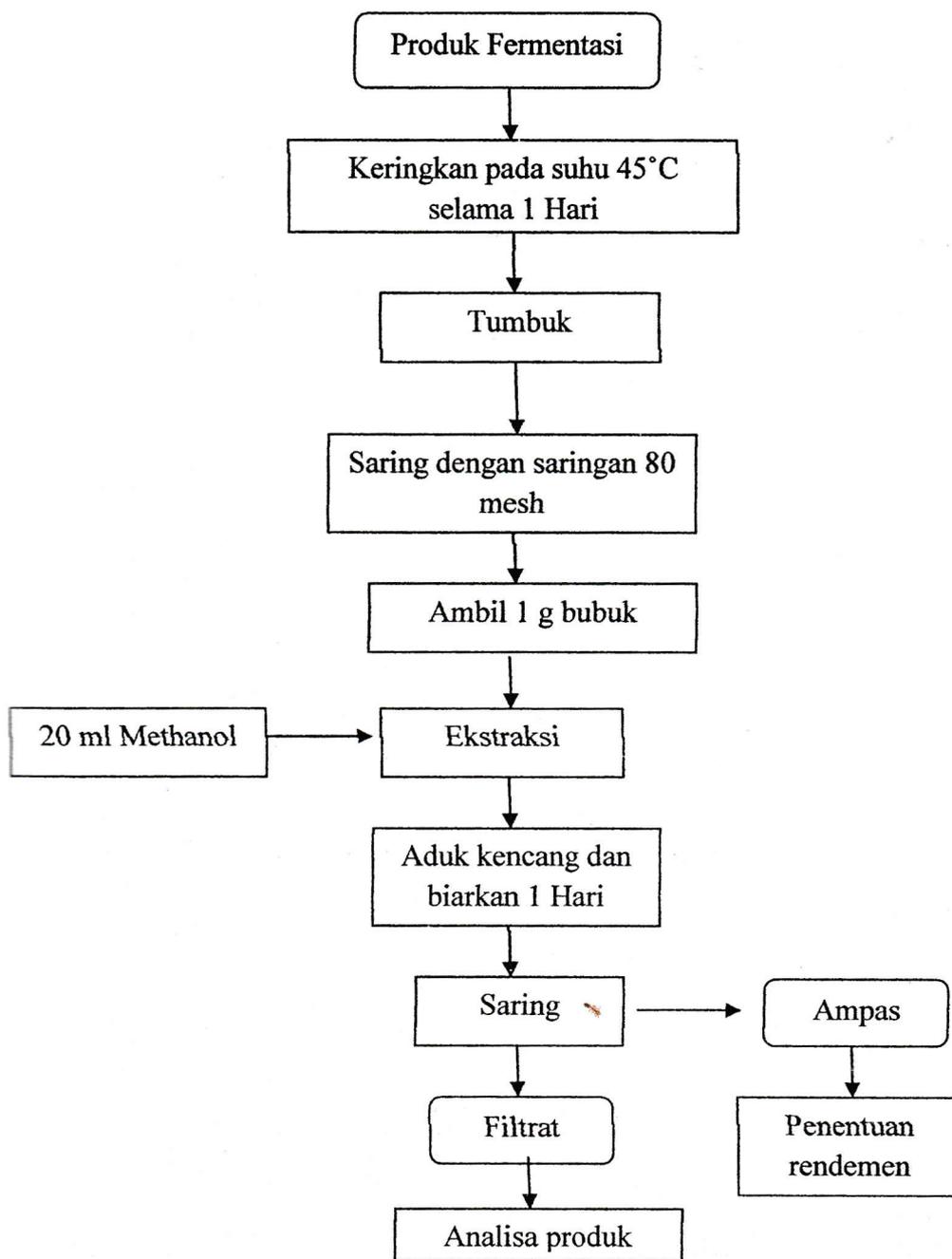




Lampiran 3. *Flow Chart* Tahapan Proses Produksi Etanol



Lampiran 4. Flow Chart Tahapan Pembuatan Pigmen Angkak



Lampiran 5. Cara perhitungan jumlah koloni dengan metode SPC

Data yang dilaporkan sebagai SPC harus mengikuti peraturan-peraturan sebagai berikut:

1. Hasil yang dilaporkan hanya terdiri dari dua angka, yaitu angka pertama di depan koma dan angka kedua di belakang koma.
2. Jika semua pengenceran yang dibuat untuk pemupukan menghasilkan angka < 30 koloni pada cawan petri, hanya jumlah koloni pada pengenceran terendah yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai < 30 dikalikan dengan besarnya pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung.

Jlh koloni per pengenceran			SPC	Keterangan
10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}		
16	1	0	$<3.0 \times 10^3$ (1.6×10^3)	Hitung pengenceran 10^{-2}

Faktor pengenceran = Pengenceran x Jumlah yang ditumbuhkan

$$= 10^{-2} \times 1.0$$

$$= 10^{-2}$$

Jumlah koloni = Jumlah koloni per cawan x 1/faktor pengenceran

$$= 16 \times 1/10^{-2}$$

$$= 1.6 \times 10^3$$

3. Jika semua pengenceran yang dibuat untuk pemupukan menghasilkan angka >300 koloni pada cawan petri, hanya jumlah koloni pada pengenceran tertinggi yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai < 300 dikalikan dengan besarnya pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung.

Jlh koloni per pengenceran			SPC	Keterangan
10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴		
TBUD	TBUD	355*	<3.0 x 10 ⁶ (3.6 x 10 ⁶)	Hitung pengenceran 10 ⁻⁴
TBUD	325*	20	<3.0 x 10 ⁵ (3.3 x 10 ⁵)	Hitung pengenceran 10 ⁻³

4. Jika cawan dari dua tingkat pengenceran menghasilkan koloni dengan jumlah antara 30 dan 300, dan perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah dari kedua pengenceran tersebut lebih kecil atau sama dengan 2, tentukan rata-rata dari kedua nilai tersebut dengan memperhitungkan pengencerannya. Dan jika perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah lebih besar dari 2, yang dilaporkan hanya hasil pengenceran yang terkecil.

Jlh koloni per pengenceran			SPC	Keterangan
10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴		
293*	41*	4	3.5 x 10 ⁴	Hitung rata-ratanya karena 41000/29300=1.4 (<2)
140*	32*	2	1.4 x 10 ⁴	Hitung pengenceran 10 ⁻² karena 32000/14000=2.3 (>2)

5. Jika digunakan dua cawan petri (duplo) per pengenceran, data yang diambil harus dari kedua cawan tersebut, tidak boleh diambil salah satu saja, meskipun salah satu dari cawan duplo tersebut tidak memenuhi syarat diantara 30 dan 300.

Jlh koloni per pengenceran			SPC	Keterangan
10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴		
138 162	42 43	2 4	1.5 x 10 ⁴	Rata-rata dari pengenceran 10 ⁻² karena perbandingan antara pengenceran 10 ⁻² dan 10 ⁻³ adalah 2.4
290 280	36 32	4 1	3.1 x 10 ⁴	Rata-rata dari pengenceran 10 ⁻² dan 10 ⁻³ karena perbandingan antara kedua

Lampiran 7. Prosedur Pengamatan/ Analisa

1. Penentuan pH

pH ditentukan dengan menggunakan pH meter (*Fisher Accumat* model 230 pH/ ion meter) dengan prosedur sebagai berikut ini :

- pH dihidupkan dan dibiarkan sebentar (30 menit) hingga jarum menunjukkan angka tetap.
- Ukur suhu contoh, samakan suhu *buffer* dengan suhu contoh.
- Standarkan terlebih dahulu dengan *buffer* (4 dan 7) pada suhu tersebut.
- Bilas alat dengan aquades dan keringkan dengan kapas yang bersih.
- Ukur pH sampel (sampel bisa diencerkan dengan aquades dengan perbandingan 1:1), catat pH nya.

2. Penentuan Kadar Glukosa dengan Metoda Dinitrosalisilat (DNS)

A. Bahan Kimia

- Larutan Asam Dinitrosalisilat, 1% (asam dinitrosalisilat 10 g, fenol 2 g, natrium sulfid 0.5 g, natrium hidrosida 10 g, tambah air sampai 1 liter).
- Larutan kalium natrium tartrat (garam Rochelle), 40%.
- Larutan glukosa standar (300 mg/L).

B. Pembuatan Kurva Standar

- Siapkan 10 tabung reaksi yang bersih dan isilah masing-masing sebagai berikut (masing-masing dengan 2 ulangan).

No. Tabung	1	2	3	4	5
Aquadest, ml	3,0	2,5	2,0	1,0	0
Lar. glukosa standard, ml	0	0,5	1,0	2,0	3,0
Kadar glukosa, mg/l	0	50	100	200	300

- Tambahkan ke dalam masing-masing tabung 3 mL reagensia DNS. Tutup tabung reaksi dengan kelereng.
- Panaskan semua tabung bersama-sama dalam penangas air mendidih selama 10 menit.
- Ambil semua tabung dan dinginkan bersama-sama dalam gelas piala berisi air dingin.
- Tambahkan 1 mL larutan kalium sodium tartrat 40% ke dalam masing-masing tabung, goyang hingga homogen! Biarkan tabung hingga dingin.
- Teralah absorbansi masing-masing larutan tersebut dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 575 nm.
- Buatlah kurva standard yang menunjukkan hubungan antara absorbansi (A_{575}) dengan kadar glukosa (mg/L).

C. Penentuan kadar glukosa pada sampel

1. Sampel (suspensi mikrobia) disentrifugasi pada 3.000 x g selama 15 menit.
2. Sampel diencerkan sedemikian sehingga kadar glukosanya kurang dari 300 mg/L. Catat besarnya faktor pengenceran yang digunakan.
3. Siapkan 2 tabung reaksi yang bersih dan kering. Isilah masing-masing dengan 3 mL larutan sampel dan 3 ml reagensia DNS. Tutup tabung reaksi dengan kelereng.
4. Panaskan semua tabung bersama-sama dalam penangas air mendidih selama 10 menit.
5. Ambil semua tabung dan dinginkan bersama-sama dalam gelas piala berisi air dingin.
6. Tambahkan 1 mL larutan kalium sodium tartrat 40% ke dalam masing-masing tabung, goyang hingga homogen! Biarkan tabung hingga dingin.
7. Teralah absorbansi masing-masing larutan tersebut dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 575 nm.
8. Apabila absorbansi melebihi 0,7, encerkan dengan aquadest dan teralah kembali.
9. Hitunglah kadar glukosa dalam larutan sampel berdasarkan kurva standar. Perhatikan faktor pengenceran yang digunakan.

3. Penentuan Kadar Asam Laktat dengan Metoda Titration

A. Reagensia:

- Larutan NaOH 0,1 N standar
- Larutan phenolphthalein (PP)
- Aquadest

B. Peralatan:

- Erlenmeyer 250 mL
- Pipet volume 5 mL
- Gelas ukur/ pipet 10 mL
- Buret

C. Penentuan kadar asam laktat pada sampel

1. Sampel disentrifugasi pada 3000 x g selama 15 menit untuk memisahkan biomasanya.
2. Ambil 5 mL supernatan dan masukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml. Tambahkan 10 mL aquadest dan beberapa tetes larutan PP sebagai indikator.
3. Titration sampel menggunakan larutan NaOH 0,1 N sampai larutan merah muda.
4. Tentukan kadar asam laktat dalam sampel dengan menggunakan rumus berikut.

$$\text{Kadar asam laktat} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N NaOH} \times \text{BM}_{\text{asam laktat}}}{\text{Volume sampel}} \times 100 \%$$

4. Penentuan Kadar Pati (metode Iod; AOAC 1995)

Hidrolisat terdiri dari komponen gula sederhana dan molekul pati. Berdasarkan komponen hidrolisat dengan panjang rantai di bawah 12 unit glukosa tidak memberikan warna bila bereaksi dengan senyawa iod. Komponen pati dalam hidrolisat akan berwarna ungu merah-biru bila bereaksi dengan senyawa iod. Intesitas warna biru akan berbeda tergantung dari kadar pati dalam hidrolisat.

Cara Kerja:

Pembuatan kurva standard dengan menggunakan *soluble starch* pada kisaran 0.01 – 0.1%. Di pipet masing-masing 1 mL ke dalam tabung reaksi dan dipanaskan hingga suhu 80 °C (pati menjadi larut) setelah didinginkan ditambahkan 0.1 mL larutan iod (0.2 g iod dan 2 g KI dalam 100 mL air), kemudian ditambahkan aquades masing-masing 2 mL. Selanjutnya pengukuran intensitas warnanya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 610 nm.

Pada penetapan contoh, diambil 1 mL contoh hasil proses hidrolisis (sampel disaring dengan kertas saring terlebih dahulu) lalu ditambahkan dengan larutan iod 0.1 mL kemudian ditambahkan aquades 3 mL. Pengukuran intensitas warnanya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 610 nm. Data yang diperoleh diplotkan pada kurva standard.

5. Penentuan Total Gula (Fenol-H₂SO₄) (Dubois *et al.* 1956)

- Pembuatan kurva standar

1. Pipet 2 mL larutan glukosa standar yang mengandung 0, 10, 20, 30, 40 dan 60 µg glucosa, masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi.
2. Tambahkan 1 mL larutan fenol 5%, kocok.
3. Tambahkan dengan cepat 5 mL larutan asam sulfat pekat dengan cara menuangkan secara tegak lurus ke permukaan larutan.
4. Biarkan selama 10 menit, kocok lalu tempatkan dalam penangas air selama 15 menit.
5. Ukur absorbansinya pada 490 nm untuk heksosa dan 480 nm untuk pentosa dan asam uronat.
6. Buat kurva standar.

- Penetapan sampel

1. Untuk menetapkan total gula sampel harus berupa cairan yang jernih (saring jika ada endapan). Sampel (hidrolisat ampas sagu) dipersiapkan dengan metoda penjernihan sampel menggunakan Pb acetat. Cairan sampel yang akan dianalisa dijernihkan dengan Pb acetat ½ basa, kelebihan Pb acetat dinetralkan NaCO_3 8%, sampel didiamkan/diendapkan semalam sehingga pengotor mengendap. Cairan jernih dari sampel diambil dan dianalisa total gulanya.
2. Lakukan penetapan sampel seperti pada pembuatan kurva standar kemudian tentukan total gula sampel (dinyatakan sebagai % glukosa).

6. Pengukuran Biomasa (Pons *et al.* 1990)

Sebanyak 1.5 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* yang telah diketahui berat awalnya, setelah itu sampel disentrifugasi pada kecepatan 13000 rpm selama 5 menit. Kemudian dilakukan pemisahan antara supernatan dengan biomasanya. Tabung *eppendorf* yang telah berisi biomassa dimasukkan akuades steril sebanyak 1.5 mL kemudian dilakukan sentrifugasi kembali. Pemisahan antara akuades dan biomassa dilakukan, selanjutnya tabung *eppendorf* yang berisi biomassa dikeringkan pada suhu 50 °C selama 24 jam. Berat kering biomassa adalah berat tabung yang berisi biomassa yang telah dikeringkan dikurangi dengan berat awal, menurut perhitungan berikut:

Berat biomassa kering (g)

Berat sel kering (g/L) = -----

Vol sampel (L)

7. Penentuan Total Asam

Mula-mula buret diisi dengan NaOH 0,1N perlahan-lahan sehingga tidak ada gelembung didalamnya. Kemudian contoh ditimbang dalam Erlenmeyer sebanyak 10 ml kemudian dihancurkan. Masukkan ke dalam labu ukur 250 ml ditambahkan aquades sampai tanda batas kemudian saring. Filtrat diambil sebanyak 100 mL masukkan dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan 3 tetes indikator fenolftalein 1 % sebagai indikator. Contoh selanjutnya dititrasi dengan NaOH 0,1 N sambil digoyang sampai dengan terbentuk warna merah muda stabil. Pemakaian titer dicatat.

$$\% \text{ asam laktat} = \frac{\text{mL. NaOH} \times \text{N NaOH} \times 90}{\text{gr sampel} \times 1000} \times 100$$

8. Visikositas dengan Rion Viscotester VT-04

Rangkaian alat visikotester sesuai dengan petunjuk. Pasang rotor pada cup dan bahan yang dimasukan didalamnya hingga seluruh permukaan rotor terendam. Digunakan rotor yang paling besar dengan skala terkecil. Pastikan visikotester terhubung dengan aliran listrik. Selanjutnya tekan tombol on, rotor akan berputar, pastikan pula rotor tidak terlalu dekat dengan dinding permukaan cup sehingga dapat mempengaruhi gerak rotor, baca skala yang ditunjukkan oleh jarum, apabila skala tidak terbaca (jam kelura dari skala) maka rotor diganti dengan skala yang lebih besar. Satuan yang digunakan adalah dPa.s.

9. Penentuan Total Padatan

Timbang 5 g sampel dan masukan kedalam cawan aluminium yang telah dibersihkan, dikeringkan dan ditentukan beratnya. Ruang pengering atau oven dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit sampai suhu tetap. Setelah itu, masukan bahan kedalam oven. Setelah 60 menit bahan dikeluarkan dari oven dan didinginkan dalam desikator, kemudian timbang dan catat hasilnya. Pengovenan dan penimbangan dilakukan tiap 60 menit sampai beratnya tetap.

$$\text{Perhitungan : Total padatan} = \frac{A}{B} \times 100\%$$

A= berat sampel akhir (g), B= berat sampel awal (g)

10. Kadar Serat Kasar

Serat kasar merupakan residu dari bahan makanan atau hasil pertanian setelah diperlakukan dengan asam atau alkali mendidih terdiri dari selulosa dengan sedikit lignin dan pentose. Prosedur analisa sebagai berikut :

- a. Sampel yang telah diekstraksi lemaknya dimasukan ke dalam erlemeyer 500 ml. Ditambahkan 0,5 g asbes yang telah dipijarkan dan 3 tetes anti foam agent.
- b. Tambahkan 200 ml H₂SO₄ 0,255 N, ditutup dengan pendingin balik kemudian *refluk* selama 30 menit sambil sekali-kali digoyang.
- c. Sampel disaring dengan kertas saring, residu yang tertinggal di erlemeyer dicuci dengan air mendidih dan saring kembali. Cuci residu pada kertas saring sampai air cucian tidak bersifat asam lagi (uji lakmus).
- d. Pindahkan secara kuantitatif residu pada kertas saring ke dalam erlemeyer kembali. Selanjutnya sisanya dicuci dengan 200 ml NaOH 0,313 N sampai residu masuk dalam erlemeyer.
- e. *Refluk* selama 30 menit sambil kadang-kadang digoyang.
- f. Saring kembali dengan kertas saring yang diketahui beratnya dan telah dikeringkan dalam oven, sambil dicuci dengan K₂SO₄ 10%
- g. Cuci lagi residu dengan air mendidih, kemudian alcohol 95%
- h. Keringkan kertas saring dalam oven pada suhu 110°C sampai berat konstan (kira-kira 2 jam)
- i. Dinginkan dalam desikator dan timbang. Berat residu sama dengan berat serat kasar.

11. Kerapatan Optik Warna Merah dan Kuning Pigmen Angkak

- a. Ambil satu sendok teh produk fermentasi
- b. Keringkan dalam oven pada suhu 45 °C selama satu hari
- c. Tumbuk dan ayak dengan saringan 80 mesh
- d. Ambil 1 g bubuk, ekstrak pigmen yang ada dengan penambahan methanol pa
- e. Kocok kuat-kuat kemudian diamkan selama 1 hari
- f. Saring filtrat yang terbentuk dengan kertas whatman no.1
- g. Isikan filtrat hasil penyaringan ke dalam *kuvet pyrex* berdiameter 1 cm, ukur kerapatan optic dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm dan 390 nm, Jika tidak terbaca, lakukan pengenceran.

12. Rendemen Angkak

- a. Ambil sejumlah sampel (misalnya A gram), kemudian dikeringkan
- b. Lakukan prosedur penentuan kerapatan optik.
- c. Keringkan sisa contoh yang tidak terekstrak, kemudian timbang (missal B g)

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100 \%$$

13. Penentuan Kelarutan Pigmen Angkak

Pengukuran penentuan kelarutan pigmen angkak sama seperti prosedur penentuan kerapatan optic. Sebagai bahan pengestrak digunakan air, etanol, kloroform dan methanol. Hasil pengukuran diukur dalam satuan absorbansi

14. Penentuan Asam Sitrat (Metode Piridin-Asetat Anhidrat)

- a. Masukkan 1 mL contoh yang mengandung 25-200 mg asam sitrat
- b. Tambahkan 21 mL piridin kemudian kocok dengan vortex hingga rata
- c. Tambahkan 5 mL asetat-anhidrat, kemudian kocok sampai merata dengan vortex.
- d. Tempatkan dalam penangas air bersuhu 32°C atau pada udara terbuka dengan suhu 22-29°C.
- e. Lakukan pembacaan intensitas warna dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 410 nm
- f. Buat kurva standar dengan membuat larutan asam sitrat konsentrasi 25-200 mg/ml
- g. Perlakuan pengukuran standar sama dengan contoh
- h. Buat blanko dengan perlakuan yang sama. Gunakan air sebagai pengganti contoh
- i. Kadar asam sitrat diduga dengan menggunakan kurva standar.

15. Rendemen Asam Sitrat

Rendemen Asam sitrat dihitung berdasarkan ratio jumlah asam sitrat (gram) dibagi volume kultur dikali 100%.

16. Penentuan Kadar Etanol

Penentuan kadar etanol dilakukan secara tidak langsung dengan penetapan Berat jenis hasil destilata contoh.

- Pipet 25 mL contoh dan masukan dalam botol penyulingan sambil diukur suhunya.
- Tambahkan air destilata dengan volume yang sama.
- Lakukan penyulingan, dan penyulingan dihentikan jika diperoleh hasil kurang lebih 23 mL.
- Masukkan destilata ini ke dalam piknometer 25 mL.
- Tepatan hingga tanda tera dengan penambahan air destilata, kemudian tutuplah.
- Keringkan dinding piknometer kemudian timbang. Setelah selesai cuci piknometer dengan aseton.
- Keringkan dan biarkan sampai pada suhu kamar, kemudian timbang botol piknometer kosong.
- Tentukan pula bobot 25 mL air destilata.
- Hitung bobot jenis destilata dengan rumus berikut :

$$A = \frac{D - P}{W - P}$$

Dimana :

A = Berat Jenis Destilata

D = Berat piknometer yang berisi destilat pada suhu t °C

P = Berat piknometer kosong pada suhu t °C

W = Berat piknometer yang berisi air destilata pada suhu t °C

Kadar etanol ditentukan dengan pertolongan tabel hubungan antara bobot jenis dan kadar etanol berbagai suhu.

17. Rendemen Etanol

Rendemen etanol (% b/b) dihitung berdasarkan rumus berikut ini :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Kadar Etanol} \times \text{volume filtrat} \times 0,789}{\text{Berat Bahan Baku Kering}} \times 100 \%$$

18. Enzim Glukoamilase (metode Pandey *et al.* 1994, diacu dalam Sunaryanto 2003)

Aktivitas enzim glukoamilase ditentukan dengan menggunakan substrat *soluble starch*. Filtrat enzim hasil ekstraksi diencerkan dengan buffer Na-asetat (pH 4.5-4.6) dengan faktor pengenceran (FP) beberapa kali. Sebanyak 2 mL *soluble starch* 2 % sebagai substrat (Vsb) dicampur 0.25 mL larutan contoh (Vc). Kemudian di inkubasi selama 20 menit pada suhu 60 °C. Setelah inkubasi dilakukan pemanasan dengan air mendidih selama 5 menit. Hal yang sama dilakukan untuk kontrol, dimana larutan sampel dipanaskan/didihkan terlebih dahulu sebelum dicampur substrat. Selanjutnya diukur gula pereduksinya (Cgr) (glukosa yang dibebaskan dari pati) dengan metode DNS.

Satu unit didefinisikan sebagai banyaknya μmol glukosa yang terbentuk oleh aktivitas enzim per menit pada kondisi percobaan.

Perhitungan aktivitas glukoamilase:

$$A = \frac{C_{gr} \times (V_c + V_{sb}) \times FP}{BM \times t \times V_c}$$

- Dimana:
- A = aktivitas glukoamilase (U/mL)
 - C_{gr} = Konsentrasi gula pereduksi dalam sampel (mg/L)
 - BM = Berat molekul glukosa (180 g/mol)
 - t = Waktu inkubasi substrat dengan sampel (menit)
 - V_c = Volume larutan contoh (mL)
 - V_{sb} = Volume larutan substrat (*soluble starch*) (mL)
 - F_p = Faktor pengenceran