

**PETUNJUK PRAKTIKUM  
TEKNOLOGI FERMENTASI**



**DISUSUN OLEH  
Dr rer nat Abu Amar**

**LABORATORIUM BIOKIMIA DAN TEKNOLOGI FERMENTASI  
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN  
INSTITUT TEKNOLOGI INDONESIA  
SERPONG  
2016**

**PETUNJUK PRAKTIKUM  
TEKNOLOGI FERMENTASI**



**DISUSUN OLEH  
Dr rer nat Abu Amar**

**LABORATORIUM BIOKIMIA DAN TEKNOLOGI FERMENTASI  
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN  
INSTITUT TEKNOLOGI INDONESIA  
SERPONG  
2016**

## Kata Pengantar

Buku petunjuk praktikum teknologi fermentasi ini adalah petunjuk praktikum yang telah direvisi, sebagai hasil diskusi dan workshop yang telah dilaksanakan pada tanggal 20 Desember 2017 di *Sentul City* Kabupaten Bogor lalu. Dalam workshop telah dipaparkan beberapa jenis praktikum yang memang harus dilaksanakan, yaitu minimal 5 macam produk dari proses fermentasi yaitu : Biomassa, Produk metabolit primer, Produk metabolit sekunder, enzim, dan produk transformasi.

Dalam hal biomassa diwakili oleh proses produksi biomassa menggunakan ragi *Saccharomyces cerevisiae*, untuk produk metabolit primer diwakili oleh fermentasi asam sitrat, menggunakan kapang *Aspergillus niger*. Lebih lanjut untuk produk metabolit sekunder diwakili oleh proses fermentasi antibiotik menggunakan mikroba kapang *Penicilium chrysogenum* atau *Penicillium notatum*, sedangkan untuk produk enzim diwakili oleh salah satu yaitu proses fermentasi enzim amilase atau enzim protease. Modul wajib terakhir adalah produk transformasi diwakili oleh proses fermentasi asam cuka berbasis air kelapa. Untuk modul tambahan disesuaikan dengan kebutuhan yang diperlukan karena biasanya berupa produk yang lagi *ngetrend* atau *hit* saat itu misalnya produk klasik yang sudah lama ada misalnya tempe, kecap, tape tauco atau produk yang lagi disenangi oleh masyarakat misalnya keju, yoghurt, nata decoco, ataupun kefir dll.

Dengan disusunnya buku petunjuk praktikum teknologi fermentasi ini diharapkan para mahasiswa dapat dengan mudah dalam melaksanakan kegiatan praktikum teknologi fermentasi, sehingga tujuan perkuliahan teknologi fermentasi dapat tercapai dengan baik. Demi kesempurnaan dan kelengkapan buku petunjuk praktikum Teknologi Fermentasi ini, kritik dan saran yang membangun dari para dosen sangat diharapkan.

Serpong, Akhir Desember 2016  
Pengampu Mata Kuliah  
Teknologi Fermentasi

(Dr rer nat Abu Amar)

# Daftar Isi

Kata Pengantar	3
Daftar Isi	4
Peraturan Praktikum	5
Nilai Praktikum	6
<b>Modul modul Wajib</b>	
Modul 1 Teknologi Fermentasi (Metabolit Primer) Asam sitrat	8
Modul 2 Teknologi Fermentasi (Metabolit sekunder) Penisilin	14
Modul 3 Teknologi Fermentasi (Biomassa)	17
Modul 4 Teknologi Fermentasi (Produk enzim) Amilase	23
Modul 5 Teknologi Fermentasi (Produk Transformasi) Asam cuka	30
<b>Modul Tambahan</b>	
Produksi Keju	33
Referensi	38

## **PERATURAN PRAKTIKUM**

### **Peserta Praktikum**

Peserta praktikum disebut sebagai praktikan. Praktikan berhak dan wajib mengikuti seluruh rangkaian kegiatan praktikum yang telah diprogramkan oleh laboratorium. Jika ada modul praktikum yang tidak diikuti karena sesuatu hal misalnya sakit maka praktikan yang belum melaksanakan praktikum modul tersebut harus mengulang dan melaksanakannya. Pelaksanaan praktikum susulan dikoordinasikan dengan asisten yang ada di laboratorium. Praktikan yang syah dan diijinkan mengikuti praktikum teknologi Fermentasi adalah mahasiswa yang telah mengisi KRS mata kuliah praktikum Teknologi Fermentasi. Bagi yang tidak mengisi KRS tidak diperkenankan untuk mengikuti praktikum

### **Tata Tertib Praktikum**

1. Praktikan harus mengikuti seluruh modul yang telah diprogramkan oleh Prodi atau wajib diikuti oleh semua mahasiswa sesuai dengan jadwal program yang telah ditentukan. Jika ada praktikan yang berhalangan harus memberikan surat keterangan tertulis secara syah sebagai pertimbangan untuk mengikuti praktikum susulan. Hal ini jika memungkinkan dihindari atau sedapat mungkin tidak terjadi kecuali kalau sakit
2. Dalam Laboratorium tidak diperbolehkan makan maupun merokok (kecuali organoleptik test)
3. Menggunakan jas praktikum jas laboratorium selama praktikum berlangsung
4. Test selalu diadakan pada setiap modul praktikum berlangsung, atau sesuai dengan jadwal yang telah ditentukan, biasanya pelaksanaan test sebelum praktikum dimulai
5. Bagi mahasiswa yang terlambat lebih dari 15 menit tidak diperkenankan mengikuti praktikum
6. Ketenangan dan kebersihan dalam laboratorium harus selalu dijaga.

### **Alat-Alat**

1. Sebelum praktikum berlangsung seluruh praktikan harus mengecek alat alat yang digunakan bila ada yang rusak segera melaporkan ke asisten yang jaga
2. Selesai praktikum alat alat harus dicuci bersih dan dilap sampai kering
3. Bila ada kerusakan alat alat akibat kelalaian mahasiswa (praktikan), maka praktikan diwaajaibakan menggantinya berupa alat yang sama
4. Selama penggantian belum dilakukan praktikan belum dapat diberi nilai praktikum.

## NILAI PRAKTIKUM

Nilai praktikum diambil dari komponen sebagai berikut:

- 2 kali rata rata nilai test semua modul praktikum
  - 1 kali rata rata aktifitas praktikum dalam laboratorium
  - 2 kali rata rata laporan semua modul praktikum
  - 3 kali rata rata nilai ujian responsi atau ujian akhir praktikum yang diadakan setelah semua modul praktikum yang wajib selesai dilaksanakan
- Kemudian jumlah seluruh kompenen itu dibagi dengan delapan.

### Contoh:

Rata rata nilai test 7.0

Rata rata nilai aktifitas praktikum 6.5

Rata rata nilai laporan praktikum 7.5

Nilai ujian akhir praktikum (Responsi) 7.2

$$\begin{aligned} \text{Maka nilai Akhir praktikum} &= \frac{(2 \times 7.0) + (1 \times 6.5) + (2 \times 7.5) + (3 \times 7.2)}{8} \\ &= 7.14 \\ &= B \end{aligned}$$

### Laporan

1. Setiap modul praktikum dilaporkan dalam satu laporan
2. Laporan dikumpulkan sesuai dengan jadwal yang telah ditentukan
3. Keterlambatan pengumpulan laporan akan mengurangi nilai laporan
4. Bentuk penulisan laporan
  - a. Dibuat dalam ukuran kertas folio (A4) / sesuai dengan ketentuan yang diberikan oleh asisten waktu praktikum berlangsung
  - b. Diketik/ditulis tangan secara rapi dan dapat dibaca dengan jelas oleh orang lain / sesuai dengan ketentuan yang diberikan asisten pada waktu praktikum berlangsung
  - c. Di halaman luar harus dicantumkan  
Kelompok praktikum.....kanan atas  
Nama asisten  
Judul Laporan ditengah  
Tanggal Percobaan dibawahnya
5. Isi laporan meliputi:
  - a. Pendahuluan  
Tujuan Praktikum  
DasarTeori yang berhubungan langsung dengan modul percobaan yang dilakukan
  - b. Bahan dan metode secara lengkap ditulis dalam bentuk kalimat pasip
  - c. Hasil Pengamatan dicantumkan dalam bentuk Tabel

- d. Pembahasan diuraikan sebagai alasan, sesuai dengan hasil pengamatan yang diperoleh saat praktikum berlangsung
  - e. Kesimpulan (dibuat kesimpulan yang ringkas padat sesuaikan dengan tujuan)
  - f. Daftar Pustaka
6. Nilai Laporan praktikum dengan komponen sebagai berikut:
- |                      |                               |          |
|----------------------|-------------------------------|----------|
| Pendahuluan          | nilai maksimum yang diberikan | 15 point |
| Bahan dan Metoda     | nilai maksimum yang diberikan | 20 point |
| Hasil dan Pengamatan | nilai maksimum yang diberikan | 15 point |
| Pembahasan           | maksimum nilai yang diberikan | 20 point |
| Kesimpulan           |                               | 5 point  |
| Daftar Pustaka       |                               | 5 point  |
7. Nilai keseluruhan maksimum 80

## MODUL 1 : FERMENTASI ASAM SITRAT

### 1. Pendahuluan

Asam sitrat adalah komponen alami dari buah buahan seperti jeruk baik jeruk keprok jeruk Medan, jeruk Pontianak , jeruk Garut, jeruk Malang dan juga jeruk Bali yang berukuran besar, jeruk nipis, yang biasanya asam banget untuk dimanfaatkan sebagai penyedap soto ayam jawa timur atau soto soto lainnya. **Asam sitrat** merupakan asam organik lemah yang ditemukan pada daun dan **buah** tumbuhan genus Citrus (jeruk-jerukan). Senyawa ini merupakan bahan pengawet yang baik dan alami, selain digunakan sebagai penambah rasa masam pada makanan, dapat menimbulkan cita rasa yang khas pada makanan sehingga menjadi lebih sedap. Awalnya sebelum ditemukan fermentasi asam sitrat ini dulu jika ingin mendapatkan kristal asam sitrat maka diperlukan berton ton buah jeruk nipis untuk diambil cairannya kemudian di kristalkan. Dengan ditemukannya proses fermentasi asam sitrat ini maka kita lebih mudah memperolehnya dalam waktu yang relatif lebih singkat tidak harus menanam jeruk dan membutuhkan berhektar hektar kebun.

Asam sitrat digunakan secara meluas dalam industri industri makanan, minuman, (75%) produk farmasi lebih kurang (10%) dan industri lainnya (15%). Untuk Makanan dan minuman misalnya digunakan untuk cocktail buah buahan ini meningkatkan cita rasa buahnya menjadi lebih intensif. Dengan demikian fungsi asam sitrat dalam industri paling tidak ada 3 macam yaitu:

- 1) Sebagai pengawet
- 2) Sebagai pengintensif cita rasa
- 3) Sebagai pembantu proses pengalengan
- 4) Sebagai Penggumpal keju analog

#### Ad.1)

Sekarang ini, banyak sekali produk di pasaran yang memakai bahan pengawet makanan yang membahayakan bagi kesehatan. Kita harus lebih cermat dalam memilih jenis produk berpengawet yang aman untuk kita konsumsi. Adapun beberapa zat pengawet makanan yang aman untuk kita konsumsi antara lain asam sitrat, garam benzoat, sorbat, dan propionat, belerang dioksida dan sulfite, nitrit dan nitrat, natrium klorida, gula, asam, nisin, natamycin, subtilin, serta antioksidan BHA dan BHT. Asam sitrat merupakan senyawa yang dapat digunakan untuk mengawetkan makanan dan minuman secara alami. Kandungan asam didalamnya berfungsi untuk mencegah pertumbuhan bakteri dan jamur. Asam sitrat juga berfungsi untuk menstabilkan warna makanan dengan cara mengurangi kekeruhan warnanya. Sehingga asam sitrat merupakan salah satu bentuk pengawet makanan yang dinyatakan 99,9% aman untuk dikonsumsi.

#### Ad.2)

Dalam berbagai produksi makanan, asam sitrat juga digunakan untuk menguatkan rasa masam pada makanan, misalnya untuk pembuatan permen, serta minuman-minuman bersoda. Fungsi dari asam sitrat itu sendiri adalah untuk menguatkan rasa dan mencegah kristalisasi gula. Selain itu, asam sitrat juga berfungsi untuk mengkatalisasi hidrolisa sukrosa ke dalam bentuk gula selama penyimpanan dan juga sebagai penjernih gel yang dihasilkan. Banyaknya asam sitrat yang ditambahkan pada produksi permen berkisar antara 0,2 s/d 0,3%.

### Ad.3)

Pengalengan merupakan cara pengawetan makanan dalam wadah yang tertutup rapat lalu disterilkan dengan panas. Tujuannya adalah untuk meningkatkan daya simpan produk. Adapun beberapa jenis makanan yang biasa dikalengkan adalah koktail, cincau, sop buah, sardines, dan lain-lain. Senyawa ini juga dapat digunakan untuk membantu dalam proses pengalengan makanan, seperti pengalengan buah-buahan yang memiliki keasaman rendah. Asam sitrat digunakan untuk meningkatkan pH yang terdapat pada makanan kaleng, sehingga dapat dikonsumsi dalam jangka waktu yang lama dan dapat membantu menghentikan perkembangan bakteri yang membahayakan bagi kesehatan

### Ad.4)

Keju merupakan produk olahan susu yang telah banyak dikenal diseluruh dunia, dimana bahan dasarnya adalah susu. Salah satu jenis keju yang terkenal adalah keju mozarella, yang terkenal berasal dari Italy yang memiliki sifat elastis, berserat, dan lunak. Salah satu bahan pendukung pembuatan keju tersebut adalah penambahan asam sitrat yang berfungsi untuk meningkatkan cita rasa keju. Selain itu, asam sitrat juga berfungsi untuk menggumpalkan susu dalam proses pembuatannya. Disamping pada pengolahan keju kadang kadang untuk meningkatkan cita rasa pada yoghurt suka juga dalam proses pembuatannya ditambahkan asam sitrat untuk meningkatkan diacetyl dan senyawa butanediol untuk menambah konsentrasi diasetilnya sehingga rasa yoghurtnya lebih nikmat. Namun yang sudah diimplementasikan pada industri adalah untuk industri keju.

Proses fermentasi asam sitrat lazimnya dengan kapang *Aspergillus niger*, kapang ini adalah kapang utama yang dimanfaatkan untuk produksi asam sitrat dengan proses fermentasi. Kapang ini bersifat aerobik. Asam sitrat yang diproduksi berbentuk anhidrous atau dalam bentuk monohidrat. Suhu transisi antara kedua bentuk itu adalah 36.6°C. Bentuk anhidrous diperoleh dengan kristalisasi dari larutan air yang cukup panas, sedangkan senyawa monohidrat diperoleh dari kristalisasi pada suhu dibawah 36.6°C. Selain kapang, mikroorganisme dari Yeast banyak digunakan di Jepang untuk memproduksi asam sitrat, bahkan sudah dimanfaatkan pada skala industri. Yeast yang dimaksud adalah *Candida lipolytica*, *Candida tropicalis*, *Candida intermedia*, *Candida parapsilosis* dan *candida guilliermondii*.

Asam sitrat sebagai hasil metabolit primer dalam proses fermentasi ini tentu tidak diekskresikan dalam jumlah yang berlebihan, namun diproduksi sesuai dengan kebutuhan yang diperlukan oleh sel sel kapang. Oleh karena itu agar proses produksi asam sitrat berlebih, hanya dapat terjadi dalam kondisi metabolisme tidak normal. Akumulasi asam sitrat dalam media

terjadi jika ada defisiensi enzimatik yang disebabkan oleh kekurangan zat gizi Nitrogen, Fosfat, Mangan, zat besi dan terutama Zn. Ion-ion ini dapat mempengaruhi hasil produksi asam sitrat. Produktivitas yang tinggi dapat dicapai jika pertumbuhan mikroorganismenya dibatasi oleh zat gizi tersebut diatas dalam pertumbuhannya. Dengan demikian defisiensi senyawa Zn dapat meningkatkan produksi asam sitrat.

Ada dua macam tipe proses fermentasi asam sitrat dengan menggunakan *Aspergillus niger* yaitu:

- 1) Surface fermentation yaitu fermentasi permukaan dengan menggunakan molases sebagai bahan dasarnya untuk sumber gulanya.
- 2) Submerged fermentation yaitu fermentasi terendam. Bahan baku sumber gulannya dapat dipakai sukrosa, gula beet ataupun molases, bahkan sirup glukosa juga dapat digunakan karena masih dianggap murah, namun harus benar diperhitungkan kalau mau menggunakan glukosa apakah BEP nya baik jika dibandingkan dengan molases.

Fermentasi yang menggunakan yeast dilakukan dengan fermentasi terendam dan menggunakan molases ataupun sirup glukosa sebagai sumber karbonnya.

### **Produksi menurut kultur permukaan**

Kondisi media sangat mempengaruhi produksi asam sitrat, kekurangan dari unsur-unsur logam seperti yang disebutkan dalam pendahuluan ini ternyata mempengaruhi produktivitas yang nyata. Faktor-faktor penting yang mempengaruhi dan menentukan persiapan media adalah:

- a). kandungan gula, optimalnya jika kadar gula antara 14-20%
- b). garam-garam anorganik seperti N K P dan S serta Mg diperlukan dalam jumlah tertentu
- c). Keasaman (pH) kestabilan pH merupakan salah satu faktor penting untuk produksi asam sitrat. Garam-garam anorganik dan pH sangat menentukan proporsi asam sitrat maupun asam oksalat yang dihasilkan. Menurut hasil penelitian laboratorium pH optimal untuk fermentasi asam sitrat adalah 2.2 atau kurang dari itu.

- d). Nisbah luas permukaan terhadap volume media.

Dalam fermentasi asam sitrat konversi gula menjadi asam sitrat dilakukan oleh enzim intraseluler dan berlangsung didalam sel yang membentuk suatu lapisan miselium. Gula masuk kedalam sel secara osmosis, sedangkan asam sitrat keluar dengan cara difusi. Laju awal proses enzimatik dan difusi akan menentukan berapa lama fermentasi berlangsung. Jadi jelas bahwa dalam wadah yang dalam dan besar kecepatan pembentukan asam sitrat relatif lebih lambat, karena luas permukaan lapisan miselium menjadi kecil jika dibandingkan dengan volume. Baki-baki yang digunakan dangkal atau bejana yang digunakan dangkal maka permukaan menjadi lebih besar akibatnya konversi gula menjadi asam sitrat berlangsung lebih cepat.

- e). Persediaan oksigen.

Persediaan Oksigen yang cukup banyak justru akan menurunkan rendemen, demikian juga kalau terlalu sedikit. Oleh karena itu perlu penelitian khusus untuk merancang persediaan oksigen dalam fermentasi asam sitrat ini. Berdasarkan penelitian Ovelando dkk, 2013 menyampaikan bahwa volume jamur yang dipakai sebagai inokulum dalam produksi asam sitrat berbasis sari markisa akan menghasilkan 4.46% asam sitrat jika volume inokulum 50 ml dan waktu fermentasi 5 hari tanpa diketahui proses aerasinya.

- e). Suhu. Suhu yang paling optimum digunakan menurut eksperimen adalah 26-28°C.

Pada percobaan ini dilakukan fermentasi dengan menggunakan satu macam suhu saja dan keduanya adalah fermentasi permukaan yang membedakan adalah luas permukaan yang digunakan yang satu menggunakan erlenmeyer bervolume 1 liter dan yang lain volume 500 ml dengan volume media yang sama masing masing 250 ml.

### **BAHAN DAN ALAT**

Bahan : Biakan murni *Aspergillus niger*, air suling steril (5 ml dalam tabung reaksi )

Media fermentasi dengan komposisi sebagai berikut:

Sukrosa teknis	150.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.25g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> atau NH <sub>4</sub> Cl	0.25g
MnSO <sub>4</sub>	18 µg/L
Fe SO <sub>4</sub>	1.62µg/L

Semua bahan tersebut dilarutkan dalam aquadest dan ditepatkan menjadi 1 liter. pH kemudian diatur dengan asam klorida (HCl 0.1N) menjadi 2.5 sampai 3.0. 200 ml ditempatkan dalam erlenmeyer 500 ml dan 200 ml ditempatkan dalam erlenmeyer volume 1000 ml (untuk dua kelompok) untuk dua kelompok lain dibuat dengan cara yang sama. Jadi ada empat kelompok, sisa 200 ml ditempatkan pada erlenmeyer 250 ml sebagai kontrol

**Alat** : Erlenmeyer 250 ml dan 500 ml serta yang bervolume 1 liter  
Pipet pipet steril, autoclave dan inkubator yang dapat diatur suhunya

### **Cara kerja**

1. Sterilkan media , air suling dan semua pipet [ipet maupun erlenmeyer yang akan dipakai dalam percobaan pada autoclave dengan suhu 121°C dengan tekanan 1-2 Atm selama 15 menit.
2. Dinginkan semuanya pada suhu kamar
3. Tambahkan 5 ml air suling steril pada biakan kapang *Aspergillus niger* yang penuh dengan spora, buatlah suspensi spora secara merata.
4. Tambahkan 1 ml suspensi spora kapang *Aspergillus niger* kedalam media steril yang sudah dingin. (pada empat erlenmeyer yang sudah disiapkan 2 dengan volume 1 l, dan dua lagi dengan volume erlenmeyer 500 ml) dan 1 erlenmeyer lagi berisi 200 ml supaya diinokulasi sebagai kontrol
5. Semua erlenmeyer baik yang sudah diinokulasi maupun yang tidak diinkubasikan pada suhu yang sama selama 1 minggu
6. Pengamatan dilakukan seminggu kemudian.

### **Pengamatan**

Setelah umur 1 minggu pengamatan dilakukan terhadap : pertumbuhan biomassa kapang, pH cairan media dan juga keberadaan asam sitrat dalam media

### **Cara Pengujian**

#### **Biomassa**

Keringkan kertas saring berlipat dari Whatman masukkan oven pada suhu 80°C kemudian dinginkan kedalam eksikator selama 30 menit. Kemudian timbanglah berat keringnya (wo). Saringlah seluruh kultur melalui kertas saring, tamunglah filtratnya dalam erlenmeyer yang lain. Sisihkanlah filtratnya kemudian ukur pHnya. Juga keasaman total. Cuci biomassa pada kertas saring, kemudian keringkanlah pada oven pada suhu 80°C selama 1 jam kemudian dinginkanlah pada desikator lalu timbanglah (w1)

$$\text{Biomassa (\% b/v)} = \frac{\text{Berat biomassa kering ( w1-wo)}}{\text{Volume media yang terukur}} \times 100\%$$

**pH** diukur dengan mengukur cairan media menggunakan pH meter digital yang sebelumnya pH meter dikalibrasi terlebih dahulu.

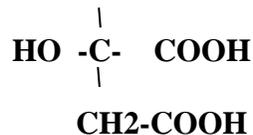
### Total Asam

Total asam diukur sebagai asam sitrat.

Pipet 10 ml filtrat kedalam erlenmeyer 250 ml, encerkan dengan kira kira 10 ml air suling lalu tambahkan 2 tetes indikator Phenolpftalin, titrasi dengan larutan NaOH 0.1N sampai titik akhir titrasi ditandai dengan warna lautan merah jambu. Catat pemakaian volume NaOH 0.1 N yang dibutuhkan sebagai V1. Kemudian pipet 10 ml larutan dari media kontrol dan tambahkanlah air suling sebanyak 10 ml tambahkan indikator beberapa tetes Phenolphtalin dilanjutkan dengan titrasi dengan NaOH 0.1 N catat pemakaian volume NaOH 0.1 N misalnya V0

$$\text{Asam sitrat hidrat} = \frac{(V1-V0) \times N \text{ NaOH} \times \text{BM Asam sitrat hidrat}}{\text{ml Contoh}} \times 100$$

Rumus asam sitrat **CH<sub>2</sub>-COOH**



BM asam sitrat hidrat terhitung sama dengan BM/3 = 64

Untuk mengecek keberadaan asam sitrat sisa filtrat yang masih ada diperlakukan dengan penambahan Ca(OH)<sub>2</sub> kemudian dikocok sampai terbentuk seperti susu, kemudian ditambahkan asam sulfat, maka akan terbentuk endapan putih seperti kapur itulah Gips sedangkan larutannya adalah asam sitrat dengan reaksi sebagai berikut:



Ambilah supernatannya, itu adalah larutan asam sitrat murni.

### Tabel Pengamatan

Buatlah tabel pengamatan pada perlakuan luas permukaan fermentasi dan juga kontrol apakah yang terjadi, cek pH cairan sebelum fermentasi dan sesudah fermentasi,

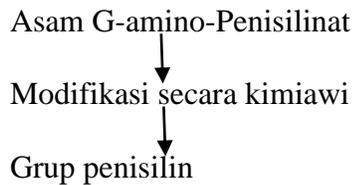
Total asam sesudah fermentasi bandingkan data data yang diperoleh.yang berbeda dengan jumlah total asam pada wadah yang lain  
Amatilah endapan putih jika filtratnya ditetsi dengan  $\text{Ca(OH)}_2$  dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Buatlah laporan dan bahaslah berdasarkan data yg kalian peroleh

## MODul 2: FERMENTASI ANTIBIOTIK PENISILIN

### Pendahuluan

Penisilin merupakan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh Kapang *Penicillium notatum* ataupun *Penicillium chrysogenum* dalam media tertentu. Penisilin digunakan dalam terapi sistemik. Sampai dengan saat ini mempunyai indeks therapeutik terbesar. Sifat senyawa Penisilin adalah tidak beracun dan yidak stabil dalam air.

Bagan utama proses pembentukan Penisilin sebagai berikut:



**Misalnya** karbenisilin dan metisilin

Penisilin dapat diproduksi dengan baik melalui metode kultur permukaan maupun kultur terendam. Pada metode kultur terendam kapang ditambahkan secara terendam pada medium fermentasi didalam tabung beergoyang. Biasanya dgunakan untuk studi laboratorium. Sementara drum berputar atau tangki tangki yang dalam digunakan untuk skala ilot plant atau komersial. Agitasi dan aerasi dperlukan untuk menghasilkan produk yang optimal.

### Tujuan Praktikum:

- 1) Ingin memproduksi antibiotik penisilin dengan cara fermentasi menggunakan kapang *Penicillium chrysogenum* ataupun *Penicillium notatum*
- 2) Membuktikan bahwa ekstrak hasil fermentasi mengandung senyawa antibiotik yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri pada media agar dibuktikan dengan *clear zone* yang terbentuk

### Media Sporulasi

Dalam produksi penisilin penting untuk menumbuhkan spora dalam jumlah yang sangat besar yang digunakan untuk inokulasi. Sejumlah media yang telah dikembangkan untuk tujuan tersebut seperti contoh berikut:

Gliserol	7.5	g
Molases	7.5	g
Corn Steep liquor	2.5	g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.05	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.06	g
Pepton	5.0	g
NaCl	4.0	g
Fe-Tartrat	0.004	g
Agar	15	g

Aquadest                      1000 ml

## **Inokulasi**

Ada beberapa metode inokulasi dalam produksi penisilin antara lain:

- 1) Kultur permukaan: Permukaan medium dengan spora kering dalam keadaan murni ataupun campuran dengan tepung gandum
- 2) Kultur terendam Medium diinokulasi dengan spora yang menggunakan suspensi spora yang tidak bergerminasi (berkecambah) atau dalam bentuk pelet.

Dalam percobaan ini akan dilakukan produksi penisilin dengan cara kultur terendam pada media fermentasi broth yang berbeda.

## **Bahan dan Cara Kerja**

Alat Alat                      : Erlenmeyer. Pipet steril, autoklaf, rotary shaker, cawan petridish steril  
Jarum inokulasi, lampu spiritus dan batang pengaduk steril

Bahan                            : Biakan murni *Penicillium chrysogenum*, aquadest steril  
Media fermentasi yang sudah disiapkan dalam kondisi steril yaitu Malt ekstrakt broth, Czapexdoc broth.  
Biakan murni *Bacillus subtilis* pada media NA umur 24 jam saat test keberadaan antibiotik nantinya  
Media PCA (Plate Count agar)

## **Cara Kerja**

- 1) Sterilkan media aquadest dan pipet pipet dalam autoklave
- 2) Dinginkan semua peralatan ataupun media sampai suhu kamar
- 3) Tambahkan 5 ml aquadestilata steril kedalam biakan jamur/kapang *Penicillium chrysogenum*
- 4) Campur hingga merata sehingga diperoleh suspensi
- 5) Tambahkan 2 ml suspensi kedalam media steril yang sudah disiapkan (250ml MEB) dalam erlenmeyer 500 ml, dan satu lagi (kelompok lain), 250 ml Czapex doc Broth dalam erlenmeyer 500 ml. Kedua erlenmeyer diinkubasikan pada suhu ruangan yang suhunya konstant pada suhu  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  jika memungkinkan
- 6) Siapkan rotary shaker untuk rangkaian ini

## **Pengamatan**

- 1) Setelah fermentasi berlangsung 7 hari pengamatan dilakukan pada hasil produksi penisilin dan aktifitas antibiotiknya.
- 2) Firasi Penisilin dilakukan dengan cara sebagai berikut:  
Gunakan filter membran bisa digunakan kertas saring whattman yang berpori pori dengan diameter pori  $0.45\mu$
- 3) Fitrat dipakai sebagai curd antibiotik

### Uji aktifitas antibiotik

- 1) Siapkan media PCA (plate count Agar) dan kemudian cairkan dalam penangas air
- 2) Inokulasikan media PCA dengan bakteri *Bacillus substilis* dengan cara pour plate
- 3) Celupkn paper disk steril pada cairan antibiotik yang kamu peroleh dari praktikum
- 4) Tempelkan paper disk tersebut secara aseptis dibagian tengah dari agar plate yang sudah diionokulasi dengan *Bacillus substilis*.
- 5) Inkubasikan pada suhu kamar secara terbalik dengan hati hati.
- 6) Amati adanya zone bening disekitar paper disk yang menunjukkan adanya daerah penghambatan pertumbuhan mikroba.
- 7) Ukurlah diameter zona bening itu, bandingkanlah aktivitas antibiotiknya pada media fermentasi dari kelompok lain

### Modul 3: FERMENTASI ALKOHOL (BIOMASSA SEL)

#### *Saccharomyces cerevisiae*

Fermentasi pada mulanya didefinisikan sebagai suatu peristiwa keluarnya gelembung gelembung gas pada proses perubahan bahan-bahan yang mengandung gula atau pati menjadi minuman beralkohol. Kemudian, istilah fermentasi digunakan untuk menyebut proses biologis maupun non biologis. Lebih jauh Pasteur membuat definisi fermentasi yaitu suatu reaksi anaerob yang melibatkan aktivitas mikroba dalam memperoleh energi untuk pertumbuhannya dalam keadaan tanpa oksigen.

Dewasa ini fermentasi mempunyai arti atau pengertian yang lebih luas yaitu: semua kegiatan mikroba yang dilaksanakan baik aerobik maupun anaerobik yang menghasilkan suatu proses perubahan kimiawi spesifik pada suatu substrat organik. Fermentasi alkohol dapat didefinisikan sebagai proses perubahan senyawa-senyawa gula oleh mikroba (Dalam hal ini yeast) yang menghasilkan CO<sub>2</sub> dan Alkohol atau etanol.

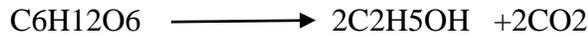
Fermentasi alkohol cukup terkenal di Indonesia, nbanyak minuman tradisional yang sebenarnya merupakan hasil proses fermentasi alkohol. Misalnya saja Tuak, Badeg pace, badeg lengkuas, Anggur, brem Bali, cairan tape ketan hitam, dan lain sebagainya. (untuk cairan tape hitam biasanya masyarakat tidak sengaja memproduksi cairan tape ketan hitam tujuannya untuk membuat tape tetapi airnya sangat banyak sekali dan itu banyak mengandung alkohol karena dari baunya yang sangat alkoholis. Bahan dasar yang dipakai dalam fermentasi ini adalah bahan yang mengandung gula (tetes, nira kelapa, nira aren dll) dan bahan karbohidrat (beras, beras ketan, pati atau tepung dari beberapa jenis umbi-umbian). Jika dipakai bahan bakar dari karbohidrat maka sebelum dilakukan fermentasi sebaiknya dilakukan sakarifikasi lebih dahulu. Yaitu proses penguraian karbohidrat menjadi gula-gula sederhana yang dilakukan secara enzimatik atau cara yang lain.

Alkohol yang terbentuk merupakan hasil fermentasi gula oleh Yeast misalnya *Saccharomyces cerevisiae* dan juga *Saccharomyces ellipsoides*, yang biasa digunakan dalam proses ini. Namun selain itu, ada juga *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces carlesbergensis* yang biasa digunakan untuk membuat beer dengan merek (Carlsberg beer). Nama merek beer terkenal ternyata diambil dari nama species yeast yang digunakan dalam proses. Konsentrasi gula yang digunakan antara 10-12%, jika konsentrasi gula lebih tinggi produksi alkoholnya juga akan tinggi namun perlu diperhatikan kemampuan jenis yeastnya apakah dia tahan pada tekanan osmotik yang tinggi pula. Jika gula tinggi logikanya tekanan osmotik cairan naik, harus dicari jenis species Yeast yang osmotoleran.

Suhu fermentasi yang lazim digunakan adalah antara 21.1 – 32.2°C. Aroma akan berkembang lebih baik pada suhu yang lebih rendah yaitu pada range 21.1-23.9°C. Namun suhu yang rendah memperlambat proses fermentasinya sendiri. Konsentrasi gula dan suhu fermentasi merupakan faktor penting yang mempengaruhi kualitas beer atau alkohol yang dihasilkan. Disamping itu harus diperhatikan pula seleksi yeast yang digunakan. Yang tidak kalah pentingnya adalah supply O<sub>2</sub>, jika O<sub>2</sub> tidak cukup maka pembentukan alkohol yang relatif cukup sebaliknya jika supply oksigen cukup maka pembentukan alkohol rendah yang diproduksi adalah biomassa selnya. Faktor lain adalah nutrisi dan jenis bahan baku karbohidratnya.

Selama proses fermentasi selain dibentuk alkohol akan dihasilkan pula asam misalnya asam malat, asam sitrat serta asam-asam yang mudah menguap misalnya asam asetat atau asam propionat. Kadang-kadang terbentuk juga senyawa metanol. Aktivitas fermentasi dapat diamati dengan adanya pembentukan alkohol, pembentukan gas CO<sub>2</sub> ditandai dengan gelembung-gelembung gas yang keluar selama proses, rasa serta aroma alkohol dari minuman yang bersangkutan.

Reaksi biokimia pembentukan alkohol mengikuti tahap-tahap reaksi seperti pada bagian EMP (Embden Meyerhoff Parnas) yang reaksinya secara singkat dapat ditulis sebagai berikut:



Reaksi pembentukan alkohol berlangsung dalam suasana anaerob (Tanpa oksigen), namun demikian oksigen tetap dibutuhkan pada awal fermentasi untuk pembentukan sel-sel yang cepat. Setelah sel-sel terbentuk cukup, suasananya anaerob akan terwujud dengan sendirinya sebab oksigen terlarut telah habis dikonsumsi dan mulai timbul gelembung-gelembung gas CO<sub>2</sub> yang terakumulasi akan mendukung suasana anaerob. Dari persamaan reaksi di atas dapat ditentukan secara teoritis alkohol yang dihasilkan sebanyak 51% dari berat gula yang dipakai (2 mol etanol: 1 mol glukosa) =  $2 \times 46 / 180 = 0.511$ ). Dalam hal ini semua gula dikonversi menjadi alkohol atau dikatakan bahwa efisiensi produksi alkohol sebesar 100%, dalam kenyataan efisiensi sebesar 95%, bergantung dari bahan dasar gula yang digunakan.

Untuk dapat menilai suatu proses dipakai kinetika fermentasi yang ditunjukkan dengan parameter seperti: kecepatan pertumbuhan sel spesifik, Growth yield, pembentukan produk. Dalam latihan ini pengamatan proses fermentasi setiap saat mengalami kesulitan. Oleh karena itu dalam proses fermentasi hanya ditentukan beberapa parameter yang sederhana misalnya pembentukan produk, efisiensi produksi alkohol dan enersi yang hilang dll.

Banyaknya substrat yang digunakan untuk pembentukan produk (SP) dapat dihitung sebagai berikut:

$$SP = \frac{P_2 - P_1 \times 0.8 \times 10}{0.51} \text{ g/l}$$

P<sub>1</sub> = Kadar alkohol pada awal fermentasi % v/v

P<sub>2</sub> = Kadar alkohol pada akhir fermentasi % v/v

0.8 = adalah berat jenis alkohol, 0.51 = adalah faktor konversi gula menjadi alkohol

Banyaknya substrat yang digunakan untuk pembentukan sel sama dengan S<sub>x</sub> yang dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$S_x = \frac{(X_2 - X_1) \times F \times 0.47}{0.4}$$

X<sub>1</sub> = jumlah sel awal fermentasi, sel/ml

X<sub>2</sub> = jumlah sel pada akhir proses fermentasi, sel/ml

F = faktor konversi dari jumlah sel menjadi berat sel mg/sel

Banyaknya substrat yang digunakan untuk pembentukan produk SP dihitung sebagai berikut

$$Sp = \frac{(P2-P1) \times 0.8 \times 10}{0.51} \text{ g/l}$$

P1 = kadar alkohol pada awal fermentasi % V/V

P2 = Kadar alkohol pada akhir fermentasi % V/V

Banyaknya substrat yang diubah menjadi enersi yang hilang Se dihitung berdasarkan persamaan untuk neraca bahan  $\Delta S = SP + SX + Se$  atau  $\Delta S = S2 - S1$

$\Delta$  = Banyaknya substrat yang dikonversi g/l

S1 = Kadar substrat awal fermentasi g/l

S2 = Kadar substrat pada akhir fermentasi g/l

Efisiensi produksi alkohol terhadap gula dapat dihitung sbb: Efisiensi produksi =  $SP/S1 \times 100\%$

### Metode

1. Bahan Biakan murni *Saccharomyces cerevisiae* dalam media tauge agar miring Larutan Sukrosa dengan berbagai konsentrasi yang sudah steril Amonium Sulfat dan Phosphat Asam sulfat
2. Alat: Spektrofotometer, conway disk labu fermentasi, centrifuge, hydrometer, Autoclave, pH meter, Haemacytometer, Mikroskop. Tally Counter, alat alat gelas lainnya.

### Cara kerja

#### Pengaruh Kadar Gula pada Fermentasi Alkohol

1. Siapkan 150 ml media gula pasir (gula merah) 5 sampai dengan 8 % steril sebanyak 4 labu erlenmeyer
2. Atur keasaman dengan asam sulfat 1 N sehingga pH 4.5
3. Untuk setiap 150ml media gula pasir diinkubasikan dengan satu tabung biakan murni yeast yang berumur 3 hari
4. Inkubasikan pada suhu ruangan selama 24 jam, maka diperoleh starter, Sebelum starter digunakan, amati jumlah sel sel khamir/ml untuk masing masing starter untuk menentukan berapa jumlah starter yang diperlukan untuk inkubasi.

#### Fermentasi Alkohol

1. Siapkan masing masing 1 liter media gula pasir/gula merah dengan konsentrasi 5 , 5,7 dan 8% dalam satu labu fermentasi
2. Atur keasaman dengan asam sulfat 1N sehingga diperoleh pH 4.5
3. Sterilkan pada suhu 121°C selama 15 Menit kemudian didinginkan
4. Tambahkan di setiap 1 liter media sebanyak 1 gram Amonium sulfat dan 0.3 gram Amonium phosphat

5. Inokulasikan dengan cara menuangkan secara aseptis starter yang telah dibuat dan inkubasikan pada suhu ruangan
6. Lakukan pengamatan pada awal fermentasi (jam ke 0, setelah inkubasi 24 jam dan 48 jam) dengan mengambil contoh bahan dan kemudian dilakukan penentuan
  - a. jumlah sel/ml
  - b. kadar gula
  - c. kadar alkohol
  - d. kerapatan sel pada OD 660

Setiap pengamatan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan

Dari hasil pengamatan yang diperoleh hitunglah.....

1. Banyaknya sisa gula setelah fermentasi 24 jam dan 48 jam
2. Gula yang dikonsumsi setelah 24 dan 48 jam
3. SP, Sx, dan S1 setelah 24 jam dan 48 jam
4. Efisiensi produksi alkohol terhadap gula setelah 24 jam dan 48 jam

Cantumkan cara pengamatan tersebut dalam blanko laporan yang disediakan dan buatlah evaluasi proses fermentasinya.

### **Cara analisis**

Perhitungan jumlah sel khamir

1. Diambil 1 ml sampel dimasukkan dalam tabung reaksi berisi 9 ml aquadest steril kemudian digojok sampai homogen
2. Diambil satu tetes diletakkan pada haemocytometer tepat pada petaknya kemudian ditutup dengan gelas penutup secara hati-hati supaya tidak ada gelembung udara
3. Amati dengan mikroskop pembesaran sedang
4. Jika terlalu pekat dilakukan pengenceran

Perhitungan berdasarkan pada jumlah sel khamir rata-rata tiap kotak x pengenceran x volume

Diketahui: Kedalaman petak = 0.01 mm, luas tiap petak =  $1/400 \text{ mm}^2 = 0.0025 \text{ mm}^2$   
 $= 25 \times 10^8 \text{ ml}$ . Sehingga jumlah sel yeast/ml =  $A/25 \times 10^8 \times \text{pengenceran}$

### **Analisis Kadar Gula**

Urutan Kerja

1. Ambil aquadest secukupnya dan 0.5 ml HCl pekat
2. Panaskan pada suhu 60-70°C selama 10 menit. Kemudian dinginkan secara cepat netralkan dengan NaOH 4%
3. Filtrat, tambahkan Na-Phosphat K-Oksalat 10% sebanyak 3 ml kemudian encerkan menjadi 200 ml dan saring
4. Ambil 25 ml filtrat, tambahkan 25 ml larutan Luff-Schoorl dan beri batu didih secukupnya kemudian panaskan sampai mendidih selama 8 menit dengan penutup pendingin baik
5. Dinginkan secepat dengan air mengalir
6. Tambah 15 ml KI 20% dan 25 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 26.5%, kemudian titrasi dengan Na-Tiosulfat 0.1N dengan indikator amylum 1%. Indikator ini ditambahkan bila akhir titrasi hampir dicapai
7. Buat blanko dengan perlakuan yang sama dengan sample

8. Perhitungan: selisih titrasi blanko dan sampel x pengenceran dipakai untuk menentukan jumlah gula dengan menggunakan tabel gula pada halaman berikut.

Tabel 1: Glukosa (mg) yang setara dengan nilai titrasi sesungguhnya (ml Tiosulfat 0.005N)

ml Tio	Glukosa						
0.3	= 0.067	4.5	= 0.672	8.7	= 1.237	12.9	= 1.756
0.4	= 0.086	4.6	= 0.685	8.8	= 1.249	13.0	= 1.770
0.5	= 0.105	4.7	= 0.698	8.9	= 1.262	13.1	= 1.785
0.6	= 0.125	4.8	= 0.713	9.0	= 1.275	13.2	= 1.800
0.7	= 0.142	4.9	= 0.729	9.1	= 1.288	13.3	= 1.813
0.8	= 0.157	5.0	= 0.746	9.2	= 1.300	13.4	= 1.827
0.9	= 0.173	5.1	= 0.759	9.3	= 1.313	13.5	= 1.842
1.0	= 0.191	5.2	= 0.772	9.4	= 1.326	13.6	= 1.856
1.1	= 0.210	5.3	= 0.787	9.5	= 1.339	13.7	= 1.871
1.2	= 0.229	5.4	= 0.797	9.6	= 1.354	13.8	= 1.885
1.3	= 0.247	5.5	= 0.810	9.7	= 1.368	13.9	= 1.889
1.4	= 0.263	5.6	= 0.822	9.8	= 1.382	14.0	= 1.913
1.5	= 0.279	5.7	= 0.837	9.9	= 1.397	14.1	= 1.928
1.6	= 0.294	5.8	= 0.852	10	= .....	14.2	= 1.942
1.7	= 0.306	5.9	= 0.868	10.1	= 1.411	14.3	= 1.956
1.8	= 0.319	6.0	= 0.882	10.2	= 1.435	14.4	= 1.971
1.9	= 0.332	6.1	= 0.892	10.3	= 1.446	14.5	= 1.984
2.0	= 0.344	6.2	= 0.902	10.4	= 1.457	14.6	= 1.992
2.1	= 0.357	6.3	= 0.911	10.5	= 1.469	14.7	= 2.010
2.2	= 0.370	6.4	= 0.926	10.6	= 1.480	14.8	= 2.022
2.3	= 0.382	6.5	= 0.940	10.7	= 1.491	14.9	= 2.035
2.4	= 0.395	6.6	= 0.950	10.8	= 1.502	15.0	= 2.048
2.5	= 0.408	6.7	= 0.969	10.9	= 1.513		
2.6	= 0.421	6.8	= 0.983	11.0	= 1.524		
2.7	= 0.434	6.9	= 0.997	11.1	= 1.535		
2.8	= 0.446	7.0	= 1.010	11.2	= 1.547		
2.9	= 0.461	7.1	= 1.023	11.3	= 1.558		
3.0	= 0.477	7.2	= 1.036	11.4	= 1.569		
3.1	= 0.493	7.3	= 1.048	11.5	= 1.580		
3.2	= 0.507	7.4	= 1.061	11.6	= 1.591		
3.3	= 0.520	7.5	= 1.074	11.7	= 1.602		
3.4	= 0.532	7.6	= 1.088	11.8	= 1.613		
3.5	= 0.543	7.7	= 1.102	11.9	= 1.624		
3.6	= 0.558	7.8	= 1.116	12.0	= 1.636		
3.7	= 0.571	7.9	= 1.130	12.1	= 1.649		
3.8	= 0.583	8.0	= 1.145	12.2	= 1.662		
3.9	= 0.596	8.1	= 1.159	12.3	= 1.674		
4.0	= 0.609	8.2	= 1,173	12.4	= 1.687		
4.1	= 0.622	8.3	= 1.186	12.5	= 1.700		
4.2	= 0.634	8.4	= 1.192	12.6	= 1.713		

4.3	= 0.647	8.5	= 1.211	12.7	= 1.729
4.4	= 0.660	8.6	= 1.244	12.8	= 1.742

### Analisis berat kering yeast

Urutan kerja:

1. Ambil sejumlah sel dengan kepekatan tertentu yang telah diketahui atau dihitung jumlahnya
2. Lakukan sentrifugasi pada 2000-3000 g selama 10 menit. Supernatan dibuang dan dicuci endapannya dengan air suling beberapa kali sehingga akhirnya diperoleh endapan sel sel yeast yang bersih dari kotoran
3. Keringkan dalam oven sampai beratnya konstant pada suhu  $105 \pm 1^\circ\text{C}$  selama 1 jam masukkan desikator dan timbanglah
4. Buatlah beberapa ulangan
5. Hitunglah hubungan antara berat dan jumlah sel sel yeast mg/sel kering/jumlah sel

### Analisis Alkohol

Urutan kerja:

1. Ambil satu ml sampel masukkan dalam labu takar 100 ml ditambahkan dengan aquadest sampai tanda
2. Ambil 1 ml masukkan dalam petak tepi mikrodifusi dish (Conway microdiffusion dish)
3. Satu ml larutan  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (kalium bikromat) jenuh pada bagian tepi bercampur dengan sample
4. Tutup dengan penutup menggunakan perekat vaselin kemudian digojok secara hati hati dengan jalan memutar mutar supaya sample dan kalium karbonat jenuh tercampur secara merata kemudian inkubasikan pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 2 jam
5. Setelah inkubasi larutan Kalium bikromat diambil dengan menggunakan drop pipet secara hati hati, uahakan agar semuanya terambil dengan cara menambahkan aquadest pada waktu pengambilannya
6. Masukkan dalam labu takar 10 ml diencerkan dengan aquadest sampai tanda
7. Amati optical density menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang  $\lambda$  480nm, konsentrasi alkohol dapat diketahui dengan membandingkan kurva standard perhatikan pengencerannya.
8. Pembuatan kurva standar alkohol terdiri atas aquadest dan larutan alkohol dengan konsentrasi 0.025%; 0.05%; 0.075%; 0.1 % sebagai sample dengan perlakuan sama seperti diatas.

### HASIL PEGAMATAN

Percobaan	Kadar Sukrosa		
	1	2	3
Pengamatan pada jam ke			
1. Jumlah sel/ml			
2. Kadar gula g/l			
3. Kadar alkohol (%)			
dst			

dst			
-----	--	--	--

## **Modul 4: PRODUKSI ENZIM AMYLASE, PROTEASE DAN LIPASE**

### **1. Pendahuluan**

Kapang dapat menghasilkan bermacam-macam enzim ekstraselular yang berguna untuk berbagai tujuan dalam industri, baik industri pangan, tekstil, kulit dan sebagainya. Enzim dapat diproduksi dengan menumbuhkan mikroorganisme pada media padat atau media cair. Substrat untuk fermentasi media padat berupa bekatul dari beras ataupun gandum. Substrat untuk media cair digunakan ekstrak kentang. Galur galur dari species *Rhizopus* dan *Aspergillus* dapat digunakan dalam skala industri untuk menghasilkan enzim, dan diantaranya galur *Aspergillus* jauh lebih penting *Aspergillus oryzae* telah lazim digunakan untuk menghasilkan amylase dan protease dalam jumlah besar.

Dalam percobaan ini kemampuan *Aspergillus oryzae* untuk menghasilkan amylase dan protease akan diuji. Untuk maksud ini kapang ditumbuhkan pada media padat bekatul gandum dan media cair ekstrak kentang. Penentuan Uji aktifitas enzim yang dihasilkan dengan cara titrasi maupun menggunakan spektrofotometer.

### **Enzim lipase**

Enzim lipase di alam tersebar secara merata di berbagai sumber. Enzim ini berada di organ hewan, tumbuhan misalnya biji jarak, bakteri, khamir, dan kapang. Lipase hewani berbeda dengan lipase mikrobial. Untuk skala industri yang bersumber pada lipase hewani berasal dari kelenjar pankreas binatang umumnya babi dan sapi, lipase mikrobial misalnya dari *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor* dan juga berasal dari *Pseudomonas* berupa lipase lipoprotein. Enzim lipase dapat dimanfaatkan diberbagai bidang misalnya di bidang farmasi, industri pangan, maupun industri pakan ternak. Enzim lipase ini menghidrolisis senyawa trigliserida menjadi digliserida dan asam lemak bebas. Enzim lipase ini mudah beraksi pada senyawa lemak yang teremulsi dan sukar bereaksi dengan senyawa lemak dalam bentuk esternya, tetapi senyawa ester murni yang larut dalam air merupakan substrat yang baik untuk enzim lipase ini

### **Pengaruh faktor luar.**

Keadaan optimum untuk kelangsungan proses hidrolisis lipase ini dipengaruhi oleh asal usul enzim tersebut. Misalnya lipase mikrobial mempunyai pengaruh pH optimum untuk aktivitasnya adalah pH 7 dan suhu 37°C, sedangkan lipase hewani pada pH 9.0 dan suhu 37°C. Demikian juga senyawa-senyawa inhibitor dan aktivatornya pun berbeda. Senyawa seperti Kalsium oleat, albumin, dan garam empedu, keduanya sebagai aktivator enzim lipase hewani. Senyawa ion Kalsium mengaktifkan lipase mikrobial tetapi garam empedu hanya sedikit berfungsi sebagai aktivator. Untuk menunjukkan aktivitas lipase digunakan minyak zaitun yang diemulsikan secara

stabil dengan gum arab ataupun minyak kedelai, minyak jarak, minyak ikan, minyak wijen dan butter juga digunakan untuk percobaan.

Dibawah ini beberapa metode penentuan aktivitas enzim lipase

Metode	Asal enzim	pH optimum	Suhu	Substrat	pengukuran
n-FIP	Kapang	7.0	37°C	Minyak zaitun dan gum arab	Volumetri dengan NaOH
n-Worthington	<i>Geotrichum candidum</i>	8.2	25°C	Minyak zaitun dan gum arab	Volumetri dengan NaOH
n-Yamada dan Machida	<i>Aspergillus</i>	7.0	37°C	Minyak zaitun dan P v.alkohol	Volumetri dengan NaOH
n-Ekstrak Kim	Bakteri	7.0	37°C	Minyak wijen dan albumin	Volumetri dengan KOH

## 2. Bahan dan Alat

### 2.1 Bahan bahan

1. Untuk fermentasi media padat adalah bekatul gandum, tepung jagung, larutan HCl 0.2N mengandung mineral sebagai berikut: 1 gram ZnSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O. 1 gram FeSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O; 0.5 gram CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O dalam air suling dan tepatkan volumenya menjadi 500 ml (larutan A).
2. Encerkan 50 ml larutan A dengan air suling menjadi 1 liter dengan HCl 2N (Larutan B)
3. Encerkan larutan B sepuluh kali untuk mendapatkan larutan HCl 0.2N mengandung mineral tersebut diatas
4. Suspensi spora *Aspergillus oryzae*, Air steril yang mengandung tween 80

### 2.2 Alat Alat

Alat alat yang dimanfaatkan dalam percobaan ini adalah erlenmeyer 500 ml dan erlenmeyer 1000 ml; pipet pipet Steril 2 ml; gelas ukur, labu ukur yang diperlukan dan elenmeter lainnya serta gelas piala. Shaker

## 3. Cara kerja

### 3.1 Persiapan Media

#### 3.1.1 Fermentasi pada media padat

1. Campurkan 500 g bekatul gandum dan 50 g tepung jagung dan 385 ml HCl yang mengandung mineral yang telah disiapkan sebelumnya
2. Campurkan dengan tangan secara merata lalu bagilah ke dalam erlenmeyer 500 ml masing masing sebanyak 50-60 g lalu sumbat dengan kapas.

#### 3.1.2 Fermentasi pada media cair

1. Rebus 100 g kentang dalam 2 liter air. Ambil ekstraknya tambahkan ke dalam ekstrak 4 g CaCO<sub>3</sub> dan 2 g pepton

2. Campurkanlah dan tepatkan volumenya menjadi 2 liter lalu bagilah kedalam erlenmeyer 1000ml subat dengan kapas.

### **3.2 Penyiapan larutan tween**

Campurkan 1 tetes tween 80 ke dalam 00 ml air suling, bagilah ke dalam tabung reaksi masing masing sebanyak 5 ml tutup dengan kapas.

### **3.3 Sterilisasi**

Sterilisasi media cair dan padat dan juga tween yang anda buat serta beberapa pipet pipet yang akan digunakan harus disetrilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 45 menit dan tekanan 15 Psi. Dinginkan sehingga mencapai suhu ruangan 30°C

### **3.4 Inokulasi**

Tuangkan air steril yang mengandung tween 80 kedalam biakan *Aspergillus oryzae* secara aseptik, keriklah biakan yang mengandung spora dengan menggunakan jarum ose yang steril. Kemudian pindahkan sebanyak 2 ml ke dalam setiap erlenmeyer (media padat maupun cair) pada kondisi aseptis

### **3.5 Inkubasi**

Untuk fermentasi media padat, inkubasi dilakukan pada suhu ruang (25-30°C) pada meja laboratorium. Untuk fermentasi terendam tempatkanlah erlenmeyer yang berisi media dan sudah diinokulasi dengan spora kapang di dalam rotary shaker dengan lama inkubasi antara 96-120 jam

## **4. Pengamatan**

Lakukan pengujian aktivitas enzim amylase protease dan lipase yang dihasilkan.

## **5. Pengujian aktivitas amilase**

Aktivitas amylase ditentukan dengan mengukur kemampuan enzim ini untuk menghidrolisis laruta pati yang diketahui konsentrasinya pada kondisi suhu dan pH tertentu dan dalam waktu tertetu pula. Aktivitasnya dinyatakan dengan jumlah mg gula reduksi yang dapat dibebaskan oleh 1 ml atau 1 gram enzim. Jumlah pereduksi hasil hidrolisis diukur dengan metode Shaffer Houtmann.

### **Ekstraksi enzim dari media Fermentasi**

Untuk media padat: pindahkanlah 50 gram media yang telah ditumbuhi oleh kapang ke dalam erlenmeyer 500 ml yang berisi air suling dan kocok pada shaker selama 1 jam. Saring dengan kertas saring Whatmann ukuran 2 dan tampung filtratnya tepat sebanyak 100ml dalam labu ukur. Untuk media cair saring langsung media yang sudah ditumbuhi oleh kapang itu dengan kertas saring dan tampung filtratnya.

### **Penyiapan pereaksi**

Buffer sitrat-posfat siapkan larutan stock asam sitrat 19.21 g/l (larutan A) dan larutan di natrium hidrogen pospat.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ , 71.7 g/l (larutan B) Campurkan 25.2 ml Larutan A dengan 24.8 larutan B dan tepatan volumenya menjadi 100 ml pH larutan seharusnya menjadi 4.8

**Substrat:** Larutan kanji 2%. Campurkan 10 gram kanji dengan air suling, lalu tuangkan campuran ini kedalam air mendidih, lalu pindahkan kedalam labu ukur 500 ml dengan air suling tepatkan volumenya.

**Larutan NaOH 0.1 N** larutkan 4 gram NAOH dengan aquadest dan tepatkan volumenya menjadi 1000 ml

**Pereaksi Shaffer-Hartmann.**

Timbang 40 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidrat ; 7.5 asam tartrat; 18.4 g kalium oksalat; 0.7 g Kalium Yodat; 100 g Kalium Yodida dan 5 g  $\text{CuSO}_4$ ; Larutkan masing masing dengan air suling secara terpisah kemudian campurkanlah menurut urutannya tepatkan volumenya menjadi 1000ml

**Larutan Natrium tiosulfat standart:** larutkan 23 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dengan air suling, tambahkan kedalamnya 1g NAOH padat lalu tepatkan voluemenya menjadi 1 liter. Kekuatan larutan ini 0.1N

**Larutan Kalium dikromat 0.1N :** Timbang 4.9033 g  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  yang telah dikeringkan, larutkan dengan air suling dan tepatkan volumenya menjadi 1 liter gunakan larutan ini untuk standardisasi larutan tiosulfat 0.1 N (pipet 25 ml larutan  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  0.1 N ke dalam erlenmeyer, tambahkan 3 g KI dan 10 ml HCl pekat, lalu titrasi dengan larutan  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gunakan larutan kanji 1% sebagai indikator. Titik akhir adalah berubahnya warna biru kehijauan

**Larutan  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0.005 N:** encerkanlah 225 ml larutan  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0.1 N menjadi 500 ml dengan air suling gunakan labu ukur.

**Larutan kanji 1 % :** 1 gram kanji dicampurkan dengan 100 ml air suling dan panaskan sampai terjadi gelatinisasi dan tepatkanlah kembali dengan air suling supaya tepat menjadi 100 ml.

**Cara Kerja**

1. Pipet 5 ml larutan kanji 2% kedalam tabung reaksi masing masing tempatkan tabung tabung ini dalam penangas air dengan suhu  $40^\circ\text{C}$  lalu ke dalam tiap tiap tabung masukkan 1 ml enzim dari media padat (tabung1) dan 1 ml enzim media cair (tabung 2) dan 1 ml air suling (tabung 3) goyangkanlah tabung dan biarkanlah reaksi berjalan selama 30 menit
2. Setelah 30 menit stop reaksi dengan penambahan 1 ml NaOH 0.1N lalu tepatkan volume menjadi 10 ml dengan penambahan air suling, dan campurkanlah secara merata.
3. Pindahkanlah dengan pipet masing masing 1 ml larutan di atas ke dalam 3 tabung reaksi, diiikuti dengan 5 ml pereaksi Shaffer-Hartmann.
4. Campurkanlah dan tempatkan dalam penangas air mendidih selama 15 menit, lalu dinginkan
5. Setelah dingin pindahkan isi setiap tabung secara kualitatif ke dalam erlenmeyer terpisah tambahkan 5 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N ke dalam masing masing erlenmeyer
6. Titrasi dengan larutan  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0.005N
7. Campuran tanpa enzim berlaku sebagai blanko (tabung 3) Selisih antara nilai titrasi blanko dan nilai titrasi contoh memberikan nilai sesungguhnya dari tembaga y ang

tereduksi, dari jumlah glukosa yang setara dengan nilai titrasi (ml Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0.005 N dapat diperoleh) Aktivitas amylase = mg glukosa/ml ekstrak enzim.

8. Cocokkan dengan Tabel 1: Glukosa (mg) yang setara dengan nilai titrasi sesungguhnya (ml Tiosulfat 0.005N)

## Pengujian aktivitas Protease

Aktivitas protease ditentukan dengan mengukur kemampuan enzim ini untuk meghidrolisis protein seperti kasein dan menyebabkan tirosin, tirosin yang dibebaskan diukur secara kolorimetri.

## Persiapan Reagen

*Buffer sitrat pospat:* campurkan 6.4 ml larutan stock A dan 43.6ml laruta stock B, lalu tepatkan volume menjadi 100 ml dengan air suling. pH larutan ini seharusnya 7.0 jika tidak harus diatur supaya pH menjadi 7.0 menggunakan NaOH 0.01 N atau HCl 0.01 N.

*Substrat berupa larutan kasein 1%:* timbang 1 g kasein tambahkan sejumlah buffer sitrat pospat. Lalu panaskan sambil diaduk dalam penangas air mendidih selama 10 m enit, dinginkan lalu tepatkan volumenya menjadi 100 ml dengan larutan buffer yang sama.

*Larutan Asam tri kloro asetat 5%*

*Larutan NaOH 0.05 N*

*Pereaksi folin :* Larutkan 100 g Natrium salisilat dengan sejumlah air suling, lalu tambahkan kedalamnya larutan 25 g Na-Molibdat, juga dalam air suling. Tambahkan air suling sehingga volume menjadi 700 ml, lalu aduk asam 85% sebanyak 50 ml dan 100 ml asam klorida pekat aduk lalu tambahkan 100 g Litiumsulfat dan beberapa tetes air Brom. Didihkan campuran selama 15 menit untuk menghilangkan kelebihan Brom.

*Larutan stock tirosin 100µg/ml*

## Cara kerja

1. Siapkan 4 buah tabung masing masing berisi 1 ml larutan kasein 1%, letakkan tabung tabung tersebut dalam penangas air dengan suhu 40°C ke dalam dua dari 4 tabung ini masukkan 0.5ml larutan enzim dari setiap biakan kedalam dua tabung lainnya, tambahkan 3 ml asam triklor asetat. Biarkan reaksi berlangsung selama 20 menit.
2. Lalu ke dalam dua tabung terdahulu (berisi enzim) tambahkan 3ml asam triklorasetat 5% untuk menghentikan reaksi enzimatik dan memperoleh protein yang tidak bereaksi.
3. Kedalam dua tabung lainnya (blanko tanpa enzim), tambahkan 0.5 ml larutan enzim dari setiap biakan secara terpisah. Campurkan dan biarkan pada suhu ruang selama 30 menit, lalu saring isi masing masing tabung. Filtratnya digunakan untuk mengembangkan warna.
4. Tambahkan 2 ml larutan NaOH 0.5 N kedalam setiap 1 ml filtrat, diikuti dengan 0,6 ml pereaksi folin yang telah diencerkan (1:2) ukur intensitas warna yang terbentuk setelah 5-20 menit dengan spektrofotometer padapanjang gelombang 660 nm
5. Siapkan kurva standard tirosin dengan menggunakan larutan standart tyrosin 100µg/ml, NaOH 0.5 N dan pereaksi folin seperti cara tersebut diatas mulai langkah di nomer 4.

Sebagai ganti filtrat, gunakan larutan standard tirosin yang diencerkan dengan air suling sehingga volumenya 1 ml

6. Bandingkan nilai absorbansi (OD) contoh dengan standard untuk memperoleh konsentrasi tirosin.
7. Aktivitas protease =  $\mu\text{g}$  tirosin/ml ekstrak enzim.  
 $\mu\text{g}$  tirosin dari kurva x faktor pengenceran.

### **Penentuan Aktivitas Enzim Lipase dengan metode Yamada dan Machida yang dimodifikasi**

**Prinsip:** Enzim lipase memutus ikatan asam lemak pada minyak zaitun, kemudian asam lemaknya dinetralisir dengan senyawa NaOH, kelebihan NaOH dititrasi dengan asam klorida sehingga jumlah asam lemak yang dihidrolis dapat ditentukan dengan pasti.

Definisi : 10 unit lipase sebanding dengan jumlah enzim yang membebaskan 1 $\mu\text{mol}$  asam lemak per menit dibawah kondisi tertentu.

#### **Pereaksi :**

*Larutan polivinylalkohol* yang apat dibuat dengan cara 18.5 g. Moviol 30/98 dan 1.5 Moviol 4/88 (Hoechst) disuspensikan di dalam air dengan pengadukan secara kostant pada suhu 75-80°C. Kemudian hasil suspensi didinginkan, jika sudah bening di saring dengan aquadest dan ditepatkan volumenya menjadi 1 liter.

*Larutan substrat:* 225 ml polivinylalkohol dan 75 ml minyak zaitun (kualitas DAB) didinginkan di water bath dan 10 menit dihomogenisasi didalam mixer. Larutan substrat disimpan pada suhu 5-10°C dapat digunakan selama 48 jam. Setelah 48 jam tidak stabil kembali

*Senyawa buffer phosphat* dengan pH 6.0 : kedalam 61 ml 0.1 M larutan (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) dinatrium hidrogen pospat ditambahkan  $\pm$  40 ml larutan 0.1 Kalium dihidrogenpospat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) tetes demi tetes sampai pH 6.0 dapat dicapai.

*Campuran etanol dan Aceton* (CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> Merck art 14) dan 100 ml etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH Merck art. 971) dicampu secara merata.

*Larutan indikator PP* (C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>) merck art. 7233. 0.5 g PP dilarutkan di dalam etanol sampai volume tercapai tepat 50 ml.

*Larutan standard NaOH* 0.05 N dan larutan Standar HCl 0.05N

Larutan enzim yang diperoleh dari fitrasi pada percobaan, larutan enzim yang diperoleh seharusnya mengandung 10-15 unit per ml

#### **Cara kerja**

1. 5 ml larutan substrat dan 4 ml larutan buffer pospat dimasukkan dengan cara di pipet ke dalam erlenmeyer 100 ml di dalam water bath pada suhu 37°C ditambah dengan 1 ml

larutan enzim (Nyalakan stop watch pada saat ini) dan kocok secara merata setiap 10 menit.

2. Setelah 30 menit hentikan aktivitas lipase dengan menambahkan 10.0 ml larutan aceton-ethanol. Kemudian tambahkan juga 10 ml NaOH 0.05 N dan sekali lagi 10 ml larutan aceton-ethanol dan 2 tetes indikator PP.
3. Kemudian titrasi dengan HCL 0.05 N sampai larutan menjadi tidak berwarna
4. Untuk larutan blanko lakukan hal yang sam tetapi sesudah ditambah enzim 1.0 ml tanpa ditunggu 30 menit pada suhu 37°C tambahkan 10 ml larutan aceton-ethanol dan 10 ml larutan NaOH 0.05 N dan sekali lagi 10 ml larutan Aceton-ethanol dan jangan lupa 2 tetes Indikator PP
5. Kemudian titrasi dengan HCl 0.05 N seperti pada contoh

	Larutan contoh	Larutan blanko
Larutan substrat	5.0 ml	5.0 ml
Larutan buffer –pospat e Semuanya dikocok dan letakkan pada suhu 37°C	4.0 ml	4.0 ml
Larutan enzim	1.0 ml	1.0 ml
Tepat 30 menit pada suhu 37°C, tiap 10 menit dikocok		Langsung dengan
Aceton ethanol	10.0 ml	10.0 ml
Larutan NaOH 0.05N	10.0 ml	10.0 ml
Aceton-ethanol	10.0 ml	10.0 ml
Indikator PP	2 tetes	2 tetes
Dikocok dan kemudian dititrasi dengan larutan HCL 0.05 N sampai warna hilang		

### Perhitungan

Aktivitas lipase dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\frac{(H-B) \cdot 10}{m \cdot 0.6} = \text{unit/g (untuk praktikum ini dipakai unit /ml)}$$

H = ml HCl yang dibutuhkan untuk contoh

B = ml HCl yang dibutuhkan untuk blanko

m = berat enzim per ml (dalam praktikum ini belum diketahui maka dipakai satuan unit/ml)

10 = 10 unit 1  $\mu\text{mol}$  asam lemak yang bebas

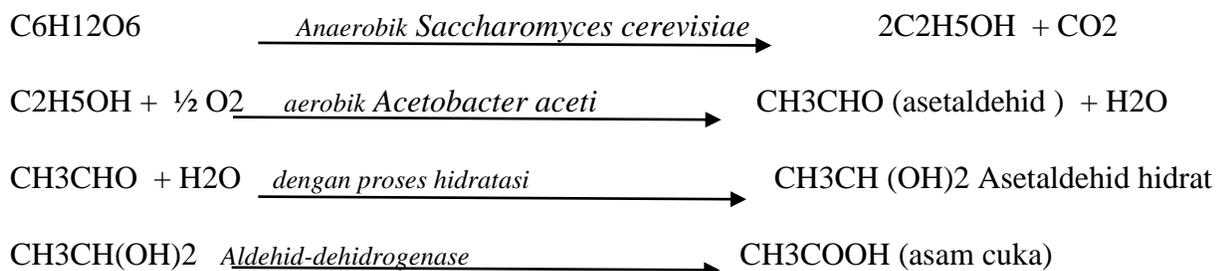
0.6 = 0.6ml 0.05N NaOH sebanding dengan 1  $\mu\text{mol}$  asam lemak

## Modul 5: FERMENTASI ASAM CUKA SEBAGAI CONTOH PROSES DEHIDROGENASI DALAM INDUSTRI PERTANIAN

Asam cuka adalah produk fermentasi yang berasal dari hasil bahan baku buah buahan yang mengandung gula misalnya buah apel buah mangga buah nanas ataupun air kelapa. Dalam buah apel banyak dijumpai asam asam organik dan juga gula buah yang disebut fruktosa. Fruktosa memiliki tingkat kemanisan yang paling tinggi (114 kali) dibandingkan sukrosa (100 kali) apa lagi dengan glukosa yang rasanya kurang manis hanya (69 kali). Turunan dari senyawa karbohidrat contohnya adalah manitol, sorbitol xylito. Khusus untuk Xylitol mempunyai *cooling effect* yang lebih baik dibandingkan dengan gula sukrosa *Cooling effect* maksudnya adalah sensai rasa dingin ketika gula itu melarut dalam rongga mulut kita. Semakin kecil ukuran partikel gula gula tersebut semakin mudah melarut dalam rongga mulut maka sensasi dingin semakin terasa. Turunan gula gula alokohol ini banyak jenisnya dan sering digunakan dalam berbagai industri pangan.

Buah buahan yang sering dimanfaatkan oleh industri rumah tangga sebagai bahan baku cuka apel adalah buah apel (*Malus sylvestris*). Buah ini banyak mengandung asam asam organik khususnya yang dominan adalah asam malat. Aroma khas dari buah apel menjadi kontributor dalam pembentukan aroma cuka apel yang spesifik. Disamping itu kandungan asam asam lain misalnya asam askorbat juga lumayan dalam buah apel walaupun tidak sebanyak asam askorbat pada jambu biji. (*Psidium guayava*). Cairan buah apel dapat dimanfaatkan sebagai bahan pembuatan cuka apel karena kandungan gula yang dimilikinya. Dengan proses sederhana dan alamiah buah gula yang terdapat dalam buah apel dihidrolisi oleh mikroorganisme alam yang terdapat dalam buah menjadi alkohol. Biasanya hal ini dilakukan oleh *Saccharomyces cerevisiae* Jika kandungan alkohol dalam cairan itu cukup maka proses selanjutnya adalah oksidasi oleh bakteri asam cuka misalnya *Acetobacter aceti* yang secara alamiah juga ada di buah apel menjadi asam cuka.

Reaksi kimia yang terjadi adalah sebagai berikut:



Cuka apel adalah produk alami yang dikenal mempunyai banyak manfaat kesehatan seperti meningkatkan stamina dan memperkuat sistem imun. Meskipun membutuhkan waktu 2-3 bulan, resep cuka apel ini adalah cara yang murah untuk membuatnya di rumah.

### Tujuan Praktikum

- 1) Mempelajari proses pembuatan cuka apel dengan cara fermentasi spontan
- 2) Mengamati mikroorganisme yang ada dalam proses pembuatan cuka apel (dimungkinkan dua jenis yaitu *Saccharomyces cerevisiae* dan *Acetobacter aceti*)
- 3) Mengukur total asam cuka yang diperoleh.

### Bahan, Alat dan cara Kerja

#### Bahan baku

Sepuluh buah apel organik jika memungkinkan untuk memperoleh hasil yang baik yang masih segar, larutan gula pasir (Gula pasir 100 gram dilarutkan dalam air masak sebanyak 300 ml), Cuka apel organik volume 100 ml sebagai bahan starter.

NaOH 0.1 N

Indikator PP

Aquadest

#### Alat

Toples kaca atau dari gelas yang besar ukuran 3 liter sebanyak 4 buah

4 buah Kain katun putih bersih sebagai penutup toples gelas

Pengaduk dari kayu

Pisau dapur, Telenan, Saringan halus yang dilapisi kain katun. Karet gelang.

Ikubator yang gelas temperatur yang bisa diatur pada suhu 30-32°C

Erlenmeyer 250 ml steril sebanyak 4 buah

Biuret

Pipet tetes

Pipet steril 10 ml

Mikroskop dan perangkatnya gelas objektif dan gelas penutup, senyawa methylene biru

Senyawa Gram A, B, C dan D

### Cara Kerja

1. Langkah pertama Cucilah 10 buah apel organik dengan air sehingga bersih
2. Potonglah satu buah apel menjadi potongan kecil kecil sebesar dadu ukuran 1 inchi masukkan potongan apel tersebut kedalam toples kaca yang bersih yang bermulut lebar.
3. Biarkanlah diudara terbuka walaupun sampai coklat di suhu ruang selama 4 jam
4. Tambahkan lah larutan gula pasir (100 gram gula pasir dilarutkan dalam 300ml air matang) kedalam toples

5. Sekarang tuangkanlah air matang bersih ke dalam toples sehingga apelnya terendam semua oleh air yang diberikan, jika perlu tambahkan 100ml cuka apel organik yang sudah jadi sebagai starter untuk mempercepat proses fermentasinya
6. Tutuplah toples dengan kain katun tipis, biarkanlah kain menutup botol kaca dibagian atas toples tetapi tidak tertutup rapat cukup menggunakan karet gelang sebagai pengikat agar oksigen masih memungkinkan masuk kedalam campuran tersebut.
7. Letakkan toples pada ruangan yang hangat temperatur 30-32°C dan terhindar dari sinar matahari selama 4 minggu-5minggu aduk setiap minggu sekali secara hati hati.
8. Tuangkanlah air yang ada dalam stoples pindahkanlah pada toples kaca lain yang bersih, biasanya cairannya berbusa itu adalah aktivitas mikroba alam yang semula mengkonversi gula dari apel menjadi alkohol, kemudian alkohol dioksidasi lebih lanjut menjadi asam cuka.
9. Simpan toples gelas yang baru ini pada suhu yang sama dengan ditutup secara hati hati selama 4 minggu
10. Pada hari ke 14, tahap kedua diharapkan sudah menjadi cuka apel setelah itu simpan dalam kulkas.

### **Pengamatan dan analisis**

1. Selama proses pembuatan lakukan pengamatan mulai minggu pertama sampai terbentuk cuka apel
2. Pada minggu pertama ambil sampel satu ml secara aseptis masukkan dalam tabung reaksi yang steril untuk pengamatan sel khamir.
3. Ambil satu tetes larutan tersebut letakkan dalam gelas benda, tetesi dengan senyawa *methyline blue*, dan amati dibawah mikroskop dengan perbesaran awal 10 x 10 kemudian pindahkan ke pengamatan ukuran sedang yaitu dengan menukar lensa objektif perbesaran 45 kali.
4. Kemudian amati terus setiap minggu, kondisi proses dengan mengukur nilai pH dan total asam cuka yang diperoleh mulai minggu ke 4 , 5, 6 dan ke 7.
5. Pengukuran pH dengan menggunakan pH meter.
6. Total asam cuka yang diperoleh diukur dengan cara titrasi menggunakan NaOH 0.01 N yang sebelumnya larutannya ditetesi dengan indikator PP.
7. Pada minggu ke 6 atau ke7 lakukan pengamatan morfologi bakteri asam cuka, lakukan dengan pengecatan gram, normalnya bakteri *Acetobacter aceti* bersifat gram negatif dengan bentuk batang, umumnya bersifat motil dan tahan asam.

### **Cara Pengukuran total asam**

1. Ambil 10 ml tepat larutan hasil fermentasi pada toples 1 (untuk pengukuran minggu ke 4), masukkan ke dalam erlenmeyer 250ml
2. Tambahkan 10 ml aquadest lalu tambahkan 2 tetes indikator PP
3. Totrasi dengan NaOH 0.1 N sampai titik akhir merah jambu
4. Catat volume NaOH yang dibutuhkan sebagai V1.
5. Pipet aquadest steril yang sama yang digunakan digunakan untuk pembuatan asam cuka sebanyak 10 ml tambahkan aquadest lalu tambahkan 2 tetes indikator PP dan titrasi dengan NaOH 0.1 N catat volumenya sebagai V0

Perhitungan

$$\text{Asam cuka (\%)} = \frac{(V1-V0) \times N \text{ NaOH} \times \text{BM asam cuka} \times 100}{\text{MI Contoh} \times 1000}$$

Berat Molekul asam cuka adalah  $\text{CH}_3\text{COOH} = 60$

## MODUL TAMBAHAN

### Pembuatan Keju Lunak

Keju merupakan produk fermentasi berbentuk padat atau cream yang berbasis susu sapi, yang dalam prosesnya memanfaatkan bakteri asam laktat antara lain *Lactococcus lactis* ssp *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* dan *Lactococcus cremoris*, bahkan kadang kadang ditambah dengan bakteri *Leuconostoc mesenteroides* sebagai bakteri yang bersifat heterofermentatif. Klasifikasi keju berdasarkan cara pembuatannya ada 3 macam yaitu *fresh cheese*, *ripening cheese*, dan *cooking cheese*. **Fresh cheese** adalah proses pembuatan keju yang menggunakan enzim renin baik alami dari cairan lambung anak sapi maupun renin mikrobial tanpa pemeraman keju lebih lanjut contohnya adalah Quark, Mozzarella, (dapat dimasukkan dalam fresh cheese walaupun sebagian mengatakan kurang tepat. **Ripening cheese** adalah proses pembuatan keju seperti fresh cheese namun dilanjutkan dengan proses penggaraman dan pemeraman bahkan kadang kadang diinokulasi dengan bakteri yang membentuk permukaan keju menjadi kuning dan aromatis misalnya bakteri *Brevibacterium linens* contoh Gouda, Edamer dan Emmentaler menggunakan bakteri *Propionibacterium shermanii*. **Cooking cheese** adalah proses pembuatan keju yang berbahan baku keju dari *ripening cheese* yang hampir habis masa kadaluarsanya diblending lagi dengan susu skim dan air serta emulsifier dan setelah homogen karena pemanasan, itu dicetak berbentuk lembaran lembaran atau sesuai dengan selera.

Ada juga klasifikasi berdasarkan kandungan berat keringnya misalnya keju keras, keju semi lunak, dan keju lunak. **Keju keras** jika berat keringnya paling tidak 60-62%, contoh Emmentaler, Cheddar, **Keju semi lunak atau keju iris** kandungan berat keringnya 40-59% contoh gouda, edamer, tilsister. **Keju lunak** kandungan kadar berat keringnya 38-40% contoh cammebert, limburg, Brie, Romadur dan Muenster cheese. Klasifikasi keju berdasarkan asal bahan baku misalnya keju berbasis susu sapi, keju berbasis susu kambing, keju berbasis susu kerbau dan keju berbasis susu unta. Disamping itu masih banyak pembagain keju yang berbasis bentuk misalnya keju yang banyak lubang lubangnya karena gas yang dikeluarkan saat pemeraman sehingga membentuk lubang yang bebsar besar pada keju saat diperam contohnya emmental.

Dalam proese pembuatannya disiapkan starter keju lebih dulu. Biasanya bakteri starter keju dibiakkan dalam larutan susu yang sudah dipasteurisasi selama 24 jam sehingga pH susu sangat rendah sekali yang dapat disebut sebagai biang keju. Selanjutnya setelah starter keju disiapkan susu yang sudah dipasteurisasi sebelumnya diinokulasi dengan starter keju dan ditambahkan enzim rennin berasal dari cairan lambung anak sapi atau dapat juga renin mikrobial. Proses ini ditunggu lebih kurang 1 jam maka akan terbentuk dadih yang jika dicek dengan jari tangan maka akan terbentuk padatan. Hal ini menunjukkn bahwa proses enzimatis pemotongan casein susu oleh enzim renin sudah selesai. Dilanjutkan dengan proses pemotongan dengan cara diaduk biasanya whey dan curdnya akan memisah dengan sendirinya. Proses berikutnya adalah penyaringan. Penyaringan dilakukan dengan menggunakan kain belacu yang sudah bersih.

Keju lunak yang sudah disaring kemudian di beri garam sebanyak 1 sampai dengan 2%. Akhirnya produk dikemas pada wadah yang sudah disiapkan misalnya botol yang terbuat dari gelas.. Produk ini kemudian disimpan dalam lemari es pada suhu 4-5°C. Produk ini siap untuk dilakukan uji organoleptik dan uji kimiawi. Dalam proses pembuatan keju lunak ini tidak perlu ditambahkan dengan

senyawa  $\text{CaCl}_2$  saat pengolahannya yaitu saat pembentukan Curd. Hal ini diberikan jika kita ingin membuat keju dengan curd yang kuat dan stabil, Pemberian  $\text{CaCl}_2$  menjadi keharusan kalau kita ingin membentuk produk *semi soft* atau *hard cheese*

### **Bahan Baku**

Susu sapi pasteurisasi (5 liter) untuk kelompok 1 dan 4 liter untuk kelompok kedua yang sudah disiapkan, sebaiknya untuk bahan keju susu tidak perlu dihomogenisasi agar pembentukan curdnya mudah. Hal ini dapat dijelaskan karena globula lemak susu yang sudah dihomogenisasi mengakibatkan ukuran globula lemaknya seragam dan kecil. Ini akan menyulitkan dalam pembentukan curd karena waktu proses menjadi lebih lama. Proses penyatuan senyawa senyawa hidrofob untuk pembentukan curd menjadi lebih lama. Susu kedelai untuk kelompok kedua sebanyak 1 liter

### **Bahan tambahan**

**Enzim renin** mikrobial yang berasal dari Chrystian Hansen Laboratory yang berasal dari Denmark

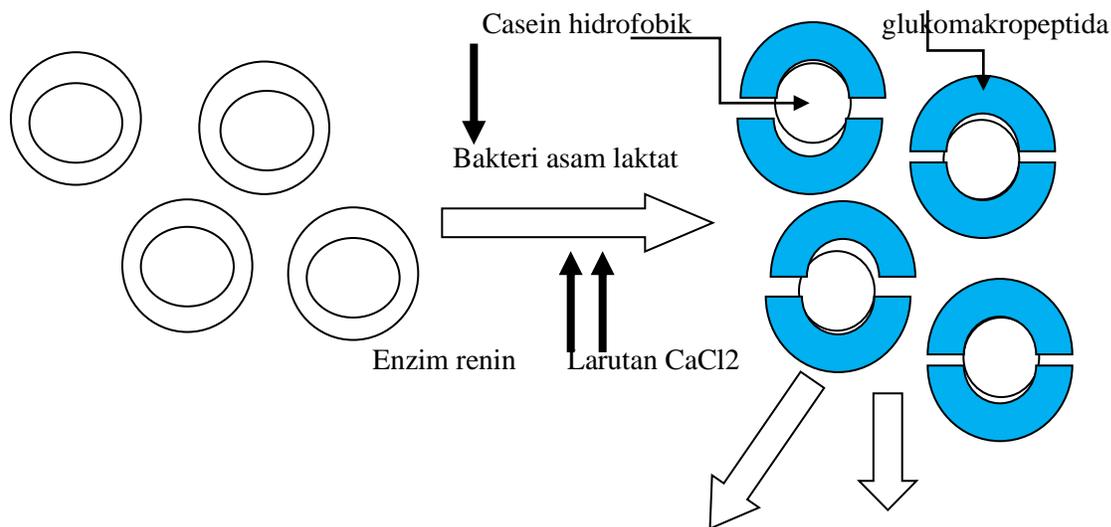
**Kultur keju:** Terdiri atas *Lactococcus lactis ssp.lactis*, *Lactococcus cremorius*, dan *Lactococcus lactis ssp diacetylactis* serta kadang-kadang dilengkapi engan *Leuconostoc mesenteroides* Sebagai bakteri yang bersifat heterofermentatif.

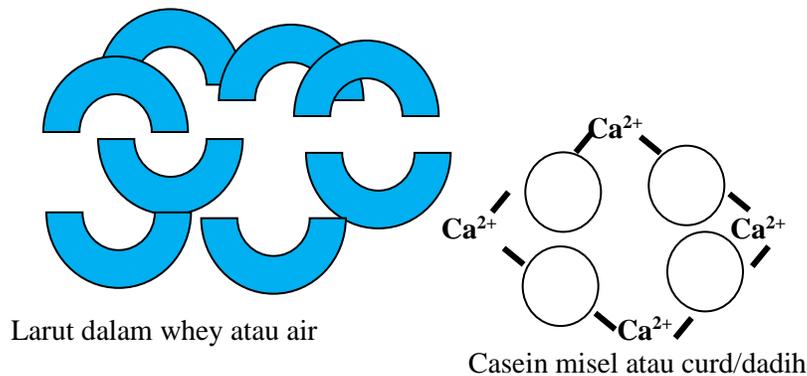
**Garam meja** biasa digunakan untuk memberikan cita rasa keju yang diinginkan.

**Garam  $\text{CaCl}_2$**  diperlukan jika akan memproduksi keju semi soft cheese ataupun Hard cheese. Namun jika keju lunak tidak diharuskan memberikan  $\text{CaCl}_2$  karena Fungsi  $\text{CaCl}_2$  khususnya ion  $\text{Ca}^{2+}$  adalah menyatukan senyawa hidrofobic casein susu yang bermuatan negatif dibagian permukaannya, dan sudah kehilangan glukomakropeptidanya karena telah dihidrolisis oleh enzim renin mikrobial.

### **Proses pembentukan Curd atau dadih**

Secara skematis dapat digambarkan sebagai berikut: Protein Susu sapi yang namanya casein permukaannya bersifat hidrofilik yang disebut senyawa glukomakropeptida dibagian dalam adalah casein yang hidrofobik. Jika pH susu mencapai 6.1 karena ada aktivitas bakteri asam laktat dan masukkan enzim renin maka ikatan senyawa glukomakropeptida dengan casein bagian dalam lepas maka senyawa hidrofobik akan mengikat ion  $\text{Ca}^{2+}$  dan berikatan lagi dengan casein hidrofobik membentuk net atau gel itulah saatnya curd telah terbentuk.





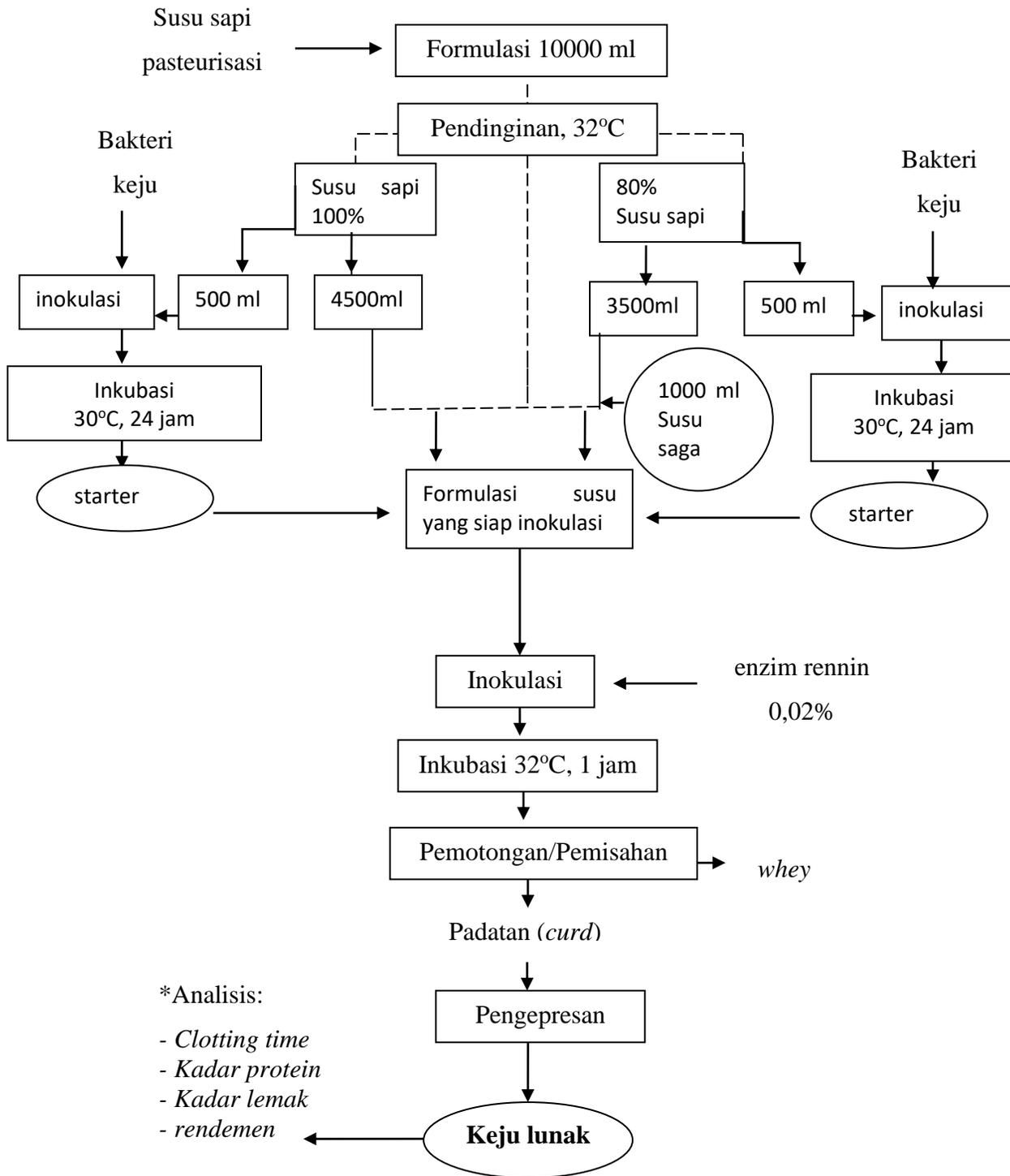
Dalam whey ada glukomakropeptide, asam laktat, air, sisa laktosa yang tidak terfermentasi, oleh karena itu dalam whey banyak dijumpai laktosa dan juga mineral yang terlarut dalam whey misalnya vitamin B 1 dan Bi2 atau B kompleks serta vitamin C atau semua vitamin yang larut dalam air. Sedangkan vitamin A dan D, E serta Vitamin K ada dalam curd. **Casein misel** yaitu curd atau protein susu (*casein hidrofobik*) yang telah kehilangan pelindungnya yaitu senyawa glukomakropeptid yang bersifat hidrofilik saat dipotong oleh enzim renin maka senyawa glukomakropeptide akan memisahkan diri larut dalam sistem hidrofilik, bercampur dengan whey. sedangkan casein hidrofobik akan menyatu dengan bantuan ion Kalsium dan membentuk gel atau netz dalam netz itu terjebak air lemak dan senyawa senyawa organik lainnya. Jika telah terjadi peristiwa pemotongan curd maka air yang terjebak dalam netz akan keluar dan curd menyatu lagi dengan curd lain membentuk curd yang kompak dan memadt terbentuklah massa keju yang disebut sebagai keju segar.

## TUJUAN PRAKTIKUM

- 1) Untuk mempelajari proses pembuatan keju dengan cara fermentasi dengan memvariasi bahan bakunya yaitu perbandingan susu sapi 100% : susu kedelai 0%, susu sapi (80%) : 20% susu saga
- 2) Mengukur clotting time dari kedua formula bahan baku pada pembuatan keju
- 3) Mengukur dan membandingkan rendemen yang dihasilkan

### ***Prosedur kerja***

- 1) Lima (5) liter susu pasteurisasi disiapkan, diambil 500 ml untuk pembuatan starter
- 2) 500 ml susu yang sudah dipisahkan diinokulasi dengan mix cheese culture diinkubasikan selama 24 jam
- 3) Susu pasteurisasi kemudian diinokulasi dengan starter dan ditambahkan dengan enzim renin sebanyak 0.02 %
- 4) Dididamkan selama 1 jam, jika sudah kental kemudian diaduk agar curd dan wheynya memisah dan dilanjutkan dengan proses penyaringan
- 5) Pemberian garam 1-2% sesuai dengan selera, dan akhirnya disimpan untuk uji organoleptik dan kimiawi



Gambar 4. Diagram alir proses pembuatan keju lunak

Jika jumlah volume susu terlalu besar dapat dikurangi sesuai dengan kebutuhan . Namun untuk kelengkapan lainnya misalnya starter dan juga bahan bahan lain secara proporsional disesuaikan. Analisis yang dilakukan adalah menghitung rendemen keju, menghitung kadar protein yang ada dan menghitung kadar lemak produk, kadar air dan kadar berat kering (untuk k kadar protein dan kadar lemak) sifatnya tidak wajib karena di praktikum ABHP sudah dilakukan.

## REFERENSI

1. Lee, B.J (1996) *Fundamentals of Food Biotechnology*. VCH Publishers
2. Prave, P., Faust, U., Sittig, W., Sukatsch, D.A (1987) *Fundamental of biotechnology* VCH Publishers
3. Spreer, E (1995) *Technologie der Milchverarbeitung* Behr's Verlag
4. Sellmach, B., Gooschick, W., Battermann, F., Zabel, K. (1988) *Bestimmungsmethoden Enzyme* Steinkopf Verlag Darmstadt