

**ISOLASI BAKTERI PENGHASIL ASAM SITRAT  
DARI BUAH ALPUKAT (*Persea americana mill.*) BUSUK**

**Erni Anggraini**

Pendidikan Biologi FKIP Universitas Muhammadiyah Palembang, Palembang

E-mail: erniangraini.81@gmail.com (*correspondence author*)

**ABSTRAK**

Asam sitrat merupakan senyawa antara siklus kreb yang banyak dimanfaatkan pada berbagai industri makanan, minuman, dan farmasi. Asam sitrat pada industri tersebut antara lain digunakan sebagai pengawet makanan, pemicu rasa, pencegah rusaknya rasa dan aroma, antioksidan. Asam sitrat biasanya terkandung pada buah-buahan. Alpukat salah satu buah yang digemari oleh masyarakat Indonesia, mudah didapatkan, dan memiliki berbagai macam manfaat sehingga tujuan penelitian ini adalah mengisolasi mikroba penghasil asam sitrat dari buah alpukat (*Persea americana Mill.*) busuk dan menyeleksi isolat-isolat potensial untuk digunakan sebagai isolat penghasil asam sitrat. Metode penelitian meliputi isolasi dan pemurnian mikroba penghasil asam sitrat dengan menggunakan media Prescott, seleksi isolat penghasil asam sitrat, dan deteksi asam sitrat. Hasil penelitian dari isolasi dan pemurnian mikroba penghasil asam sitrat didapatkan 2 isolat tunggal (isolat A dan E) masing-masing memiliki indeks asam sitrat sebesar 0,25 mm dan 0,65 mm. Isolat E dipilih sebagai isolat terbaik penghasil asam sitrat berdasarkan indeks asam sitratnya dan berdasarkan hasil perhitungan kadar asam sitrat diperoleh hasil sebesar 0,07%, sehingga disimpulkan isolat yang diperoleh dari sampel buah alpukat (*Persea americana Mill.*) busuk memiliki kemampuan untuk menghasilkan asam sitrat.

**Kata Kunci:** bakteri, asam sitrat, alpukat

**PENDAHULUAN**

Asam sitrat merupakan asam organik lemah yang terdapat pada daun dan buah tumbuhan tertentu (Surest, Ovelando, & Nabilla, 2013). Pemanfaatan asam sitrat saat ini sudah sangat beragam, terutama pada bidang industri. Pemanfaatan asam sitrat paling banyak digunakan pada industri makanan dan minuman yaitu sebanyak 60%, industri farmasi 30%, dan 10% untuk industri-industri yang lainnya. Pemanfaatan asam sitrat pada industri makanan dan minuman dikarenakan sifat-sifat asam sitrat yang menguntungkan seperti memiliki kelarutan relatif tinggi, tidak beracun, menghasilkan rasa asam yang disukai, sebagai pengawet, pencegah kerusakan warna dan aroma, menjaga turbiditas, pengatur pH, penghambat oksidasi, penginvert sukrosa, sebagai pemberi kesan rasa dingin.

Pemanfaatan asam sitrat tersebut mendorong berbagai macam penelitian yang memanfaatkan mikroorganisme baik bakteri maupun kapang yang menghasilkan asam sitrat diantaranya fermentasi asam sitrat dari *Aspergillus niger* (Currie, 1917). Metode fermentasi yang dikembangkan untuk

produksi asam sitrat dari kulit buah kiwi dengan *Aspergillus niger* NRRL 567 (Hang, Luh, & Woodams, 1987). Berbagai jenis kapang yang dapat menghasilkan asam sitrat, seperti *A. niger*, *A. awamori*, *A. fonsecaeus*, *A. luchuensis*, *A. wentii*, *A. saitoi*, *A. flavus*, *A. clavatus*, *A. fumaricus*, *A. phoenicus*, *Mucor viriformis*, *Ustilina vulgaris*. Selain kapang, beberapa bakteri dan khamir juga dapat memproduksi asam sitrat, diantaranya : *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, dan *Candida* (Anam, Albanna, Banoet, & Zuraidah, 2010).

Asam sitrat banyak dihasilkan oleh buah-buahan seperti jeruk, nanas, kiwi, pir, lemon. Alpukat (*Persea americana Mill.*) salah satu buah yang digemari oleh masyarakat, mudah didapatkan, dan memiliki berbagai macam manfaat. Manfaat buah alpukat diantaranya sebagai antioksidan (Febrianti & Zulfikar, 2016), sebagai bahan pangan yang diolah dalam berbagai masakan. Manfaat lain dari daging buah alpukat adalah untuk bahan dasar kosmetik (Menegristek, 2000). Jus alpukat

mempunyai efek protektif terhadap risiko aterosklerosis (Rahman, 2013).

Alpukat apabila sudah busuk maka akan menjadi sampah yang tidak bisa dikonsumsi dan terdapat mikroba dalam proses pembusukan buah sehingga tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengisolasi bakteri penghasil asam sitrat dari sumber buah alpukat (*Persea americana* Mill.) busuk dan menyeleksi isolat-isolat potensial untuk digunakan sebagai isolat penghasil asam sitrat.

#### METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Institut Pertanian Bogor. Bahan yang digunakan antara lain: buah alpukat yang telah membusuk, medium Prescott agar, NaOH.

Tahapan dalam penelitian ini adalah isolasi dan pemurnian isolat penghasil asam sitrat, seleksi isolat berdasarkan indeks asam sitrat, dan deteksi asam sitrat.

#### Isolasi dan pemurnian Bakteri Penghasil Asam Sitrat dari Buah Busuk

Isolasi bakteri penghasil asam sitrat dilakukan dengan dua cara yaitu dengan cara mengambil satu ose daging buah alpukat busuk dan digores kuadran pada medium Prescott. Metode isolasi lainnya yaitu dengan cara mengambil satu ose daging buah alpukat busuk dan ditotol atau ditempelkan pada medium Prescott. Diinkubasi selama 2 hari pada suhu 37 °C.

Diamati pertumbuhan mikrob yang membentuk zona bening disekitar koloni. Koloni yang membentuk zona bening dimurnikan dengan cara memindahkan pada

medium yang baru. Koloni yang telah dimurnikan dilakukan pengamatan berdasarkan ciri morfologi koloni, yaitu bentuk, warna, elevasi, dan tepian.

#### Seleksi Isolat berdasarkan Indeks Asam Sitrat

Isolat yang telah dimurnikan ditotol pada medium Prescott dan diinkubasi selama ± 48 jam pada suhu 37 °C, kemudian diamati dan dihitung zona asam yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang tumbuh dalam media dengan menghitung zona bening yang dihasilkan dan zona koloni. Lalu dihitung nilai indeks asam sitrat dengan rumus sebagai berikut:

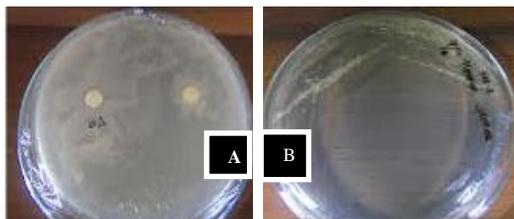
$$\text{Indeks Asam Sitrat} = \frac{\text{diameter zona asam} - \text{diameter koloni mikrob}}{\text{diameter koloni mikrob}}$$

#### Deteksi Asam Sitrat Menggunakan Metode Titrasi

Isolat yang memiliki kemampuan produksi asam sitrat tertinggi disubkulturkan pada 150 mL medium Prescott cair. Diinkubasi pada suhu 30 °C selama 5-7 hari. Setelah itu, dilakukan titrasi pada 100 mL larutan sampel menggunakan larutan NaOH 0,1 N. Reaksi positif adanya asam sitrat setelah inkubasi ditandai dengan perubahan warna dari biru menjadi kuning, kemudian di titrasi menggunakan NaOH terjadi perubahan warna dari kuning menjadi hijau. Kemudian dihitung kadar asam sitratnya. Perhitungan kadar asam sitrat :

$$\% \text{ asam sitrat} = \frac{\text{normalitas NaOH} \times \text{volume NaOH} \times \text{berat ekuivalen asam sitrat}}{\text{volume sampel} \times 10}$$

metode titik dan gores. Hasil isolasi bakteri penghasil asam sitrat pada media Prescott (Gambar 1).



Gambar 1. Pertumbuhan bakteri penghasil asam sitrat dari buah alpukat pada media Prescott yang diisolasi dengan (A) metode titik dan (B) metode gores.

Proses isolasi bakteri penghasil asam sitrat dilakukan dari buah busuk yaitu alpukat, yang proses isolasinya dengan menggunakan media Prescott agar. Media ini mengandung glukosa dan asam sitrat sebagai salah satu komponennya (Prescott, Harley, & Klein, 2002). Glukosa berfungsi sebagai sumber karbon bagi mikroba, sedangkan asam sitrat berfungsi untuk meningkatkan aktivitas enzim sitrat sintase.

Asam sitrat diproduksi dengan cara fermentasi glukosa dengan menggunakan *Aspergillus niger* (Maulana, 2011). Asam sitrat merupakan senyawa antara pada siklus kreb (siklus asam trikarboksilat) dan termasuk senyawa metabolik primer yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroba dalam fermentasi.

Tabel 1. Uji morfologi isolat terpilih

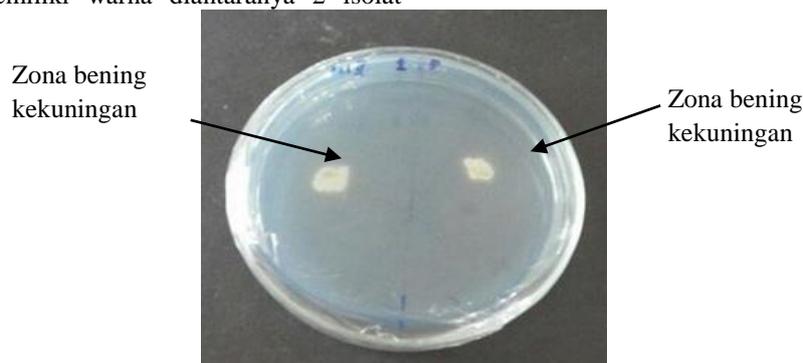
Isolat	Warna koloni	Karakterisasi Morfologi		
		Bentuk koloni	Tepian	Elevasi
A	Kuning keputihan	Tidak beraturan dan menyebar	licin	datar
E	Putih	Tidak beraturan dan menyebar	licin	datar

Hasil isolasi diperoleh 2 isolat tunggal (isolat A dan E) yang menunjukkan adanya zona berwarna kuning pada media Prescott. Pada uji morfologi kedua isolat tersebut mempunyai bentuk, tepian, dan elevasi yang sama tetapi memiliki warna yang berbeda isolat A berwarna kuning keputihan sedangkan isolat E berwarna putih. Hasil penelitian (Anam, Albanna, Banoet, & Zuraidah, 2010), mendapatkan 5 isolat kapang yang membentuk zona bening dari buah tomat busuk pada media Prescott dan memiliki warna diantaranya 2 isolat

berwarna putih, 1 isolat berwarna putih kecoklatan, 1 berwarna putih kekuningan dan 1 isolat berwarna merah kecoklatan.

#### Seleksi Isolat berdasarkan Indeks Asam Sitrat

Koloni tunggal bakteri hasil isolasi yang membentuk zona kuning di media Prescott dipindahkan ke media yang baru dengan metode titik. Hasil purifikasi diperoleh dua isolat yaitu isolat A dan E (Gambar 2).



Gambar 2. Pertumbuhan isolat A dan isolat E pada media Prescott

Perubahan warna media dari biru menjadi kuning mengindikasikan adanya senyawa yang dihasilkan oleh bakteri sehingga terjadi penurunan pH media menjadi asam. Dengan melihat adanya perubahan warna pada media, dapat ditentukan bahwa isolat yang diproduksi dari sampel buah busuk alpukat diindikasikan menghasilkan asam sitrat. Menurut (Surest,

Ovelando, & Nabilla, 2013), buah markisa mengandung asam sitrat dalam kandungan yang tinggi, yaitu 2,4-4,8%. Penelitian ini menggunakan metode fermentasi dengan menggunakan buah markisa kuning dan markisa manis. Pada markisa kuning dengan penambahan volum jamur 50 mL dan waktu fermentasi 5 hari didapat persen asam sitrat tertinggi yaitu 4,46 %.

Tabel 2. Hasil Pengukuran Indeks Asam Sitrat Isolat A dan E

Isolat	Diameter zona asam (mm)	Diameter koloni bakteri (mm)	Indeks Asam Sitrat
A	0,75	0,6	0,25
E	0,825	0,5	0,65

Hasil perhitungan nilai indeks asam sitrat menunjukkan bahwa isolat yang berasal dari sampel E mempunyai nilai indeks asam sitrat yang lebih tinggi sebesar 0,65 sedangkan sampel A yang hanya memiliki indeks asam sitrat sebesar 0,25. Hal tersebut mengindikasikan bahwa isolat E yang berasal dari alpukat mempunyai kemampuan produksi asam sitrat yang lebih baik dibandingkan dengan isolat A, meskipun kedua isolat mampu menghasilkan asam sitrat. Metode fermentasi *solid-state* dikembangkan untuk produksi asam sitrat dari kulit buah kiwi dengan *Aspergillus niger* NRRL 567 yang menghasilkan sekitar 100 g asam sitrat per kg kulit buah kiwi yang difermentasi dengan adanya metanol 2% pada suhu 30 °C dalam 4 hari (Hang,

Luh, & Woodams, 1987). Asam sitrat yang didapat dari proses fermentasi buah markisa adalah 4,46 % yaitu pada penambahan volum jamur 50 mL dan lama waktu fermentasi 5 hari pada markisa kuning (Surest, Ovelando, & Nabilla, 2013).

#### Deteksi Asam Sitrat Menggunakan Metode Titrasi

Isolat dengan kode E dipilih sebagai isolat terbaik sebagai penghasil asam sitrat berdasarkan indeks asam sitratnya. Isolat E kemudian ditumbuhkan di media Prescott cair (Gambar 3), dan setelah inkubasi selama 7 hari dilakukan proses titrasi dengan NaOH 0,1 N. Hasil titrasi dengan NaOH (Gambar 3).



Gambar 3. Pertumbuhan isolat E pada media Prescott cair (A) sebelum titrasi dan (B) setelah titrasi dengan NaOH 0,1 N.

Hasil dari fermentasi menunjukkan perubahan warna pada media cair *Prescott* dari biru menjadi kuning. Selanjutnya hasil fermentasi dilanjutkan dengan proses titrasi yang menggunakan NaOH 0,1 N yaitu larutan basa sebagai titran. Pada proses titrasi zat yang akan di tentukan kadarnya

pada sampel. Dari hasil pengukuran diperoleh volume NaOH yang digunakan sebanyak 11,5 mL dan berdasarkan hasil perhitungan kadar asam sitrat diperoleh hasil sebesar 0,07% yang artinya, dalam 100 mL substrat terdapat 0.07 mL asam sitrat (Tabel 2).

Tabel 2. Kadar asam sitrat dari 100 mL kultur isolat bakteri E

Isolat	Volume NaOH 0,1 N (mL)	Volume (mL)	Kadar asam sitrat (%)
E	11.5	100	0,07

Produksi asam sitrat pada proses fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah jenis media, pH media, waktu fermentasi, suhu, aerasi, dan mikroorganisme yang digunakan (Friedrich, Cimerman, & Steiner, 1994). Pembentukan asam sitrat di dalam fermentasi larutan gula didasarkan pada teori bahwa asam piruvat yang terbentuk dari glukosa dapat dihasilkan asetil-coA yang di dalam kondensasi dengan asam oksaloasetat menghasilkan asam sitrat (siklus krebs) (Maulana, 2011)

#### KESIMPULAN

Isolat yang diperoleh dari sampel buah alpukat (*Persea americana* Mill.) busuk memiliki kemampuan untuk menghasilkan asam sitrat. Hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya zona berwarna kuning disekitar koloni, dan berdasarkan hasil perhitungan kadar asam sitrat diperoleh hasil sebesar 0,07%.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Anam, K., Albanna, M. Z., Banoet, Y., & Zuraidah. (2010). *Isolasi dan seleksi kapang penghasil asam sitrat*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Currie, J. N. (1917). The Citric Acid Fermentation of *Aspergillus niger*. *The Journal of Biological Chemistry*, 31(1), 15-37.
- Febrianti, N., & Zulfikar, M. (2016). Aktivitas antioksidan buah alpukat (*Persea americana* Mill.) dan buah stroberi (*Fragaria vesca* L.). (Prosiding) *Symbion Symposium on Biology Education*, 613-620.
- Friedrich, J., Cimerman, A., & Steiner, W. (1994). Concomitant biosynthesis of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes and citric acid on sucrosa. *J Enzym and Microbial Technology*, 16, 703-710.
- Hang, Y. D., Luh, B. S., & Woodams, E. E. (1987). Microbial Production of Citric Acid by Solid State Fermentation of Kiwifruit Peel. *Journal of Food Science*, 52(1), 226-227.
- Maulana, N. A. (2011). *Pabrik asam sitrat dari tepung tapioka dengan proses fermentasi*. Jawa Tmur: Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknologi Industri Universitas Pembangunan Nasional Veteran.
- Menegristek. (2000). *Alpukat/Avokad(Persea americana Mill./Persea gratissima Gaerth.)*. Jakarta: Sistim Informasi Manajemen Pembangunan di Perdesaan, BAPPENAS.
- Prescott, L. M., Harley, & Klein. (2002). *Microbiology 5th Edition*. USA: The McGrawth-Hill Companies.
- Rahman, S. (2013). *Studi pendahuluan pengaruh alpukat terhadap profil lemak di poli penyakit dalam kllinik Iman*. Medan: Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.
- Surest, A. H., Ovelando, R., & Nabilla, M. A. (2013). Fermentasi buah markisa (*Passiflora*) menjadi asam sitrat. *Jurnal Teknik Kimia*, 19(3), 15-21.