Pharmacoscript

Abna et al./Pharmacoscript, Volume 9, No, 1, Februari 2026, 149-166

P-ISSN : 2622-4941 | E-ISSN : 2685-1121

BIOKONVERSI LIMBAH MANGGA MENJADI ASAM SITRAT MELALUI FERMENTASI TERKONTROL *Aspergillus niger* ATCC 16404

Inherni Marti Abna*, Agustin Alfiani Putri, Muchammad Reza Ghozaly, Anna Yuliana

Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Esa Unggul, Jakarta

*Email: inherni.martiabna@esaunggul.ac.id

Received: 02/01/2026 Revised: 19/02/2026 Accepted: 26/02/2026 Published: 28/02/2026

ABSTRAK

Biaya substrat karbon merupakan komponen terbesar dalam produksi asam sitrat industri, sehingga diperlukan sumber alternatif yang ekonomis. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi potensi limbah daging buah mangga (*Mangifera indica* L.) sebagai substrat alternatif bagi *Aspergillus niger* ATCC 16404. Fermentasi dilakukan melalui metode fermentasi media cair terendam (*submerged fermentation*) selama 108 jam menggunakan *vertical shaker* 150 rpm dengan variasi konsentrasi limbah (A: 0%, B: 25%, dan C: 50%). Parameter yang diukur meliputi kinetika pertumbuhan sel, konsumsi gula pereduksi, dinamika pH, dan kadar asam sitrat yang divalidasi dengan uji statistik ANOVA satu arah dan DMRT ($\alpha = 0,05$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi limbah mangga meningkatkan akumulasi produk secara sangat signifikan ($F = 21,93$; $p < 0,001$). Variasi konsentrasi terbaik ditemukan pada perlakuan C (50%) yang menghasilkan rata-rata kadar asam sitrat sebesar 1,66 ± 0,78 mg/L dengan kadar puncak mencapai 3,08 mg/L pada waktu fermentasi jam ke-108. Penurunan pH hingga mencapai 3,0 pada variasi C mengonfirmasi efisiensi sekresi asam organik yang lebih tinggi. Kesimpulan penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi limbah mangga 50% merupakan dosis optimal untuk biokonversi asam sitrat.

Kata Kunci: *Aspergillus niger*; Asam Sitrat; Biokonversi; Limbah Mangga; *Submerged Fermentation.*

ABSTRACT

Carbon substrate costs represent the most significant expenditure in industrial citric acid production, necessitating the exploration of more economical and sustainable alternatives. This study evaluates the potential of mango pulp waste (Mangifera indica L.) as an alternative substrate for Aspergillus niger ATCC 16404. Fermentation was conducted via submerged fermentation for 108 hours using a vertical shaker at 150 rpm, with varying waste concentrations: A (0%), B (25%), and C (50%). Parameters measured included cell growth kinetics, reducing sugar consumption, pH dynamics, and citric acid concentration, all of which were validated using One-Way ANOVA and Duncan's Multiple Range Test ($\alpha = 0.05$). The results demonstrated that increasing mango waste concentration significantly enhanced product accumulation ($F = 21.93$; $p < 0.001$). The optimal concentration was observed in treatment C (50%), yielding an average citric acid concentration of 1.66 ± 0.78 mg/L, with a peak concentration reaching 3.08 mg/L at the 108-hour mark. A decline in pH to 3.0 in variation C confirmed a higher efficiency of organic acid secretion. This study concludes that

a 50% mango waste concentration serves as the optimal dosage for citric acid bioconversion, offering an innovative solution for transforming organic waste into high-value biochemical products.

Keywords: *Aspergillus niger; Bioconversion; Citric Acid; Mango Waste; Submerged Fermentation.*

PENDAHULUAN

Asam sitrat merupakan asam karboksilat alami yang memiliki peran strategis dan tidak tergantikan dalam pasar biokimia global saat ini. Secara fundamental, senyawa dengan rumus molekul $C_6H_8O_7$ ini ditemukan alami pada jaringan tanaman dan hewan sebagai zat antara dalam siklus asam trikarboksilat atau siklus Krebs. Jalur metabolisme sentral ini sangat krusial bagi respirasi seluler dan produksi energi pada hampir semua organisme aerobik, sehingga keberadaan asam sitrat menjadi bagian tak terpisahkan dari eksistensi biologis (Chukwuemeka *et al*., 2019; Madigan *et al*., 2012).

Eskalasi permintaan global terhadap asam sitrat tingkat farmasi (*pharmaceutical grade*) terus terjadi secara konsisten dengan rata-rata kenaikan sebesar 5% per tahun dalam dekade terakhir (Chukwuemeka *et al*., 2019). Fenomena tersebut dipicu oleh karakteristik multifungsinya, mulai dari pengatur keasaman dan pengaw*et al*ami dalam industri makanan, hingga agen pengkelat, pendapar, dan komponen *effervescent* dalam industri farmasi serta kosmetik. Sifatnya yang aman, tidak beracun, *biocompatible*, serta memiliki kelarutan tinggi menjadikannya pilihan utama sebagai eksipien yang sulit digantikan oleh asam organik maupun asam anorganik sintetis lainnya (Ksiazek, 2023; Kusuma *et al*., 2019; Wulandari *et al*., 2021).

Produksi asam sitrat skala industri secara komersial tidak lagi mengandalkan ekstraksi langsung dari buah sitrus karena dianggap tidak efisien untuk memenuhi volume pasar yang besar. Meskipun buah secara alami mengandung asam sitrat, jumlah yang dihasilkan melalui ekstraksi fisik relatif kecil dengan proses pemurnian yang sangat kompleks dan mahal sesuai standar farmakope (Ksiazek, 2023). Industri bioteknologi modern saat ini memanfaatkan proses fermentasi mikroorganisme, khususnya kapang filamen, untuk mengubah sumber gula sederhana menjadi asam sitrat melalui manipulasi jalur metabolik yang presisi (Behera, 2020).

Salah satu mikroorganisme produsen asam sitrat paling unggul adalah kapang *Aspergillus niger*. Kapang ini dipilih karena mampu menghasilkan rendemen tinggi, laju pertumbuhan cepat, serta memiliki fleksibilitas metabolik pada kondisi

lingkungan ekstrem. Karakteristik paling menonjol dari *A. niger* adalah kemampuannya bertahan pada pH rendah di kisaran 2,5 hingga 3,5 (Patel dan Pandya, 2017). Kondisi asiditas ekstrem ini secara teknis menguntungkan karena dapat menghambat kontaminan secara alami selama fermentasi berlangsung, sehingga menjamin kualitas produk akhir sesuai standar industri (Behera, 2020). Penelitian ini menggunakan strain spesifik *Aspergillus niger* ATCC 16404 yang telah teruji memiliki stabilitas genetik unggul dan efisiensi metabolisme yang tinggi (Dhillon *et al*., 2011; Papagianni, 2007).

Tantangan fundamental industri fermentasi saat ini adalah tingginya biaya investasi bahan baku, terutama penggunaan karbon murni seperti glukosa teknis yang harganya fluktuatif. Biaya komponen karbon dilaporkan dapat menyerap hingga 60-70% dari total biaya produksi (Behera, 2020; Dhillon *et al*., 2011). Kondisi tersebut mendorong para peneliti mencari sumber karbon alternatif dari limbah agroindustri yang murah dan berkelanjutan sebagai upaya valorisasi limbah (Njokweni *et al*., 2021). Berbagai studi sebelumnya telah mengeksplorasi potensi limbah kulit nanas hingga hasil samping pertanian lainnya.

Indonesia memiliki buah mangga (*Mangifera indica* L.) sebagai komoditas hortikultura unggulan dengan angka produksi nasional lebih dari 2,8 juta ton per tahun (BPS, 2023). Sayangnya hal ini belum diimbangi dengan manajemen pascapanen memadai, sehingga saat panen raya tingkat kerusakan buah akibat pembusukan sangat signifikan. Akibatnya, banyak buah mangga hanya berakhir menjadi limbah organik yang mencemari lingkungan serta berkontribusi terhadap emisi gas rumah kaca melalui proses dekomposisi yang tidak terkendali (Njokweni *et al*., 2021). Buah mangga memiliki potensi teknis besar sebagai substrat fermentasi karena komposisi daging buahnya kaya nutrisi makro dan mikro. Daging buah mangga mengandung kadar air tinggi dan konsentrasi gula pereduksi sekitar 15-20% (Maldonado-Celis *et al*., 2019). Komponen gula sederhana tersebut merupakan bahan bakar utama bagi *Aspergillus niger* untuk menjalankan metabolisme selulernya (Ksiazek, 2023). Selain itu, kandungan karbohidrat sebesar 16,40 gram per 100 gram bahan berfungsi sebagai cadangan karbon selama fermentasi (Kemenkes RI, 2018).

Pemanfaatan limbah mangga dalam penelitian ini ditujukan untuk mengonversi profil nutrisi gula alami mangga melalui jalur metabolisme *A. niger* menjadi asam sitrat baru, bukan sekadar mengekstraksi kandungan asli buah. Penggunaan matriks

daging buah yang kaya serat pektin secara alami juga berfungsi sebagai induser sekresi enzim pektinolitik, yang mempercepat ketersediaan substrat siap pakai bagi kapang sejak awal fermentasi (Abbas *et al*., 2016; Patel dan Pandya, 2017).

Meskipun beberapa literatur telah membahas potensi limbah mangga, mayoritas studi masih terbatas pada pemanfaatan kulit atau bijinya saja (Abbas *et al*., 2016). Sementara itu, daging buah mangga busuk secara utuh mengandung profil nutrisi, vitamin, dan rasio karbon-nitrogen yang lengkap untuk mendukung densitas biomassa kapang selama proses produksi (Dhillon *et al*., 2011). Hal ini krusial untuk menjaga integritas metabolik sel dalam memicu inisiasi sekresi produk secara lebih awal. Pemanfaatan profil nutrisi lengkap pada daging buah memungkinkan penelitian ini mengevaluasi efektivitas respons metabolik *A. niger* dalam durasi kinetika yang lebih efisien selama 108 jam dibandingkan durasi standar pada penelitian terdahulu (Behera, 2020; Dhillon *et al*., 2011; Papagianni, 2007).

METODE PENELITIAN

Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan pengambilan sampel limbah buah mangga dilakukan melalui teknik random sampling (Hidayat *et al*., 2020). Penelitian disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari tiga perlakuan dan tiga kali ulangan untuk menjamin validitas hasil serta meminimalkan galat percobaan (Montgomery, 2017). Perlakuan tersebut meliputi variasi substitusi limbah mangga sebagai berikut:

a. 0% limbah mangga dan 100% media dasar fermentasi.
b. 25% limbah mangga dan 75% media dasar fermentasi
c. 50% limbah mangga dan 50% media dasar fermentasi

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan antara lain autoklaf (Tomy), oven (Memmert), *chopper* (Advance), *microwave* (Modena), sentrifuga (Eppendorf), *refrigerator*, *vertical shaker* (Zhicheng), *vortex* (Dragonlab), *beaker glass*, erlenmeyer, gelas ukur (Iwaki), cawan petri, tabung reaksi, tabung eppendorf, kaca arloji, spektrofotometer UV-Vis (Jasco V-730), timbangan analitik (Sartorius), mikropipet (Thermo), *laminar air flow* (Labtech), lemari asam (Nadiso), *hot plate* (IKA), pH indikator, kertas saring, kain saring nilon, kapas berlemak, kasa, ose bulat, aluminium foil, dan perangkat lunak *SPSS*.

Bahan dalam penelitian ini adalah limbah buah mangga, mikroorganisme *Aspergillus niger* ATCC 16404, media

*Potato Dextrose Agar (*PDA*)* (Himedia) dan *Potato Dextrose Broth* (PDB) (Himedia), amonium nitrat (NH_4NO_3), magnesium sulfat heptahidrat ($MgSO_4.7H_2O$), kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4), kalsium klorida ($CaCl_2$), natrium hidroksida (NaOH) (Emsure), asam sulfat (H_2SO_4) (Mallinckrodt), asetat anhidrat ($C_4H_6O_3$) (Emsure), piridin (C_5H_5N) (Fulltime), fenol (Supelco), glukosa standar (Millipore), akuades sebagai pelarut, serta asam sitrat standar (Emprove).

Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan sebagai validasi awal identitas spesimen buah mangga utuh berdasarkan karakteristik morfologi. Kegiatan ini dilaksanakan di Herbarium Bogoriense, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) untuk menjamin akurasi bahan baku dan menghindari kesalahan identifikasi

2. Sterilisasi Alat

Seluruh peralatan gelas dilapisi aluminium foil untuk mencegah kontaminasi pasca-sterilisasi. Sterilisasi dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit (Andriani, 2016; Madigan *et al*., 2012)

3. Persiapan Sampel

Limbah mangga sebanyak 3 kg dicuci, dikupas, dan dihaluskan menggunakan *chopper*. Suspensi daging buah disaring menggunakan kain saring nilon untuk memisahkan serat kasar. Filtrat yang diperoleh kemudian disentrifugasi pada kecepatan 5.000 *rpm* selama 15 menit. Supernatan diambil sebagai sumber karbon utama dan disimpan dalam *refrigerator* pada suhu 4 °C (Puspadewi *et al*., 2017).

4. Pembuatan Media Pertumbuhan dan Media Dasar Fermentasi

Penyiapan media pertumbuhan dilakukan dengan melarutkan 39 gram *Potato Dextrose Agar* (PDA) dalam 1 liter akuades yang dipanaskan hingga homogen, serta melarutkan 24 gram *Potato Dextrose Broth* (PDB) ke dalam 1 liter akuades untuk kebutuhan kultur cair (Jamilatun *et al*., 2020). Media dasar fermentasi diracik menggunakan amonium nitrat (NH_4NO_3) 10g, magnesium sulfat heptahidrat ($MgSO_4.7H_2O$) 1 g, dan kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) 4g dalam 1000 mL akuades (Auta *et al*., 2014). Seluruh media selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit sesuai dengan prosedur standar sterilisasi mikrobiologi (Madigan *et al*., 2012).

5. Peremajaan *Aspergillus niger* ATCC 16404

Kultur murni *Aspergillus niger* ATCC 16404 diinokulasi secara aseptik pada media

PDA menggunakan metode gores. Cawan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 hari hingga terbentuk miselia dan spora hitam yang pekat. Proses peremajaan ini bertujuan untuk memastikan viabilitas dan integritas fisiologis isolat sebelum digunakan sebagai inokulum (Abna, 2021; Jamilatun *et al*., 2020; Puspadewi *et al*., 2017).

6. Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Aspergillus niger* ATCC 16404

Sebanyak 2 ose kultur diinokulasikan ke dalam 100 mL media PDB steril, lalu ditempatkan pada *vertical shaker* 150 *rpm*. Pengambilan sampel dilakukan secara berkala setiap 6 jam. Massa sel dipisahkan menggunakan kertas saring yang telah diketahui bobotnya, dicuci, dan dikeringkan dalam oven pada suhu 40 °C hingga diperoleh berat sel kering konstan untuk menyusun profil kurva pertumbuhan (Purkan *et al*., 2016).

7. Pembuatan Inokulum *Aspergillus niger* ATCC 16404

Inokulum disiapkan dalam dua tahap adaptasi substrat. Tahap pertama melibatkan inokulasi 2 ose biakan ke dalam 100 mL PDB selama 36 jam. Tahap kedua, sebanyak 10 mL suspensi tahap pertama dipindahkan ke media adaptasi (campuran media dasar dan PDB rasio 1:1) dan diinkubasi selama 36 jam pada *shaker* 150 *rpm* hingga mencapai kerapatan sel optimal (Chen *et al*., 2014; Lotfy *et al*., 2007).

8. Fermentasi Asam Sitrat oleh *Aspergillus niger* ATCC 16404

Fermentasi dilakukan dengan metode *submerged fermentation* dalam erlenmeyer 250 mL. Sebanyak 10 mL inokulum kedua dimasukkan secara *aseptik* ke dalam media perlakuan (A, B, dan C). Proses fermentasi berlangsung selama 108 jam pada suhu ruang dengan agitasi kontinu 150 rpm. Penyamplingan dilakukan secara periodik setiap 6 jam untuk dianalisis kinetika pertumbuhannya. Sampel disentrifugasi pada 6.000 *rpm* untuk memisahkan supernatan dari biomassa sel (Puspadewi *et al*., 2017).

9. Isolasi Produk Asam Sitrat

Supernatan sebanyak 10 mL direaksikan dengan 5 mL kalsium klorida ($CaCl_2$) 0,25 N untuk membentuk endapan kalsium sitrat. Endapan disaring, dicuci dengan natrium hidroksida (NaOH) 0,1 N, lalu ditambahkan 0,5 mL asam sulfat (H_2SO_4) 1 N untuk melepaskan kembali asam sitrat ke fase cair melalui pembentukan kalsium sulfat sebagai produk samping (Puspadewi *et al*., 2017).

10. Analisis Gula Pereduksi

Analisis gula pereduksi dilakukan untuk memantau dinamika konsumsi nutrisi oleh mikroba selama fermentasi. Prosedur menggunakan metode fenol-sulfat dengan

glukosa sebagai standar (0-50 *ppm*). Sebanyak 1 mL sampel direaksikan dengan 1 mL fenol 5% dan 5 mL H_2SO4 98%. Campuran didiamkan selama 10 menit, *di-vortex*, kemudian dipanaskan pada suhu 40 °C selama 15 menit. Absorbansi sampel diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 488 nm (Masuko *et al*., 2005).

11. Analisis Asam Sitrat Hasil Fermentasi

Analisis dilakukan dalam dua tahap, yaitu uji kualitatif dan kuantitatif. Uji kualitatif dilakukan dengan memanaskan supernatan bersama asam sulfat pekat hingga terbentuk warna gelap. Analisis kuantitatif dilakukan dengan mereaksikan 0,5 mL sampel dengan 2 mL piridin dan 3 mL asetat anhidrat. Absorbansi campuran diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 313,2 nm terhadap kurva standar asam sitrat murni (Marier dan Boulet dalam Puspadewi *et al*., 2017).

Analisis Data

Data hasil penelitian diuji terlebih dahulu menggunakan uji Normalitas (*Shapiro-Wilk*) untuk memastikan data terdistribusi normal dan uji Homogenitas (*Levene's Test*) untuk memastikan varians data bersifat homogen. Data hasil pengamatan dianalisis secara statistik menggunakan analisis varians (ANOVA) satu arah pada taraf kepercayaan 95% (-(α=0,05). Apabila terdapat perbedaan signifikan, analisis dilanjutkan dengan uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) untuk menentukan konsentrasi substrat yang paling optimal (Montgomery, 2017). Seluruh prosedur pengolahan data dilakukan dengan bantuan perangkat lunak statistik (Lotfy *et al*., 2007; Rizqiati *et al*., 2021).

HASIL DAN PEMBAHASAN

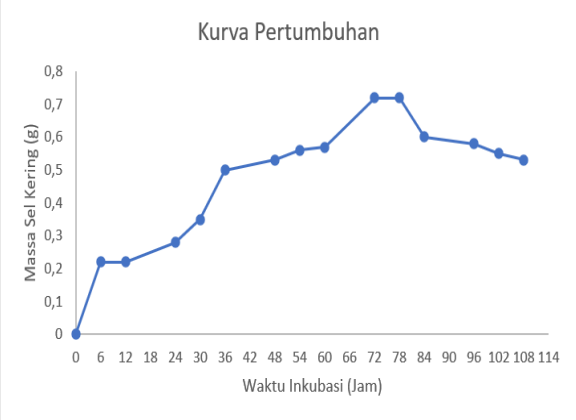
1. Karakteristik Bahan Baku dan Validasi Taksonomi

Langkah awal dalam penelitian ini adalah memastikan integritas biologi dari substrat yang digunakan. Berdasarkan hasil determinasi di Herbarium Bogoriense, Direktorat Pengelolaan Koleksi Ilmiah BRIN(Nomor:B1722/II.6.2/DI.05.07/6/2022), sampel yang digunakan terkonfirmasi secara autentik sebagai mangga Arum Manis dengan identitas taksonomi *Mangifera indica* L. dari suku *Anacardiaceae*. Validasi ini menjadi landasan krusial dalam pembahasan karena karakteristik metabolit primer dan sekunder pada tanaman sangat dipengaruhi oleh spesiasi dan varietasnya. Penggunaan limbah mangga Arum Manis yang teridentifikasi dengan jelas menjamin bahwa ketersediaan gula pereduksi dan serat pektin dalam limbah tersebut konsisten dengan

profil nutrisi yang dibutuhkan oleh *Aspergillus niger* untuk produksi asam sitrat secara optimal.

2. Pertumbuhan *Aspergillus niger* ATCC 16404

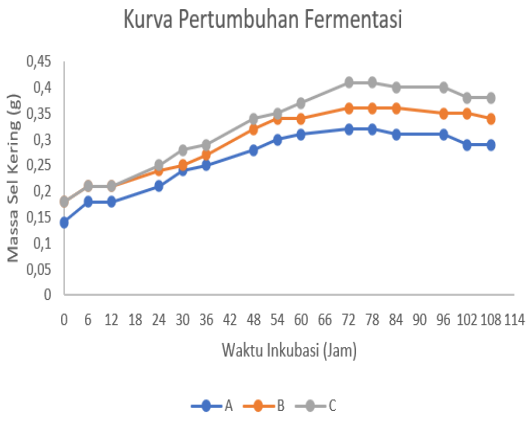
Pemeriksaan terhadap kurva pertumbuhan pada media *Potato Dextrose Broth* (Gambar 1) bertujuan untuk memvalidasi performa kinetika *Aspergillus niger* ATCC 16404 dalam kondisi nutrisi ideal sebagai kontrol. Munculnya fase adaptasi (*lag phase*) pada jam ke-6 hingga jam ke-12 menandakan bahwa sel sedang melakukan penyesuaian fisiologis terhadap lingkungan baru dan mensintesis perangkat metabolik untuk menginisiasi pemanfaatan sumber karbon (West, 2021). Durasi fase ini sangat bergantung pada kecocokan antara aparatus enzimatik mikroba dengan komposisi kimia media (Behera, 2020; West, 2021)



Gambar 1. Kurva pertumbuhan dalam media PDB

Selanjutnya, lonjakan biomassa pada fase eksponensial terjadi secara signifikan mulai jam ke-36 dan terus meningkat hingga mencapai puncaknya pada jam ke-72. Hal ini menunjukkan bahwa isolat memiliki viabilitas yang sangat baik, di mana ketersediaan glukosa bebas dalam media PDB memicu laju metabolisme yang cepat melalui jalur glikolisis (Tong *et al*., 2019). Pengurangan biomassa yang mulai terlihat setelah jam ke-72 hingga jam ke-108 mencerminkan transisi dari fase logaritma menuju fase stasioner. Penurunan berat kering ini mengindikasikan adanya fase autolisis awal yang dipicu oleh keterbatasan nutrisi dan penurunan pH ekstrem. Secara fisiologis, kondisi stres pada fase stasioner ini merupakan sinyal krusial bagi sel untuk mengalihkan metabolisme primer menjadi metabolisme sekunder, yaitu biosintesis asam sitrat (Behera, 2020; Tong *et al*., 2019).

3. Fermentasi



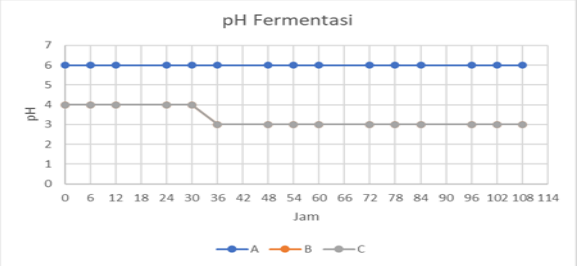
Gambar 2. Kurva pertumbuhan pada media fermentasi

Beralih pada kurva pertumbuhan dalam media fermentasi limbah mangga (Gambar 2), terlihat akselerasi pertumbuhan awal yang lebih cepat jika dibandingkan dengan media standar. Hal ini disebabkan karena penggunaan inokulum yang diambil tepat saat mencapai fase puncak pertumbuhan pada kurva PDB, sehingga sel memiliki aparatus enzimatik yang aktif dan tidak lagi memerlukan waktu adaptasi yang lama untuk memulai aktivitas metaboliknya (Behera, 2020; West, 2021).

Terlihat perbedaan gradien pertumbuhan yang nyata antar variasi, di mana peningkatan konsentrasi limbah mangga berkorelasi langsung dengan pencapaian puncak biomassa yang lebih tinggi pada rentang jam ke-36 hingga jam ke-72. Hal ini membuktikan bahwa limbah mangga mengandung komponen gula terlarut dan nitrogen organik yang bertindak sebagai faktor pembatas pertumbuhan (Behera, 2020; Dhillon *et al*., 2011).

Pertumbuhan yang lebih signifikan pada variasi konsentrasi tinggi juga mengindikasikan adanya sinergi antara gula dari mangga dengan suplemen mineral magnesium ($MgSO_4$). Mineral ini bertindak sebagai kofaktor esensial bagi enzim-enzim kunci dalam jalur glikolisis yang bertanggung jawab atas penyediaan energi dan prekursor karbon untuk biosintesis metabolit sekunder (Tong *et al*., 2019; West, 2021).

4. Analisis pH



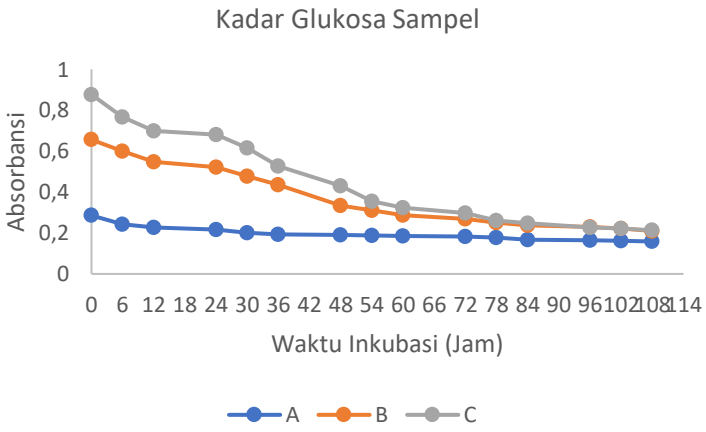
Gambar 3. pH pada media fermentasi

Dinamika pH media yang ditunjukkan pada Gambar 3 memberikan gambaran mengenai hubungan antara aktivitas seluler dengan perubahan kimiawi lingkungan. Penurunan nilai pH yang terjadi secara simultan dengan peningkatan biomassa, terutama mulai jam ke-36, merupakan indikator terjadinya sekresi asam organik ke lingkungan ekstraseluler (Devandla *et al*., 2025). Tercapainya kondisi pH yang semakin asam (mencapai pH 3,0) pada variasi limbah tinggi merupakan pemicu utama dimulainya akumulasi asam sitrat. Pada ambang pH kritis ini, kapang memasuki fase stasioner dan aktivitas enzim *isocitrate dehydrogenase* dalam siklus asam trikarboksilat (TCA) mulai terhambat secara parsial (Almousa *et al*., 2018; Behera, 2020). Hambatan enzimatis ini menyebabkan akumulasi aliran karbon terhenti di tahap sitrat. Akibatnya, sel menyekresikan senyawa tersebut ke lingkungan ekstraseluler untuk menjaga

homeostasis dan keseimbangan pH internal seluler. Mengingat fermentasi dihentikan pada jam ke-108, penurunan pH ini menjadi bukti bahwa sel baru saja memulai fase sekresi aktif pasca pertumbuhan primer (Devandla *et al*., 2025).

Selain sebagai indikator produk, keasaman media juga berfungsi sebagai mekanisme pertahanan diri bagi *A. niger* untuk menekan pertumbuhan mikroba kontaminan yang umumnya tidak toleran terhadap lingkungan dengan pH rendah, sehingga penurunan pH selama fermentasi berperan dalam meningkatkan akumulasi sitrat sekaligus menekan kontaminan. (Lende *et al*., 2021; West, 2023).

5. Analisis Kadar Glukosa

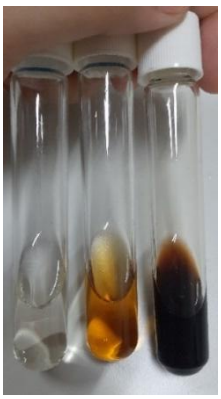


Gambar 4. Kadar glukosa pada media fermentasi limbah mangga

Analisis terhadap kurva kadar glukosa (Gambar 4) mengungkapkan dinamika pemanfaatan substrat oleh *A. niger* ATCC 16404 selama periode fermentasi. Penurunan kadar glukosa yang terjadi secara konsisten, terutama yang paling drastis pada variasi C, mengonfirmasi bahwa gula pereduksi dalam limbah mangga dikonsumsi secara aktif sebagai sumber karbon primer dan energi (Behera,2020; West, 2021).

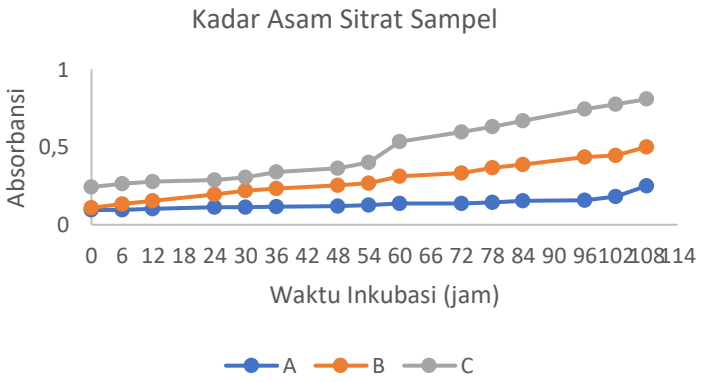
Fenomena ini menjelaskan adanya *carbon flux* di mana pada 72 jam pertama, glukosa diprioritaskan untuk pembentukan biomassa. Setelah melewati fase puncak pertumbuhan, konsumsi gula yang tetap berlangsung hingga jam ke-108 menunjukkan pengalihan substrat untuk mendukung metabolisme pemeliharaan dan inisiasi sintesis metabolit sekunder. Penurunan substrat ini menunjukkan bahwa sel berada dalam kondisi metabolisme aktif dan kapasitas enzimatis kapang dalam mendegradasi komponen gula dalam matriks limbah mangga sangat efisien (Lende *et al*., 2021; Max *et al*., 2010).

6. Analisis Kadar Asam Sitrat



Gambar 5. Uji kualitatif asam sitrat

Analisis kadar asam sitrat dalam penelitian ini mencakup pengujian secara kualitatif untuk memastikan keberadaan senyawa target dan pengujian kuantitatif untuk mengukur konsentrasi yang dihasilkan. Uji kualitatif dilakukan dengan menambahkan asam sulfat (H_2SO_4) pekat ke dalam supernatan hasil fermentasi (Gambar 5). Penambahan asam kuat ini berfungsi sebagai agen pendehidrasi dan pengoksidasi molekul organik. Hasil pengujian menunjukkan indikasi positif yang ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi lebih gelap setelah proses pemanasan. Fenomena perubahan warna ini disebabkan oleh proses pelepasan karbon atau karbonisasi akibat reaksi oksidasi senyawa organik oleh asam sulfat pekat, yang mengonfirmasi bahwa *Aspergillus niger* ATCC 16404 berhasil mensekresikan asam organik ke dalam media (Puspadewi *et al*., 2017).



Gambar 6. Kadar asam sitrat pada media fermentasi limbah mangga

Secara kuantitatif, kadar asam sitrat tertinggi pada penelitian ini ditemukan pada variasi C dengan kadar puncak mencapai 3,08 mg/L. Angka ini menunjukkan peningkatan yang signifikan dibandingkan kelompok kontrol (0,41 mg/L) dan membuktikan efektivitas limbah mangga sebagai induser biosintesis. Meskipun secara statistik nilai rata-rata akumulasi pada variasi C berada pada angka 1,66 ± 0,78 mg/L (Tabel 1), kemunculan nilai puncak di atas 3 mg/L memberikan indikasi kuat mengenai potensi maksimal substrat jika durasi fermentasi dioptimasi lebih lanjut (Behera, 2020; Devandla *et al*., 2025).

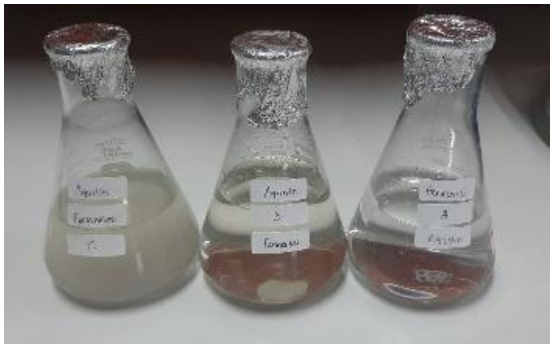
Meskipun terdapat perbedaan skala akumulasi absolut yang dibedakan oleh durasi fermentasi pada penelitian pembanding yang dilakukan selama 7 hari (168 jam), sedangkan penelitian ini menerapkan durasi kinetika yang lebih efisien selama 108 jam (4,5 hari). Capaian kadar ini merupakan representasi dari akumulasi awal produk, yang membuktikan bahwa limbah mangga mampu memicu respons metabolik *A. niger* secara dini bahkan sebelum mencapai puncak masa inkubasi standar (Tong *et al*., 2019). Pemilihan waktu yang lebih singkat ini bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas awal substrat dalam menginisiasi metabolisme sekunder, yang dalam skala

industri sangat krusial untuk menekan biaya operasional serta meminimalisir risiko kontaminasi (Lende *et al*., 2021; West, 2021).

Potensi ini mengindikasikan bahwa komposisi kimia pada limbah mangga memberikan dukungan nutrisi yang memadai bagi metabolisme *Aspergillus niger* dalam mensintesis asam organik. Efektivitas produksi pada penelitian ini didukung oleh tingginya kandungan gula alami pada matriks buah mangga yang mencapai 14,8 g/100g (Kemenkes RI, 2018). Nilai tersebut secara kompetitif setara dengan potensi gula pada kulit pisang sebesar 14 g dan markisa 11 g (Chukwuemeka *et al*., 2019; Ovelando *et al*., 2013).

Ketersediaan gula yang melimpah ini memicu kondisi hipermetabolik pada *A. niger* yang secara signifikan meningkatkan efisiensi biokonversi selama proses fermentasi berlangsung. Meskipun akumulasi produk akhir masih berada pada tahap awal kinetika akibat durasi inkubasi yang lebih singkat dibandingkan penelitian terdahulu, fenomena ini membuktikan efektivitas limbah mangga dalam menginduksi respons metabolik sejak dini (Almousa *et al*., 2018; Behera, 2020; Tong *et al*., 2019).

7. Isolasi Asam Sitrat



Gambar 7. Hasil isolasi asam sitrat

Proses isolasi asam sitrat pada penelitian ini dilakukan untuk memurnikan produk dari matriks media fermentasi dan biomassa kapang (Gambar 7). Metode isolasi yang dipilih didasarkan pada prinsip pengendapan bertingkat menggunakan kalsium klorida ($CaCl_2$). Penambahan $CaCl_2$ bertujuan untuk mengikat ion sitrat yang terlarut dalam hasil fermentasi menjadi bentuk garam kalsium sitrat yang tidak larut (Dhillon *et al*., 2011; Zuroidah *et al*., 2019). Pemilihan $CaCl_2$ dinilai sangat efektif karena ion kalsium (Ca^{2+}) memiliki afinitas yang kuat terhadap gugus karboksilat pada molekul asam sitrat. Untuk mengoptimalkan pembentukan endapan, dilakukan penambahan NaOH guna menciptakan suasana basa. Pada kondisi pH basa, kelarutan kalsium sitrat menurun drastis sehingga kristal endapan yang terbentuk menjadi lebih stabil dan mudah dipisahkan (Dhillon *et al*., 2011; Lende *et al*., 2021 ; Puspadewi *et al*., 2017).

Tahap akhir pemurnian melibatkan penambahan asam sulfat (H_2SO_4) yang berfungsi sebagai agen pengonversi garam menjadi asam bebas. Reaksi antara kalsium sitrat dengan H_2SO_4 menghasilkan asam sitrat cair dan endapan sampingan berupa kalsium sulfat ($CaSO_4$). Secara stoikiometri, penambahan asam sulfat harus dilakukan secara presisi agar seluruh kalsium terendapkan sempurna menjadi $CaSO_4$, sehingga filtrat yang diperoleh murni berupa asam sitrat cair (Puspadewi *et al*., 2017; Zuroidah *et al*., 2019). Metode pengendapan ini sejalan dengan penelitian Wardani (2018) yang membuktikan bahwa penggunaan garam kalsium merupakan metode yang paling ekonomis dan efektif untuk mengisolasi asam sitrat dari hasil bioproses.

8. Analisis Statistik

Analisis statistik dilakukan untuk memvalidasi pengaruh nyata variasi konsentrasi limbah mangga terhadap efisiensi biosintesis asam sitrat oleh *Aspergillus niger* ATCC 16404. Berdasarkan hasil uji *Shapiro-Wilk*, data dinyatakan berdistribusi normal karena nilai signifikansi setiap kelompok lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$). Hal ini didukung oleh uji homogenitas varians melalui *Levene Statistic* yang menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,09 ($p > 0,05$), mengonfirmasi bahwa varians data antar kelompok perlakuan bersifat homogen. Terpenuhinya asumsi ini memberikan landasan ilmiah yang kuat untuk menggunakan statistik parametrik (Madigan, 2012).

Tabel 1. Profil kadar asam sitrat pada berbagai variasi konsentrasi substrat

Variasi Konsentrasi	Rata-rata Kadar Asam Sitrat (mg/L)	Notasi Duncan ($\alpha = 0,05$)
A (0%)	0,41 ± 0,16	a
B (25%)	0,98 ± 0,48	b
C (50%)	1,66 ± 0,78	c

Tabel 1 menunjukkan adanya korelasi positif yang signifikan antara konsentrasi substrat dengan kapasitas akumulasi produk. Meskipun nilai rata-rata pada Variasi C tercatat sebesar 1,66 ± 0,78 mg/L, pencapaian kadar tertinggi hingga 3,08 mg/L menunjukkan adanya potensi biokonversi yang tinggi dari limbah mangga. Standar deviasi yang teramati pada Variasi C mencerminkan dinamika fase transisi metabolisme sekunder yang sedang berlangsung aktif pada jam ke-108, di mana sel-sel kapang baru saja memulai sekresi asam organik secara fluktuatif sebelum mencapai kondisi tunak (*steady state*) (Behera , 2020 ; West, 2021).

Hasil uji *One-Way ANOVA* memberikan nilai F hitung sebesar 21,93 dengan signifikansi 0,000 ($p < 0,05$), yang

membuktikan adanya perbedaan yang sangat nyata antar perlakuan. Uji lanjut *Duncan Multiple Range Test (DMRT)* mempertegas hasil ini dengan menempatkan setiap variasi pada subset yang berbeda secara utuh. Hal ini mengindikasikan bahwa setiap penambahan dosis limbah mangga memberikan dampak metabolik yang konsisten bagi kapang dalam mengawali sekresi asam sitrat (Almousa *et al*., 2018; Montgomery, 2017).

Penemuan ini memperkuat potensi limbah mangga sebagai substrat substitusi yang efektif dalam produksi asam sitrat untuk kebutuhan industri farmasi.

KESIMPULAN

Limbah daging buah mangga (*Mangifera indica* L.) terbukti efektif sebagai substrat karbon alternatif dalam produksi asam sitrat menggunakan *Aspergillus niger* ATCC 16404, menggantikan penggunaan glukosa murni.

Metode *submerged fermentation* dengan agitasi 150 rpm mampu mendukung kinetika pertumbuhan sel dan memicu sekresi asam organik secara optimal melalui mekanisme *carbon flux* pasca-fase eksponensial.

Konsentrasi substrat berpengaruh signifikan terhadap akumulasi produk berdasarkan uji ANOVA ($F = 21{,}93$; $p < 0{,}05$), di mana setiap peningkatan dosis konsentrasi limbah berbanding lurus dengan peningkatan kadar asam sitrat yang dihasilkan.

Variasi C (konsentrasi 50%) merupakan dosis paling optimal dengan kadar puncak mencapai 3,08 mg/L pada jam ke-108, ditandai dengan penurunan pH media hingga 3,0 sebagai indikator keberhasilan biosintesis.

Proses isolasi melalui metode pengendapan bertingkat menggunakan $CaCl_2$ dan pemurnian dengan H_2SO_4 berhasil mengonversi sitrat hasil fermentasi menjadi bentuk asam sitrat cair dan endapan kalsium sulfat ($CaSO_4$).

DAFTAR PUSTAKA

Abbas, N., Safdar, W., Ali, S., Choudhry, S., & Ilahi, S. (2016). Citric acid production from *Aspergillus niger* using mango (*Mangifera indica* L.) and sweet orange (*Citrus sinensis*) peels as substrate. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, *7*(2), 868–872. https://doi.org/10.14299/ijser.2016.02.001

Abna, I. M. (2021). Isolasi dan analisis antimikroba kapang endofit dari tanaman nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lam). *Jurnal Katalisator*, *6*(2), 146–163.

https://doi.org/10.62769/katalisator.v6i2.646

Almousa, A. A., El-ghany, M. N. A., & Ashour, E. H. (2018). Citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Innovation in Pharmaceutical and Biological Sciences*, *5*(4), 20–37.

Andriani, R. (2016). Pengenalan alat-alat laboratorium mikrobiologi untuk mengatasi keselamatan kerja dan keberhasilan praktikum. *Jurnal Mikrobiologi*, *1*(1), 7.

Auta, H. S., Abidoye, K. T., Tahir, H., Ibrahim, A. D., & Aransiola, S. A. (2014). Citric acid production by *Aspergillus niger* cultivated on *Parkia biglobosa* fruit pulp. *International Scholarly Research Notices*, *2014*, 1–8.https://doi.org/10.1155/2014/762021

Badan Pusat Statistik. (2023). *Statistik tanaman buah-buahan dan sayuran tahunan Indonesia 2022*. BPS RI.

Behera, B. C. (2020). Citric acid from *Aspergillus niger*: A comprehensive overview. *Critical Reviews in Microbiology*, *46*(6), 727–749. https://doi.org/10.1080/1040841x.2020.1828815

Chen, H., He, X., Geng, H., & Liu, H. (2014). Physiological characterization of ATP-citrate lyase in *Aspergillus niger*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *41*, 721–731. https://doi.org/10.1007/s10295-014-1418-3

Chukwuemeka, I. C., Ethel, O. C., Kalu, A. D., & Chigozie, N. C. (2019). Citric acid production by *Aspergillus niger* using banana and plantain peels. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, *8*(2), 15–21. https://doi.org/10.30574/gscbps.2019.8.2.0111

Devandla, A., Malapati, A. K., Tallapalli, M., Mandugula, H. C., & Shaik, M. B. (2025). Sustainable production of citric acid using *Aspergillus niger*: Optimization of fermentation parameters and utilization of orange peel. *World Journal of Biology Pharmacy and Health Sciences*, *21*(01), 468–474. https://doi.org/10.30574/wjbphs.2025.21.1.0038

Dhillon, G. S., Brar, S. K., Verma, M., & Tyagi, R. D. (2011). Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, *54*(2), 83–92. https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.02.002

Hidayat, N., Prabowo, S., Rahmadi, A., Marwati, & Emmawati, A. (2020).

Teknologi fermentasi. IPB Press.

Jamilatun, M., Azzahra, N., & Aminah, A. (2020). Perbandingan pertumbuhan *Aspergillus fumigatus* pada media instan modifikasi carrot sucrose agar dan potato dextrose agar. *Jurnal Mikologi Indonesia*, *4*(1), 168–174. https://doi.org/10.46638/jmi.v4i1.69

Kementerian Kesehatan RI. (2018). *Tabel komposisi pangan Indonesia (TKPI)*. Direktorat Jenderal Kesehatan Masyarakat.

Książek, E. (2023). Citric acid: Properties, microbial production, and applications in industries. *Molecules*, *29*(1), 22. https://doi.org/10.3390/molecules29010022

Kusuma, G. A., Antara, N. S., & Suwariani, N. P. (2019). Fermentasi produksi asam sitrat menggunakan *Aspergillus niger* ATCC 16404 dengan substrat hidrolisat cair limbah padat industri brem. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, *7*(4), 615–624. https://doi.org/10.24843/jrma.2019.v07.i04.p13

Lende, S. V., Karemore, H., & Umekar, M. J. (2021). Review on production of citric acid by fermentation technology. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, *17*(3), 85–93. https://doi.org/10.30574/gscbps.2021.17.3.0313

Lotfy, W. A., Ghanem, K. M., & El-Helow, E. R. (2007). Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs. *Bioresource Technology*, *98*(18), 3470–3477. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.032

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., & Clark, D. P. (2012). *Brock biology of microorganisms* (13th ed.). Pearson Education.

Maldonado-Celis, M. E., Yahia, E. M., Bedoya, R., Landázuri, P., Loango, N., Aguillón, J., Restrepo, B., & Guerrero Ospina, J. C. (2019). Chemical composition of mango (*Mangifera indica* L.) fruit: Nutritional and phytochemical compounds. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1–21. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01073

Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S. I., & Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, *339*(1), 69–72. https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.0

01

Max, B., Salgado, J. M., Rodríguez, N., Cortés, S., Converti, A., & Domínguez, J. M. (2010). Biotechnological production of citric acid. *Brazilian Journal of Microbiology*, *41*(4), 862–875. https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400005

Montgomery, D. C. (2017). *Design and analysis of experiments*. John Wiley & Sons.

Njokweni, S. G., Steyn, A., Botes, M., Viljoen-Bloom, M., & van Zyl, W. H. (2021). Potential valorization of organic waste streams to valuable organic acids through microbial conversion: A South African case study. *Catalysts*, *11*(8), 964. https://doi.org/10.3390/catal11080964

Ovelando, R., Nabilla, M. A., & Surest, A. H. (2013). Fermentasi buah markisa (Passiflora) menjadi asam sitrat. *Jurnal Ilmu Teknik Sriwijaya*, *1*(1), 103409.

Papagianni, M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, *25*(3), 244–263. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.01.002

Patel, T., & Pandya, H. (2017). Citric acid production fermentation process. *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *2*(4), 3983–3991.

Purkan, P., Baktir, A., & Sayyidah, A. R. (2016). Produksi enzim kitinase dari *Aspergillus niger* menggunakan limbah cangkang rajungan sebagai induser. *Kimia Riset*, *1*(1), 34–41. https://doi.org/10.20473/jkr.v1i1.2440

Puspadewi, R., Anugrah, R., & Sabila, D. (2017). Kemampuan *Aspergillus wentii* dalam menghasilkan asam sitrat. *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy)*, *5*(1), 15–20. https://doi.org/10.26874/kjif.v5i1.83

Rizqiati, H., Mulyani, S., & Ramadhanti, L. (2021). Pengaruh variasi konsentrasi sukrosa terhadap total bakteri asam laktat, pH, kadar alkohol dan hedonik water kefir belimbing manis (*Averrhoa carambola*). *Jurnal Teknologi Pangan*, *21*(1), 54–62. https://doi.org/10.35799/jis.21.1.2021.31160

Rohmah, U. M., Shovitri, M., & Kuswytasari, N. D. (2018). Degradasi plastik oleh jamur *Aspergillus terreus* (LM 1021) pada pH 5 dan 6; serta suhu 25°C dan 35°C. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, *7*(2), 5–10. https://doi.org/10.12962/j23373520.v7i2.37207

Sasmitaloka, K. S. (2017). Produksi asam sitrat oleh *Aspergillus niger* pada kultivasi media cair. *Jurnal Integrasi Proses*, *6*(3), 116–122. https://dx.doi.org/10.36055/jip.v6i3.1747

Sidauruk, M. G. E., Hutauruk, S. N., Martgrita, M. M., & Manurung, A. (2019). Citric acid production from Toba banana peel (*Musa acuminata* Colla) through submerged fermentation using *Aspergillus niger*. *Microbiology Indonesia*, *13*(4), 118–122. https://doi.org/10.5454/mi.13.4.2

Tong, Z., Zheng, X., Tong, Y., Shi, Y. C., & Sun, J. (2019). Systems metabolic engineering for citric acid production by *Aspergillus niger* in the post-genomic era. *Microbial Cell Factories*, *18*(1), 28. https://doi.org/10.1186/s12934-019-1064-6

Wardani, R. K. (2018). Pemanfaatan kalsium klorida ($CaCl_2$) untuk ekstraksi asam sitrat pada buah jeruk purut. Dalam *The 3rd Science and Pharmacy Conference 2018*.

West, T. P. (2021). Citric acid production by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation of agricultural processing coproducts. *Fermentation*, *7*(1), 12. https://doi.org/10.3390/applbiosci2010001

Wulandari, S. L., Kaloik, P., Lakobal, P., & Wenda, N. (2021). Isolasi dan seleksi mikrob penghasil asam sitrat dari buah-buahan busuk. *Jurnal Biologi Papua*, *13*(1), 56–63.

Zuroidah, A., Wardani, R. K., & Arifiyana, D. (2019). Isolasi asam sitrat pada buah belimbing wuluh (Averrhoa bilimbi L.) dengan menggunakan larutan kalsium klorida ($CaCl_2$). *Jurnal Farmasi*, *1*(1), 1–9.