

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL PERCOBAAN

1. Penyiapan Inokulum dan Optimasi Waktu Inokulasi

a. Peremajaan Biakan *Aspergillus flavus* galur NTGA7A4UVE10

Setelah dilakukan peremajaan pada agar miring dalam tabung reaksi dan pada agar dalam cawan petri dengan masa inkubasi 7 hari diperoleh koloni *Aspergillus flavus* berwarna hijau tua yang tumbuh menutupi permukaan agar. Medium PDA yang semula berwarna putih kekuningan menjadi berwarna kuning. Bentuk koloni *Aspergillus flavus* galur NTGA7A4UVE19 dapat dilihat pada Gambar 6.

b. Optimasi Waktu Inokulasi

Setelah dilakukan prakultur dengan variasi waktu inokulasi, yaitu 18 jam, 24 jam dan 30 jam, diperoleh biomassa sel kapang yang berbentuk pellet berwarna putih kekuningan. Setelah dilakukan pengeringan dan penimbangan terhadap biomassa sel kapang diperoleh bobot kering sel kapang yang berbeda antara tiga macam waktu inokulasi tersebut. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan

bobot sel kering tersebut diperoleh bahwa waktu optimum untuk inokulasi *Aspergillus flavus* adalah 30 jam dengan bobot sel kering 26,45 g/L.

2. Fermentasi Tahap I

a. Fermentasi Tahap I

Biomassa sel kapang sebanyak 300 µl dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi berisi medium pembanding, medium fermentasi minimum dan medium fermentasi minimum dengan asam amino. Setelah dilakukan inkubasi selama 7 hari diperoleh biomassa sel berbentuk pellet yang lebih besar dibandingkan dengan biomassa sel hasil prakultur (Gambar 8). Setelah disaring dan disentrifugasi diperoleh supernatan berwarna kuning jernih. Data selengkapnya mengenai pengamatan biomassa sel dapat dilihat pada Tabel 2.

b. Skrinning dengan FeCl_3 1%

Berdasarkan skrinning dengan larutan FeCl_3 1% diperoleh warna larutan yang bervariasi antara jingga kuning, jingga dan jingga kecoklatan. Data selengkapnya mengenai hasil skrinning fermentasi tahap I dengan FeCl_3 dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 9.

3. Analisis Kuantitatif dengan KLT Densitometri

a. Pembuatan larutan standar dan spektrum serapan

Kurva serapan standar asam kojat yang diperoleh dengan KLT Densitometri dapat dilihat pada Gambar 10. Dari kurva serapan tersebut didapatkan panjang gelombang maksimum 312 nm.

b. Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Kojat

Kurva kalibrasi larutan standar asam kojat dapat dilihat pada Gambar 12 dan data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 3. Dari kurva kalibrasi tersebut diperoleh persamaan regresi liner $y = 1503,303378 + 14,31025567 x$ dengan $r = 0,9994$.

c. Analisis Kuantitatif Asam Kojat dalam Kultur Fermentasi dengan KLT Densitometri

Konsentrasi asam kojat selama proses fermentasi berlangsung dapat dilihat pada Tabel 4. Konsentrasi asam kojat tertinggi ditunjukkan pada medium fermentasi minimum dengan penambahan asam amino L-arginin HCl yaitu 18,6545 g/L. Pada fermentasi tahap I ini asam kojat yang dihasilkan oleh medium fermentasi yang mengandung *yeast extract* sedikit, yaitu hanya 6,6719 g/L. Densitogram standar asam kojat dapat

dilihat pada Gambar 11 sedangkan salah satu densitogram asam kojat dalam kultur fermentasi dapat dilihat pada Gambar 13.

5. Fermentasi dengan Medium Terpilih dalam Volume Medium 100 ml

Berdasarkan fermentasi tahap I diperoleh bahwa medium fermentasi yang mengandung asam amino L-arginin HCl menghasilkan asam kojat yang paling banyak, maka medium tersebut digunakan untuk fermentasi tahap selanjutnya. Sebelum dilakukan fermentasi tahap II dilakukan dahulu fermentasi pada skala medium 100 ml dalam Erlenmeyer 250 ml. Untuk pembandingan dilakukan juga fermentasi menggunakan medium yang mengandung *yeast extract* dan medium fermentasi minimum.

Data bobot sel kering dapat dilihat pada Tabel 5. Hasil skrinning dengan FeCl_3 1% dapat dilihat pada Tabel 5 dan Gambar 14. Konsentrasi asam kojat yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 6. Berdasarkan Tabel tersebut dapat dilihat bahwa medium yang mengandung *yeast extract* menghasilkan asam kojat tertinggi, yaitu 10,4945 g/L. Sementara itu medium fermentasi minimum yang mengandung asam amino L-arginin HCl menghasilkan asam kojat lebih banyak dibandingkan medium fermentasi minimum, yaitu 7,9283 g/L.

6. Fermentasi Tahap II (Variasi Volume Medium Fermentasi)

Berdasarkan fermentasi sebelumnya diperoleh bahwa medium fermentasi minimum yang mengandung asam amino L-arginin HCl menghasilkan asam kojat lebih banyak dibandingkan medium fermentasi minimum. Maka kombinasi medium ini yang digunakan untuk fermentasi tahap II menggunakan Erlenmeyer 250 ml 1000 ml. Medium yang dihasilkan berwarna kuning coklat keruh dengan dedak padi yang tidak larut.

Hasil pemisahan biomassa sel adalah filtrat berwarna kuning. Data volume filtrat yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 7. Filtrat hasil fermentasi dapat dilihat pada Gambar 16.

Hasil skrinning dengan FeCl_3 1% dapat dilihat pada Tabel 7 dan Gambar 17. Konsentrasi asam kojat yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 8.

7. Analisis Kualitatif dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis

a) Pembuatan larutan dan spektrum serapan standar asam kojat

Spektrum serapan spektrofotometri UV dari standar asam kojat dengan konsentrasi 25,20 ppm menunjukkan panjang gelombang maksimum pada 268 nm dengan serapan sebesar 1,35349. Spektrum

serapan spektrofotometri UV dari standar asam kojat dapat dilihat pada Gambar 18.

b) Pembuatan spektrum serapan asam kojat dalam kultur fermentasi

Spektrum serapan spektrofotometri UV dari sampel asam kojat menunjukkan panjang gelombang maksimum pada 268 nm. Data selengkapnya mengenai panjang gelombang maksimum dan serapan sampel asam kojat hasil fermentasi tahap II dapat dilihat pada Tabel 9. Perbandingan spektrum serapan standar asam kojat dengan sampel asam kojat hasil fermentasi tahap II dapat dilihat pada Gambar 19.

8. Analisis Kualitatif dengan Metode Spektrokolorimetri

a) Pembuatan larutan dan spektrum serapan standar asam kojat

Spektrum serapan spektrokolorimetri dari standar asam kojat dengan konsentrasi 104,0 ppm menunjukkan panjang gelombang maksimum pada 493 nm dengan serapan sebesar 0,67327. Spektrum serapan spektrokolorimetri dari standar asam kojat dapat dilihat pada Gambar 20.

b) Pembuatan spektrum serapan asam kojat dalam kultur fermentasi

Spektrum serapan spektrokolorimetri dari sampel asam kojat tidak tampak jelas sehingga tidak dapat diketahui panjang gelombang maksimum dan serapannya. Hal ini dikarenakan konsentrasi asam kojat yang dihasilkan terlalu sedikit.

B. PEMBAHASAN

Asam kojat (5-hidroksi-2-(hidroksimetil)-1,4-piron) merupakan metabolit sekunder yang banyak diproduksi oleh spesies jamur dari genus *Aspergillus* dan *Penicillium* melalui proses fermentasi dalam kondisi aerob. Meskipun dapat diproduksi secara sintesis, asam kojat banyak diproduksi melalui proses fermentasi karena asam kojat yang dihasilkan melalui proses tersebut relatif bersih dari produk sampingan. Selain itu proses fermentasi dan isolasinya relatif sederhana. Upaya peningkatan produksi asam kojat saat ini terfokus pada optimasi kondisi fermentasi sehingga dapat dihasilkan asam kojat dalam jumlah maksimum.

Pada penelitian ini dilakukan optimasi kondisi fermentasi berupa optimasi sumber nitrogen pengganti *yeast extract* dan optimasi aerasi dengan variasi volume medium fermentasi.

Kapang yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Aspergillus flavus* galur NTGA7A4UVE10. Galur ini dipilih karena berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui memiliki pertumbuhan yang paling baik

dalam medium dedak padi pandan wangi. Dedak padi pandan wangi pun dipilih sebagai sumber nitrogen pengganti *yeast extract* karena berdasarkan penelitian sebelumnya dengan menggunakan pembanding dedak beras merah dan dedak padi IR-64, dedak pandan wangi menghasilkan konsentrasi asam kojat tertinggi (13). Padi pandan wangi memiliki kandungan nutrisi lebih banyak dibandingkan beras merah dan padi IR-64. Hal ini dikarenakan padi pandan wangi memiliki masa tanam yang lebih lama yaitu 180 hari dibandingkan beras merah (100 hari) dan padi IR-64 (93 hari). Selain itu padi pandan wangi mengalami pemupukan tiga kali, sementara beras merah dan padi IR-64 hanya mengalami pemupukan dua kali (13). Sebagai langkah awal dari penelitian ini dilakukan peremajaan mutan *Aspergillus flavus* galur NTGA7A4UVE10 di dalam medium PDA. Tujuan peremajaan ini untuk mengaktifkan kembali sel kapang yang telah memasuki masa istirahat, karena sebelumnya disimpan dalam lemari es untuk menghentikan pertumbuhannya. *Aspergillus flavus* NTGA7A4UVE10 diremajakan dalam medium PDA yang berupa agar miring dalam *slant*. Medium PDA yang dihasilkan berwarna putih. Hasil dari peremajaan ini diperoleh koloni kapang berwarna hijau setelah 7 hari pada permukaan PDA. Sementara itu warna medium PDA berubah menjadi putih kekuningan. Hal ini yang membedakan antara galur NTGA7A4UVE10 dengan galur M3B7F7E8.

Kapang *Aspergillus flavus* galur NTGA7A4UVE10 yang telah diremajakan selama 7 hari kemudian diinokulasi dalam medium YES. Medium YES merupakan campuran *yeast extract* 10 g dan sukrosa 5 g

dalam 1000 ml akuades, larutan yang diperoleh berwarna kuning jernih. Inokulasi ini bertujuan untuk memperoleh jumlah dan kualitas inokulum yang optimum sehingga cepat memasuki fase pertumbuhan eksponensial ketika dilakukan fermentasi dan cepat menghasilkan metabolit sekunder. Untuk memperoleh kondisi inokulasi yang optimum dilakukan optimasi terhadap masa inokulasi dengan menggunakan tiga perbedaan waktu, yaitu 18 jam, 24 jam dan 30 jam. Setelah inokulasi dilakukan pengamatan terhadap bobot sel kering dari kapang sehingga dapat diketahui waktu inokulasi yang dapat menghasilkan biomassa sel lebih banyak. Semakin banyak biomassa sel akan semakin banyak menghasilkan metabolit sekunder, dalam hal ini asam kojat. Hasil yang diperoleh yaitu masa inokulasi 30 jam menghasilkan bobot sel kering paling tinggi, sebesar 26,45 g/L. Waktu inokulasi 30 jam ini kemudian digunakan untuk tahap fermentasi selanjutnya.

Pada fermentasi tahap I dilakukan optimasi medium dengan menggunakan variasi asam amino sebagai pelengkap dedak padi untuk menggantikan *yeast extract*. Penggunaan dedak padi pandan wangi bertujuan untuk mengganti sumber nitrogen yang biasa digunakan yaitu *yeast extract* untuk meningkatkan efisiensi fermentasi asam kojat karena dedak padi pandan wangi lebih mudah didapat dan lebih murah dibandingkan dengan *yeast extract*. Asam amino yang digunakan dalam penelitian ini yaitu L-triptofan, L-arginin HCl, L-lisin HCl, L-asam glutamat dan L-valin. Pemilihan penggunaan asam amino tersebut berdasarkan hasil optimasi penelitian sebelumnya, yaitu dengan melihat hasil bobot sel

kering. Dalam penelitian ini asam amino tersebut ditambahkan dalam medium untuk meningkatkan nutrisi yang terkandung dalam dedak padi pandan wangi sehingga fermentasi memberikan hasil yang optimum. Fermentasi tahap pertama ini menggunakan 3 ml medium dalam tabung reaksi yang ditambahkan 300 μ l inokulum (10% v/v). Fermentasi dilakukan selama 12 hari pada suhu 28⁰C dengan pengocokan 180 rpm. Waktu fermentasi selama 12 hari adalah waktu fermentasi yang umum dilakukan untuk menghasilkan asam kojat. Pada hari tersebut biasanya telah terbentuk kadar asam kojat yang cukup tinggi, namun tidak menutup kemungkinan bahwa setelah hari tersebut masih terdapat asam kojat yang dihasilkan.

Setelah fermentasi selesai dilakukan pengamatan terhadap biomassa sel dan skrinning dengan FeCl₃ 1%. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa biomassa sel yang dihasilkan oleh tiap medium tidak sama. Sementara itu hasil skrinning dengan larutan FeCl₃ 1% menunjukkan bahwa medium yang digunakan cukup baik untuk fermentasi dalam menghasilkan asam kojat. Untuk dapat mengetahui konsentrasi asam kojat yang dihasilkan maka dilakukan penetapan kadar dengan KLT densitometri terhadap seluruh sampel.

Deteksi asam kojat menggunakan lampu D2 & W sebab asam kojat memiliki serapan pada panjang gelombang UV-Vis, yaitu pada 200-800 nm. Campuran kloroform–metanol (2:1) digunakan untuk melarutkan filtrat yang telah dikeringkan karena memiliki sifat dari pelarut yang ideal untuk KLT, yaitu mudah menguap, memiliki viskositas rendah sehingga

mudah ditotolkan dan dapat melarutkan sampel dengan baik. Campuran toluen-etil asetat-asam format (3:6:1) digunakan sebagai eluen karena berdasarkan penelitian sebelumnya telah terbukti bahwa kombinasi dan komposisi pelarut tersebut dapat memisahkan asam kojat dengan baik dan memiliki Rf yang memenuhi syarat untuk analisis kuantitatif yaitu antara 0,30-0,70.

Untuk perhitungan konsentrasi asam kojat yang dihasilkan kultur fermentasi diperlukan kurva kalibrasi yang diperoleh dari larutan standar asam kojat dalam kloroform-metanol (2:1) dalam berbagai konsentrasi. Sebelumnya perlu diketahui panjang gelombang maksimum dengan melakukan pengukuran spektrum serapan pada panjang gelombang 200-400 nm dan diperoleh panjang gelombang maksimum pada 312 nm. Panjang gelombang ini yang kemudian digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Berdasarkan kurva kalibrasi yang dibuat diperoleh persamaan regresi linear $y = 1503,303378 + 14,31025567 x$ dengan $r = 0,9994$. Kurva kalibrasi asam kojat dapat dilihat pada Gambar 12.

Berdasarkan data yang diperoleh diketahui bahwa medium fermentasi minimum yang ditambahkan asam amino L-arginin HCl menghasilkan konsentrasi asam kojat paling tinggi yaitu 18,6545 g/L. Hal ini menunjukkan bahwa asam amino tersebut tidak cukup terdapat dalam dedak padi pandan wangi sehingga harus ditambahkan supaya kandungan nutrisinya dapat setara dengan kandungan nutrisi *yeast extract*. Berdasarkan data biomassa sel dan konsentrasi asam kojat dapat dilihat pula bahwa medium *yeast extract* dapat menghasilkan biomassa

sel yang banyak tetapi menghasilkan konsentrasi asam kojat yang rendah. Hal ini dikarenakan biomassa sel telah memenuhi seluruh medium dan menggunakan sukrosa untuk pertumbuhan sel sehingga sukrosa yang digunakan untuk menghasilkan asam kojat hanya sedikit.

Sebelum melanjutkan ke tahap fermentasi kedua dilakukan fermentasi menggunakan medium terpilih yang mengandung asam amino L-arginin HCl dan medium pembanding dengan volume medium 100 ml. Medium pembanding yang digunakan adalah medium fermentasi yang mengandung *yeast extract* dan medium fermentasi minimum. Medium *yeast extract* digunakan karena medium tersebut umum digunakan untuk fermentasi asam kojat dan dapat menghasilkan asam kojat dengan konsentrasi tinggi. Sementara itu, medium fermentasi minimum digunakan sebagai medium pembanding untuk melihat apakah ada perbedaan konsentrasi asam kojat yang signifikan dengan adanya penambahan asam amino. Kondisi fermentasi yang digunakan sama seperti kondisi sebelumnya yaitu inkubasi selama 12 hari pada suhu 28°C dengan pengocokan 180 rpm.

Setelah proses fermentasi selesai sampel disaring dan disentrifugasi untuk memperoleh filtrat jernih yang bebas dari biomassa sel. Setelah itu dilakukan pengamatan terhadap bobot sel kering dan skrinning dengan larutan FeCl₃ 1%. Hasil yang diperoleh ternyata berbeda dengan hasil dari fermentasi sebelumnya. Jika pada fermentasi sebelumnya asam kojat yang dihasilkan dalam medium *yeast extract* hanya sedikit, pada volume medium 100 ml ini asam kojat yang dihasilkan

oleh medium *yeast extract* paling tinggi dibandingkan dengan asam kojat yang dihasilkan oleh medium fermentasi minimum dengan atau tanpa L-arginin HCl yaitu sebesar 10,4945 g/L. Sementara itu biomassa sel yang dihasilkan tidak memenuhi seluruh medium seperti yang terdapat pada tahapan fermentasi awal. Adanya bagian medium yang tidak dipenuhi biomassa sel menunjukkan bahwa sukrosa tidak sepenuhnya digunakan untuk pertumbuhan sel kapang tetapi digunakan untuk biosintesis asam kojat.

Sementara itu konsentrasi asam kojat yang dihasilkan oleh medium fermentasi minimum lebih kecil jika dibandingkan dengan adanya penambahan asam amino L-arginin HCl. Hal ini menunjukkan bahwa L-arginin HCl dapat melengkapi kebutuhan nutrisi yang tidak terdapat pada dedak padi pandan wangi. Asam kojat yang dihasilkan oleh medium fermentasi minimum adalah 7,0431 g/L sedangkan asam kojat yang dihasilkan oleh medium fermentasi minimum dengan penambahan asam amino L-arginin HCl adalah 7,9283 g/L. Hal ini menunjukkan terdapat perbedaan yang cukup signifikan dari penggunaan asam amino L-arginin HCl untuk produksi asam kojat. Medium fermentasi minimum dengan penambahan L-arginin HCl digunakan untuk medium fermentasi tahap II.

Pada fermentasi tahap II dilakukan optimasi aerasi dengan menggunakan variasi volume medium untuk melihat apakah peningkatan volume medium yang digunakan sebanding dengan peningkatan asam kojat yang dihasilkan. Namun pada tahap ini masih terdapat keterbatasan aerasi karena hanya menggunakan empat variasi volume medium

fermentasi. Selain itu Erlenmeyer yang digunakan adalah Erlenmeyer biasa dan tidak memiliki tonjolan pipih pada bagian dasar Erlenmeyer sehingga aerasi yang diperoleh hanya bergantung pada kecepatan *shaker* dan jumlah udara yang dapat masuk melalui penutup kapas. Jika menggunakan Erlenmeyer dengan tonjolan pipih, larutan akan terpecah saat diputar dan akan menyatu kembali sehingga akan lebih banyak menangkap oksigen yang dibutuhkan untuk pertumbuhan kapang.

Pada tahap ini digunakan Erlenmeyer 250 ml sebagai bioreaktor untuk fermentasi medium 100 ml dengan pengocokan 180 rpm dan Erlenmyer 1000 ml sebagai bioreaktor untuk fermentasi medium 300 ml, 400 ml dan 500 ml dengan pengocokan 150 rpm selama 12 hari pada suhu 28°C. Setelah proses fermentasi dilakukan penyaringan terhadap filtrat sehingga diperoleh larutan berwarna kuning. Supernatan yang diperoleh digunakan untuk penetapan kadar dengan KLT densitometri dan untuk ekstraksi dan pemurnian isolat asam kojat. Ternyata konsentrasi asam kojat yang diperoleh dalam Erlenmeyer 1000 ml jauh dari harapan karena dari volume medium 300 ml hanya menghasilkan 1,8824 g/L asam kojat, dari volume medium 400 ml hanya menghasilkan 1,3311 g/L asam kojat, dan dari volume medium 500 ml hanya menghasilkan 0,3569 g/L asam kojat. Semakin banyak volume medium yang digunakan semakin sedikit asam kojat yang dihasilkan. Sementara itu jika dibandingkan fermentasi menggunakan volume medium 100 ml dalam Erlenmeyer 250 ml diperoleh konsentrasi asam kojat yang lebih tinggi yaitu 7,9283 g/L. Hal ini menunjukkan bahwa fermentasi dalam Erlenmeyer 1000 ml tidak

menghasilkan aerasi yang optimum. Bila dibandingkan antara Erlenmeyer 1000 ml dengan Erlenmeyer 250 ml, kedua wadah tersebut memiliki besar mulut yang hampir sama sehingga jumlah oksigen dari udara bebas yang dapat keluar masuk wadah hampir sama. Tetapi rongga kosong di dalam Erlenmeyer 1000 ml lebih besar sehingga oksigen yang terdapat di dalamnya kurang cukup memenuhi kebutuhan oksigen kapang dalam medium. Sementara itu dalam Erlenmeyer 250 ml terdapat rongga kosong yang tidak terlalu besar sehingga oksigen yang terdapat di dalamnya cukup memenuhi kebutuhan oksigen kapang dalam medium.

Dalam penggunaan Erlenmeyer 1000 ml ternyata volume media 300 ml menghasilkan asam kojat yang lebih banyak dibandingkan volume media 400 ml dan 500 ml. Hal ini dikarenakan volume media 300 ml dalam Erlenmeyer 1000 ml memberikan luas permukaan media yang lebih besar sehingga semakin banyak kapang yang terdapat di permukaan media yang dapat memenuhi kebutuhan oksigen. Fermentasi asam kojat oleh *Aspergillus flavus* merupakan fermentasi aerob, sehingga kebutuhan oksigen sangat penting. Jika kapang tidak dapat memperoleh oksigen yang cukup untuk pertumbuhannya maka metabolit sekunder yang dihasilkan pun tidak sesuai dengan harapan. Adanya keterbatasan dalam variasi aerasi mengakibatkan hasil yang diperoleh adalah hasil sementara. Tidak tertutup kemungkinan variasi volume media yang lebih beragam dalam Erlenmeyer 250 ml dan Erlenmeyer 1000 ml menghasilkan konsentrasi asam kojat yang lebih tinggi.

Hasil fermentasi tahap II juga dianalisis secara kualitatif menggunakan spektrofotometer UV karena struktur asam kojat memiliki gugus kromofor sehingga memberikan serapan pada daerah panjang gelombang ultraviolet yaitu 200-400 nm. Spektrum yang diperoleh dibandingkan dengan spektrum serapan asam kojat untuk mengetahui apakah panjang gelombang maksimum yang diperoleh sesuai dengan standar. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa spektrum serapan asam kojat dalam kultur fermentasi sama dengan spektrum serapan standar asam kojat dengan panjang gelombang maksimum yang sama yaitu 268 nm. Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa sampel dalam kultur fermentasi teridentifikasi mengandung asam kojat.

Analisis kualitatif menggunakan spektrokolorimetri juga dilakukan dengan penambahan larutan FeCl_3 1% karena asam kojat membentuk kompleks berwarna merah jingga dengan ion Fe^{3+} , sehingga intensitas warna kompleks yang terbentuk dapat dideteksi pada daerah panjang gelombang tampak (*visible*). Standar asam kojat menunjukkan pola spektrum serapan dengan panjang gelombang 493 nm. Namun sampel asam kojat dari kultur fermentasi tidak menunjukkan adanya spektrum serapan karena asam kojat yang dihasilkan hanya sedikit sehingga tidak dapat terdeteksi secara spektrokolorimetri.