

ISBN : 978-602-9030-49-5

PROSIDING

Bidang: Mikrobiologi dan Keamanan Pangan

SEMINAR NASIONAL PATPI 2013

“Peran Teknologi Dan Industri Pangan Untuk Percepatan
Tercapainya Kedaulatan Pangan Indonesia”

Disponsori Oleh:  | PT. TIGA PILAR SEJAHTERA FOOD Tbk.

HOTEL ASTON
Jember | 26-29 Agustus 2013



SEMINAR NASIONAL
PATPI 2013



Disponsori Oleh:





PT. TIGA PILAR SEJAHTERA FOOD Tbk.

www.tigapilar.com

Diselenggarakan Oleh:



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN SPONSOR.....	ii
PENDAHULUAN.....	iii
DAFTAR ISI.....	iv
KATA PENGANTAR.....	xx
SAMBUTAN KETUA PATPI PUSAT.....	xxi
SAMBUTAN KETUA PATPI JEMBER.....	xxiii
PIHAK PENYELENGGARA.....	xxv
ORAL BIDANG KAJIAN MIKROBIOLOGI DAN KEAMANAN PANGAN (KODE M).....	1
Aplikasi Teknologi Mikroemulsi Dalam Industri Pangan Indonesia: Potensi Dan Regulasinya (<i>Application Of Microemulsion Technology In The Indonesian Food Industry: Potency And Its Regulations</i>) Ambar Rukmini.....	1
Pengaruh Perendaman Chips Singkong Menggunakan Starter Bakteri Asam Laktat Pada Pembuatan Tepung Mocaf Asep Nurhikmat.....	13
Optimasi Produksi Angkak Sebagai Pewarna Alami Merah Tinggi Lovastatin (<i>Optimization Production Of Angkak As Natural Colorants With High Level Lovastatin</i>) Medicia Kartawijaya.....	21
Ekstraksi Dan Evaluasi Sifat Prebiotik <i>Pectic Polysaccharides</i> (Pp) Dari Kulit Pisang Nurhayati.....	34
Morfologi <i>Aspergillus Oryzae</i> 3087 Selama Produksi Enzim Protease Alkali Dalam Media Cair Riska Rian Fauziah.....	45

Jember, 20-25 Agustus 2011

MORFOLOGI *Aspergillus oryzae* 3087 SELAMA PRODUKSI ENZIM PROTEASE ALKALI DALAM MEDIA CAIR

Riska Rian Fauziah^{1*}, Yuwapin Dandusitapunth²

¹Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember,
Jember, Indonesia,

²School of Bioresources and Technology, Biotechnology Division, King Mongkut's University
of Technology Thonburi, Bangkok, Thailand

*Koresponden Autor: fauziah.rr@gmail.com/085649757168

Abstrak

Aspergillus oryzae 3087 merupakan wild type strain kapang penghasil enzim protease alkali. Penelitian kali ini, kapang ditumbuhkan dalam medium cair untuk mengamati pertumbuhan dan produktivitasnya dalam menghasilkan enzim protease. Proses fermentasi dilakukan di dalam fermentor kapasitas 2 L yang didalamnya terdapat medium sebanyak 1.5 L dan dioperasikan dengan suhu 30°C, tekanan 1.0 vvm, agitasi 700 rpm dan tidak ada pengontrolan pH selama proses. Objek dari penelitian ini adalah untuk mengamati pertumbuhan *A. oryzae* yang meliputi jumlah biomassa dan morfologi serta aktivitas protease alkali yang dihasilkan. Hasil yang diperoleh menunjukkan jumlah biomassa sebanyak 5,25 g/L dengan aktivitas protease sebesar 726,15 U/mL serta morfologi yang berwujud berbentuk filamen dan pellet dengan diameter pellet maksimum 388,96 µm. Selama proses pertumbuhan, terjadi fenomena fragmentasi, pembentukan spora dan autolisis.

Kata kunci : *Aspergillus oryzae* 3087, morfologi, protease alkali

PENDAHULUAN

Enzim protease merupakan enzim yang potensial dan penggunaannya mencapai 10% dari berbagai jenis enzim yang tersedia di pasaran. Aplikasi enzim protease dalam industri sangat luas, misalnya digunakan dalam industri pangan, farmasi, detergen, kimia dan industri kulit. Sebagian besar industri membutuhkan enzim protease yang aktif dalam kondisi alkali dan sumber utama untuk menghasilkan protease alkali adalah mikroba, baik dari bakteri, jamur dan kapang (Rao et al., 1998).

Aspergillus oryzae merupakan salah satu mikroba penghasil enzim protease, kapang ini tidak menghasilkan aflatoxin sehingga digolongkan mikroba yang aman digunakan untuk industri pangan oleh badan kesehatan dunia (WHO) (Ward et al., 2006). Rao et al. (1998) menyebutkan bahwa *A. oryzae* dapat menghasilkan protease alkali, asam dan netral.

Produksi enzim protease dengan menggunakan mikroba dapat dilakukan dalam media padat (*solid state fermentation*) maupun media cair (*submerged fermentation*). Pada umumnya produksi enzim protease di industri menggunakan media cair karena lebih mudah dalam menyiapkan media, pengontrolan kondisi fermentasi dan *recovery* produk (Imanaka et al., 2010). Begitu pula produksi protease oleh *A. oryzae*, dapat menggunakan media cair dan biomassa enzim yang dihasilkan bersifat ekstraseluler (Biesebeke et al., 2002).

Fermentasi kapang dalam media cair akan menghasilkan inokulum yang berbentuk filamen bebas, filamen bercabang, dan dapat pula beraglomerasi membentuk gumpalan (*clump*) dan butiran (*pellet*) (Cui et al., 1997; Papagiani, 2004). Ukuran dari masing-masing inokulum tersebut dapat berbeda-beda tergantung kondisi fermentasi yang digunakan (Nishimichi et al., 1990; Cox et al., 1998).

Keberadaan filamen di dalam kultur media akan meningkatkan viskositas media, sehingga dibutuhkan agitasi yang lebih besar untuk menstabilkan media dan aerasi. Sebaliknya, kultur yang mengandung pellet viskositasnya lebih rendah sehingga energi yang dibutuhkan lebih sedikit (Pazouki and Panda, 2000). Oleh karena itu, inokulum yang berbentuk pellet lebih banyak digunakan dalam fermentasi media cair (Paul and Thomas, 1998), seperti yang dilakukan dalam penelitian ini.

Faktor yang mempengaruhi morfologi kapang selama fermentasi antara lain kondisi fermentasi, jumlah inokulum, tipe inokulum (spora atau sel vegetatif), dan umur inokulum. Ukuran inisial inokulum inilah yang sangat mempengaruhi morfologi selama proses fermentasi (Papagiani, 2004). Oleh karena itu, dalam penelitian ini diamati pertumbuhan *A. oryzae* yang meliputi jumlah biomassa dan morfologi serta aktivitas protease alkali yang dihasilkan.

MATERI DAN METODE

Strain Mikroba

Penelitian ini menggunakan *wild type* strain *A. oryzae*3087 yang diperoleh dari Thailand Institute of Scientific and Technological Research. Kapang tersebut ditumbuhkan dalam media Malt Extract Agar (MEA) pada suhu 30°C selama 5 hari, kemudian konidiosporanya (berwarna hijau) disuspensikan dalam larutan tween 80 normal saline 0.025% (v/v). Selanjutnya suspensi tersebut digunakan sebagai stok spora inokulum dalam tahap selanjutnya.

Inokulum

Inokulum yang digunakan di dalam fermentor adalah pelet, yang diperoleh dari inokulasi 1×10^8 spora ke dalam tabung Erlenmeyer yang berisi 50 mL kompleks media. Inokulum tersebut diinkubasi dalam shaker waterbath pada suhu 30 °C, agitasi 250 rpm selama sehari, kemudian 150 mL pelet inokulum diinokulasikan ke dalam fermentor yang berisi 1,5 L kompleks media (10%, v/v).

Kondisi Fermentasi

Proses fermentasi dilakukan dalam fermentor yang berkapasitas 2 L, namun pada saat proses menggunakan kompleks media dengan volume of 1.5 L, yang terdiri dari 10 g/L *defatted soybean*, 5 g/L *lactosa*, 5 g/L KH_2PO_4 dan 1 g/L *casitone*. Fermentor tersebut dioperasikan dengan suhu 30°C, aerasi 1.0 vvm, agitasi 700 rpm dengan pH inisial 5.0 dan tidak ada pengontrolan pH selama proses.

Metode Analisa

Protease alkali ditentukan dengan mengikuti metode Anson's (Anson, 1938).

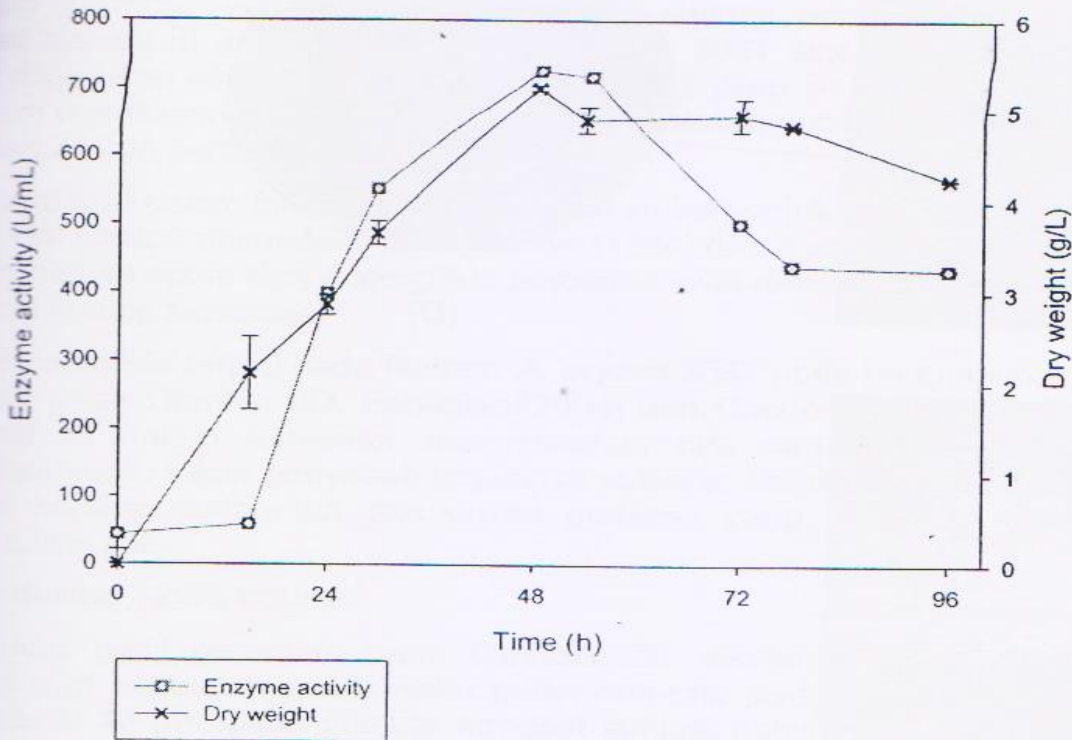
Jumlah sel kering kapang ditentukan dengan mengikuti metode Cui *et al.* (1998) yang menggunakan NaCl.

Diameter pellet ditentukan dengan menggunakan Mikroskop Olympus seri BX51 dan Olympus Automatic Exposure Photo Micrographic System Model PM-10 AK.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Jumlah sel kering dan aktivitas enzim protease alkali

Selama fermentasi, jumlah sel kering dan enzim yang dihasilkan diamati setiap 24 jam. Hasil yang diperoleh seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.

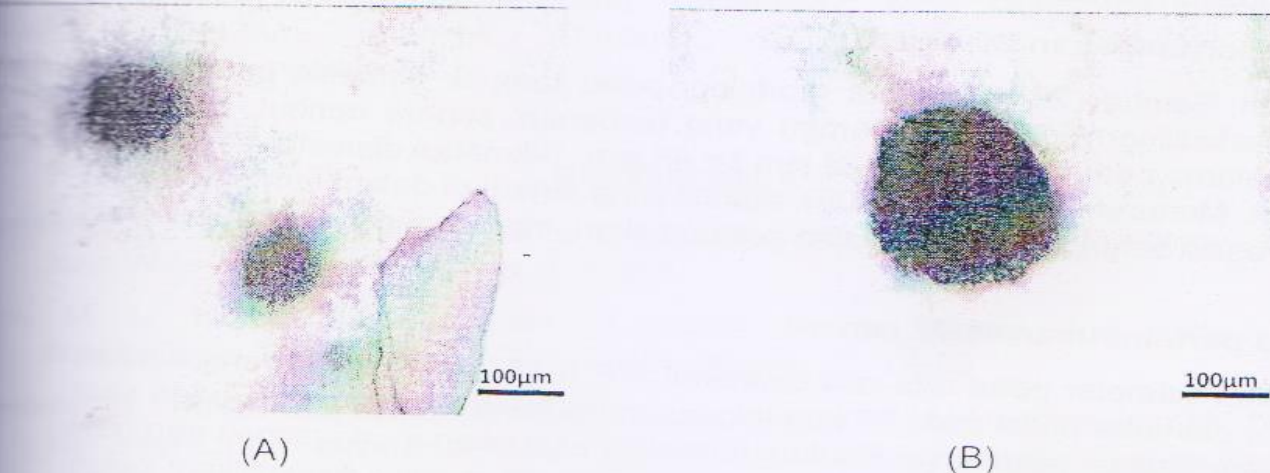


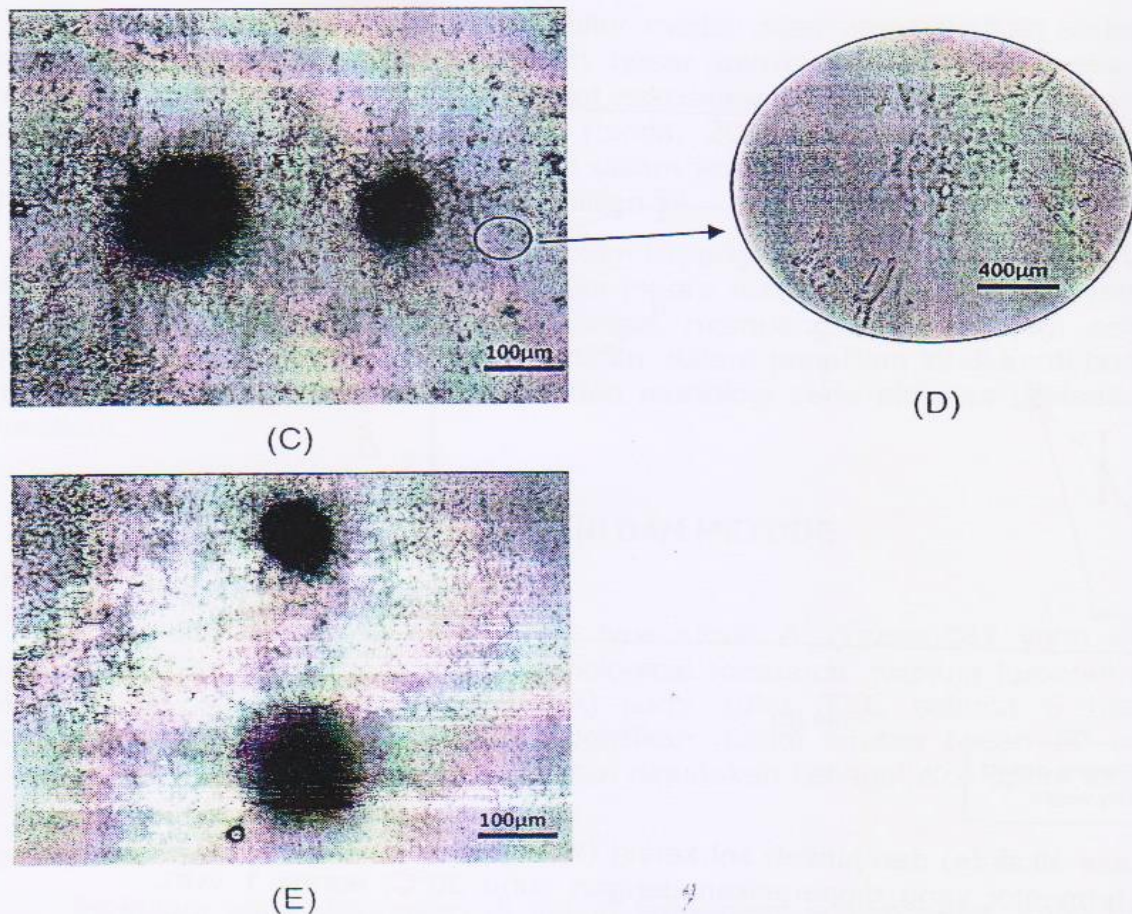
Gambar 1. Aktivitas protease alkali (■) dan jumlah sel kering (x) kultur *A. oryzae*3087 yang ditumbuhkan dalam 2-L fermentor yang dioperasikan dengan suhu 30°C, aerasi 1 vvm, rpm 700 dan tidak ada pengontrolan pH selama fermentasi

Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa peningkatan jumlah biomasa diikuti dengan meningkatnya aktivitas protease alkali. Jumlah sel kering optimal diperoleh saat fermentasi berjalan 48 jam dengan jumlah 5.25 ± 0.03 g/L dan aktivitas protease 720 ± 0.00 U/mL. Setelah 48 jam jumlah sel kering dan aktivitas protease menurun, hal ini disebabkan karena kandungan nutrisi di dalam media telah menurun seperti yang dikemukakan Siamartarnet *et al.*, (1999). Berdasarkan hasil ini diketahui bahwa produksi enzim protease oleh *A. oryzae* berbanding lurus dengan pertumbuhannya, hasil yang sama juga diperoleh dalam penelitian Kumar and Takagi (1999); Wang *et al.* (2005); Srinubabuet *et al.* (2008); Sabekeet *et al.* (2002) dan Devi *et al.*, 2008.

Morfologi *A. oryzae*3087 selama proses fermentasi

Inokulum yang digunakan dalam penelitian ini berbentuk pellet yang berumur 24 jam dengan diameter rata-rata 280.77 ± 38.03 μm. Selama proses fermentasi morfologi pellet tersebut diamati dan hasil yang diperoleh seperti pada Gambar 2 berikut:





Gambar 2. Morfologi *A. oryzae* 3087 pada pertumbuhan 24 (A), 48 (B), 72 (C), terjadinya autolisis (D) dan 96 jam (E) dalam 2-L fermentor yang dioperasikan dengan suhu 30°C, aerasi 1 vvm, agitasi 700 rpm dan tidak ada pengontrolan pH selama fermentasi [perbesaran 100X, kecuali (D) = 400X]

Morfologi selama pertumbuhan 0-24 jam

Berdasarkan Gambar 2A, dapat diamati bahwa morfologi *A. oryzae* di dalam kultur tersebut berupa pellet yang pada bagian tengahnya tampak padat dan disekelilingnya terdapat filamen yang berbentuk seperti rambut. Diameter rata-rata pellet tersebut $291.83 \pm 73.20 \mu\text{m}$. Selama 24 jam pertumbuhan, diketahui diameter pellet tersebut meningkat dari ukuran sebelumnya (ukuran inokulum awal $280.77 \pm 38.03 \mu\text{m}$). Fomina and Gadd (2002), menyatakan bahwa morfologi pellet ini terbentuk karena adanya agregasi dari satu atau gabungan beberapa spora. Keberadaan padatan dalam media juga memicu terbentuknya pellet (Liu *et al.*, 2008). Pada penelitian ini keberadaan *defatted soybean* dalam media diduga merupakan pemicu terbentuknya pellet.

Morfologi selama pertumbuhan 24-48 jam

Berdasarkan Gambar 2B., diketahui morfologi pellet tampak semakin padat pada bagian inti dan disekelilingnya terdapat filamen yang berbentuk seperti rambut. Diameter pellet meningkat selama pertumbuhan dari 24 jam ke 48 jam. Diketahui diameter pellet rata-rata $388.96 \pm 35 \mu\text{m}$. Menurut Oncu *et al.* (2006), agitasi yang terjadi di dalam fermentor akan menyebabkan agregasi sehingga semakin lama pertumbuhan, morfologi pellet akan semakin padat.

Morfologi selama pertumbuhan 48-72 jam

Pada saat ini diameter pellet rata-rata diketahui $278.16 \pm 87 \mu\text{m}$. Seperti yang tampak pada Gambar 2C., diameter pellet pada 72 jam ini ukurannya lebih kecil daripada pada saat pertumbuhan 48 jam. Agitasi yang besar didalam fermentor juga akan mengganggu agregasi hifa sehingga semakin lama pertumbuhan, filamen seperti rambut yang mengelilingi pellet

terlepas. Hasil serupa juga ditemui dalam penelitian Oncu *et al.*, (2006) yang mengamati pertumbuhan *A. sojae* dalam memproduksi enzim pektinase.

Dalam Gambar 2C, juga dapat diamati adanya spora dalam kultur. Hal ini menunjukkan bahwa di dalam media cair *A. oryzae* 3087 juga mengalami sporulasi. Hal ini juga ditemukan oleh Galbraith and Smith (1996), yang meneliti tentang pertumbuhan jamur. Dalam penelitiannya, diketahui bahwa pembentukan spora oleh *A. niger* terjadi pada saat 48 dan 72 jam pertumbuhan.

Spora yang terdapat dalam kultur dalam penelitian ini berbentuk oval dengan diameter rata-rata 4-7 μm . Hal serupa ditemukan oleh Wicklow (1984) dan Alexopoulos *et al.* (1996), yang menyebutkan bahwa spora dari *Aspergillus* berbentuk oval dengan diameter antara 4-8 μm , berwarna kuning kehijauan.

Proses autolisis terjadi pada filamen *A. oryzae* 3087 pada pertumbuhan 72 jam. Hal ini ditunjukkan pada Gambar 2D. Papagiani(2004) dan Oncu *et al.* (2006) mengemukakan bahwa agitasi di dalam fermentor menyebabkan hifa dan micelium terputus dan ini merupakan salah satu faktor penyebab terjadinya autolisis. Selain itu, autolisis diduga terjadi karena umur kapang sudah tua dan enzim protease yang dihasilkan oleh kapang ini menyebabkan lisis sel.

Morphology during 72-96 hours

Berdasarkan hasil penelitian pada Gambar 2E, diketahui bahwa diameter pellet semakin kecil dari sebelumnya. Diameter pellet rata-rata pada saat pertumbuhan 96 jam adalah $264.48 \pm 34.13 \mu\text{m}$. pada gambar tersebut tampak bahwa kepadatan pellet semakin menurun dan filamen seperti rambut yang mengelilinginya sudah tidak terlihat lagi. Hal ini merupakan karakteristik terjadinya autolisis (Park *et al.*, 2002). Jumlah spora di dalam kultur semakin banyak.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa produksi enzim protease oleh *A. oryzae* 3087 berbanding lurus dengan pertumbuhannya, dimana mencapai titik optimum pada saat pertumbuhan 48 jam. Selama proses fermentasi dalam media cair, morfologi yang diamati berbentuk pellet dengan dikelilingi filamen yang menyerupai rambut. Autolisis dan pembentukan spora oleh kapang ini terjadi pada saat pertumbuhan 72 jam. Berdasarkan hasil penelitian perlu dilakukan penelitian lebih jauh mengenai mekanisme terjadinya sporulasi oleh *A. oryzae* 3087 di dalam medium cair.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Beasiswa Unggulan Dikti; Fermentation Laboratory, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, Thailand; dan Universitas Brawijaya Malang sebagai pendukung dalam penelitian ini.

REFERENCES

- Alexopoulos, C. J., C. W. Mims and B. Blackwell, 1996, *Introductory Mycology*, Canada, John Willey and Sons. Inc., pp. 311-319.
- Allen, M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin. *The Journal of General Physiology*. 22: 79-89.
- Beekun, R., Ruijter, G., Rahardjo Y.S.P., Hoogschagen M. J., Heerikhuisen M., Levin A., van Driel K.G.A., Schutyser M.A.I., Dijksterhuis J., Zhu Y., Weber F.J., de Vos W.M.,

- van den Hondel K.A.M.J.J., Rinzema A. and Punt P.J. 2002. *Aspergillusoryzae* in solid-state and submerged fermentations: Progress report on a multi-disciplinary project. *FEMS Yeast Research*. 2: 245-248.
- Cox, P. W., G. C. Paul and C. R. Thomas, 1998, Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms, *Microbiology*, Vol. 144, pp. 817-827.
- Cui Y. Q., Ouwehand J. N. W., van der Lans R. G. J. M., Giuseppin M. L. F., and Luyben K. C. A. M. 1998. Aspects of the use of complex media for submerged fermentation of *Aspergillusawamori*. *Enzyme and Microbial Technology*. 23:168-177.
- Devi, M. K., Bhanu A. R., Gnanaprabal G. R., Pradeep B. V. and Palaniswamy M. 2008. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillusniger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian Journal of Science and Tehnology*. 1 (7): 1-6.
- Fomina, M and G. M. Gadd, 2002, Influence of clay minerals on the morphology of fungal pellets, *Mycological Research*, Vol. 106, pp. 107-117.
- Galbraith, G. C. And Smith, J. E., 1996, Filamentous growth of *Aspergillusniger* in submerged shake culture, *Transactions of The British Mycological Society*, Vol. 52, pp. 237-246.
- Imanaka, H., S. Tanaka, B. Feng, K. Imamura and K. Nakanishi, 2010, Cultivation characteristics and gene expression profiles of *Aspergillusoryzae* by membrane-surface liquid culture, shaking-flask culture, and agar-plate culture, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 109, No. 3, pp. 267-273.
- Kumar, C.G., H. Takagi, 1999, Microbial alkaline protease: from a bioindustrial viewpoint, *Biotechnology Advances*, Vol. 17, pp. 561-594.
- Liu, Y., W. Liao and S. Chen, 2008, Study of pellet formation of filamentous fungi *Rhizopusoryzae* using a multiple logistic regression model, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 99, No. 1, pp. 117-128.
- Oncu, S., S. Unluturk, C. Tari, N. Gogus, 2006, Various factors affecting the pellet morphology, broth rheology and pectinase enzyme production in submerged fermentation of *Aspergillussojiae*, 13rd International World Congress of Food Science and Technology [Electronic], Available: <http://iufost.edpsciences.org/> [2010, September, 27].
- Papagiani, M., 2004, Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes, *Biotechnology Advanced*, Vol. 22, pp. 189-259.
- Park, J. P., Y. M. Kim, S. W. Kim, H. J. Hwang, Y. J. Cho, Y. S. Lee, C. H. Song and J. W. Yun, 2002, Effect of agitation intensity on the exo-biopolymer production and mycelial morphology in *Cordycepsmilitaris*, *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 34, pp. 433-438.
- Paul, G. C. and C. R. Thomas, 1998, Characterization of mycelial morphology using image analysis, *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 60, pp. 1-59.
- Pazouki M. and T. Panda, 2000, Understanding the morphology of fungi, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, Vol. 22, pp. 127-43.
- Rao, M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S. and Deshpande V. V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62 (3): 597-635.
- Samarntam, W., Cheevadhanarak S. and Tanticharoen M. 1999. Production of alkaline protease by genetically engineered *Aspergillusoryzae* U1521. *Journal of General and Applied Microbiology*. 45: 99-103.

Murthy, G., N. Lokeswari and K. Jayaraju, 2007, Screening of nutritional parameters for the production of protease from *Aspergillusoryzae*, *E-Journal of Chemistry*, Vol. 4, No. 2, pp. 208-215.

A. P. J., G. D. Robinson, M. G. Weibè, B. Cunliffe and T. W. Naylor, 1990, Growth and morphology of *Fusariumgraminearum* and other fungi in batch and continuous culture, *Microbial Growth Dynamics*, pp. 17-38.

R. R. C. S. Law, C. Webb, 2005, Protease production and conidiation by *Aspergillusoryzae* in flour fermentation, *Process Biochemistry*, Vol. 40, pp. 217-227.

Q. P., W. M. Qin, J. Dhanjoon, J. Ye and A. Singh, 2006, Physiology and biotechnology of *Aspergillus*, *Advances In Applied Microbiology*, vol. 58, pp. 1-55.

D. T., 1984, Conidium germination in wild and domesticated yellow-green *Aspergilli*, *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 299-300.



Sertifikat

Diberikan kepada

RISKA RIAN FAUZIAH, S.Pt., M.P.

Sebagai

PEMAKALAH ORAL

Seminar Nasional PATPI (Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia)

“Peran Teknologi dan Industri Pangan untuk Percepatan Tercapainya Kedaulatan Pangan Indonesia”

Jember, 26 - 29 Agustus 2013

Ketua Umum PATPI

Indonesian Association of Food Technologists

Prof. Dr. Ir. Rindit Pambayun, M.P.

Ketua Panitia Seminar Nasional PATPI 2013

Dr. Ir. Jayus

SEMINAR NASIONAL
PATPI 2013