

KINETIKA PERTUMBUHAN *Aspergillus oryzae* KKB4 PADA SUBSTRAT PADAT SERTA AKTIVITAS ENZIM KASAR EKSTRASELULER UNTUK MEREDUKSI AFLATOKSIN B₁

The Growth Kinetics of *Aspergillus oryzae* KKB4 on Solid State Culture System and the Activity of Crude Extracellular Enzyme on Reducing Aflatoxin B₁

Sardjono¹

ABSTRAK

Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa *Aspergillus oryzae* KKB4, mampu mendegradasi aflatoksin B₁ (AFB₁) dan diketahui bahwa enzim ekstraseluler berperan dalam mendegradasi dan detoksifikasi AFB₁ dengan menggunakan sistem kultur rendam. Fermentasi jamur dengan substrat padat memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan kultur rendam, terutama karena media yang digunakan lebih murah. Hal ini disebabkan karena dapat menggunakan limbah pertanian sebagai media fermentasi. Dalam penelitian ini dilihat kinetika pertumbuhan *Aspergillus oryzae* KKB4 pada substrat padat dan aktivitas enzim kasar ekstraseluler terhadap penurunan AFB₁. Sebagai media fermentasi digunakan dedak steril. Setelah inokulasi, dedak didistribusikan secara aseptis pada cawan petri sebanyak 29-30 gram tiap petri. Inkubasi dilakukan pada suhu 27 °C dan RH 87-95 %. Parameter kinetik yang dipelajari adalah pertumbuhan biomasa yang diukur dengan protein biomasa, viable count, konsentrasi spora, laju produksi CO₂, kehilangan air dan kehilangan bahan kering serta aktivitas total enzim ekstraseluler kasar terhadap AFB₁. Enzim kasar diekstraksi dari dedak terfermentasi dengan menggunakan buffer fosfat 0,05 M. Reaksi degradasi AFB₁ dilakukan pada suhu 30 °C selama 1 jam dengan menggunakan AFB₁ murni sebagai substrat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan biomasa berbeda antara yang diukur dengan viable plate count dan dengan pengukuran protein biomasa. Pada hasil plate count menunjukkan pertumbuhan biomasa terjadi sampai hari ketiga fermentasi dan relatif konstan setelah periode tersebut, sedangkan dengan protein biomasa pertumbuhan terjadi sampai hari kelima fermentasi, dan terus sedikit meningkat pada periode berikutnya dengan maksimum protein biomasa 2,628 mg/g bahan kering. Laju pertumbuhan spesifik adalah 0,022/jam, dan laju produksi CO₂ tertinggi adalah 0,0324 mmol/g/hari dan dicapai pada hari ketiga fermentasi. Aktivitas metabolisme juga ditandai dengan laju kehilangan bahan kering, dengan laju tertinggi pada hari ketiga fermentasi 0,035 g/g bahan kering/hari. Hubungan antara kehilangan bahan kering dengan produksi CO₂ dinyatakan dengan persamaan $y = 1,185x + 0,0079$. Hasil ini menunjukkan bahwa aktivitas metabolik (laju produksi CO₂ dan laju kehilangan bahan kering) dapat dipakai untuk mengukur pertumbuhan biomasa. Aktivitas total enzim ekstraseluler tertinggi juga dicapai pada hari ketiga fermentasi, yakni 1,699 µgAFB₁/ml/jam, atau 0,888 µg AFB₁/g protein biomasa/jam.

Kata kunci: Kinetika pertumbuhan, *Aspergillus oryzae*, substrat padat, aktivitas enzim, aflatoxin B₁

ABSTRACT

Previous research indicated that *Aspergillus oryzae* KKB4 be able to degrade aflatoxin B₁ (AFB₁) and it was found that extracellular enzymes take a role on degrading and detoxify AFB₁ in submerged culture system. Fungal fermentation in solid-state culture more advantage compare to submerged culture system, because of the medium composition is simple and relatively cheaper than submerged culture. Agricultural waste usually used for solid-state culture system for fungal fermentation. The growth kinetics of *Aspergillus oryzae* KKB4 in solid-state culture and its extracellular enzyme activity were observed in this research. Rice bran was used for growth medium. The inoculated rice bran were aseptically distributed over petridishes containing 29-30 g of inoculated rice bran. Incubation was carried out in an incubator at 27 °C and relative humidity of 87-95 %. Kinetic parameters were studied, i.e. biomass, measured by biomass protein and viable plate count method, spore concentration, carbondioxide production rate (CPR), lost of water

and dry matter, and the activity of crude extracellular enzyme againsts AFB1. Crude extracellular enzyme was extracted from fermented rice bran by using 0.05M phosphate buffer and pure AFB1 was used as substrate. The reaction was conducted at 30 °C for 1 hr. It was shown that growth pattern was different between viable plate count and biomass protein. The biomass protein increased until the end of fermentation, and the maximum biomass protein was 2.628 mg/g dry matter. The maximum specific growth rate was 0.022/hr, and the highest carbon dioxide production rate (CPR) was 0.0324 mmole/g/day found in the third day of fermentation. The metabolic activities also be shown by the rate of dry matter lost. The highest rate of dry matter lost also found in the third day of fermentation, and the correlation between dry matter lost and CPR was expressed in equation of $y = 1.185x + 0.0079$. This result indicated that metabolic activities (CPR, lost of dry matter) was able to be used as the growth parameter. The activity of crude extracellular enzyme associated with the fungal growth, and the highest activity was observed in the third day fermentation, it was 1.699 $\mu\text{g AFB1/ml/hr}$; or 0.888 $\mu\text{g AFB1/g biomass protein/hr}$.

Keywords: Growth kinetics, *Aspergillus oryzae*, solid substrate, enzyme activity, aflatoxin B₁

PENDAHULUAN

Indonesia sebagai negara tropis memiliki iklim yang lembab dan panas, memberikan kontribusi pada rawannya cemaran jamur pada pangan. Telah banyak data yang mengungkapkan tingginya cemaran jamur pada pangan di Indonesia serta cemaran mikotoksin pada pangan (Sardjono, 1998; Pitt dkk., 1998; Noorhayati dkk., 1998). Cemaran aflatoksin merupakan cemaran mikotoksin terbanyak di Indonesia, karena tingginya cemaran jamur penghasil aflatoksin (Sardjono, 2005). Mengingat sulitnya pengendalian cemaran jamur dan sifat aflatoksin yang tahan terhadap faktor pengolahan, maka detoksifikasi merupakan alternatif untuk mengupayakan pangan bebas aflatoksin. Detoksifikasi dapat dilakukan secara kimia, namun umumnya memberikan dampak yang kurang menguntungkan karena residu bahan kimia dan pengaruhnya terhadap citarasa pangan yang bersangkutan. Oleh karena itu detoksifikasi secara biologik merupakan salah satu cara yang perlu untuk terus dikembangkan.

Djien (1974) melaporkan bahwa jamur *Rhizopus oligosporus* dan *Neurospora crassa* memiliki kemampuan untuk mereduksi AFB1 pada proses fermentasi, namun tidak ada penjelasan lanjutan tentang peran jamur tersebut dalam detoksifikasi AFB1. Pengungkapan lebih dalam tentang peran jamur tersebut akan meningkatkan pendayagunaan jamur tersebut untuk melakukan detoksifikasi AFB1, yang sangat penting artinya pada masalah peningkatan keamanan pangan di Indonesia.

Telah diteliti bahwa jamur *Aspergillus oryzae* KKB4 yang diisolasi dari koji mampu mereduksi AFB1 pada kultur rendam, dan telah diketahui pula bahwa enzim ekstraseluler yang dihasilkan mampu mereduksi dan mendetoksifikasi AFB1 (Sardjono dkk., 2004a; Sardjono dkk., 2004b). Pengembangan lebih lanjut tentang potensi jamur tersebut sangat besar artinya dalam upaya peningkatan kualitas pangan serta memberikan harapan baru di bidang bioteknologi yang berkaitan dengan masalah keamanan pangan.

Penggunaan substrat padat untuk fermentasi memiliki beberapa keunggulan bila dibandingkan dengan kultur rendam, khususnya bila menggunakan jamur sebagai agensia fermentasi (Doelle dkk., 1992). Beberapa keunggulan di antaranya medium yang digunakan sederhana, produksi metabolit lebih banyak, enzim memiliki toleransi panas yang lebih besar, peluang kontaminasi kecil, untuk konsentrasi substrat yang sama diperlukan bioreaktor yang lebih kecil. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari kinetika pertumbuhan dan aktivitas metabolit yang dihasilkan pada substrat padat untuk digunakan sebagai landasan ilmiah dalam merancang proses fermentasi pada skala yang lebih besar.

METODE PENELITIAN

Mikroorganisme dan Penyiapan Starter

Aspergillus oryzae KKB4 adalah hasil isolasi dari koji (Sardjono dkk., 2004a). Starter disiapkan dengan menggunakan dedak kasar sebagai medium pertumbuhan. Sebanyak 10 gram dedak kasar yang masih baru dimasukkan ke dalam 250 ml erlenmeyer, ditambahkan 10 ml air dan disterilkan pada suhu 121 °C selama 30 menit. Suspensi spora dari kultur *Aspergillus oryzae* KKB4 pada medium PDA umur 7 hari digunakan untuk inokulasi, menggunakan 0,5 ml suspensi spora (10^7 spora /ml). Inkubasi dilakukan pada suhu 25 °C selama 7 hari.

Media, Inokulasi dan Inkubasi

Dedak kasar yang masih baru dari unit pengilingan padi digunakan sebagai media fermentasi. Dedak ditambah air dengan perbandingan 1:1 (b/b), disterilkan pada suhu 121 °C selama 30 menit. Inokulasi dengan menggunakan starter sebanyak 1 % (b/b). Dedak yang sudah diinokulasi secara aseptik didistribusikan ke dalam cawan petri steril dengan

isi masing-masing sebanyak 30 gram. Jumlah cawan petri disesuaikan dengan keperluan pengamatan selama penelitian. Inkubasi dilakukan di dalam inkubator yang dilengkapi dengan cadangan air dibagian bawah untuk mendapatkan kelembaban relatif 87-95 %. Suhu inkubasi 25 °C, dan sebagai ulangan, diambil dua buah petridish tiap hari untuk keperluan analisis, selama 7 hari inkubasi.

Berat Kering Bahan

Diukur dengan penimbangan dedak terfermentasi setelah dikeringkan pada suhu 106 °C selama 16 jam (Smits, dkk., 1996).

Perhitungan Koloni Jamur dan Produksi Spora

Perhitungan jumlah koloni dilakukan dengan plate count dengan metode *spread plate* pada medium Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC). Inkubasi dilakukan pada suhu 25 °C. Spora diukur dengan memanen spora dari dedak terfermentasi menggunakan 0,01 % Tween 80, dan konsentrasi dihitung dengan menggunakan *haemocytometer*.

Protein Biomasa

Pertumbuhan biomasa selain dengan plate count juga diukur dengan mengukur protein biomasa. Karena sulitnya memisahkan secara kuantitatif biomasa jamur dari substratnya, maka pengukuran biomasa dapat dilakukan dengan pengukuran protein, di samping bisa juga dengan pengukuran glukosamin, CO₂ dan O₂ selama pertumbuhan (Smits, 1998).

Laju Pertumbuhan Spesifik

Laju pertumbuhan spesifik biomasa diukur dengan persamaan $dX/dt = \mu_m \cdot x (1 - X/X_{maks})$, dimana X adalah biomasa, μ_m adalah laju pertumbuhan spesifik maksimum, X_{maks} adalah maksimum biomasa. Pada penelitian ini biomasa untuk menentukan μ_{maks} menggunakan protein biomasa (Smits, 1998)

Laju Produksi Karbondioksida

Laju produksi karbondioksida dilakukan dengan mengukur karbondioksida yang dibebaskan dengan modifikasi metode Smits dkk.(1996). Pengukuran produksi karbondioksida minimal dilakukan selama 1 jam.

Aktivitas Enzim Ekstraseluler Kasar

Enzim diekstrak dari 10 gram dedak terfermentasi dengan menggunakan 50 ml larutan bufer fosfat 0,05 M, suhu 4 °C selama 2 jam, sentrifugasi pada suhu 4 °C, dan filtrat yang diperoleh diukur aktivitasnya terhadap AFB1. Satu mililiter larutan standar AFB1 dengan konsentrasi 4 µg AFB1/

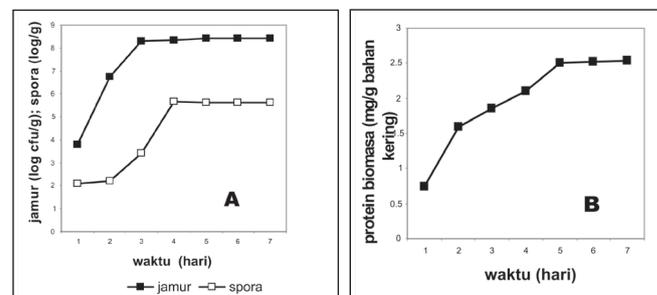
ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi 5 ml. Setelah pelarut diuapkan dengan menggunakan gas nitrogen, sebanyak 1 ml enzim ekstraseluler dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 4 µg AFB1. Setelah digojog dengan *vortex mixer*, reaksi dilakukan pada suhu 30 °C selama 1 jam. Reaksi dihentikan dengan memanaskan tabung beserta isinya pada waterbath mendidih selama 10 menit. Aflatoxin B₁ diekstrak dengan menggunakan kloroform. Setelah pelarut diuapkan, ekstrak dilarutkan dalam metanol air (8:2), kemudian dilakukan *clean up* dengan *Immunoaffinity column*. Setelah diderivatisasi, konsentrasi AFB1 dianalisa dengan HPLC menggunakan *ODS reverse phase column* dan *Flourescence Detector*. Methanol, acetonitril dan air (26:11:63) digunakan sebagai fase mobil dengan laju 1 mL/menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan Jamur

Pertumbuhan jamur yang diukur dengan plate count ditunjukkan pada Gambar 1 A, sedangkan pertumbuhan yang diukur dengan protein biomasa disajikan pada Gambar 1B. Untuk protein biomasa, angka telah dikoreksi dengan protein dedak sebagai media. Terlihat bahwa kedua parameter tersebut memiliki pola yang berbeda. Hasil dari perhitungan koloni menunjukkan kenaikan yang tajam sampai 3 hari fermentasi, sedangkan protein biomasa terus mengalami kenaikan sampai 5 hari fermentasi dan kemudian tetap terjadi kenaikan, walaupun tidak besar, dengan maksimum protein biomasa sebesar 2,628 mg/g bahan kering. Perbedaan tersebut disebabkan karena protein biomasa menunjukkan total biomasa, baik yang hidup maupun yang mati, sedangkan total plate count hanya menunjukkan yang hidup saja. Pada gambar 1A nampak bahwa setelah hari ketiga, relatif tidak terjadi kenaikan jumlah koloni, sedangkan pembentukan spora relatif sangat lambat sangat lambat setelah 4 hari fermentasi. Pola ini mirip dengan penelitian Sardjono dkk.(1998).

Jika laju pertumbuhan spesifik (μ) dihitung berdasarkan pada persamaan yang ditulis oleh Smits dkk.(1996) dengan

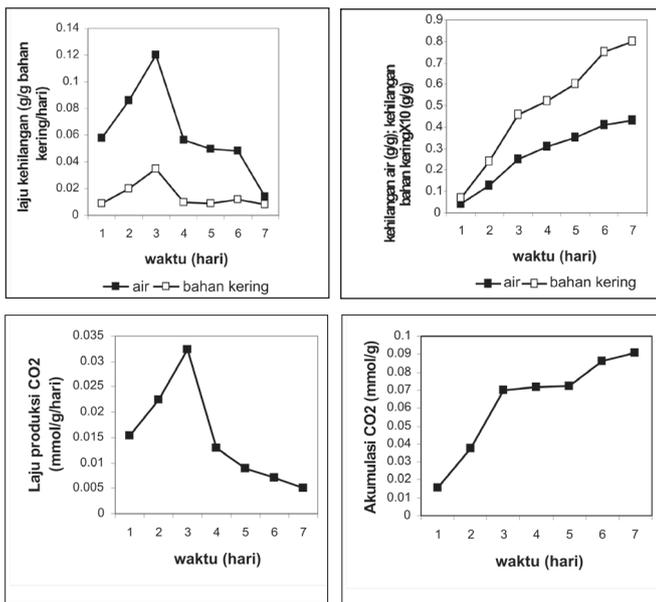


Gambar 1. Pertumbuhan biomasa yang diukur dengan *plate count* dan jumlah spora (A) dan pertumbuhan biomasa yang diukur dengan analisis protein biomasa (B)

mengganti glukosamin dengan protein biomasa sebagai parameter pertumbuhan, diperoleh bahwa μ_m sebesar 0,022/jam.

Kehilangan Bahan Kering dan Air

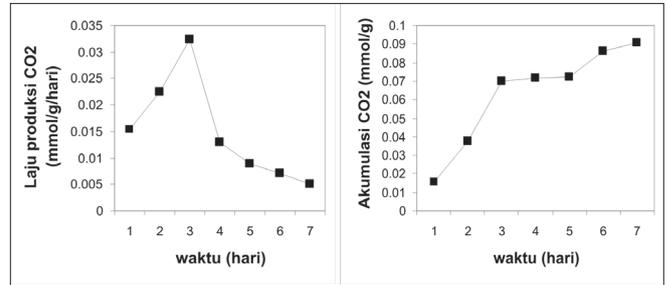
Laju kehilangan bahan kering terbesar terjadi pada 3 hari fermentasi, kemudian menurun sampai akhir fermentasi (Gambar 2), demikian juga laju kehilangan air mencapai puncaknya pada 3 hari fermentasi. Jika laju kehilangan bahan kering ini dikaitkan dengan aktivitas metabolisme, yang didasarkan pada aktivitas degradasi bahan kering, maka aktivitas metabolik tertinggi terjadi pada 3 hari fermentasi. Ini didukung oleh laju produksi CO₂ tertinggi terjadi pada 3 hari fermentasi. Sedangkan kehilangan air selain karena kegiatan metabolik juga disebabkan oleh penguapan secara fisik, namun demikian masih bisa dikatakan bahwa kehilangan air yang tinggi pada 3 hari fermentasi juga mengindikasikan kegiatan metabolik yang tinggi pada hari tersebut.



Gambar 2. Laju kehilangan bahan kering dan kehilangan air selama fermentasi

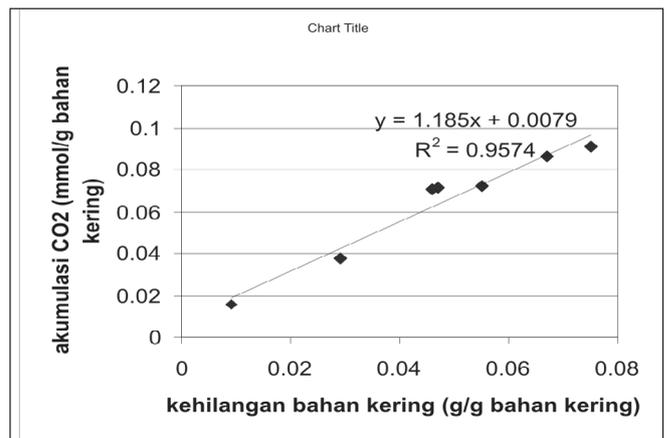
Laju Produksi CO₂

Laju produksi CO₂ sebagai salah satu indikator aktivitas metabolik yang sekaligus juga merupakan salah satu parameter pertumbuhan, ditunjukkan pada Gambar 3. Aktivitas metabolik tertinggi terjadi pada 3 hari fermentasi, dengan laju 0,0324 mmol CO₂/g/hari, dengan total produksi CO₂ selama fermentasi sebesar 0,092 mmol/g. Laju produksi CO₂ ini memiliki pola yang sama dengan pola kehilangan bahan kering yang mencapai puncaknya pada 3 hari fermentasi, kemudian menurun sampai akhir fermentasi.



Gambar 3. Laju produksi CO₂ dan akumulasi CO₂ selama fermentasi

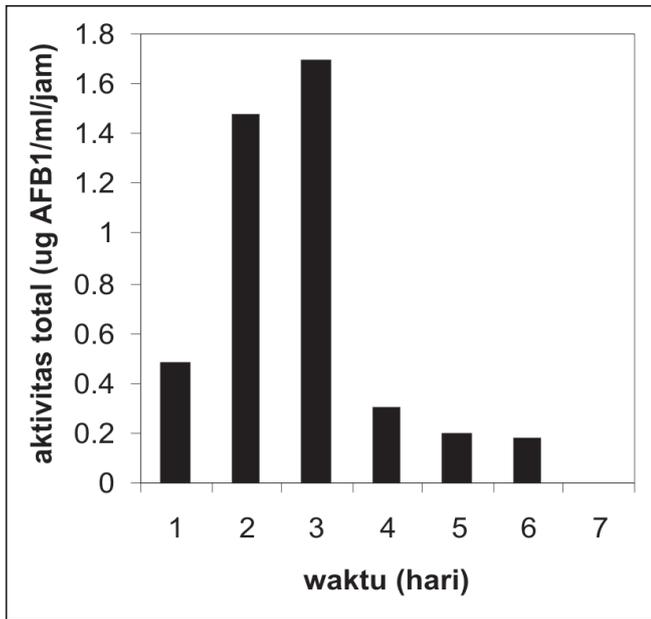
Laju produksi CO₂ ini memiliki pola yang sama dengan pola kehilangan bahan kering yang puncaknya terjadi pada 3 hari fermentasi, kemudian menurun sampai akhir fermentasi. Selama fermentasi ini tentunya juga kehilangan air sebagai akibat kegiatan metabolik. Jika dicari hubungan antara kehilangan bahan kering dengan akumulasi produksi CO₂ diperoleh persamaan $y = 1,185x + 0,0079$ seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Hubungan antara kehilangan bahan kering dan akumulasi CO₂

Aktivitas Enzim Kasar Ekstraseluler

Pola aktivitas enzim kasar ekstraseluler ternyata memiliki pola yang mirip dengan pola pada medium sintetis (Sardjono dkk., 1992). Aktivitas enzim ekstraseluler berasosiasi dengan laju pertumbuhan, memiliki aktivitas total tertinggi pada 3 hari fermentasi, sebesar 1,69 µg AFB1/ml/jam, atau 0,881 µg AFB1/g protein biomasa/ jam. Hasil ini lebih rendah bila dibandingkan pada medium cair atau kultur rendam, karena penurunan AFB1 selain karena aktivitas enzim ekstraseluler juga karena sebagian AFB1 terikat pada miselia (Sardjono dkk., 2004).



Gambar 5. Aktivitas enzim kasar ekstraseluler pendegradasi aflatoxin B₁

KESIMPULAN

Penggunaan metode perhitungan jumlah koloni untuk menyatakan pertumbuhan biomasa jamur berbeda dengan pengukuran berdasarkan pada protein biomasa. Protein biomasa bertambah terus selama fermentasi dan laju kenaikannya mengalami penurunan menjelang akhir fermentasi, sedangkan jumlah koloni relatif tidak bertambah setelah 3 hari fermentasi. Protein biomasa maksimum yang dicapai adalah 2,628 mg/g bahan kerig media. Laju pertumbuhan spesifik yang dicapai adalah 0,022/jam.

Kecepatan pertumbuhan biomasa jamur juga dapat dilihat dengan laju produksi CO₂ maupun laju kehilangan bahan kering, karena pertumbuhan biomasa jamur yang tinggi juga menunjukkan aktivitas metabolik yang tinggi (Smits, 1996). Laju produksi CO₂ tertinggi terjadi pada hari ketiga yakni 0,0324 mmol CO₂ /g/hari, demikian pula laju kehilangan bahan kering tertinggi terjadi pada hari ketiga. Hubungan antara laju produksi CO₂ dengan laju kehilangan bahan kering dapat dinyatakan dengan persamaan $y = 1,185x + 0,0079$.

Aktivitas enzim kasar ekstraseluler sejalan dengan pertumbuhan biomasa jamur, dan aktivitas total tertinggi adalah 1,699 µg AFB1/ml/jam, atau 0,888 µg AFB1/g protein biomasa/jam.

DAFTAR PUSTAKA

Djen, K.S. (1974). Self protection of fermented foods against aflatoxin. *Proceeding of International Congress on Food Science and Technology* **3**: 224-253.

Doelle, H.W., Mitchel, D.A. dan Rolz, C.E. (1992). *Solid Substrate Cultivation*. Elsevier Applied Science, New York.

Norhayati, A., Sardjono, Yamashita, A. dan Yoshizawa, T. (1998). Natural co-occurrence of aflatoxins and fusarium mycotoxins (fumonisins, deoxynevalenol, nivalenol dan zearalenone) in corn from Indonesia. *Food Additive and Contaminant* **15**: 337-384.

Pitt, J.I., Hocking, A.D., Miscambel, B.F., Dharmaputra, O.S., Sardjono, Rahayu, E.S. dan Kuswanto, K.R. (1998). The mycoflora of food commodities from Indonesia *Journal of Mycology* **1**: 41-60.

Sardjono, Rahayu, K. dan Sudarmadji, S. (1992). Growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in mixed culture with *Aspergillus oryzae*. *ASEAN Food Journal* **7**: 30-33.

Sardjono, 1998. Pencemaran pangan oleh jamur, potensi bahaya dan pencegahannya. *Agritech* **18**: 23-27.

Sardjono, Zhu, Y. dan Knol, W. (1998). Comparison of fermentation profiles between lupine and soybean by *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* in solid-state culture systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 3376-3380.

Sardjono, Raharjo, S., Rahayu, E.S. dan Rahayu, K. (2004a). Indigenous proteolytic *Aspergillus* isolated from koji and its ability for aflatoxin B1 degradation. *Agritech* **24**:139-145.

Sardjono, Raharjo, S., Rahayu, E.S. dan Rahayu, K. (2004b). Detoxification of aflatoxin B1 by extracellular enzymes of *Aspergillus oryzae* KKB4. *Indonesian Food and Nutrition Progress* **11**: 30-34.

Sardjono (2005). Mycotoxigenic fungi and the occurrence of mycotoxins in Indonesian commodities. The 9th National Congress of Indonesian Society for Microbiology, Denpasar, Bali.

Smits, J.P., Rinzema, A., Tramper, J., Van Sonsbeek, H.M. dan Knol, W. (1996). Solid state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM 3494: Substrate composition changes, C balance, enzyme production and kinetics. *Applied Microbiology and Biotechnology* **46**: 489-496.

Smits, J.P. (1998). *Solid-State Fermentation, Modelling Fungal Growth and Activity*. Proefchrift terverkrijging van de graad van doctor, van de Landbouwwuniversiteit Wageningen, The Netherland.