

ENKAPSULASI DAN STABILITAS PIGMEN KAROTENOID DARI
Neurospora intermedia N-1
(*Encapsulation and the Stability of Carotenoids from Neurospora intermedia N-1*)

Gusdinar T. *, Marlia Singgih *, Sri Priatni **, Sukmawati AE. *, Tri Suciati *

* Sekolah farmasi - ITB, Jl. Ganesha 10 Bandung, *email: gusdinar@fa.itb.ac.id*

** Pusat Penelitian Kimia LIPI, Jl. Cicitu Bandung

Diterima: 2 September 2011

Disetujui: 28 Oktober 2011

Abstrak

Neurospora sp merupakan spesies fungi yang dilaporkan menghasilkan pigmen karotenoid, yaitu metabolit sekunder yang termasuk kelompok pigmen yang berwarna kuning, jingga atau merah jingga. Pada penelitian ini telah dilakukan enkapsulasi pigmen karotenoid *Neurospora intermedia* N-1 menggunakan kopolimer gelatin-maltodekstrin. Suspensi dari campuran ekstrak karotenoid dengan kopolimer gelatin-maltodekstrin, dikeringkan dengan alat *spray drier* sehingga diperoleh serbuk karotenoid GME (gelatin-maltodekstrin-ekstrak) dan diuji stabilitasnya terhadap pengaruh penyimpanan RH 20-30%, selama 5 minggu. Hasil enkapsulasi ekstrak karotenoid diperoleh serbuk GME dengan nilai EY (*encapsulation yields*) \pm 48%. Mikroenkapsulasi ekstrak karotenoid tersebut dapat meningkatkan kelarutannya dalam air dan stabil pada kondisi RH 20-30%, stabilitas menurun mulai pada minggu ke 3. Analisis KCKT terhadap serbuk GME menunjukkan penurunan kandungan β -karoten sekitar 30%, setelah penyimpanan 5 minggu. Analisis SEM terhadap serbuk GME menunjukkan partikel yang berbentuk bulat dan berlekuk di permukaan dengan ukuran $\pm 1 \mu\text{m}$.

Kata kunci: Enkapsulasi, *spray-drier*, stabilitas, β -karoten

Abstract

Neurospora sp, a species of fungi was reported containing the carotenoid pigments, the secondary metabolite of the yellow, orange or red-orange pigments group. On this research, the carotenoid pigments of *Neurospora intermedia* N-1 has been encapsulated by a copolymer of gelatin-maltodextrins. The encapsulated products were dried by a spray drier and the carotenoid powder was determined its stability to the storage influence at RH 20-30%, for 5 weeks. Encapsulation product of carotenoids extract obtained the GME powder with EY value \pm 48%. Microencapsulation of this extract was increased the water solubility and stable at RH 20-30% condition, the stability was decreased start at the third week. HPLC analysis of GME powder showed the decreasing of β -carotene about 30%, after storage for 5 weeks. SEM analysis of GME powder showed the globular shape and dents on the surface of particles, with size $\pm 1 \mu\text{m}$.

Keywords : encapsulation, *spray-drier*, stability, β -carotene

PENGANTAR

Bahan pewarna makanan baik yang alami maupun sintetis sangat akrab dengan kehidupan sehari-hari. Warna merupakan bagian penting untuk penampilan suatu

produk, baik untuk makanan atau obat-obatan. Sejak ditemukannya pewarna sintetis, penggunaan pewarna alami sangat menurun. Namun banyak pewarna sintetis yang menyebabkan reaksi alergi ketika digunakan dalam makanan dan kosmetik, dalam hal-hal

tertentu dapat pula menimbulkan penyakit kanker. Penggunaan pewarna sintesis akhir-akhir ini cukup merebak, hal ini terjadi karena pewarna jenis ini umumnya lebih murah dan memberikan warna yang menarik dan stabil pada makanan, (Nuraida, 1996).

Penggunaan pewarna alami dapat menjadi alternatif karena efek keamanannya, dan memiliki efek menguntungkan bagi kesehatan, contohnya β -karoten pada wortel. Namun pewarna ini sangat tidak stabil terhadap pengaruh cahaya. Pigmen atau pewarna alami yang dihasilkan oleh kapang merupakan alternatif yang menjanjikan karena dapat dikultivasi dan memberikan perolehan yang cukup tinggi. Penelitian mengenai pigmen karoten yang dihasilkan oleh kapang *Blakeslea* dan *Xanthophyllomyces* telah dikembangkan di Eropa yang direkomendasikan sebagai bahan aditif pangan yang aman dan memiliki efek menguntungkan bagi kesehatan. Hasil pengembangan ini selanjutnya akan digunakan oleh industri untuk produksi karoten secara bioteknologi dan pengembangan produk pangan baru kaya akan karoten (Avalos, 2003).

Oncom merupakan produk makanan tradisional Indonesia, khususnya masyarakat Jawa Barat, yang diperoleh dari proses fermentasi jamur oncom pada media substrat padat. Oncom merah dihasilkan oleh kapang *Neurospora sp* yang mempunyai strain jingga, merah, merah muda, dan warna peach, warna ini ditimbulkan oleh karotenoid sebagai produk metabolit sekunder. Senyawa karotenoid memiliki rentang variasi warna yang sangat menarik khususnya bila digunakan sebagai pewarna untuk bahan obat, kosmetika dan makanan, namun umumnya sensitif terhadap cahaya, panas, dan oksigen serta sulit larut dalam air. Agar pigmen ini dapat larut dalam air, diperlukan upaya mengkonjugasi senyawa karotenoid dengan senyawa lain yang memberi efek peningkatan solubilitas dan stabilitas warna. Senyawa obat dalam partikel dapat dibuat dengan melarutkan obat dan kopolimer dalam pelarut organik umum, kemudian diuapkan dan dilarutkan dengan air. Senyawa obat tersebut dapat ter-enkapsulasi dalam partikel ketika pelarut diganti dengan air (Xiao Yun dkk., 2007). Gugus hidrofobik dari protein akan

berinteraksi dengan senyawa karotenoid yang bersifat hidrofobik dan gugus hidrofil dari polisakarida akan terekspos keluar sehingga dapat stabil di dalam suasana polar seperti contohnya air. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan enkapsulasi pigmen karotenoid kapang *Neurospora intermedia* N-1 dan menguji stabilitas dari produk enkapsulasi yang dihasilkan. Proses enkapsulasi dilakukan pula terhadap β -karoten murni, sebagai produk pembanding.

METODE PENELITIAN

Bahan

Isolat kapang *N.intermedia* N-1, ampas tahu, maltodekstrin, gelatin, senyawa standar β -carotene, pelarut organik dan bahan kimia lainnya.

PROSEDUR

Fermentasi *N.intermedia* N-1

Substrat ampas tahu kering yang telah terseleksi, ditimbang sebanyak 200 gram dan ditambahkan air sebanyak 600 ml (1 : 3). Selanjutnya substrat tersebut disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Substrat yang telah diautoklaf didinginkan, diinokulasi dengan 50 ml suspensi spora (10^6 spora/ml) kemudian dipindahkan ke dalam 2 buah tray bertutup dan berlubang dengan ukuran 35 cm \times 25 cm. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 3-5 hari. Spora yang berwarna kuning-oranye dipanen dan disimpan ditempat gelap untuk diekstraksi lebih lanjut.

Ekstraksi karotenoid

Ekstrak kasar pigmen karotenoid *N.intermedia* N-1 diperoleh melalui ekstraksi spora berwarna jingga dengan aseton teknis. Ekstrak disaring menggunakan kertas saring ukuran sedang. Tahap ekstraksi ini dilakukan berulang sampai seluruh pigmen terangkat dan residu spora berwarna kuning pucat. Ekstrak pigmen selanjutnya dipekatkan dengan evaporator vakum pada suhu 40°C.

Ekstraksi karotenoid pada produk enkapsulasi GMB dan GME mengikuti metode Xiaoyun dkk. (2007) yang dimodifikasi. Serbuk mengandung karotenoid dididid-persikan dengan 1 ml HCl 0,1M dan ditambahkan tripsin (0,2mg/ml). Cairan selanjutnya diinkubasi pada 37°C selama 1 malam. Hidrolisis tripsin

dihentikan dengan 0,5 ml HCl 0,2M. Sikloheksan ditambahkan pada ratio tertentu dan dikocok selama 1 jam. Campuran dipisahkan menggunakan corong pisah, fase sikloheksan (atas) dipisahkan, ditambahkan natrium sulfat kering dan dievaporasi.

Analisis karotenoid dengan KCKT

Analisis karotenoid dilakukan menggunakan KCKT mengikuti Metode Sandmann et al (2008) yang dimodifikasi, dengan detektor UV/Vis yang diukur pada panjang gelombang 450 nm, fase gerak asetonitril : methanol : 2-propanol (85:10:5), laju aliran 2 ml/menit, temperatur 26°C, jenis kolom C18 (Waters Symetry ukuran 150x3,9mm, 5µm) dan waktu analisa selama 20 menit. β-carotene Type II (Sigma-Aldrich) digunakan sebagai senyawa standar KCKT.

Pembuatan kopolimer melalui reaksi Maillard

Pembuatan kopolimer berdasarkan prinsip reaksi Maillard, mengikuti metode Pan et al., (2007) yang dimodifikasi. Pada pembuatan kopolimer ini digunakan gelatin (Merck), maltodekstrin dengan nilai DE 13-17. Kopolimer dibuat dari campuran gelatin-maltodekstrin dengan ratio 4 : 1. Reaksi Maillard dilakukan pada suhu 50°C, 100 rpm selama 4 jam.

Proses enkapsulasi karotenoid

Pembuatan serbuk karotenoid dilakukan mengacu pada metode Chen dan Tang (1998) yang dimodifikasi. Sebanyak 1,3 gram ekstrak karotenoid dilarutkan dengan sedikit etanol teknis. Kopolimer gelatin-maltodekstrin disiapkan dengan mencampurkan 40 gram gelatin dan 10 gram maltodekstrin dan dilarutkan dalam 1 liter aquadest. Reaksi kopolimerisasi dilakukan pada alat *shaker* dengan suhu 50°C, 100 rpm, selama 4 jam. Enkapsulasi karotenoid GME (gelatin-maltodekstrin-ekstrak) dilakukan dengan menambahkan ekstrak karotenoid yang telah dilarutkan dalam etanol ke dalam 1 liter larutan kopolimer gelatin-maltodekstrin yang telah didinginkan. Selanjutnya, larutan dihomogenisasi menggunakan alat *magnetic stirer* selama 30 menit. Serbuk karotenoid GME dibuat dengan mengeringkan suspensi GME dengan alat *spray-drier* pada kondisi suhu inlet 160°C, outlet 70°C, tekanan 1 Bar

dengan laju alir rata-rata 8 ml/menit. Sampel diletakkan di dalam desikator dengan kelembaban 20 % - 30 %, suhu antara 25° C – 28°C. Hasil enkapsulasi (*encapsulation yield/EY*) dihitung dengan persamaan:

$$\% EY = \frac{MSA \times 100}{MSB}$$

MSA = total massa mikrokapsul setelah enkapsulasi

MSB = total massa mikrokapsul sebelum enkapsulasi

Serbuk GMB dan GME diuji kestabilannya terhadap sifat kelarutan karotenoid (OD₄₅₀), intensitas warna dengan alat chromameter, dan kadar air (Sudarmadji S. dkk.). Bentuk dan ukuran partikel dianalisis menggunakan alat SEM merk JEOL JSM 6510/LV/A/LA.

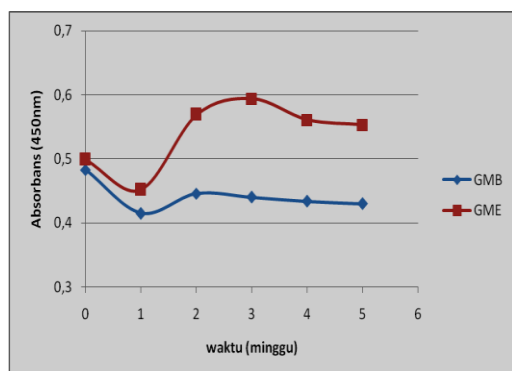
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, pembuatan kopolimer gelatin-maltodekstrin dilakukan melalui reaksi Maillard yang merupakan reaksi antara suatu protein dengan sakarida. Kopolimer casein-g-dekstran telah dibuat melalui reaksi Maillard yaitu suatu reaksi pencangkakan (*grafting*) molekul dekstran dengan molekul casein. Kopolimer tersebut larut dalam air pada pH 7,0, tetapi tidak larut dalam etanol. Sementara itu, β-carotene yang bersifat hidrofob, kelarutannya meningkat dalam etanol. Pencampuran kopolimer dalam air dengan β-carotene dalam etanol akan terdispersi secara bersamaan yang mengindikasikan adanya interaksi antara β-carotene dan casein (Pan dkk., 2007). Atas dasar tersebut, enkapsulasi ekstrak karotenoid *N.intermedia* dengan kopolimer gelatin-maltodekstrin dilakukan untuk memperbaiki sifat kelarutan karotenoid tersebut di dalam air.

Suspensi dari campuran ekstrak karotenoid dengan kopolimer gelatin-maltodekstrin, dikeringkan dengan alat *spray drier* sehingga diperoleh serbuk karotenoid GME (gelatin-maltodekstrin-ekstrak). Sebagai pembandingan, dilakukan proses enkapsulasi yang sama menggunakan β-carotene murni (Sigma), sehingga diperoleh serbuk GMB (gelatin-maltodekstrin- β-carotene). Hasil pengeringan diperoleh serbuk GMB

dengan nilai EY 60 %, dan serbuk GME dengan nilai EY 48 %. Hasil dari proses *spray drying* tergantung pada konfigurasi alat, sementara efisiensi mikroenkapsulasi berkaitan dengan sifat fisikokimia dari bahan inti maupun bahan penyalut. Enkapsulasi likopen dengan β -siklodekstrin, memberikan perolehan produk (EY) sebesar $51 \pm 1\%$. (Nunes dan Mercadante, 2007). Chen dan Tang (1998), melaporkan nilai EY 67% untuk hasil enkapsulasi karotenoid dari ampas wortel dengan gelatin-sukrosa.

Produk enkapsulasi karotenoid dengan kopolimer bersifat hidrofil dapat meningkatkan kelarutannya dalam air. Bagian inti partikel yang bersifat hidrofobik akan bertindak sebagai ruang *cargo*, sementara bagian kulit luar (*shell*) yang bersifat hidrofilik akan menstabilkan partikel di dalam suatu dispersi air (Pan dkk., 2007). Pada penelitian ini, sifat kelarutan karotenoid dan stabilitas serbuk GMB dan GME dalam air ditentukan nilai absorbansinya pada panjang gelombang 450 nm (OD_{450}). Pengujian stabilitas serbuk tersebut dilakukan sampai minggu ke 5. Hasil analisis terhadap kedua serbuk, terjadi penurunan absorbansi mulai pada minggu ke 3 (Gambar 1). Secara statistik, penurunan nilai OD_{450} rata-rata pada serbuk GME sebesar 2,5% dan serbuk GMB sebesar 0,76%.

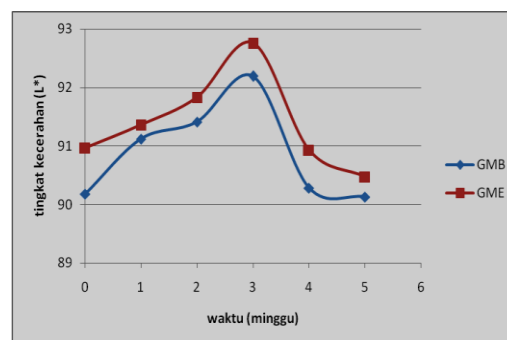


Gambar 1. Hasil pengujian stabilitas karotenoid (OD_{450}) pada suspensi GMB dan GME

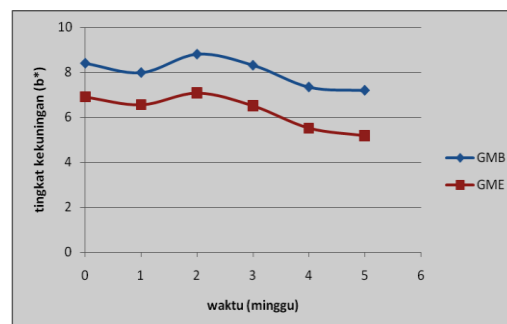
Pada Gambar 1, terlihat adanya peningkatan nilai OD pada minggu ke 1, terutama pada sampel GME. Hal ini dapat terjadi karena respon antioksidan yang signifikan dari ekstrak karotenoid *N.intermedia*, yang merupakan campuran dari beberapa karotenoid dan respon tersebut menurun setelah minggu ke 3. Hasil studi terdahulu, dilaporkan setidaknya terdapat lima senyawa karotenoid pada ekstrak

N.intermedia, antara lain: lycopene, neurosporen, γ -carotene, β -carotene dan phytoene (Priatni dkk., 2010). Menurut Kyung-Jin dkk., (2009), secara *in vivo*, interaksi sinergistik antara senyawa karotenoid campuran berpengaruh nyata terhadap kerusakan limfosit DNA.

Analisis warna serbuk GMB dan GME dilakukan dengan menggunakan alat chromameter. Pada prinsipnya chromameter bekerja berdasarkan pengukuran perbedaan warna yang dihasilkan oleh permukaan sampel. Sistem notasi warna yang digunakan adalah sistem satuan warna L^* (tingkat kecerahan a^* (tingkat kemerahan) dan b^* (tingkat kekuningan)). Pada penelitian ini, analisis warna hanya teramati nilai L^* dan b^* , sedangkan nilai a^* tidak teramati atau bernilai negatif. Seperti halnya pada pengujian stabilitas karotenoid diatas, kecenderungan penurunan warna nilai L^* dan b^* terjadi mulai pada minggu ke 3. Hasil analisis tingkat kecerahan warna (L^*) dan tingkat kekuningan (b^*) disajikan pada Gambar 2 dan 3.



Gambar 2. Hasil pengujian stabilitas tingkat kecerahan warna (L^*) pada serbuk GMB dan GME

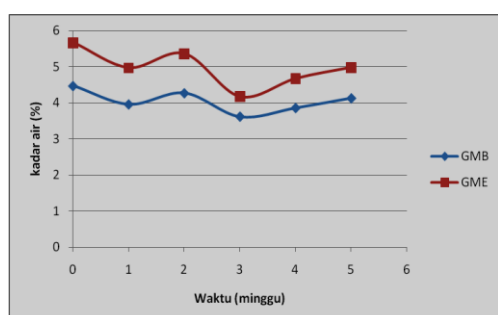


Gambar 3. Hasil pengujian stabilitas tingkat kekuningan (b^*) pada serbuk GMB dan GME

Hasil analisis terhadap serbuk GME menunjukkan terjadinya penurunan tingkat kecerahan warna (nilai L^*) rata-rata 0,84% dan penurunan tingkat kekuningan (nilai b^*)

rata-rata 8,64%. Sedangkan hasil analisis terhadap serbuk GMB menunjukkan terjadinya penurunan tingkat kecerahan warna (nilai L^*) rata-rata 0,76% dan penurunan tingkat kekuningan (nilai b^*) rata-rata 5,24%. Studi yang dilakukan Chen dan Tang (1998), menyebutkan bahwa penurunan nilai L^* , a^* dan b^* dalam serbuk karotenoid akan menurun seiring dengan meningkatnya waktu penyimpanan. Penurunan warna kuning dari serbuk karotenoid selama penyimpanan dapat disebabkan oleh degradasi *trans*- β -carotene dan formasinya ke bentuk isomer *cis*. Telah banyak dilaporkan bahwa formasi *cis* karotenoid dapat menurunkan intensitas warna.

Selama pengujian stabilitas, serbuk GMB dan GME ditempatkan pada suatu eksikator dengan tingkat kelembaban (%RH) antara 20 % - 30 % dan suhu antara 25° C – 28°C. Pada kelembaban dan suhu terkendali tersebut, perubahan kadar air dari serbuk enkapsulasi diamati selama penyimpanan sampai minggu ke 5. Hasil analisis kadar air dari serbuk GMB dan GME tersebut disajikan pada gambar 5.

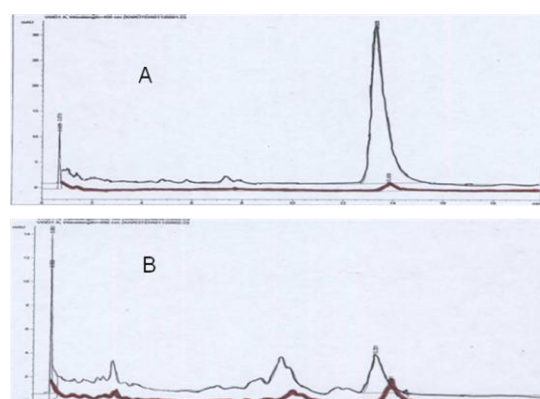


Gambar 4. Hasil analisis kadar air dari serbuk GMB dan GME

Hasil analisis statistik terhadap serbuk GME menunjukkan peningkatan kadar air rata-rata 5,48% dan pada serbuk GMB terjadi peningkatan kadar air rata-rata 4,09%. Peningkatan kadar air tersebut, secara jelas terjadi setelah minggu ke 3. Beberapa disakarida telah digunakan untuk bahan enkapsulasi. Berbagai zat volatil telah berhasil dijebak dalam sukrosa, maltosa atau laktosa melalui pengeringan beku, gula yang berbentuk amorf menjadi bentuk kristal. Permukaan membran dari disakarida tersebut bersifat kedap air dengan resistensi tinggi terhadap difusi pada kadar air yang rendah

atau membentuk formasi kompleks. Dengan proses enkapsulasi rangkap dapat meningkatkan kemampuan menghalangi air masuk ke dalam partikel. Halangan tersebut dapat dibentuk melalui suatu kombinasi penyalutan menggunakan zat lilin sehingga dapat membentuk dinding rangkap. Pengurangan penyerapan air akan sangat penting dalam kestabilan dan efektivitas dari serbuk enkapsulasi (Onwulata, dkk., 1998).

Hasil analisis KCKT (Gambar 5), menunjukkan penurunan kandungan β -karoten dari 0,0090 μ g (puncak 1) menjadi 0,0035 μ g (puncak 1') per gram serbuk GME dan 0,178 μ g menjadi 0,0075 μ g per gram serbuk GMB, setelah penyimpanan dalam eksikator pada minggu ke 5. Degradasi pada α dan β -carotene mengikuti reaksi kinetik orde pertama, selama penyimpanan serbuk pigmen karotenoid wortel hasil enkapsulasi dengan maltodekstrin. Selain itu, temperatur inlet pada *spray drier*, sangat mempengaruhi perolehan pigmen. Temperatur pengeringan lebih tinggi (>150°C) dapat menyebabkan dekomposisi senyawa karotenoid (Robert, 2003).

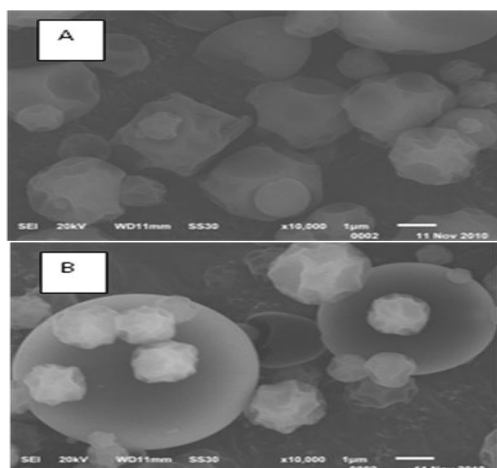


Gambar 5. Analisis KCKT stabilitas karotenoid pada serbuk GMB (A) dan GME (B), 1: puncak β -karoten 0 minggu, 1': β -karoten 5 minggu penyimpanan

Bentuk dan ukuran partikel serbuk GMB dan GME ditentukan menggunakan alat SEM (JEOL JSM 6510/LV/A/LA). Pengamatan bentuk dan ukuran dilakukan pada pembesaran 10.000 kali. Hasil analisis disajikan pada Gambar 6.

Analisis SEM terhadap serbuk GME dan GMB, secara umum keduanya memiliki partikel berbentuk bulat-berlekuk dengan ukuran rata-rata 1 μ m, tidak tampak adanya

patahan ataupun lubang pori-pori. Aspek-aspek tersebut merupakan indikasi proteksi yang baik terhadap material inti, dalam hal ini karotenoid (Nunes dan Mercadante, 2007). Hasil analisis SEM antara partikel GME dan GMB tampak adanya perbedaan, partikel GME (6A) memiliki bentuk dan ukuran partikel yang hampir seragam, sedangkan pada partikel GMB (6B) selain bentuk partikel bulat-berlekuk juga tampak adanya partikel berukuran lebih besar dengan bentuk bulat dan cenderung tembus pandang. GMB merupakan β -carotene murni yang dienkapsulasi dengan kopolimer gelatin-maltodekstrin. Tidak homogenya ukuran dan bentuk partikel dapat disebabkan oleh adanya β -carotene yang tidak terenkapsulasi. Hal ini sesuai dengan data KCKT (Gambar 5), dimana kandungan β -carotene dalam GMB pada minggu ke 0 jauh lebih tinggi dibandingkan dengan minggu ke 5.



Gambar 6. SEM dari serbuk GME (A) dan GMB (B), pembesaran 10.000x

KESIMPULAN

Proses mikroenkapsulasi pigmen karotenoid *Neurospora intermedia* N-1 dengan kopolimer gelatin-maltodekstrin (GME) dapat meningkatkan kelarutan dan stabil pada penyimpanan RH 20-30% selama tiga minggu.

DAFTAR PUSTAKA

Avalos, J. 2003. Production of Fungal Carotenoids for Healthy Nutrition Fungal Carotenoids, European Commission, Research Project

- Chen, B.H. and Tang, Y.C., 1998. Processing and Stability of Carotenoid Powder from Carrot Pulp Waste, *J. Agric. Food Chem.* 1, 46, p. 2312-2318
- Sandmann, G., Shinishi Takaichi, Paul D. Fraser., 2008. C-apocarotenoids in the yellow mutant *Neurospora crassa* YLO35, *Phytochemistry* 69 pp. 2886-2890
- Kyung-Jin, Yeum, Giancarlo Aldini, Robert M. Russell and Norman I. Krinsky. 2009. Antioxidant/Pro-oxidant Actions of Carotenoids, Chapter 12, *Carotenoids, Volume 5: Nutrition and Health*
- Nunes, I.L., and Mercadante, A.Z. 2007. Encapsulation of lycopene using spray-drying and molecular inclusion processes, *an International Journal Brazilian Archives of Biology and Technology*, ISSN 1516-8913, Vol. 50, no. 5, p. 893-900
- Nuraida, L., Sihombing, SH., Fardiaz, S. 1996. Produksi Karotenoid Pad Limbah Cair Tahu, Air Kelapa Dan Onggok Oleh Kapang *Neurospora sp.*, *Bul. Tek. dan Industri Pangan*, Vol VII No 1
- Onwulata, C.I. konstance, R.P. dan holsinger, V.H. (1998), Properties of Single- and Double-Encapsulated Butteroil Powders, *Journal of Food Science*, 63, No. 1
- Priatni, S., Leenawaty Limantara, Heriyanto, Marlia Singgih, and Tutus Gusdinari. 2010. Identification of carotenoids in *Neurospora intermedia* N-1 isolated from Indonesian fermented Peanut cake (oncom merah), *Proceedings of NP-SEA*, Malang, March, 20th-21st, p. 92-95
- Robert, P., Carlsson, RM., Romero N. dan Masson. L.2003. Stability of spray dried encapsulated carotenoid pigments from *Rosa mosqueta* oleoresin, *JAOCS*. Vol. 80. No 11, p.1115-1120
- Pan Xiaoyun, Ping Yao, Ming Jiang. 2007. Simultaneous nanoparticle formation and encapsulation driven by hydrophobic interaction of casein-graft-dextran and β -carotene, *Journal of Colloid and Interface Science* 315, p. 456-463
- Sudarmadji, S., Haryono, B., Suhardi, (1997), Prosedur analisa untuk bahan makanan dan pertanian, Penerbit Liberty, Yogyakarta