

MEKANISME PRODUKSI MINYAK SEL TUNGGAL DENGAN SISTEM FERMENTASI PADAT PADA MEDIA ONGGOK-AMPAS TAHU DENGAN MENGGUNAKAN KAPANG *ASPERGILLUS TERREUS*

[The Production Mechanism of Single Cell Oil from *Aspergillus terreus* in a Solid Fermentation System Using a Mixture of Tapioca and Tofu Waste Media]

Debby M. Sumanti, Carmencita Tjahjadi, Marleen Herudiyanto dan Tati Sukarti

Staf Pengajar Jurusan Teknologi Pertanian Fakultas Pertanian UNPAD Bandung

Diterima 20 Januari 2005 /Disetujui 8 Juli 2005

ABSTRACT

Fat is an important nutrient for health. Considering the ever-increasing annual demand for cooking oil as a result of the rapid increase in population new sources of poly-unsaturated fats must be searched for.

One potential source is the Single Cell Oil (SCO); production of SCO does not require vast areas of land, production time is relatively short and is not affected by environmental conditions. Moreover, product synthesis and production volume can be easily controlled; Moreover, the tri-acyl-glycerol produced contain essential fatty acids, i.e linoleic and linolenic acid.

*The objectives of this research was to study the influence of two mold strains of *A. terreus* and the C/N ratio of the growth medium consisting of cassava starch and tofu processing waste on SCO production.*

*This research consisted of two parts. The first part was a study on keeping methods of pure cultures of *A. terreus*, preparation of starter cultures, isolation of mold from the starter culture and preparation of fermentation media. The second part of the research was fermentation of *A. terreus* strain FNOC 6039 and FNOC 6040 on solid media made of tapioca and tofu waste having C/N ratios of 25/1, 30/1, 35/1, 40/1 and 45/1. Post-fermentation observations on the growth medium slabs consisted of moisture, starch, total sugars and protein content and SCO production.*

*Both strain of *A. terreus* and C/N ratio affected moisture, starch, total sugars and protein content of the growth media. The *A. terreus* FNOC 6040 strain growth on a medium with C/N ratio of 45/1 was the most potential oil producer, i.e. 14,63% crude SCO. The oil was brownish yellow in color and has a slightly fishy aroma.*

Keywords : Single Cell Oil, Solid Fermentation, Cassava starch and Tofu Processing Waste, *Aspergillus terreus* mold strain.

PENDAHULUAN

Kebutuhan lemak atau minyak makan di dunia meningkat dari tahun ke tahun sejalan dengan makin bertambahnya jumlah penduduk. Kira-kira setengah dari kebutuhan yang dapat terpenuhi oleh produksi dunia berasal dari sumber yang ada sekarang. Dari produksi sekitar 60 juta ton/tahun, yang dikonsumsi oleh manusia kurang lebih 80% dan sisanya dimanfaatkan untuk industri (Evans and Ratledge, 1985).

Mengingat kebutuhan lemak yang terus meningkat maka perlu dicari suatu sumber lemak/minyak alternatif yang mengandung senyawa-senyawa yang mendukung kesehatan yaitu senyawa asam lemak tidak jenuh jamak (*Polyunsaturated Fatty Acid/PUFA*).

Alternatif sumber lemak atau minyak yang mempunyai prospek cerah untuk dikembangkan adalah penggunaan mikroorganisme untuk produksi minyak sel

tunggal (MST), dengan alasan tidak memerlukan lahan yang luas, membutuhkan waktu yang relatif singkat, tidak banyak dipengaruhi oleh kondisi ekologi pertumbuhan dan pembentukan produk dapat diatur, dengan demikian harga dapat menjadi lebih stabil.

Mikroorganisme yang berlemak tinggi (*Oleaginous*) seperti kapang, khamir dan bakteri mempunyai potensi sebagai sumber alternatif dari lemak/minyak. Kapang merupakan mikroorganisme *oleaginous* yang paling tepat untuk menghasilkan lemak dibandingkan dengan bakteri dan khamir. Hal ini disebabkan karena kapang lebih mudah ditangani, dapat tumbuh pada kisaran pH yang rendah, dapat mendegradasi sumber karbon (C) yang kompleks dan mampu tumbuh cepat pada limbah serta dapat menghasilkan berbagai asam lemak.

Minyak sel tunggal (MST) mengandung asam lemak tidak jenuh ganda tertentu seperti asam gamma

linolenat (*GammaLinolenic Acid/GLA*) dan eikosapentaenoat (EPA). GLA adalah asam lemak omega-6 yang merupakan turunan asam linoleat. Asam linoleat merupakan asam lemak esensial yang harus disuplai dari makanan. GLA merupakan senyawa penting pembentukan prostaglandin dan dapat digunakan sebagai *Health Food Supplement* untuk mengatasi berbagai gangguan kesehatan akibat gizi lebih seperti jantung koroner, hipertensi dan obesitas. Oleh karena itu minyak mikroba mempunyai fungsi *dietik* dan *terapeutik* sehingga dapat disebut sebagai *High Value Oil*.

Produksi GLA dari kapang telah dilakukan dalam skala industri di Inggris dan Jepang dengan menggunakan kapang dari Ordo *Mucorales* yaitu *Mucor javanicus* dan *Motierella isabellina*. Di Indonesia, penelitian terhadap kapang penghasil GLA telah dilakukan dengan menggunakan seleksi terhadap 11 kapang *Mucor* (Nuraida et al., 1995) dan 11 kapang *Rhizopus* (Suliantari et al., 1996).

Aspergillus adalah kapang utama yang digunakan dalam proses fermentasi kecap, tauco dan miso. Diketahui bahwa *Aspergillus flavus* mampu memproduksi lemak (%w/w) sebesar 28%, *A. nidulans* sebesar 51%, *A. ochraceus* sebesar 48% dan pada *A. terreus* sebesar 57%. Dari beberapa spesies kapang *Aspergillus* tersebut, terlihat bahwa *A. terreus* merupakan salah satu jenis kapang yang dapat memproduksi lemak dalam jumlah tinggi. Selain itu juga lemak yang diproduksi oleh *A. terreus* mempunyai komposisi asam lemak tidak jenuh yang lebih tinggi dibandingkan dengan jenis kapang lainnya. Diketahui bahwa kandungan asam lemaknya hampir sama dengan minyak kelapa sawit yang terdiri dari asam oleat dan linoleat (Ratledge, 1974 dalam Birch et al, 1976).

Adapun strain kapang *A. terreus* yang dicoba dalam penelitian ini adalah FNOC 6039 dan FNOC 6040, kedua strain tersebut memiliki beberapa keunggulan dalam produksi minyak sel tunggal.

Kapang *Aspergillus* mempunyai kemampuan untuk menguraikan limbah, sehingga limbah industri pertanian seperti ampas tahu, onggok (ampas tapioka), dedak padi, molase, limbah cair tapioka dan tahu dapat dicoba sebagai medium pertumbuhan untuk produksi minyak sel tunggal.

Selama proses fermentasi, kapang membutuhkan nutrient untuk kehidupan dan pertumbuhannya yaitu (1) sumber karbon, (2) sumber nitrogen, (3) sumber energi, dan (4) faktor pertumbuhan yang terdiri dari vitamin dan mineral (Fardiaz, 1992).

Ada beberapa faktor yang mempengaruhi produksi minyak sel tunggal antara lain suhu, pH, waktu inkubasi, aerasi, nutrient meliputi sumber karbon, nitrogen, vitamin dan mineral serta rasio karbon (C) : nitrogen (N).

Rasio karbon dan nitrogen merupakan faktor penting dalam produksi minyak sel tunggal. Rasio C : N dalam medium fermentasi berperan sebagai sumber nutrient yang dibutuhkan untuk membentuk energi dan menyusun komponen-komponen sel. Setiap mikroorganisme bervariasi dalam kebutuhannya akan rasio C : N tersebut.

Menurut Rahman (1989), rasio C : N yang digunakan dalam industri fermentasi harus memenuhi beberapa kriteria berikut ini : dapat memproduksi biomassa dengan hasil maksimum untuk setiap gram substratnya, dapat menekan pembentukan produk yang tidak diinginkan sampai serendah mungkin dan memungkinkan pembentukan produk fermentasi dengan laju maksimum serta mutu yang konsisten.

Kyle dan Rotledge (1992), menyatakan bahwa rasio C : N = 62,9 : 1 pada *Mucorisabellina* IFO 7884 dapat meningkatkan produksi lemak sampai 67%.

Untuk memenuhi kebutuhan rasio karbon dan nitrogen tersebut maka diperlukan media fermentasi padat salah satunya adalah onggok (ampas tapioka) sebagai sumber karbon dan ampas tahu sebagai sumber nitrogen yang digunakan dalam penelitian ini.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar air, kadar pati, kadar gula total dan kadar protein pada media fermentasi yang digunakan kapang *Aspergillus terreus* untuk metabolisme sel yang selanjutnya dapat diketahui strain *A. terreus* dan rasio C : N yang optimum untuk menghasilkan minyak sel tunggal dalam jumlah tinggi.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : limbah padat tapioka (onggok) yang merupakan hasil sampingan industri tapioka yang berasal dari unit ekstraksi pati singkong yang diperoleh dari Industri Tapioka Pak Dadang di Garut, ampas tahu yang merupakan limbah padat yang diperoleh dari ekstraksi protein biji kedelai pada proses pembuatan tahu yang berasal dari Perusahaan Tahu Pak Mamad Cikeruh Jatinangor, biakan murni (agar miring) *A. terreus* strain FNOC 6039 dan FNOC 6040 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi PAU UGM Yogyakarta, larutan mineral yang terdiri dari KH_2PO_4 , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebagai sumber vitamin dan mineral, asam D-tartat, Potato Dextrose Agar (PADA) Malt Agar (MA), aquades, spirtus, alkohol 95% serta bahan-bahan untuk analisis kimia seperti larutan Luff Schoorl, H_2SO_4 6 N, KI 30%, NaOH 0,1 N, NaOH 4 N, NaOH 35%, HCl 4 N, HCl 0,1 N, HCl 25%, amylum, phenolphthalein 1%, pekat

H₂SO₄, selenium mixture, Na₂S₂O₃ 0,1 N, H₃BO₃ 3% dan pelarut n-Hexana.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven cabinet, kompor gas, grinder, timbangan analitik, inkubator, autoclave, mikroskop, termometer, lampu spiritus, saringan, jarum ose, cawan Petri, labu ukur, Erlenmeyer, pipet volume, corong gelas kimia, gelas ukur, batang pengaduk, pH meter, panik, baki plastik/kotak kue plastik persegi, plastik wrapping/kertas sampul, kapas, perban, aluminium foil dan alat-alat analisis kimia.

Metode penelitian

Penelitian tahap pertama

Persiapan kultur kapang

a. Pemeliharaan bukan murni

Memelihara dan memperbanyak biakan murni *A. terreus* strain FNOC 6039 dan FNOC 6040 dengan menginokulasi secara zig-zag pada media agar miring PADA dan MA dengan menggunakan ose steril secara aseptis. Selanjutnya setelah ditutup lalu diinkubasi pada suhu 30^o C selama 3 - 5 hari. Perbanyak dari biakan murni ini digunakan sebagai kultur stok.

b. Pembuatan inokulum / laru dari nasi

Pembuatan inokulum ini dilakukan dengan cara menginokulasi kultur stok *A. terreus* masing-masing strain FNOC 6039 dan FNOC 6040 ke dalam cawan petri yang berisi nasi setengah matang. Caranya dengan menuangkan 1 ml aquades ke dalam tabung reaksi yang berisi kultur stok tersebut lalu dikocok-kocok dengan ose steril secara aseptis. Setelah itu lalu dituangkan ke dalam cawan petri tersebut dan diaduk sampai rata bercampur dengan nasi. Perbandingan nasi setengah matang dengan kultur stok *A. terreus* adalah nasi setengah matang sebanyak 100 g menggunakan 2 agar miring. Selanjutnya diinkubasi selama 5 - 7 hari pada suhu 30^o C dalam keadaan dibungkus dan diletakkan terbalik. Apabila telah tumbuh spora kapang secara merata pada nasi hari ke-5, maka dapat dikeringkan inokulum tersebut dalam oven pada suhu 40 - 45^o C selama 2 hari, lalu dihancurkan sehingga diperoleh inokulum/laru bubuk. Kemudian inokulum bubuk tersebut dicampurkan dengan tepung beras yang telah disangrai dan disaring. Perbandingan inokulum bubuk dengan tepung beras adalah 19 : 1.

c. Isolasi kapang dari inokulum bubuk / laru

Isolasi kapang dilakukan dengan cara : Menimbang 1 g inokulum bubuk, lalu dilakukan pengenceran sampai dengan 10⁻⁴ dengan menggunakan

buffer fosfat sebanyak 9 ml untuk masing-masing tabung reaksi. Memipet 1 ml untuk masing-masing pengenceran ke dalam cawan petri steril. Memasukkan media PDA (Potato Dextrose Agar) cair (45^o C) sebanyak 15 ml ke dalam cawan petri untuk meratakan penyebaran inokulum dengan cara menggoyang-goyang cawan petri tersebut. Setelah PDA membeku lalu dibungkus dan diinkubasi dalam keadaan terbalik pada suhu 30^o C selama 3 - 5 hari. Apabila telah terbentuk koloni kapang maka dapat diamati kultur kapang meliputi warna spora, ukuran spora, bentuk spora, ketebalan spora, warna miselium dan kecepatan pertumbuhannya. Untuk memperoleh gambar struktur dan identifikasi kapang dapat dilakukan dengan membuat preparat di atas gelas objek yang diberi tetes gliserol 10%, kemudian secara hati-hati menggunakan jarum ose steril mengambil miselium kapang beserta sporanya untuk diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran (lensa 10X dan 45X). Dari isolasi kapang tersebut juga dapat langsung menghitung jumlah total kapang dengan menggunakan suatu standar yang disebut "Standard Plate Count" sehingga mencapai jumlah 5 X 10⁶ spora/g laru.

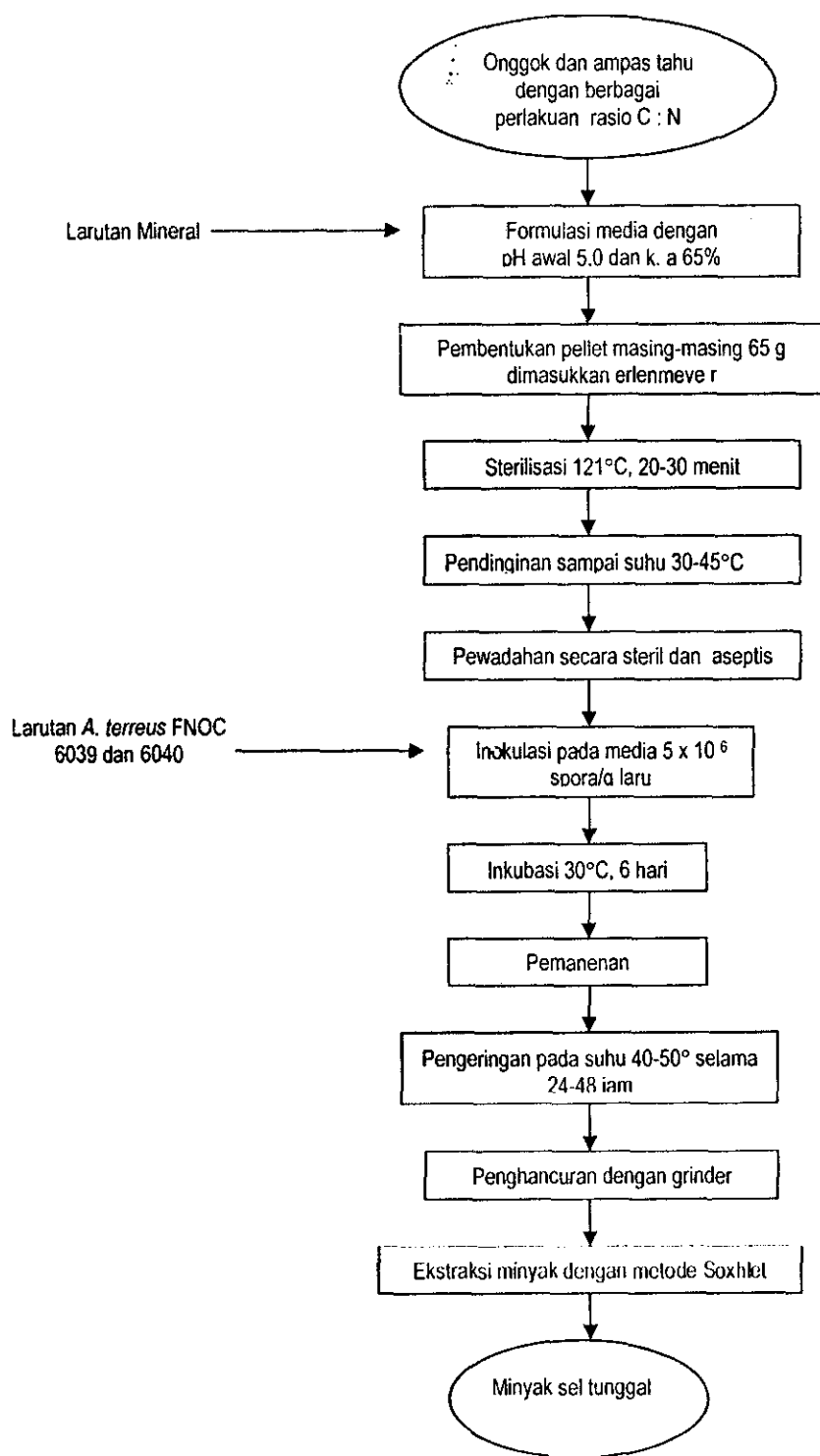
Persiapan media fermentasi

Bahan dasar untuk media fermentasi padat terdiri dari onggok yang digunakan sebagai sumber karbon (C) dan ampas tahu yang digunakan sebagai sumber nitrogen (N). Onggok dan ampas tahu tersebut dikeringkan dan digiling menjadi tepung, kemudian dibuat campuran media padat, yaitu onggok-ampas tahu. Pada campuran media onggok-ampas tahu dilakukan formulasi media berdasarkan perbandingan karbon dan nitrogen (C/N). Penentuan kadar karbon dengan cara memperhitungkan sumber karbon yang berasal dari :

- Gula sebagai glukosa
- Pati (by different), sebagai homopolimer dari glukosa
- Lemak, dengan asumsi merupakan trigliserida sederhana
- Protein yang merupakan polimer asam amino dengan asam amino dominan asam glutamat

Penelitian tahap kedua

Penelitian tahap kedua yang dilakukan adalah melakukan fermentasi padat onggok-ampas tahu dengan berbagai rasio C : N yaitu 25 : 1, 30 : 1, 35 : 1, 40 : 1 dan 45 : 1. Inokulum bubuk/laru yang digunakan adalah *A. terreus* strain FNOC 6039 dan FNOC 6040 dengan suhu pertumbuhan 30^o C dan pH pertumbuhan dalam media 5,0. Diagram Alir Produksi Minyak Sel Tunggal dapat dilihat pada Gambar 1. Cara pembuatan media dengan rasio



Gambar 1. Produksi minyak sel tunggal

C : N yang berbeda-beda dari kedua bahan tersebut adalah sebagai berikut :

Kadar C onggok	= 41,71 g / 100 g onggok
Kadar N onggok	= 0,88 g / 100 g onggok
Kadar C ampas tahu	= 40,87 g / 100 g ampas tahu
Kadar N ampas tahu	= 2,52 g / 100 g ampas tahu

Perbandingan C/N = 25/1 untuk formulasi onggok-ampas tahu (basis : 100 g onggok)

$$\frac{25}{1} = \frac{(0,4171 \times 100) + (0,4087 \times Y)}{(0,0088 \times 100) + (0,0252 \times Y)}$$

$$25 = \frac{(41,71) + (0,4087 Y)}{(0,88) + (0,0252 Y)}$$

$$25((0,88) + (0,0252 Y)) = 41,71 + 0,4087 Y$$

$$22 + 0,63 Y = 41,71 + 0,4087 Y$$

$$0,63 Y - 0,4087 Y = 19,71 - 22$$

$$0,2213 Y = 19,71$$

$$Y = 89,06 \text{ g}$$

Jadi 100 g onggok + 89,06 g ampas tahu

Dengan cara perhitungan serupa diperoleh jumlah penambahan ampas tahu terhadap 100 g onggok pada perbandingan C/N 30,35, 40 dan 45 berturut-turut 89,06, 44,08, 23,05, dan 2,9 g.

Pada tahap ini dilakukan analisis terhadap onggok-ampas tahu awal media siap untuk fermentasi dan media akhir fermentasi serta produksi minyak sel tunggal yang dilakukan meliputi : kadar air, kadar pati, kadar gula total, kadar protein, dan produksi minyak sel tunggal. Prosedurnya adalah sebagai berikut :

Kadar air metode oven (Sudarmadji et al., 1984)

Menimbang sampel sebanyak 2 g dan dimasukkan ke dalam cawan kering yang telah diketahui beratnya. Kemudian dikeringkan dalam oven selama 3 - 5 jam pada suhu 100 - 105^o C. Setelah itu didinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali sampai diperoleh berat yang konstan (selisih berturut-turut < 0,2 mg). Persen kadar air dihitung berdasarkan basis basah dengan rumus :

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{Kehilangan berat (g)}}{\text{Berat sample (g)}} \times 100 \%$$

Kadar pati (Sudarmadji et al., 1984)

Menimbang dengan teliti 3 g sampel. Tambahkan 30 ml air dingin, didiamkan selama 1 jam sambil diaduk-aduk. Saring pada kertas saring, kemudian dicuci sehingga volume totalnya menjadi 250 ml. Filtratnya akan mengandung senyawa-senyawa karbohidrat yang larut dalam air, sedangkan senyawa karbohidrat yang tidak larut terdapat dalam filter. Residunya kemudian direfluks dengan

200 ml HCl 2,5% (20 ml HCl BD 1,12 dalam 200 ml H₂O) selama 2 ½ jam. Dinginkan lalu netralkan campuran tersebut dengan menambahkan larutan NaOH 4 N. Gunakan indikator phenolphthalein 1% selama 5 tetes. Tambahkan air hingga volume mencapai 250 ml (gunakan labu ukur), lalu disaring. Tentukan selanjutnya kadar glukosa menurut metode Luff Schoorl. Kadar pati dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar pati} = \frac{0,90 \times 250 \times \text{kadar glukosa}}{25 \text{ mg sample}} \times 100\%$$

Kadar gula total dengan metode Luff Schoorl (Sudarmadji et al., 1984)

Menimbang bahan sekitar 2,5 g secara teliti dan dimasukkan ke dalam labu ukur 250 ml. Tambahkan 200 ml ethanol 40% atau aquades 50 ml. Kemudian tambahkan 5 ml larutan carez I, lalu digojlog selama 1 menit. Selanjutnya ditambahkan 5 ml larutan carez II dan digojlog lagi selama 1 menit. Tambahkan lagi ethanol 40% atau aquades sampai garis batas. Gojlog sebentar larutannya menjadi homogen lalu disaring. Pipet 50 ml filtrat secara teliti, masukkan dalam gelas kimia, kemudian dievaporasi sampai volumenya menjadi setengahnya. Pindahkan sisa tersebut ke dalam labu ukur 100 ml dengan menggunakan air panas sebagai pembilas. Dinginkan, kemudian ditambahkan air sampai garis batas. Larutan ini kita sebut dengan : Larutan A.

Masukkan 50 ml larutan A ke dalam labu ukur 100 ml. Tambahkan beberapa indikator methyl oranye. Kemudian teteskan HCl 4 N ke dalamnya hingga larutan berubah warna menjadi merah. Tambahkan 15 ml HCl 0,1 N kemudian panaskan selama 30 menit dalam penangas air mendidih. Dinginkan secara cepat sampai 20^o C, kemudian tambahkan 15 ml NaOH 0,1 N. Tambahkan air sampai garis batas, lalu dikocok agar larutannya homogen. Untuk mencegah terjadinya busa pada pemanasan setelah ditambahkan larutan Schoorl, maka tambahkan 1 ml Isopentanol. Larutan ini kita sebut sebagai : Larutan B.

Untuk penentuan kadar gula pereduksi digunakan larutan A, sedangkan untuk penentuan gula total digunakan larutan B.

Pipet 25 ml larutan yang akan diperiksa, dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml. Kemudian tambahkan 25 ml larutan luff schoorl. Tambahkan pula beberapa batu didih, lalu panaskan sampai mendidih (2 menit). Pindahkan labu ke atas kasa asbes dan atur apinya sampai tepat berada di bawah kasa (tidak kena kasa). Pasang pendingin balik, lalu direfluks selama 10 menit. Kemudian didinginkan dengan cepat. Selanjutnya masukkan 10 ml KI 30% dan tambahkan pula 25 ml H₂SO₄ 6 N. Titrasi dengan larutan Na₂S₂O₃ 0,1 N. Bila warna

berubah menjadi kuning, tambahkan indikator amylum 1 ml. Lanjutkan titrasi sampai warna biru tepat berubah putih seperti susu. Membuat juga suatu percobaan blanko dengan menggunakan 25 ml air sebagai pengganti larutan A atau larutan B.

Perhitungan :

Dengan mengetahui selisih antara titrasi blanko dan sampel (jumlah gula), kadar gula total dalam bahan dapat ditentukan dengan melihat pada Tabel Luff Schoorl. Dimana jumlah ml tiosulfat dalam 2,5 g sampel adalah selisih ml blanko dengan sampel X faktor pengenceran. Jumlah ml tiosulfat setara dengan mg gram gula reduksi. Jadi kadar gula total dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar gula total} = \frac{\text{mg gula total}}{2,5 \times 1000} \times 100\%$$

Kadar protein metode Kjeldahl-Mikro (Sudarmadji et al., 1984)

Menimbang 0,5 - 1 g bahan, dimasukkan ke dalam labu kjeldahl. Menambahkan 25 ml H₂SO₄ pekat + katalisator : CuSO₄ 1 g atau Na₂SO₄ atau satu sendok kecil selenium mixture dan 2 - 3 butir batu didih. Lalu dipanaskan dengan api kecil dalam lemari asam dan sesekali digoyang-goyang. Destruksi selesai bila larutan sudah berwarna hijau jernih. Didinginkan dengan cara mengalirkan air ledeng pada tabung. Setelah itu lalu ditambah 50 ml air suling dan dilakukan destruksi lagi selama 30 menit serta didinginkan kembali. Larutan yang telah jernih tersebut lalu dimasukkan dalam labu destilasi, ditambah aquades secukupnya dan 35 ml NaOH 35%, selanjutnya didestilasi perlahan-lahan. Destilatnya ditampung dengan H₃BO₃ 3% (asam borat) yang telah diberi beberapa tetes indikator campuran methyl merah + brom kresol hijau. Destilasi dihentikan bila satu tetes destilat terakhir tidak merubah warna kertas lakmus merah yang dibasahkan dengan air suling. Membilas alat penyuling dengan aquades, air bilasannya dicampur dengan destilat. Kemudian dititrasi dengan HCl 0,1 N sampai terjadi perubahan warna dari hijau menjadi violet. Kadar protein dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{(\text{ml HCL} - \text{ml HCl blanko}) \times \text{N HCl} \times 6,25 \times 14}{\text{mg sample}} \times 100\%$$

$$\text{Kadar nitrogen (\%)} = \frac{(\text{ml HCL} - \text{ml HCl blanko}) \times \text{N HCl} \times 14}{\text{mg sample}} \times 100\%$$

Produksi minyak sel tunggal

Berdasarkan formulasi media campuran onggok-ampas tahu dari rasio C/N yang digunakan, maka media campuran tersebut ditambahkan larutan mineral yang terdiri dari KH₂PO₄, FeCl₃.6H₂O, ZnSO₄.7H₂O, CuSO₄.5H₂O, MnSO₄.H₂O dan CaCl₂.2H₂O masing-masing sebanyak satu tetes dan kemudian dilakukan pengaturan pH awal menjadi pH 5,0. Selanjutnya ditambahkan air hingga mencapai kadar air sekitar 65% dan dicampur merata lalu dibuat pelet dengan diameter 4 mm menggunakan super grider. Masing-masing media sebanyak 65 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer ukuran 500 ml, ditutup dengan kapas dan aluminium foil dan sterilkan pada suhu 121° C selama 20 - 30 menit dalam otoklaf.

Selanjutnya setelah dingin (suhu ± 30° C) masing-masing media diinokulasi dengan inokulum bubuk/luar kapang *A. terreus* FNOG 6039 dan FNOG 6040 dengan jumlah spora 5 X 10⁶ spora/g laru. Kemudian diinkubasi pada suhu 30° C selama 6 hari. Pada hari ke-6 dilakukan pemanenan, setelah itu dikeringkan dalam oven pada suhu 40 - 45° C kemudian dihaluskan. Bahan yang telah halus tersebut lalu diekstraksi dengan metode Soxhlet untuk mendapatkan minyak sel tunggal yang diinginkan.

Kadar lemak/minyak metode soxhlet (Sudarmadji et al., 1984)

Sampel kering yang telah dihaluskan dan ditimbang sebanyak 3 - 5 g lalu dibungkus dengan kertas saring (hull) secara kuantitatif dan diletakkan pada labu soxhlet. Dibawahnya diletakkan labu lemak yang telah diketahui beratnya dan dipasang kondensornya. Pelarut yang digunakan adalah n-Hexana. Panaskan soxhlet tersebut. Ekstraksi dilakukan sampai 10 sirkulasi. Setelah ekstraksi selesai, kemudian pelarut dalam labu lemak didestilasi selanjutnya labu lemak tersebut dipanaskan dalam oven pada suhu 105° C sampai beratnya konstan dan tidak berbau zat pelarut lagi. Kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Kadar lemak/minyak dihitung berdasarkan rumus :

$$\text{Kadar lemak/minyak (\%)} = \frac{\text{Selisih berat labu (g)}}{\text{Berat sample (g)}} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Komposisi kimia onggok dan ampas tahu

Onggok dan ampas tahu yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah padat tapioka dan limbah padat

tahu dengan komposisi kimia seperti tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi kimia onggok dan ampas tahu dalam satuan berat kering

Komposisi kimia	Onggok	Ampas tahu
Kadar Air (%)	6,75	13,83
Kadar Abu (%)	1,09	3,36
Kadar Lemak (%)	2,54	12,10
Kadar Gula Total (%)	0,31	0,23
Kadar Protein (%)	5,51	15,75
Kadar Nitrogen (%)	0,88	2,52
Kadar Pati (%)	83,80	54,73

Kadar air

Perlakuan rasio C : N yang semakin tinggi menghasilkan media onggok-ampas tahu dengan kadar air yang semakin rendah, kecuali rasio C : N = 40 : 1. Kadar air tertinggi diperoleh dari perlakuan rasio C : N = 40 : 1 yaitu 74,53%, sedangkan kadar air terendah diperoleh dari perlakuan rasio C : N = 45 : 1 sebesar 65,23%.

Penurunan kadar air setelah fermentasi yang sejalan dengan semakin tingginya rasio C : N karena besarnya rasio C : N dalam media fermentasi berpengaruh terhadap tersedianya oksigen dalam pengendalian laju pertumbuhan dan produksi metabolit (H₂O dan CO₂).

Menurut Sinthia Prideaka Soekarto (1996), konsentrasi karbon yang terlampaui tinggi pada medium dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme karena adanya perbedaan tekanan osmotik yang dapat mengakibatkan plasmolisis dan penghambatan sintesis

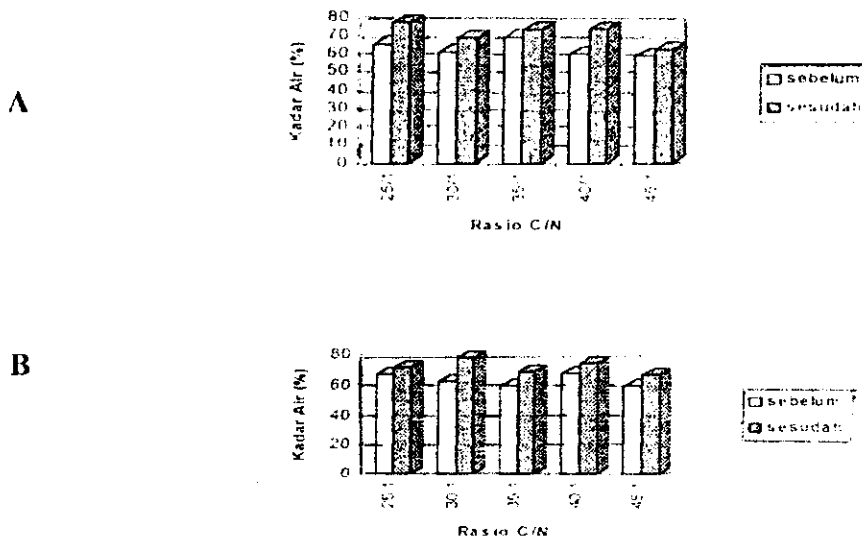
enzim-enzim pada rantai respirasi. Dengan demikian kemampuan *A. terreus* untuk melakukan metabolisme yang menghasilkan uap air menjadi berkurang.

Selama fermentasi berlangsung, terjadi perubahan kadar air pada media onggok-ampas tahu. Perubahan kadar air pada media onggok-ampas tahu sebelum dan sesudah fermentasi dapat dilihat dalam Gambar 2.

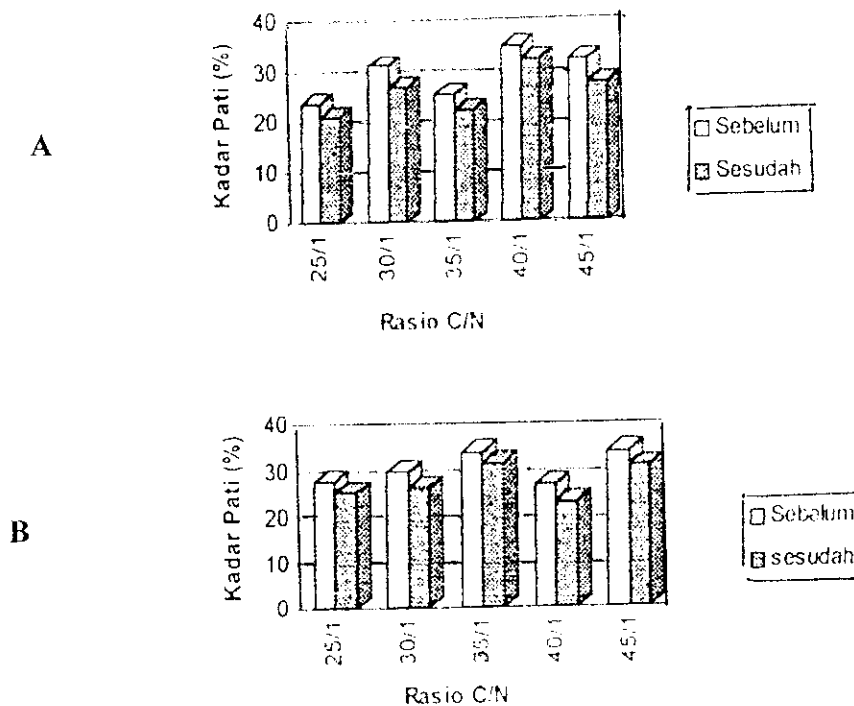
Dari Gambar 2 terlihat bahwa setelah fermentasi berlangsung selama 6 hari terjadi peningkatan kadar air. Meningkatnya kadar air selama fermentasi disebabkan karena kapang yang diinokulasikan pada media melakukan metabolisme yang mengeluarkan uap air, sehingga akan mempengaruhi kadar air media setelah fermentasi.

Kadar pati

Perubahan kadar pati selama proses fermentasi dapat menunjukkan jumlah pati yang digunakan oleh kapang untuk pertumbuhannya dan menghasilkan metabolit lain. Perubahan kadar pati media onggok-ampas tahu sebelum dan sesudah fermentasi dapat dilihat pada Gambar 3. Pada gambar tersebut terlihat bahwa penurunan kadar pati terbesar setelah fermentasi terjadi pada media dengan rasio C : N = 30 : 1 yang diinokulasi oleh strain kapang *A. terreus* FNOC 6039 (31,35% menjadi 26,86%), sedangkan penurunan kadar pati terkecil terjadi pada media dengan rasio C : N = 35 : 1 yang diinokulasi oleh strain kapang *A. terreus* FNOC 6040 (33,99% menjadi 31,50%).



Gambar 2. Kadar air (%) media fermentasi padat onggok-ampas tahu sebelum dan sesudah fermentasi. A. Perubahan kadar air (%) oleh *A. terreus* FNOC 6039; B. Perubahan kadar air (%) oleh *A. terreus* FNOC 6040.



Gambar 3. Kadar pati (%) media fermentasi padat ongkok-ampas tahu sebelum dan sesudah fermentasi. A. Perubahan kadar pati (%) oleh *A. terreus* FNOc 6039; B. Perubahan kadar pati (%) oleh *A. terreus* FNOc 6040.

Penurunan kadar pati disebabkan karena berlangsungnya proses hidrolisis pati menjadi gula-gula sederhana oleh enzim pemecah pati yang dihasilkan oleh *A. terreus*. Hal tersebut menunjukkan terjadinya pertumbuhan sel pada fase logaritmik, dimana semua nutrisi digunakan untuk keperluan metabolisme pertumbuhan sel.

Rahman (1992) menyatakan bahwa selama pertumbuhan mikroorganisme *oleaginous*, yaitu pertumbuhan (pembentukan sel-sel) kapang akan terhenti pada fase awal stasioner. Mulai saat itu konsumsi gula akan dipakai untuk pembentukan metabolit primer, diantaranya adalah biosintesis asam lemak.

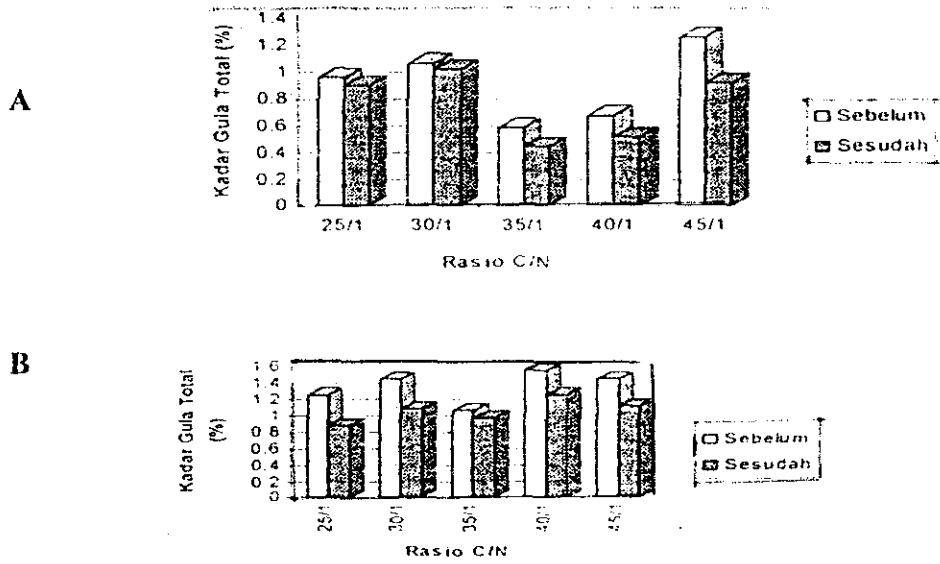
Kadar gula total

Besarnya rasio C : N pada setiap strain kapang *A. terreus* memberikan pengaruh yang nyata terhadap kadar gula total, kecuali pada rasio C : N = 25 : 1, dimana strain kapang *A. terreus* FNOc 6039 tidak berbeda nyata dengan FNOc 6040. Hal ini diduga karena selama proses fermentasi terjadi pemanfaatan gula oleh kapang *A. terreus* yang merupakan hasil penguraian pati untuk selanjutnya akan dikonversi menjadi lemak atau minyak.

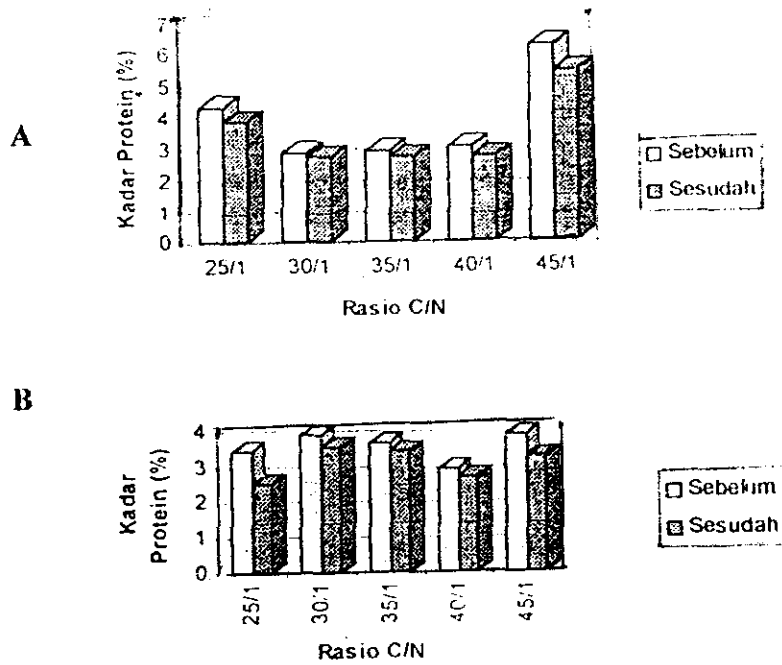
Gambar 4 terlihat bahwa kadar gula total media ongkok-ampas tahu mengalami penurunan setelah 6 hari fermentasi. Penurunan kadar gula terbesar terjadi pada media ongkok-ampas tahu dengan rasio C : N = 25 : 1 yang diinokulasi oleh kapang *A. terreus* FNOc 6040 (dari 1,25% menjadi 0,87%). Penurunan terkecil terjadi pada media ongkok-ampas tahu dengan rasio C : N = 30 : 1 yang diinokulasi oleh kapang *A. terreus* FNOc 6039 (dari 1,06% menjadi 1,02%).

Penelitian Sutrisno (1987) dalam Hetianti (1994) juga menunjukkan bahwa kadar gula akan meningkat terus sampai mencapai keadaan maksimum dan akhirnya menurun lagi sampai akhir fermentasi. Terjadi peningkatan kadar gula merupakan hasil hidrolisis pati oleh enzim-enzim hidrolase. Peningkatan kadar gula yang nyata sampai hari keempat fermentasi sesuai dengan penurunan kadar pati yang nyata pula.

Hal ini sesuai dengan teori akumulasi lemak dalam Rahman (1992) bahwa selama pertumbuhan mikroorganisme *oleaginous*, yaitu pertumbuhan (pembentukan sel-sel) kapang akan berhenti sampai pada awal fase stasioner. Mulai saat itu konsumsi gula akan dipakai untuk pembentukan metabolit primer, diantaranya adalah biosintesis asam lemak.



Gambar 4. Kadar Gula Total (%) Media Fermentasi Padat Onggok-Ampas Tahu Sebelum dan Sesudah Fermentasi. A. Perubahan Kadar Gula Total (%) oleh *A. terreus* FNOC 6039; B. Perubahan Kadar Gula Total (%) oleh *A. terreus* FNOC 6040.



Gambar 5. Kadar Protein (%) media fermentasi padat onggok-ampas tahu sebelum dan sesudah fermentasi. A. Perubahan kadar protein (%) oleh *A. terreus* FNOC 6039; B. Perubahan kadar protein (%) oleh *A. terreus* FNOC 6040.

Kadar protein

Besarnya rasio C : N pada setiap strain kapang *A. terreus* memberikan pengaruh yang nyata terhadap kadar protein, kecuali pada rasio C : N = 40 : 1, dimana strain *A. terreus* FNOC 6039 tidak berbeda nyata dengan FNOC 6040. Hal ini diduga karena strain kapang *A. terreus* mempunyai kemampuan yang tinggi untuk merombak sumber nitrogen yang ada menjadi protein pada medium ongkok-ampas tahu.

Menurut Rahman (1992), apabila nitrogen telah habis dalam medium fermentasi, maka karbon yang berlebih tersebut akan terus dikonsumsi oleh mikroorganisme *oleaginous* dan akhirnya karbon tersebut dikonversi menjadi lemak. Dengan demikian tingginya kadar protein pada media ongkok-ampas tahu tentunya akan mempengaruhi pertumbuhan sel kapang dan pembentukan miselium kapang sehingga akan berpengaruh besar pada proses akumulasi lemak kapang.

Dari Gambar 5 terlihat bahwa kadar protein media ongkok-ampas tahu juga mengalami penurunan seperti halnya kadar pati dan gula total setelah 6 hari fermentasi. Penurunan kadar protein terbesar terjadi pada media ongkok-ampas tahu dengan rasio C : N = 45 : 1 yang diinokulasi oleh kapang *A. terreus* FNOC 6039 (dari 6,26% menjadi 5,47%). Penurunan kadar protein terkecil terjadi pada media ongkok-ampas tahu dengan rasio C : N

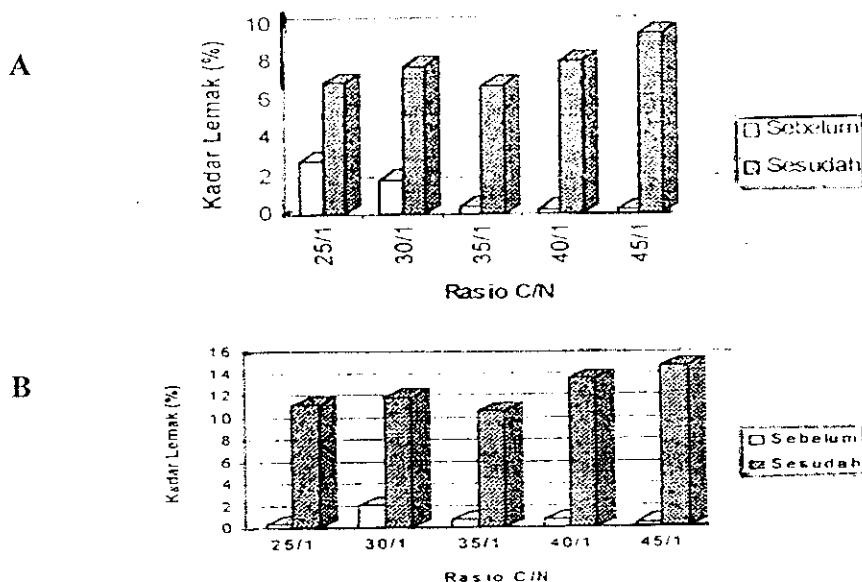
= 35 : 1 yang diinokulasi oleh kapang *A. terreus* FNOC 6039 (dari 2,96% menjadi 2,75%).

Produksi minyak sel tunggal

Strain kapang *A. terreus* yang dikombinasikan dengan rasio C : N tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap produksi minyak sel tunggal. Secara mandiri, baik strain kapang *A. terreus* maupun rasio C : N menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap produksi minyak sel tunggal.

Pada Gambar 6 memperlihatkan perubahan kadar lemak/minyak pada media ongkok-ampas tahu sebelum dan sesudah fermentasi. Terlihat bahwa terjadi peningkatan kadar lemak/minyak setelah 6 hari fermentasi. Peningkatan kadar lemak/minyak tertinggi terdapat pada media ongkok-ampas tahu dengan rasio C : N = 45 : 1 yang diinokulasi oleh kapang *A. terreus* FNOC 6040 sebesar 14,63%.

Hal ini erat kaitannya dengan kemampuan strain kapang yang tumbuh untuk mengakumulasi substrat menjadi lemak dalam jaringan intraselulernya dan adanya aktivitas spesifik enzim lipase yang dimilikinya. Strain kapang *A. terreus* FNOC 6040 diduga mempunyai kemampuan yang tinggi dalam mengkonversi sumber C dan N yang tersedia menjadi minyak sel tunggal, dibandingkan strain kapang *A. terreus* 6039.



Gambar 6. Kadar Lemak (%) media fermentasi padat ongkok-ampas tahu sebelum dan sesudah fermentasi. A. perubahan kadar lemak (%) oleh *A. terreus* FNOC 6039; B. Perubahan kadar lemak (%) oleh *A. terreus* FNOC 6040.

Rasio C : N yang tinggi dalam media berarti ketersediaan sumber karbon dan nitrogen lebih banyak dan aktivitas spesifik lipase pun semakin besar sehingga dapat mendukung pertumbuhan sel kapang, metabolisme dan dapat meningkatkan kemampuan kultur kapang untuk mengakumulasi lemak intraselulernya.

Seiama metabolisme berlangsung, sumber C yang tersedia merupakan bentuk simpan yang ideal untuk surplus energi metabolik. Selanjutnya bersama sitrat, Co-A dan ATP (sitrat liase) membentuk asetil Co-A, oxaloasetat dan ADP + Pi. Dengan bantuan asetil Co-A karboxilase kemudian membentuk malonil Co-A yang menghasilkan asam lemak kompleks dan lemak.

Menurut Rahman (1992), akumulasi lemak yang terjadi pada mikroorganisme *oleaginous* mengikuti pola 2 tahap yaitu tahap pertama ialah perkembangbiakan sel dengan laju maksimum yang berlangsung terus sampai nutrisi selain karbon, biasanya nitrogen telah habis dalam medium. Kemudian karbon yang berlebih tersebut akan terus dikonsumsi oleh mikroorganisme *oleaginous* dan pada akhirnya karbon tersebut dikonversi menjadi lemak. Minyak kapang *A. terreus* yang dihasilkan berbau amis (*fishy flavor*) yang disebabkan oleh interaksi trimetil-amin oksida (NMe₃) dengan ikatan rangkap dari lemak tidak jenuh. Trimetil-amin oksida terbentuk akibat oksidasi trimetil-amin oleh peroksida (Ketaren, 1986).

KESIMPULAN

Strain kapang *Aspergillus terreus* dan rasio C : N memberikan pengaruh terhadap kadar air, kadar pati, kadar gula total dan kadar protein media fermentasi ongkok-ampas tahu. Strain kapang *A. terreus* yang paling berpotensi untuk memproduksi minyak sel tunggal adalah FNOC 6040 dan rasio C : N = 45 : 1 dengan nilai rata-rata kadar minyak sebesar 14,63%, warna minyak kuning kecoklatan dan berbau amis (*fishy flavor*).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional RI yang telah memberikan dana pada penelitian ini melalui Proyek Penelitian Ilmu Pengetahuan Dasar dengan Nomor Kontrak 12/P21PT/DPPM/PID/III/2003.

DAFTAR PUSTAKA

- Bajpai, P. dan Bajpai, P.K. 1993. Eicosapentaenoic Acid (EPA) Production from Microorganism : a review. *Journal of Biotechnology*. 30 (1993) : 161 – 183.
- Birch. G.G., Porker, K.J. and Worga, J.T. 1976. *Food From Waste*. Applied Science Pubs. Ltd London.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. PAU. Pangan dan Gizi IPB. Bogor.
- Evans, C.A. and Ratledge, C. 1985. A Comparison of The Oleaginous Yeast, *Candida curvata*, Grown on Different Carbon Sources a Continuous and Batch Culture. *Lipids* Vol. 18, No. 9.
- Helianti. 1994. Pemanfaatan Ampas Tahu, Ongkok dan Dedak Untuk Produksi Pigmen Angkak oleh *Monascus purpureus* BC 88202 dengan Sistem fermentasi Padat. Skripsi. FATETA, IPB. Bogor.
- Ketaren, S. 1986. Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Kyle, D.J dan Ratledge, C. 1992. Industrial Application of Single Cell Oils. P.G.I. American Oil Chemists Society Champaign. Illinois.
- Nuraida, L., N.L. Puspitasari, F.G. Winarno, Swandoko dan F. Kusnandar. 1995. Produksi Asam Gamma Linolenat oleh Kapang *Mucor*. *Buletin Teknologi Industri Pangan*. 6 (33) : 66 – 73.
- Rahman, A. 1989. Pengantar Teknologi Fermentasi. Mikrobiologi Pangan dan Gizi PAU. Bogor.
- Suliantari, L., Nuraida, N. Andarwulan, Djuhanawati dan Nugrahaningrum. 1996. Microbial Produksi Asam Gamma Linolenat menggunakan *Rhizopus*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*, Vol. 1 (2) : 45 – 49.