

EFEK KONDISI PERTUMBUHAN TERHADAP PRODUKSI β -GLUKAN OLEH *EPICOCCUM NIGRUM* SECARA KULTUR BATCH DALAM *CONTINUOUSLY STIRRED TANK REACTOR* (CSTR)

Influence of Culture Conditions on β -glucan Production from Epicoccum nigrum Under a Batch Culture in Continuously Stirred Tank Reactor (CSTR)

Jayus¹⁾, Sony Suwasono¹⁾ dan Giyarto¹⁾

¹⁾ Dosen Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember
Email: jayus.ftp@unej.ac.id

ABSTRACT

Batch culture fermentation in CSTR system was operated under different agitation speeds and aeration rates in attempt to optimize production of β -glucan from *Epicoccum nigrum*. It was found that its production was influenced by both of the agitation speed and aeration rate. However, the yields obtained were lower compared to that in shake flask culture, indicating that *E. nigrum* is sensitive to agitation speed and aeration rate.

Key words : *E. nigrum*, β -glucan, batch culture fermentation in CSTR

PENDAHULUAN

Epicoccum nigrum adalah fungi berbentuk filamen yang dapat diisolasi dari udara, dan di lahan yang banyak terdapat tanaman keras. Fungi ini telah dilaporkan dapat memproduksi β -glukan dengan struktur yang khas. β -glukan yang dihasilkan memiliki frekuensi percabangan lebih banyak, bercabang dengan ikatan (1→6) dan ikatan (1→3) pada rantai utama karbon. Dua rantai cabang terbentuk pada setiap tiga residu rantai utama (Schmid *et al.*, 2001). Uji sifat fisik dan kimianya yang berkaitan dengan aplikasi β -glukan ini untuk pengembangan industri belum banyak dilakukan. β -Glukan hasil sekresi *E. nigrum* ini telah dilaporkan dapat berfungsi sebagai senyawa antitumor. Rendemen produksi β -glukan oleh fungus ini cukup menjanjikan, 3-5 g/l dalam kultur *shake flask* (Schmid *et al.*, 2001), namun kondisi kultur pertumbuhan untuk mengoptimalkan produksinya belum dilakukan. Beberapa kendala pada produksi β -glukan dari fungi antara lain yaitu terjadinya penurunan rendemen akibat degradasi oleh enzim pemecah glukan yang dihasilkan oleh fungi itu sendiri, seperti terjadi pada produksi pullulan oleh *Aureobasidium pullulan*

(Campbell *et al.*, 2003). Kendala lainnya adalah perubahan morfologi fungi akibat perbedaan kondisi pertumbuhan. Perubahan morfologi jamur ini dapat mempengaruhi rendemen produksinya (Jayus *et al.*, 2002). Oleh karena itu, mengetahui kondisi optimal bagi pertumbuhan *E. nigrum* sangat berarti bagi upaya peningkatan rendemen produksi β -glukan. Tulisan ini membahas hasil penelitian tentang efek kondisi pertumbuhan terhadap produksi β -glukan oleh *E. nigrum*.

METODA PENELITIAN

Pemeliharaan Kultur *Epicoccum nigrum*

Kultur mikroba *Epicocum nigrum* Ehrenb. Ex Schlecht akan diperoleh dari Culture Collection of University of La Trobe (Australia) dalam bentuk kultur tanah. Fungi ini ditumbuhkan dalam cawan petri yang berisi media Malt Extract Agar (MEA) (Oxoid) pada suhu 40°C selama 48 jam.

Pertumbuhan *Epicoccum nigrum* dalam Fermentor

Sistem ini digunakan untuk meningkatkan skala produksi β -Glukan. Fermentasi *Epicoccum nigrum* dilakukan

dalam fermenter volume satu yang dilengkapi dengan pengaduk kontinu (aplikon) dan 2 impeler Ruston 6-blade. pH pertumbuhan akan dimonitor menggunakan Ingold pH probe dan dikontrol secara otomatis dengan penambahan 2 M HCl atau 2 M NaOH menggunakan pH controller.

Fermentasi *Epicoccum nigrum* dilakukan dalam fermenter (merk: aplikon) volume kerja 1L yang dilengkapi dengan 2 impeler Ruston 6-blade. pH pertumbuhan dimonitor menggunakan Ingold pH probe dan dikontrol secara otomatis dengan penambahan 2 M HCl atau 2 M NaOH menggunakan pH controller. *Epicoccum nigrum* ditumbuhkan pada substrat tetes tebu sebagai sumber karbon dengan penambahan natrium nitrat sebagai sumber N. Beberapa parameter operasi fermenter divariasikan sesuai perlakuan diantaranya adalah kecepatan agitasi (100, 300 dan 500 rpm) dan laju aerasi (0,0; 0,3 dan 0,6 vvm)

Evaluasi Aktivitas Enzim dalam Media Pertumbuhan

Aktivitas enzim β -glukanase diuji menggunakan substrat yang sesuai, yaitu (a) laminarin atau scleroglukan untuk aktivitas β -(1 \rightarrow 3)-glukanase, (b) pustulan untuk β -(1 \rightarrow 6)-glukanase. Pengujian dilakukan dalam larutan buffer 50 mM natrium asetat pH 5,0 dengan konsentrasi masing-masing substrat sebanyak 4 mg/ml pada suhu 40 °C selama 30 menit. Jumlah total gula reduksi yang dibebaskan diestimasi menggunakan metode Nelson–Somogyi. Satu unit enzim β -glukanase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang mampu memecah substrat dan menghasilkan 1 μ mol glukosa equivalent per menit pada suhu 40 °C. Sedangkan aktivitas enzim lainnya (β -Glukosidase, β -Galaktosidase) diuji dengan cara ditambahkan ke dalam 50 mM larutan buffer Na-asetat pH 5,0 yang

mengandung *p*-NP- β -glucopyranoside atau *p*-NP- β -galactopyranoside sebagai substrat. Inkubasi dilakukan pada suhu 40°C selama 10 menit. Jumlah *p*-nitrophenyl (kromatogram kuning) yang dibebaskan dapat dilihat dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 510 nm. Satu unit enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang mampu memecah substrat dan menghasilkan 1 μ mol *p*-nitrophenol per menit pada suhu 40 °C.

Analisis Kualitatif dan Kuantitatif Produk Fermentasi

Sampel yang mengandung β -glukan diendapkan menggunakan pelarut etanol (2:1) setelah dilakukan pemisahan biomassa dan filtratnya dengan sentrifugasi 8000 g. Gumpalan β -glukan kemudian ditempatkan dalam membran dialisis untuk memisahkan sisa-sisa substrat yang terikat sebelum dilakukan pengeringan pada *freeze drier*. Kemungkinan munculnya turunan β -glukan selama fermentasi diuji secara kualitatif menggunakan kromatografi lapis tipis (TLC) dan secara kuantitatif melalui pembacaan TLC menggunakan TLC Scanner. TLC-Silica menggunakan pelarut (fase bergerak) campuran *n*-butanol, pyridine dan air dengan pendeteksi campuran diphenylamine, aniline dan asam fosfat.

Pemurnian Produk Fermentasi

Filtrat dari hasil fermentasi dengan fermenter yang menghasilkan produk terbanyak dimurnikan dalam kolom LC (2,5 x 50 cm) yang berisi karbon aktif. Filtrat hasil fermentasi dimasukkan ke dalam kolom LC, selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan menggunakan pelarut etanol dengan konsentrasi gradien 2 – 50% (v/v). Fraksinasi diharapkan dapat mengidentifikasi glukan dan turunannya (gentio-oligosakarida, ello-oligosakarida, dan glukosa).

Faktor Pertumbuhan *Lactobacilli*

Pengujian prebiotik dilakukan dengan menggunakan bakteri asam laktat, species *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* dan *L. lactis* yang ditumbuhkan pada media spesifik (MRS-Broth) dengan atau tanpa penambahan senyawa produk Glukan dan turunannya, dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam. Kurva kecepatan pertumbuhan spesifik dan perubahan pH selama pertumbuhan diamati.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan dan Produksi β -glukan oleh *Epicoccum nigrum* dalam CSTR

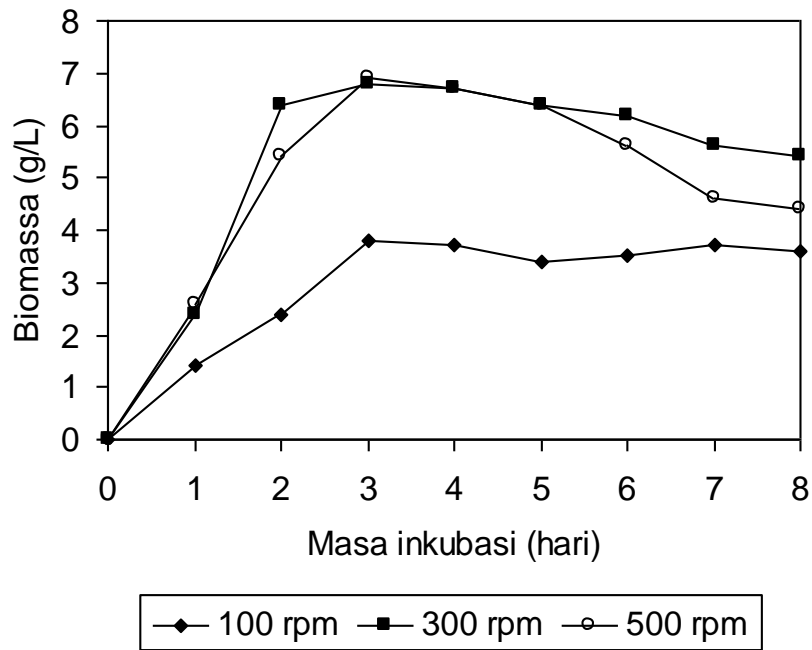
Pertumbuhan *E. nigrum* dalam media tetes tebu dipengaruhi oleh kecepatan agitasi yang diberikan (**Gambar 1**). Semakin tinggi kecepatan agitasi yang diberikan semakin tinggi pula biomassa yang terbentuk. Walau demikian, biomassa yang terbentuk pada agitasi 500 rpm tidak berbeda nyata dengan biomassa pada kecepatan 300 rpm. Perbedaan hanya terjadi pada akhir masa fermentasi dimana pada 500 rpm terjadi penurunan biomassa yang cukup drastis. Penyebab dari terjadinya penurunan biomassa ini sering dikaitkan dengan terjadinya proses autolysis yang banyak terjadi pada pertumbuhan mikroorganisme jamur atau fungi (Znidarsic & Pavko, 2001).

Seiring dengan pertumbuhan *E. nigrum*, produksi β -glukan pada media tetes tebu dalam fermenter CSTR juga dipengaruhi oleh kecepatan agitasi. Produksi β -glukan meningkat jika kecepatan agitasi ditingkatkan dari 100 rpm menjadi 300 rpm, tetapi kemudian produksinya menurun jika kecepatan agitasi ditingkatkan menjadi 500 rpm (**Gambar 2**). Walau demikian produksi tertinggi dalam kultur CSTR ini masih berada dibawah rendemen β -glukan yang dihasilkan pada kultur teraduk saja (shake

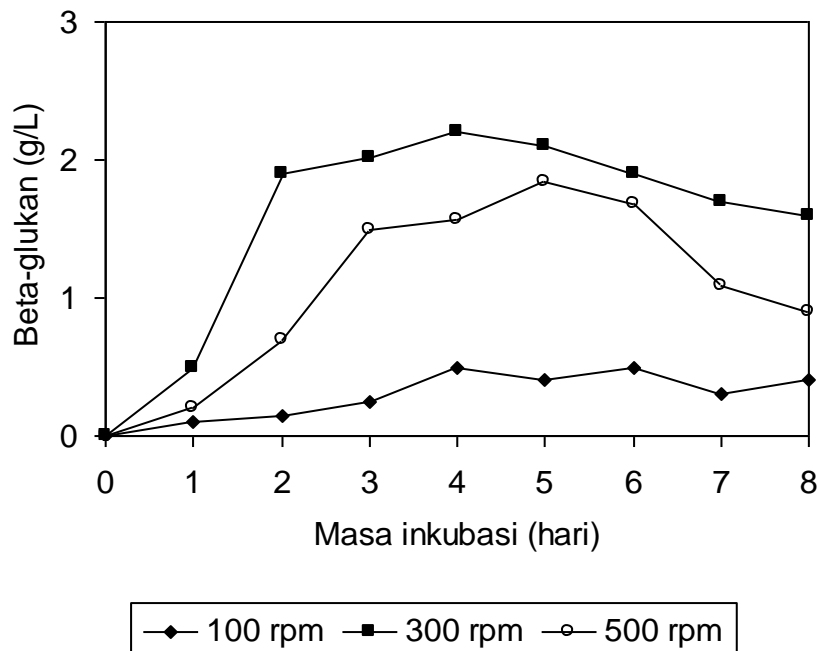
flask). Hasil pengamatan semacam ini mengindikasikan bahwa *E. nigrum* tergolong mikroorganisme yang sensitif terhadap pengadukan keras dalam CSTR. Sensitivitas *E. nigrum* ini dapat menyebabkan rendahnya produktivitas metabolit yang diekskresikan. Kasus semacam ini pernah terjadi pada jamur lain yang memproduksi ekstraselluler metabolit seperti *Aspergillus niger* (Wongwicharn et al, 1999), *Penicillium variable* (Petruccioli et al., 1995) dan *Trichoderma reesei* (Lejeuni & Baron, 1995). Lebih rendahnya rendemen β -glukan pada kultur CSTR dibanding *shake flask* menandakan bahwa CSTR tidak cocok untuk pengembangan produksi β -glukan dari *E. nigrum*. Pencarian alternatif jenis fermenter sangat perlu untuk dilakukan seperti penggunaan fermenter *airlift* yang tidak menggunakan pengadukan oleh *agitator* yang sangat kasar. Hal ini untuk mengantisipasi kemungkinan sifat *E. nigrum* yang sensitif pada *shear*.

Efek Aerasi pada Pertumbuhan dan Produksi β -glukan oleh *Epicoccum nigrum* dalam CSTR

Pemberian aerasi pada kultur *E. nigrum* nampaknya dapat memperbaiki daya tumbuh *E. nigrum* dan rendemen β -glukan yang dihasilkan (**Gambar 3**). Pemberian aerasi sebesar 0.3 vvm dapat meningkatkan biomassa yang terbentuk. Walau demikian, biomassa yang terbentuk akan menurun dengan pemberian aerasi yang lebih tinggi lagi (0,6 vvm). ini menandakan bahwa *E. nigrum* memerlukan konsentrasi oksigen tertentu untuk memproduksi pertumbuhannya. Tetapi jika pemberian oksigen berlebih, pertumbuhannya menjadi terhambat. Selain itu, dimungkinkan perbedaan pertumbuhan itu disebabkan oleh sensitivitas kepekaan *E. nigrum* terhadap daya *shear* oleh media yang teraerasi.



Gambar 1. Biomassa *Epicoccum nigrum* pada media tetes tebu dengan kecepatan agitasi yang berbeda tanpa diberi perlakuan aerasi



Gambar 2. Produksi β -glukan oleh *Epicoccum nigrum* pada media tetes tebu dengan kecepatan agitasi yang berbeda tanpa diberi perlakuan aerasi

Sama halnya dengan pertumbuhan *E. nigrum*, produksi β -glukan juga dipengaruhi oleh tingkat laju aerasi yang diberikan. Produksi β -glukan meningkat pada aerasi 0.3 vvm, tetapi dengan aerasi yang lebih tinggi lagi (0.6 vvm)

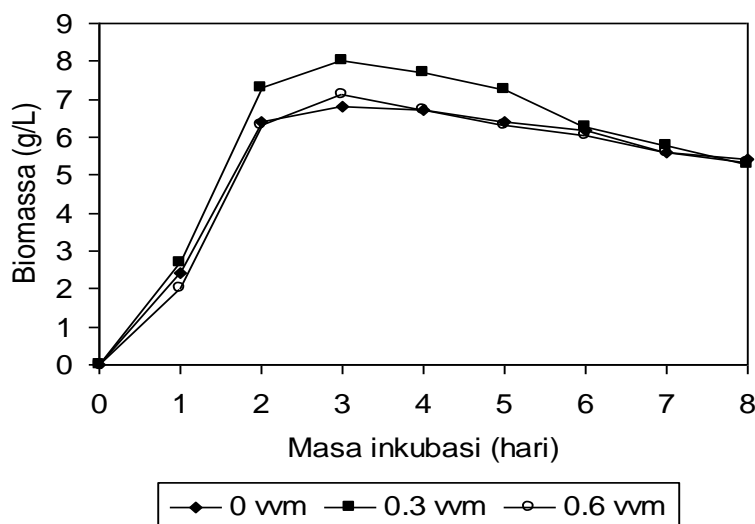
produksi menurun lagi (**Gambar 4**). Adanya perbedaan produksi akibat perbedaan aerasi ini tidak serta merta bahwa produksi β -glukan oleh *E. nigrum* adalah sensitif terhadap ketersediaan O_2 . Dalam fermentasi *batch* jenis ini tidak

dapat diketahui secara pasti faktor penyebab perubahan produksi yang terjadi akibat *shear* atau secara tidak langsung akibat ketersediaan O₂ dalam medium, sebab jika kecepatan agitasi berubah nilai laju transfer O₂ spesifik (kLa) sistem juga akan berubah. Penurunan produksi bisa juga terjadi akibat perbedaan biomassa yang terbentuk karena biomassa yang terbentuk pada kecepatan agitasi yang bervariasi juga berbeda. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengujian efek oksigen terlarut dengan kecepatan agitasi yang terkontrol serta pengujian perbedaan kondisi lingkungan fermentasi ini pada sistem kontinu dimana suatu faktor dapat dilihat pengaruhnya tanpa adanya interferensi dari laju pertumbuhan maupun faktor lingkungan lainnya yang dapat dikontrol pada kultur kontinu.

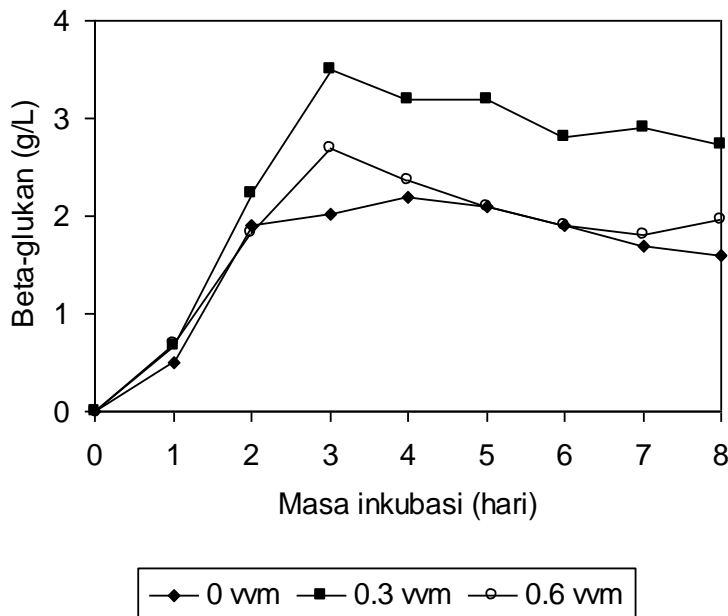
Evaluasi Aktivitas Enzim dalam Media Pertumbuhan

Hasil evaluasi aktivitas enzim-enzim pemecah β -glukan dan β -glukanase pada filtrat hasil fermentasi tetes tebu oleh *E. Nigrum* menunjukkan hasil yang negatif. Inkubasi filtrat dengan substrat β -glukanase seperti laminarin atau scleroglucan untuk aktivitas β -(1 \rightarrow 3)-

glukanase, pustulan untuk aktivitas β -(1 \rightarrow 6)-glukanase maupun aktivitas enzim lainnya seperti β -glukosidase dan β -galaktosidase, semuanya tidak menunjukkan adanya hasil pemecahan β -glukan. Tidak terdeteksinya aktivitas enzim ini bisa disebabkan oleh beberapa hal. Pertama, *E. Nigrum* memang tidak menghasilkan enzim-enzim tersebut karena tidak semua mikroorganisme jamur penghasil polisakarida ekstraselluler juga menghasilkan enzim pemecah metabolit. Tidak semua jamur dari genus *Acremonium* dan *Chepalosporium* yang menghasilkan β -glukan juga menghasilkan enzim pemecah β -glukan (Pitson et al., 1997). Penyebab lainnya adalah terjadinya inaktivasi enzim yang diproduksi oleh *E. nigrum* segera setelah enzim tersebut tersekresi baik akibat adanya agitasi maupun aerasi. Inaktivasi enzim yang terproduksi cepat dapat disebabkan oleh faktor mekanik yang terjadi selama proses fermentasi berlangsung, dan atau oleh aktivitas protease yang dihasilkan oleh jamur *E. nigrum*. Kasus inaktivasi enzim oleh protease semacam ini juga pernah terjadi pada jamur *Acremonium persicinum* (Pitson et al., 1997).



Gambar 3. Biomassa *E.nigrum* dalam media tetes tebu pada kecepatan agitasi 300 rpm dan perbedaan perlakuan laju aerasi



Gambar 4. Produksi β -glukan oleh *E.nigrum* dalam media tetes tebu pada kecepatan agitasi 300 rpm dan perbedaan perlakuan laju aerasi

Analisis Kualitatif Produk Fermentasi

Gumpalan β -glukan hasil pengendapan menggunakan pelarut etanol (2:1) setelah dialisis untuk memisahkan sisa-sisa substrat ternyata hanya terdiri dari satu jenis polisakarida. Ini terbukti setelah dilakukan pelarutan kembali dan diuji secara kualitatif pada lembar kromatografi lapis tipis (TLC) hanya muncul satu titik tepat pada titik awal elusi dari larutan β -glukan. Hal ini menandakan bahwa jenis glukan yang terendapkan oleh etanol hanya satu jenis. Selama proses fermentasi berlangsung tidak terjadi pemutusan atau pemotongan polimer β -glukan yang terekresi oleh *E. nigrum* secara acak atau random. Pemotongan polimer polisakarida secara random yang menghasilkan polisakarida atau oligosakarida biasanya dilakukan oleh enzim endoglukanase (Martin, 2003). Kemungkinan tidak terjadinya pemotongan polimer secara acak ini didukung oleh pengamatan pada TLC terhadap filtrat sisa fermentasi yang hanya menghasilkan dua titik yang terdiri atas polisakarida β -glukan dan satu titik yang

diduga adalah glukosa. Glukosa ini bisa saja berasal dari sisa glukosa dari substrat atau dari hasil pemecahan β -glukan secara ekso oleh enzim eksoglukanase sehingga rendemen glukan dalam filtrat menurun. Kasus penurunan rendemen β -glukan selama proses fermentasi ini pernah juga terjadi pada produksi pullulan oleh *Aureobasidim pullulan* (Campbell *et al.* 2003). Tentu saja dugaan ini perlu dibuktikan dengan adanya sekresi enzim eksoglukanase oleh *E. Nigrum*

KESIMPULAN

Produksi β -glukan oleh *E. nigrum* dalam CSTR dipengaruhi oleh kecepatan agitasi dan laju aerasi. Rendemen tertinggi diperoleh pada pertumbuhan dengan kecepatan agitasi 300 rpm dan laju aerasi 0,3 vvm. *E. nigrum* kemungkinan peka terhadap agitasi dan aerasi karena biomassa dan rendemen yang diperoleh pada kondisi pertumbuhan ini dalam CSTR lebih rendah dibanding dengan biomassa dan rendemen yang dihasilkan pada kultur batch dalam *shake flask*.

SARAN

Untuk memperkuat kajian keilmuan dan prospek teknologi terapan dari temuan hasil penelitian ini, ada beberapa hal yang perlu dipertimbangkan. Pertama, perlunya pencarian tipe fermenter yang cocok seperti *airlift* fermenter atau yang lain untuk meningkatkan rendemen produksi β -glukan oleh *E. nigrum*. Kedua, percobaan produksi β -glukan oleh *E. nigrum* melalui fermentasi secara kontinyu perlu dilakukan mengingat produksi β -glukan secara batch berhubungan dengan pertumbuhan biomassa. Proses fermentasi secara kontinyu biasanya tepat untuk produk yang bersifat *growth associated*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional atas dukungan dana yang telah diberikan untuk terlaksananya penelitian ini.

PUSTAKA

- Campbell BS, McDougall BM and Seviour RJ (2003). Why Do Exopolysaccharide Yields from the Fungus *Aureobasidium Pullulanfall* during Batch Culture Fermentation?. *Journal of Enzyme and Microbial Technology* 33: 104-112.
- Jayus, McDougall BM and Seviour RJ (2002). Factors Affecting the Synthesis of (1 \rightarrow 3) and (1 \rightarrow 6)- β -Glucanase by the Fungus *Acremonium* sp. IMI 383068 Grown in Batch Culture. *Journal of Enzyme and Microbial Technology* 31: 289-299.
- Lejeune R and Baron GV (1995). Effect of Agitation on Growth and Enzyme Production of *Trichoderma Reesei* in Batch Fermentation. *Journal of Applied Microbiology and biotechnology* 43: 249-258.
- Martin K (2003). *Studies on β -Glucan Degrading Enzymes in Fungi*. PhD Thesis. La Trobe University. Victoria. Australia.
- Petruccioli M, Fenice M, Piccioni P, and Federici F (1995). Effect of Stirrer Speed and Buffering Agents on the Production of Glucose Oxidase and Catalase by *Penicillium Variabile* (P16) in Benchtop Bioreactor. *Journal of Enzyme and Microbial Technology* 17: 336-339.
- Pitson SM, Seviour RJ, and McDougall BM (1997). Production of β -Glucan Degrading Enzymes by *Acremonium* and *Chepalosporium* Species. *Journal of Mycological Research* 110: 153-158.
- Schmid F, Stone BA, McDougall BM, Bacic A, Martin KL, Brownlee RTC, Chai E and Seviour RJ (2001). Structure of Epiglucan, A Highly Side-Chain/Branched (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -Glucan from the Micro Fungus *Epicoccum Nigrum* Ehrenb. Ex Schlecht. *Journal of Carbohydrate Research* 331: 163-171.
- Wongwicharn A, Harvey LM, and McNeil B (1999). Secretion of Heterologous and Native Protein, Growth and Morphology in Batch Cultures of *Aspergillus Niger* B1-D at Varying Agitation Rates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 74:821-828.
- Znidarsic P and Pavko A (2001). The Morphology of Filamentous Fungi in Submerged Cultivation as A Bioprocess Parameter. *Journal of Food Technology and Biotechnology* 39: 237-252.