

OPTIMASI MEDIA FERMENTASI *Aspergillus oryzae*, PENGHASIL ANTIJAMUR PATOGEN BUAH KAKAO *Phytophthora palmivora*

Fermentation Medium Optimization of *Aspergillus oryzae*, Antifungals Producer for Cacao Pathogen *Phytophthora palmivora*

Rizka Aulia Rahma¹, Simon Bambang Widjanarko², Rofiq Sunaryanto³, Yunianta²

¹Program Pascasarjana, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya Malang, Jl. Veteran Malang 65145

²Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya Malang, Jl. Veteran Malang 65145

³Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi Serpong, Gedung 630 Komplek Puspiptek, Cisauk, Serpong, Tangerang Selatan 15314
Email: reezaulia@yahoo.com

ABSTRAK

Indonesia dikenal sebagai produsen dan eksportir buah kakao, tetapi saat ini Indonesia memiliki masalah dalam produksi buah kakao dikarenakan adanya mikroorganisme penyebab penyakit (*Phytophthora palmivora*) yang menurunkan jumlah produksi buah kakao tiap tahunnya. Penelitian ini melanjutkan penelitian sebelumnya yang telah menemukan senyawa aktif yang bersifat antijamur terhadap *Phytophthora palmivora* dari metabolit *Aspergillus oryzae*. Pada penelitian ini senyawa tersebut akan diproduksi dalam jumlah yang lebih banyak melalui optimasi media fermentasi. Penelitian tahap I dilakukan untuk mengetahui profil senyawa aktif yang dominan dan mendapatkan sumber karbon, nitrogen yang terbaik untuk media fermentasi *Aspergillus oryzae*. Penelitian tahap II dirancang menggunakan *Response Surface Method* (RSM) dengan *Central Composite Design* (CCD) untuk mengoptimasi 2 variabel dalam media fermentasi yaitu konsentrasi glukosa (sumber karbon terbaik) dan konsentrasi pepton (sumber nitrogen terbaik). Respon yang diinginkan adalah persentase luas area senyawa aktif yang paling besar. Analisis data dilakukan dengan program *Design Expert D.X. 7.1.5*. Tahap I penelitian ini menduga bahwa senyawa *Tenuazonic acid* dengan bobot molekul 198.1126 gram.mol⁻¹ adalah senyawa antijamur yang dihasilkan jamur *Aspergillus oryzae* untuk jamur patogen buah kakao *Phytophthora palmivora*. Selain itu, diperoleh hasil bahwa glukosa merupakan sumber karbon terbaik (rerata % relatif luas area senyawa antijamur: 85,39%) dan pepton dipilih sebagai sumber nitrogen yang terbaik (rerata % relatif luas area senyawa antijamur: 91,07%). Penelitian tahap II menghasilkan kondisi optimum media fermentasi antijamur dari *A. oryzae* dengan komposisi glukosa sebesar 35,25 gram/L dan pepton sebesar 16,7 gram/L. Kombinasi kedua komposisi tersebut akan menghasilkan data laboratorium respon rerata % relatif luas area senyawa antijamur sebesar 91,2217% dan nilai dugaan (prediksi) oleh model *Design Expert* sebesar 92,2936%. Perbedaan nilai dugaan (respon dari model) dengan nilai respon hasil percobaan di laboratorium sebesar 1,1614% sehingga dapat disimpulkan bahwa model yang digunakan telah sesuai dan mampu menjelaskan data percobaan yang digunakan.

Kata kunci: Buah kakao, *Aspergillus oryzae*, *Phytophthora palmivora*, senyawa aktif, optimasi media fermentasi, *Response Surface Method* (RSM)

ABSTRACT

Indonesia was known as a producer and exporter of cacao, but nowadays Indonesia had an issue in cacao production caused by microorganisms (*Phytophthora palmivora*) that capable of reducing the amount of cacao production each year. This study follows up a previous study that had found compounds that are actively against at *Phytophthora palmivora* from *Aspergillus oryzae* metabolites. In this study the compound will be produced in greater numbers to optimize fermentation medium. The first stage was conducted to determine the profile of the active compound and to analyze the best carbon, nitrogen source for *Aspergillus oryzae* fermentation medium. The second stage was designed by using *Response Surface Method* (RSM) with *Central Composite Design* (CCD) to optimize two variables in the fermentation medium, glucose concentration (the best carbon source) and the concentration of peptone (best nitrogen

source). The expected response was the most active compounds percentage of the area. Data analysis was performed by Design Expert DX 7.1.5 program. The first stage of this study presumed that Tenuazonic acid compounds with a molecular weight of 198.1126 gram.mol⁻¹ was an antifungal compound produced by *Aspergillus oryzae* fungus to prevent *Phytophthora palmivora* fungus pathogens cacao pods. In addition the results are that glucose was the best carbon source (mean % relative area of antifungal compounds: 85.39%) and that peptone was selected as the best source of nitrogen (mean % relative area of antifungal compounds: 91.07%). The second stage showed the optimum conditions of fermentation medium antifungal *Aspergillus oryzae* was the composition of glucose 35.25 g/L and peptone 16.7 g/L. The combination of both compositions would yield a mean response of laboratory data % relative area of antifungal compounds 91.2217% and the estimated value (prediction) by Design Expert models 92.2936%. Difference in the estimated values (the response of the model) to the value of the results of response in laboratory experiments at 1.1614%, then it could be concluded that the model used was appropriate and able to explain the applied experimental data.

Keywords: Cacao, *Aspergillus oryzae*, *Phytophthora palmivora*, active compound, optimization of fermentation medium, *Response Surface Method (RSM)*

PENDAHULUAN

Buah kakao merupakan salah satu jenis komoditas ekspor yang memberikan peningkatan devisa negara Indonesia. Hal ini seharusnya bisa menjadi peluang bagi Indonesia untuk meningkatkan jumlah ekspor buah kakao, tetapi produksi di Indonesia justru mengalami penurunan. Indonesia hanya dapat mengekspor buah kakao sebesar 100.000 ton, hal ini disebabkan 50% buah kakao yang diproduksi memiliki permasalahan penyakit berupa busuk buah (Johnson dkk., 2006).

Menurut Drenth dan Guest (2004) bahwa busuk buah pada buah kakao disebabkan oleh adanya jamur *Phytophthora palmivora*. Duguma dkk. (2001) menyebutkan bahwa biasanya penanganan *Phytophthora palmivora* ini menggunakan bahan kimia *metalaxyl-copper*. Pestisida kimia hanya diperbolehkan jika serangan jamur sudah lebih dari 40% karena sifat bahan kimia tersebut berbahaya jika digunakan berlebihan (Sulistiyowati dkk., 2003).

Penelitian Rahmi (2011) menyebutkan bahwa metabolit sekunder dari isolat *Aspergillus oryzae* memiliki daya hambat yang baik terhadap patogen buah kakao. Oleh karena itu, akan dikaji lebih dalam tentang nutrisi-nutrisi yang dibutuhkan pada saat fermentasi dan optimasi media pertumbuhan *A. oryzae*. Optimasi media fermentasi ini memodifikasi konsentrasi sumber karbon dan nitrogen. Luas area *peak* senyawa antijamur (%) merupakan faktor utama yang digunakan sebagai respon pada optimasi. Dalam penelitian ini diharapkan akan menghasilkan kondisi optimum media pertumbuhan *A. oryzae* dalam menghasilkan senyawa antijamur.

Biokontrol merupakan pestisida alami yang memanfaatkan metabolit dari mikroorganisme menguntungkan seperti jamur maupun bakteri untuk mengendalikan penyakit pada buah kakao yang disebabkan

oleh bakteri dan jamur (Haggag dan Mohamed, 2007). Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Hanada dkk. (2009) menjelaskan keamanan penggunaan biokontrol untuk jenis penyakit akibat jamur *Phytophthora palmivora* yang menggunakan metabolit dari *Trichoderma martialis*.

METODE PENELITIAN

Persiapan awal fermentasi

Bahan yang digunakan yaitu kultur mikroba *A. oryzae*, dan *P. Palmivora* (BPPT Serpong). Media pertumbuhan jamur yaitu *Potato Dextrose Agar* merk Oxoid dengan komposisi ekstrak kentang 4g/L, dextrose 20 g/L, dan agar 15 g/L. Media untuk fase vegetatif yaitu *fungae 1*, dengan komposisi tepung beras rose brdan20 g/L, glukosa p.a (Merck) 10 g/L, soybean meal 20 g/L, KH₂PO₄ p.a (Merck) 1 g/L, MgSO₄.7H₂O p.a (Merck) 0,5 g/L, dan aquadest. Media untuk fase fermentatif menggunakan media *fungae 33* dengan komposisi tripton p.a (Oxoid) 10 g/L, gliserol p.a (Merck) 50 ml, yeast extract p.a (Oxoid) 5 g/L, Malt extract p.a (Merck) 5 g/L, ekstrak kentang 20% 250 ml, dan aquadest hingga 1 L. Bahan yang digunakan untuk membuat suspensi isolat *A. oryzae*, *P. palmivora*, yaitu *Tween 80* (Merck) p.a steril. Bahan kimia yang digunakan untuk pelarut saat ekstraksi adalah etil asetat. Bahan yang digunakan untuk analisis yaitu kloroform, *silica gel 60* (Merck), *glasswool*, *acetonitril*.

Regenerasi dan perbanyakkan jamur fitopatogen kakao (*P. palmivora*) dan jamur antifitopatogen (*A. oryzae*) dimulai dengan penumbuhan kapang tersebut pada media PDA (cawan). Kultur kapang dari *gliserol stock* tersebut diambil dengan pinset steril, lalu dipindahkan ke bagian tengah cawan yang berisi media PDA steril secara aseptis, diinkubasi selama 5 hari pada inkubator suhu 28°C. Setelah tumbuh dalam cawan maka dipindahkan pada agar miring PDA diinkubasi pada suhu 28°C selama 5 hari (Shirling dan Gottlieb, 1966).

Kultivasi kultur vegetatif (*seed culture*) dilakukan dengan cara mengambil beberapa mL jamur yang sudah dihitung kepadatan sel nya (10^5 spora/mL) dipindahkan ke dalam 50 mL media vegetatif (F1 dalam erlenmeyer 500 mL) kemudian diletakkan pada *shaker* dengan kecepatan 220 rpm, dengan suhu 30°C selama 3 hari. Pada fase vegetatif ini jamur antifitopatogen akan meningkat jumlah selnya (Rahmi, 2011).

Kultivasi kultur fermentatif dilakukan dengan cara metabolit sekunder yang dihasilkan melalui kultivasi kultur fermentatif jamur *A. oryzae* (antifitopatogen) dimasukkan pada erlenmeyer 500 mL (dengan volume kerja sebanyak 50 mL). Sebanyak 5% (v/v) *seed culture* (kultur vegetatif) diinokulasikan ke dalam masing-masing 50 mL media fermentasi (F33) dalam kondisi steril. Inkubasi pada suhu 30°C selama 5 hari 220 rpm (Rahmi, 2011).

Ekstraksi Hasil Fermentasi

Broth hasil kultivasi fermentatif selama 5 hari diekstraksi. Ekstraksi dilakukan secara dua fasa dengan menggunakan pelarut etil asetat dengan perbandingan pelarut dengan *broth* fermentasi mikroba (1:1). Selanjutnya campuran tersebut dikocok secara horizontal dengan menggunakan *recipro shaker taitec SR 25* selama 15 menit. Setelah itu dilakukan sentrifugasi (*sentrifuse kubota 7780*) selama 15 menit dengan kecepatan 8000 rpm dan didiamkan sampai terbentuk dua lapisan (2 fasa), dimana lapisan pelarut organik berada di bagian atas dan lapisan bawah adalah fasa air dan endapan (biomassa sel). Lapisan pelarut organik diambil dan dipisahkan menggunakan pipet. Selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* (Abdel-Raouf dan Ibraheem, 2008).

Pemurnian Ekstrak dengan Kromatografi Kolom

Ekstrak kasar hasil fermentasi difraksinasi dengan menggunakan kromatografi kolom untuk mendapatkan ekstrak yang lebih murni. Pada penelitian ini kolom yang digunakan berdiameter 2.5 cm dengan tinggi 50 cm. Fasa diam yang digunakan adalah silika gel 60 F₂₅₄ (Merck, Germany) (0,063-0,200 mm) dan fase gerak yang digunakan adalah campuran kloroform: metanol: aquades dengan 10 variasi campuran untuk mendapatkan kepolaran yang berbeda-beda (Ningsih, 2013). Tiga puluh fraksi dari kromatografi kolom kemudian dilakukan uji menggunakan HPLC untuk mengetahui profil kromatogram HPLC dan dibandingkan dengan hasil HPLC Rahmi (2011). Kemudian setiap fraksi tersebut diuji aktivitasnya menggunakan metode *disc diffusion agar*. Setelah dipastikan bahwa fraksi tertentu yang mengandung senyawa antijamur dan aktif menghambat pertumbuhan jamur patogen buah kakao maka selanjutnya ekstrak tersebut dianalisis menggunakan UPLC-MS untuk

mengetahui kira-kira senyawa apakah yang berperan dominan sebagai antijamur patogen buah kakao.

Rancangan Percobaan Tahap I

Rancangan percobaan penentuan sumber karbon dan level konsentrasinya. Percobaan tahap 1 ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) 1 faktor. Jenis sumber karbon yang digunakan sebagai faktor yaitu C1 : glukosa, C2 : laktosa, C3 : maltosa, C4 : sukrosa, C5 gliserol. Setelah diperoleh sumber karbon yang terbaik dalam proses penghambatan jamur patogen maka selanjutnya dicari level konsentrasi terbaik (g/L) yang digunakan selama fermentasi. Faktor dari level konsentrasi sumber karbon (g/L) yaitu CK1 : 10, CK2 : 15, CK3 : 20, CK4 : 25, CK5 : 30, CK6 : 35, CK7 : 40

Rancangan percobaan penentuan sumber nitrogen dan level konsentrasinya. Jenis sumber nitrogen yang digunakan sebagai faktor adalah N1 : Pepton, N2 : Tripton, N3 : MSG, dan N4 : *Yeast extract*. Faktor dari level konsentrasi sumber nitrogen (g/L) adalah NK1 : 5, NK2 : 10, NK3 : 15, dan NK4 : 20.

Analisis Data Tahap I

Analisis data tahap 1 menggunakan metode analisis sidik ragam (ANOVA = *Analysis of Variance*) dilanjutkan dengan uji *Fischer's LSD (Least Significant Difference)*. Analisis data menggunakan selang kepercayaan sebesar 1%. Pemilihan perlakuan terbaik dilakukan dengan melihat nilai terbesar dari kromatogram masing-masing perlakuan.

Rancangan Percobaan Tahap II

Pada tahap 2 optimasi media fermentasi ini dilakukan menggunakan rancangan percobaan *Central Composite Design (CCD)* (Box dkk., 2005) dengan kombinasi dua faktor perlakuan yaitu level konsentrasi sumber karbon (X_1 , g/L) dan sumber Nitrogen (X_2 , g/L) yang merupakan variabel bebas dan % relatif luas area senyawa antijamur (Y_2 , %) yang merupakan variabel terkontrol. Optimasi ini dilakukan untuk mencari level optimum nutrisi sumber karbon dan nitrogen yang dibutuhkan pada media fermentasi *A. oryzae*.

Pengamatan Tahap II

Pada penelitian tahap 2 dilakukan pengamatan % relatif luas area senyawa antijamur (%) hasil pembacaan dari HPLC.

Analisis Data Tahap II

Optimasi media fermentasi menggunakan metode RSM, analisis data dilakukan menggunakan bantuan perangkat lunak Design Expert DX 7.1.5 (Stat-Ease Inc., Minneapolis,

MN, USA), sehingga didapatkan rancangan percobaan berdasarkan kombinasi 2 perlakuan tersebut dengan matriks CCD. Parameter yang diamati adalah % relatif luas area senyawa antijamur (%) dengan metode HPLC. Validasi data optimasi dilakukan dengan cara membandingkan nilai respon hasil dari laboratorium dengan hasil *suggestion* (prediksi) dari *software design expert*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Aktivitas Ekstrak Kasar *A. oryzae*

Uji aktivitas ekstrak kasar *A. oryzae* pada *P. palmivora* menunjukkan diameter zona hambat sebesar 39.39 mm (dengan konsentrasi ekstrak sebesar 25.000 ppm). Berdasarkan Direktorat Jenderal Perkebunan (2010) *P. palmivora* pada buah kakao biasanya dihambat menggunakan antibiotik jenis *streptomycin* (memiliki diameter zona hambat sebesar 25.43 mm). Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak kasar dalam penelitian ini (dihasilkan dari metabolit sekunder *A. oryzae*) dapat digunakan sebagai alternatif antijamur buah kakao. Hal ini karena ekstrak dari *A. oryzae* memiliki diameter zona hambat lebih besar dari 25.43 mm (*streptomycin*). Selain dihasilkan oleh *A. oryzae*, antijamur buah kakao juga dapat dihasilkan oleh *Trichoderma martial* (Hanada dkk., 2009), *Geniculosporium* (Tondje dkk., 2006), *Bacillus* spp (Melnick dkk., 2008).

Fraksinasi dan Karakterisasi Senyawa Aktif

Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom ini menghasilkan fraksi yang memiliki daya hambat pada *P. palmivora* adalah fraksi 10-15 yang menggunakan eluen 4 dan 5. Eluen 4 tersusun atas 142.5 ml kloroform dan 7.5 ml metanol, sedangkan eluen 5 tersusun atas 135 ml kloroform, 13.5 ml metanol dan 1.5 ml aquades.

Senyawa antijamur yang aktif, diduga memiliki sifat semipolar karena terelusi menggunakan pelarut dominan kloroform yang memiliki sifat semipolar pula sesuai dengan penelitian sebelumnya oleh Rahmi (2011). Hal ini sesuai dengan teori “*like dissolve like*” dimana suatu senyawa senyawa polar hanya akan larut dalam senyawa polar.

HPLC

Senyawa antijamur yang diduga aktif muncul pada *retention time* menit ke-17 dengan jumlah senyawa antijamur (dilihat dari luas area senyawa antijamur) meningkat mulai dari fraksi ke-11 hingga konsentrasi maksimalnya pada fraksi 13. Fraksi 13 merupakan konsentrasi paling tinggi kemudian menurun pada fraksi 14 sampai 16. Hal ini sesuai dengan

prinsip kromatografi kolom bahwa senyawa yang terelusi merupakan senyawa yang larut dengan eluen yang digunakan. Jumlah senyawa antijamur pada menit awal muncul sedikit, meningkat tinggi seiring meningkatnya *retention time* hingga kemudian menghilang pada menit-menit selanjutnya (Hedhammar dkk., 2003).

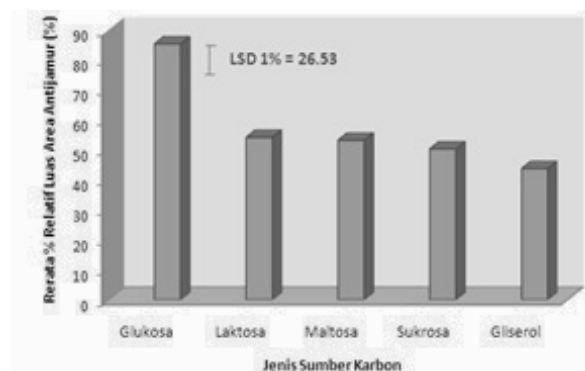
Ultra Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (UPLC-MS)

Senyawa aktif hasil kromatografi kolom fraksi 13 kemudian dilakukan analisis menggunakan UPLC-MS untuk mengetahui profil senyawa aktif yang paling dominan. Hasil UPLC senyawa dari fraksi kolom 13 yaitu fraksi senyawa yang memiliki aktivitas daya hambat zona bening terbesar terhadap *P. palmivora*. Selanjutnya karakterisasi menggunakan *Mass Spectrometry* pada senyawa yang muncul di *retention time* menit ke 2.25. Dari hasil dugaan UPLC-MS tersebut kemudian dicocokkan dengan database internet (*Chemspyder*) yang digunakan untuk menduga jenis apakah senyawa tersebut. Selain itu juga dicocokkan dengan data dari database program UPLC-MS yaitu *Masslynk*.

Senyawa yang muncul pada *retention time* menit ke 2.25 memiliki bobot molekul 198.1126 gram.mol⁻¹. Hasil tersebut memiliki tingkat kemiripan sebesar 99.20% dengan senyawa dengan rumus molekul C₁₀H₁₆NO₃ yang bernama *Tenuazonic acid*. Hasil pendugaan dari program database UPLC-MS (*Masslynk*) dan *Chemspyder* juga dicocokkan dengan berbagai literatur. Menurut penelitian dari Seidah, (2002); Taniwaki dkk, (2012) menyebutkan bahwa dari bermacam-macam jenis aspergillus yang diteliti, beberapa jenis aspergillus menghasilkan senyawa metabolit sekunder berupa *Tenuazonic acid*.

Pemilihan Jenis Sumber Karbon dan Level Konsentrasinya

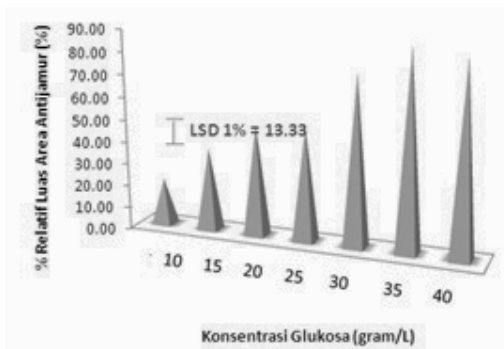
Gambar 1 hasil analisis % relatif luas area senyawa antijamur, menunjukkan bahwa glukosa merupakan sumber karbon terbaik dalam menghasilkan senyawa antijamur



Gambar 1. Pengaruh jenis sumber karbon terhadap rerata % relatif luas area senyawa antijamur

tertinggi dengan % relatif luas area senyawa antijamur sebesar 85.39% diikuti oleh laktosa 54.20%, maltosa 53.24%, sukrosa 50.33%, gliserol 43.76%.

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan jenis sumber karbon berpengaruh nyata pada produksi senyawa antijamur. Hasil ini dapat dibandingkan dengan penelitian Fattah dan Hoda (2011) yang juga menjelaskan bahwa sumber karbon yang berbeda-beda akan menghasilkan jumlah metabolit atau enzim yang berbeda pula.

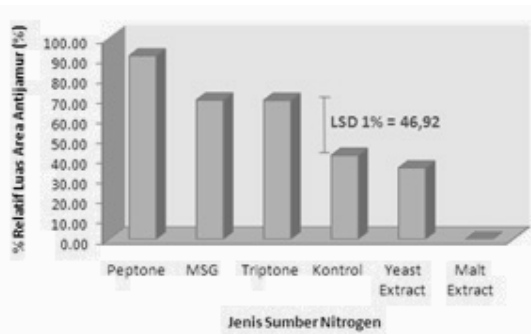


Gambar 2. Pengaruh konsentrasi glukosa terhadap rerata % relatif luas area senyawa antijamur

Gambar 2 menunjukkan bahwa % relatif luas area antijamur meningkat mulai dari penambahan glukosa 10 g/L (21,12%) hingga mencapai maksimalnya pada penambahan glukosa 35 g/L (88,21%). Mengalami penurunan % relatif luas area senyawa antijamur pada penambahan glukosa 40 g/L. Sehingga penambahan glukosa sebanyak 10 g/L yang digunakan sebagai konsentrasi terbaik untuk dilanjutkan pada proses optimasi fermentasi.

Pemilihan Jenis Sumber Nitrogen dan Level Konsentrasinya

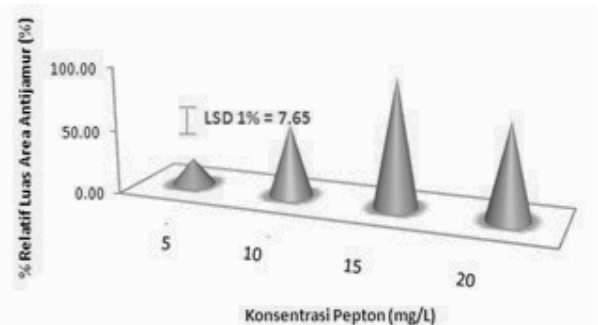
Jenis sumber nitrogen dengan konsentrasi yang sama digunakan sebagai faktor dalam penentuan jumlah senyawa antijamur (*Tenuazonic acid*) yang digambarkan dengan



Gambar 3. Pengaruh jenis sumber nitrogen terhadap rerata % relatif luas area senyawa antijamur

rerata % relatif luas area senyawa antijamur pada analisis uji menggunakan HPLC. Jenis-Jenis sumber nitrogen dengan konsentrasi 10 g/L ditambahkan gliserol 10 g/L, ekstrak kentang 20% 250 mL/L, aquades, kemudian diuji pengaruhnya terhadap produksi senyawa aktif.

Dari Gambar 3 dapat diketahui hasil analisis % relatif luas area senyawa antijamur menunjukkan bahwa pepton merupakan sumber nitrogen terbaik dalam menghasilkan senyawa antijamur tertinggi dengan % relatif luas area senyawa antijamur sebesar 91,07% diikuti oleh MSG 69,11%, tripton 68,95%, kontrol 41,64%, yeast extract 35,40% dan malt extract tidak menghasilkan senyawa aktif. Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan jenis sumber nitrogen berpengaruh nyata pada produksi senyawa antijamur. Hal ini didukung pula oleh penelitian Zambare (2010) bahwa adanya penggunaan sumber nitrogen dalam bentuk pepton pada medium fermentasi jamur aspergillus. Dalam penelitian ini pepton dipilih sebagai sumber nitrogen terbaik. Hal ini sebanding dengan data dari literatur bahwa golongan jamur aspergillus cocok tumbuh pada medium yang mengandung pepton (Khrisna dkk., 2010). Penelitian Gallardo dkk. (2004) juga memproduksi jenis senyawa antijamur *tenuazonic acid* dengan menggunakan pepton di dalam komposisi mediumnya.



Gambar 4. Pengaruh konsentrasi pepton terhadap rerata % relatif luas area senyawa antijamur

Dapat dilihat pada Gambar 4 bahwa jumlah senyawa antijamur meningkat pada penambahan pepton 5 g/L hingga 10 g/L. Diketahui bahwa senyawa antijamur terbanyak (99.81%) diproduksi pada penambahan pepton sebanyak 15 g/L yang kemudian menurun konsentrasinya menjadi 74.61% pada penambahan pepton yang lebih tinggi (20 g/L). Menurut Hermawan dkk. (2000) konsentrasi dan sumber nitrogen akan mempengaruhi nilai pH medium, pertumbuhan dan aktivitas mikroorganisme dalam proses fermentasi.

Optimasi 1 Medium Fermentasi *A. Oryzae*

Optimasi medium fermentasi *A. oryzae* menggunakan Central Composite Design (CCD) (Box dan Draper, 2007) dengan kombinasi dua faktor perlakuan yaitu level konsentrasi

sumber karbon (X_1 , g/L) dan sumber Nitrogen (X_2 , g/L) yang merupakan variabel bebas dan % relatif luas area senyawa antijamur senyawa aktif (Y_2 , %) yang merupakan variabel terkontrol.

Penelitian pendahuluan mengemukakan hasil bahwa sumber karbon terbaik adalah glukosa dengan konsentrasi terbaik dalam menghasilkan senyawa antijamur adalah pada konsentrasi 35 g/L. Selain sumber karbon, penelitian pendahuluan juga menunjukkan hasil mengenai sumber nitrogen terbaik yang dapat digunakan jamur *A. oryzae* dalam memproduksi senyawa antijamur. Nitrogen dipilih sebagai sumber nitrogen terbaik dengan konsentrasi terbaik sebesar 15 g/L (acuan dalam menentukan titik tengah).

Optimasi 2 Medium Fermentasi *A. oryzae*

Setelah dilakukan optimasi pertama untuk lebih meyakinkan hasil yang diperoleh maka dilakukan optimasi kedua. Titik tengah optimasi kedua akan menggunakan hasil *suggestion* dari *software Design Expert*.

Pemilihan Model Respon

Dalam menentukan respon optimum yaitu berdasarkan pemilihan model yang paling sesuai untuk evaluasi model dari sistem komputerisasi *Design Expert* adalah dengan model urutan jumlah kuadrat (*Sequential Model Sum of Squares*), pengujian ketidaktepatan model (*Lack of Fit Tests*), dan ringkasan model statistik (*Model Summary Statistics*). Perhitungan pemilihan model statistik berdasarkan *Sequential Model Sum of Squares*.

Pemilihan model berdasarkan *Sequential Model Sum of Squares* dimulai dengan model linear. Model linear memiliki bentuk persamaan respon $y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2$ mempunyai nilai p sebesar 0,0242 (2,42%) yang menunjukkan bahwa peluang kesalahan model kurang dari 5% (nilai p pada program telah diatur <5%) atau berarti bahwa model tersebut nyata (signifikan) terhadap respon. Model selanjutnya yang diamati adalah 2FI (interaksi antara 2 faktor), yang memiliki bentuk persamaan respon $y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1 X_2$. Model 2FI memiliki nilai p sebesar 0,08428 (8,428%), yang menunjukkan bahwa peluang kesalahan dari model lebih dari 5% (nilai p pada program telah diatur <5%), berarti bahwa pengaruh model 2FI tidak nyata (tidak signifikan) terhadap respon % relatif luas area senyawa antijamur.

Berikutnya adalah model kuadrat, yang memiliki bentuk persamaan respon $y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1^2 + \beta_4 X_2^2 + \beta_5 X_1 X_2$. Model kuadrat memiliki nilai p sebesar <0,0001 (0,01%), yang menunjukkan bahwa peluang kesalahan model kurang dari 5%, atau berarti model kuadrat memiliki pengaruh yang nyata (signifikan) terhadap respon. Model kuadrat tersebut memiliki nilai F (F-test) yang paling tinggi

dan p-value (Prob>F) paling rendah. Menurut Montgomery (2001) bahwa semakin tinggi nilai F atau semakin kecil p-value (Prob>F) berarti semakin signifikan hubungannya dengan model yang digunakan.

Model kubik memiliki nilai p sebesar 0.1946 (19,46%), yang menunjukkan peluang kesalahan model lebih dari 5%, dapat diartikan bahwa model kubik memiliki pengaruh yang tidak nyata terhadap respon. Model kubik dinyatakan *aliased* (tidak disarankan) oleh program, diduga model tersebut terlalu kompleks sehingga tidak mungkin digunakan. Dari keempat model tersebut yang memiliki pengaruh nyata (signifikan) terhadap respon % relatif luas area senyawa antijamur adalah model linear dan kuadrat. Namun yang lebih disarankan untuk digunakan adalah model kuadrat. Semua model yang ada, model kuadrat memiliki peluang kesalahan yang lebih kecil daripada model-model yang lainnya, seperti linear, 2FI, dan kubik, serta dinyatakan *suggested* oleh program (Montgomery, 2001).

Analisis Ragam (ANOVA)

Analisis ragam ANOVA terhadap model mampu menjelaskan hubungan antara variabel dan respon. Variabel A (konsentrasi pepton) memiliki nilai p sebesar <0,0001 yaitu kurang dari 0,0500 ($p < 0,0500$) dan sebaliknya nilai p variabel B (konsentrasi glukosa) sebesar 0,5545 yang berarti lebih besar dari 0,0500 ($p < 0,0500$). Hal ini berarti bahwa apabila nilai p-value kurang dari 0,0500 maka mengindikasikan bahwa model signifikan.

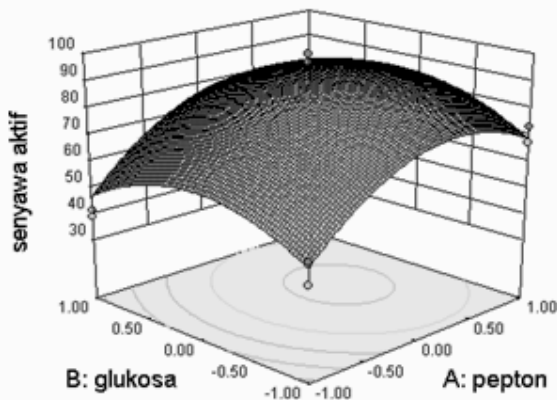
Nilai interaksi antara konsentrasi pepton dan glukosa (AB) pada grafik interaksi dua faktor (2FI) dengan persamaan $y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1 X_2$ tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap % relatif luas area senyawa antijamur yang ditunjukkan dari nilai p yang besar yaitu 0,6250 ($p > 0,05$). Dari hal tersebut dapat disimpulkan bahwa model linier dan 2FI tidak sesuai untuk menunjukkan pola yang signifikan dari respon % relatif luas area senyawa antijamur.

Variabel konsentrasi pepton kuadrat (A^2) dan konsentrasi glukosa kuadrat (B^2) pada grafik model kuadrat dengan persamaan $y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1^2 + \beta_4 X_2^2 + \beta_5 X_1 X_2$ memberikan pengaruh yang berbeda. Hal ini dapat dilihat dari konsentrasi pepton kuadrat (A^2) dan konsentrasi glukosa kuadrat (B^2) berpengaruh signifikan dibuktikan dengan nilai p kurang dari 0,05. Menurut Cai dkk. (2007) apabila nilai p kurang dari 0,05, hal tersebut menunjukkan bahwa model bersifat signifikan. Dengan demikian model kuadrat sesuai untuk menunjukkan pola respon % relatif luas area senyawa antijamur secara signifikan.

Dari program *Design Expert* diperoleh persamaan polinomial model ordo kedua dalam bentuk variabel kode, yaitu $Y = 90,23 + 11,86X_1 + 0,980X_2 + 1,15X_1X_2 - 17,38X_1^2$

$-13,68X_2^2$. Dimana : Y_1 = respon % relatif luas area senyawa antijamur (%), X_1 = konsentrasi pepton (g/L), dan X_2 = konsentrasi glukosa (g/L).

Respon % Relatif Luas Area Senyawa Antijamur



Gambar 5. Kurva permukaan respon (3 dimensi) konsentrasi pepton dan konsentrasi glukosa terhadap respon % relatif luas area senyawa antijamur

Gambar 5 dapat dilihat bahwa dengan peningkatan konsentrasi pepton dan konsentrasi glukosa, % relatif luas area senyawa antijamur mengalami penurunan hingga mencapai titik tertentu (menunjukkan poin minimum). Menurut Wang dkk. (1979) beberapa sumber nitrogen dan sumber karbon berlebih dapat menyebabkan penghambatan oleh substrat. Apabila dihubungkan dengan model monod (Vogel dan Todaro, 1996) dalam kondisi konsentrasi substrat rendah, penambahan konsentrasi substrat akan menambah laju pertumbuhan spesifik, namun pada batas tertentu konsentrasi substrat tidak berpengaruh nyata terhadap laju pertumbuhan spesifik, sehingga laju pertumbuhan sel konstan, dan dapat terjadi penghambatan oleh substrat itu sendiri.

Validasi Kondisi Optimum Hasil Prediksi Model

Perbandingan hasil validasi laboratorium dengan hasil solusi atau prediksi yang diberikan oleh *Design Expert* menunjukkan % relatif luas area senyawa aktif yang diduga oleh model *Design Expert* akan muncul sebesar 92,2936% (luas area: 85.227.918) dengan perlakuan pemberian glukosa dengan konsentrasi 35,25 g/L dan pepton 16,7 g/L. Hasil percobaan laboratorium menunjukkan rerata % relatif luas area senyawa antijamur sebesar 91,2217% (Luas area: 84.238.062). Data menunjukkan penurunan 1,1614% dibandingkan dengan nilai dugaan respon dari model matematik yang digunakan. Perbedaan nilai dugaan (respon dari model) dengan nilai respon hasil percobaan di laboratorium sebesar 1,1614% (kurang dari 5%) menunjukkan bahwa model yang digunakan

telah sesuai dan mampu menjelaskan data percobaan yang digunakan. Wu dkk. (2006) menyatakan bahwa perbedaan nilai prediksi dengan nilai penelitian jika tidak lebih dari 5% mengindikasikan bahwa model tersebut tepat.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis interpretasi UPLC-MS dan perbandingan literatur diduga bahwa senyawa antijamur yang dihasilkan jamur *A. oryzae* yang bersifat antifitopatogen pada jamur patogen buah kakao *P. palmivora* adalah senyawa *Tenuazonic acid* dengan bobot molekul 198.1126 gram.mol⁻¹. Dari beberapa jenis sumber karbon seperti glukosa, laktosa, maltosa, sukrosa, dan gliserol, glukosa merupakan sumber karbon terbaik (rerata % relatif luas area senyawa antijamur: 85.39%) dalam komposisi media *A. oryzae* selama fermentasi. Adapun pepton dipilih sebagai sumber nitrogen yang paling baik (rerata % relatif luas area senyawa antijamur: 91,07%) dibandingkan dengan MSG, tripton, *yeast extract*, *malt extract* dan kontrol.

Kondisi optimum media fermentasi antijamur dari *A. oryzae* dihasilkan pada titik dengan komposisi sumber karbon dari glukosa dengan konsentrasi 35,25 g/L dan sumber nitrogen terbaik diperoleh dari pepton dengan konsentrasi 16,7 g/L. Dari kombinasi kedua komposisi tersebut akan dihasilkan data laboratorium respon rerata % relatif luas area senyawa antijamur sebesar 91,2217% dan nilai dugaan (prediksi) oleh model *Design Expert* sebesar 92,2936%. Perbedaan nilai dugaan (respon dari model) dengan nilai respon hasil percobaan di laboratorium sebesar 1,1614%. Hal ini menunjukkan bahwa model yang digunakan telah sesuai dan mampu menjelaskan data percobaan yang digunakan. Respon % relatif luas area senyawa antijamur yang diperoleh bersifat kuadratik dengan persamaan polinomial yang diperoleh $Y = 90,23 + 11,86X_1 + 0,980X_2 + 1,15X_1X_2 - 17,38X_1^2 - 13,68X_2^2$. Y_1 adalah respon % relatif luas area senyawa antijamur (%), X_1 = konsentrasi pepton (g/L), dan X_2 = konsentrasi glukosa (g/L).

DAFTAR PUSTAKA

Abdel-Raouf, N. dan I.B.M. Ibraheem. (2008). Antibiotic activity of two anabaena species against four fish pathogenic Aeromonas species. *African Journal of Biotechnology* 7: 2644-2648.

Box, George, E. P. dan Draper, N.R. (2007). *Response Surfaces, Mixtures, and Ridge Analyses*. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken New Jersey Chapman.

- Cai, W., Gu, X. dan Tang, J. (2007). Extraction and preliminary structure discussion of soluble *Opuntia milpa alta* polysaccharide. *Journal of Food Machinery* **23**: 68-71.
- Direktorat Jenderal Perkebunan (2010). *Statistik Perkebunan Indonesia 1998-2000*. Departemen Pertanian, Direktorat Jenderal Perkebunan, Jakarta.
- Duguma, B., Gockowski, J. dan Bakala, J. (2001). Smallholder cacao (*Theobroma cacao* Linn.) cultivation in agroforestry systems of West and Central Africa: challenges and opportunities. *Agroforestry Systems Journal* **51**: 177-188.
- Fattah, F.M.A. dan Hoda, M.A.H.S. (2011). Amylase production from *Aspergillus oryzae* LS1 by solid-state fermentation and its use for the hydrolysis of wheat flour. *Iranian Journal of Biotechnology* **9**: 267-274.
- Gallardo, G.L., Pena, N.I., Chacana, P., Terzolo, H.R. dan Cabrera, G.M. (2004). L-Tenuazonic acid, a new inhibitor of *Paenibacillus larvae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **20**: 609-612.
- Haggag, W.M. dan Mohamed (2007). Biotechnological aspect of microorganism used in plant biological control. *World Journal of Agricultural sciences* **6**: 771-776.
- Hanada, R.E., Pomella, A.W.V., Soberanis, W., Loguercio, L.L. dan Pereira, J.O. (2009). Biocontrol potential of *Trichoderma Martiale* against the black pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. *Journal of Biological Control* **50**: 143-149.
- Hedhammar, M., Karlstrom, A.E. dan Hober, S. (2003). *Chromatographic Methods for Protein Purification*. Royal Institute of Technology, AlbaNova University Center, Dept. of Biotechnology, SE-106 91 Stockholm, Sweden.
- Hermawan, D.R.W.A., Utami, T. dan Cahyanto, M.N. (2000). Fermentasi etanol dari buah semu jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) oleh *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3015 menggunakan ammonium sulfat dan urea sebagai sumber nitrogen. *Agritech* **20**: 93-98.
- Ningsih, K.N.M. (2013). *Penapisan dan Identifikasi Senyawa Antijamur Patogen Phellinus Lamaoensis dari Jamur Endofit pada Tanaman Obat Asal Cirebon*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Khrisna, C.M., Sasidhar, P. dan Suresh, C. (2010). Production of extracellular amylase from agricultural residues by a newly isolated *Aspergillus* species in solid state fermentation. *African Journal of Biotechnology* **9**: 5162-5169.
- Melnick, R.L., Zidack, N.K., Bailey, B.A., Maximova, S.N., Gultinan, M. dan Backman, P.A. (2008). Bacterial endophytes: *Bacillus* spp from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. *Journal of Biological Control* **46**: 46-56.
- Montgomery, D.C. (2001). *Design and Analysis of Experiment*. 5th edition. John Willey dan Sons, Inc., NewYork.
- Rahmi, A. (2011). *Aktivitas Antijamur dan Fraksinasi Ekstrak Butanol yang Dihasilkan oleh Jamur (F-IG-LB-178.1 DAN F-AE-PP-8.3) dan Aktinomisetes a-IG-BP-191.5 Terhadap Jamur Fitopatogen Tanaman Kakao*. Tesis. Pascasarjana Teknologi Hasil Pertanian. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya, Malang.
- Rahulan, R., Nampoothiri, K.M., Szakacs, G., Nagy, V. dan Pandey, A. (2009). Statistical optimization of L-Leucine amino peptidase production from *Streptomyces gedanensis* IFO 13427 under submerged fermentation using response surface methodology. *Journal of Biochemical Engineering* **43**: 64-71.
- Seidah, A. (2002). Secondary metabolites as co-markers in the taxonomy of Aspergilli. *Journal of Acta Microbiologica Polonica* **52**: 15-23.
- Shirling, E.B. dan Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* **16**(3): 313-340.
- Sulistyowati, E., Junianto, Y.D., Sukanto, S., Wiryadiputra, S., Winarto, L. dan Primawati, N. (2003). Analisis status penelitian dan pengembangan PHT pada pertanaman kakao. *Risalah Simposium Nasional Penelitian PHT Perkebunan Rakyat*. Bogor.
- Taniwaki, M.H., Pitt, J.I., Iamanaka, B.T., Sartori, D., Copetti, M.V., Balajee, A., Fungaro M.H.P. dan Frisvad, J.C. (2012). *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil Nuts. *Plos One* **7**(8): e42480.
- Tondje, P.R., Hebbbar, K.P., Samuels, G., Bowers, J.H., Weise, S., Nyemb, E., Begoude, D., Foko, J. dan Fontem, D. (2006). Bioassay of geniculosporium species for *Phytophthora megakarya* biological control on cacao pod husk pieces. *African Journal of Biotechnology* **5**: 648-652.
- Vogel, H.C. dan Todaro, C.L. (1996). *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook; Principles, Process Design and Equipment*. Noyes Publications, New Jersey.

- Wang, D.I.C., Cooney, C.L., Demain, A.L., Dunhill, P., Humprey, A.E. dan Lily, M.M. (1979). *Fermentation and Enzym Technology*. Willey Interscience, London.
- Wu, M., Ding, H., Wang, S. dan Xu, S. (2006). Optimizing conditions for the purification of linoleic acid from sunflower oil by urea complex fractionation. *Journal of American Oil Chemist's Society* **85**: 677-684.
- Zambare, V. (2010). Solid state fermentation of *Aspergillus oryzae* for glucoamylase production on agro residues. *International Journal of Life Sciences* **3**: 16-25