INDONESIAN JOURNAL OF ESSENTIAL OIL
VOL. 3, NO. 2, pp. 76-88, November 2018

Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Biotransformasi Minyak Jarak (*Ricinus communis L.*) oleh *Aspergillus oryzae*

Dian Mulyani *[1], Elvina Dhiaul Iftitah[2], Arie Srihardyastutie[3]
[1,2,3]Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Jalan Veteran 65145 Malang, Indonesia
e-mail: *[1] **dianmulyani88@gmail.com** , [2] vin_iftitah@yahoo.com , [3] arie_s@ub.ac.id

Abstrak

Biotransformasi mikrobial menggunakan jamur *Aspergillus oryzae* dilakukan dengan menggunakan orbital shaker pada temperatur 26oC, 130 rpm dan variasi waktu inkubasi 3, 5, 7 dan 9 hari. Produk yang dihasilkan dianalisis menggunakan GC-MS. Analisis difokuskan pada produk-produk senyawa intermediet, yang mengarah ke pembentukan senyawa lakton. Produk utama yang terbentuk melalui biotransformasi minyak jarak oleh *Aspergillus oryzae* (26oC, 130 rpm) adalah etil heksadekanoat (8,24%, 3 hari), etil pentadekanoat (1,22%, 5 hari), etil pentadekanoat (56,28%, 7 hari) dan etil pentadekanoat (0,34%, 9 hari). Semakin lama waktu inkubasi diperoleh semakin banyak produk etil pentadekanoat yang terbentuk, dari 1,22% (5 hari) menjadi 56,28% (7 hari). Namun, mengalami penurunan menjadi 0,34% (9 hari). Senyawa etil pentadekanoat terbentuk maksimum pada hari ke-7.

Kata kunci— Biotransformasi, *Aspergillus oryzae,* Minyak Jarak

Abstract

Effect of Incubation Time on Biotransformation of Castor Oil (Ricinus communis L.) by Aspergillus oryzae. *Microbial biotransformation using Aspergillus oryzae fungi was carried out using orbital shaker at temperatures of 26oC, 130 rpm with variations in incubation times of 3, 5, 7 and 9 days. Products were analyzed using GC-MS. The analysis is focused on intermediate compound products, which leads to the formation of lactone compounds. The main products formed by biotransformation of castor oil by Aspergillus oryzae (26oC, 130 rpm) were ethyl hexadecanoate (8.24%, 3 days), ethyl pentadecanoate (1.22%, 5 days), ethyl pentadecanoate (56.28%, 7 days) and ethyl pentadecanoate (0.34%, 9 days). The longer the incubation period, the more ethyl pentadecanoate products are formed, from 1.22% (5 days) to 56.28% (7 days). However, it decreased to 0.34% (9 days). The ethyl pentadecanoate compound is maximum formed on the 7th day.*

Keywords— *Biotransformation, Aspergillus oryzae, Castor Oil*

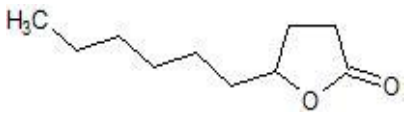
1. PENDAHULUAN (INTRODUCTION)

Flavour merupakan rasa yang pada umumnya digunakan oleh banyak industri makanan dan minuman. *Flavour* yang telah banyak dimanfaatkan oleh industri merupakan *flavour* sintesis. Akan tetapi pandangan konsumen yang lebih memilih produk natural telah meningkatkan jumlah permintaan akan adanya *flavour* alami. Meningkatnya permintaan konsumen mengenai makanan yang sehat, bergizi, dan beraroma menyebabkan peningkatan akan adanya bahan penyedap sintetis. Hal ini dapat diminimalisir dengan adanya pendekatan metode mikrobiologis untuk menghasilkan bahan kimia rasa khusus [1].

Flavour alami yang dapat diproduksi melalui biotransformasi mikrobial adalah *γ-decalactone* yang memiliki potensi sebagai wewangian dan penghilang kepahitan dalam produk farmasi, zat penyedap dalam pembuatan makanan terutama produk roti dan makanan instan, pengental untuk jus buah dan minuman, bahan wewangian dalam deterjen dan kosmetik [2]. Lakton alami seperti *γ-decalactone* dapat diproduksi dari asam lemak bebas melalui beberapa tahap reaksi enzimatis yaitu hidroksilasi dan β-oksidasi oleh jamur [3]. Menurut penelitian Farbood dan Wilis (1985), *γ-decalactone* dapat diproduksi menggunakan berbagai mikroba penghasil enzim lipase pada substrat minyak jarak atau asam risinoleat (asam-12-hidroksi-9-oktadekenoat) [4]. Minyak jarak (*Ricinus communis* L.) digunakan dalam proses biotransformasi mikrobial sebagai substrat. Hal ini dikarenakan komponen utama dalam minyak jarak adalah asam risinoleat (asam 12-hidroksi-9-oktadekenoat) yang mampu membentuk beberapa intermediet (asam 4-hidroksi dekanoat) melalui tahapan reaksi β-oksidasi yang mengarah pada proses pembentukan lakton [5].

Biotransformasi merupakan penggunaan sistem biologis untuk menghasilkan perubahan kimia pada suatu senyawa [6]. Biotransformasi juga dapat didefinisikan sebagai proses dimana senyawa organik diubah dari satu bentuk ke bentuk lainnya, dibantu oleh organisme seperti bakteri, jamur, dan enzim [7].

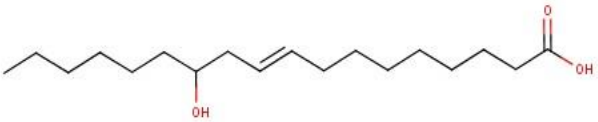
γ-decalactone ($C_{10}H_{18}O_2$) adalah ester siklik yang dihasilkan dari kondensasi gugus alkohol (-OH) dan gugus asam karboksilat (-COOH) dari molekul yang sama. Hal ini ditandai dengan cicin tertutup yang terdiri dari empat atom karbon dan satu atom oksigen endosiklik tunggal, ditambah dengan keton yang berdekatan [8]. Berikut ini merupakan struktur dari *γ-decalactone* **(Gambar 1)** [9]:



Gambar 1. Struktur *γ-decalactone* [9]

Minyak biji jarak (*Ricinus communis* L.) merupakan sumber komersial dari hidroksilasi asam lemak. Kandungan dari minyak jarak terdiri dari 90% risinoleat, 4% linoleat, 3% oleat, 1% stearat, dan kurang dari 1% linoleat asam lemak. Kandungan utama dari minyak biji jarak (asam risinoleat) yang sangat tinggi dapat digunakan sebagai aplikasi dalam industri kimia seperti cat, pelapis, tinta dan pelumas. Asam risinoleat dan turunannya memiliki gugus hidroksil yang menyediakan lokasi grup fungsional untuk melakukan berbagai reaksi kimia termasuk halogenasi, dehidrasi, esterifikasi, dan sulfasi [10].

Asam risinoleat (asam 12-hidroksi-9-oktadekenoat) adalah komponen utama (86%) dari minyak biji jarak dan digunakan sebagai substrat dalam sebagian besar proses produksi *γ-decalactone*. Asam lemak ini ditransformasikan menjadi *γ-decalactone* oleh strain ragi melalui β-oksidasi [11]. Berikut ini merupakan struktur asam risinoleat yang disajikan dalam **Gambar 2** [10].



Gambar 2. Struktur asam risinoleat [10]

Aspergillus oryzae merupakan jamur yang digunakan untuk industri fermentasi, seperti pembuatan kecap dan produksi cuka. Jamur berfilamen ini memiliki kemampuan menghasilkan sejumlah besar enzim industri (amilase, protease, lipase) dan bahan kimia khusus [12]. Dalam fermentasi makanan tradisional, *Aspergillus oryzae* menghasilkan sejumlah besar enzim ekstrakseluler yang mempengaruhi warna, rasa, dan aroma makanan yang difermentasi [13]. Aktivitas optimum enzim lipase dari *Aspergillus oryzae* adalah stabil pada temperatur 30°C dengan pH 7 [14].

Penelitian ini akan fokus pada pengembangan produksi *bioflavour* dengan menggunakan metode biotransformasi terhadap minyak jarak (*Ricinus communis* L.). Biotransformasi dilakukan selama 3, 5, 7 dan 9 hari. Mikroorganisme yang akan digunakan adalah jenis kapang *Aspergillus oryzae*. Selanjutnya produk *flavour* yang dihasilkan diekstrak menggunakan n-heksana dan dianalisis menggunakan GCMS.

2. METODE PENELITIAN (MATERIALS AND METHODS)

2.1 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu laminar air flow, *hot plate*, *incubator shaker*, Erlenmeyer 100 mL, pipet ukur 10 mL, bola hisap, neraca analitik, autoklaf, *rotary evaporator*, *microwave* termodifikasi, pembakar bunsen, inkubator, tabung *sentrifuge*, *sentrifuge*, oven, GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah minyak jarak (*castor oil*), *Aspergillus oryzae*, Tween 80, n-heksana, dekstrosa, aquades, pepton, ekstrak yeast, NaCl, KH_2PO_4, K_2HPO_4, $MgSO_4.7H_2O$, larutan aktivator ($FeSO_4.7H_2O$, $MnSO_4.7H_2O$, $ZnSO_4.7H_2O$, $CoCl_2.6H_2O$).

2.2 Analisis Substrat Minyak Jarak

Minyak jarak sebanyak 50 g dimasukkan ke dalam labu alas bulat 100 mL. Kemudian ditambahkan 38 mL etanol dan 1 mL H_2SO_4 1 M. Campuran direfluks selama dua jam pada temperatur 60-70^oC. Hasil refluks didinginkan dan dimasukkan ke dalam corong pisah. Apabila tidak terbentuk dua fasa maka ditambahkan larutan NaCl jenuh, kemudian dikocok selama 15 menit. Fasa organik dipisahkan dan ditambahkan dengan Na_2SO_4 anhidrat. Dilakukan setrifugasi untuk memisahkan filtrat dan padatan Na_2SO_4 anhidrat.

Produk transesterifikasi diambil sebanyak 0,05 mL. Kemudian ditambahkan pelarut n-heksana sebanyak 2 mL. Selanjutnya dianalisis menggunakan GC-MS.

2.3 Pembuatan Media Cair

Media pertumbuhan *Aspergillus oryzae* terdiri atas: pepton 2,5 g; ekstrak yeast 1,25 g; NaCl 1,25 g; dekstrosa 2,5 g; KH_2PO_4 3,35 g; K_2HPO_4 4,2 g; MgSO4.7H2O 0,05 g; Tween 80 0,2%; dilarutkan dalam 250 mL akuades dengan aktivator ($FeSO_4.7H_2O$ 0,00125 g; $MnSO_4.7H_2O$ 0,0004 g; $ZnSO_4.7H_2O$ 0,00035 g; $CoCl_2.6H_2O$ 0,0005 g) dan 1,25 mL minyak jarak 0,5%. Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada 121^oC, 15 psi selama 15 menit [15].

2.4 Pembuatan Inokulum

Kultur stok disuspensikan dalam 5 mL aquades steril. Kemudian dimasukkan kedalam 70 mL media cair. Selanjutnya diinkubasi selama 96 jam (4 hari).

2.5 Biotransformasi Minyak Jarak oleh Aspergillus oryzae

Sebanyak 200 mL media cair dengan komposisi Tween 80 0,2%, minyak jarak 5% dibagi menjadi 4 bagian lalu dimasukkan kedalam erlenmeyer 100 mL [16]. Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada 12 ^oC, 15 psi, selama 15 menit [15]. Kemudian media diinokulasi dengan 5 mL larutan inokulum secara aseptis. Kultur diinkubasi dengan *rotary shaker* selama 3, 5, 7, dan 9 hari dengan kecepatan 130 rpm/menit pada suhu 26^oC [16].

Setelah diinkubasi, tiap produk biotransformasi dididihkan hingga 100^oC. Produk diekstraksi dengan n-hekasana hingga terbentuk lapisan yang berbeda. Lapisan organik diambil lalu diuapkan dengan *rotary evaporator* [16]. Selanjutnya dilakukan analisis menggunakan GC-MS.

2.6 Karakterisasi Produk Biotrasformasi

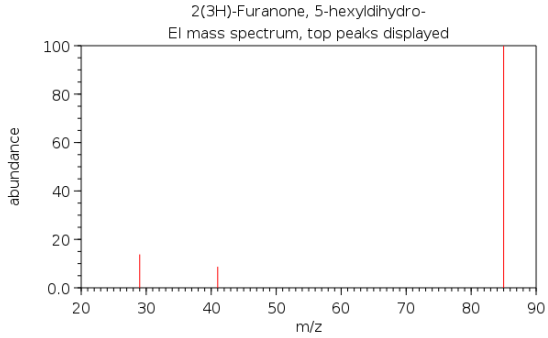
Karakterisasi produk biotransformasi dilakukan dengan menggunakan GC-MS. Karakterisasi tersebut menggunakan variasi waktu inkubasi selama 3, 5, 7 dan 9 hari. Berikut merupakan gambaran matriks data yang akan dilakukan pada penelitian ini (**Tabel 1**):

Tabel 1. Matriks data penelitian variasi waktu inkubasi terhadap biotransformasi minyak jarak oleh *Aspergillus oryzae*

	Variasi Waktu Inkubasi (hari)*			
	3	**5**	**7**	**9**
Kode Sampel	A1	A2	A3	A4

*)= kondisi reaksi menggunakan *incubator shaker* (130 rpm) dengan temperatur ruang (26°C)

GCMS merupakan metode pemisahan senyawa organik yang menggunakan dua metode analisis senyawa yairu kromatografi gas (GC) dan spektroskopi massa (MS). Kromatografi gas digunakan untuk menganalisis jumlah senyawa *bioflavour* secara kuantitatif berdasarkan waktu retensi dan luas area. Spektroskopi massa digunakan untuk menganalisis struktur molekul *bioflavour* dengan mendapatkan berat molekul dari perbandingan massa terhadap muatan ion (m/z). Senyawa *flavour* yang menjadi target dari biotransformasi mikrobial minyak biji jarak adalah *γ-decalactone.* Berikut ini adalah spektrum massa (m/z) dari *γ-decalactone* (**Gambar 3**) [17]:



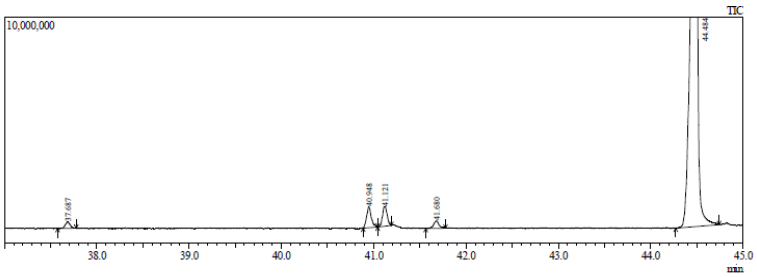
Gambar 3. Spektrum massa *γ-decalactone* [17]

Spektrum massa dari *γ-decalactone* memiliki 3 peak tertinggi pada m/z 85, 29, dan 41.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN (RESULT)

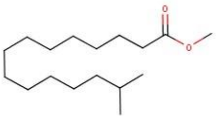
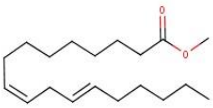
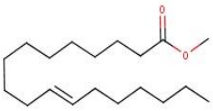
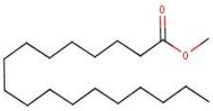
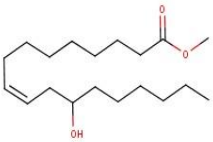
3.1 Analisis Substrat Minyak Jarak

Minyak jarak (*Ricinus communis* L.) sebagai substrat ditransesterifikasi terlebih dahulu sebelum dilakukan analisis dengan GC-MS. Tujuannya adalah untuk mengetahui komponen-komponen asam lemak apa saja yang terdapat dalam substrat. Kromatogram hasil transesterifikasi minyak jarak ditunjukkan pada **Gambar 4** dan diinterpretasikan pada **Tabel 2**. Berdasarkan **Gambar 4** terdapat lima puncak dengan kelimpahan terbesar pada puncak ke-5 dengan waktu retensi 44,484 menit dan konsentrasi sebesar 88,666% yang diduga merupakan senyawa metil risinoleat.



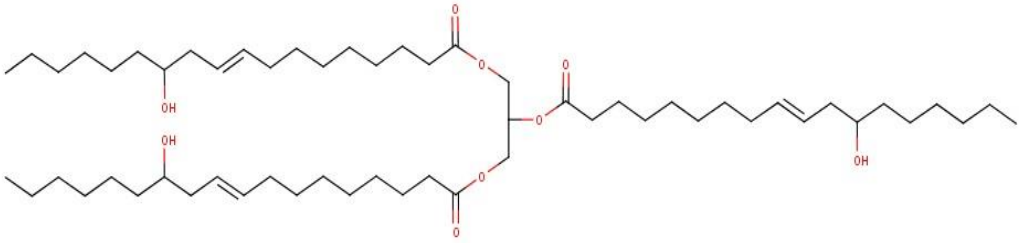
Gambar 4. Kromatogram produk reaksi transesterifikasi minyak jarak

Tabel 2. Data analisis GC-MS produk transesterifikasi minyak jarak

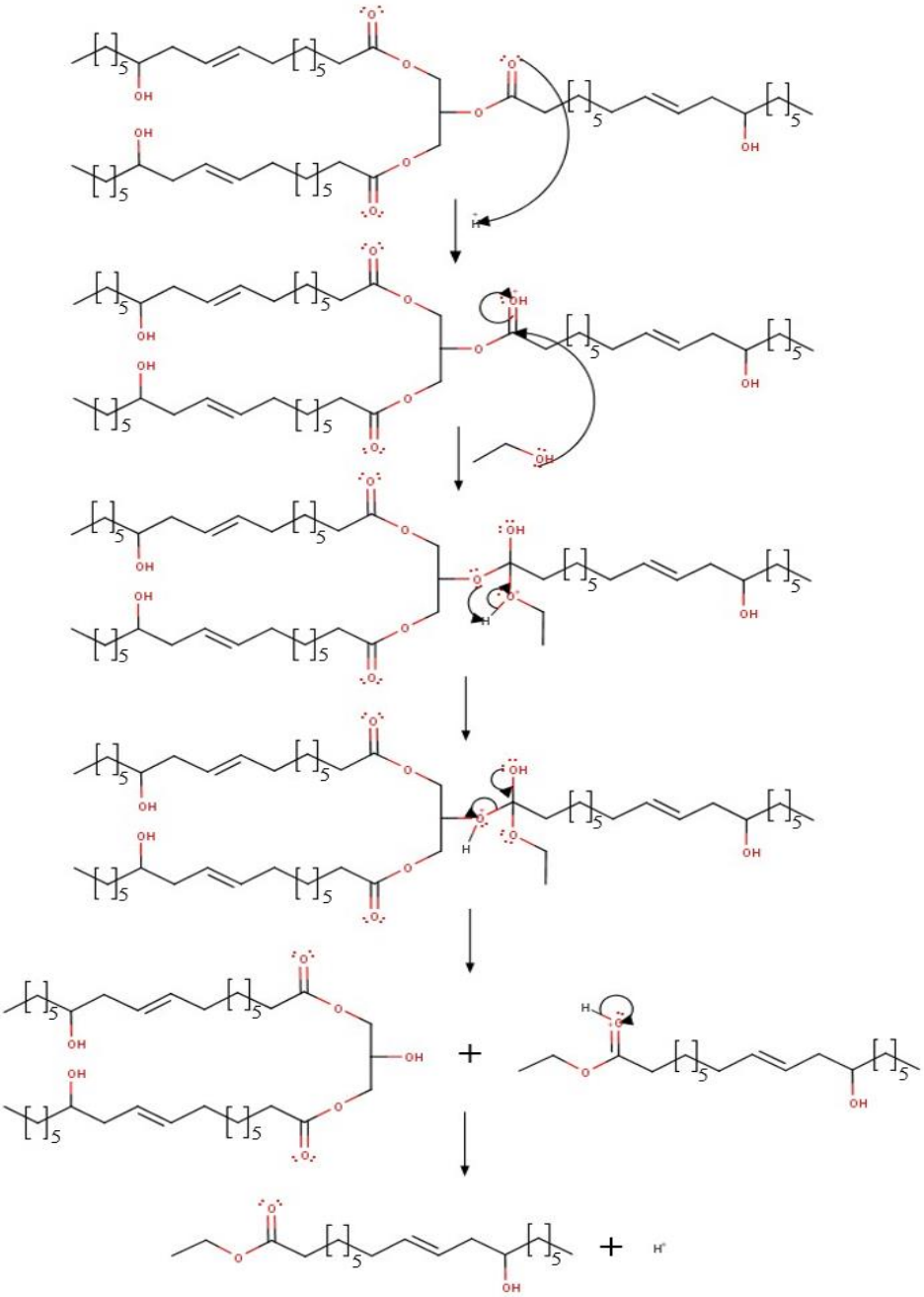
Puncak	Senyawa	SI	t_R (menit)	Konsentrasi (%)
1	 Metil 14-metil pentadekanoat	84	37,686	0,872
2	 Metil 9,12-oktadekadienoat	81	40,951	4,285
3	 Metil 11-oktadekenoat	83	41,117	4,547
4	 Metil oktadekanoat	80	41,680	1,630
5	 Metil risinoleat	80	44,484	88,666

Gambar 4, menunjukkan lima puncak yang mewakili lima metil ester dalam minyak jarak. Puncak ke-5 dengan waktu retensi 44.484 menit adalah metil risinoleat (88.666%) sebagai asam lemak penyusun utama dalam minyak jarak. Metil ester lainnya adalah metil 14-metil pentadekanoat (0.872%) pada puncak ke-1, metil 9,12-oktadekadienoat (4.285%) pada puncak ke-2, metil 11-oktadekenoat (4.547%) pada puncak ke-3, dan metil oktadekanoat (1.630%) pada puncak ke-4. Hasil analisis GCMS terhadap substrat minyak jarak sama dengan hasil penelitian Setiadji dkk. (2017) yang melakukan reaksi transesterifikasi terhadap minyak jarak dengan metanol menggunakan katalis basa (KOH) selama 3 jam [18]. Beberapa komponen penyusun minyak jarak yang dihasilkan dari penelitian Setiadji dkk. (2017) diantaranya yaitu *methyl ricinoleate* (75.58%); *methyl linoleate* (6.63%); *methyl oleate* (7.34%); *methyl palmitate* (2.10%); *methyl stearate* (3.85%); dan *methyl ester* lainnya (0.744%) [18]. Berdasarkan hasil analisis substrat minyak jarak menggunakan GC-MS, metil risinoleat merupakan komponen penyusun utama dalam minyak jarak.

Minyak jarak memiliki komponen utama berupa risinolein (**Gambar 5**), gliserida dari asam risinoleat [19]. Asam risinoleat memiliki tiga gugus fungsional yaitu ester *linkage*, ikatan rangkap dan gugus hidroksil [19].



Gambar 5. Trigliserida minyak jarak [10]

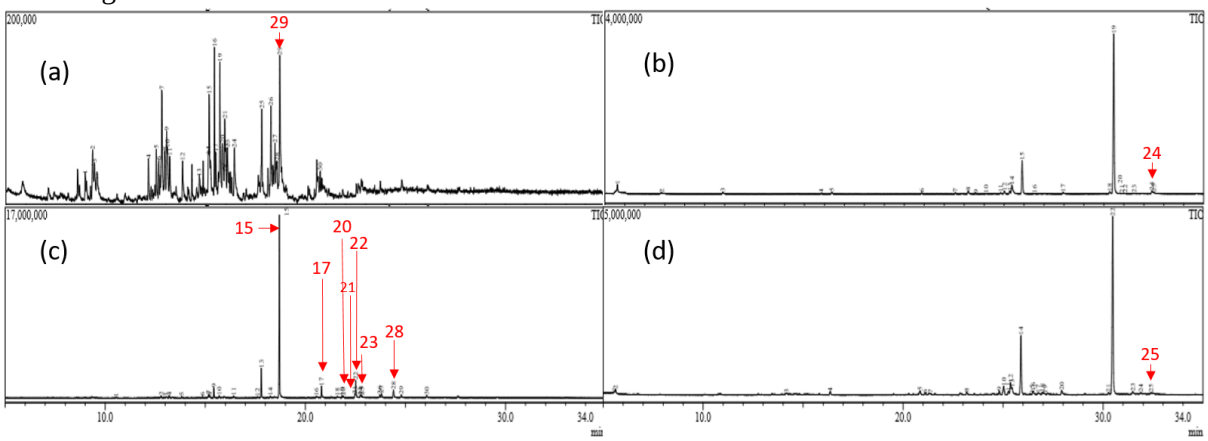


Gambar 6. Mekanisme reaksi transesterifikasi minyak jarak

Trigliserida minyak jarak pada **Gambar 5**, mengalami reaksi transesterifikasi menghasilkan alkil ester yang terbentuk dari pergantian gugus hidroksil dari suatu gugus karboksilat dengan gugus alkoksi dari alkohol. Mekanisme reaksi transesterifikasi yang ditunjukkan pada **Gambar 6,** diawali dengan protonasi karbonil oleh asam (H_2SO_4) yang berfungsi sebagai katalis. Karbonil diaktivasi terhadap serangan nukleofil. Kemudian nukleofil (gugus hidroksil dari etanol) menyerang karbonil. Setelah itu terjadi transfer proton dari alkohol ke gugus C-O ester dan terjadi pemutusan digliserida karena terbentuknya kembali gugus C=O karbonil dari asam risinoleat. Tahap terakhir yaitu deprotonasi (H^+) menghasilkan senyawa ester baru yaitu etil risinoleat.

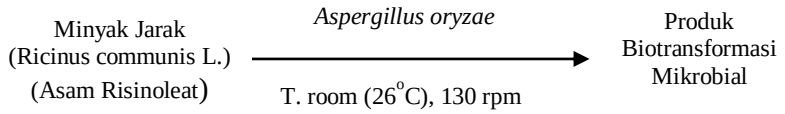
3.2 Biotransformasi Minyak Jarak oleh Aspergillus oryzae

Produk biotransformasi minyak jarak oleh *Aspergillus oryzae* dianalisis menggunakan GC-MS. **Tabel 3** menyajikan produk reaksi yang didapat dengan minyak jarak pada kromatogram **Gambar 7**.

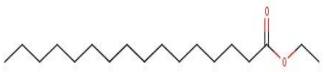
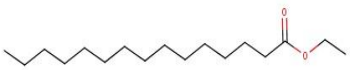


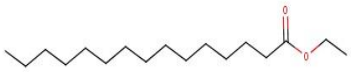
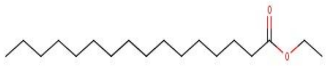
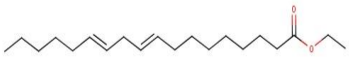
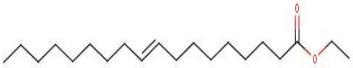
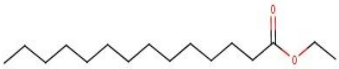
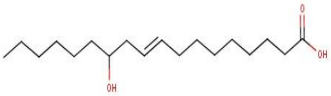
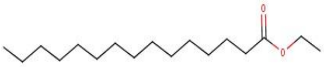
Gambar 7. Kromatogram biotransformasi minyak jarak oleh *Aspergillus oryzae*: **(a)** hari ke- 3, **(b)** hari ke-5, **(c)** hari ke-7, **(d)** hari ke-9

Pembentukan produk lakton melalui proses reaksi biotransformasi ini menggunakan substrat minyak jarak sebagai *starting material.* Reaksi tersebut dibantu oleh *Aspergillus oryzae* yang dapat menghasilkan berbagai macam enzim untuk mengonversi substrat minyak jarak menjadi produk lakton dengan kondisi temperatur ruang (26°C) dan pengadukan menggunakan *shaker* pada kecepatan 130 rpm. Berikut merupakan reaksi umum biotransformasi minyak jarak oleh *Aspergillus oryzae*:



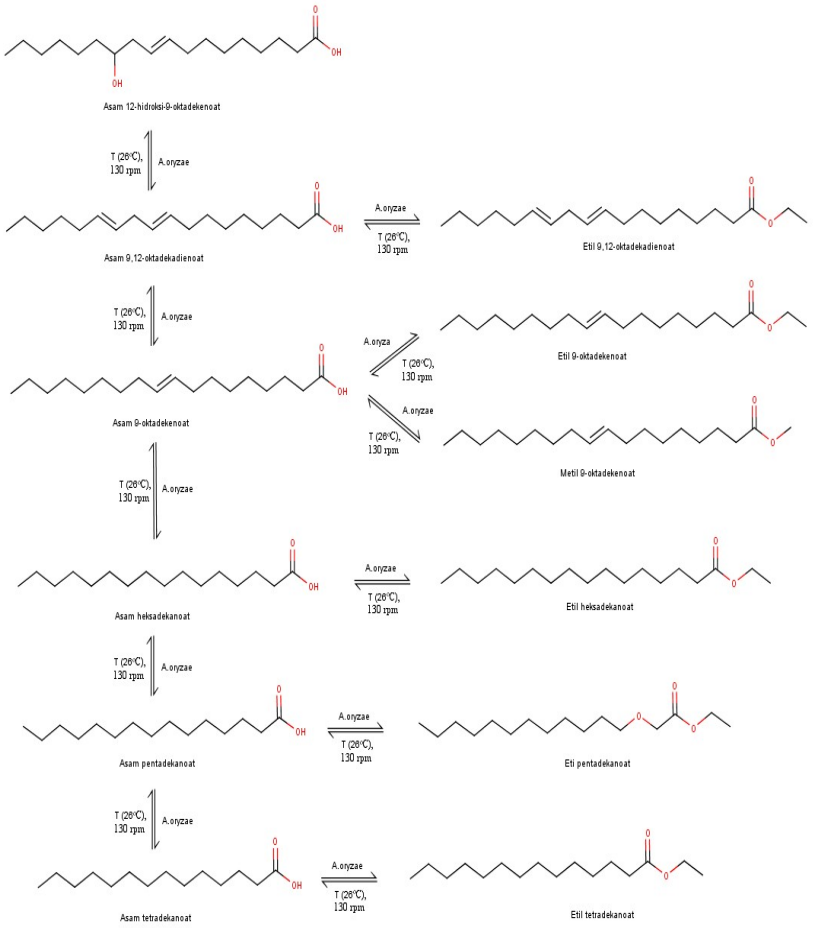
Tabel 3. Senyawa hasil biotransformasi minyak jarak

t (Hari)	No. Puncak	Senyawa	t_R (Menit)	% Area
3	29	Etil heksadekanoat 	18,701	8,24
5	24	Etil pentadekanoat 	32,404	1,22

t (Hari)	No. Puncak	Senyawa	t_R (Menit)	% Area
7	15	Etil pentadekanoat 	18,701	56,28
	17	Etil heksadekanoat 	20,804	3,54
	20	Metil 9-oktadekenoat	21,884	0,49
	21	Etil 9,12-oktadekadienoat 	22,467	1,08
	22	Etil 9-oktadekenoat 	22,514	6,16
	23	Etil tetradekanoat 	22,733	0,97
	28	Asam 12-hidroksi-9-oktadekenoat 	24,400	3,27
9	25	Etil pentadekanoat 	32,394	0,34

Berdasarkan **Tabel 3**, biotransformasi minyak jarak hari ke-3, 5, 7, dan 9 menghasilkan beberapa senyawa ester. Hal ini menunjukkan bahwa proses biotransformasi hanya sampai pada tahap esterifikasi dan belum mencapai tahap pembentukan intermediet melalui proses β-oksidasi serta tahap laktonisasi (pembentukan produk lakton). Pada hari ke-5 hingga hari ke-9 terdapat satu senyawa yang berulang yaitu etil pentadekanoat, dimana persen area dari senyawa tersebut mengalami peningkatan dari hari ke-5 (1,22%) menuju hari ke-7 (56,28%) dan mengalami penurunan persen area pada hari ke-9 (0,34%). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa etil pentadekanoat terbentuk maksimum pada hari ke-7. Penurunan persen area senyawa etil pentadeknoat (56,298%, 7 hari) ke (0,34%, 9 hari) disebabkan oleh terbentuknya produk lain pada saat biotransformasi hari ke-9.

Biotransformasi minyak jarak dapat terjadi melalui reaksi yang dikatalisis oleh enzim lipase yang dihasilkan oleh mikroba *Aspergillus oryzae*. *Aspergillus oryzae* dikondisikan pada temperatur ruang (26°C) dengan kecepatan *shaker* 130 rpm. Berikut ini merupakan dugaan reaksi biotransformasi minyak jarak yang disajikan dalam **Gambar 8**. Reaksi pada **Gambar 8** menunjukkan adanya proses biotransformasi dari asam 12-hidroksi-9-oktadekenoat (asam risinoleat) menjadi beberapa produk ester yaitu etil 9,12-oktadekadienoat, etil 9-oktadekenoat, metil 9-oktadekenoat, etil heksanoat, etil pentadekanoat, dan etil tetradekanoat.

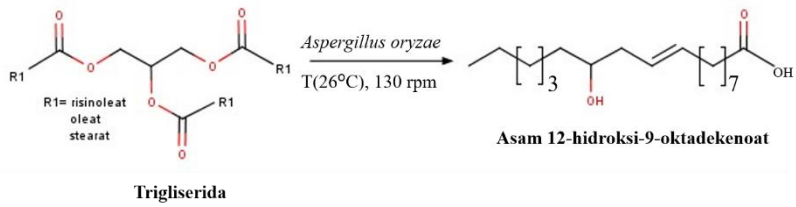


Gambar 8. Dugaan reaksi biotransformasi minyak jarak oleh *Aspergillus oryzae*

Reaksi biotransformasi minyak jarak yang terjadi hanya sampai pembentukan ester dan belum sampai pada tahap laktonisasi. Hal ini disebabkan oleh adanya perbedaan metode yang dilakukan. Menurut paten Farbood dan Wilis (1985), *γ-decalactone* dapat diproduksi dengan adanya pengaturan pH, adanya penambahan *inducer* seperti asam dekanoat, adanya penambahan senyawa terhidrolisis, dan adanya penambahan enzim [4]. Selain hal tersebut, enzim lipase yang dihasilkan oleh *Aspergillus oryzae* dapat terdenaturasi seiring bertambahnya waktu inkubasi dan keterbatasan nutrisi untuk *Aspergillus oryzae* bertahan hidup.

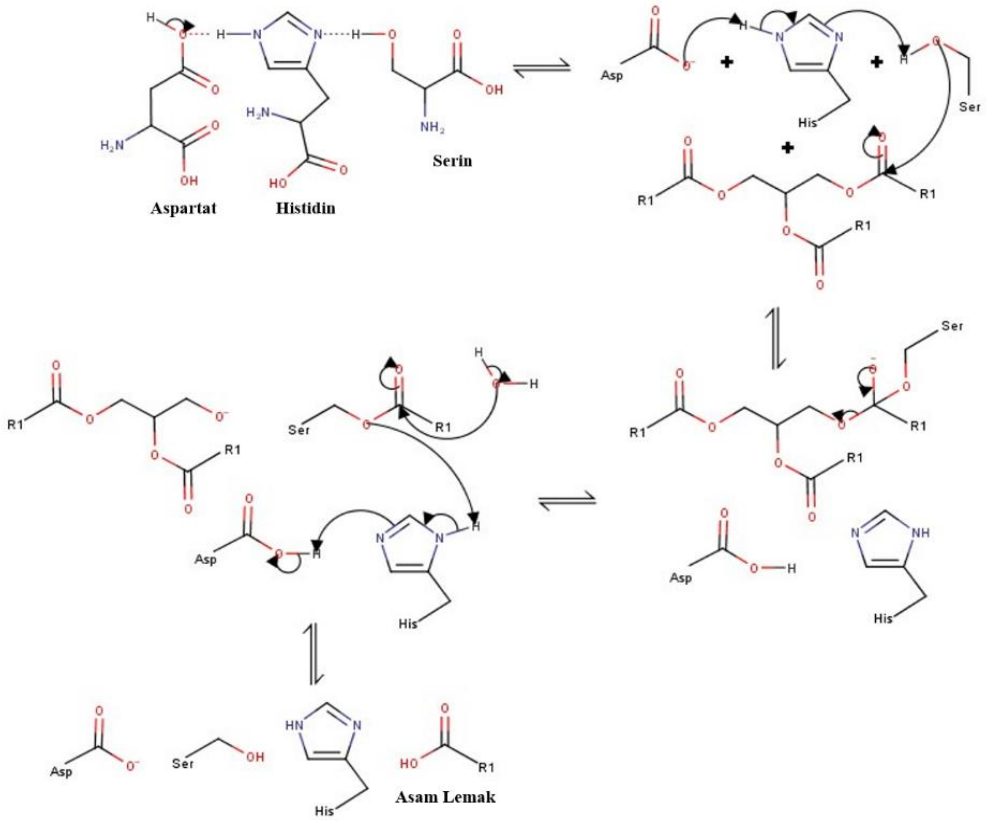
3.3 Mekanisme Reaksi Hidrolisis Biotransformasi Minyak Jarak oleh Aspergillus oryzae

Produk ester yang terbentuk diawali dengan reaksi hidrolisis terhadap minyak jarak. Produk hidrolisis minyak jarak, asam 12-hidroksi-9-oktadekenoat, ditunjukkan dalam **Tabel 3** dan persamaan reaksi disajikan dalam **Gambar 9**.



Gambar 9. Reaksi hidrolisis trigliserida minyak jarak menjadi asam 12-hidroksi-9-oktadekenoat

Dugaan mekanisme reaksi hidrolisis minyak jarak menggunakan enzim lipase yang dihasilkan oleh *Aspergillus oryzae* ditunjukkan pada **Gambar 10**. Dalam **Gambar 10** menjelaskan reaksi hidrolisis trigliserida minyak jarak menjadi asam lemak melalui pendekatan sisi aktif enzim yang dihasilkan oleh *Aspergillus oryzae*. Salah satu enzim yang dihasilkan oleh *Aspergillus oryzae* adalah enzim lipase [12]. Lipase berfungsi sebagai katalis yang memiliki kemampuan menghidrolisis trigliserida minyak menjadi asam lemaknya [20]. Enzim lipase memiliki sisi akif enzim berupa residu asam amino yaitu serin, histidin dan aspartat [21]. Asam amino tersebut dimungkinkan memiliki peran dalam reaksi hidrolisis.

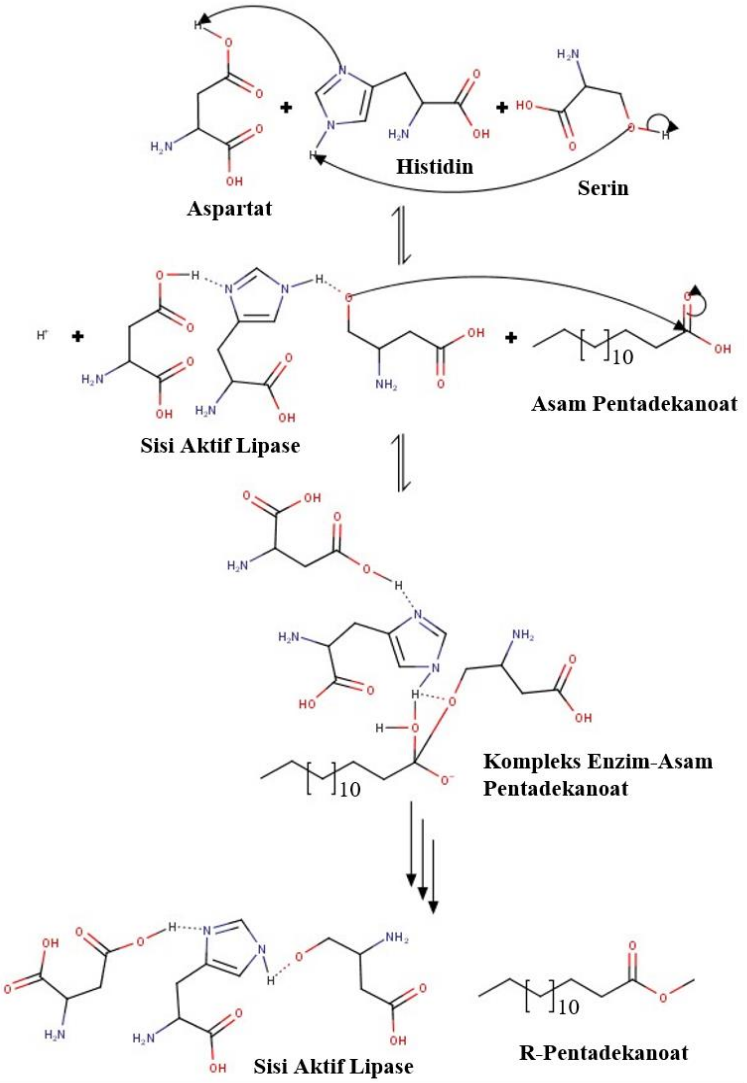


Gambar 10. Dugaan mekanisme reaksi hidrolisis trigliserida minyak jarak menjadi asam lemak

Mekanisme reaksi hidrolisis trigliserida minyak jarak yang ditunjukkan dalam **Gambar 10** diawali dengan pembentukan triad katalitik antara histidin, serin dan asam aspartat. Kemudian histidin mendeprotonasi gugus OH serin. Serin menyerang gugus karbonil trigliserida menghasilkan intermediet asil-enzim. Kemudian histidin mendeprotonasi intermediet asil-enzim dan gugus OH-air menyerang sebagai nukleofil gugus asil sehingga katalitik enzim lepas menghasilkan asam lemak.

3.4 Mekanisme Reaksi Esterifikasi Biotransformasi Minyak Jarak oleh Aspergillus oryzae

Biotransformasi minyak jarak oleh *Aspergillus oryzae* menghasilkan beberapa produk berupa senyawa ester yang disajikan dalam **Tabel 3**. Pembentukan senyawa ester ini melalui reaksi esterifikasi yang dapat didekati dengan sisi aktif enzim lipase dari *Aspergillus oryzae*. Dugaan mekanisme reaksi esterifikasi dengan menggunakan enzim yang dihasilkan oleh *Aspergillus oryzae* disajikan dalam **Gambar 11**.



Gambar 11. Dugaan mekanisme reaksi esterifikasi asam pentadekanoat menjadi R-pentadekanoat

Berdasarkan **Gambar 11** mekanisme reaksi esterifikasi diawali dengan interaksi antara tiga sisi aktif enzim lipase yaitu serin, histidin dan asam aspartat. Kemudian atom O pada serin menyerang atom C pada gugus karbonil asam pentadekanoat membentuk kompleks enzim-asam pentadekanoat. Kompleks enzim-asam pentadekanoat melalui beberapa tahapan menghasilkan sisi aktif enzim dan R-pentadekanoat.

3.5 Analisis Senyawa Produk Biotransformasi Minyak Jarak oleh Aspergillus oryzae

Produk utama yang terbentuk melalui biotransformasi terhadap minyak jarak oleh *Aspergillus oryzae* (26°C, 130 rpm) adalah etil heksadekanoat (8,24%, 3 hari), etil pentadekanoat (1,22%, 5 hari), etil pentadekanoat (56,28%, 7 hari) dan etil pentadekanoat (0,34%, 9 hari). Semakin lama waktu inkubasi maka semakin banyak produk etil pentadekanoat yang terbentuk, dari 1,22% (5 hari) menjadi 56,28% (7 hari). Namun, mengalami penurunan menjadi 0,34% (9 hari).

Biotransformasi minyak jarak oleh *Aspergillus oryzae* hanya membentuk produk berupa senyawa ester dan belum terbentuk senyawa lakton yang diharapkan. Hal ini dapat disebabkan oleh enzim yang dihasilkan oleh *Aspergillus oryzae* tidak spesifik melainkan terdapat beberapa jenis enzim lainnya. Menurut penelitian Machida dkk. (2008), *Aspergillus oryzae* memiliki

kemampuan untuk menghasilkan sejumlah enzim diantaranya yaitu enzim lipase, protease, dan amilase [12]. Terbentuknya enzim yang dihasilkan oleh *Aspergillus oryzae* ini dapat memicu adanya banyak produk samping yang dihasilkan dari proses reaksi biotransformasi dan dapat meminimalisir terbentuknya produk lakton. Selain itu, tidak terbentuknya enzim lipase juga dapat menjadi penyebab produk lakton tidak teridentifikasi. Menurut penelitian Dali dkk. (2010), selama proses fermentasi berlangsung diperlukan pengadukan secara konsisten supaya konsumsi oksigen selalu ada [22]. Penurunan oksigen terlarut dapat menyebabkan penurunan dalam laju pertumbuhan sel-sel didalam medium fermentasi. Penelitian Dali dkk. (2010) juga memaparkan bahwa kultur yang teraduk memiliki aktivitas enzim lipase 50% lebih tinggi dibandingkan kultur yang tidak teraduk [22]. Akan tetapi, kecepatan pengadukan yang terlalu tinggi juga dapat menurunkan aktivitas enzim lipase.

Enzim lipase kemungkinan juga tidak terbentuk karena keterbatasan sumber nitrogen dalam medium yang digunakan untuk pertumbuhan *Aspergillus oryzae*. Penelitian Ohnishi dkk. (1994) menyatakan bahwa konsentrasi tinggi sumber nitrogen dalam media efktif dapat meningkatkan produksi lipase oleh mikroorganisme [23]. Enzim lipase yang dihasilkan oleh *Aspergillus oryzae* dalam kultur padat hanya dalam jumlah kecil [23]. Hal ini dapat ditinjau dari aktivitas enzim protease yang lebih tinggi dibandingkan aktivitas enzim lipase yang dihasilkan oleh *Aspergillus oryzae* [23]. Kondisi optimal produksi lipase dalam kultur *Aspergillus oryzae* ditentukan dalam hal pH, komposisi medium, dan suhu [23].

4. KESIMPULAN (CONCLUSION)

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa semakin lama waktu inkubasi dalam biotransformasi minyak jarak oleh *Aspergillus oryzae* maka semakin banyak produk etil pentadekanoat yang terbentuk, dari 1,22% (5 hari) menjadi 56,28% (7 hari). Namun, mengalami penurunan menjadi 0,34% (9 hari). Senyawa etil pentadekanoat terbentuk maksimum pada hari ke-7. Produk maksimum yang terbentuk melalui metode konvensional (26°C, 130 rpm) adalah etil heksadekanoat (8,24%, 3 hari), etil pentadekanoat (1,22%, 5 hari), etil pentadekanoat (56,28%, 7 hari) dan etil pentadekanoat (0,34%, 9 hari).

DAFTAR PUSTAKA (REFERENCE)

[1] Welsh, Flask W.,William D. Murray., Ross E. Williams. (1989). Microbiological and Enzymatic Production of Flavor and Fragrance Chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*, Volume 9, Issue 2 (1989).

[2] Gopinath, M., L.Vijayakimar., R. Dhanasekar., T. Viruthagiri. (2008). Microbial Biosynthesis of γ-Decalactone and its Applications-A Review. *Global Journal of Biotechnologi & Biochemistry*, 3 (2): 60-68.

[3] Romero-Guido C., Belo I., Ta T.M., Cao-Hoang L., Alchihab M., Gomes N., Thonart P., Teixeira J.A., Destain J., and Wache Y. (2011). Biochemistry of Lactone Formation in Yeast and Fungi and its Utilisation for The Production of Flavour and Fragrance Compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 89 : 535–547.

[4] Farbood M.I dan Wilis B.J. (1985). Production of *γ-Decaalactone. US Patent*, 4,560,656.

[5] Okui By Seiichi., Mitsuru Uchiyma., Michinao Mizukagi. (1963). Metabolism of Hydroxy Fatty Acids. *The Journal of Biochemistry*, Vol. 54, No. 6, 1963.

[6] Borges, Keyller Bastos., Warley De Souza Borges., Monica Tallarico Pupo., Pierina Sueli Bonato. (2007). Endophytic Fungi as Models for The Stereoselective Biotransformation of Thioridazine. *Appl. Microbiol Biotechnol*, (2007) 77:669-674

[7] Kebamo, Selamu., Shibiru Tesema., Bekesho Geleta. (2015). The Role of biotransformation in Drug Discovery and Development. *Journal of Drug Metab Toxicol*, 2015, 6-5.

[8] Braga, A., I. Belo. (2016). Biotechnological Production of γ-decalactone, A Peach Like Aroma, by Yarrowia lipolytica. *World J Microbiol Biotechnol*, (2016) 32:169.

[9] Gawdzik, Barbara dan Angelika Kamizela. Lactones with A Fragrance Properties. *Institute of Chemistry, University of Technology*.
[10] Patel, Vinay R., Gerard G. Dumancas., Lakshmi C. Kasi Viswanath., Randall Maples., ad Bryan John J. Subong. (2016). *Castor Oil: Properties, Uses, and Optimization of Processing Parameters in Commercial Production*. Libertas Academica.
[11] Andrade, Dayana Pereira de., Beartriz Ferreira Carvalho., Rosane Freitas Schwan., Disney. (2017). Gamma-Decalactone Production by Yeast Strains Under Different Conditions. *Food Technology and Biotechnology*, 55 (2) 2017.
[12] Machida, Masayuki., Osamu Yamada., Katsuya Gomi. (2008). Genomics of Aspergillus oryzae: Learning from The History of Koji Mold and Exploration of Its Future. *DNA Research*, 15, 173-183 (2008).
[13] Ye, Mao., Ying Lin., Wenbiao Huang., Jinhua Wei. (2014). Comparative Analusis of Aspergillus oryzae with Normal and Abnormal Color Conidia. *Indian J Microbiol*, 54(1):108-110.
[14] Toida, Jinichi., Kimio Kondoh., Mikio Fukuzawa., Kunio Ohnishi & Junichi Sekiguchi. (1995). Purification and Characterization of a Lipase from Aspergillus oryzae, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*.
[15] Widiastutik, Catur. (2006). Penentuan Suhu dan Waktu Inkubasi Optimum Aktivitas Lipase Amobil dari Mucor michei. *Skripsi*. Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.
[16] S. Gocho, N. Tabogami, M. Inagaki, C. Kawabata, dan T. Komai. (1995). Biotransformation of Oleic Acid to Optically Active γ –Dodecalactone. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 59, no. 8, hlm. 1571–1572, Jan 1995.
[17] Pubchem, *Gamma-Decalactone*, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/gamma-Decalactone#section=Top, diakses pada 13 Februari 2019.
[18] Setiadji, Soni., Nila TAnyela B., Tety Sudiarti., Eko Prabowo H., Bebeh Wahid N. (2017). Alternatif Pembuatan Biodiesel Melalui Transesterifikasi Minyak Castor (Ricinus communis) Menggunakan Katalis Campuran Cangkang Telur Ayam dan Kaolin. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Ilmu Kimia*, 3(1), Mei 2017, 1-10.
[19] Mubofu, E. B. (2016). Castor oil as a potential renewable resource for the production of functional materials. *Sustainnable Chemistry Process*, 4(1).
[20] Warche Y., Aguedo M., Choquet A. Gatfield I., Nicauld JM., Belin JM. (2001). Role of β-oxidation enzymes in γ-Decalactone Production by The Yeast Yarrowia lipolityca. *Appl Environment Microbial*, 67(12):5704.
[21] Khan, Faez Iqbal., Dongming Lan., Rabia Durrani., Weiqian Huan., Zexin Zhao., Yonghua Wang. (2017). The Lid Domain in Lipases: Structural and Functional Determinant of Enztmatic Proprties. *Fronties in Bioengineering and Biotrchnology*.
[22] Dali, Seniwati., Abd. Rauf Patong., M. Noor Jalaluddin., Pirman Ap. (2010). Optimasi Produksi Enzim, dari Isolat *Aspergillus oryzae* pada Kopra Beramur. *Indonesia Chemica Acta*, Vol. 3, No. 1, Juni 2010.
[23] Ohnishi, Kunio., Yohko Yoshida., Junichi Sekiguchi. (1994). Lipase Production of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol.77, No. 5, 490-495.