

OPTIMASI KONDISI PRODUKSI PEKTINASE DARI *Aspergillus niger*

Iftakhul Mufarrikha, Anna Roosdiana (*), Sasangka Prasetyawan

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya
Jl. Veteran Malang 65145

*Alamat korespondensi, Tel : +62-341-575838, Fax : +62-341-575835

Email: aroos@ub.ac.id

ABSTRAK

Pektinase merupakan enzim yang dapat memecah senyawa pektin menghasilkan asam galakturonat. Pektinase dapat diisolasi dari berbagai mikroorganisme salah satunya adalah *Aspergillus niger*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kondisi optimum produksi pektinase meliputi pH, temperatur dan waktu fermentasi *Aspergillus niger*. Fermentasi untuk menghasilkan enzim pektinase dilakukan dengan variasi pH 5, 6, 7, 8, 9, 10 dan temperatur (30, 35, 40, 45, 50) °C, serta waktu fermentasi selama (24, 48, 60, 72, 96, 120) jam. Ekstrak kasar pektinase hasil fermentasi digunakan untuk menentukan kadar protein dan aktivitas enzim. Aktivitas enzim diukur berdasarkan banyaknya µg asam galakturonat (gula pereduksi) yang dihasilkan oleh hidrolisis pektin pada kondisi optimum. Penentuan kadar protein dilakukan dengan menggunakan reagen Biuret dan penentuan gula pereduksi menggunakan reagen DNS (Dinitrosalisilat) secara spektrofotometri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum produksi pektinase oleh *Aspergillus niger* yaitu pada pH 5, temperatur 40 °C dan waktu fermentasi selama 96 jam dengan konsentrasi pektinase sebesar 7.99 µg/mL dan aktivitas sebesar 20.14 unit.

Kata kunci : aktivitas, *Aspergillus niger*, fermentasi, pektinase

ABSTRACT

Pectinase is an enzyme that can hydrolyze pectin compounds into galacturonic acid. Pectinase can be isolated from various microorganisms, one of them is *Aspergillus niger*. The purpose of this research was to determine the optimum conditions of pectinase production including pH, temperature and time of fermentation. The fermentation was done at pH 5, 6, 7, 8, 9, 10, temperature (30, 35, 40, 45, 50) °C and fermentation time for (24, 48, 60, 72, 96, 120) hours. Crude extract of pectinase was determined for the protein content and enzyme activity. The enzyme activity was based on the number of µg galacturonic acid (reducing sugar) that was produced by hydrolysis of pectin in optimum condition. The content of protein was reacted with Biuret reagent and reducing sugars with DNS (Dinitrosalicylate) reagent, and measured by spectrophotometric method. The results showed that the optimum condition of *Aspergillus niger* to produce pectinase was at pH 5, temperature 40 °C and 96 hours of fermentation time resulting in 7.99 µg/mL pectinase concentration and activity of 20.14 units.

Keywords : activity, *Aspergillus niger*, fermentation, pectinase.

PENDAHULUAN

Berkembangnya sektor industri sekarang ini memberikan dampak signifikan terhadap peningkatan penggunaan enzim sebagai biokatalisator, seperti dalam bidang minuman. Beberapa pengamatan yang telah dilakukan membuktikan bahwa penggunaan enzim semakin meningkat dari tahun ke tahun mencapai 10-15%. Enzim memiliki sifat-sifat spesifik yang sangat

menguntungkan yaitu, efisien, selektif, mengalami reaksi tanpa efek samping dan ramah lingkungan [1]. Mikroorganisme merupakan sumber enzim yang paling banyak digunakan daripada hewan dan tumbuhan, karena mikroorganisme memiliki pertumbuhan yang cepat dan tumbuh pada berbagai jenis substrat [2]. Pektinase dapat diisolasi dari *Aspergillus niger*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus subtilis* dan *Penicillium chrysogenum* [3]. *Aspergillus niger* merupakan salah satu jenis kapang yang sering digunakan pada kultivasi media padat untuk menghasilkan pektinase. Kapang ini dapat ditumbuhkan pada media padat yang banyak mengandung nutrisi polisakarida yang berfungsi sebagai sumber karbon [4].

Pektinase atau enzim pektinolitik merupakan salah satu enzim yang banyak digunakan dalam sektor komersial, terutama digunakan sebagai biokatalis pada proses penghancuran buah dan penjernihan sari buah [5]. Pektinase merupakan enzim yang memecah pektin, suatu substrat polisakarida yang diperoleh dari dinding sel tumbuhan. Pektin merupakan polimer dari asam D-galakturonat yang dihubungkan oleh ikatan 1-4 glikosidik [6,7]. Pada penelitian ini dilakukan optimasi produksi pektinase secara fermentasi oleh *Aspergillus niger*.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah kultur murni *Aspergillus niger* diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya Malang. Bahan-bahan yang digunakan memiliki derajat kemurnian pro analisa (pa) dan for *Microbiology*. Bahan-bahan yang memiliki kualitas pa antara lain: KH_2PO_4 , CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaOH , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$, Na_2SO_3 , asam dinitrosalisilat (DNS), $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, CH_3COOH , CH_3COONa , $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, $\text{NaC}_6\text{H}_5\text{O}_7$, Na_3PO_4 monobasis, Na_3PO_4 dibasis, Na_2CO_3 , NaHCO_3 . Sedangkan bahan kimia yang digunakan dengan kualitas for *Microbiology* antara lain: pepton (Oxoid), kasein, *citrus* pektin (Merck), tepung agar, urea dan dextrosa. Bahan lain yang digunakan adalah kentang dan akuades.

Peralatan yang digunakan antara lain seperangkat alat gelas, *magnetic stirrer*, jarum ose, bola hisap, kertas saring *Whatman* No. 40, *syringe*, kapas steril, oven, neraca analitik (Mettler Toledo AL 204), penangas air (Wemmert W 200), inkubator (Heraeus Type B 5042), pH meter (Inolab WTW), autoklaf (All, American Model 20X), shaker (Edmund Buhler SM 25 24B),

sentrifuse dingin (Juan MR 1889), penangas listrik (Janke-Kunkel), refrigerator, Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu Model 160A double beam), laminal flow air, aluminium foil dan botol sampel.

Produksi dan Isolasi Pektinase

Aspergillus niger yang telah ditumbuhkan dalam media padat agar miring disuspensikan ke dalam 2 mL akuades steril menggunakan jarum ose. Suspensi ditanam pada 15 mL media cair steril. Optimasi produksi pektinase pengaruh pH dilakukan dengan cara: dalam labu Erlenmeyer 25 ml ditambahkan 2 mL inokulum *Aspergillus niger* dan 25 mL media cair. Selanjutnya campuran difermentasi pada temperatur 30 °C selama 96 jam dengan variasi pH 5, 6, 7, 8, 9, dan 10. Optimasi produksi pektinase pengaruh temperatur dilakukan dengan cara yang sama pada pH optimum pada variasi temperatur 30, 35, 40, 45, dan 50 °C selama 96 jam. Sedangkan Optimasi produksi pektinase pengaruh waktu fermentasi dilakukan dengan cara yang sama pada pH dan temperatur optimum dengan variasi waktu 24, 48, 60, 72, 96, dan 120 jam.

Masing-masing campuran substrat yang sudah difermentasi ditambah 5 mL buffer asetat pH 5, kemudian dihomogenkan supaya enzim pektinase terekstrak, selanjutnya sampel disentrifugasi pada 3000 rpm selama 30 menit pada temperatur 4 °C dan supernatan merupakan ekstrak kasar enzim pektinase.

Uji Kadar Protein

Penentuan kadar protein dilakukan dengan metode Biuret. Sebanyak 2 mL larutan enzim ditambah 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein, kemudian dikocok dan diinkubasi pada temperatur 50 °C selama 30 menit. Serapan diukur pada panjang gelombang 540 nm sehingga kadar protein diketahui dengan memplotkan nilai serapan pada persamaan regresi kurva baku kasein. Sebagai larutan blanko 4 mL akuades ditambah 8 mL reagen Biuret selanjutnya diperlakukan sama seperti perlakuan sebelumnya.

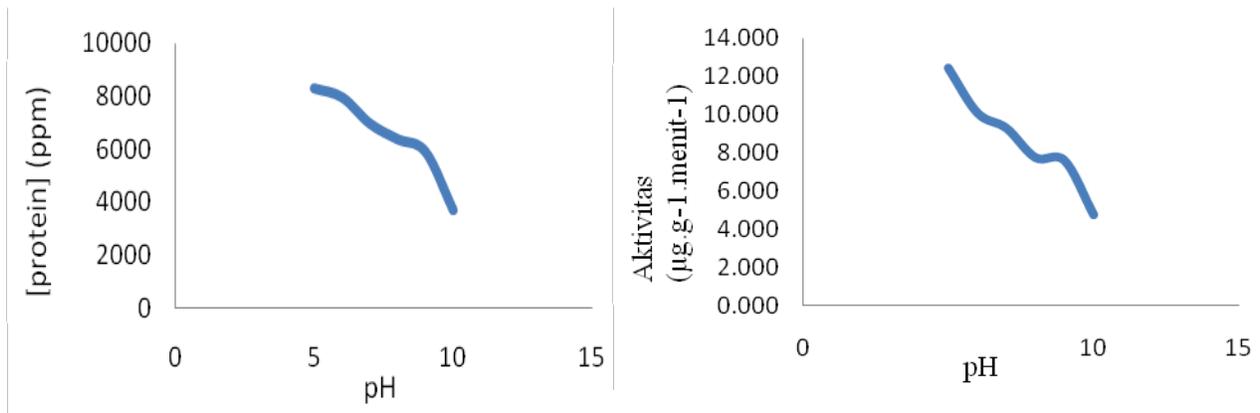
Uji Aktivitas Pektinase

Tabung reaksi sebanyak 2 buah masing-masing diisi 1 mL susbtrat pektin 0,5 % (b/v). 1 mL ekstrak kasar pektinase dan 1 mL buffer asetat pH 5, kemudian dipanaskan dalam penangas

air pada temperatur 50 °C selama 55 menit, selanjutnya pada tabung 2 diisi dengan 1 mL akuades dan diberi perlakuan yang sama seperti sampel. Setelah itu ditambah dengan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Selanjutnya campuran dimasukkan dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan dengan akuades hingga tanda batas. Larutan diukur serapannya pada panjang gelombang 495 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

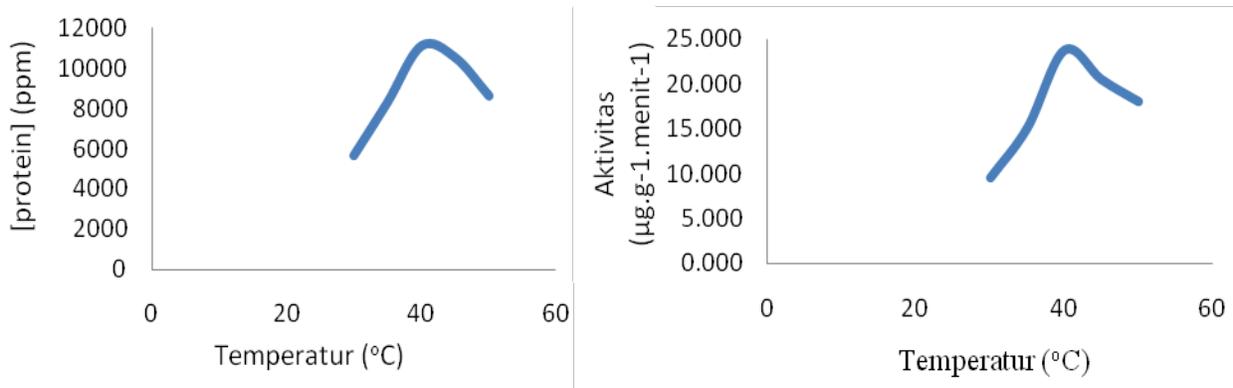
Hasil dari penelitian ini membahas kondisi optimum produksi pektinase oleh *Aspergillus niger* meliputi pH, temperatur dan waktu fermentasi. Ekstrak kasar pektinase hasil isolasi digunakan untuk menentukan aktivitas dan kadar protein. Nilai aktivitas pektinase dinyatakan dalam satuan unit aktivitas, yaitu banyaknya μg gula pereduksi (asam galakturonat) yang dapat dihasilkan oleh satu mL enzim dalam satu menit. Banyaknya enzim yang dihasilkan diasumsikan sebagai banyaknya protein yang dihasilkan, sehingga protein tinggi maka aktivitas enzim tinggi juga.



Gambar 1. Grafik kadar protein dan aktivitas pektinase hasil fermentasi pada variasi pH

Gambar 1 merupakan grafik kadar protein dan aktivitas enzim pektinase pada variasi pH. Kadar protein menunjukkan bahwa semakin basa media fermentasi maka konsentrasi protein akan semakin menurun. Konsentrasi protein tertinggi dihasilkan pada pH 5 yaitu 8267 ppm. Aktivitas pektinase hasil fermentasi tertinggi dihasilkan pada pH 5 dari kisaran pH 5-10 dan semakin menurun pada kondisi basa, karena pada umumnya kapang (*Aspergillus niger*) menyukai pH di bawah 7. Adanya perubahan pH lingkungan akan mengakibatkan aktivitas

enzim yang berperan pada biosintesis pektinase akan mengalami perubahan. Kondisi pH lingkungan medium yang optimum akan mendukung produksi enzim yang lebih maksimum. Fermentasi sangat bergantung pada sel dan akan tumbuh baik pada pH 5 karena enzim-enzim yang bekerja untuk metabolisme tumbuh baik pada pH 5.



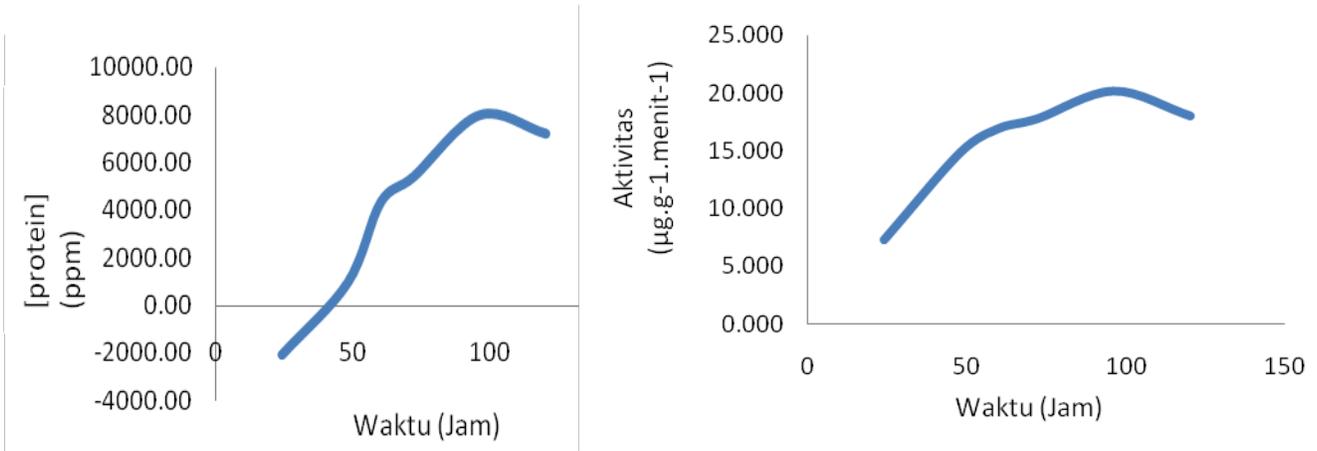
Gambar 2. Grafik kadar protein dan aktivitas pektinase hasil fermentasi pada variasi temperatur

Konsentrasi protein akan semakin meningkat seiring tingginya temperatur akan tetapi semakin menurun dengan temperatur yang terlalu tinggi (Gambar 2). Hasil uji kadar protein menunjukkan konsentrasi protein tertinggi pada temperatur 40 °C dengan kadar protein sebesar 6018 ppm. Beberapa jenis mikroba dapat hidup pada daerah temperatur yang luas, sedangkan jenis lainnya pada daerah temperatur yang terbatas. Pada umumnya batas daerah temperatur bagi kehidupan mikroorganisme antara 0-90 °C.

Temperatur fermentasi optimum yaitu pada temperatur 40 °C, karena aktivitas enzim menunjukkan kenaikan pada temperatur 30 °C sampai temperatur 40 °C. Sedangkan pada temperatur 45 °C mulai terjadi penurunan aktivitas pektinase. Hal ini karena di bawah temperatur minimum dan di atas temperatur maksimum, aktivitas enzim akan berhenti. Sel tidak dapat tumbuh dengan baik sehingga mengalami kematian bahkan pada temperatur yang terlalu tinggi akan terjadi denaturasi enzim.

Produksi pektinase dapat diketahui dengan menentukan kadar protein pada variasi waktu fermentasi. Semakin lama waktu fermentasi konsentrasi protein meningkat. Kadar protein

tertinggi dihasilkan pada waktu 96 jam hal ini karena pada waktu tersebut pertumbuhan mikroba mencapai maksimal (Gambar 3).



Gambar 3. Grafik kadar protein dan aktivitas pektinase hasil fermentasi pada variasi waktu fermentasi

Aktivitas pektinase menunjukkan waktu fermentasi optimum pada waktu 96 jam, dikarenakan pada kondisi tersebut merupakan awal fase stasioner dan akhir dari fase eksponensial sehingga mikroba dapat menggunakan nutrisi dan sangat aktif mensintesis enzim pektinase. Sedangkan pada fermentasi waktu 120 jam, mulai mengalami penurunan karena sel memasuki fase stasioner. Aktivitas enzim akan semakin menurun karena pada waktu tertentu saat jumlah mikroba yang mengkonsumsi nutrisi tersebut melebihi daya dukung nutrisi, maka akan terjadi kekurangan nutrisi. Kemudian nutrisi akan benar-benar tidak dapat lagi mencukupi kebutuhan mikroorganisme, sehingga produk yang dihasilkan akan semakin menurun.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa kondisi optimum produksi pektinase dari *Aspergillus niger* yaitu pada pH 5, temperatur 40 °C dengan waktu fermentasi selama 96 jam menghasilkan ekstrak kasar pektinase dengan konsentrasi 7.99 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan aktivitas 20.14 unit.

DAFTAR PUSTAKA

1. Rahayu S., 2004, *Karakteristik Biokimiawi Enzim Termostabil Penghidrolisis Kitin*, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
2. Jayani R. S., Saxena dan Gupta R., 2005, *Microbial Pectinolytic Enzymes a Review*, *Proses Biochem*, 40: 2931-2944.
3. Akhdiya A., 2003, *Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termostabil*, *Buletin Plasma Nutfah* 2003; 9 (2): 38-44.
4. Bayoumi R. A., Hesham M. Y., Mahmoud A., Swelim E., dan Abdel-All Z., 2008, *Production of Bacterial Pectinase from Agro-Industrial Waste under Solid State Fermentation Conditions*, *Journal of Applied Sciences Research*, 4(12): 1708-1721, INSInet Publication.
5. Sujarwo., 2009, *Isolasi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Xilanase dari Aspergillus niger*, Skripsi Program Sarjana Kimia, Universitas Brawijaya, Malang.
6. Prayitno D. A., Rachmawaty R., Handayani H., Selvy F., dan Sari R. P., 2011, *Penggunaan Enzim dalam Industri Pangan*, Universitas Diponegoro, Semarang.
7. Berry S. H., dan Yusuf A., 2009, *Pengolahan Limbah Kulit Pisang Menjadi Pektin dengan Metode Ekstraksi*, Universitas Diponegoro, Semarang.