

**PURIFIKASI DAN KARAKTERISASI ENZIM PEKTINASE  
DARI *Aspergillus ustus* BL5  
[Purification and Characterization of Pectinase from *Aspergillus ustus* BL5]\***

Yopi<sup>1</sup>, Nanik Rahmani<sup>1</sup>, Ade Andriani<sup>1</sup>, Fitria Dewi<sup>2</sup> dan Anja Meryandini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Biokatalis dan Fermentasi, Bidang Bioproses, Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI,  
Jln Raya Bogor Km 46, Cibinong 169011. Telp. 021-8754587, Fax. 021-8754588;

<sup>2</sup>Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam-Institut Pertanian Bogor;  
E-mail: yop\_i@yahoo.com

**ABSTRACT**

Pectinase is an enzyme that could hydrolyze pectin into galacturonic acid. Natural pectinase was produced by microbes such as bacteria, yeast, fungi and Actinomycetes. Application of pectinase in industry were mainly in juice industry, textile, pulp, tea, cocoa and coffee fermentation. In this research, we conducted purification and characterization of pectinase produced by *Aspergillus ustus* BL5 in submerged fermentation using commercial pectin. The result showed that the optimum of pectinase production was reached at 120 hours fermentation process with specific activity 0.59 U/mg. The crude extract of pectinase was then concentrated using PEG 6000 and purified by Sephadex G-75 gel filtration chromatography. There were 2 fractions contained pectinase which the activity was 4.15 U/mg (pectinase A) and 3.3 U/mg (pectinase B), respectively. Compare to crude extract, the yield product of pectinase A and B increased 6.94 and 5.53 times, respectively. The purified pectinase A have optimum temperature at 50 °C and optimum pH at 5.

**Key words:** Pectin, bioprocess, saccharides, culture collection, bioassay

**ABSTRAK**

Pektinase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis pektin menjadi asam galakturonat. Pektinase secara alami diproduksi oleh berbagai mikroba seperti bakteri, ragi, jamur dan Aktinomisetes. Aplikasi pektinase dalam industri terutama dalam industri minuman dari buah-buahan, tekstil, fermentasi bubur kertas, teh, kakao dan kopi. Dalam penelitian ini, kami melakukan pemurnian dan karakterisasi pektinase yang dihasilkan oleh *Aspergillus ustus* BL5 dalam fermentasi cair dengan menggunakan pektin komersial. Hasil penelitian menunjukkan bahwa produksi optimum pektinase terjadi pada 120 jam proses fermentasi dengan aktivitas spesifik 0,59 U/mg. Ekstrak kasar pektinase kemudian dipekatkan dengan menggunakan PEG 6000 dan dimurnikan dengan kromatografi gel filtrasi sephadex G-75. Terdapat 2 produk pektinase dengan aktivitas masing-masing 4,15 U/mg (pektinase A) dan 3,3 U/mg (pektinase B). Dibanding dengan enzim kasar, *yield* produk pektinase A dan B masing-masing meningkat 6,94 dan 5,53 kali. Pektinase A hasil purifikasi mempunyai suhu optimum pada 50 °C dan nilai optimum pH 5.

**Kata kunci:** pektin, bioproses, sakarida, kultur koleksi, bioassay

**PENDAHULUAN**

Pektin merupakan salah satu polimer penyusun utama lamela tengah, lapisan penyusun awal dinding sel daun teh. Pektin merupakan kompleks makromolekul glikosidik dengan berat molekuler tinggi yang penyusun utamanya adalah polimer asam D-galakturonat yang terikat dengan  $\alpha$ -1,4-glikosidik (Kashyap *et al.*, 2001). Enzim pektinase merupakan enzim yang menghidrolisis pektin melalui reaksi depolimerisasi (hidrolase dan lyase) dan de-esterifikasi (esterase). Pektinase secara alami diproduksi oleh berbagai mikroba seperti bakteri, yeast, kapang dan Aktinomisetes (Kapoor *et al.*, 2000; Kashyap *et al.*, 2000). Aplikasi pektinase di industri sangat luas, diantaranya pada industri jus buah-buahan untuk memperbaiki hasil dan kejernihan jus (Alkorta *et al.*, 1982), industri tekstil (Kashyap *et al.*,

2001), pra perlakuan limbah cair pektin, pembuatan kertas, fermentasi teh dan kopi (Carr, 1985).

Ada dua kelompok enzim pektinase yang diaplikasikan pada industri, yaitu pektinase asam yang digunakan secara luas dalam ekstraksi, klarifikasi dan pembuangan pektin dari jus buah. Sedangkan pektinase basa banyak diaplikasikan untuk pra-perlakuan limbah cair dari pengolahan sayur-sayuran yang banyak mengandung residu pektin, industri tekstil, ekstraksi minyak sayur, industri kertas, fermentasi kopi dan teh (Kashyap *et al.*, 2001; Hondal *et al.*, 2002). Enzim pektinase yang berasal dari kapang, khususnya *Aspergillus niger* secara industri sudah diproduksi dan digunakan dalam membantu proses ekstraksi, klarifikasi dan maserasi (Kester dan Visser, 1990). Di sisi lain, penggunaan pektinase pada industri teh dapat mempercepat proses fermentasi

\*Diterima: 28 Agustus 2013 - Disetujui: 17 Oktober 2013

tasi teh dan juga menghilangkan busa yang terbentuk pada bubuk teh dengan memecah pektinnya (Carr, 1985). Indonesia merupakan produsen teh ke-empat terbesar setelah China, India dan Jepang. Pemanfaatan pektinase dalam industri teh akan meningkat seiring dengan semakin tingginya konsumsi teh.

Berdasarkan penelitian sebelumnya telah dilaporkan bahwa *A. ustus* BL5 mempunyai kemampuan terbaik dalam menghasilkan pektinase dari hasil seleksi terhadap 81 isolat. Karakteristik pektinase kasar yang dihasilkan optimum pada pH 5 dan suhu 50 °C (Andriani *et al.*, 2011). Pada penelitian ini dilaporkan optimasi produksi enzim pektinase dengan variasi konsentrasi substrat, variasi pH, proses purifikasi serta karakterisasi pektinase yang dihasilkan oleh *A. ustus* BL5 pada *submerged fermentation*.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Mikroorganisme

Mikroorganisme *A. ustus* BL5 merupakan koleksi dari Laboratorium Biokatalis dan Fermentasi, Puslit Bioteknologi-LIPI.

### Optimasi produksi pektinase

Optimasi produksi enzim pektinase ekstrak kasar dilakukan dengan 5 variasi konsentrasi substrat pektin (0,5, 1, 1,5, 2 dan 2,5 %) dan 5 variasi pH (5, 6, 7, 8 dan 9). Produksi dilakukan pada media yang mengandung 0,3 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,3% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,01 % MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O selama 7 hari dan pengambilan sampel setiap 24 jam sekali. Sampel enzim ekstrak kasar diperoleh dengan sentrifugasi pada kecepatan 11.000 rpm selama 15 menit suhu 4 °C. Larutan enzim kasar yang diperoleh selanjutnya diuji aktivitas pektinase dan konsentrasi proteinnya.

### Uji Aktivitas Pektinase

Uji aktivitas pektinase dilakukan dengan metode yang dikembangkan oleh Okafor *et al.* (2010). Aktivitas pektinase ditentukan dengan menggunakan *citrus pectin* sebagai substrat (*Acros Organic*). Sebanyak 0,25 mL 0,05 % larutan *citrus pectin* dalam buffer sodium citrat 0,05 M pH 4,4 dan 0,25 mL

larutan ekstrak kasar enzim direaksikan selama 30 menit pada suhu ruang. Kemudian ditambahkan 1,5 mL larutan asam dinitrosalisilat (DNS) (Miller, 1959). Selanjutnya larutan dipanaskan pada penangas air pada temperatur 100°C selama 15 menit dan kemudian didinginkan. Larutan reaksi kemudian diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Jumlah gula reduksi yang terbentuk dihitung dengan menggunakan asam galakturonat sebagai standar. Satu unit aktivitas pektinase didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dapat memproduksi 1 μmol pektin dalam 1 menit.

### Produksi Pektinase

Produksi pektinase ekstrak kasar dilakukan berdasarkan kondisi optimum yang sudah diperoleh pada tahap sebelumnya. Produksi dilakukan pada skala 1 L selama 7 hari dan dilakukan pengambilan sampel setiap 24 jam. Hasil sampling selanjutnya disentrifugasi dua kali pada kecepatan 11.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang diperoleh kemudian digunakan untuk uji aktivitas pektinase dan kadar protein.

### Purifikasi Pektinase

Pemekatan dengan polietilena glikol (PEG) 6000 dilakukan dengan cara memasukkan 80 mL ekstrak kasar enzim ke dalam membran dialysis, kemudian ditaburi dengan PEG di seluruh permukaan membran. Enzim disimpan di dalam ruang pendingin selama semalam. Kemudian, membran dicuci dengan aquades untuk menghilangkan PEG yang tersisa di permukaan membran. Enzim yang tersisa di membran didialisis semalam dengan buffer sitrat 0.01 M pH 5. Selanjutnya larutan enzim dipekatkan dengan cara ultrafiltrasi dengan *sentricon Corning Spin-X*.

Pemurnian enzim dilakukan menggunakan matriks Sephadex G-75 dengan sistem *open column* kromatografi berdiameter 2 cm dan tinggi 18,5 cm. Satu milliliter enzim hasil pemekatan diinjeksi ke dalam gel filtrasi matriks Sephadex G-75 dan kemudian dielusi dengan 0,01 M buffer sitrat pH 5 den-

gan kecepatan 1 min/mL. Volume fraksi yang ditampung masing-masing sebanyak 1 mL. Fraksi yang dikumpulkan sebanyak 100 *microtube* dan diukur kadar proteinnya pada dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm. Aktivitas pektinase setiap fraksi diukur dengan metode tertera diatas.

### Karakterisasi Pektinase

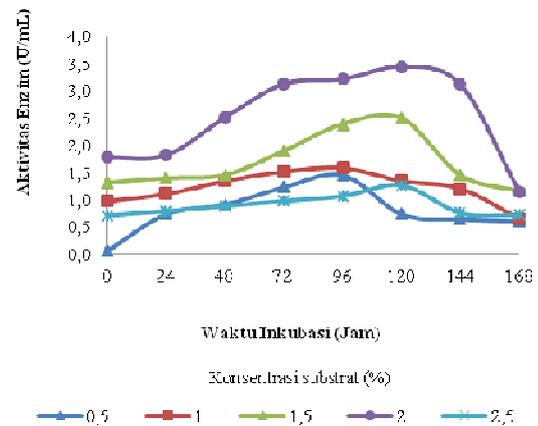
Karakterisasi enzim meliputi penentuan pH dan suhu optimum serta pengaruh beberapa senyawa kimia terhadap aktivitas pektinase. Rentang pH yang diuji dari pH 3 - 8 (selang 0,5) pada 0,05% substrat pektin. Rentang suhu yang diuji suhu 30°C-80°C (selang 10°C) dalam buffer pH optimum yang diperoleh pada tahap sebelumnya dengan waktu inkubasi selama 30 menit. Senyawa kimia yang diuji adalah EDTA, CaCl<sub>2</sub>, SDS, DMSO, dan CuSO<sub>4</sub>. Analisa dilakukan dengan melakukan pengukuran aktivitas enzim pada kondisi optimum dengan ditambahkan masing-masing 0,05 M senyawa kimia tersebut.

## HASIL

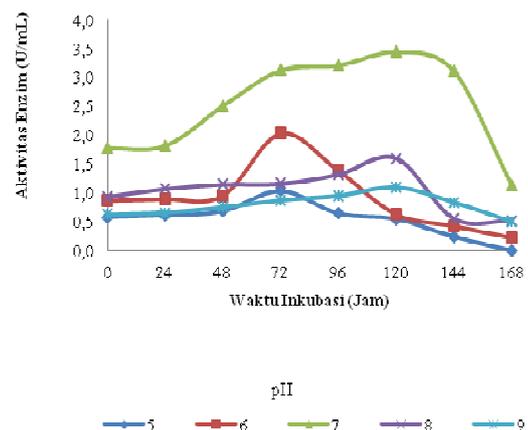
### Optimasi Produksi Pektinase

Aktivitas pektinase yang dihasilkan oleh *A. ustus* BL5 pada berbagai konsentrasi substrat yang diuji selama 168 jam pertumbuhan, berturut-turut dapat dilihat pada Gambar 1. Konsentrasi substrat 2% memberikan hasil yang tertinggi dibanding lainnya yaitu 3,45 U/mL. Konsentrasi 1,5% (2,45 U/mL) cukup memproduksi enzim meski lebih rendah dibanding konsentrasi 2%. Di sisi lain, konsentrasi 0,5% (1,45U/mL), 1% (1,58U/mL) dan 2,5% (1,26U/mL) memberikan hasil yang lebih rendah dalam produksi enzim.

Gambar 2 menunjukkan hasil pengaruh pH selama proses produksi enzim. Pertumbuhan pada pH 7 memberikan hasil lebih baik, pH 6 cukup menghasilkan enzim pada jam ke-72 inkubasi, sedang pH 5, 8 dan 9 menunjukkan hasil aktivitas pektinase yang rendah.



**Gambar 1.** Aktivitas pektinase *A. ustus* BL5 yang diuji pada 5 variasi konsentrasi substrat (0,5, 1, 1,5, 2 dan 2,5 %)



**Gambar 2.** Pengaruh pH media terhadap aktivitas pektinase yang dihasilkan oleh *A. ustus* BL5 pada konsentrasi substrat 2 % dan suhu ruang.

### Pemekatan Larutan Enzim

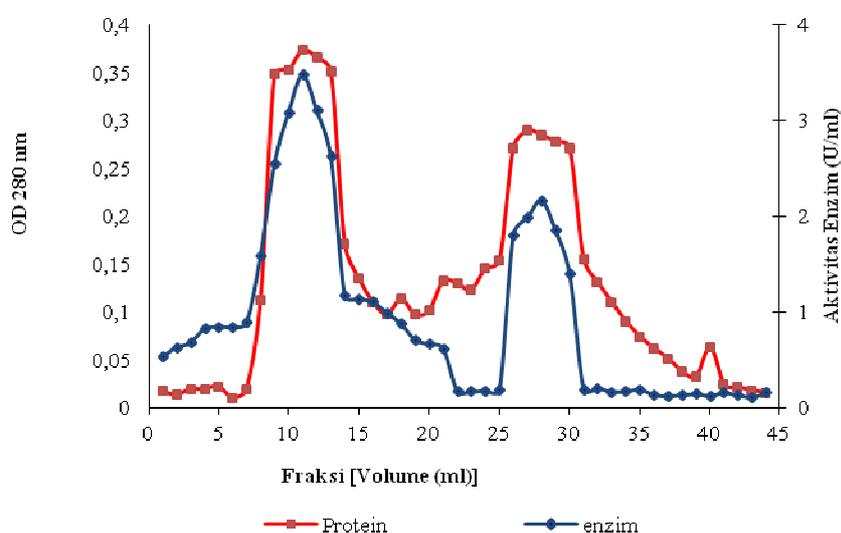
Setelah diperoleh kondisi optimum untuk produksi enzim pektinase, dilakukan produksi pektinase skala 1 L dan enzim ekstrak kasar yang diperoleh selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan PEG 6000 dan diultrafiltrasi. Pemekatan tersebut mampu meningkatkan aktivitas enzim ekstrak kasar dari

3.45 U/mL menjadi 5.77 U/mL. Selanjutnya enzim hasil pemekatan ini dimurnikan dengan kromatografi filtrasi gel.

### Kromatografi Filtrasi Gel

Hasil kromatografi filtrasi gel dengan 1 mL sample larutan enzim hasil pemekatan bisa dilihat pada Gambar 3. Dari analisa 45 fraksi elusi hasil kromatografi tersebut, terlihat ada 2 puncak utama pada fraksi nomor 11 dan 27. Fraksi no.9-13 (pektinase A) dan fraksi no.26-30 (pektinase B),

masing-masing dikumpulkan dalam satu tabung, dan kemudian dianalisa aktivitas enzim dan konsentrasi proteinnya. Tabel 1 menunjukkan hasil tahapan pemurnian pektinase dari *A. ustus* BL5, dimulai dari produksi enzim kasar, proses pemekatan, dan kromatografi filtrasi gel. Pektinase A memiliki aktivitas 4,15 U/mg dan pektinase B memiliki aktivitas 3,3 U/mg. Untuk selanjutnya dipilih pektinase A yang memiliki aktivitas lebih tinggi untuk diteliti lebih dalam.



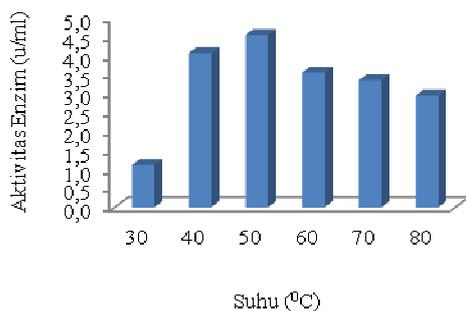
**Gambar 3.** Kromatogram gel dengan matriks Sephadex G-75, elusi menggunakan 10 mM bufer sitrat pH 5, kecepatan alir 1 min/mL.

**Tabel 1.** Tahapan pemurnian enzim pektinase

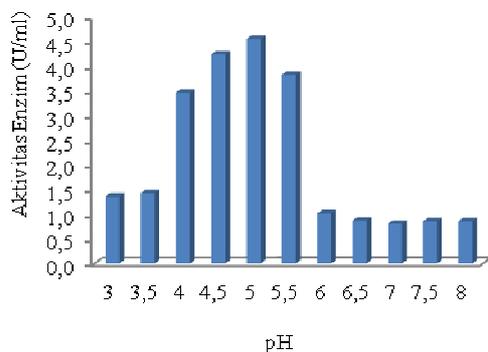
| Tahap Pemurnian                        | Total Akti-<br>tas (Unit) | Total Pro-<br>tein (mg) | Aktivitas<br>Spesifik (U/<br>mg) | Tingkat ke-<br>murnian | Recovery<br>(%) |
|--|---------------------------|-------------------------|----------------------------------|------------------------|-----------------|
| Enzim kasar                            | 276                       | 462                     | 0,6                              | 1                      | 100             |
| Pemekatan                              | 138,48                    | 81,6                    | 1,7                              | 2,8                    | 50              |
| Filtrasi gel puncak 1<br>(Pektinase A) | 14,83                     | 3,57                    | 4,15                             | 6,94                   | 5,37            |
| Filtrasi gel puncak 2<br>(Pektinase B) | 9,21                      | 2,78                    | 3,3                              | 5,53                   | 3,33            |

### Karakterisasi Pektinase

Pektinase A hasil filtrasi gel puncak 1 yang diperoleh memiliki aktivitas yang tinggi ketika bekerja pada suhu sekitar 40-50 °C, tetapi aktivitas menjadi menurun jika bekerja pada 60-80 °C. Suhu terbaik untuk aktivitas pektinase A adalah 50 °C (Gambar 4). Pengaruh pH pada aktivitas pektinase yang dihasilkan oleh *A. ustus* BL5 bisa dilihat pada Gambar 5. Pektinase A stabil pada pH sekitar 4 – 5,5 dan memiliki aktivitas optimum ketika bekerja pada pH 5. Analisis dengan penambahan berbagai senyawa kimia yang mengandung ion logam terhadap aktivitas enzim menunjukkan hanya senyawa SDS yang menurunkan aktivitas enzim, sedang 4 senyawa lainnya seperti EDTA, CaCl<sub>2</sub>, DMSO, dan CuSO<sub>4</sub> tidak berpengaruh pada aktivitas pektinase A (Tabel 2).



**Gambar 4.** Pengaruh suhu terhadap aktivitas pektinase dari *A. ustus* BL5.



**Gambar 6.** Pengaruh pH terhadap aktivitas pektinase dari *A. ustus* BL5 pada media pektin 2% dan suhu 50°C.

**Tabel 2.** Pengaruh penambahan senyawa kimia terhadap aktivitas pektinase.

| Bahan Kimia       | Aktivitas enzim (U/mL) | Peningkatan Aktivitas (%)* |
|-------------------|------------------------|----------------------------|
| EDTA              | 4.25                   | 123                        |
| CaCl <sub>2</sub> | 3.47                   | 100                        |
| SDS               | 1.55                   | 45                         |
| DMSO              | 4.19                   | 121                        |
| CuSO <sub>4</sub> | 5.65                   | 163                        |

### PEMBAHASAN

Konsentrasi substrat optimum untuk pertumbuhan *A. ustus* BL5 adalah 2 % dengan waktu fermentasi jam ke-120, besarnya aktivitas pektinase ekstrak kasar tertinggi yang diperoleh sebesar 3,45 U/mL. Konsentrasi substrat 2,5% memberikan aktivitas pektinase terendah sebesar 1,26 U/mL. Sedangkan pada pH 7 dengan konsentrasi substrat 2 %, *A. ustus* BL5 mampu menghasilkan pektinase ekstrak kasar dengan aktivitas sama yaitu sebesar 3,45 U/mL. Pertumbuhan *A. ustus* BL5 dengan aktivitas pektinase ekstrak kasar terendah dimiliki oleh media kultur pH 5 dengan aktivitas sebesar 0,65 U/mL. Hasil ini berbeda dengan yang dilakukan oleh Khaimar *et al.*, 2009 yang melakukan produksi enzim pektinase dari *A. niger* media optimum untuk pertumbuhan pada pH 3,8.

Pemekatan enzim merupakan langkah awal dari proses pemurnian enzim sebelum tahap pemurnian selanjutnya. Pemekatan protein berfungsi untuk memekatkan konsentrasi protein enzim, mereduksi volume larutan enzim, dan memisahkan enzim yang diinginkan dari sebagian enzim kontaminan yang tidak dikehendaki (Rosenberg, 2005). Aktivitas enzim setelah dipekatkan mempunyai aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan enzim ekstrak kasarnya. Pada penelitian ini pemekatan dilakukan dengan menggunakan PEG 6000 dan ultrafiltrasi. Pemekatan tersebut mampu meningkatkan aktivitas enzim ekstrak kasar dari 3,45 U/mL menjadi 5,77 U/mL. Aktivitas enzim pektinase yang sudah dipekatkan, selanjutnya dimurnikan dengan menggunakan gel filtrasi. Hasil kromatografi filtrasi gel dari enzim

*A. ustus* BL5 yang dimurnikan mempunyai dua puncak yang berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat dua enzim pektinase yang berbeda ukurannya. Puncak pertama yaitu dari fraksi nomor 9-13 memiliki aktivitas enzim pektinase rata-rata 3,4 U/mL. Puncak kedua yaitu dari fraksi nomor 26-30 memiliki aktivitas enzim pektinase rata-rata 2,1 U/mL. Peneliti yang lain seperti Buga *et al.* (2010) dan Polizeli *et al.* (1991) menggunakan matriks Sephadex G-100 untuk memurnikan pektinase dari *A. niger* SA6 dan *Neurospora crassa*. Hasil pemurnian enzim pektinase dari *A. niger* SA6 dan *Neurospora crassa* menunjukkan adanya satu puncak enzim. Perlu analisa lebih dalam untuk melihat kedua jenis pektinase dari *A. ustus* BL5 tersebut.

Total protein dari tahap ekstrak kasar enzim sampai kromatografi filtrasi gel mengalami penurunan. Penurunan kadar protein dikarenakan pada setiap tahap pemurnian terjadi pengurangan pengotor yang terdapat di dalam larutan. Hasil pemurnian menunjukkan bahwa total protein dari tahap enzim ekstrak kasar sampai kromatografi filtrasi gel juga mengalami penurunan dari 462 mg sampai 2,7 mg. Di sisi lain, aktivitas spesifik dari produksi ekstrak kasar sampai kromatografi filtrasi gel terjadi kenaikan dari 0,6 U/mg menjadi 4,15 U/mg (Gel filtrasi puncak I) dan 3,3 U/mg (Gel filtrasi puncak II). Tingkat kemurnian meningkat dari 1 menjadi 6,94 (Gel filtrasi puncak I) dan 5,53 (Gel filtrasi puncak II). *Recovery* proses purifikasi mengalami penurunan dari enzim ekstrak kasar 100 % ke pengendapan PEG 6000 dan ultrafiltrasi sebesar 50 % serta mengalami penurunan yang drastis pada tahap kromatografi filtrasi gel puncak 1 menjadi 5,37 % dan puncak 2 menjadi 3,33 %. Nilai tingkat kemurnian yang didapatkan lebih kecil dibandingkan dengan pemurnian enzim pada *Penicillium chrysogenum* sebesar 17,24 (Banu *et al.*, 2010) dan *Neurospora crassa* sebesar 20,73 (Polizeli *et al.* 1991). Perlu pemurnian lebih efisien dan menggunakan lebih banyak jenis kromatografi untuk meningkatkan *yield* produk pektinase murni.

Profil *SDS PAGE electrophoresis* menunjukkan bahwa pemurnian dengan kromatografi filtrasi gel

tidak dapat memurnikan enzim pektinase sepenuhnya. Hal ini dapat dilihat dari banyaknya pita protein yang diperoleh. Berdasarkan analisa dengan SDS PAGE menunjukkan bahwa enzim ekstrak kasar mempunyai pita protein yang banyak, setelah pemekatan dengan PEG 6000 dan ultrafiltrasi pita protein menjadi semakin jelas terlihat (data tidak ditampilkan). Perlu pemurnian lebih lanjut agar bisa menentukan berat molekul pektinase dari *A. ustus* BL5.

Hasil karakterisasi terhadap pektinase yang sudah terpurifikasi menunjukkan bahwa pektinase yang dihasilkan oleh *A. ustus* BL5 mempunyai aktivitas optimum pada pH 5, suhu 50<sup>0</sup> C dengan aktivitas sebesar 4,54 U/mL. Hal ini sama dengan pektinase yang dihasilkan oleh *A. indicus*, *A. flavus* dan *A. niveus* dimana enzim hasil purifikasi optimum pada suhu 50 °C (Angayarkanni *et al.*, 2002). Derajat keasaman optimum pada pH 5 dengan aktivitas pektinase sebesar 4,53 U/mL. Nilai pH optimum pada pH 5 menunjukkan bahwa enzim ini termasuk enzim asam. Kebanyakan pektinase yang berasal dari kapang memiliki aktivitas optimum di lingkungan yang asam. Niture (2008) menyatakan bahwa dari 30 isolat fungi yang telah diteliti memiliki aktivitas poligalakturonase optimum pada pH 2,5-6,0. Peneliti lain mengungkapkan aktivitas poligalakturonase dari isolat kapang memiliki aktivitas optimum pada pH 3,8-6,5 (Buga *et al.*, 2010). Hasil penelitian ini sama dengan nilai optimum pH *A. flavus* dan sedikit berbeda dengan *A. indicus* dan *A. niveus* yang optimum pada pH 6 (Angayarkanni *et al.*, 2002), *Penicillium chrysogenum* optimum pada pH 6,5 (Banu *et al.*, 2010), *Neurospora crassa* pada pH 6 (Polizeli *et al.*, 1991) dan *Pleurotus ostreatus* pada pH 7,5 (Rashad *et al.*, 2011).

Banu *et al.* (2010) menyatakan bahwa peningkatan dan penurunan aktivitas enzim sangat dipengaruhi oleh jenis garam logam ataupun senyawa kimia yang ditambahkan. Pada penelitian ini dilakukan penambahan lima jenis senyawa kimia yaitu EDTA, CaCl<sub>2</sub>, SDS, DMSO dan CuSO<sub>4</sub>. Penambahan 0,05 M CuSO<sub>4</sub> memberikan pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas enzim yang dihasilkan oleh *A.*

*ustus* BL5, yaitu dapat meningkatkan aktivitas pektinase sampai 163 % dengan aktivitas enzim 5,65 U/mL. Sedangkan penambahan EDTA dan DMSO sedikit memberikan pengaruh yaitu masing-masing 123% dan 121% dengan peningkatan aktivitas 4,25 dan 4,19U/mL. Hal ini sesuai dengan Rosenberg (1996) yang menyatakan bahwa penambahan EDTA dapat meningkatkan aktivitas enzim karena EDTA berperan dalam stabilitas enzim dan kofaktor. Sedangkan larutan CuSO<sub>4</sub> mempunyai peranan sebagai aktivator pada konsentrasi yang relatif kecil. Perubahan muatan pada enzim akibat penambahan CuSO<sub>4</sub> menyebabkan enzim mudah dalam mengikat substrat. Kation seperti Cu (II) kemungkinan terlibat langsung dalam proses katalis enzim, yaitu dalam pengikatan substrat ke sisi aktif enzim (Khaimar *et al.*, 2009). Sedangkan SDS justru memberikan penurunan aktivitas enzim menjadi 1,55 U/mL (45 %) sebagaimana yang dinyatakan oleh Banu *et al.* (2010) bahwa SDS berperan mendenaturasi semua jenis protein enzim.

## KESIMPULAN

Kapang *A. ustus* BL5 memproduksi pektinase tertinggi pada jam ke-120 dengan aktivitas spesifik 0,59 U/mg. Pengendapan dengan PEG 6000 dan ultrafiltrasi telah memekatkan larutan enzim dengan aktivitas spesifik menjadi 1,697 U/mg. Dari hasil pemurnian dengan kromatografi filtrasi gel menunjukkan terdapat 2 jenis pektinase yang diproduksi oleh *A. ustus* BL5 dengan aktivitas spesifik masing-masing 4,15 U/mg dan 3,3 U/mg. Pektinase A hasil pemurnian memiliki aktivitas optimum pada suhu 50 °C, pH 5 dan penambahan CuSO<sub>4</sub> dapat meningkatkan *recovery* enzim sebesar 163%.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh PKPP KNRT Ristek tahun 2011. Terimakasih kepada Dicki Gustiawan atas bantuan teknis di laboratorium.

## DAFTAR PUSTAKA

Andriani A, N Rahmani and Yopi. 2011. Production and characterization of pectinase enzyme from *Aspergillus ustus*

- BL5 using submerged fermentation. *Proceeding of The 2<sup>nd</sup> International Seminar of Chemistry*, Bandung 24-25 November 2011. W Suratno, U Supratman, UMS Soed-janaatmadja, I Hastiawan, A Anggraeni, T Herlina dan I Rahayu (Penyunting), 264-267. Padjajaran University.
- Alkorta I, C Garbisu, JM Llana and Serra JL. 1982. Enzymes and their uses in the processed apple industry: review. *Proc. Biochem.* 17, 35-41.
- Angayarkanni J, P Muthusamy, M Subbaiyan and S Krishnasamy. 2002. Improvement of Tea Leaves Fermentation with *Aspergillus* spp. Pectinase. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94(4), 299-303.
- Banu AR, MK Devi, GR Gnanaprabhal, BV Pradeep and M Palaniswamy. 2010. Production and characterization of pectinase enzyme from *Penicillium chrysogenum*. *Ind J of Sci and Technol* 3, 377-381.
- Buga ML, S Ibrahim and Andrew J Nok. 2010. Partially purified polygalacturonase from *Aspergillus niger* (SA6). *African Journal of Biotechnology* 9(52), 8944-8954.
- Carr JG. 1985. Tea, coffee and cocoa. In: *Microbiology of Fermented Food*, vol. II. E Wood, B.J.B. (Eds.), 133-154. Elsevier Applied Science, London.
- Hondal GS, RP Tiwari, R Tewari, N Dahiya and Beg QK. 2002. Microbial alkaline pectinase and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59, 409-18.
- Khaimar Y, K Vamsi Krishna, B Amol, G Nikhil, T Soham, P Prasad, Girish, G Mayank, J Amol, M Adarsh, B Joshi and Mishra D. 2009. Study of pectinase G production in submerged fermentation using different strains of *Aspergillus niger*. *J Microbiol.* 1, 13-17.
- Kapoor MQK, BB Bhusan, KS Dadhich, and GS Hundal. 2000. Production and partial purification and characterization of a thermo-alkali stable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-CP-2. *Process. Biochem.* 36, 467-473.
- Kashyap DR, SKA Chandra and R Tewari. 2000. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. *World J Microbiol Biotechnol.* 16, 277-282.
- Kashyap DR, PK Vohra and R Tewari. 2001. Application of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour Technol* 77, 215-27.
- Kester HCM and J Visser. 1990. Purification and characterization of polygalacturonases produced by the hyphal fungus *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12, 150-160.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31, 426-428.
- Niture SK. 2008. Comparative biochemical and structural characterizations of fungal polygalacturonases. *Biologia* 63(1), 1-19.
- Okafor UA, VI Okochi, Shalom Nwodo Chinedu, OAT Ebuhehi and Onyeme-Okerenta. 2010. Pectinolytic activity of wild-type filamentous fungi fermented on agro-wastes. *African Journal of Microbiology Research* 4(24), 2729-2734.
- Polizeli Mde L, JA Jorge and HF Terenzi. 1991. Pectinase production by *Neurospora crassa*: purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. *Journal of Gene Microbiol* 137, 1815-1823.
- Rashad MM, Hala M Abdou, Wafaa GH Shousha, Mona M Ali and Neveen N El-Sayed. 2011. Purification and characterization of the pectin lyase produced by *Pleurotus ostreatus* grown on lemon pulp waste. *Aus J of Basic and Appl Sci* 5(8), 1377-1384.
- Rosenberg IM. 2005. *Protein Analysis and Purification Benchtop Techniques*, 136-150, 2nd ed. Birkhäuser, Boston.