

*Dan seandainya pohon-pohon di bumi menjadi pena dan laut menjadi tinta, ditambah
tujuh laut lagi setelah kering, niscaya tidak akan habis-habisnya dituliskan ilmu Allah dan
hikmahNya. sungguh Allah Maha Perkasa lagi Maha Bijaksana.*

(QS. Luqman : 27)

*Kupersembahkan untuk orang-orang
yang kucintai :
mama, bapak, kakak-kakak. dan "aa"*

F/TIN.
1996
0282

KAJIAN PURIFIKASI PARSIAL PEKTINASE (ENDOPOLIGALAKTURONASE) HASIL FERMENTASI CAIR KULIT KAKAO OLEH *Aspergillus niger*

Oleh
NITA RATNA SUMINAR
F 28. 1288



1995
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
B O G O R

Nita Ratna Suminar. F 28.1288. Kajian Purifikasi Parsial Pektinase (Endopoligalakturonase) Hasil Fermentasi Cair Kulit Kakao Oleh *Aspergillus niger*. Dibawah bimbingan Helena Yusuf.

RINGKASAN

Perkembangan agroindustri yang pesat berpengaruh pula pada peningkatan limbah organik yang dihasilkan. Tanaman kakao merupakan salah satu komoditi perkebunan yang cukup besar produksinya. Bagian terbesar dari buah coklat adalah kulit buah. Bagian ini belum dimanfaatkan secara maksimal. Dilihat dari komposisi kulit buah kakao yang banyak mengandung pektin, berpotensi sebagai substrat untuk fermentasi pektinase.

Pektinase merupakan enzim utama dibutuhkan dalam industri sari buah. Sampai saat ini belum terdapat produksi pektinase skala industri di Indonesia. Salah satu jenis pektinase komersial yang dipasarkan di Indonesia adalah Ultrazym 100G yang masih harus diimpor dari Switzerland.

Pengkajian ini bertujuan untuk mempelajari proses penggumpalan (presipitasi) enzim sebagai tahap awal purifikasi dengan menggunakan amonium sulfat untuk menentukan tingkat kejenuhan amonium sulfat pada aktifitas maksimal, menentukan pH optimal aktifitas, dan memperkirakan berat molekul pektinase yang dihasilkan dibandingkan dengan pektinase komersial (Ultrazym 100G), pektinase standar, serta pektinesterase standar melalui penerapan metoda elektroforesis gel.



Berdasarkan analisa aktifitas endopoligalakturonase dan konsentrasi protein diperoleh aktifitas spesifik maksimal pada tingkat kejenuhan amonium sulfat 60%. Enzim yang dimurnikan mempunyai tingkat kemurnian rata-rata sebesar 1.56 kali filtrat dengan persen recovery rata-rata 72.92%. Analisa pengaruh pH terhadap aktifitas endopoligalakturonase dengan perubahan pH sebesar 0.5 dari pH 3.5 - 6.5, diperoleh aktifitas maksimal pada pH 5.5.

Analisa perkiraan berat molekul menggunakan elektroforesis gel SDS-PAGE dengan menggunakan standar berat molekul yang terdiri dari Phosphorylase B (94000 Da), Bovine serum albumin (67000 Da), Ovalbumin (43000 Da), Carbonic anhydrase (30000 Da), Soybean trypsin inhibitor (20100 Da), dan α -Lactalbumin (14400 Da). Berat molekul perkiraan yang dihasilkan adalah Ultrazym 100G sebesar 16,698 - 88,988 Da, Pektinase standar sebesar 16,698 - 96,753 Da, Pektinesterase standar sebesar 16,698 - 69,236 Da, dan pektinase yang dihasilkan sebesar 15,617 - 88,988 Da.

**KAJIAN PURIFIKASI PARSIAL PEKTINASE
(ENDOPOLIGALAKTURONASE) HASIL FERMENTASI CAIR
KULIT KAKAO OLEH *Aspergillus niger***

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN
pada Jurusan TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN
Fakultas Teknologi Pertanian
Institut Pertanian Bogor**

Oleh

NITA RATNA SUMINAR

F 28.1288

**1995
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR**

**INSTITUT PERTANIAN BOGOR
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN**

**KAJIAN PURIFIKASI PARSIAL PEKTINASE
(ENDOPOLIGALAKTURONASE) HASIL FERMENTASI CAIR
KULIT KAKAO OLEH *Aspergillus niger***

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN
pada Jurusan **TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN**
Fakultas Teknologi Pertanian
Institut Pertanian Bogor

Oleh

NITA RATNA SUMINAR

F 28.1288

Dilahirkan pada tanggal 25 Desember 1973
di Bogor

Tanggal lulus : 19 Desember 1995



Disetujui,
Desember 1995

Helena Yusuf
Dr. Ir. Helena Yusuf, MSc.

Dosen Pembimbing

KATA PENGANTAR

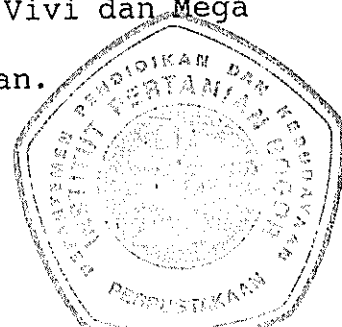
Alhamdulillah robbil'alamiin. Puji dan syukur Penulis panjatkan ke hadirat Illahi Robbi yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga Penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini sebagai tugas akhir untuk meraih gelar Sarjana Teknologi Pertanian pada Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Institut Pertanian Bogor.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr.Ir. Helena Yusuf, MSc., selaku Dosen Pembimbing yang telah banyak memberikan bimbingan, petunjuk, saran dan dorongan dalam penelitian dan penulisan skripsi ini. Serta kepada Dr. Ir. Erliza Noor dan Ir. Ade Iskandar sebagai Dosen Penguji yang telah berkenan menguji dan memberikan saran-saran.

Terima kasih yang tidak terhingga untuk mama dan bapak tercinta atas segala dorongan, semangat dan do'a yang tiada hentinya menyertai Penulis.

Terima kasih kepada Agus Muslih atas kesetiaan dan dorongan yang senantiasa menyertai penulis, serta kepada kakak-kakak, mama dan papa atas segala bantuan dan dorongan yang selalu diberikan kepada Penulis.

Tidak lupa Penulis ucapkan terima kasih kepada Nesty, Ade, Dani, adik-adik di Wismo Ayu dan sahabat-sahabat lainnya di Jurusan TIN, serta teman seperjuangan Vivi dan Mega atas dukungan dan bantuan yang telah diberikan.



Ucapan terima kasih juga Penulis tujukan kepada Pepi, Emi, Mika, 'Mba Dewi, Ibu Eni, dan Ibu Ika di PAU Bioteknologi IPB, juga kepada Mas Irvan Faisal di P3 Biotek Serpong atas bantuan yang telah diberikan. Serta semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu Penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna, namun terlepas dari itu semua Penulis berharap semoga tulisan ini dapat memberikan manfaat bagi semua pihak yang memerlukan.

Bogor, Desember 1995

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR GRAFIK	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
I. PENDAHULUAN	1
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
A. POTENSI LIMBAH KAKAO	4
B. SENYAWA PEKTIN	5
C. ENZIM PEKTINOLITIK (PEKTINASE)	6
1. Klasifikasi dan cara kerja	6
2. pH, berat molekul dan aktifitas pektinase	12
3. Aplikasi pektinase	17
4. Teknik fermentasi	18
D. PROSES PEMISAHAN ENZIM	21
1. Ekstraksi	21
2. Isolasi enzim	22
3. Dialisis enzim	26
4. Pemurnian enzim dengan kromatografi	29
5. Elektroforesis gel	29

III.	BAHAN DAN METODA	33
A.	BAHAN DAN ALAT	33
B.	METODA	33
1.	Produksi pektinase	33
2.	Ekstraksi	34
3.	Isolasi	34
4.	Dialisis	35
5.	Elektroforesis gel SDS-PAGE	35
6.	Pengaruh pH terhadap aktifitas enzim	39
7.	Analisa aktifitas endopoligalakturonase	40
8.	Analisa konsentrasi protein terlarut	41
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	44
A.	ANALISA AKTIFITAS POLIGALAKTURONASE	44
B.	OPTIMASI TINGKAT KEJENUHAN AMONIUM SULFAT	47
C.	"DESALTING" DENGAN DIALISIS DALAM BUFFER SITRAT - FOSFAT	56
D.	PENGARUH pH TERHADAP AKTIFITAS ENZIM	61
E.	BERAT MOLEKUL PEKTINASE HASIL ELEKTROFORESIS GEL	65
V.	KESIMPULAN DAN SARAN	73
A.	KESIMPULAN	73
B.	SARAN-SARAN	74
	DAFTAR PUSTAKA	76
	LAMPIRAN	80

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Distribusi pektinase pada beberapa mikroorganisma	10
Tabel 2. Karakteristik pektinase dari berbagai mikroorganisma	13
Tabel 3. Berat endapan hasil isolasi berbagai tingkat kejenuhan amonium sulfat	47
Tabel 4. Aktifitas spesifik endopoligalakturonase hasil pengendapan dengan amonium sulfat pada berbagai tingkat kejenuhan (produksi dalam fermentor)	51
Tabel 5. Aktifitas spesifik endopoligalakturonase hasil pengendapan dengan amonium sulfat pada berbagai tingkat kejenuhan (produksi dalam "shake flask")	52
Tabel 6a. Purifikasi parsial endopoligalakturonase hasil fermentasi batch 1	55
Tabel 6b. Purifikasi parsial endopoligalakturonase hasil fermentasi batch 2	55
Tabel 7. Pengaruh pH terhadap aktifitas endopoligalakturonase	62
Tabel 8. Data perhitungan R_f "molecular weight" standar	68
Tabel 9. Data perhitungan R_f sampel	70

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Penampang melintang buah kakao	4
Gambar 2. Struktur pektin	6
Gambar 3. Mekanisme penyerangan pektinase	9
Gambar 4. Mekanisme proses dialisis	27
Gambar 5. Skema elektroforesis gel	38
Gambar 6. Kurva-kurva standar endopoligalakturonase . .	46
Gambar 7. Proses dialisis	57
Gambar 8. Hasil elektroforesis SDS-PAGE	72

DAFTAR GRAFIK

	Halaman
Grafik 1. Standar konsentrasi protein	43
Grafik 2. Berat endapan hasil isolasi berbagai tingkat kejenuhan amonium sulfat	49
Grafik 3. Aktivitas spesifik endopoligalakturonase hasil pengendapan dengan amonium sulfat pada berbagai tingkat kejenuhan (produksi dalam fermentor)	51
Grafik 4. Aktivitas spesifik endopoligalakturonase hasil pengendapan dengan amonium sulfat pada berbagai tingkat kejenuhan (produksi dalam "shake flask")	52
Grafik 5. Pengaruh pH terhadap aktivitas endopoligalakturonase	62
Grafik 6. Kurva standar berat molekul	68



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Penyiapan larutan elektroforesis SDS-PAGE	80

I. PENDAHULUAN

Perkembangan agroindustri Indonesia yang pesat berpengaruh pada peningkatan produksi perkebunan. Seiring dengan hal tersebut maka limbah organik dari kegiatan agroindustri pun meningkat.

Tanaman coklat (*Theobroma cacao* L) merupakan komoditi perkebunan Indonesia yang cukup besar produksinya. Berdasarkan statistika Indonesia tahun 1992, produksi kakao dari perkebunan besar mulai tahun 1987 sampai tahun 1991 berturut-turut adalah 17,700, 39,600, 39,100, 41,500, dan 40,100 ton. Untuk perkebunan rakyat produksi kakao mulai tahun 1986 sampai 1991 berturut-turut adalah 11,800, 25,800, 39,800, 68,300, 97,500, dan 78,800 ton (Biro Pusat Statistik, 1992).

Kulit buah kakao merupakan bagian terbesar dari keseluruhan buah, sehingga kulit kakao sebagai limbah harus dipertimbangkan pemanfaatannya. Selama ini pemanfaatan kulit kakao terbatas sebagai kompos dan pakan ternak.

Berdasarkan komposisinya kulit kakao berpotensi sebagai substrat untuk produksi pektinase melalui fermentasi, terutama karena kandungan pektin yang cukup tinggi.

Pemanfaatan limbah tanaman kakao sebagai substrat pektinase akan memberikan nilai tambah dari segi ekonomi serta mengurangi pencemaran organik.

Pektinase merupakan enzim yang utama dibutuhkan dalam proses ekstraksi dan klarifikasi industri minuman sari buah. Sampai saat ini belum terdapat produksi pektinase dalam skala industri di Indonesia, sehingga masih harus diimpor dari negara-negara lain.

Pektinase merupakan kerja sinergis dari sedikitnya tiga komponen enzim, jenisnya bervariasi dari satu galur ke galur lainnya. Dengan demikian, penggunaan kulit kakao sebagai substrat untuk memproduksi pektinase dengan fermentasi cair oleh *Aspergillus niger* diduga akan menghasilkan pektinase dengan komposisi dan sifat tersendiri, untuk itu perlu diketahui komponen-komponen pektinase yang dihasilkan.

Salah satu jenis pektinase yang dipasarkan di Indonesia adalah Ultrazym 100G yang diproduksi oleh NOVO. Sebagai aplikasinya Ultrazym 100G ini antara lain digunakan dalam proses produksi wine dan sari buah apel.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan parameter-parameter isolasi pektinase sebagai tahap awal purifikasi sebagai berikut : mempelajari proses penggumpalan enzim sebagai tahap awal purifikasi dengan menggunakan amonium sulfat untuk menentukan tingkat kejenuhan amonium sulfat pada aktifitas maksimal; menentukan nilai pH optimal untuk mendapatkan aktifitas pektinase maksimal; dan memperkirakan

berat molekul pektinase yang dihasilkan, dibandingkan dengan pektinase komersial (Ultrazym 100G), pektinase standar, serta pektinesterase standar melalui penerapan metoda elektroforesis gel.

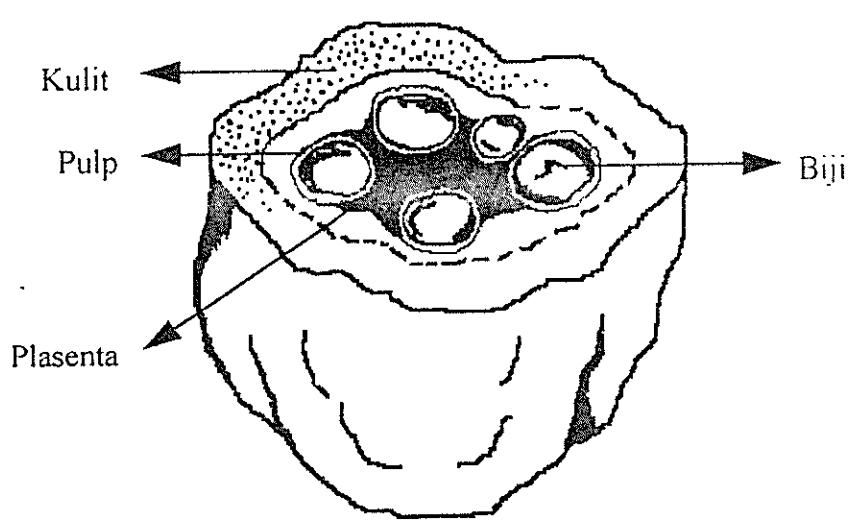
II. TINJAUAN PUSTAKA

A. POTENSI LIMBAH KAKAO

Tanaman kakao (*Theobroma cacao* L) di Indonesia dibudidayakan di perkebunan besar milik pemerintah maupun swasta, dan perkebunan-perkebunan rakyat.

Daging buah, pulp dan plasenta merupakan bagian buah yang umumnya dibuang pada pemanenan kakao. Persentase dari daging buah, pulp dan plasenta basah adalah kurang lebih 80 persen dari keseluruhan berat buahnya (Anonim, 1991).

Menurut Nasution et al., 1980, buah kakao terdiri dari kulit buah, plasenta, pulp dan keping biji, seperti terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Penampang melintang buah kakao

Buah kakao biasanya terdiri dari 20 - 40 keping biji, kadang-kadang terdiri dari 50 keping biji (Urquhatt, 1961).

Menurut Roesmanto (1991), kulit buah kakao kering mengandung 6.4 persen protein, 1.5 persen lemak serta 27.1 persen serat. Berdasarkan analisa kimia yang dilakukan oleh Riyadi (1987), didapatkan bahwa plasenta kakao mengandung 3.65 persen pektin. Selain itu kulit buah kakao juga mengandung unsur hara berupa 3.74 persen karbon (C), 0.91 persen nitrogen (N), 0.2 persen phosphor (P), 3.18 persen kalium (K), 0.67 persen kalsium (Ca), 0.29 persen Magnesium (Mg), dan 0.18 persen sulfur (S) (Anonim, 1991).

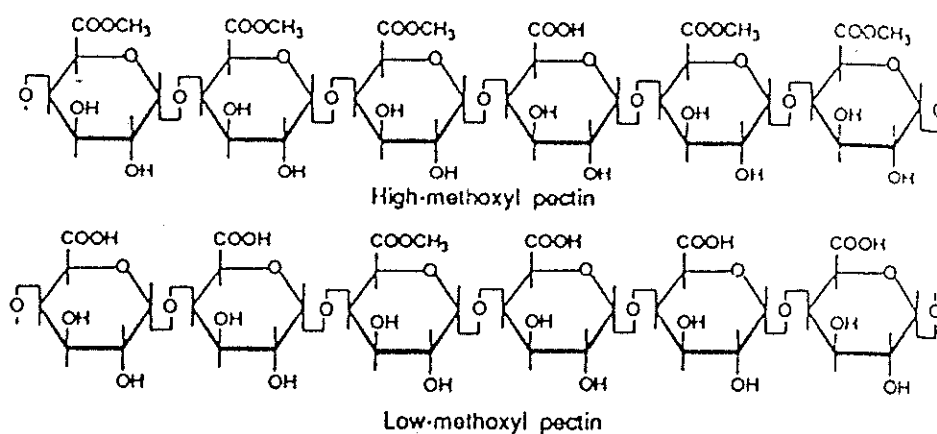
B. SENYAWA PEKTIN

Pektin secara umum terdapat dalam dinding sel primer tanaman, khususnya di sela-sela antara selulosa dan hemiselulosa (Winarno, 1991).

Pektin merupakan polisakarida yang terutama mengandung rantai metil ester ikatan α -1,4-D-galakturonat. Adapun struktur pektin seperti terlihat pada Gambar 2 (Rombouts dan Pilnik, 1980).

Menurut Winarno (1991), senyawa pektin merupakan polimer dari asam D-galakturonat yang dihubungkan dengan ikatan β -(1,4)-glukosida. Secara umum senyawa pektin dapat diklasifikasikan menjadi tiga kelompok senyawa

yaitu asam pektat (asam galakturonat), asam pektinat (pektin) dan protopektin. Lebih lanjut disebutkan, kandungan pektin dalam tanaman sangat bervariasi baik berdasar jenis tanaman maupun dari bagian-bagian jaringannya. Faktor lain yang menentukan komposisi dan kandungan protopektin, pektin dan asam pektat di dalam buah adalah derajat kematangan buah.

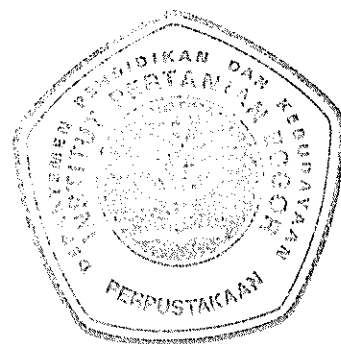


Gambar 2. Struktur pektin

C. ENZIM PEKTINOLITIK (PEKTINASE)

1. Klasifikasi dan Cara kerja

Menurut Winarno (1980), pektinase dapat dibagi menjadi dua kelompok besar yaitu enzim depolimerisasi dan enzim saponifikasi/pektin esterase.



Golongan depolimerase secara umum dibedakan menjadi tiga sub golongan berdasarkan jenis substrat yaitu pektin, asam pektat atau oligo-D-galakturonat; jenis pemecahan yang dilakukan yaitu pemecahan trans-eliminasi atau hidrolisis; dan degradasi baik secara acak (endo) atau dari rantai paling ujung (ekso) (Suhartono, 1989).

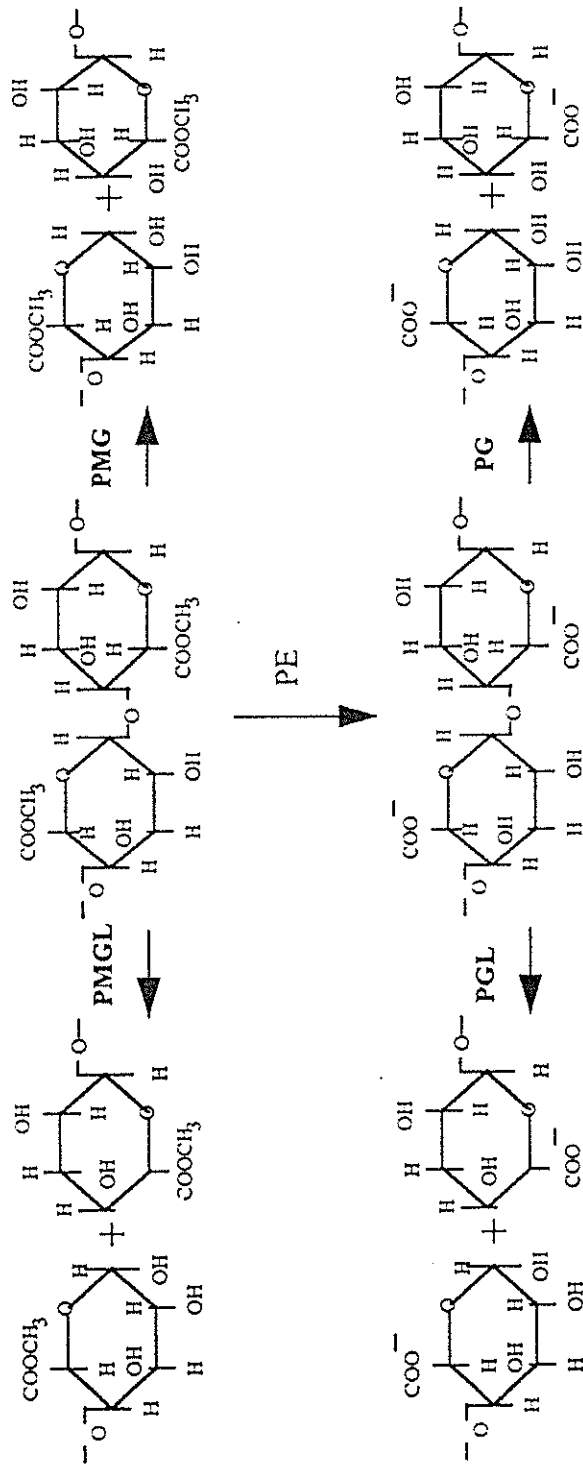
Depolimerase diklasifikasikan dengan menggunakan kriteria cara pemotongan ikatan glukosida secara hidrolitik, transeliminasi dan reaksi pemotongan secara endo atau ekso. Berdasarkan kriteria tersebut, depolimerase pektin terbagi menjadi dua kelompok besar yaitu enzim dengan substrat asam pektinat dan enzim dengan substrat asam pektat. Enzim dengan substrat asam pektinat terdiri dari polimetilgalakturonase (PMG) dan pektin liase (PL). Sedangkan enzim dengan substrat asam pektat terdiri dari poligalakturonase (PG) dan pektat liase (PAL). Masing-masing enzim tersebut terbagi lagi atas endo dan ekso (Winarno, 1980).

Transeliminasi dilakukan oleh pektinase yang tergolong liase, dimana pemecahan yang dilakukan akan mengeluarkan molekul air. Adapun hidrolisis yang dilakukan oleh pektinase yang tergolong hidrolase akan memerlukan air. Hidrolisis ini dapat berlangsung dengan mengikuti pola aktifitas acak (endoenzim) atau

pola aktifitas yang secara bertahap melepaskan galakturonobiosa (eksoenzim) (Suhartono, 1989).

Pektin esterase disebut juga pektin metil esterase yang menghidrolisis ester metil pada asam galakturonat dengan spesifitas yang tinggi. Pektin esterase ini dibentuk oleh tumbuhan tingkat tinggi, sejumlah besar kapang, beberapa khamir dan bakteri. Pektin esterase mengubah pektin menjadi pektin berester rendah dan asam pektat. Mekanisma penyerangan pektinase terlihat pada Gambar 3 (Fogarty dan Kelly, 1983).

Endopoligalakturonase dari kapang menghidrolisis asam digalakturonat, serta sedikit aktif terhadap asam poligalakturonat. Eksopoligalakturonase dari *Aspergillus niger* menghidrolisis substrat asam galakturonat baik yang jenuh maupun tidak jenuh. Oligogalakturonase dihasilkan oleh sejumlah mikroorganisma. Enzim ini terikat pada membran sel, memecah substrat dari ujung rantai non reduksi dan lebih menyukai substrat dengan rantai pendek. Terdapat dua jenis oligogalakturonase, jenis pertama spesifik terhadap oligogalakturonat tidak jenuh dan hanya menghidrolisis unit tidak jenuh, sedangkan jenis kedua secara spesifik memecah oligogalakturonat dan menghasilkan monomer sebagai hasil akhir. Kedua jenis aktifitas tersebut dapat diperoleh dari miselia *Aspergillus niger* (Suhartono, 1989).



Gambar 3. Mekanisme penyerangan pektinase

Keterangan :
 PMG = Polimetilgalakturonase
 PMGL = Polimetilgalakturonat liase
 PE = Pektin esterase
 PG = Poligalakturonase
 PGL = Poligalakturonat liase

Pektinase dihasilkan oleh berbagai spesies kapang, khamir, dan bakteri. Distribusi pektinase pada berbagai mikroorganisma tersebut seperti tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Distribusi pektinase pada beberapa mikroorganisma*)

SUMBER	PE	PG	PGL	PMG	PMGL	OG	OGL
<i>Bacillus</i> sp.			+			+	
<i>Bacillus</i> sp.no.RK 9			+				
<i>Bacillus subtilis</i>			+				
<i>Bacillus polimixa</i>			+				
<i>Bacillus pumilus</i>			+				
<i>Bacillus sphaericus</i>			+				
<i>Bacillus stearothermophilus</i>			+				
<i>Erwinia aroideae</i>		+	+		+		+
<i>Erwinia caratovora</i>		+	+				+
<i>Pseudomonas</i> sp.			+				+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>			+				
<i>Pseudomonas marginalis</i>	+	+	+				
<i>Xanthomonas</i> sp.	+		+				
<i>Xanthomonas campestris</i>	+		+				
<i>Xanthomonas cyanopsidis</i>			+				
<i>Clostridium multifermentans</i>	+		+				
<i>Clostridium aurantibutyricum</i>	+		+				
<i>Clostridium felsineum</i>		+	+				
<i>Cytophaga johnsonii</i>			+				
<i>Cytophaga deprimata</i>			+				
<i>Cytophaga albogilva</i>			+				
<i>Sterptomyces nitrosporeus</i>			+				
<i>Trichoderma koningii</i>		+					

Tabel 1. Distribusi pektinase pada beberapa mikroorganisma (lanjutan) 11

SUMBER	PE	PG	PGL	PMG	PMGL	OG	OGL
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>		+					
<i>Cercospora arachidicola</i>		+					
<i>Cephalosporium sp.</i>			+				
<i>Apergillus niger</i>	+	+		+	+		
<i>Aspergillus sojae</i>					+		
<i>Aspergillus saito</i>		+					
<i>Fusarium culmorum</i>			+				
<i>Fusarium oxysporum</i>			+				
<i>Fusarium solani</i>			+		+		
<i>Penicillium expansum</i>		+					
<i>Penicillium italicum</i>					+		
<i>Penicillium digitatum</i>	+			+	+		
<i>Penicillium chrysogenum</i>	+	+					
<i>Rhizoctonia fragariae</i>		+					
<i>Rhizoctonia solani</i>	+	+					
<i>Rhizopus arrhizus</i>		+					

*) Fogarty dan Kelly (1983)

Keterangan :

PE = Pektinesterase
 PG = Poligalakturonase
 PGL = Poligalakturonatliase
 PMG = Polimetilgalakturonat
 PMGL = Polimetilgalakturonatliase
 OG = Oligogalakturonat
 OGL = Oligogalakturonatliase

Aspergillus niger merupakan penghasil Poligalakturonase, pektinesterase dan pektinliase yang efektif (Rombouts dan Pilnik, 1980).

2. pH, berat molekul, dan aktifitas pektinase

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktifitas enzim antara lain adalah konsentrasi enzim, substrat, produk, senyawa inhibitor dan aktifator, pH dan jenis pelarut yang terdapat pada lingkungan, kekuatan ion dan suhu (Suhartono, 1989).

Satuan resmi untuk aktifitas enzim yang ditetapkan oleh "Enzyme Commission of International Union of Biochemistry" adalah satu unit enzim merupakan jumlah enzim yang mampu mengkatalisa perubahan satu mikromol substrat per menit pada kondisi tertentu (Winarno, 1980).

Pengukuran aktifitas pektinolitik yang telah banyak digunakan adalah berdasarkan viskositas (metode viskometrik), antara lain diaplikasikan untuk mengukur aktifitas poligalakturonase, poligalakturonat liase dan pektin transeliminase (Suhartono, 1989).

Tagawa dan Kaji di dalam Kellogg dan Wood (1988), melakukan pengukuran aktifitas poligalakturonase dari *Corticium rolfsii* menggunakan viskometer Ostwald. Media pengujian yang digunakan adalah 1.0 - 0.8 persen larutan sodium pektat pH 4.0 dengan pelarut 0.1 M buffer sitrat-fosfat pH 4.0. Selain menggunakan

viskometer Ostwald, aktifitas poligalakturonase dapat pula diukur menggunakan viskometer Brookfield.

Pektinase yang dihasilkan dari mikroorganisma mempunyai karakteristik yang berbeda-beda, seperti tercantum pada Tabel 2.

Tabel 2. Karakteristik pektinase dari berbagai mikroorganisma*)

Jenis	Sumber	Berat Molekul (Da)	Aktifitas Spesifik (u/mg)	pH optimum
Pektinesterase	<i>Acrocylindrium sp.</i>			7.5
	<i>Contothyrium diplodiella</i>			4.8
	<i>Corticium rolfsii</i>	37,000		3.5
	<i>Fusarium oxysporum</i>	35,000	203	7.0
	<i>Clostridium multifementans</i>	400,000	48	9.0
Endopoligalakturonase	<i>Aspergillus niger</i>			4.0-5.5
	<i>Aspergillus niger</i>	35,000	81	4.1
		85,000	44	3.8
		46,000	75	5.0
	<i>Aspergillus japonicus</i>	35,500	1,362	4.5
	<i>Botrytis cinerea</i>	69,000	2,049	4.0
	<i>Fusarium oxysporum</i>	37,000	194	5.0
		37,000	148	5.0
	<i>Rhizoctonia fragariae</i>	36,000	1,866	5.0
		36,000	1,845	5.0
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	30,300	92	5.0
	<i>Trichoderma koningii</i>	32,000		5.0
	<i>Verticillium albo-atrum</i>	30,000	2,075	6.6
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>		168	4.4

Tabel 2. Karakteristik pektinase dari berbagai 14 mikroorganisma (lanjutan)

Jenis	Sumber	Berat molekul (Da)	Aktifitas Spesifik (u/mg)	pH optimum
Endopoligalakturonase	<i>Erwinia carotovora</i>		362	5.3
	<i>Pseudomonas cepacia</i>		125	4.5
Endopektinliase	<i>Bacillus polymyxa</i>			8.3-9.6
	<i>Bacillus subtilis</i>	33,000		8.5
	<i>Erwinia aroideae</i>	37,000		9.1
	<i>Erwinia carotovora</i>		90	8.5
	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	30,000-36,000		9.8-8.2
	<i>Erwinia chrysanthemi</i>		320	9.0
	<i>Erwinia rubrifaciens</i>	41,000	450	9.5
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	42,300	956	9.4
	<i>Streptomyces fradiae</i>		176	9.1
	<i>Xanthomonas campestris</i>		1,050	9.5
	<i>Cephalosporium sp.</i>		364	9.9
	<i>Hypomyces solani</i>	32,400-42,000		8.5
Endopektinliase	<i>Alternaria mali</i>	28,000	176	8.7
	<i>Alternaria mali</i>	31,000	577	8.2
	<i>Aspergillus Fonsecaus</i>		19	5.2
	<i>Aspergillus japonicus</i>	32,000	355	6.0
	<i>Aspergillus niger</i>		24	5.2
	<i>Aspergillus niger</i>			5.9
	<i>Aspergillus niger</i>	35,400	17	6.0
	<i>Aspergillus niger</i>	33,100	44	6.0
	<i>Aspergillus sojae</i>	32,000	77	5.5
	<i>Dothidea ribesia</i>	31,200		8.4
	<i>Erwinia aroideae</i>	30,000	400	8.1

Tabel 2. Karakteristik pektinase dari berbagai 15 mikroorganisma (lanjutan)

Jenis	Sumber	Berat molekul (Da)	Aktifitas spesifik (u/mg)	pH optimum
Oligogalak-turonase	<i>Bacillus sp.</i>			6.5
	<i>Erwinia carotovora</i>			7.2
	<i>Erwinia aroideae</i>			7.0
	<i>Pseudomonas sp.</i>			7.0

*) (Rombouts dan Pilnik, 1980)

pH Optimum enzim merupakan pH dimana enzim mempunyai aktifitas maksimal. Enzim umumnya mempunyai pH optimum pada kisaran pH 4.5 - 8.0. Pada kisaran pH tersebut enzim mempunyai stabilitas yang tinggi. Semakin jauh pH dari nilai optimum maka enzim semakin tidak stabil. Stabilitas enzim terhadap pH tergantung pada beberapa faktor, diantaranya adalah (1) suhu; (2) kekuatan ionik; (3) komposisi kimia buffer yang digunakan; (4) konsentrasi beberapa komponen yang mempengaruhi misalnya sulfhidril; (5) konsentrasi ion logam kontaminan; (6) konsentrasi substrat atau kofaktor; dan (7) konsentrasi enzim (Muchtadi, et al., 1992).

Tabel 2 menunjukkan bahwa berat molekul dan pH optimum sangat bervariasi bahkan untuk galur-galur yang sejenis. Selain yang dicantumkan pada Tabel 2, berikut ini diilustrasikan keragaman pH optimum pektinase dari beberapa galur. Endopoligalakturonase

yang dihasilkan dari *Erwinia carotovora* mempunyai aktifitas optimum pada pH 4.0 - 6.5 dan dengan menggunakan elektroforesis SDS-PAGE diperoleh pita-pita protein dengan berat molekul antara 42,000 - 45,000 Dalton (Saarilahti, 1992). Poligalakturonase yang diproduksi oleh *Aspergillus niger* yang diisolasi dari bawang, dengan kultur yang mengandung bawang, glukosa dan garam, mempunyai aktifitas maksimal pada pH 5.0 (Behere et al., 1993).

Menurut Sajjaanantakul dan Pitifer (1991) didalam Walter (1991), pektinesterase yang telah dimurnikan mempunyai berat molekul antara 22,000 - 37,000 Dalton. Nilai tersebut bervariasi tergantung pada sumber dan metoda analisa yang digunakan. Nilai pH optimal pektinesterase tergantung pada sifat asli pektinesterase. Aktifitas pektinesterase kapang mempunyai pH optimum antara pH 4.0 - 5.2.

Endopoligalakturonase mempunyai pH optimum antara pH 3.6 - 5.5. pH optimum menjadi lebih asam dengan menurunnya berat molekul dari substrat. Perubahan dalam pH optimum diperoleh dengan perbedaan buffer dan perubahan kekuatan ionik media reaksi. pH optimum eksopoligalakturonase antara pH 4.6 - 6.0. Eksopoligalakturonase mempunyai berat molekul antara 47,000 sampai 68,000 Dalton. Endopektat liase mempunyai pH optimum aktifitas antara pH 8.0 - 9.5 dan untuk

ekspektat liase antara pH 8.0 - 8.5. Berat molekul dari endopektatliase dan gabungan isozim adalah antara 40,000 - 47,500 Dalton. pH optimum aktifitas oligogalakturonat liase antara 7.0 - 7.2. Endopektin liase mempunyai pH optimum aktifitas pada pH 4.9 dan 6.5, dengan asam polimetilpoligalakturonat atau pektin sebagai substrat. Berat molekul dari endopektin liase antara 23,500 sampai 35,000 Dalton (Burns 1991 didalam Walter 1991).

Ultrazym pada proses depektinisasi sari buah apel pada suhu 55 °C mempunyai aktifitas optimum pada kisaran pH antara 3.5 dan 5.0 (Anonim, 1983).

3. Aplikasi Pektinase

Pektinase banyak berperan didalam destruksi serta pembusukan buah-buahan dan sayuran. Pektinase pada penerapan aplikasinya mempunyai beberapa fungsi, yaitu (1) meningkatkan yield sari buah dan padatan dari tanaman; (2) mengurangi viskositas konsentrat; dan (3) modifikasi dan solubilisasi struktur pektin pada sedimentasi dan klarifikasi sari buah (Fogarty dan Kelly, 1983).

Penggunaan pektinase yang terlama dan terbesar terutama pada sari buah apel dan lebih lanjut untuk sari buah pear dan anggur. Penambahan pektinase akan mengakibatkan dengan cepat penurunan viskositas dan

turbiditas; penggumpalan dan pengendapan partikel (floks) (Rombouts dan Pilnik, 1980).

Sari buah secara umum diekstrak dengan proses pemerasan dan dapat dipermudah dengan prahidrolisis enzimatis pada pulp (pektin). Penggunaan lain dari pektinase mikrobial adalah pada maserasi. Proses ini digunakan dalam produksi puree untuk makanan bayi dan minuman (Fogarty dan Kelly, 1983).

Maserasi dapat dicapai dengan pektinase yang relatif banyak mengandung endopoligalakturonase dan hampir bebas dari pektinesterase dan pektinliase. Perlakuan enzimatis pada pulp menyebabkan liquifaksi buah-buahan dan sayuran dengan sempurna, jika selulase digunakan bersama-sama dengan pektinase (Rombouts dan Pilnik, 1980).

4. Teknik Fermentasi

Pada prinsipnya terdapat dua metoda fermentasi untuk memproduksi enzim, yaitu kultivasi media padat dan media cair.

Menurut Rombouts dan Pilnik (1980), pada produksi pektinase komposisi medium merupakan suatu faktor penting. Penelitian laboratorium memperlihatkan bahwa yield enzim yang sangat tinggi diperoleh pada media dengan konsentrasi campuran sumber karbon yang seimbang, seperti sukrosa dan pektin, laktosa dan pektin,

atau glukosa dan pektin. Enzim diduga dihasilkan pada tahap dimana konsentrasi gula pada medium menurun secara cepat. Kontrol pH merupakan faktor penting yang lain pada produksi pektinase. Produksi enzim terbaik umumnya dicapai pada nilai pH awal 4.5. Lama fermentasi umumnya dilakukan selama 3 sampai 6 hari. Inaktifasi terjadi pada pH ekstrem (dibawah pH 3 dan diatas pH 7). Dengan penggunaan media kompleks, berbagai enzim selain pektinase ikut terinduksi, yang terdiri dari hemisellulosa, sellulase, glikosidase, proteinase, esterase dan oksidoreduktase. Oleh karena itu enzim-enzim tersebut secara normal terdapat pada pektinase komersial.

Studi yang dilakukan oleh Pereira et al. (1992) menunjukkan bahwa tipe fermentasi yang digunakan sangat berpengaruh pada laju produksi pektinase oleh *Aspergillus niger* CH4. Sumber karbon yang mengandung 3% pektin (b/v) pada fermentasi terendam menunjukkan aktifitas maksimal yang dicapai pada jam ke 120; sebaliknya pada fermentasi padat waktu yang dibutuhkan lebih pendek yaitu pada jam 48 sampai 72. Konsentrasi gula tinggi memacu produksi pektinase pada fermentasi padat; tetapi pada fermentasi terendam konsentrasi gula tinggi mengakibatkan sintesis pektinase berkurang. Perbedaan yang ditemukan antara kedua bentuk fermentasi dapat dihubungkan dengan

perbedaan sifat alamiah campuran dan difusi nutrisi antara fermentasi padat dan cair.

Menurut Fogarty dan Kelly (1983), pada kultur terendam, medium nutrisi cair dibuat dari sejumlah komponen. Medium disusun dari sumber karbon (glukosa, molase, pati, pati terhidrolisis, dsb); sumber nitrogen (garam-garam amonium, ekstrak yeast, gelatin, casein, dsb); dan mineral. Pada beberapa studi laboratorium, pektinase diperoleh pada media mengandung campuran sumber karbon seperti glukosa dan pektin, sukrosa dan pektin, atau laktosa dan pektin. Penambahan pektin tersebut untuk menginduksi dan mempertinggi pembentukan pektinase pada fermentasi cair.

Produksi poligalakturonase oleh *Aspergillus niger* VTT-D-77050 pada fermentasi skala laboratorium diperoleh hasil terbaik dengan menggunakan parameter fermentasi suhu selama kultivasi pada suhu 30 °C, pH lebih besar atau sama dengan 3.5; pO₂ lebih besar atau sama dengan 30%. Di bawah kondisi ini variasi aktifitas poligalakturonase antar batch hanya kurang lebih 10% (Bailey dan Pessa, 1990).

Produksi pektinase dari *Aspergillus niger* dengan fermentasi media cair menghasilkan pektinesterase, poligalakturonase dan polimetilgalakturonat liase (Tuttobello dan Mill, 1961).

D. PROSES PEMISAHAN ENZIM

1. Ekstraksi

Menurut Suhartono (1989), teknologi pemisahan enzim dari sel dan komponen lainnya dipengaruhi oleh letak enzim. Ekstraksi dan isolasi enzim ekstraseluler lebih mudah dilakukan. Pemisahan enzim dari sel biasanya dilakukan dengan penyaringan.

Proses hilir protein dapat digolongkan menjadi 2 tahap, yaitu tahap pemanenan primer dan tahap resolusi tinggi (Datar, 1986 didalam Lee 1989). Untuk protein ekstraselluler tahap pemanenan primer terdiri dari pemisahan sel dari media. Untuk protein intraselluler tahap pemanenan primer terdiri dari : (a) pemanenan sel; (b) disruptsi sel untuk menghasilkan protein yang diinginkan; dan (c) penghilangan sel debris. Pada tahap pemanenan primer protein ekstraselluler dapat dilakukan dengan sentrifugasi dan filtrasi untuk memisahkan sel (pemisahan padatan dan cairan). Sedangkan untuk protein intraselluler pada tahap disruptsi sel dapat dilakukan secara mekanik (homogenisasi tekanan tinggi dan bead milling) dan non-mekanik (osmotik shock, pelarut organik dan enzim lisis). Pada tahap resolusi tinggi digunakan metoda kromatografi pertukaran ion, kromatografi interaksi

hidrofobik, kromatografi afinitas, filtrasi gel, dan ekstraksi cairan-cairan.

Produk hasil purifikasi dapat digolongkan menjadi dua golongan utama, yaitu : (a) preparasi murni, terutama digunakan untuk riset dan aplikasi analitikal; dan (b) "crude" atau purifikasi parsial pada enzim industrial. Enzim pada kategori pertama dimurnikan dengan teknik kromatografi setelah isolasi crude. Umumnya enzim pada kategori kedua diisolasi dengan pengendapan dan separasi membran (Somers et al., 1988).

Filter yang digunakan pada proses filtrasi enzim pada umumnya adalah filter bertekanan atau filter membran.

Magro et al. (1994) melakukan pemisahan pektinase dari sel dengan sentrifugasi dan supernatan yang mengandung enzim disterilisasi dengan filter millipore berukuran $0.22 \mu\text{m}$, untuk selanjutnya didialisis dalam air pada suhu 4°C .

2. Isolasi Enzim

Isolasi dilakukan dengan presipitasi atau penggumpalan enzim untuk memperoleh produk yang lebih murni atau konsentrasi yang lebih tinggi.

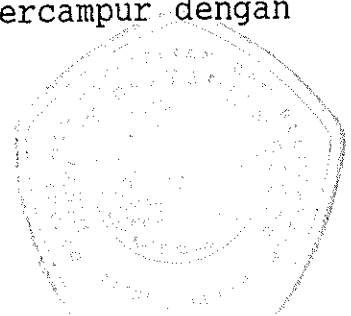
Presipitasi pada prinsipnya merupakan proses penambahan senyawa yang secara spesifik menggumpalkan protein dan tidak menggumpalkan bahan lain. Ada dua jenis metoda kimiawi untuk presipitasi yaitu dengan penambahan pelarut organik dan penambahan garam. Penambahan pelarut organik akan menurunkan konstanta dielektrik dan menyebabkan medium kurang cocok bagi permukaan enzim yang polar. Adanya residu asam amino hidrofobik yang terikat secara longgar pada molekul enzim kadang-kadang dapat menyebabkan terjadinya inaktifasi enzim. Disamping itu pelarut dapat memperbesar kemungkinan terjadinya denaturasi terutama pada temperatur yang agak tinggi, sehingga fraksinasi dengan pelarut organik dilakukan pada temperatur rendah (dibawah 0°C). Kerugian lain dalam penggunaan pelarut organik adalah sifat mudah terbakar dan harga yang mahal. Pelarut organik yang umum digunakan adalah metanol, etanol, isopropanol dan aseton. Sedangkan garam yang umum digunakan adalah amonium sulfat, sodium sulfat, dan sodium fosfat. (Suhartono, 1989).

Konsentrasi garam tinggi mengurangi hidrasi air dari molekul protein sehingga menurunkan kelarutan (Prave et al., 1987).

Menurut Scopes (1982) dalam proses presipitasi enzim, amonium sulfat merupakan garam yang terbaik untuk digunakan karena mudah larut (kelarutan ammonium sulfat 533 gram/liter pada suhu 20 °C), serta tidak peka terhadap perubahan suhu (0 sampai 30 °C). Kelebihan amonium sulfat yang lain, adalah harganya murah dan umumnya tidak mempengaruhi struktur protein. Tetapi kelemahannya adalah tidak bersifat buffer dan dapat melepaskan amonia sehingga memungkinkan terjadinya kenaikan pH (Suhartono, 1989).

Amonium sulfat tidak beracun dan mempunyai efek menstabilkan protein, karena pada konsentrasi tinggi menghambat kerja enzim proteolitik dan bakteri (Scopes, 1982).

Pemekatan protein dengan penambahan garam pada konsentrasi tinggi mengakibatkan peningkatan muatan listrik disekitar protein, yang akan menarik mantel air dari koloid protein. Interaksi hidrofobik diantara sesama molekul protein pada suasana ionik tinggi akan menurunkan kelarutan protein. Peristiwa ini dikenal sebagai "salting out". Metoda ini dilakukan pada suhu rendah (4 °C). Endapan enzim yang terbentuk dipisahkan dengan sentrifugasi atau penyaringan. Enzim hasil pengendapan ini masih tercampur dengan protein lainnya (Suhartono, 1989).



Menurut Rehm dan Reed (1987), pada kisaran salting out, umumnya kelarutan menurun dengan meningkatnya temperatur. Salting out protein merupakan pelarutan garam dalam larutan yang mengandung protein, maka sifat asli garam keseluruhan penting. Salah satu yang sangat dipertimbangkan adalah sifat fisik, sebagai contoh selain faktor kelarutan, efektifitas garam dalam menyebabkan presipitasi ikut berperan. Garam-garam yang paling efektif adalah garam-garam dengan muatan anion ganda seperti sulfat, fosfat dan sitrat. Kation relatif kurang penting. Kemampuan salting out anion mengikuti seri Hofmeister untuk beberapa anion sebagai berikut SCN^- , I^- , ClO_4^- , NO_3^- , Br^- , Cl^- , CH_3COO^- , SO_4^{2-} , dan PO_4^{3-} . Fosfat mempunyai efektifitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan sulfat, tetapi pada prakteknya fosfat pada pH netral mengandung campuran ion-ion HPO_4^{2-} dan H_2PO_4^- , yang kurang efektif daripada PO_4^{3-} .

Tagawa dan Kaji di dalam Kellogg dan Wood (1988) melakukan presipitasi dengan amonium sulfat pada kejenuhan 85% untuk 10 liter larutan enzim kasar sebagai tahap awal purifikasi poligalakturonase hasil fermentasi oleh *Corticium rolfsii*. Endapan yang terbentuk dipisahkan dengan sentrifugasi dan dilarutkan dalam 100 ml aquades.

3. Dialisis Enzim

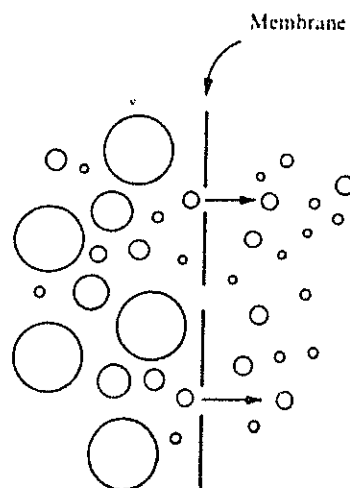
Garam-garam anorganik seringkali tidak diinginkan sebagai material yang menyertai enzim dalam aplikasi spesifik. Metoda yang sering dilakukan untuk menghilangkan garam-garam tersebut adalah filtrasi gel dan dialisis (Prave et al., 1987).

Filtrasi gel digunakan untuk memisahkan protein berberat molekul tinggi dari protein atau molekul lain berberat molekul rendah, sehingga bekerja sebagai suatu penyaring molekul. Salah satu bahan yang penting sebagai gel adalah dekstran (polimer gula yang biasanya larut dalam air) yang telah mengalami rekasi "cross linkage" dengan bantuan epikhlorhidrin, sehingga bersifat hidrofilik. Gel dekstran biasanya disebut dengan istilah sephadex. Filtrasi gel merupakan teknik pemurnian yang efektif dalam pemisahan enzim dari larutan penggumpal, larutan garam dan buffer yang tidak dikehendaki (Suhartono, 1989).

Dialisis digunakan untuk memisahkan molekul-molekul besar dari yang kecil melalui membran semi-permiabel yang meloloskan molekul-molekul kecil tetapi menahan molekul-molekul besar. Selofan merupakan bahan yang banyak digunakan dalam dialisis. Kecepatan dialisis dipengaruhi oleh suhu dan perbedaan tekanan pada kedua belah sisi membran. Pelarut

yang digunakan adalah air suling atau larutan encer dengan pH dan kekuatan ionik tertentu (Nur *et al.*, 1989).

Perpindahan molekul-molekul kecil berlangsung hingga konsentrasi didalam dan diluar kantung dialisis menjadi seimbang. Sehingga konsentrasi molekul-molekul kecil dalam membran berkurang. Keseimbangan tercapai setelah 4 sampai 6 jam. Membran dialisis tersedia dalam berbagai material dan ukuran. Material yang umum adalah collodion, sellofan dan selulos. Mekanisme proses dialisis seperti terlihat pada gambar 4 (Mc Phie 1971 didalam Boyer 1986).



Gambar 4. Mekanisme proses dialisis

Selain selofan bahan yang umum digunakan sebagai membran semipermeabel adalah sellulos aetat (Prave *et al.*, 1987).

Kantung dialisis mempunyai berbagai ukuran, dan biasanya molekul yang berukuran lebih besar dari 15,000 - 20,000 Da tidak dapat melewati kantung dialisis (Scopes, 1982). Selain itu menurut Mc Phie (1971) didalam Boyer (1986), pori-pori membran dialisis terlalu kecil untuk dilintasi difusi makromolekul berberat molekul lebih besar dari 10,000 Dalton.

Dialisis mempunyai keuntungan karena mode pengoperasiannya yang tidak sulit dan memerlukan perlengkapan mahal, tetapi kelemahannya adalah membutuhkan waktu yang cukup lama dan membutuhkan banyak air atau buffer (Prave et al., 1987).

Jumlah volume buffer yang digunakan pada dialisis sebanyak 50 kali volume kantung dialisis. Buffer yang digunakan paling sedikit dilakukan satu kali penggantian, dan untuk mempercepat proses harus terjadi pengadukan buffer dan pergerakan kantung dialisis selama proses (Scopes, 1982).

Dialisis hasil presipitasi poligalakturonase dari *Corticium rolfsii*, dalam air selama 24 jam dan dilanjutkan dalam 0.01 M buffer sitrat-fosfat pH 6.0 selama 24 jam (Tagawa dan Kaji, 1988).

Pektinase dari *Aureobasidium pullulans* LV 10 didialisis dalam 10 mM buffer sitrat-fosfat pH 4.5 dengan 3 kali penggantian buffer. (Manachini et al., 1988).

4. Pemurnian enzim dengan kromatografi

Kromatografi kolom, menurut Suhartono (1989), dapat didefinisikan sebagai sistem pengaliran suatu fluida melalui kolom yang mengandung matrik bahan pengisi dan substansi yang ingin dipisahkan menjadi beberapa komponen dengan adanya perbedaan daya ikat terhadap bahan pengisi. Untuk keperluan isolasi enzim, kolom yang digunakan dapat diisi dengan partikel yang berdasarkan daya kerjanya digolongkan ke dalam jenis absorpsi, pertukaran ion, filtrasi gel dan interaksi biokimia. Cara kromatografi kolom yang telah dikenal adalah filtrasi gel, kromatografi pertukaran ion, kromatografi interaksi hidrofobik, kromatografi afinitas dan kromatografi cair metoda cepat (FPLC = Fast Protein Liquid Chromatography) sebagai modifikasi kromatografi cair tekanan tinggi (HPLC = High Pressure Liquid Chromatography).

5. Elektroforesis Gel

Elektroforesis adalah suatu cara untuk memisahkan fraksi-fraksi suatu campuran berdasarkan pergerakan partikel koloid yang bermuatan dibawah pengaruh medan listrik (Suhartono, 1989).

Jenis elektroforesis yang dikenal adalah elektroforesis kertas, selulosa asetat, elektroforesis gel agar, gel pati dan gel akrilamida. Poliakrilamida

merupakan bahan yang sangat banyak digunakan saat ini untuk elektroforesis (Nur dan Adijuana, 1989).

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) adalah metoda yang relatif murah, reproduibel, dan cepat untuk kuantifikasi perbandingan dan karakterisasi protein.

Menurut Scopes (1982), SDS-PAGE digunakan untuk menganalisa dan mengidentifikasi enzim yang diperoleh pada tahap pemurnian sebelumnya, yaitu digunakan untuk menentukan berat molekul komponen-komponen enzim tersebut. Pada elektroforesis gel dengan menggunakan SDS-PAGE protein didenaturasi oleh SDS, dimana dodecil sulfat mengikat kuat protein, maka cukup hanya 0.1% dodecil sulfat untuk menjenuhkan rantai polipeptida, dengan perkiraan 1 molekul dodecil sulfat per 2 residu asam amino (Scopes, 1982).

Menurut Anonim (1992), SDS merupakan detergen anionik yang mendenaturasi semua struktur primer protein dan mengikatnya dalam perbandingan yang konstan antara molekul SDS dengan asam amino. Muatan negatif yang besar dari molekul SDS mengisi muatan negatif protein bermuatan negatif dan bergerak menuju elektroda positif pada laju yang sama.

SDS merupakan deterjen anionik yang bersama dengan β -merkaptotanol dan pemanasan menyebabkan rusaknya struktur tiga dimensi protein. Mula-mula SDS merusak struktur sekunder, tersier, dan kuartener protein, menghasilkan rantai polipeptida yang acak. Selanjutnya β -merkaptotanol memecah semua ikatan disulfida yang ada dan kedua reaksi tersebut menyebabkan protein terdenaturasi (Boyer, 1986). SDS akan mengikat protein yang terdenaturasi pada sisi hidrofobik dengan perbandingan yang selalu sama, yaitu 1.4 gram SDS per gram protein (Rehm dan Reed, 1987).

Purifikasi parsial pektinesterase dari *Uromyces viciae-fabae* yang dilakukan dengan menggunakan SDS-gel menunjukkan ekstrak kasar yang diuji mempunyai berat molekul antara 70,000 sampai 80,000 (Frittrang et al., 1992).

Kekuatan ionik larutan penyangga yang digunakan umumnya berada pada kisaran 0.05 sampai 0.15 dan diambil nilai diantara kedua ekstim (Nur et al., 1989).

Pita-pita atau "band" dari protein pada gel dapat dilihat dengan menggunakan pewarnaan. Bahan-bahan pewarna yang umum digunakan adalah Amido black, Nigrosine, Coomassie Blue G-50, dan Coomassie Blue R-250. Selain itu terdapat juga pewarna perak nitrat.

Untuk menghilangkan kelebihan pewarna digunakan larutan destaining (peluntur warna) (Scopes, 1982).

Penghitungan berat molekul sampel dilakukan dengan membandingkan jarak pergerakan sampel protein secara proporsional dengan logaritma berat molekul marker protein yang telah diketahui berat molekulnya (Anonim, 1992).

III. BAHAN DAN METODA

A. BAHAN DAN ALAT

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah bahan-bahan untuk media fermentasi, *Aspergillus niger*, amonium sulfat, membran selulosa nitrat 0.45 μm , "cellulose tubing", bahan-bahan untuk elektroforesis SDS-PAGE, bahan-bahan untuk analisa aktifitas endopoligalakturonase dan konsentrasi protein terlarut dengan metoda Lowry. Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini diberikan lebih rinci pada metoda (bagian IIIB).

Alat-alat yang digunakan adalah "plate stirrer", "stirrer bar", viscometer Ostwald II, stopwatch, inkubator, filter milipore vakum diameter 47 mm, timbangan elektronik, spektrofotometer Spectronic 20 Milton Roy, sentrifus Beckman J-21, pH meter, pompa vakum, perangkat elektroforesis, fermentor Biostat M dan alat gelas.

B. METODA

1. Produksi Pektinase (adaptasi dan modifikasi dari Magro et al., 1994)

Produksi enzim dilakukan dengan fermentasi media cair. Mikroorganisme yang digunakan adalah *Aspergillus niger* yang diisolasi dari kulit kakao. Media fermentasi untuk 1 liter terdiri dari $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2

gram, KH_2PO_4 4 gram, Na_2HPO_4 6 gram, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 400 mg, CaCl_2 1 mg, H_3BO_3 10 μg , MnSO_4 10 μg , ZnSO_4 70 μg , CuSO_4 50 μg , MoO_3 10 μg , dan bubuk kulit kakao 4.5% (w/v). Fermentasi dilakukan secara batch selama 120 jam pada kondisi terkontrol pH 4.0 dan suhu 30 °C, dengan aerasi 0.5 vvm dan pada kecepatan agitasi 600 rpm. Jenis impeller yang digunakan adalah "six blade turbine disc".

2. Ekstraksi (Manachini et al., 1988)

Broth fermentasi disentrifus pada suhu 4 °C pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit dan dilakukan penyaringan 3 kali menggunakan kertas saring dan kemudian menggunakan sellulos nitrat sampai diperoleh filtrat bening secara visual. Filtrat hasil penyaringan dianalisa aktifitas endopoligalakturonase konsentrasi protein terlarutnya.

3. Isolasi

Isolasi enzim dilakukan dengan mengendapkan filtrat melalui penambahan amonium sulfat p.a pada tingkat kejenuhan 50% - 95%, karena berdasarkan penelitian pendahuluan pada tingkat kejenuhan dibawah 50% endapan yang terbentuk sedikit sekali (dapat diabaikan). Isolasi dilakukan dengan penambahan anonium sulfat secara perlahan-lahan disertai

pengadukan pada suhu 4 °C. Setelah semua amonium sulfat larut pengadukan dilanjutkan selama 10 - 30 menit, dan kemudian dibiarkan semalam pada suhu 4 °C. Selanjutnya masih pada suhu yang sama, endapan yang terbentuk dipisahkan dengan menggunakan sentrifus pada kecepatan 5000 g selama 30 menit. Analisa aktifitas dan kadar protein terlarut dilakukan terhadap hasil yang diperoleh.

Penambahan amonium sulfat dilakukan berdasarkan rumus :

$$g = \frac{533 (S_2 - S_1)}{100 - 0.3S_2}$$

Keterangan :

g = gram amonium sulfat yang ditambahkan
 S_1 = persen kejenuhan awal
 S_2 = persen kejenuhan akhir
 diasumsikan kejenuhan 100% = 4.05 M

4. Dialisis (Tagawa dan Kaji, 1988)

Hasil presipitasi dengan amonium sulfat didialisis menggunakan membran Cellulose dengan "molecular weight cut off" 12000 secara rangkap dua. Dialisis dilakukan pada suhu 4 °C dengan pengadukan, dalam 0.01 M buffer sitrat-fosfat pH 4.5 selama 24 jam dan 3 kali penggantian buffer. Selanjutnya dianalisa aktifitas dan konsentrasi protein terlarutnya.

5. Elektroforesis gel SDS-PAGE (Ornsten dan Davis, 1971)

a. Pembuatan gel

Pembuatan gel pemisah SDS-PAGE 10% T dilakukan dengan mencampurkan 10 ml larutan akrilamida-bisakrilamida (akril-bis), 3.75 ml buffer stock pemisah, 0.3 ml larutan SDS 10%, 1.5 ml amonium persulfat 1.5%, 14.45 ml aquades, dan 0.015 ml TEMED (tetrametiletilen diamin). Kemudian diaduk dengan menggunakan stirrer magnetic, dan dituang secara perlahan-lahan dengan menggunakan pipet tetes ke dalam kolom unit gel elektroforesis yang tersedia. Gel terbentuk setelah 10 - 20 menit.

Gel stacking disiapkan dengan mencampurkan 2.5 ml larutan akril-bis, 5.0 ml buffer stock stacking ing, 0.2 ml SDS 10%, 1.0 ml ammonium persulfat 1.5%, 11.3 ml aquades, dan 0.015 ml TEMED. Campuran gel tersebut dituangkan secara perlahan dengan menggunakan pipet tetes kedalam cetakan gel yang telah berisi gel pemisah yang telah mengeras.

b. Persiapan sampel protein

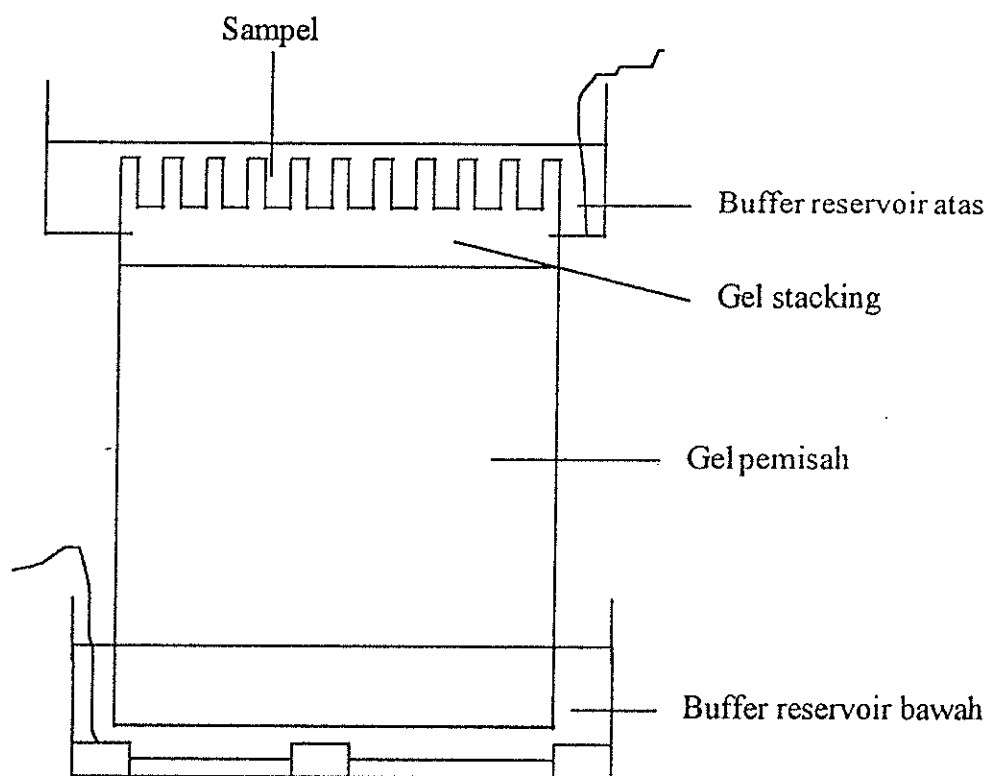
Sampel disiapkan dengan melarutkannya kedalam buffer. Jumlah protein yang dipakai

dalam elektroforesis sekitar 50-100 μg dengan volume 10-30 μl . Campuran tersebut kemudian dididihkan dalam air mendidih selama 3-5 menit. Supaya batas dari mobilitas sampel mudah diketahui, maka ditambahkan pewarna tanda bromofenol biru dalam buffer sampel.

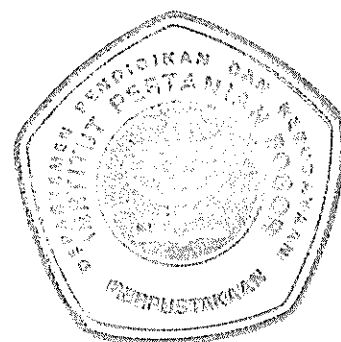
c. Elektroforesis

Setelah terbentuk gel, buffer reservoir dituangkan ke dalam unit elektroforesis yang telah disediakan. Sampel sebanyak 20 μl kemudian disuntikkan pada permukaan gel elektroforesis. Hal yang sama dilakukan pada standar yang telah diketahui berat molekulnya. Elektroforesis dilakukan pada kondisi arus tetap sebesar 15 mA hingga pewarna tanda mencapai batas gel pemisah, kemudian arus dinaikkan menjadi 20 mA. Elektroforesis dilakukan hingga warna dari bromofenol biru mendekati batas bawah kira-kira 1 cm. Proses ini memakan waktu sekitar 12 jam. Bentuk elektroforesis gel yang digunakan adalah gel slab vertikal, seperti tercantum pada gambar 5.

Setelah elektroforesis selesai, gel dikeluarkan dari kolom dan direndam dalam larutan pewarna Coomassie Brilliant Blue selama 24 jam.



Gambar 5. Skema elektroforesis gel slab vertikal



Kemudian pencucian dilakukan dengan larutan peluntur warna melalui perendaman gel selama 24 jam. Setelah larutan pewarna dilunturkan, gel direndam dalam larutan penyimpan yang berupa larutan asam asetat glasial 7%. Bahan-bahan yang harus disiapkan untuk elektroforesis terdapat pada lampiran 3.

d. Perhitungan berat molekul

Kurva standar dari "molecular weight marker" yang diketahui berat molekulnya dibuat dengan memetakan mobilitas relatif terhadap logaritma berat molekul.

$$R_f = \frac{\text{Jarak migrasi protein (cm)}}{\text{Jarak migrasi Bromofenol blue (cm)}}$$

6. Pengaruh pH terhadap aktifitas enzim

Analisa pengaruh pH terhadap aktifitas endopoligalakturonase dilakukan dengan mengukur aktifitas endopoligalakturonase pada nilai pH 3.5 sampai 6.5 dengan selang pH sebesar 0.5 menggunakan buffer pada nilai pH yang diujikan.

7. Pengujian aktifitas endopoligalakturonase dengan viscometer Ostwald II

Analisa aktifitas endopoligalakturonase yang digunakan merupakan modifikasi dari Wimborne dan Rickard (1977).

Sebanyak 9 ml larutan 0,5% (b/v) pektin esterifikasi 61% pH 4,5 yang dilarutkan dalam 0,05 M buffer sitrat pH 4,5, ditambahkan 0,1 ml filtrat dan 0,9 ml 0,05 M buffer sitrat pH 4,5. Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 30 menit. Setiap selang 3 menit dilakukan pengukuran viskositas menggunakan viscometer Ostwald II. Viskositas dalam hal ini disetarakan dengan waktu yang dibutuhkan oleh sampel untuk melewati jarak tertentu pada pipa viscometer Ostwald. Persentase pengurangan viskositas selama inkubasi dinyatakan dengan rumus :

$$\%Reduksi = \left(\frac{V_i - V_r}{V_i - V_s} \right) \times 100$$

dimana : V_i = viskositas pektin tanpa filtrat
 V_r = viskositas larutan yang direaksikan
 V_s = viskositas air murni

Kurva standar yang merupakan plot antara persen reduksi dengan waktu inkubasi digunakan untuk menentukan waktu inkubasi yang memberikan

persen reduksi sebesar 50%. Selanjutnya dari plot antara $1/V_r$ dan waktu inkubasi ditentukan nilai $1/V_r$ yang memberikan 50 persen reduksi. Untuk pengukuran konsentrasi enzim yang terdapat pada sampel, dilakukan perhitungan laju alir dalam viskosimeter pada berbagai tingkat pengenceran. Setiap tingkat pengenceran dilakukan inkubasi selama 30 menit. Faktor pengenceran yang sesuai, yaitu yang memberikan nilai V_r untuk reduksi 50 persen diperoleh dari plot antara $1/V_r$ dan faktor-faktor pengenceran yang diuji.

$$A_u = A_s \left(\frac{t_s D_u}{t_u} \right) = 1 \times \left(\frac{t_s}{30} \right) \times D_u$$

dimana : A_u = jumlah unit aktivitas yang dicari
 A_s = jumlah unit aktivitas standar (=1)
 t_s = waktu inkubasi untuk mencapai 50% reduksi
 t_u = waktu inkubasi pengukuran
 D_u = faktor pengenceran

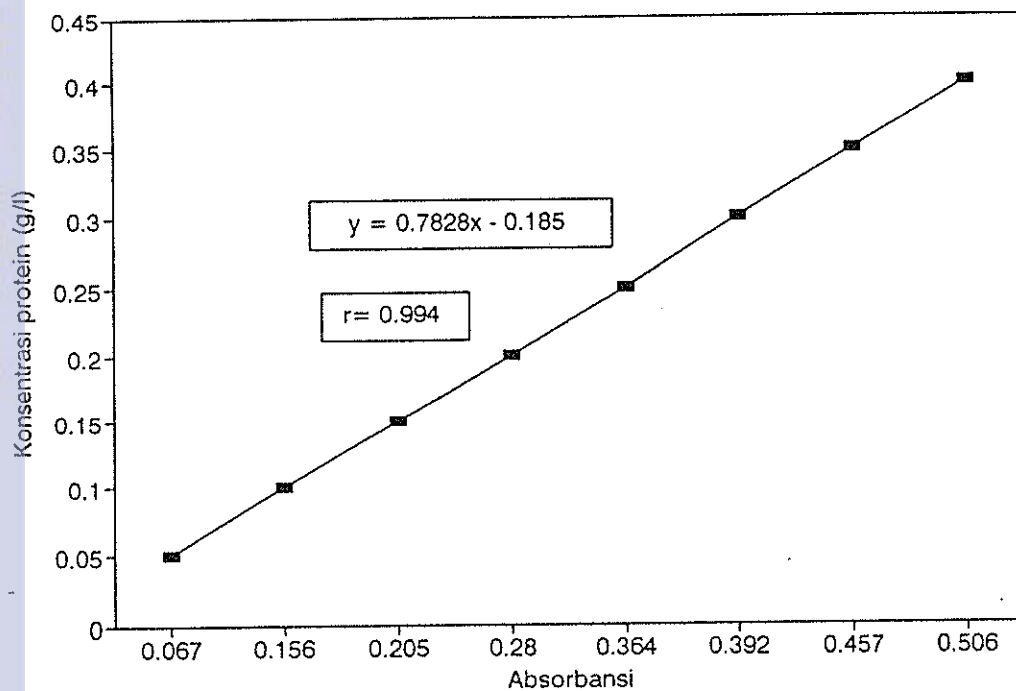
8. Analisa konsentrasi protein terlarut (Metoda Lowry)

Metoda ini dilakukan dengan mencampurkan 1 ml sampel dan 5 ml pereaksi C ke dalam tabung reaksi, kemudian dikocok merata dan dibiarkan selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan larutan folin yang telah diencerkan dan campuran diaduk rata kemudian didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang hingga

terbentuk warna biru. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 500 nm.

Kurva standar protein dibuat dengan menggunakan protein standar bovine serum albumin pada konsentrasi 0.05 g/l sampai 0.4 g/l. Protein standar tersebut diencerkan dalam berbagai tingkat konsentrasi dan diperlakukan sama seperti sampel. Hasil absorbansi kemudian diplotkan dengan berbagai konsentrasi yang digunakan sehingga diperoleh suatu persamaan linier dari kurva standar, seperti tercantum pada grafik 6. Konsentrasi protein sampel diperoleh dengan menggunakan persamaan yang diperoleh dari kurva standar. Pereaksi yang digunakan terdiri dari :

1. Pereaksi A : Natrium karbonat 2 persen dalam larutan NaOH 0,1 N.
2. Pereaksi B : CuSO_4 0,5 persen dalam larutan Na-K-Tartrat 1 persen.
3. Pereaksi C : Campuran 50 ml pereaksi A dengan 1 ml pereaksi B.
4. Pereaksi folin ciocalteau (pereaksi fenol) dilarutkan dengan air 1:1 sebelum digunakan.
5. Larutan Bovine serum albumin sebagai larutan protein standar.



Grafik 1. Kurva standar konsentrasi protein

C. WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Juni sampai dengan bulan November 1995, bertempat di Laboratorium Rekayasa Bioproses Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. ANALISA AKTIFITAS POLIGALAKTURONASE

Produksi enzim pektinase pada penelitian ini, dilakukan dengan menggunakan substrat bubuk kulit kakao yang berdasarkan analisa proksimat yang dilakukan mengandung 13,1% pektin bersama sumber-sumber mineral lainnya pada fermentasi media cair. Pektinase yang dihasilkan diduga terutama mengandung poligalakturonase.

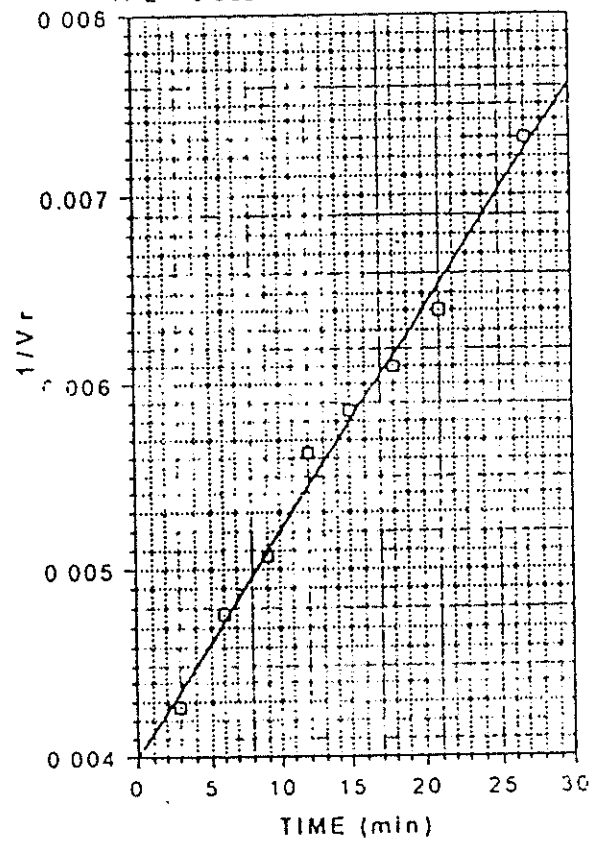
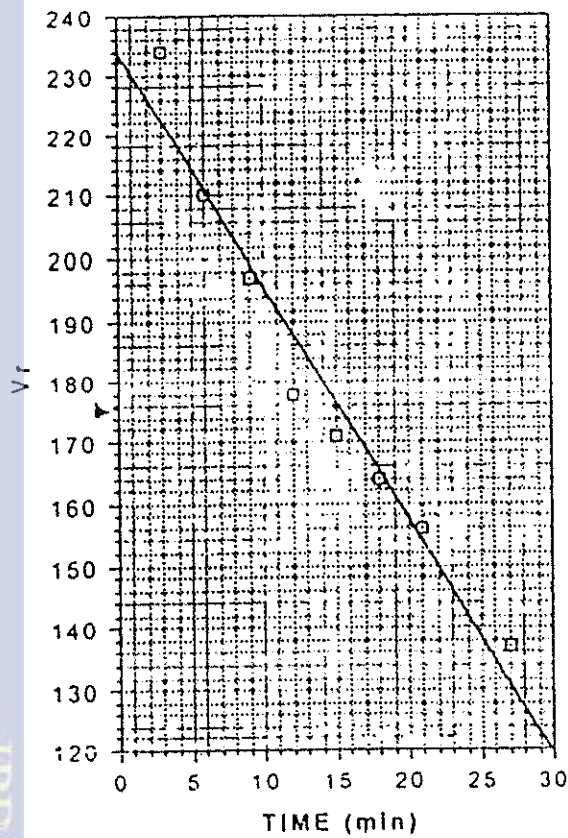
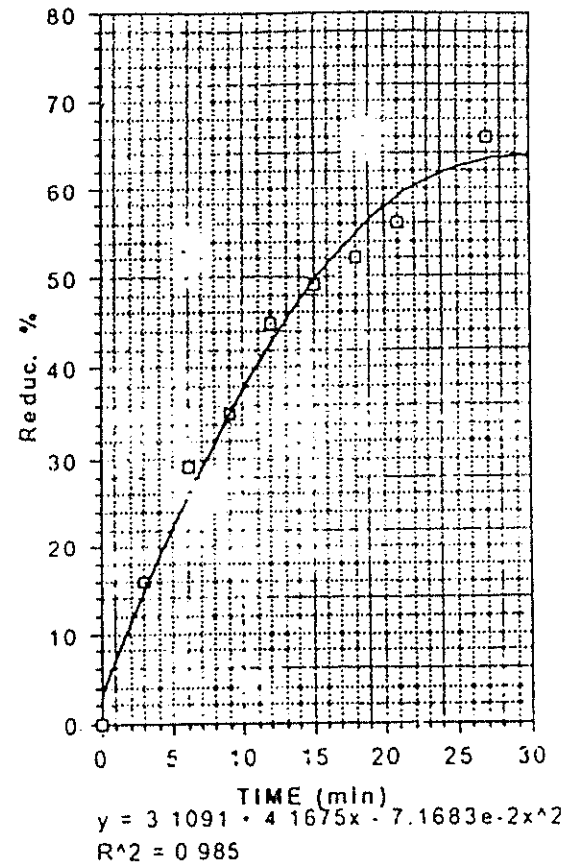
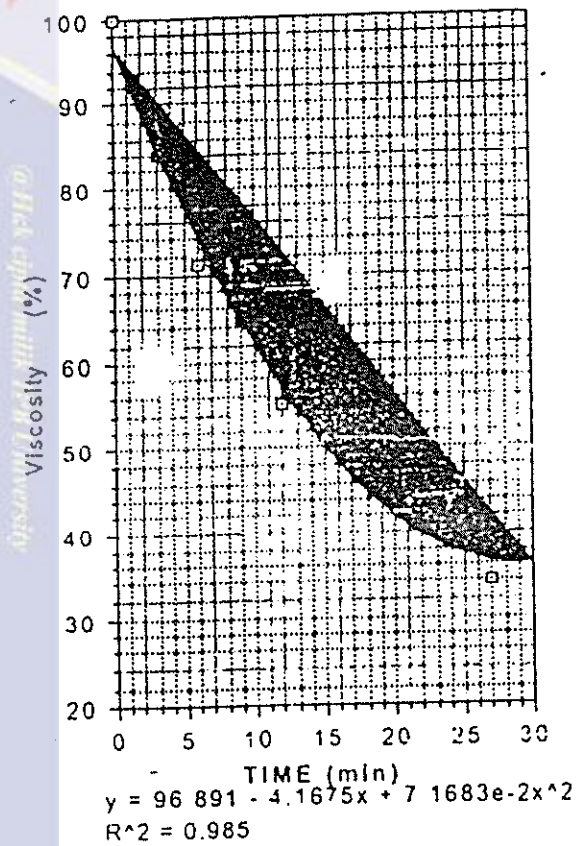
Poligalakturonase merupakan pektinase yang menghidrolisis ikatan α -D-(1-4) poligalakturonat. Endopoligalakturonase mempunyai pH optimum antara 3.6 sampai 5.5 dan eksopoligalakturonase antara pH 4.6 sampai 6.0. Viskometrik merupakan metoda analisa yang sensitif bagi poligalakturonase. Menurut Fogarty dan Kelly (1983), penyerangan poligalakturonat secara acak oleh endopoligalakturonase akan mengakibatkan penurunan 50% viskositas substrat yang hanya disebabkan oleh hidrolisis 2 sampai 3% ikatan glikosidik. Sedangkan pada eksopoligalakturonase penurunan 50% viskositas substrat membutuhkan sekitar 20% pemecahan ikatan substrat. Pengukuran viskositas yang dilakukan menggunakan viskometer Ostwald II dinyatakan sebagai laju alir dalam unit detik.

Substrat yang optimal untuk poligalakturonase adalah poligalakturonat, terutama substrat dengan derajat esterifikasi yang rendah. Dengan peningkatan derajat

esterifikasi, laju dan derajat hidrolisis pektin akan menurun secara cepat. Viskositas material pektin berbeda-beda tergantung pada pH, temperatur, buffer dan kekuatan ionik, sehingga dalam analisa aktifitas poliglakturonase menggunakan viskometer diperlukan standardisasi faktor-faktor tersebut.

Pada penggunaan metoda viskometrik ini terlebih dahulu dibutuhkan kurva standar. Kurva standar diperoleh mula-mula dengan mengukur viskositas larutan yang direaksikan (V_r) pada setiap selang waktu inkubasi (t) 3 menit. Dengan demikian dapat dihitung nilai persen reduksi dengan menggunakan rumus seperti yang tercantum pada Metoda pengujian, dan diperoleh juga nilai V_r dari berbagai persen reduksi. Selanjutnya nilai persen reduksi diplotkan terhadap waktu inkubasi (t) untuk menentukan waktu inkubasi yang memberikan nilai 50% reduksi. Berdasarkan pengukuran yang telah dilakukan, diperoleh waktu inkubasi pada 50% reduksi adalah 15 menit ($t' = t_s$). Dengan melalui perhitungan pada 50% reduksi menggunakan rumus atau dengan memplotkan waktu inkubasi dengan V_r , maka diperoleh nilai V_r pada 50% reduksi atau pada t_s . Pada penelitian ini, nilai V_r pada 50% reduksi adalah sebesar 176 detik.

Adapun kurva-kurva standar yang diperoleh pada penelitian ini seperti terlihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Kurva-kurva standar endopoligalakturonase

Berdasarkan kurva-kurva tersebut maka dapat dihitung aktifitas enzim pada sampel dengan menghitung laju alir dengan viskosimeter pada berbagai tingkat pengenceran.

B. OPTIMASI TINGKAT KEJENUHAN AMONIUM SULFAT

Pemurnian suatu protein selalu disertai dengan pemisahan protein-protein lain yang tidak dikehendaki. Semakin banyak tahap pemurnian yang dilakukan maka tingkat pemurnian semakin tinggi, tetapi hasil yang diperoleh makin rendah. Dengan demikian pemilihan tahap pemurnian yang akan digunakan disesuaikan dengan tujuan pemurnian. Penelitian ini ditujukan untuk memperoleh enzim yang masih crude hasil purifikasi parsial.

Broth hasil fermentasi dipisahkan dari biomasa dengan sentrifugasi pada temperatur 4°C dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, yang dilanjutkan dengan penyaringan. Penyaringan dilakukan untuk memperoleh filtrat enzim yang cukup jernih yang diduga terbebas dari kontaminan berukuran berat molekul cukup besar. Filtrat enzim dianalisa aktifitas endopoligalakturonase dan konsentrasi protein terlarutnya sehingga diperoleh nilai aktifitas spesifik.

Pengendapan protein pada larutan garam berkonsentrasi tinggi merupakan metoda yang banyak digunakan dalam pemurnian enzim.

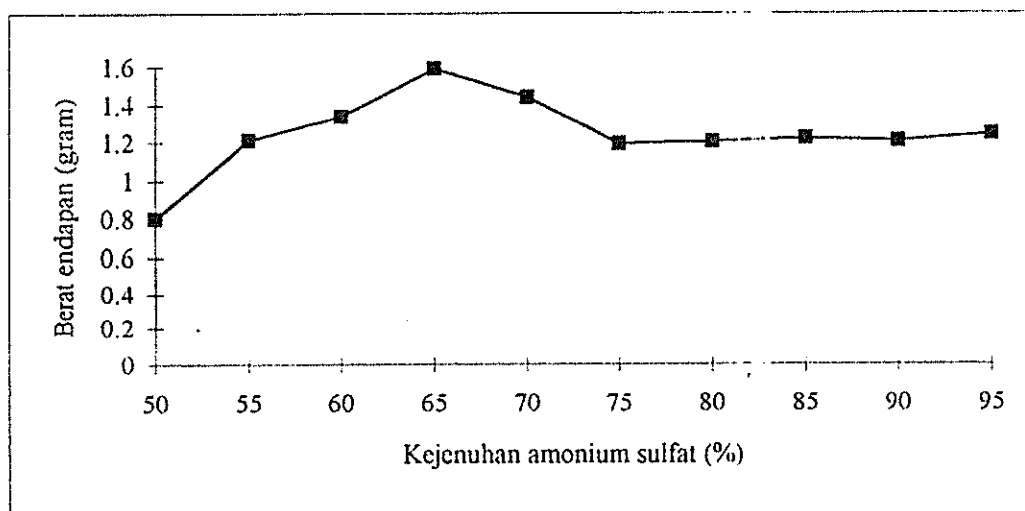
Pada proses salting out garam ditambahkan pada larutan protein secara perlahan-lahan dengan kecepatan pengadukan yang baik. Hal ini ditujukan agar tidak terjadi konsentrasi yang tinggi hanya pada satu tempat. Sedangkan pengendapan selama beberapa jam ditujukan untuk menyempurnakan proses pengendapan. Penggunaan amonium sulfat dengan grade yang murni disarankan karena bertujuan untuk mencegah potensial inhibitor enzim atau asam bebas yang terdapat pada beberapa sampel. Pada umumnya konsentrasi amonium sulfat yang digunakan dinyatakan persentase kejenuhan amonium sulfat (Chereminisnoff dan Ouellette, 1985).

Pada Tabel 3 disajikan data hasil isolasi enzim pada berbagai tingkat kejenuhan amonium sulfat. Pektinase yang dihasilkan membentuk endapan pada kejenuhan amonium sulfat diatas 50%.

Sebenarnya pada tingkat kejenuhan yang lebih kecil dari 50% endapan mungkin terbentuk tetapi dalam jumlah yang sangat sedikit (dapat diabaikan).

Tabel 3. Berat endapan hasil isolasi dengan amonium sulfat

Amonium Sulfat (%)	Berat endapan (gram)		
	1	2	Rata-rata
50	0.592	1.003	0.798
55	0.596	1.829	1.213
60	0.851	1.823	1.337
65	1.376	1.806	1.591
70	1.380	1.491	1.436
75	0.832	1.551	1.192
80	1.208	1.191	1.200
85	1.074	1.360	1.217
90	1.027	1.380	1.204
95	1.094	1.383	1.239



Grafik 2. Berat endapan hasil isolasi pada berbagai tingkat kejenuhan amonium sulfat

Berdasarkan data berat endapan rata-rata yang terbentuk pada kejenuhan amonium sulfat 50% - 95%, dapat dilihat bahwa endapan banyak terbentuk pada kisaran kejenuhan amonium sulfat antara 60 sampai 70%.

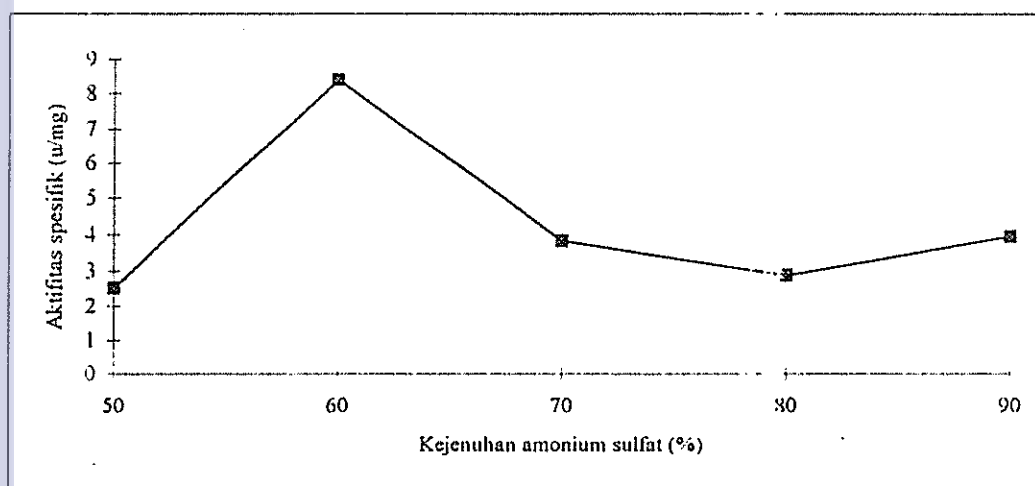
Banyaknya jumlah endapan yang terbentuk tidak cukup dijadikan pertimbangan dalam menentukan tingkat kejenuhan yang akan digunakan dalam proses pemurnian enzim selanjutnya. Hal ini mengingat bahwa pada endapan hasil presipitasi tersebut masih terkandung berbagai jenis protein yang terbentuk selama proses fermentasi.

Dengan demikian untuk menentukan tingkat kejenuhan amonium sulfat yang akan digunakan dalam pemurnian pektinase maka perlu dilakukan analisa aktifitas enzim pada berbagai tingkat kejenuhan yang dicobakan, seperti tercantum pada Tabel 4 dan 5. Berdasarkan analisa aktifitas enzim yang dilakukan, diperoleh aktifitas tertinggi pada tingkat kejenuhan amonium sulfat 60%. Hal ini menunjukkan bahwa sebagian besar endopoligalakturonase terendapkan pada tingkat kejenuhan 60%.

Data aktifitas endopoligalakturonase yang tercantum pada kedua Tabel tersebut mempunyai nilai kuantitatif yang berbeda jauh. Hal ini disebabkan karena perbedaan proses fermentasi. Pada proses fermentasi menggunakan shake flask diperoleh aktifitas yang lebih kecil, ini dapat disebabkan karena pada fermentasi menggunakan

Tabel 4. Aktivitas spesifik endopoligalakturonase hasil pengendapan dengan amonium sulfat pada berbagai tingkat kejenuhan (produksi dalam fermentor)

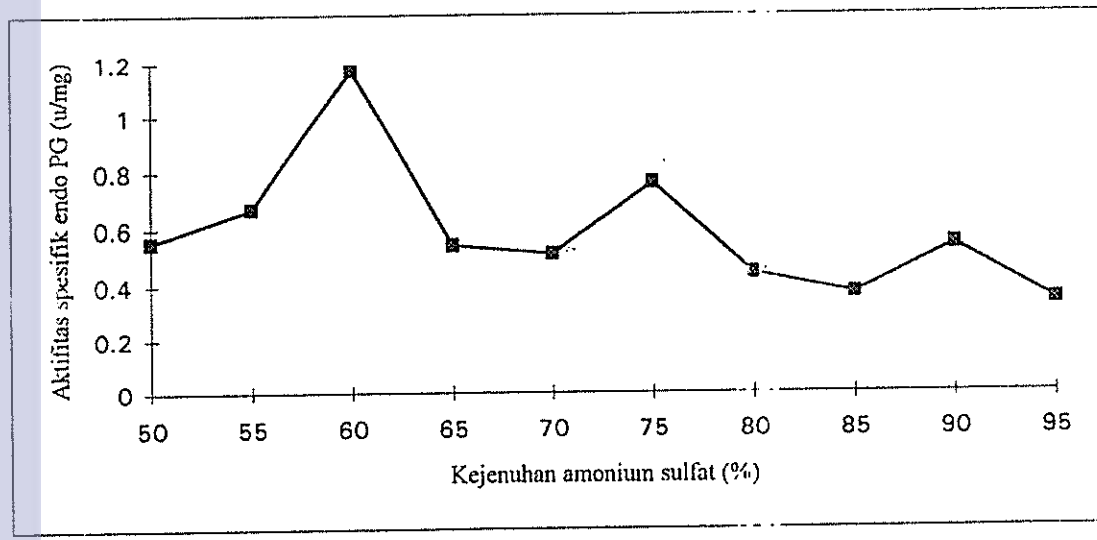
	Aktivitas Endo PG (u/ml)	Konsentrasi Protein terlarut (mg/ml)	Aktivitas spesifik Endo PG (u/mg)
Filtrat	2.98	1.00	2.99
* Pengendapan dengan amonium sulfat (% kejenuhan)			
50	3.10	1.23	2.52
60	33.65	4.01	8.40
70	17.14	4.48	3.83
80	24.18	8.39	2.88
90	32.51	8.23	3.95



Grafik 3. Aktivitas spesifik endopoligalakturonase hasil pengendapan dengan amonium sulfat pada berbagai tingkat kejenuhan (produksi dalam fermentor)

Tabel 5. Aktifitas spesifik endopoligalakturonase hasil pengendapan dengan amonium sulfat pada berbagai tingkat kejenuhan (produksi dalam shake flask)

	Aktifitas Endo PG (u/ml)	Konsentrasi Protein terlarut (mg/ml)	Aktifitas spesifik Endo PG (u/mg)
Filtrat	1.17	2.58	0.45
* Pengendapan dengan amonium sulfat (% kejenuhan)			
50	15.24	27.61	0.55
55	23.11	34.46	0.67
60	24.97	21.39	1.17
65	10.23	18.88	0.54
70	9.41	18.29	0.51
75	8.60	11.25	0.76
80	5.51	12.38	0.44
85	4.96	13.40	0.37
90	8.49	15.59	0.54
95	6.80	19.98	0.34



Grafik 4. Aktifitas spesifik endopoligalakturonase hasil pengendapan dengan amonium sulfat pada berbagai tingkat kejenuhan (produksi dalam shake flask)

Pada proses fermentasi menggunakan shake flask diperoleh aktifitas yang lebih kecil, ini dapat disebabkan karena pada fermentasi menggunakan shake flask jumlah oksigen selama fermentasi terbatas dan pH fermentasi tidak terkontrol, selain juga kumulatif dari faktor-faktor lainnya yang menyebabkan error sehingga mempengaruhi nilai aktifitas enzim.

Data aktifitas enzim pada berbagai tingkat kejenuhan hasil produksi pada shake flask mempunyai grafik yang tidak teratur. Hal ini diduga disebabkan selain oleh kondisi fermentasi yang tidak terkontrol secara optimal juga disebabkan karena pengujian yang tidak 100% spesifik. Sehingga kemungkinan aktifitas endopoligalakturonase yang diukur terinduksi oleh jenis pektinase lain yang mempunyai karakteristik yang hampir sama, pada hasil pengendapan dengan tingkat kejenuhan amonium sulfat diatas 60%.

Dilihat dari persentase tingkat kejenuhan yang tidak terlalu tinggi, diduga endopoligalakturonase memiliki berat molekul yang tidak terlalu besar dan tingkat kepolaran yang tidak terlalu rendah. Pada umumnya untuk protein berberat molekul besar dan kepolaran rendah akan lebih mudah diendapkan (Scopes, 1982). Namun demikian dugaan ini masih memerlukan pengujian yang lebih spesifik pada endopoligalakturonase murni.

Penggunaan berbagai tingkat kejenuhan amonium sulfat pada penelitian ini ditujukan untuk menentukan tingkat kejenuhan amonium sulfat pada aktifitas enzim tertinggi, dengan demikian untuk selanjutnya pengendapan dilakukan pada tingkat kejenuhan amonium sulfat 60%.

Pada Tabel 6 disajikan data hasil purifikasi pektinase yang dilakukan. Berdasarkan hasil yang diperoleh dari pengendapan enzim pada fermentasi yang berbeda, dengan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 60%, berhasil merubah tingkat kemurnian enzim sebesar 1.04 dan 1.86 kali, sehingga bila diambil nilai rata-ratanya adalah sebesar 1.45 kali, dengan nilai persen recovery sebesar 71.72% dan 76.54%, sehingga bila dirata-ratakan sebesar 74.13%.

Nilai tingkat kemurnian diperoleh dengan membandingkan nilai aktifitas spesifik suatu tahap dengan nilai aktifitas spesifik pada tahap awal (filtrat). Sedangkan persen recovery diperoleh dengan membandingkan terhadap nilai total unit aktifitas tahap awal (filtrat). Total aktifitas merupakan hasil kali aktifitas dengan volume total.

Tabel 6a. Purifikasi parsial endopoligalakturonase hasil fermentasi batch 1

	Aktifitas Endo PG (u/ml)	[] Protein terlarut (mg/ml)	Aktifitas spesifik endo PG (u/mg)	Tingkat Pemurnian endo PG	Volume (ml)	Total unit Aktivitas (unit)	Persen Recovery (%)
* Filtrat	1.38	2.42	0.57	-	2000	2762.80	100
* Pengendapan dengan amonium sulfat	94.36	88.96	1.06	1.86	21	1981.56	71.72
* Dialisis	86.28	74.25	1.16	2.03	22.80	1964.42	71.10

Tabel 6b. Purifikasi parsial endopoligalakturonase hasil fermentasi batch 2

	Aktifitas Endo PG (u/ml)	[] Protein terlarut (mg/ml)	Aktifitas spesifik endo PG (u/mg)	Tingkat Pemurnian endo PG	Volume (ml)	Total unit Aktivitas (unit)	Persen Recovery (%)
* Filtrat	8.77	2.58	3.40	-	600	5261.40	100
* Pengendapan dengan amonium sulfat	335.58	94.62	3.55	1.04	12	4026.96	76.54
* Dialisis	314.54	84.97	3.70	1.09	12.50	3931.75	74.73

Keterangan :

Aktifitas spesifik endo PG = $\text{Aktifitas endo PG} / [\text{Protein terlarut}]$

Tingkat pemurnian endo PG = $\text{Aktifitas spesifik pada suatu tahap} / \text{Aktifitas spesifik tahap sebelumnya}$

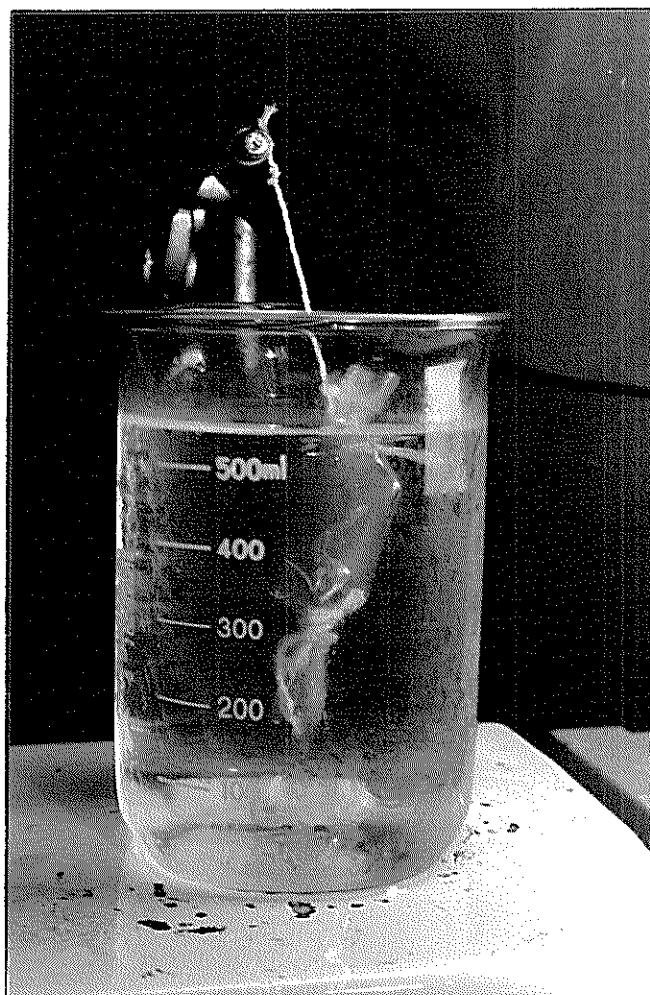
Total Unit Aktivitas = $\text{Aktifitas} \times \text{volume}$

Persen recovery = $\text{Total unit aktifitas pada suatu tahap} / \text{total unit aktifitas pada tahap sebelumnya}$

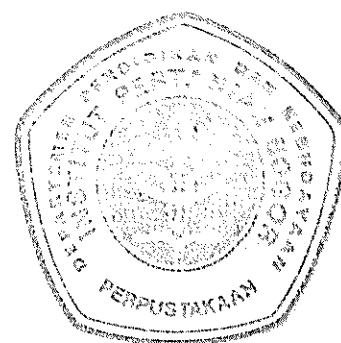
C. "DESALTING" DENGAN DIALISIS DALAM BUFFER SITRAT-FOSFAT

Langkah selanjutnya yang dilakukan adalah proses penghilangan garam (*desalting*). Salah satu metoda yang digunakan untuk *desalting* adalah dengan dialisis. Hasil pengendapan dengan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 60% didialisis dalam 0.01 M buffer sitrat-fosfat pH 4.5 selama 24 jam dengan penggantian buffer sebanyak 3 kali. Dialisis dilakukan dengan memasukkan sejumlah endapan enzim yang dilarutkan seminimal mungkin pada buffer yang sama untuk buffer dialisis kedalam kantung sellulos yang semi permeabel. Kantung dialisis yang digunakan diproduksi oleh SIGMA dengan cut off sebesar 12,000 Dalton, dengan demikian material dengan berat molekul yang lebih besar dari 12,000 Da akan tetap berada dalam kantung dialisis dan material selain itu berdifusi keluar membran. Adapun dialisis yang dilakukan seperti terlihat pada Gambar 7.

Konsentrasi garam yang tinggi yang terdapat pada sampel dalam proses dialisis dilawan oleh tekanan osmotik sehingga buffer masuk kedalam kantung dialisis sebelum garam keluar dari kantung dialisis. Dengan demikian terjadi peningkatan volume selama tahap awal dialisis jika konsentrasi padatan tinggi. Selanjutnya garam dan protein dengan berat molekul rendah berdifusi ke luar



Gambar 7. Proses dialisis



membran bersama dengan buffer yang berdifusi ke dalam kantung dialisis.

Hasil dialisis mempunyai aktifitas endopoligalakturonase yang lebih rendah dibandingkan hasil pengendapan. Hal ini diduga disebabkan karena adanya kofaktor yang berupa logam dengan berat molekul rendah terpisah dari enzim dan terlarut keluar dari kantung dialisis. Selain itu dapat juga disebabkan karena kontaminasi pada membran atau penghambatan aliran oleh fase pada perbatasan membran. Sedangkan penurunan konsentrasi protein terlarut pada hasil dialisis diduga karena pada hasil dialisis, protein dengan berat molekul kurang dari 12,000 Da telah berdifusi ke luar membran. Sedangkan peningkatan volume pada hasil dialisis diduga karena adanya buffer, yang berfungsi sebagai media pembatas, yang berdifusi ke dalam membran.

Pada proses dialisis konsentrasi garam dapat dipertahankan pada tingkat yang rendah dengan menggunakan suatu aliran air yang cepat pada sisi filtrat. Penggunaan air deionisasi dalam dialisis adalah penting, yaitu untuk menghindari kontaminasi logam yang masuk ke dalam kantong membran dialisis dengan arus balik. Proses dialisis yang dilakukan menggunakan buffer dalam jumlah 50 kali volume kantung dialisis dengan penggantian buffer sebanyak 3 kali, hal ini bertujuan untuk memperoleh

hasil yang terbaik (Scopes, 1982). Adapun untuk mempercepat proses dilakukan pengadukan buffer dan kantung dialisis diusahakan bergerak dengan menggunakan pengaduk magnetik.

Berdasarkan analisa yang telah dilakukan, dialisis enzim hasil fermentasi yang berbeda dapat meningkatkan kemurnian sebesar 2.03 dan 1.09 kali, berarti bila dirata-ratakan tingkat kemurnian yang diperoleh sebesar 1.52 kali. Adapun nilai persen recovery yang diperoleh sebesar 71.10% dan 74.73%, dengan nilai rata-rata sebesar 72.92%.

Nilai persen recovery yang diperoleh pada tahap pengendapan dan dialisis mempunyai nilai yang tidak jauh berbeda. Hal ini disebabkan karena pada kedua tahapan tersebut perubahan volume yang terjadi tidak terlalu besar, dimana persen recovery tergantung pada nilai aktifitas dan volume.

Tingkat pemurnian pada tahap pengendapan mempunyai nilai yang tidak jauh berbeda dengan nilai pada tahap dialisis. Hal ini diduga karena proses penghilangan garam tidak berlangsung sempurna. Menurut Scopes (1982), pada suatu proses dialisis penghilangan yang sempurna garam endogenous dari sampel tidak dapat terjadi, karena keseimbangan yang bermula dalam kantung dialisis didistribusikan ke seluruh buffer dan kantung dialisis.

Selain itu diduga juga karena pada hasil dialisis terjadi penurunan aktifitas dan penurunan konsentrasi protein, yang secara proporsional diperoleh nilai aktifitas spesifik yang tidak jauh berbeda, yang berpengaruh langsung pada nilai tingkat pemurnian.

Berdasarkan hasil yang diperoleh persen recovery dan tingkat pemurnian dari kedua tahapan yang dilakukan mempunyai nilai yang tidak jauh berbeda. Pada dialisis dimaksudkan terutama untuk menghilangkan garam-garam yang digunakan baik dalam pengendapan maupun dalam fermentasi dan merupakan tahapan antara dalam pemurnian.

Nilai aktifitas hasil dialisis lebih rendah dibandingkan hasil pengendapan. Pada proses dialisis molekul-molekul dengan berat molekul kurang dari 12,000 Da akan terlarut keluar membran. Kondisi tersebut memungkinkan juga untuk terlarutnya kofaktor yang bersifat logam dengan berat molekul rendah sehingga menurunkan aktifitas enzim.

Dari penelitian El-sayed et al. (1994), purifikasi poligalakturonase yang dihasilkan dari fermentasi media padat limbah kurma oleh yeast *Endomycopsis fibuligera* dengan pengendapan menggunakan amonium sulfat yang disertai dialisis diperoleh tingkat pemurnian sebesar 5.9 kali filtrat dan persen recovery sebesar 54.7%. Sedangkan pada pemurnian poligalakturonase yang dihasilkan

dari fermentasi cair media yang mengandung 1.25% pektin (b/v) dan 1% pepton (b/v) oleh *Corticium rolfsii* IFO 6146, dengan pengendapan menggunakan amonium sulfat pada kejenuhan 85% dan dilanjutkan dialisis dalam 0.01 M buffer sitrat fosfat pH 6.0, diperoleh persen recovery sebesar 52% (Tagawa dan Kaji di dalam Kellogg dan Wood, 1988).

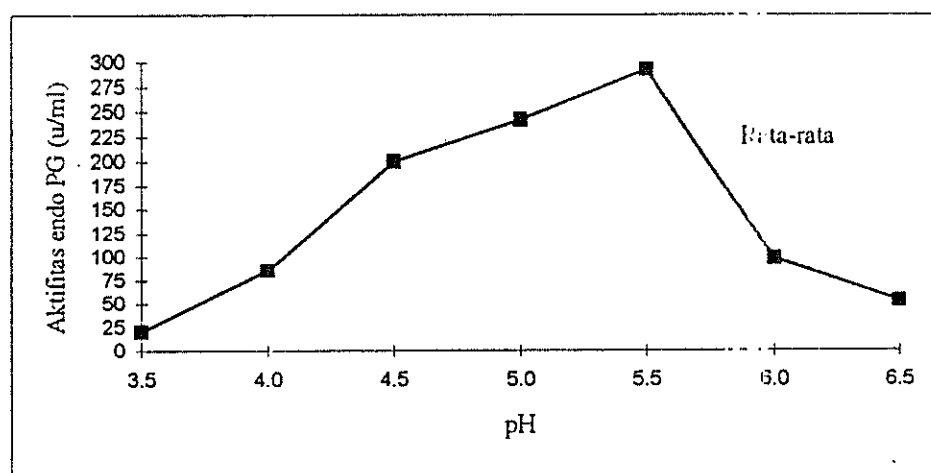
D. PENGARUH pH TERHADAP AKTIFITAS ENZIM

Setiap enzim mempunyai kisaran pH optimum, yaitu kisaran pH yang menunjukkan aktifitas maksimum. Hal ini disebabkan enzim bersifat amphotitik, yaitu mempunyai konstanta disosiasi bagi gugusan asam dan gugusan basanya, terutama yang diperlihatkan oleh gugusan residu terminal karboksil maupun gugusan aminonya (Winarno, 1980).

Hasil analisa pengaruh pH terhadap aktifitas endopoligalakturonase diperoleh aktifitas maksimal pada pH 5.5, seperti tersaji pada Tabel 7. Dilihat dari bentuk grafik, aktifitas endopoligalakturonase memiliki peningkatan yang besar pada kisaran pH antara 4.5 dan 5.5. Hal ini menunjukkan pada kisaran pH tersebut diduga endopoligalakturonase memiliki kestabilan yang cukup tinggi.

Tabel 7. Pengaruh pH terhadap aktifitas endopoligalakturonase

pH	Aktifitas endo PG (u/ml)		
	Ulangan 1	Ulangan 2	Rata-rata
3.5	26	15	20
4.0	94	76	85
4.5	86	314	200
5.0	191	293	242
5.5	265	318	292
6.0	131	65	98
6.5	45	60	53



Grafik 5. Pengaruh pH terhadap aktifitas endopoligalakturonase

Perubahan keaktifan enzim akibat pengaruh pH diperkirakan karena terjadinya perubahan ionisasi pada gugus ionik enzim, pada sisi aktifnya atau sisi lain yang secara tidak langsung mempengaruhi sisi aktif enzim (Muchtadi et al., 1992). Gugus ionik berperan dalam menjaga konformasi sisi aktif dalam mengikat substrat dan dalam mengubah substrat menjadi produk. Selain itu menurut Soendoro (1989), perubahan keaktifan dimungkinkan karena terdenaturasinya enzim akibat pH yang ekstrim tinggi atau rendah, atau karena substrat mengalami kelebihan atau kekurangan proton sehingga sebagai hasil yang aktif hanya satu bentuk muatan.

Menurut Burns di dalam Walter (1991), nilai pH optimum endopoligalakturonase antara 3.6 dan 5.5, dimana pH optimum tersebut akan menjadi lebih asam dengan menurunnya berat molekul substrat. Selain itu pH optimum dapat berubah dengan perbedaan buffer dan perubahan kekuatan ionik media reaksi.

Pektinesterase dari berbagai mikroorganisme mempunyai pH optimum antara 3.5 dan 9.0. Endopoligalakturonase dari *Aspergillus niger* mempunyai pH optimum antara 3.8 sampai 5.5 sedangkan endopoligalakturonase dari mikroorganisme lainnya mempunyai pH optimum antara 4.0 sampai 6.6. Untuk endopektatliase dari berbagai mikroorganisme mempunyai pH optimum antara 8.2 sampai 9.9,

serta endopektinliase mempunyai pH optimum antara 5.2 dan 8.4. Sedangkan pH optimum untuk oligogalakturonase antara 7.0 dan 7.2 (Rombouts dan Pilnik, 1980). Eksopoligalakturonase menurut Burns didalam Walter (1991), mempunyai pH optimum antara 4.6 dan 6.0.

Berdasarkan kisaran pH optimum yang diperoleh pada penelitian ini, dapat diduga mayoritas yang terbentuk adalah poligalakturonase.

Poligalakturonase menurut Rombouts dan Pilnik (1980), menyerang ikatan glikosidik dengan hidrolisis, dan pektin metoksil rendah baik digunakan sebagai substrat. Dengan demikian berdasarkan dari substrat yang digunakan diduga pula mayoritas adalah poligalakturonase.

Ultrazym sebagai enzim komersial yang dihasilkan NOVO dan umum dipakai dalam industri sari buah, pada proses depektinisasi sari buah apel pada suhu 55 °C mempunyai pH optimum pada kisaran pH 3.5 dan 5.0 (Anonim, 1983).

Berdasarkan penelitian Bruhlmann et al. (1994), pada proses degumming ramie bast fiber terdapat korelasi yang kuat antara aktifitas pektat liase dalam supernatan dan efek degumming. Supernatan dari kultur dengan strain terpilih mengandung enzim pektinolitik, xilanolitik dan selulolitik. Degumming dari bast fiber pada pH 7 lebih dipengaruhi oleh kehadiran pektat liase daripada

xylanase atau sellulase. Degumming tidak dapat meningkat hasilnya dengan peningkatan pH kultur supernatan dari pH 7 ke pH 9.

E. BERAT MOLEKUL PEKTINASE HASIL ELEKTROFORESIS GEL

Enzim yang dihasilkan dari proses dialisis, diperkirakan berat molekulnya dengan menggunakan elektroforesis gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfat-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) dengan konsentrasi akrilamida sebesar 10 % pada sistem buffer diskontinyu, yang menggunakan bahan buffer yang berbeda-beda dalam gel dibandingkan dengan buffer dalam reservoir. Pada sistem ini sampel ditempatkan pada gel stacking yaitu bagian gel sebelah atas dengan pori yang lebih besar dari pori gel pemisah dibagian sebelah bawahnya.

Pada gel stacking tidak terjadi proses pemisahan. Sampel protein selama pergerakan pada gel stacking dijenuhkan pada zone sempit (stacking) sebelum pemisahan pada gel pemisah yang mempunyai ukuran pori lebih kecil.

SDS-PAGE merupakan elektroforesis gel poliakrilamida yang dilakukan pada sampel protein yang didenaturasi oleh SDS bersama-sama dengan β -merkaptetoetanol dan pemanasan sehingga menyebabkan rusaknya struktur tiga dimensi protein.

SDS merupakan detergen anionik yang bermuatan negatif karena adanya gugus-gugus anion dari SDS, sehingga kompleks SDS-protein yang terbentuk bermuatan negatif. Dengan demikian sampel yang ditambahkan akan bergerak menuju elektroda positif.

Elektroforesis gel yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan sampel dengan volume 20 μ ml dengan konsentrasi protein yang relatif sama untuk setiap sampel. Penggunaan SDS dimaksudkan agar pektinase yang hendak dielektroforesis mempunyai muatan yang sama (negatif), dengan demikian pemisahan terjadi hanya berdasarkan perbedaan ukuran molekul. Elektroforesis gel yang digunakan berbentuk lempengan (slab) dengan sistem vertikal. Penggunaan gel slab menurut Hames dan Rickwood (1987), mempunyai keuntungan yaitu beberapa sampel berikut "molecular weight marker" dapat dielektroforesis dibawah kondisi yang sama pada satu gel sehingga diperoleh rumus pita hasil perbandingan langsung. Selain itu panas yang dihasilkan selama elektroforesis lebih mudah dihilangkan dengan gel slab standar, sehingga mengurangi gangguan pada pita protein akibat efek pemanasan dan dibutuhkan waktu yang lebih sedikit untuk pemisahan sejumlah sampel yang dielektroforesis dibawah kondisi yang sama.

Sampel dilewatkan sistem pada kondisi yang sama. Arus yang digunakan sebesar 15 mA pada tahap awal, kemudian setelah sampel memasuki batas antara gel stacking dan gel pemisah arus dinaikan menjadi 20 mA.

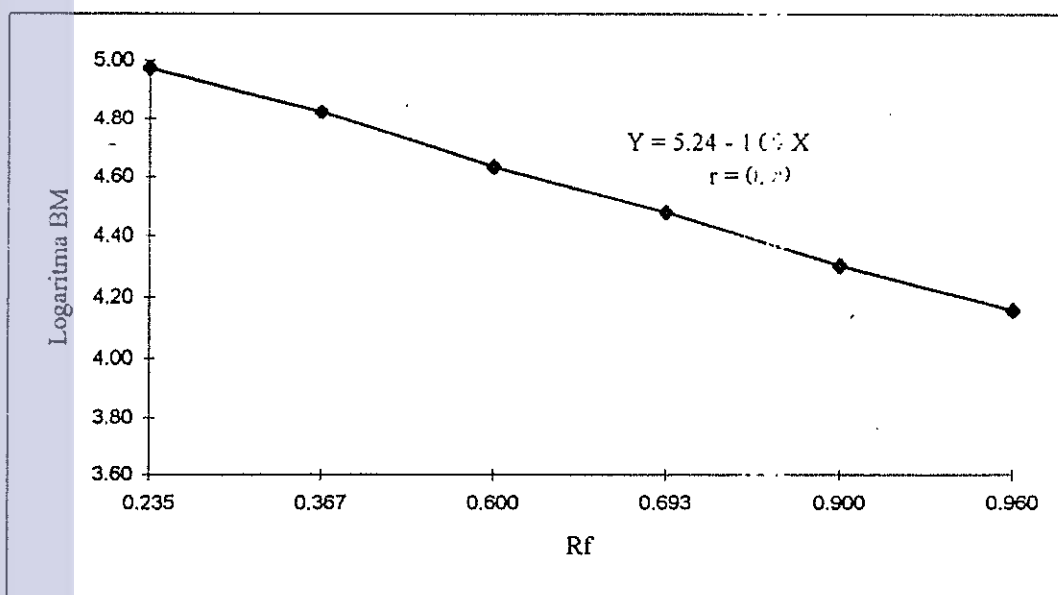
Berdasarkan nilai mobilitas relatif (R_f) yang dibandingkan dengan logaritma berat molekul dari protein standar yang telah diketahui berat molekulnya maka diperoleh kurva standar dengan persamaan linier tertentu. Kurva standar (grafik 4) dibuat dengan memplot nilai mobilitas relatif (R_f) dan logaritma dari berat molekul protein standar yang telah diketahui nilainya (Tabel 8). Berat molekul sampel protein diukur dengan membandingkan migrasi molekul sampel dengan protein standar pada grafik 4.

Elektroforesis yang dilakukan menggunakan protein standar yang diproduksi oleh Pharmacia. Dari studi pustaka diketahui berat molekul pektinase berkisar antara 22,000 sampai 85,000 Da. Oleh karena itu protein standar yang terdiri dari Phosphorylase (94,000 Da), Bovine Serum Albumin (67,000 Da), Ovalbumin (43,000 Da), Carbonic Anhydrase (30,000 Da), Soybean Trypsin Inhibitor (20,100 Da), dan α -Lactalbumin (14,400 Da), dianggap memadai untuk memperkirakan berat molekul pektinase.

Tabel 8. Data perhitungan Rf berat molekul standar

Jenis	Jarak migrasi (cm)	BM (da)	Rf *	Log BM
Phosphorylase B	3.80	94,000	0.235	4.97
BSA	5.50	67,000	0.367	4.83
Ovalbumin	9.00	43,000	0.600	4.63
Carbonic Anhydrase	10.40	30,000	0.693	4.48
Soybean Trypsin inhibitor	13.50	20,100	0.900	4.30
α - Lactalbumin	14.40	14,400	0.960	4.16
Bromofenol blue	15.00	-	1	-

*) Rf = Jarak migrasi protein / jarak migrasi pewarna tanda



Y = Log berat molekul

Grafik 6. Kurva standar berat molekul

Sesuai dengan berat molekulnya, maka senyawa yang mempunyai berat molekul terkecil akan bergerak paling jauh sehingga nilai R_f -nya paling besar. Dalam hal ini pita yang terjauh menunjukkan α -Lactalbumin.

Nilai R_f dari setiap pita pada masing-masing sampel dimasukkan ke dalam persamaan linier dari kurva standar sehingga diperoleh nilai perkiraan berat molekul dari masing-masing sampel. Pada Ultrazym 100G yang merupakan pektinase komersial terpisah menjadi 7 pita. Pektinase standar SIGMA menghasilkan 13 pita, Pektinesterase standar 5 pita dan sampel hasil dialisis menghasilkan 6 pita, dengan berat molekul tercantum pada Tabel 9.

Pada ultrazym 100G terdapat 2 pita yang sama dengan pektinase standar dengan berat molekul 88,988 Da dan 64,754 Da, selain itu terdapat juga satu pita yang sama dengan pektinesterase sekaligus pektinase standar, dengan berat molekul 16,698 Da.

Bentuk pita protein yang dihasilkan dipengaruhi oleh jumlah volume dan cara penyuntikan sampel serta kepekatan protein sampel.

Berat molekul pektinase bervariasi antara satu galur mikroorganisma dengan yang lainnya. Pektinesterase I (PE I) dari kapang *Phytophthora injestans* mempunyai berat molekul 45,000 - 48,000 Da dan PE II sekitar

Tabel 9. Data perhitungan R_f sampel

Sampel	Jarak migrasi (cm)	R_f	Perkiraan BM (Da)
Ultrasym 100G	4.0	0.267	88,988
	5.9	0.393	64,754
	6.9	0.460	54,777
	8.3	0.553	43,338
	8.8	0.587	39,860
	9.9	0.660	33,159
	14.0	0.800	16,698
Pektinase Standar SIGMA	3.5	0.233	96,753
	4.0	0.267	88,988
	4.7	0.313	79,153
	5.9	0.393	64,754
	6.5	0.433	58,569
	7.0	0.467	53,868
	8.5	0.567	41,912
	9.6	0.640	34,866
	10.2	0.680	31,536
	11.0	0.733	27,585
	12.0	0.800	23,335
	13.5	0.900	18,155
	14.0	0.933	16,698
Pektinesterase standar SIGMA	5.5	0.367	69,236
	6.3	0.667	60,562
	7.5	0.500	49,545
	9.8	0.653	33,720
	14	0.933	16,698
Hasil dialisis	4.0	0.267	88,988
	5.4	0.360	70,404
	6.0	0.400	63,680
	6.5	0.433	58,569
	10.0	0.667	32,609
	14.4	0.960	15,617

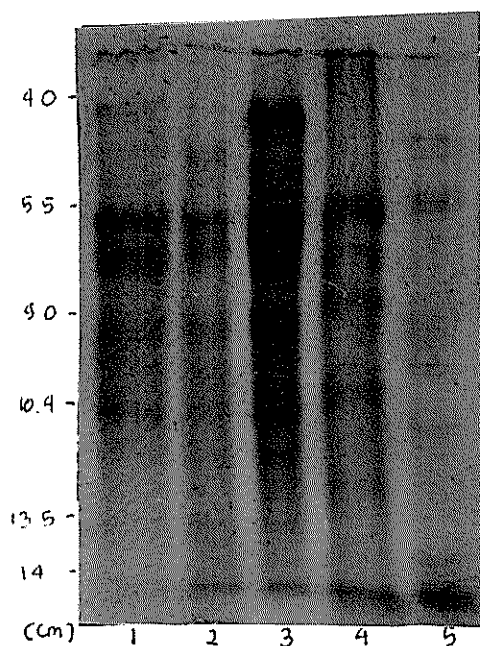
35,000 sampai 37,000 Da dengan metoda elektroforesis gel (Tagawa dan Kaji di dalam Kellogg dan Wood, 1988). Sedangkan PE I dan II dari kapang *Botrytis cinerea* peos masing-masing mempunyai berat molekul 28,400 dan 27,800 Da (Schejter dan Marcus di dalam Kellogg dan Wood, 1988). Dari penelitian yang dilakukan oleh Schejter dan Marrus di dalam Kellogg dan Wood (1988) didapatkan bahwa berat molekul poligalakturonase I dan II dari kapang *Botrytis cinerea* peos hasil elektroforesis gel masing-masing adalah 34,600 dan 56,800 Da. Sedangkan endopektatliase dari *Erwinia aroideae* diperkirakan mempunyai berat molekul 67,000 Da (Konno di dalam Kellogg dan Wood, 1988).

Menurut Rombouts dan Pilnik (1980), endopoligalakturonase dari *Aspergillus niger* mempunyai berat molekul antara 35,000 dan 85,000 Da dan dari mikroorganisma lainnya mempunyai berat molekul antara 30,000 sampai 69,000 Da. Sedangkan endopektinliase dari *Aspergillus niger* mempunyai berat molekul 33,100 dan 35,400 Da. Sedangkan endopoligalakturonase yang dihasilkan dari *Erwinia carotovora* mempunyai berat molekul antara 42,000 dan 45,000 Da dengan menggunakan elektroforesis SDS-PAGE (Saarilahti, 1992).



Eksopoligalakturonase mempunyai berat molekul 48,000 Da (Konno di dalam Kellogg dan Wood, 1988).

Berdasarkan data yang diperoleh, Ultrazym 100G diduga selain pektinesterase juga mengandung endopoligalakturonase (33,159 - 64,754 Da), eksopoligalakturonase (54,777 dan 64,754 Da) dan endopektinliase (33,159 Da). Pada hasil dialisis diduga terdapat endopoligalakturonase (32,609 - 70,404 Da) dan eksopoligalakturonase (58,569 - 70,404 Da), pektinesterase (32,609 - 70,404 Da) serta endopektinliase (32,609 Da). Gambar 8 menunjukkan pita-pita hasil elektroforesis SDS-PAGE.



Gambar 8. Hasil elektroforesis SDS-PAGE

Keterangan :

- 1 = Ultrazym 100G
- 2 = Berat molekul standar
- 3 = Pektinase standar
- 4 = Pektinesterase standar
- 5 = Hasil dialisis

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Pektinase yang diproduksi oleh berbagai galur mikroorganisma mempunyai karakteristik yang berbeda-beda.

Purifikasi parsial protein umunya dilakukan dengan pengendapan menggunakan amonium sulfat yang disertai proses desalting. Pektinase yang dihasilkan dari fermentasi cair kulit kakao oleh *Aspergillus niger* pada penelitian ini, mempunyai aktifitas maksimal pada tingkat kejenuhan amonium sulfat 60%. Tingkat kejenuhan tersebut tidak mutlak digunakan pada skala komersial mengingat amonium sulfat yang digunakan pada skala laboratorium merupakan amonium sulfat pure analisis (p.a), sehingga dalam penerapan untuk skala komersial perlu diperhatikan nilai kemurnian amonium sulfat yang digunakan.

Berdasarkan purifikasi parsial yang dilakukan, diperoleh tingkat pemurnian rata-rata poligalakturonase hasil pengendapan dengan amonium sulfat sebesar 1,45 kali filtrat dengan persen recovery rata-rata sebesar 74,13%. Sedangkan pada tahap dialisis diperoleh tingkat pemurnian rata-rata sebesar 1,52 kali filtrat dengan persen recovery rata-rata sebesar 72,92%.

Aktifitas maksimal poligalakturonase yang diuji dengan menggunakan substrat pektin esterifikasi 61% dalam 0,05 M buffer sitrat pada pH 3,5 sampai 6,5 diperoleh pada pH 5,5. Dimana pada pH antara 4,5 sampai 5,5 mempunyai aktifitas yang lebih besar dibandingkan nilai pH yang lain sehingga pada selang nilai pH tersebut enzim mempunyai kestabilan yang cukup tinggi.

Perkiraan berat molekul dengan menggunakan elektroforesis gel SDS-PAGE, Ultrazym 100G mempunyai berat molekul antara 16,698 - 88,988 dalton, pektinase dan pektinesterase standar SIGMA mempunyai berat molekul antara 16,698 - 96,753 dalton dan 16,698 - 69,236 dalton. Sedangkan sampel hasil dialisis mempunyai berat molekul perkiraan antara 15,617 - 88,988 dalton. Pada Ultrazym 100G dan sampel hasil dialisis diperkirakan mengandung poligalakturonase, pektinesterase dan endopektinliase.

B. SARAN - SARAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh, disarankan untuk melakukan pengkajian lebih lanjut mengenai proses pemurnian pektinase sehingga diperoleh pektinase dengan kemurnian yang tinggi dan jumlah yang optimal. Selain

itu perlu juga dilakukan analisa lebih lanjut untuk menentukan jenis pektinase serta karakteristik dari pektinase yang dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 1983. UltrazymTM. Schweizerische Ferment AG, Basel.
- Anonim. 1992. Biotechnological Inovations in Food Processing. Butterworth Heinemann.
- Anonim. 1991. Pemanfaatan Kulit buah Kakao dan Kopi pada Pertanaman Kakao dan Kopi di PTP XXVI. Prosiding Seminar Bioteknologi Perkebunan dan Lokakarya Biopolimer untuk Industri Bogor 10 - 11 Desember 1991. Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB, Bogor.
- Bailey, M. J. dan E. Pessa. 1990. Strain and Process for Production of Polygalacturonase. Enzyme Microb. Technol., 1990 Vol. 12. April : 266 - 271.
- Behere, A., V. Satyanarayan dan S. R. Padwal-Desai. 1993. Separation and Limited Characterization of Three Polygalacturonases of *Aspergillus niger*. Enzyme Microb. Technol., 1993, Vol. 15, February : 158 - 161.
- Biro Pusat Statistik. 1992. Statistika Indonesia. Biro Pusat Statistik, Jakarta.
- Bruhlmann, F., K. S. Kim, W. Zimmerman dan A. Fiechter. 1994. Pectinolytic Enzymes From *Actinomyces* For Degumming of Ramie Bast Fibers. Applied and Environmental Microbiology, June 1994, vol. 60, No. 6 : 2107 - 2112.
- Burns, J. K. 1991. The Polygalacturonases and Lyases. Di dalam R. H. Walter. 1991. The Chemistry and Technology of Pectin. Academic Press, Inc.
- Cheremisinoff, P. N. dan R. P. Ouellette. 1985. Biotechnology Applications and Research. Technomic Publishing Co. Inc., Basel.
- Datar, R. 1986. Comparison of Centrifugation and Filtration in Bioseparations. Di dalam S. Lee. 1989. The Primary Stages of Protein Recovery. Journal of Biotechnology, 11 (1989) : 103 - 118.
- El-Sayed, S. T., S. A. Moharib dan E. W. Jwanny. 1994. Isolation and Characterization of Polygalacturonase and Invertase from a Yeast *Endomycopsis fibuligera* (3812) Bioconversion of Date Wastes. International Journal of Food Science and Technology (1994) 29 : 255 - 262.

- Fogarty, W. M. dan C. T. Kelly. 1983. Pectic Enzymes. Di dalam W. M. Fogarty (ed.). Microbial Enzymes and Biotechnology. Applied Science Publ., London dan New York.
- Frittrang, A.K., H. Deising dan K. Mendgen. 1992. Characterization and Partial Purification of Pectinesterase, a Differentiation-specific Enzyme of *Uromyces viciae-fabae*. Journal of General Microbiology (1992) 138. 2213-2218.
- Hames, B. D. dan D. Rickwood. 1987. Gel Electrophoresis of Protein, A Practical Approach, IRL Press, Oxford Washington D.C.
- Magro, P., L. Varvaro, G. Chilosi, C. Avanzo dan G. M. Balestra. 1994. Pectolytic Enzymes Produced by *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. FFMS Microbiology Letters 117 (1994) 1-6.
- Manachini, P. L., C. Parini dan M. G. Fortina. 1988. Pectic Enzymes from *Aureobasidium pullulans* LV 10. Enzyme Microb. Techno., 1988, Vol.10, November: 682 -685.
- Mc Phie. 1971. Dialysis. Di dalam R. F. Boyer. 1986. Modern Experimental Biochemistry. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Mill, P.J. dan R. Tuttobello. 1961. The Pectic Enzymes of *Aspergillus niger* : Endopolygalacturonase. Biochem. J. (1961) 79,57.
- Muchtadi, D., N. S. Palupi, dan M. Astawan. 1992. Enzim Dalam Industri Pangan. PAU Pangan dan Gizi, IPB, Bogor.
- Nasution, Z., W. Tjiptadi dan B. S. Laksmi. 1980. Pengolahan Coklat. Jurusan Teknologi Industri Pertanian, FATETA, IPB, Bogor.
- Nur, M. A., H. S. Rukmini dan H. Adijuwana. 1989. Petunjuk Teknik Laboratorium Untuk Bidang Biologi dan Kimia. Pusat Antar Universitas Bioteknologi, IPB, Bogor.
- Pereira, S. S., E. F. Torres, G. V, Gonzalez dan M. G. Rojas. 1993. Effects of Different Carbon Sources on The Synthesis of Pectinase by *Aspergillus niger* in Submerged and Solid-state Fermentations. Applied Microbiology and Biotechnology (1993) 39 : 36-41.

- Prave, P., U. Faust, W. Sittig dan D. A. Sukatch. 1987. Fundamentals of Biotechnology. VCH, Germany.
- Rehm, H. J. dan G. Reed. 1987. Biotechnology Vol. 7a Enzyme Technology. VCH, Germany.
- Roumbouts, F. M. dan W. Pilnik. 1980. Pectic Enzymes. Di dalam A.H. Rose (ed.). Microbial Enzyme and Bioconversions. Academic Press, London.
- Riyadi, R. 1987. Pemanfaatan Plasenta Coklat Sebagai Media Pembuatan Enzim Pektinase dari *Aspergillus niger* L51/NRRL A 11.264 Secara Fermentasi Media Cair. Skripsi Jurusan Teknologi Industri Pertanian, FATETA, IPB, Bogor.
- Roesmanto, J. 1991. Kakao : Kajian Sosial Ekonomi. Aditya Media, Yogyakarta.
- Saarilahti, H. T. 1992. Characterization of Polygalacturonases. Gene, 124 (1993) : 145 - 147.
- Sajjaanantakul, T. dan L. A. Pitifer. 1991. Pectinesterase. Di dalam R. H. Walter. 1991. The Chemistry and Technology of Pectin. Academic Press, Inc.
- Scopes, R. K. 1982. Protein Purification Principles and Practices. Springer-Verlag, New York.
- Soendoro, S. 1989. Prinsip-prinsip Biokimia Edisi Kedua. Terjemahan. Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Somers, W., J. Visser, F. M. Rombouts dan K. Van't Rief. 1989. Developments in Downstream Processing of (Poly) Saccharide Converting Enzymes. Journal of Biotechnology, 11 (1989) : 199 - 222.
- Tagawa, K. dan A. Kaji. 1988. Polygalacturonase From *Corticium rolfsii*. Di dalam Kellogg dan Wood. Methods in Enzymologi Vol. 161 Biomass Part B : Lignin, Pectin dan Chitin. Academic Press Inc., California.
- Suhartono, M.T. 1989. Enzim dan Bioteknologi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi, IPB, Bogor.
- Urquhatt, D.H. 1961. Cacao. Lonsmans, New York.
- Wimborne, M. P. dan P. A. D. Rickard. 1977. Pectinolytic Activity of *Saccharomyces fragilis* Cultured in Controlled Enviroments. Accepted for Publication July 11, 1977 : 231 - 242

Winarno, F. G. 1980. Enzim Pangan. PUSBANGTEPA, IPB, Bogor.

Winarno, F. G. 1991. Kimia Pangan dan Gizi. Gramedia, Jakarta.

Lampiran

Penyiapan Larutan Elektroforesis SDS-PAGE

1. Stock buffer stacking (0,5 M Tris HCl pH 6,8)

Stock buffer stacking dibuat dengan melarutkan 6,0 gram tris dalam 40 ml aquades dan dititrasi dengan 1 M HCl sampai pH-nya 6,8, kemudian ditambahkan aquades hingga volumenya menjadi 100 ml. Larutan kemudian disaring dengan kertas saring whatman no 1 dan disimpan pada ruang dengan suhu 4 °C.

2. Stock buffer gel pemisah (3,0 M Tris-HCl pH 8,8)

Stock buffer gel pemisah dibuat dengan cara mencampurkan 36,3 gram Tris dan 48 ml 1 M HCl dan kemudian dijadikan 100 ml dengan penambahan aquades. Selanjutnya disaring dengan kertas saring Whatman no 1 dan disimpan pada suhu 4 °C.

3 Stock buffer reservoir (0,25 M Tris, 1,92 M glycine, 1% SDS; pH 8,3).

Stock buffer reservoir dibuat dengan mencampurkan 30,3 gram Tris, 144,0 gram glycine dan 10 gram SDS yang dilarutkan dan kemudian dijadikan 1 liter dengan penambahan aquades. Selanjutnya larutan disimpan pada suhu 4 °C.

4. Buffer untuk sampel

Larutan buffer untuk sampel disiapkan dengan cara mencampurkan 0.1 M Tris-HCl pH 6.8 sebanyak 64 ml, 10% larutan SDS 20 ml, 2-Mercaptoetanol 5 ml, glycerol 10 ml dan 0.2% Bromofenol biru 1 ml. Larutan buffer tersebut disimpan pada suhu 4 °C dalam botol yang gelap.

5. Larutan pewarna protein

Larutan pewarna protein disiapkan dengan cara mencampurkan 0.5 gram Coomasie Blue R-250, 417 ml isopropanol, 416 ml asam asetat glasial 7%, dan 167 ml aquades. Campuran tersebut kemudian disaring dengan kertas saring Whatman no. 1.

6. Larutan peluntur warna

Larutan peluntur warna disiapkan dengan mencampurkan 125 ml isopropanol, 100 ml asam asetat glasial 7%, dan 775 ml aquades.