

KEMAMPUAN RHAMNOSIDASE DARI ISOLAT KAPANG UNTUK HIDROLISIS NARINGIN JERUK SIAM

Ermi Sukasih, Winda Haliza, Endang Yuli Purwani, Iceu Agustinisari dan Setyadjit

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian,
Jl. Tentara Pelajar 12 A Bogor
e-mail :bb_pascapanen@litbang.deptan.go.id, bb_pascapanen@cbn.net.id

Rasa pahit pada olahan buah jeruk seperti jus dapat mengurangi preferensi konsumen. Saat ini enzim yang dapat mengurangi rasa pahit pada jeruk masih sulit diperoleh secara komersial. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi, memproduksi kapang dan menguji aktivitas enzim rhamnosidase yang dihasilkan. Isolasi kapang dilakukan terhadap sampel kulit, pulp dan jus jeruk Siam yang telah rusak. Seleksi dilakukan dengan metode *plating* menggunakan dua media yaitu RB dan G19. Ada lima isolat kapang penghasil enzim rhamnosidase yang berhasil diidentifikasi yakni: *Penicillium brefeldianum*, *Penicillium restrictum*, *Aspergillus niger* Rha-ase B, *Aspergillus niger* Rha-ase F dan *Aspergillus niger* Rha-ase H. Aktivitas spesifik enzim rhamnosidase maksimum dari kelima isolat kapang tersebut berturut-turut adalah: 189,34 U/mg protein, kultivikasi hari ke-7; 186,82 U/mg protein, kultivikasi hari ke-5; 456,18 U/mg protein, kultivikasi hari ke-6; 159,38 U/mg protein, kultivikasi hari ke-6 dan 386,63 U/mg protein, kultivikasi hari ke-2. Filtrat enzim rhamnosidase dari kapang *A.niger* Rha-ase H mempunyai kemampuan terbesar menurunkan kadar naringin pada larutan naringin konsentrasi 1000 µg/ml dengan waktu kontak tiga jam yaitu sebesar 40,97 %.

Kata kunci: jeruk siam, kapang perusak jeruk, rhamnosidase, naringin

ABSTRACT. Ermi Sukasih, Winda Haliza, Endang Yuli Purwani, Iceu Agustinisari and Setyadjit. 2008. Effectivity of rhamnosidase from fungi isolate on hydrolisis of naringin from siam citrus. Bitterness at many Siam citrus products like juice will decrease of consumer preferences. Now, enzyme that is able to reduce bitterness is difficult to be found commercially. The objectives of research were to isolate of mold, to produce and to know enzyme rhamnosidase activity from mold isolate. Isolation of mould was conducted at sample from skin of Siam, citrus juice and pulp which have been destroyed. Selection was conducted by plating method used two media that were RB and G19. There were 5 identified isolates mould that produce rhamnosidase enzyme, namely: *Penicillium brefeldianum*, *Penicillium restrictum*, *Aspergillus niger* Rha-ase B, *Aspergillus niger* Rha-ase F and *Aspergillus niger* Rha-ase H. %. The maximum specific activity of rhamnosidase enzyme for 5 isolates as follows : 189.34 U / protein mg for 7th day cultivation; 186.82 U / protein mg for 5th day cultivation; 456.18 U / protein mg for 6th day cultivation; 159.38 U / protein mg for 6th day cultivation and 386.63 U / protein mg for 2nd day cultivation. To 3h contact at room temperature, rhamnosidase enzyme crude from *A.niger* Rha-ase H the biggest ability degrade 1000 µg/ml naringin concentration that is equal to 40.97%.

Keywords: siam citrus, citrus mold spoiled, rhamnosidase, naringin

PENDAHULUAN

Salah satu kendala dalam pengolahan buah jeruk Siam adalah munculnya rasa pahit pada produk olahan yang dihasilkan. Pemicu munculnya rasa pahit adalah karena adanya senyawa limonin yang tergolong kelompok limonoid dan naringin yang tergolong flavonoid. Dua senyawa tersebut pada jeruk segar masih berupa prekursor yang belum memiliki rasa pahit. Pada beberapa jenis jeruk, komposisi naringin lebih besar daripada limonin. Pada jeruk Siam Pontianak, kadar naringin mencapai 233,66 mg/l. Jumlah ini jauh lebih besar dari limonin yang hanya 13,7 µg/l (Setyadjit *et al.*, 2006). Naringin banyak terdapat di jaringan buah dengan struktur kimia 7-(2-ramnosido-beta-glukosida) ini mempunyai sifat larut dalam air dan kelarutannya meningkat secara asimtotik dengan kenaikan suhu. Selain itu, naringin juga stabil pada pemanasan. Dengan sifat tersebut sangat memungkinkan naringin

tereksrak dari jaringan buah maupun partikel-partikel *pulp* dalam jus jeruk dan selama pasteurisasi atau penyimpanan akan mengakibatkan meningkatnya kepahitan jus (Braddock, 1999).

Rasa pahit pada olahan buah jeruk seperti jus sampai saat ini belum dapat dihilangkan melainkan hanya bisa dikurangi. Pengurangan rasa pahit pada jeruk dapat dimulai sejak pra panen dengan pemberian *Gibberelic Acid*. Cara yang dilakukan antara lain adalah dengan pemberian resin, ataupun dengan penambahan reagen kimia untuk mengikat limonin seperti styrene divinilbenzene (Puri, 1984 *di dalam* Braddock, 1999). Penelitian selanjutnya menyatakan bahwa Amberlite IR 400 dan Amberlite IR 120 digunakan sebagai perlakuan untuk pengurangan rasa pahit dan asam pada jus jeruk jenis *grapefruit* lokal (Mishra dan Kar, 2003).

Salah satu cara untuk mengurangi rasa pahit pada jus jeruk adalah dengan cara fisiologis yaitu dengan mendedah (*expose*) gas asetilen maupun ethrel pada jeruk

beberapa jam sebelum diproses, selain itu bisa juga dengan cara menyemprotkan ethrel tersebut pada buah jeruk. Hasil penelitian Setyadjit *et al.*, (2006) menyebutkan bahwa konsentrasi gas asetilen 1500 ppm dengan waktu kontak 3 jam secara sensoris mampu menurunkan rasa pahit jeruk Siam Pontianak dari skor awal 1 (pahit) menjadi 0,1.

Selain itu rasa pahit pada jus jeruk dapat dikurangi dengan teknik ultrafiltrasi yang dikombinasikan dengan adsorpsi menggunakan Amberlite XAD-16 (Lee dan Kim, 2003). Alternatif lain adalah dengan menggunakan enzim. Penggunaan enzim untuk mengatasi rasa pahit pada jus jeruk mulai dicoba dengan menggunakan enzim yang berasal dari *Pseudomonas sp.*, yaitu *Limonate Oxidoreductase* (Hasegawa *et al.*, 1975 di dalam Braddock, 1999). Penelitian lainnya menggunakan enzim kompleks dari *Corynebacterium fascian* yang dapat memetabolisme limonin dan nomilin (Hasegawa *et al.*, 1985). Enzim naringinase yang diimobilisasi dengan sodium alginate mengurangi rasa pahit pada jus *Kinnow* (Puri *et al.*, 1996). Menurut Soares dan Hotchkiss (2000), enzim a-L-rhamnosidase dapat digunakan untuk mengurangi rasa pahit pada jus *grapefruit* dengan menghidrolisis komponen naringin. Hasil penelitian Scaroni *et al.* (2002) menyebutkan enzim a-L-rhamnosidase dapat menghidrolisis larutan naringin jenuh (*supersaturated naringin solution*). Enzim yang dihasilkan oleh *Fusarium sambucinum* 310 ini menunjukkan aktivitas yang baik pada pH 10. Filtrat enzim rhamnosidase merupakan enzim ekstraseluler karena telah dipisahkan dari miselia kapangnya.

Menurut Zverlov *et al.*, (2000), hidrolisis naringin oleh rhamnosidase akan menghasilkan rhamnosa dan prunin. Prunin yang sedikit pahit dapat dihidrolisis lebih lanjut oleh beta-glukosidase menjadi naringinin dan glukosa. Naringinin merupakan isomer dari naringin yang tidak berasa pahit. Diharapkan terjadi hal yang serupa pada jus jeruk Siam, filtrat enzim rhamnosidase dapat menghidrolisis naringin menjadi senyawa-senyawa yang tidak pahit sehingga rasa pahit pada jus akan turun.

Saat ini enzim yang dapat mengurangi rasa pahit pada jeruk masih sulit diperoleh secara komersial. Padahal negara Indonesia kaya akan keanekaragaman hayati, termasuk buah jeruk Siam yang melimpah di Kalimantan Barat dan mikroorganisme yang belum tereksplorasi. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi, memproduksi kapang pada skala laboratorium dan menguji aktivitas terhadap enzim rhamnosidase yang dihasilkan.

BAHENDAN METODE

Penelitian dilakukan sejak bulan Juli 2006 sampai dengan Februari 2007 di laboratorium Balai Besar Litbang

Pascapanen Pertanian. Identifikasi isolat kapang dilakukan di laboratorium Balitvet Bogor. Penelitian meliputi tiga tahapan kegiatan, pertama adalah isolasi, seleksi dan identifikasi kapang dari komponen jeruk Siam, tahap kedua adalah produksi kapang dan uji aktivitas enzim rhamnosidase yang dihasilkan dan tahap ketiga adalah hidrolisis naringin oleh filtrat enzim rhamnosidase yang dihasilkan.

A. Isolasi, Seleksi, dan Identifikasi Kapang (Daulay, 1989, Scaroni *et al.*, 2002, Barnett *et al.*, 2000).

Kapang diisolasi dari sampel jus, ampas dan kulit jeruk yang sudah rusak. Sebanyak 1 kg jeruk Siam Pontianak dipisahkan komponennya yang terdiri dari kulit, ampas dan cairan (jus). Masing-masing ditempatkan dalam gelas piala 250 ml lalu dibiarkan pada suhu kamar selama 4 hari hingga rusak. Tanda-tanda kerusakan adalah sampel berbau busuk dan ditumbuhi kapang. Kulit dan ampas tersebut dihancurkan dengan pisau lalu masing-masing diambil 10 g, sementara untuk jus diambil sebanyak 10 ml. Setiap sampel secara terpisah dimasukkan ke dalam 90 ml larutan pengencer NaCl 0,85% steril. Sebanyak 1 ml cairan dari masing-masing sampel diambil dan dimasukkan dalam cawan petri steril kemudian dituangkan media PDA dan diinkubasi pada suhu kamar selama dua hari. Koloni kapang yang tumbuh dari ketiga sampel diambil dengan menggunakan ose secara aseptis dan dipindahkan ke cawan yang berisi PDA beku dan dilakukan gores kuadran. Gores kuadran dilakukan sebanyak tiga kali untuk mendapatkan kultur murni. Cara ini dilakukan untuk setiap jenis koloni kapang yang berbeda. Setelah diperoleh kultur kapang murni selanjutnya dibuat agar miring untuk masing-masing kultur dan diberi kode kultur sebagai stok. Kultur stok disegarkan terlebih dahulu setiap kali digunakan.

Isolat murni ditumbuhkan dalam media seleksi RB dan G18 (Scaroni *et al.*, 2002) yang mengandung rhamnosa sebagai sumber karbon. Komposisi media RB untuk satu liter adalah: 10 g rhamnosa, 5 g pepton, 1 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g agar, dan 0,5 ml rose bengal 5%. Sedangkan satu liter media G18 mengandung 10 g rhamnosa, 5 g pepton, 1 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g agar dan 220 ml gliserol. Sebagai pendahuluan dilakukan seleksi kapang dengan metode gores langsung pada media agar miring dan dilanjutkan dengan metode tuang (*plating*). Seleksi kapang dengan metode gores langsung dilakukan sebagai berikut: Media RB dan media G18 disiapkan dan masing-masing dituangkan kira-kira sebanyak 10 ml ke dalam tabung reaksi bertutup, lalu di sterilisasi dan didinginkan dalam posisi miring sampai media membeku. Spora kapang dari kultur stok diambil secara aseptis (menggunakan ose) dan digoreskan secara zig zag pada permukaan media agar miring kemudian

diinkubasi pada suhu kamar selama dua hari. Kapang yang mampu tumbuh dalam media ini diduga merupakan kapang yang memiliki enzim rhamnosidase.

Cara seleksi isolat kapang dengan metoda *plating* adalah sebagai berikut: isolat kapang dari kultur stok yang telah berumur 7 hari dipanen sporanya. Sebanyak 1 ml suspensi spora dituangkan ke dalam cawan petri steril kemudian dituangkan media dan diinkubasi selama 2 hari. Dua macam media (RB dan G18) digunakan sebagai media seleksi. Beberapa kapang mampu mengubah media seleksi yang awalnya berwarna merah menjadi berwarna bening pada media seleksi RB. Isolat kapang yang mampu menghasilkan zona bening diduga memiliki aktivitas rhamnosidase yang kuat. Sebagai kontrol digunakan media RB dan G18 yang mengandung glukosa sebagai sumber karbon. Identifikasi kapang dilakukan dengan melihat morfologinya melalui *slide culture* berpedoman pada metode Barnett (2000).

B. Produksi Enzim Rhamnosidase (Scaroni *et al.*, 2002)

Sebanyak 0,2 ml suspensi berisi sekitar spora 10^6 spora kapang dimasukkan ke dalam erlenmeyer berisi 20 ml medium cair. Tiap liter medium mengandung : rhamnose 5 g, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 5 g, K_2HPO_4 1,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, KCl 0,5 g, *Yeast Extract* 5 g dan 1 ml mikro element. Masing-masing isolat dibuat sebanyak 7 buah untuk 7 hari pengamatan.

Medium diinkubasi pada suhu 37°C pada inkubator goyang dengan kecepatan 150 rpm dan setiap hari diambil sampel. Untuk memisahkan antara padatan (miselia) dan cairan (filtrat enzim) dari medium adalah dengan cara sentrifugasi (5000 rpm, 5 menit). Miselia ditimbang dan filtrat enzim diuji aktivitasnya. Percobaan ini diulang sebanyak dua kali.

C. Pengukuran Aktivitas Filtrat Enzim (Romero *et al.*, 1985)

Aktivitas rhamnosidase diuji pada substrat pNPR (para-Nitro Phenol Rhamnosa). Sampel terdiri dari campuran 0,5 ml substrat 3,5 mM, 0,5 ml filtrat enzim, 0,5 ml bufer potasium hidrogen phthalate-HCl pH 3,5 diinkubasi pada suhu 57°C selama 1 jam, lalu ditambahkan 2 ml NaOH 1M dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400 nm. Untuk kontrol dilakukan cara yang sama, hanya saja filtrat enzim ditambahkan setelah penambahan larutan NaOH 1M. Sebagai standar digunakan p-Nitrophenol. Satu unit aktivitas rhamnosidase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang membebaskan 1 mmol p-nitrophenol pada suhu 57°C dan pH 3,5. Kadar protein terlarut dihitung dengan menggunakan metode Lowry *et al.* (1951) dengan BSA (Bovine Serum Albumin) sebagai standar pada konsentrasi 0 s/d 100 mg/ml.

Cara perhitungan :

$$\text{Aktivitas enzim (U/ml)} = \frac{(\text{Abs sampel} - \text{Abs kontrol}) \times \text{fk}}{60 \times \text{BM} \text{ p-nitrophenol} \times \text{ml enzim}}$$

$$\text{Aktifitas spesifik (U/mg protein)} = \frac{\text{aktivitas enzim}}{\text{mg protein}}$$

D. Hidrolisis Naringin oleh Filtrat Enzim Rhamnosidase (Riberiro *et al.*, 2002 ; Abassi *et al.*, 2005)

Filtrat enzim rhamnosidase dari masing-masing isolat kapang dikontakkan dengan larutan naringin pada berbagai konsentrasi yakni 200, 400, 600, 800 dan 1000 mg/ml. Sebanyak 0,5 ml filtrat enzim ditambahkan ke dalam 1 ml larutan naringin kemudian dikocok dengan *vortex* dan diinkubasi selama satu, dua, tiga dan empat jam pada suhu kamar. Untuk menghindari terjadinya pengendapan naringin, inkubasi atau kontak enzim rhamnosidase dengan larutan naringin dilakukan dalam *shaker* dengan agitasi 100 rpm. Campuran enzim rhamnosidase dengan larutan naringin selanjutnya disebut larutan sampel. Setelah masa inkubasi/kontak tercapai, sebanyak 0,1 ml larutan sampel diambil kemudian dipindahkan ke tabung reaksi lain lalu ditambah dengan 0,1 ml NaOH 4 N dan 10 ml *diethylene glycol* dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu kamar. Setelah itu diukur abasorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 μm . Kontrol dibuat dengan mengganti filtrat enzim dengan aquabidest dengan jumlah yang sama.

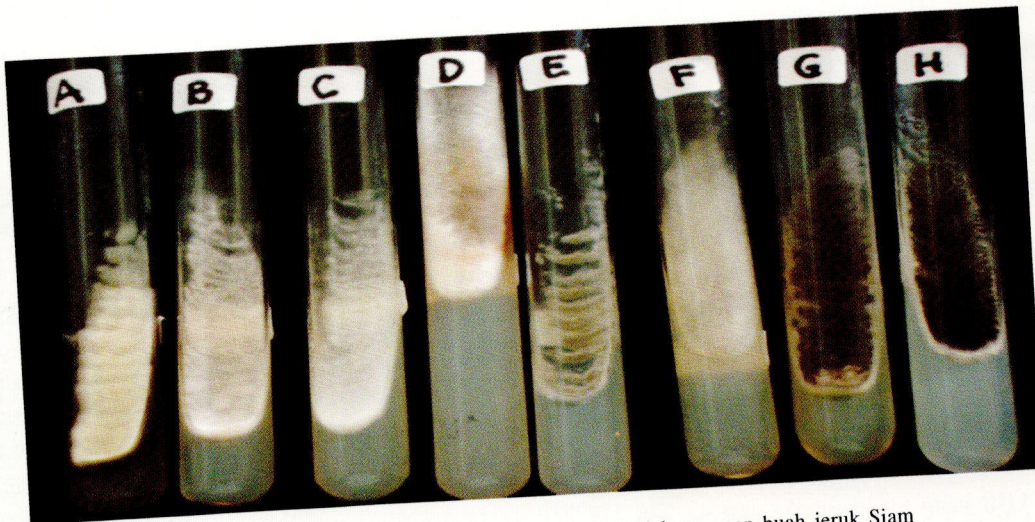
Kurva standar dibuat dengan prosedur yang sama pada konsentrasi naringin 100 sampai dengan 1000 mg/ml selang 100 mg/ml. Nilai absorbansi diplotkan dengan kadar naringin hingga diperoleh persamaan kurva standarnya. Persentase penurunan kadar naringin adalah konsentrasi naringin awal dikurangi dengan konsentrasi naringin akhir dibagi dengan konsentrasi naringin awal dikalikan 100 persen.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi , Seleksi dan Identifikasi Isolat Kapang Penghasil Enzim Rhamnosidase

Isolasi kapang dari komponen jeruk pada cawan petri menghasilkan berbagai macam bentuk dan warna koloni. Setelah dilakukan gores kuadran diperoleh 12 isolat kapang. Secara visual dilakukan seleksi awal untuk mengeliminasi isolat yang mempunyai penampakan koloni sama sehingga hanya diperoleh 8 isolat sebagai kultur stok. Isolat-isolat kapang hasil isolasi dari komponen jeruk dapat dilihat pada Gambar 1.

Isolat-isolat kapang ini selanjutnya diberi kode A, B, C, D, E, F, G dan H untuk membedakannya. Isolat kapang



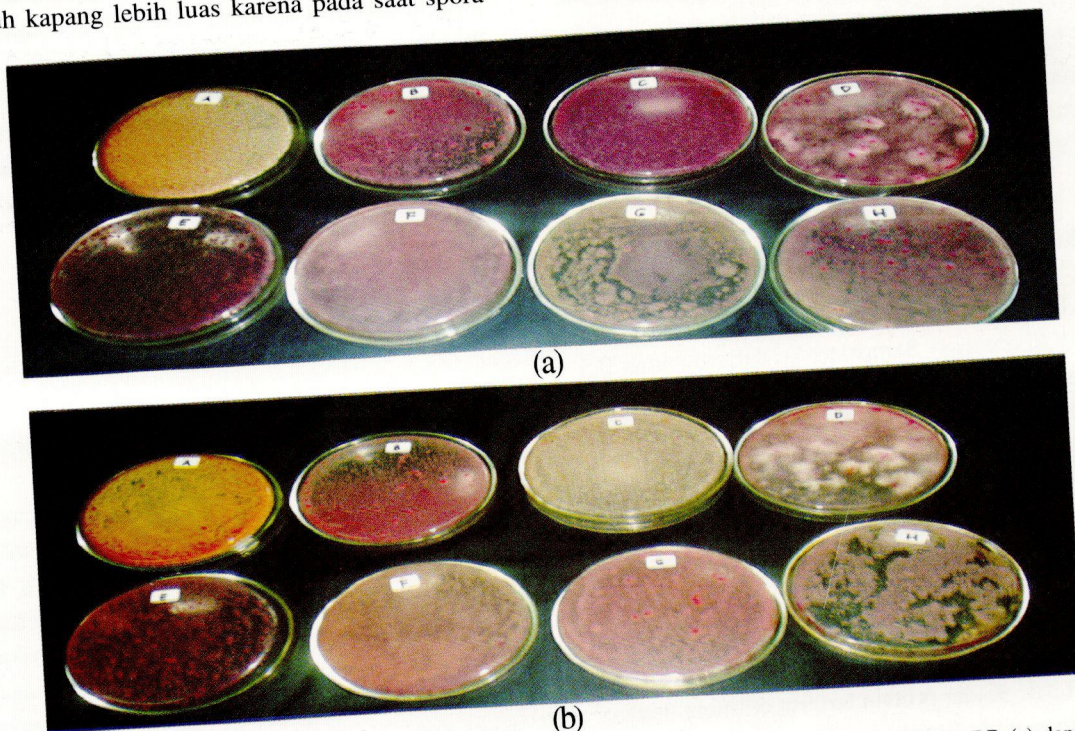
Gambar 1. Isolat-isolat kapang yang diisolasi dari komponen buah jeruk Siam
 Figure 1. Molds isolate from Siam citrus component

A mempunyai warna koloni coklat muda, isolat kapang B berwarna hijau, isolat kapang C berwarna putih, isolat kapang D berwarna coklat tua, isolat kapang E berwarna hijau tua, isolat kapang F berwarna putih membentuk masa seperti kapas, isolat kapang G dan H berwarna hitam.

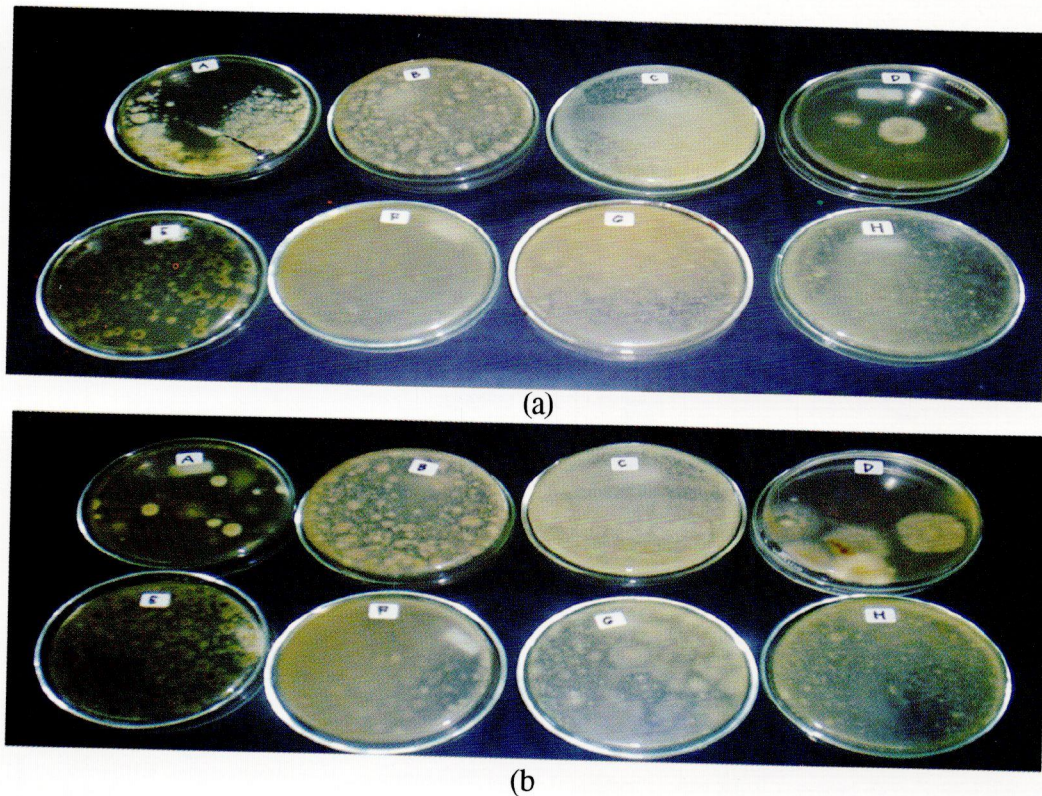
Seleksi isolat kapang dengan metode gores langsung pada media agar miring menghasilkan pertumbuhan isolat kapang yang kurang optimal sehingga dilakukan seleksi dengan metode tuang (*plating*). Seleksi dengan metode gores langsung menyebabkan area untuk tumbuh kapang relatif sempit karena pada saat kapang digoreskan, media sudah dalam bentuk beku, sementara dengan metode tuang area tumbuh kapang lebih luas karena pada saat spora

kapang ditanam media masih dalam bentuk cair dan digoyang.

Hasil pengamatan seleksi dengan metode tuang menunjukkan bahwa semua isolat kapang mampu tumbuh di permukaan cawan baik pada media seleksi dengan sumber karbon rhamnosa maupun pada media kontrol dengan sumber karbon glukosa seperti yang terlihat pada Gambar 2,3 dan Tabel 1. Kemampuan isolat kapang tumbuh pada media kontrol diduga karena kapang tersebut tidak bersifat spesifik, artinya kapang tersebut tidak hanya menghasilkan enzim rhamnosidase saja namun diduga menghasilkan enzim-enzim yang lain. Hal ini dapat dilihat bahwa selain mampu memecah rhamnosa juga dapat



Gambar 2. Hasil seleksi isolat kapang dari komponen jeruk yang telah rusak melalui plating dengan media RB (a) dan RB' (b)
 Figure 2. Molds isolate selection yield from spoiled citrus component by plating with RB (a) and RB' medium (b)



Gambar 3. Hasil seleksi isolat kapang dari komponen jeruk yang telah rusak melalui plating dengan media G18 (a) dan G18' (b)
 Figure 3. Molds isolate selection yield from spoiled citrus component by plating with G18 (a) and G18' medium

memecah glukosa sebagai sumber karbonnya. Menurut Puri *et al.*, (2005) produksi *A.niger* untuk menghasilkan enzim naringinase dapat menggunakan media dengan bermacam-macam sumber karbon seperti glukosa, rhamnosa, sukrosa dan lain-lain.

Selain dapat tumbuh pada media RB, beberapa isolat kapang mampu mengubah warna media dari merah menjadi bening. Isolat kapang yang mampu menghasilkan zona bening menandakan bahwa ada indikasi kapang

Tabel 1. Pembentukan zona bening oleh aktivitas enzim rhamnosidase melalui metode plating dengan media RB dan media G18

Table 1. The formed of clear zone by rhamnosidase enzym through plating method with RB and G18 medium

Isolat Isolate	Media RB RB medium	Media G18 G18 medium
A	**	-
B	*	-
C	-	-
D	*	-
E	-	-
F	*	-
G	-	-
H	*	-

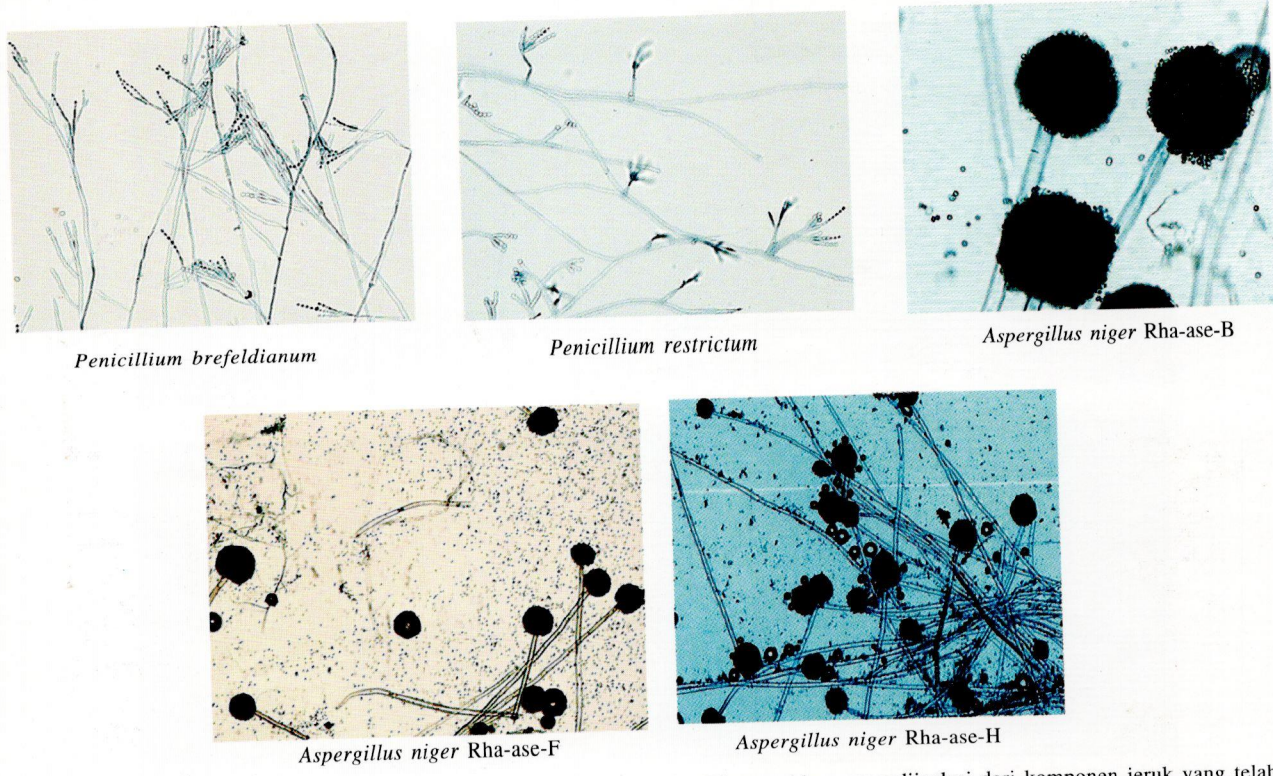
Keterangan/Remarks ** = ada zona bening yang luas/ There were clear zone widely, * = ada zona bening sedikit / There were clear zone narrowly, - = tidak ada zona bening / There wasn't clear zone

mampu menggunakan substrat dalam media dan ini diduga adalah aktivitas enzim.

Hasil pengamatan terhadap seleksi kapang penghasil enzim rhamnosidase menunjukkan bahwa isolat kapang A, B D,F dan H mampu menghasilkan zona bening pada media seleksi RB, sedangkan pada media seleksi G18 tidak dapat dilihat zona beningnya karena media G18 sendiri berwarna bening. Kemampuan isolat untuk memproduksi enzim rhamnosidase diverifikasi dengan menumbuhkannya di dalam media cair dan menguji aktivitas enzim rhamnosidase.

Identifikasi kelima isolat penghasil enzim rhamnosidase, isolat A adalah *Penicillium brefeldianum*, isolat D adalah *Penicillium restrictum*. Isolat B, F dan H diidentifikasi sebagai *Aspergillus niger*. Untuk membedakannya masing-masing isolat dinamakan *Aspergillus niger* Rha-ase-B, *Aspergillus niger* Rha-ase-F dan *Aspergillus niger* Rha-ase-H. Foto mikroskopis kelima isolat disajikan pada Gambar 4.

Beberapa hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa kapang lebih dominan menghasilkan enzim rhamnosidase daripada bakteri. Genus kapang yang sama diperoleh dari hasil penelitian Manzanares *et al.*, (2001) yaitu *Aspergillus* dan *Penicillium*. Selanjutnya disebutkan bahwa kedua genus kapang tersebut potensial menghasilkan enzim rhamnosidase. Gallego *et al.*, (2000) menyebutkan beberapa spesies dari *Aspergillus* penghasil



Gambar 4. Gambar mikroskopik beberapa isolat kapang penghasil enzim Rhamnosidase yang diisolasi dari komponen jeruk yang telah rusak (perbesaran 100 x)
 Figure 4. The microscopic pictures of several molds isolate that produced rhamnosidase enzyme isolated from spoiled citrus component at 100 x magnifying.

enzim rhamnosidase antara lain adalah *Aspergillus nidulans* dan *Aspergillus aculeatus*, spesies kapang tersebut berbeda dengan spesies kapang hasil penelitian ini. Sementara itu hasil penelitian Monti et al., (2004) menunjukkan spesies yang sama yaitu *Aspergillus niger* sebagai kapang penghasil enzim rhamnosidase, sementara itu dari genus *Penicillium* adalah *Penicillium oxalicum*.

B. Produksi dan Uji Aktivitas Filtrat Enzim Rhamnosidase Beberapa Isolat Kapang

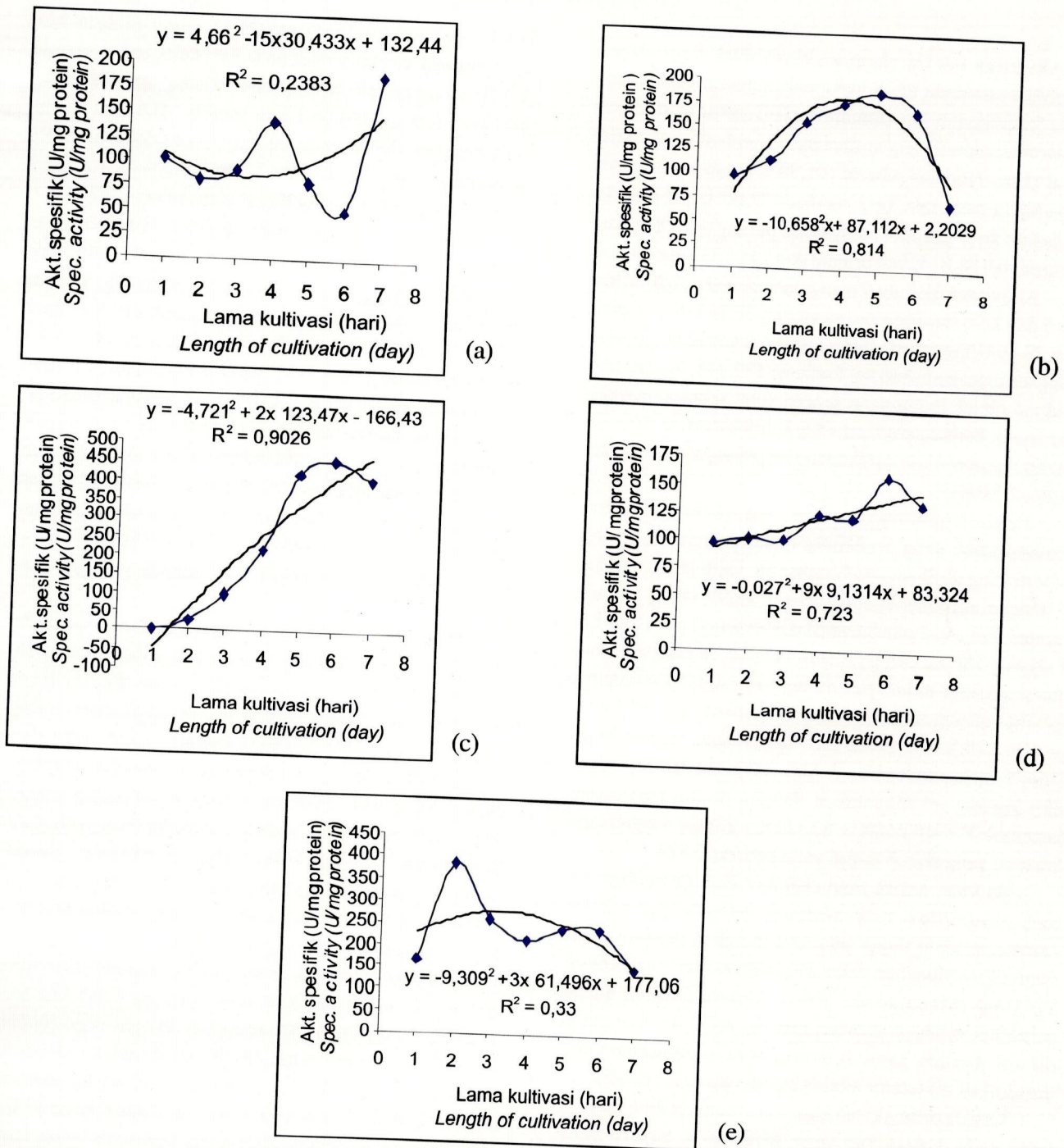
Produksi kapang penghasil enzim rhamnosidase menghasilkan endapan miselia kapang dan filtrat enzim. Berat endapan hasil produksi dari kapang-kapang tersebut disajikan pada Tabel 2. *Penicillium brefeldianum*

mempunyai berat miselia tertinggi pada hari ke-7 sebesar 2,1389 g, *Aspergillus niger* Rha-ase-B dan *Penicillium restrictum* pada hari ke-5 masing-masing sebesar 0,6151 g dan 0,2531 g, *Aspergillus niger* Rha-ase-F pada hari ke 6 sebesar 0,8088 g dan *Aspergillus niger* Rha-ase-H pada hari ke-3 sebesar 0,3317 g.

Berat endapan miselia kapang memiliki hubungan dengan pencapaian aktivitas optimal dari enzim rhamnosidase, terjadi pada *Penicillium* sp. Yaitu *Penicillium brefeldianum* dan *Penicillium restrictum* serta pada *A niger* Rha-ase F. Tabel 2 menunjukkan bahwa berat miselia tertinggi dari ketiga kapang tersebut berkorelasi dengan pencapaian aktivitas rhamnosidase tertinggi yaitu berturut-turut adalah pada hari ke-7, ke-5 dan ke-6 (Gambar

Tabel 2. Berat endapan miselia beberapa isolat kapang penghasil enzim rhamnosidase yang diisolasi dari komponen jeruk yang telah rusak.
 Table 2. The weight of miselia precipitation from several of molds isolate that produced rhamnosidase enzyme isolated from spoiled citrus component

Hari Produksi Production days	<i>Penicillium brefeldianum</i> (g)	<i>Penicillium restrictum</i> (g)	<i>Aspergillus niger</i> Rha-ase-B (g)	<i>Aspergillus niger</i> Rha-ase-F (g)	<i>Aspergillus niger</i> Rha-ase-H (g)
1	0,3257	0,0402	0,2732	0,0682	0,2048
2	0,7341	0,0493	0,3632	0,4101	0,2381
3	1,2403	0,1572	0,5605	0,4302	0,3317
4	1,6067	0,1528	0,5350	0,4980	0,2703
5	0,7634	0,2531	0,6151	0,6326	0,2461
6	0,7958	0,2114	0,5180	0,8088	0,2990
7	2,1389	0,1935	0,4724	0,6393	0,2402



Gambar 5. Karakteristik aktivitas enzim rhamnosidase yang dihasilkan oleh beberapa isolat kapang yang diisolasi dari komponen jeruk yang telah rusak: (a) *Penicillium brefeldianum*, (b) *Penicillium restrictum*, (c) *Aspergillus niger* Rha-ase-B, (d) *Aspergillus niger* Rha-ase-F dan (e) *Aspergillus niger* Rha-ase-H

Figure 5. The activity characteristic of rhamnosidase enzyme produced at various mold isolate which isolated from rotten citrus component: (a) *Penicillium brefeldianum*, (b) *Penicillium restrictum*, (c) *Aspergillus niger* Rha-ase-B, (d) *Aspergillus niger* Rha-ase-F and (e) *Aspergillus niger* Rha-ase-H.

5a, 5b dan 5d). Namun demikian tidak terjadi pada *Aspergillus niger* Rha-ase-B dan *Aspergillus niger* Rha-ase-H. Berat endapan tertinggi diperoleh berturut-turut pada hari ke-5, dan ke-3, sedangkan aktivitas optimum enzimnya berturut-turut dicapai pada hari ke-6 (Gambar 5c), dan ke-2 (Gambar 5e). Setiap jenis kapang mempunyai berat miselia maksimum yang spesifik. Hal ini terkait dengan pola pertumbuhan kapang. Berat miselia maksimum

menunjukkan fase logaritma (puncak pertumbuhan) kapang yang selanjutnya akan mengalami penurunan. Aktivitas enzim rhamnosidase dinyatakan dalam aktivitas spesifik yaitu aktivitas enzim dibagi dengan kadar protein terlarutnya.

Enzim rhamnosidase dari kapang yang diisolasi dari komponen buah jeruk yang telah rusak memiliki pola aktivitas yang berbeda-beda seperti terlihat pada Gambar

5. Aktivitas enzim rhamnosidase dari *Penicillium brefeldianum* pada tujuh hari pengamatan menunjukkan pola ketidakstabilan dimana terjadi peningkatan dan penurunan seperti terlihat pada Gambar 5a. Aktivitas awal (hari -1) adalah sebesar 101,98 U/mg dan mengalami penurunan pada hari ke-2 menjadi 79,06 U/mg protein. Pada hari ke-3 dan ke-4 mengalami peningkatan berturut-turut adalah 88,81 U/mg protein dan 141,23 U/mg protein.

Aktivitas ini kembali mengalami penurunan pada hari ke-5 dan ke-6 masing-masing adalah 77,76 U/mg protein dan 49,46 U/mg protein dan mengalami kenaikan aktivitas yang tertinggi pada hari ke-7 sebesar 189,34 U/mg protein. Diduga faktor lingkungan seperti suhu selama produksi dan assay berpengaruh terhadap ketidakstabilan aktivitas enzim rhamnosidase dari kapang ini (Mangunwidjaya dan Suryani, 1994).

Penicillium restrictum memiliki aktivitas rhamnosidase yang cenderung meningkat secara teratur seperti yang terlihat pada Gambar 5b, yaitu mulai hari ke-1 dengan aktivitas enzim sebesar 96,99 U/mg protein sampai mencapai puncak aktivitas tertinggi pada hari ke-5 sebesar 186,82 U/mg protein. Namun, setelah hari ke-6 dan seterusnya terjadi penurunan yang signifikan dimana masing-masing terjadi penurunan sebesar 165,87 U/mg protein pada hari ke-6 dan aktivitas terendah sebesar 68,96 U/mg protein pada hari ke-7. Aktivitas enzim rhamnosidase dari kapang ini dinyatakan dengan model persamaan kuadrat $Y = -10,658X^2 + 87,112X + 2,2029$ dengan nilai korelasi yang cukup tinggi yaitu sebesar 0,814.

Aktivitas enzim rhamnosidase dari *Penicillium sp.* baik *Penicillium brefeldianum* maupun *Penicillium restrictum* lebih tinggi bila dibandingkan dengan genus *Penicillium* yang lain yakni *Penicillium oxalicum* sebesar 8,3 U/ml (Monti et al., 2004). Aktivitas enzim dalam penelitian ini adalah aktivitas spesifik, yakni aktivitas enzim dibagi dengan jumlah proteinnya sedangkan yang dinyatakan diliteratur adalah bukan aktivitas spesifik.

Terjadi peningkatan aktivitas rhamnosidase lainnya yaitu pada *Aspergillus niger* Rha-ase-B. Seperti yang terlihat pada Gambar 5c, pada hari ke-1 belum terlihat adanya aktivitas rhamnosidase yang ditunjukkan dengan nilai aktivitas enzim sebesar 0, kemudian setelah hari ke-2 dan seterusnya terjadi peningkatan dengan aktivitas maksimum terjadi pada hari ke-6 sebesar 456,18 U/mg protein. Selanjutnya, penurunan aktivitas baru terlihat pada hari ke-7 sebesar 407,54 U/mg protein. Aktivitas enzim rhamnosidase dari kapang ini dinyatakan dengan model persamaan kuadrat $Y = -4,7212X^2 + 123,47X - 166,43$ dengan nilai korelasi yang tinggi yaitu sebesar 0,9026

Aktivitas rhamnosidase *Aspergillus niger* Rha-ase-F menunjukkan pola peningkatan yang tidak teratur seperti terlihat pada Gambar 5d, dimana umumnya aktivitas rhamnosidase cenderung meningkat mulai dari aktivitas

awal pada hari ke-1 sebesar 96,41 U/mg protein dan aktivitas maksimum terjadi pada hari ke-6, yaitu sebesar 159,38 U/mg protein. Selanjutnya terjadi penurunan pada hari ke-7 sebesar 134,06 U/mg protein. Aktivitas enzim rhamnosidase dari kapang ini dinyatakan dengan model persamaan kuadrat $Y = -0,0279X^2 + 9,1314X + 83,324$ dengan nilai korelasi yang tinggi yaitu sebesar 0,723.

Berbeda dengan pola aktivitas rhamnosidase lainnya, aktivitas *Aspergillus niger* Rha-ase-H cenderung menurun. Seperti terlihat pada Gambar 5e, terjadi peningkatan tajam aktivitas rhamnosidase dari hari ke-1 sebesar 185,88 U/mg protein menjadi sebesar 386,63 U/mg protein pada hari ke-2 yang merupakan aktivitas maksimum rhamnosidase *Aspergillus niger* Rha-ase-H. Selanjutnya mulai hari ke-3 sampai hari ke-7 terjadi penurunan dengan aktivitas rhamnosidase terendah pada hari ke-7, yaitu sebesar 149,45 U/mg protein. Aktivitas enzim rhamnosidase dari kapang ini dinyatakan dengan model persamaan kuadrat $Y = -9,3093X^2 + 61,496X + 117,06$ dengan nilai korelasi yang rendah yaitu sebesar 0,33.

Rendahnya korelasi dan ketidaksesuaian model pada aktivitas enzim rhamnosidase yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* Rha-ase-H dan *Penicillium brefeldianum* diduga karena faktor lingkungan yang kurang optimal saat produksi kapang seperti suhu dan pH medium. Mangunwijaya dan Suryani (1994), menyebutkan pada umumnya enzim sangat peka terhadap suhu dan pH. Suhu sangat berpengaruh terhadap kestabilan enzim, bila suhu meningkat dapat mengakibatkan peningkatan laju reaksi. Sementara itu perubahan pH menyebabkan perubahan stabilitas protein, perubahan pengikatan dan laju reaksi.

Terlihat bahwa aktivitas enzim rhamnosidase dari *Aspergillus niger* baik Rha-ase B, Rha-ase F dan Rha-ase H cukup tinggi bila dibandingkan dengan *Aspergillus niger* lainnya yang telah diteliti sebelumnya. Menurut Monti et al., (2004) *Aspergillus niger* CCIM K2 dengan inducer L-rhamnosa menghasilkan aktivitas sebesar 12 U/ml, sementara itu kapang dari genus *Aspergillus* yang lain yang telah diteliti adalah: *Aspergillus terreus* CCF 3059, menghasilkan aktivitas sebesar 230 U/ml, *Aspergillus aculeatus* CCF 108 aktivitasnya adalah 19 U/ml dan *Aspergillus aculeatus* CCF 3134 aktivitasnya adalah 12 U/ml.

C. Kemampuan Filtrat Enzim Rhamnosidase dalam Menghidrolisis Larutan Naringin 200 i g/l

Dalam menghidrolisis larutan naringin, filtrat enzim rhamnosidase mempunyai kemampuan yang berbeda-beda untuk setiap kapang. Enzim rhamnosidase dapat memecah naringin menjadi rhamnosa dan prunin (Fernando dan

Tabel 4. Kemampuan maksimum filtrat enzim dalam menghidrolis larutan naringin pada berbagai konsentrasi dan waktu
 Table 4. The maximum hydrolysis ability of rhamnosidase enzyme crude at various naringin concentration and time contact

Isolat Kapang Mold isolate	Penurunan naringin maksimal (%) The maximum decrease of naringin (%)	Dosis (Unit/ μ g substrat) Dose (Unit/ μ g substrat)	Konsentrasi naringin (μ g/ml) Naringin concentration (μ g/ml)	Waktu inkubasi (jam) Incubation time(hour)
<i>Penicillium brefeldianum</i>	15,27	0,123	400	4
<i>Aspergillus niger</i> Rha -Ase B	12,53	0,054	1000	1
<i>Penicillium restrictum</i>	12,27	0,083	800	3
<i>Aspergillus niger</i> Rha-Ase F	1,35	0,063	600	1
<i>Aspergillus niger</i> Rha -Ase H	40,97	0,082	1000	3

Ellenrieder, 2002) dan mengeliminasi hesperidin kristal dimana prunin adalah senyawa yang masih berasa sedikit pahit. Kemampuan maksimum enzim kasar dalam menghidrolis larutan naringin pada berbagai konsentrasi dan waktu kontak yang dihasilkan oleh beberapa isolat kapang disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4 menunjukkan bahwa filtrat enzim yang dihasilkan oleh isolat kapang *Aspergillus niger* Rha-ase-H mempunyai aktivitas enzim terbaik, karena dengan unit enzim 0,082 unit enzim/mg substrat mampu menghidrolis larutan naringin hingga 40,97% dengan waktu kontak selama tiga jam. Kemampuan dalam menghidrolis naringin oleh filtrat enzim rhamnosidase ini berbeda dengan kemampuan enzim naringinase seperti yang dilaporkan oleh Prakash *et al.*, (2002), enzim naringinase komersial mampu mereduksi sebesar 75% kandungan naringin pada *grape fruit* dengan konsentrasi enzim 1 g/l pada inkubasi suhu 40°C dan lama kontak 4 jam.

Masih rendahnya kemampuan menghidrolis larutan naringin oleh filtrat enzim disebabkan oleh beberapa faktor di antaranya adalah: suhu dan waktu kontak yang belum optimal. Menurut Scaroni *et al.*, (2001) suhu optimum adalah 50-60°C, sedangkan pada penelitian ini kontak antara enzim rhamnosidase dengan larutan naringin dilakukan pada suhu kamar dengan pertimbangan kemudahan aplikasi pada jus jeruk. Selain itu enzim rhamnosidase masih berupa *crude* atau enzim kasar yang belum dimurnikan dan tidak diimobilisasi. Imobilisasi pada enzim naringinase dilaporkan mampu menurunkan kadar naringin sebesar 71,2 s/d 72,2% pada waktu kontak 2 dan 3 jam (Mishra dan Kar, 2003).

KESIMPULAN

1. Isolat kapang penghasil enzim rhamnosidase yang berhasil diidentifikasi adalah: *Penicillium brefeldianum*, *Penicillium restrictum*, *Aspergillus niger* Rha-ase B, *Aspergillus niger* Rha-ase F dan *Aspergillus niger* Rha-ase H. Aktivitas spesifik

rhamnosidase maksimum dari kelima isolat kapang tersebut berturut-turut adalah: 189,34 U/mg protein, kultivikasi hari ke-7; 186,82 U/mg protein, kultivikasi hari ke-5; 456,18 U/mg protein, kultivikasi hari ke-6; 159,38 U/mg protein, kultivikasi hari ke-6 dan 386,63 U/mg protein, kultivikasi hari ke-2.

2. Filtrat enzim rhamnosidase dari kapang *A.niger* Rha Ase H mempunyai kemampuan terbesar menurunkan kadar naringin pada larutan naringin konsentrasi 1000 μ g/ml dengan waktu kontak tiga jam yaitu sebesar 40,97 %.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Biro Oktroi Rosseno yang telah memberikan dana pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbasi,S., P. Zandi and E. Mirbagheri. 2005. Quantification of limonin in Iranian orange juice concentrates using High Performance Liquid Chromatography and Spectrophotometric Method . Eur. Food Res. Technol 221: 202-207.
- Barnett J.A., R.W. Payne and D.Yarrow. 2000. Yeast Characteristics and Identification. Cambridge: University Press.
- Braddock, R.J. 1999. Handbook of Citrus By Product and Processing Technology. John Wiley and Sons Inc. New York.
- Dalay,D. 1989. Identifikasi Mikroba yang Berperan Dalam Fermentasi Tauco. Laporan Penelitian.PAU Pangan dan Gizi.IPB. Bogor.
- Fernando, S. dan G. Ellenrieder. 2002. Thermal inactivation and product inhibition of *Aspergillus terreus* CECT 2663 a-L-Rhamnosidase and Their Role on Hydrolysis of Naringin Solutions. Biosci.Biotechnol. Biochem. 66(7):1442-1449
- Gallego, M.V., F. Pinaga, D. Ramon and S.Valles. 2000. Purification and characterization of an α -L rhamnosidase from *Aspergillus terreus* of interest in wine making. J.Food Sci.5(2): 876-879.
- Hasegawa, S., C.E. Vandercook, G.Y. Choi and Z. Herman. 1985. Limonoid debittering of citrus juice sera by immobilized cells of *Corynebacterium fascians*. J. Food Sci 50 : 330-2.

- Lee, H.S. and J.G. Kim. 2003. Effects of debittering on red grapefruit juice concentrate. *J.Food.Chem* (82): 177-180.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol. Chem.*193:265-275.
- Mangunwidjaja, D. dan A. Suryani. 1994. *Teknologi Bioproses*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Manzanares, P., C. Hetty, V.D.Broeck, H. Leo, D. Graaff and J.Visser. 2001.Purification and characterization of two different α -L-rhamnosidases, RhaA and RhaB, from *Aspergillus aculeatus*. *Applied and Environmental Microbiology*: 2230-2234.
- Mishra, P. and R.Kar. 2003. Treatment of grapefruit juice bitterness removal by amberlite IR 400 and alginate entapped naringinase enzyme. *J.of. Food Science* 6(4): 1229-1233.
- Monti, D., P. Andrea, K. Vladimir, L.Marco dan S. Riva. 2004. Generation of an α -L- Rhamnosidase library and its application for the selective derhamnosylation on natural products. *Wiley Interscience* (www.interscience.wiley.com).
- Prakash, S., R.S. Singhal dan P.R. Kulkarni. 2002. Enzymic debittering of Indian grapefruit (*Citrus paradisi*) juice. *J. Sci Food Agric*(82):394-397.
- Puri, M., S.S. Marwaha and R.M. Kothari. 1996. Studies on the applicability of alginate-entrapped naringinase for the bittering of kinnow juice. *Enzyme Microbial Technol* 18:281-5.
- Puri, M., A. Banerjee and U.C.Banerjee.2005. Optimization of process parameters for the production of naringinase by *A.niger* MTCC 1344. *Process Biochemistry* 40(1): 195-201.
- Riberiro, M.H.L., D.Silveira and S. Ferreira. 2002. Selective adsorption of limonin and naringin from orange juice to natural and synthetic adsorbent. *Eur Food Res Technol* 215:462-471.
- Romero,C., A.Manjon, J.Bastida and J.L.Iborra.1985.A method for assaying the rhamnosidase activity of naringinase. *Anal.Biochem.*149:566-571.
- Scaroni, E., C. Cuevas, L. Carrillo and G. Ellenrieder. 2002. Hydrolytic properties of crude α -L- rhamnosidases produced by several wild strains of mesophilic fungi. *Letters in Applied Microbiology*. Universidad Nacional de Salta. Conicet. Argentina.
- Dondhi, A.S., Setyadjit, E. Sukasih., N. Harimurti., Suyanti., Yulianingsih., I. Agustinisari., A. Budiyanto., K. Dewandari dan I. Mulyawanti. 2006. *Pengembangan Teknologi Pengolahan Jeruk Siam di Kalbar. Laporan Akhir Tahun. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian*.
- Soares, N.F.F. and J.H. Hotchkiss. 2000. Naringinase immobilization in packaging film for reducing naringin concentration in graapefruit juice. *J. Food Sci* 63(1):300-4.
- Zverlov,V.V., C. Hertel, K. Bronnenmeier, A. Hroch, J. Kellermann and W.H. Schwarz. 2000. The thermostable α -L rhamnosidase Ram A of *Clostridium stercorarium*:biochemichal characterization and primary structure of a bacterial α -L rhamnosidase hydrolase, a new type of inverting glycoside hydrolase. *Molecular Microbiol.*35:173-179.