

OPTIMASI, PRODUKSI DAN KARAKTERISASI RHAMNOSIDASE DARI *Aspergillus niger* RH-ase-H

Winda Haliza, Ermi Sukasih dan Iceu Agustinisari

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapenen Pertanian

Jl. Tentara Pelajar 12 A Bogor

email :bb_pascapenen@litbangdepan.go.id, bb_pascapenen@cbn.net.id

Penelitian ini bertujuan melakukan optimasi kondisi proses, produksi rhamnosidase dan karakterisasi rhamnosidase dari *Aspergillus niger* RH-ase-H. Rancangan komposit pusat dari metodologi respons permukaan digunakan untuk mengoptimasi kondisi suhu dan pH dalam produksi rhamnosidase. Suhu dan pH merupakan faktor penting yang memberi efek terhadap produksi rhamnosidase. Model polinomial ordo kedua ditentukan melalui analisis regresi pada data percobaan. Nilai optimum untuk suhu dan pH adalah 37,5°C dan 6,5 dengan nilai prediksi maksimum produksi rhamnosidase adalah 82,05 U/mg protein. Selanjutnya, dilakukan produksi rhamnosidase dalam 1 l media produksi pada kondisi pH dan suhu optimum. Enzim diperoleh dari hasil dialisis kemudian dikarakterisasi. Enzim memiliki aktivitas optimum pada suhu 60°C dan pH 4 serta memiliki kemampuan menghidrolisis naringin pada jus jeruk, tertinggi sebesar 50,01% pada konsentrasi enzim 27,8 U/ml dan suhu 20°C menggunakan media jus jeruk siapsaji.

Kata Kunci : *Aspergillus niger*, metodologi respon permukaan, rhamnosidase, naringin, jus jeruk

ABSTRACT. W. Haliza, E. Sukasih and I. Agustinisari. 2007. Optimization, production and characterization of Rhamnosidase from *Aspergillus niger* RH-ase-H. The aims of the research were optimization, production and characterization of rhamnosidase from *Aspergillus niger* R-ase-H. Central composite design is one of response surface methodology which used to optimize the cultivation component for enhancing rhamnosidase production. Temperature and pH were important factor affecting rhamnosidase production significantly. A second-order polynomial was determined by the multiple regression analysis of the experimental data. The optimum value for temperature and pH were 37.5°C and 6.5 with a predicted value of maximum rhamnosidase production of 82.05 U/mg protein. Then, a production of rhamnosidase on 1 L production medium at optimal condition process was made. After an dialysis, rhamnosidase was characterized for temperature and pH optimum. Rhamnosidase from *Aspergillus niger* RH-ase-H have optimum activity at temperature 60°C and pH 4. This enzyme was able to hydrolyses naringin in citrus juice, reached 50.01% with enzyme concentration of 27.8U/mL at 20°C.

Keywords : *Aspergillus niger*, response surface methodology, rhamnosidase, naringin, citrus juice

PENDAHULUAN

Keragaman hayati merupakan sumber penting dalam menghasilkan mikroorganisme yang mampu memproduksi enzim dengan sifat-sifat tertentu untuk aplikasi khusus. Mikroorganisme dengan kemampuan menghasilkan rhamnosidase telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi, *Aspergillus niger* RH-ase-H yang diisolasi dari limbah pengolahan jeruk Siam memiliki kemampuan menghasilkan rhamnosidase (Sukasih *et al.*, 2007). Media limbah merupakan sumber yang cukup baik dalam menghasilkan enzim rhamnosidase, hal ini seperti yang dilaporkan oleh Scaroni *et al.* (2002) yang mengisolasi berbagai kapang penghasil rhamnosidase, seperti *Fusarium solani*, *Mucor racemosus*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Penicillium aureantiogriseum*, *Fusarium sambucinum*, dan *Aspergillus flavus*.

Rhamnosidase dapat dihasilkan oleh mikroorganisme seperti bakteri maupun kapang. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa kapang lebih dominan menghasilkan enzim rhamnosidase daripada bakteri. Genus kapang yang

potensial menghasilkan enzim rhamnosidase adalah *Penicillium* dan *Aspergillus* (Manzanares *et al.* 2001).

Rhamnosidase (EC 3.2.1.40) merupakan komplek enzim dari naringinase (Romero *et al.* 1985). Beberapa dekade terakhir, rhamnosidase banyak diaplikasikan untuk berbagai industri pangan, umumnya pada industri jus jeruk. Rhamnosidase dapat digunakan untuk penghilang/hidrolisis senyawa naringin. Naringin yang terkandung dalam buah jeruk merupakan flavonoid golongan flavanon. Naringin termasuk ke dalam kelompok flavanon neohesperidose dan neohesperidin yang sangat pahit (Del Rio *et al.*, 1998 dalam Drewnosuki dan Gomes-Canerros, 2000). Tingginya konsentrasi naringin pada buah jeruk dapat mengganggu penerimaan konsumen karena rasa pahit yang ditimbulkannya.

Rhamnosidase dapat memecah naringin (4,5,7-trihydroxy flavanone-7-rhamnoglucoside) menjadi rhamnosa dan prunin dengan cara memutuskan ikatan o-glikosil. Prunin (4,5,7-trihydroxyflavanone-7-glucoside) memiliki tingkat pahit yang lebih rendah dihidrolisis lebih lanjut oleh b-glukosidase (EC 3.2.1.20) menjadi naringinin

dan glukosa. Naringinin (4,5,7-trihydroxyflavanone) merupakan isomer naringin yang tidak berasa pahit (Zverlov *et al.*, 2000).

Rhamnosidase termasuk golongan *exo-enzim* yang menghidrolisis terminal non reduksi α -L-rhamnosyl group dari polisakarida yang mengandung L-rhamnose dan glikosida. Pada dasarnya, rhamnosidase dan senyawa biokatalis lainnya diproduksi oleh mikrobial sebagai metabolit sekunder. Produksi tersebut membutuhkan kondisi proses kultivasi yang optimal, seperti komposisi media, kondisi fisik dan kimia, pH, suhu, agitasi dan aerasi.

Produksi rhamnosidase dari kapang membutuhkan suatu kondisi lingkungan yang kondusif supaya proses dapat berlangsung dengan baik. Faktor lingkungan seperti suhu, pH, aerasi dan agitasi perlu diatur selama proses kultivasi berlangsung. Suhu sangat mempengaruhi sifat fisik membran sel. Peningkatan 5-10°C diatas suhu optimum dapat menyebabkan proses lisis dan kematian sel mikroba (Lay, 1994).

Optimasi proses dapat dilakukan dengan berbagai cara, salah satunya dengan menggunakan *response surface methodology* (RSM). RSM adalah kumpulan dari teknik statistika dan matematika untuk menganalisis permasalahan tentang variabel-variabel bebas yang mempengaruhi variabel tidak bebas (*respon*), serta bertujuan mengoptimalkan respon tersebut. Dengan demikian, RSM dapat dipergunakan oleh peneliti untuk : (1) mencari suatu fungsi pendekatan yang cocok untuk meramalkan respon yang akan datang, (2) menentukan nilai-nilai variabel bebas yang mengoptimalkan respon yang dipelajari. Metodologi ini lebih realistik dan tidak membutuhkan unit percobaan yang tidak banyak (Gaspersz, 1995).

Cara ini sangat efisien untuk optimasi parameter yang berbeda dan digunakan dalam studi produksi berbagai metabolit, misalnya optimasi komponen media untuk produksi enzim (Adinarayana dan Ellaiah, 2002), produksi metabolit sekunder lainnya (Zhang *et al.*, 1996), produksi spora (Yu *et al.*, 1997), produksi biomasa (Lhomme dan Roux, 1991). Cara ini dapat memberikan informasi tentang interaksi antara variabel, termasuk informasi yang dibutuhkan untuk merancang percobaan, proses optimasi sampai memberikan *multilevel respons* pada waktu bersamaan.

Beberapa model rancangan RSM, antara lain : rancangan faktorial 3 taraf (*3-level factorial design*), rancangan komposit pusat (*central composite design*), rancangan *Box-Behnken* (*Box-Behnken design*), rancangan D-optimal (*D-optimal design*) dengan beberapa tipe yaitu *independen*, *rotatable* dan *rotatable quardatic* dapat digunakan untuk melakukan optimasi proses (Box *et al.* 1978 dalam Palamakula *et al.* 2004).

Penelitian ini bertujuan melakukan produksi rhamnosidase dari *Aspergillus niger* RH-ase-H dengan mempelajari terlebih dahulu aspek suhu dan pH untuk optimasi kondisi proses. Optimasi kondisi proses menggunakan RSM dengan rancangan komposit pusat. Selanjutnya rhamnosidase yang dihasilkan dikarakterisasi untuk menentukan suhu dan pH optimum serta kemampuan enzim dalam menghidrolisis naringin dalam jus jeruk.

BAHAN DAN METODE

A. Bahan dan alat

Penelitian dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian selama satu tahun pada tahun 2007. Bahan kimia yang digunakan berkategori *pure analysis* kecuali disebutkan secara khusus. Peralatan yang digunakan meliputi spektrofotometer, inkubator goyang, sentrifus, pH meter, pipet mikro, *hot plate* dan peralatan gelas yang lazim dipakai.

B. Metode penelitian

1. Kultur kapang

Kultur kapang *Aspergillus niger* RH-ase-H diperoleh dari hasil seleksi dan isolasi limbah pengolahan jeruk Siam. Kapang dipelihara dalam media padat mengandung 0,5 % rhamnose. Untuk produksi rhamnosidase kapang diremajakan menggunakan media cair mengandung L-rhamnose selama tujuh hari untuk mencapai spora kapang 10^6 CFU/ml.

2. Optimasi kondisi proses produksi

Kapang yang telah diremajakan (10^6 CFU/ml) dipropagasi ke dalam 5 ml media produksi selama ± 20 jam menggunakan inkubator shaker dengan laju agitasi 150 rpm pada suhu 37°C. Selanjutnya kultur tersebut dipindahkan ke dalam 45 ml media produksi di dalam labu erlenmeyer 100 ml. Media produksi yang digunakan dari Scaroni *et al.* (2002), dengan komposisi : 5 g/l rhamnosa, 0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g/l K_2HPO_4 , 5 g/l ekstrak khamir, 5 g/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,5 g/l KCl dan 1 ml mikro elemen. Nilai pH ditepatkan sebelum media sterilisasi dengan cara menambahkan 1N NaOH dan 1N HCl. Kultivasi dilakukan selama 3 hari dengan kecepatan agitasi 150 rpm. Setelah kultivasi, dilakukan sentrifugasi pada 4000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh digunakan untuk menentukan *yield* (aktivitas rhamnosidase). Kisaran dan level variabel percobaan disajikan dalam Tabel 1.

Berdasarkan matriks tersebut, diketahui 5 ulangan pada titik sentral (*center point*), 4 *star point* dan 13 total unit percobaan. Aktivitas rhamnosidase (*yield*) merupakan

Tabel 1. Kisaran dan tingkat variabel bebas (suhu dan pH) yang diuji dalam matriks rancangan komposit pusat
 Table 1. Range and level of independent variables tested in matrix central composite design

Variabel/ Variables	Kode taraf/Code levels				
	- α	-1	0	+1	+ α
X ₁ : Suhu/Temperature (°C)	19,8	25	37,5	50	55,2
X ₂ : pH/pH	4,4	5	6,5	8	8,6

respons yang dicari (variabel tidak bebas). Komputasi rancangan dapat dilakukan dengan menggunakan bantuan software statistik (StatEasyDX7). Berdasarkan rancangan tersebut dapat dihasilkan persamaan model kuadratik sebagai berikut :

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j, \quad (1)$$

dimana y adalah respons (aktivitas rhamnosidase), β_0 adalah koefisien intersep, β_i adalah koefisien efek linier, β_{ii} adalah koefisien efek kuadratik, β_{ij} adalah koefisien efek interaksi, X_i dan X_j (suhu dan pH). Koefisien regresi (R²) diperoleh dari analisis ketepatan model persamaan tersebut. Level optimum untuk pH dan suhu ditentukan dari analisis persamaan regresi dan 3-D plot respon permukaan. Tabel 2 berikut merupakan kombinasi suhu dan pH dalam bentuk matriks rancangan komposit pusat.

3. Analisis aktivitas rhamnosidase

Pengukuran aktivitas rhamnosidase berdasarkan metode kalorimeter (*Colorimeter*) menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 405 (Yanai dan Sato, 2000). Satu unit aktivitas rhamnosidase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang membebaskan 1 mmol p-nitrophenol per menit pada suhu 30°C dan pH 6,5 dengan p-nitrophenol digunakan sebagai standar. Untuk perhitungan *yield*, aktivitas rhamnosidase yang diperoleh dibagi dengan protein terlarutnya yang diukur dengan menggunakan metode Lowry, (1951) dalam Bollag dan Edelman, (1991) pada panjang gelombang 750 nm dengan Bovine Serum

Tabel 2. Kombinasi suhu dan pH dalam rancangan komposit pusat terdiri dari 13 total unit percobaan

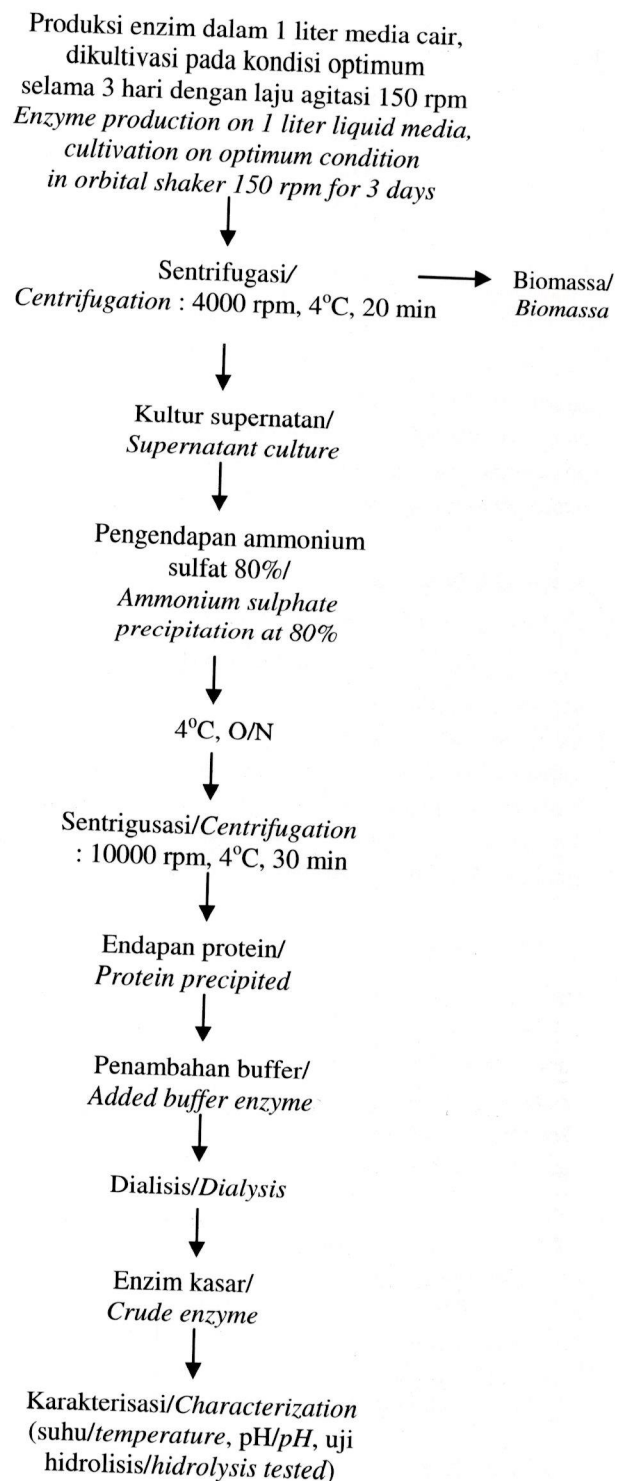
Table 2. Combination temperature and pH in central composite design consisting of 13 experiments unit

Run. no	Nilai/Value		Kode/Code		Coefficients assessed by
	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂	
1	25	5	-1	-1	Fractional 2 ² factorial design
2	25	8	+1	-1	
3	50	5	-1	+1	
4	50	8	+1	+1	
5	37,5	4,4	0	- α	Star points (4 points)
6	37,5	8,6	0	+ α	
7	19,8	6,5	- α	0	
8	55,2	6,5	+ α	0	
9	37,5	6,5	0	0	Central points
10	37,5	6,5	0	0	
11	37,5	6,5	0	0	
12	37,5	6,5	0	0	
13	37,5	6,5	0	0	

Albumin (BSA) sebagai standar. Analisis dilakukan duplo dengan menggunakan dua ulangan.

4. Produksi rhamnosidase

Produksi enzim dilakukan pada kondisi suhu dan pH optimum. *Aspergillus niger* RH-ase-H yang telah



Gambar 1. Bagan alir produksi enzim rhamnosidase
 Figure 1. Production flow chart of rhamnosidase

Tabel 3. Respon aktivitas rhamnosidase *Aspergillus niger* RH-ase-H
 Table 3. Response of rhamnosidase activity *Aspergillus niger* RH-ase-H

Run no.	Suhu/ Temperature	pH/pH	Aktivitas rhamnosidase/ Rhamnosidase activity (U/mg protein)	Protein/Protein (mg/ml)
1	25	5	10,25	1,324
2	25	8	2,53	1,603
3	50	5	0,53	1,661
4	50	8	0,75	1,800
5	37,5	4,4	41,10	1,038
6	37,5	8,6	4,92	1,700
7	19,8	6,5	1,03	1,440
8	55,2	6,5	0,75	1,123
9	37,5	6,5	109,74	1,351
10	37,5	6,5	57,11	1,483
11	37,5	6,5	117,85	0,914
12	37,5	6,5	69,67	1,409
13	37,5	6,5	55,88	1,541

diremajakan (10^6 CFU/ml) diinokulasi dalam 1 liter media produksi (Scaroni *et al.* 2002) lalu dikultivasi pada kondisi proses optimum dengan kecepatan agitasi 150 rpm selama 3 hari. Proses produksi enzim dilakukan seperti Gambar 1.

5. Karakterisasi enzim

a. Penentuan suhu dan pH optimum

Suhu optimum enzim kasar ditentukan dengan mengukur aktivitas enzim pada berbagai suhu dengan kisaran 30°C-60°C (selang suhu 10°C) menggunakan p-NPR sebagai substrat. PH optimum enzim ditentukan dengan mengukur aktivitas enzim pada berbagai pH dengan kisaran 3-7 pada kondisi suhu optimum. Bufer enzim yang digunakan adalah 0,1 M bufer fosfat-sitrat dari pH 3-7.

b. Uji hidrolisis naringin pada jus jeruk

Uji hidrolisis naringin berpedoman pada metode Davis (1947) dalam Prakash *et al.*, (2002). Media jus yang digunakan sebagai substrat adalah media jus tanpa pasteurisasi, media jus dengan pasteurisasi dan media jus komersial yang dibuat berdasarkan metode Setyadjit *et al.* (2006). Tahap pertama pengujian adalah menentukan

kadar naringin awal pada masing-masing media jus jeruk. Tahap kedua, menentukan kadar naringin setelah perlakuan penambahan enzim sebesar 10% (v/v) E/S, 20% (v/v) E/S, 30% (v/v) E/S kedalam jus jeruk dan suhu kontak 20°C, 35°C dan 50°C selama 3 jam. Jumlah jus yang digunakan sebesar 100 ml. Konsentrasi naringin diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 420 nm. Persentase hidrolisis naringin dihitung berdasarkan persentase perbandingan dari kadar naringin sebelum perlakuan dengan kadar naringin setelah perlakuan. Analisis sidik ragam akan diterapkan untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap variabel yang diamati (jumlah enzim dan suhu kontak). Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial. Model rancangan dianalisis menggunakan software Minitab ver. 11.0. Analisis dilakukan duplo dengan menggunakan dua ulangan.

c. Analisis kadar naringin

Pertama, 10 ml dietilen glikol 90% ditaruh dalam tabung reaksi, 0,2 ml jus jeruk (sentrifus/saring terlebih dahulu) ditambahkan kedalamnya. Kedua, ditambahkan 0,2 ml NaOH 4 M kedalam tabung, dan inkubasi selama 5 menit

Tabel 4. Analisis ragam model permukaan respon ordo kedua terhadap aktivitas rhamnosidase *Aspergillus niger* RH-ase-H
 Table 4. Analysis of variance second order response surface model of rhamnosidase activity *Aspergillus niger* RH-ase-H

Sumber Keragaman/ Sources of variation	Jumlah Kuadrat/ Sum of squares	Derajat Bebas/ Degrees of freedom	Kuadrat Tengah/ Mean square	Nilai F/ F value	Prob (P) > F
Regresi/Model	17.944,64	5	3.588,93	6,44	0,0149*
Galat/Residual	3901,35	7	557,34		
Galat Model/ Lack of Fit	396,34	3	132,11	0,15	0,9240 ^{tn}
Galat Murni/ Pure Error	3505,01	4	876,25	-	-
Total	21.845,99	12	-	-	-

Keterangan/Remark: * = beda nyata pada/significant at $\alpha = 0,05$ ^{tn} = tidak beda nyata pada/not significant at $\alpha = 0,05$

Tabel 5. Pengujian koefisien regresi

Table 5. Coefficients regression estimation

Sumber Keragaman/ Sources of variation	Jumlah Kuadrat/ Sum of squares	Derajat Bebas/ Degrees of freedom	Kuadrat Tengah/ Mean square	Nilai F/ F value	Prob (P) > F
X ₁ : Suhu/Temperature	17,35	1	17,35	0,031	0,8649
X ₂ : pH/pH	430,63	1	430,63	0,77	0,4086
X ₁ X ₂	16,40	1	16,40	0,029	0,8686
X ₁ ²	12672,62	1	12672,62	22,74	0,0020*
X ₂ ²	6960,25	1	6960,25	12,49	0,0095*

Keterangan/Remark: * = beda nyata pada/significant at $\alpha = 0,05$ = tidak beda nyata pada/not significant at $\alpha = 0,05$

pada suhu 30°C. Warna kuning yang terbentuk diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 420 nm. Kurva standar naringin dibuat dari plot kadar naringin 10-100 mg/ml.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Optimasi kondisi proses dan produksi rhamnosidase

Rancangan komposit pusat merupakan rancangan statistik yang dapat digunakan untuk optimasi dan evaluasi efek mean, efek interaksi dan efek kuadrat dari variabel-variabel bebas (suhu dan pH) dalam produksi rhamnosidase. Rancangan komposit pusat 2² faktorial penuh, dapat digunakan untuk eksplorasi kuadrat respons permukaan dan membangun model polinomial ordo kedua. Rancangan komposit pusat sangat berguna dalam penentuan kondisi optimum proses produksi rhamnosidase. Berdasarkan rancangan tersebut diperoleh hasil (*yield*) respons aktivitas rhamnosidase seperti yang terlihat pada Tabel 3.

Hasil yang diperoleh dikomputasi lebih lanjut untuk mendapatkan model persamaan regresi ordo kedua. Persamaan regresi ordo kedua dari hasil tersebut, sebagai berikut :

$$Y = 82,05 - 1,47 X_1 - 7,34 X_2 + 2,03 X_1 X_2 - 42,68 X_1^2 - 31,63 X_2^2, \quad (2)$$

dimana, *y* adalah aktivitas rhamnosidase (U/mg protein), X₁ adalah suhu, X₂ adalah pH

Pengujian ketepatan model persamaan tersebut dilakukan dalam analisis ragam disajikan pada Tabel 4. Dari analisis ragam tersebut diperoleh bahwa model yang digunakan signifikan terhadap respon (*yield*), karena memperoleh nilai F yang rendah terhadap nilai P (P model > F = 0,0149). Hasil pengujian ketepatan model tersebut memiliki besaran R² yang tinggi (R² = 0,8213) pada taraf $\alpha = 0,05$. Berdasarkan uji simpangan (residual), menunjukkan bahwa model polinomial ordo kedua ini merupakan model yang tepat untuk menerangkan pengaruh variabel suhu dan pH terhadap aktivitas rhamnosidase (*yield*). Hal ini disebabkan karena uji simpangan (residual) bersifat tidak nyata pada taraf $\alpha = 0,05$.

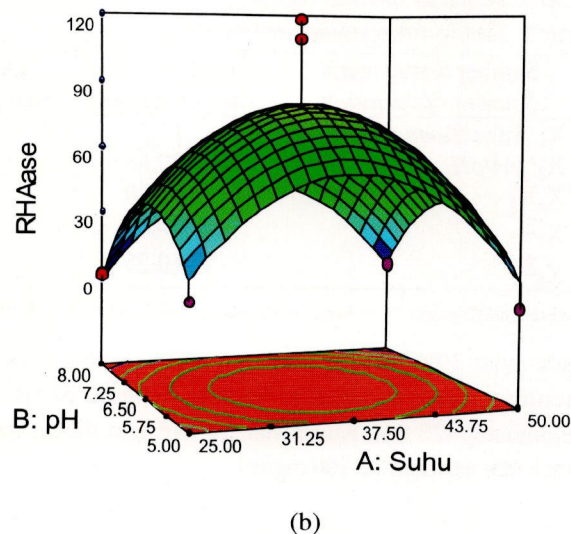
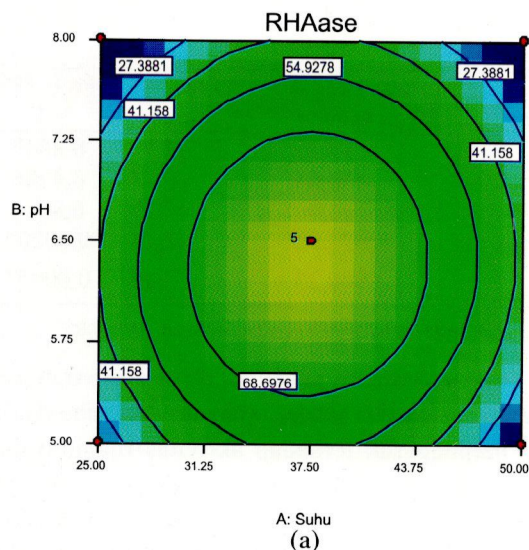
Dengan demikian model ini dapat digunakan untuk menentukan kondisi proses optimum dari suhu dan pH yang berpengaruh terhadap aktivitas rhamnosidase. Selain itu, berdasarkan pengujian koefisien regresi (Tabel 5) menunjukkan X₁² (Suhu) dan X₂² (pH) signifikan pada taraf $\alpha = 0,05$, hal ini menunjukkan bahwa suhu dan pH berpengaruh nyata respons aktivitas rhamnosidase. Tanda koefisien regresi untuk suhu dan pH bersifat negatif, menunjukkan arah pengaruh kedua variabel tersebut bersifat negatif, dimana kenaikan pH dan suhu akan menurunkan respon aktivitas rhamnosidase (*yield*).

Respons (*yield*) dari model regresi yang diperoleh dapat diplot dengan 3-D respon permukaan dan *contour plot* (Gambar 2a dan 2b) untuk melihat lebih jelas bentuk respon permukaan dari titik-titik unit percobaan. Dari hasil tersebut dapat diprediksikan level optimum dari suhu dan pH dengan bantuan persamaan regresi dalam Persamaan 2. Level optimum untuk suhu dan pH adalah 37,5 °C dan 6,5 dengan respon aktivitas rhamnosidase yang dapat diperoleh sebesar 82,05 U/mg protein (Tabel 6). Verifikasi nilai prediksi ini dilakukan sebanyak dua kali, hasil yang diperoleh tidak jauh berbeda (85,41 ± 5,45 U/mg protein).

Tabel 6. Nilai observasi dan prediksi dari respon aktivitas rhamnosidase

Table 6. Observed and predicted value of the response

Run no.	Respon rhamnosidase/ Yield response		Residual value
	Observed response	Predicted value	
1	10,25	18,57	-8,32
2	2,53	-0,15	2,68
3	0,53	11,58	-11,05
4	0,75	0,95	-0,20
5	41,10	29,16	11,94
6	4,92	8,41	-3,49
7	1,03	-1,23	2,26
8	0,75	-5,40	6,15
9	109,74	82,05	27,69
10	117,85	82,05	35,80
11	69,67	82,05	-12,38
12	55,88	82,05	-26,17
13	57,11	82,05	-24,94



Gambar 2. Contour plot (a) dan 3-D response surface plot (b) dari variabel suhu dan pH terhadap aktivitas rhamnosidase *Aspergillus* sp. RH-ase-H

Figure 2. Contours plot (a) and 3-D response surface plot (b) as function of temperature and pH to rhamnosidase activity of *Aspergillus niger* RH-ase-H

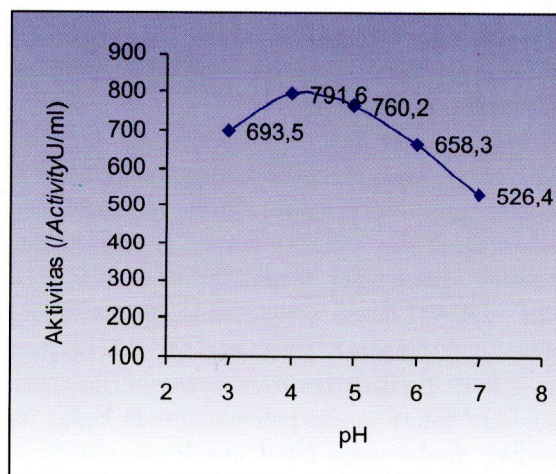
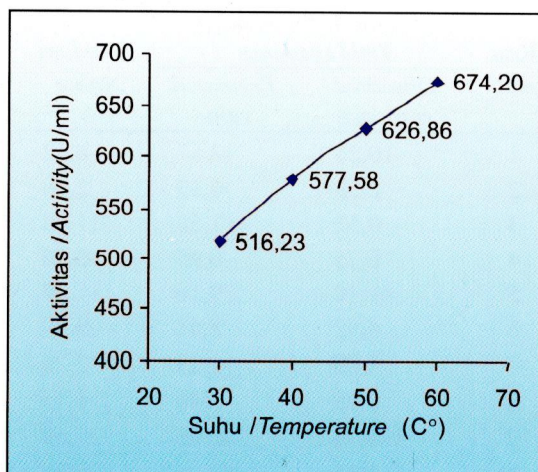
Kondisi optimal untuk produksi rhamnosidase dari *Aspergillus* sp. RH-ase-H adalah suhu 37,5 °C dan pH 6,5. Hasil optimasi ini sedikit lebih tinggi bila dibandingkan dengan hasil yang diperoleh dari Rzaivera *et al.* (2005), dimana kisaran suhu dan pH produksi rhamnosidase untuk beberapa spesies *Aspergillus* dan *Penicillium* terjadi pada 20-37°C dan 4,0 – 6,0. Dari kondisi optimal yang telah diperoleh untuk kedua kapang tersebut selanjutnya dilakukan produksi rhamnosidase dalam 1 liter media produksi. Produksi rhamnosidase dilakukan beberapa tahap yaitu kultivasi pada kondisi optimal masing-masing kapang, pemisahan biomasa, pengendapan protein selanjutnya dialisis untuk menghasilkan enzim kasar. Bagan alir produksi dapat dilihat pada Gambar 1. Ekstrak enzim kasar dari *Aspergillus* sp. RH-ase-H dapat dilihat

pada Gambar 3. Produksi bertujuan untuk mendapatkan enzim kasar (fraksi dialisis) rhamnosidase yang akan dikarakterisasi lebih lanjut meliputi : penentuan suhu optimum, pH optimum dan uji hidrolisis naringin di dalam jus jeruk.

B. Karakterisasi rhamnosidase

1. Penentuan suhu dan pH optimum

Aktivitas rhamnosidase dari *Aspergillus* sp. RH-ase-H pada berbagai suhu dapat dilihat pada Gambar 4a. Penentuan suhu optimum ditentukan berdasarkan aktivitas relatif enzim pada berbagai suhu. Pada Gambar 4a, terlihat enzim mampu bekerja pada kisaran suhu cukup luas yaitu 30-60°C (aktivitas relatif lebih dari 80%). Dengan



Gambar 3. Suhu (a) dan pH (b) optimum rhamnosidase *Aspergillus niger* RH-ase-H

Figure 3. Temperature (a) and pH (b) of rhamnosidase from *Aspergillus niger* RH-ase-H

menggunakan substrat pNPR, aktivitas optimum pada suhu 50°C. Sebagian besar rhamnosidase yang dihasilkan dari *Aspergillus* sp. memiliki karakteristik suhu optimum pada kisaran suhu 40-70°C (Gallego *et al.* 2000; Manzanares *et al.* 1997, 2000). Kenaikan suhu dapat menyebabkan laju reaksi semakin tinggi. Laju reaksi semakin tinggi disebabkan kenaikan energi aktivasi. Seluruh konstanta laju reaksi yang berperan dalam mekanisme katalitik enzim menyebabkan maksimum perubahan proses reaksi. Secara umum, hal ini sangat baik untuk menggunakan enzim pada suhu tinggi. Selain meningkatkan laju reaksi dapat pula menghindari kontaminasi mikroba. Namun, enzim adalah protein yang dapat mengalami denaturasi irreversibel pada suhu di atas kondisi lingkungan alaminya. Reaksi di atas suhu kritis merupakan laju yang cepat untuk kehilangan aktivitasnya. Suhu dapat menyebabkan denaturasi yaitu perubahan stuktur protein akibat perubahan ikatan-ikatan kovalen dan non kovalen protein. Ikatan-ikatan yang mengatur folding matriks protein yang menjaga protein/enzim dapat aktif atau bekerja.

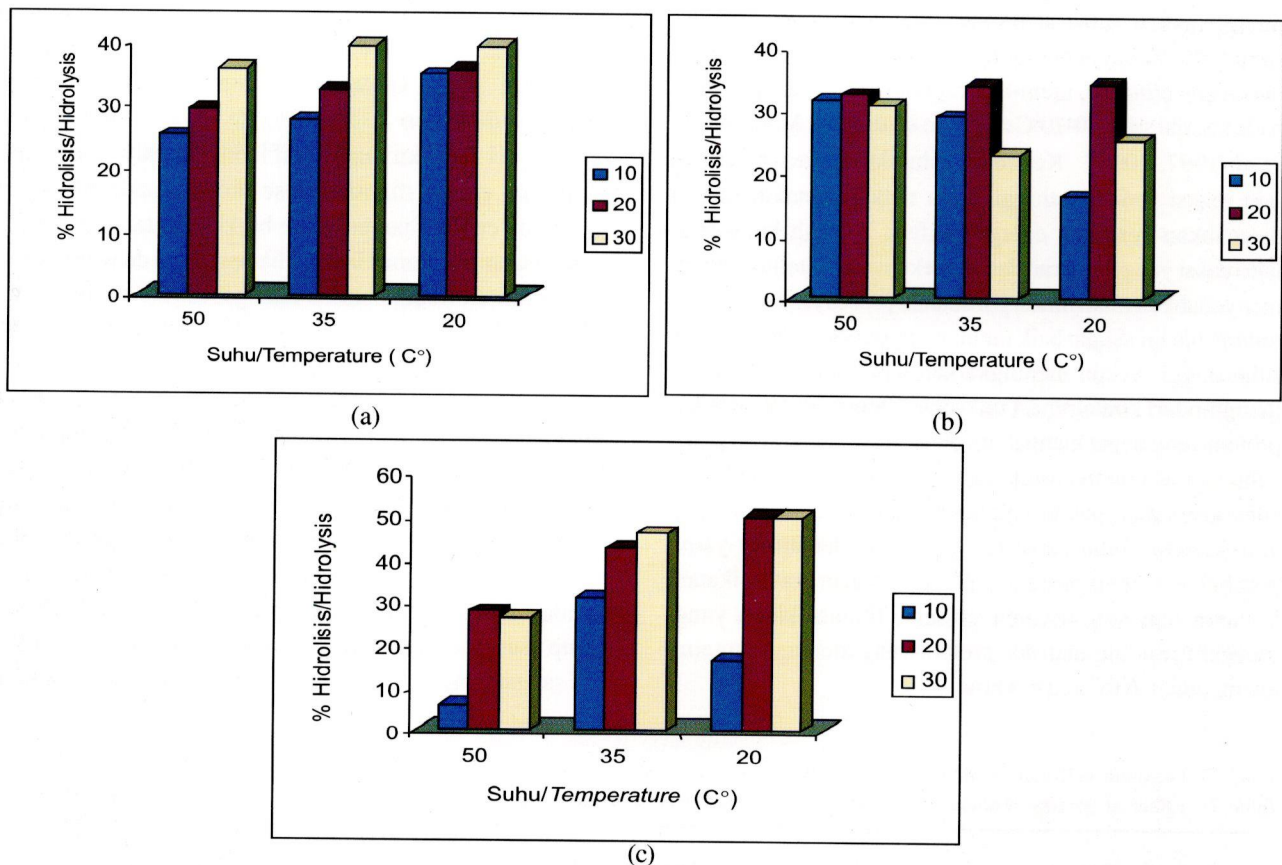
Penentuan pH optimum rhamnosidase dilakukan dengan melihat aktivitas relatif rhamnosidase pada berbagai pH. Gambar 4b menunjukkan bahwa rhamnosidase dari *Aspergillus* sp. dapat bekerja pada kisaran pH 3-6 (aktivitas relatif lebih dari 80%). Aktivitas optimum enzim rhamnosidase dicapai pada pH 4 pH optimum enzim rhamnosidase berkisar antara 3,5 s/d 6,5 atau kisaran pH asam. Hasil ini hampir sama dengan kisaran pH optimum rhamnosidase dari genus *Aspergillus* yang diungkapkan dari beberapa peneliti (Manzanares *et al.* 1997, 2001; Gallego *et al.* 2000).

Scaroni *et al.* (2002), melaporkan bahwa enzim rhamnosidase yang dihasilkan oleh *A. flavus* mempunyai pH optimum sebesar 6,5 sedangkan *A. kawachii* adalah 4,5. Selanjutnya dilaporkan bahwa pada substrat yang berbeda akan menunjukkan aktivitas yang berbeda pula.

Pentingnya penentuan pH optimum karena enzim adalah molekul protein yang mengandung sejumlah besar grup asam dan basa pada permukaan. Muatan pada grup ini sangat banyak. Konstanta disosiasi pada muatan enzim

Tabel 7. Pengaruh berbagai konsentrasi rhamnosidase dan suhu kontak terhadap kadar naringin pada beberapa jenis jus jeruk
Table 7. Effect of varying rhamnosidase concentration and temperature of incubation to naringin content on varying citrus juice

Media/Medium	Run no.	Konsentrasi enzim/ Enzyme concentration (% E/S)	Suhu kontak/ Temperature incubation (°C)	Kadar Naringin/ Naringin content (mg/ml)
Jus jeruk pasteurisasi/ pasteurized citrus juice	Kontrol/ Control	1	50	186,08 ± 7,55
		2		175,74 ± 5,85
		3		159,19 ± 1,70
	Kontrol/Control	1	35	248,13 ± 0,10
		2		179,88 ± 0,10
		3		167,47 ± 0,10
	Kontrol/Control	1	20	149,89 ± 1,46
		2		248,13 ± 0,10
		3		161,26 ± 2,93
	Kontrol/Control	1	20	159,19 ± 2,93
		2		149,89 ± 6,08
		3		248,13 ± 0,10
Jus jeruk tanpa pasteurisasi/ non pasteurized citrus juice	Kontrol/Control	1	50	156,09 ± 1,24
		2		154,02 ± 1,46
		3		158,16 ± 1,46
	Kontrol/Control	1	35	227,45 ± 0,10
		2		162,29 ± 3,16
		3		150,92 ± 2,92
	Kontrol/Control	1	20	175,74 ± 5,10
		2		227,45 ± 0,10
		3		190,22 ± 1,90
	Kontrol/Control	1	20	149,89 ± 7,78
		2		170,57 ± 7,78
		3		227,45 ± 0,10
Jus jeruk siapsaji/ commercial citrus juice	Kontrol/Control	1	50	222,28 ± 4,38
		2		170,57 ± 4,38
		3		173,67 ± 7,55
	Kontrol/Control	1	35	235,72 ± 0,10
		2		162,29 ± 1,46
		3		135,41 ± 1,46
	Kontrol/Control	1	20	127,13 ± 4,38
		2		235,72 ± 0,10
		3		128,17 ± 4,62
	Kontrol/Control	1	20	117,83 ± 2,92
		2		117,83 ± 8,77
		3		235,72 ± 0,10



Gambar 4. Penurunan naringin oleh enzim rhamnosidase pada berbagai suhu dan konsentrasi (a) media jus jeruk terpasteurisasi (b) media jus jeruk tanpa pasteurisasi (c) jus jeruk

Figure 4. Effect of temperature and pH on hydrolysis of naringin by using rhamnosidase (a) pasteurized citrus juice, (b) non pasteurized citrus juice, (c) citrus juice

berefek terhadap distribusi muatan permukaan luar dan sifat relatif katalitik. Efek ini penting dalam keutuhan sisi aktif enzim. Oleh karena itu, perubahan muatan karena pH akan berefek pada stabilitas struktur dan kelarutan enzim. pH, suhu, waktu inkubasi saling berkaitan dan dapat menyebabkan denaturasi bila enzim bekerja diatas ambang kritisnya.

C. Uji hidrolisis naringin pada jus jeruk

Enzim rhamnosidase mengkatalisis pemecahan naringin menjadi rhamnosa dan prunin (Zverlov *et al.*, 2000). Prunin adalah senyawa yang masih berasa pahit. Enzim rhamnosidase dari *Aspergillus niger* RH-ase-H menunjukkan kemampuan yang berbeda dalam menghidrolisis naringin pada media jus jeruk terpasteurisasi, jus jeruk tanpa terpasteurisasi dan jus jeruk siap. Tabel 7 menunjukkan pengaruh penambahan rhamnosidase dan suhu kontak terhadap kadar naringin pada media jus tersebut.

Kadar naringin awal untuk masing-masing media jus adalah 248,13 mg/ml, 227,45 mg/ml dan 235,72 mg/ml. Kemampuan menghidrolisis naringin oleh rhamnosidase

tertinggi pada media jus dengan kemampuan menurunkan kadar naringin mencapai 50,01% pada suhu 20°C dan konsentrasi 30% atau setara dengan 27,8 U/ml. Profil hidrolisis naringin berdasarkan suhu dan konsentrasi enzim dapat dilihat pada Gambar 4.

Sebagai perbandingan adalah hasil penelitian dari Scaroni *et al.*, (2002), enzim rhamnosidase komersial dari *Aspergillus kawachii* mampu menghidrolisis larutan naringin murni konsentrasi 100g/l sampai level 77%, sementara enzim yang dihasilkan dari *Aspergillus flavus* berhasil menghidrolisis sampai level 95% dengan konsentrasi enzim 7 U/ml selama 6 jam kontak. Kemampuan rhamnosidase *Aspergillus niger* RH-ase-H yang dihasilkan dalam penelitian ini cukup tinggi mengingat dari waktu kontak yang lebih singkat dan kondisi enzim yang belum murni serta substrat (jus jeruk) yang lebih kompleks dibandingkan larutan naringin saja.

Pada jus jeruk, kandungan naringin terus bertambah dengan bertambahnya waktu dan suhu. Sehingga dimungkinkan kemampuan hidrolisis naringin lebih besar pada suhu rendah karena kontak enzim pada suhu dingin menyebabkan kenaikan naringin yang lebih kecil pada substrat jus jeruk dibandingkan dengan kontak enzim pada suhu yang lebih tinggi.

Analisis sidik ragam menunjukkan bahwa pada media jus jeruk terpasteurisasi dan jus siapsaji, perlakuan suhu dan konsentrasi enzim berpengaruh nyata terhadap persentase penurunan naringin ($p < 0,05$). Makin besar konsentrasi enzim ada kecenderungan makin besar pula persentase penurunan naringin.

KESIMPULAN

1. Kondisi proses produksi optimum untuk *Aspergillus niger* RH-ase-H menghasilkan rhamnosidase adalah suhu 37,5 °C, pH 6,5 dengan laju agitasi 150 rpm selama 3 hari.
2. Enzim rhamnosidase dari *Aspergillus* sp. RH-ase-H mempunyai suhu optimum 50 °C dan pH optimum 4.
3. Kemampuan rhamnosidase dalam menghidrolisis naringin dalam media jus jeruk berbeda-beda, dimana persentase hidrolisis naringin tertinggi diperoleh pada media jus siapsaji, penurunan kadar naringin mencapai 50,01% pada konsentrasi enzim 30% yang setara dengan 27,8 U/ml pada suhu 20 °C dan waktu kontak 3 jam.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinarayana, K. and P. Ellaiah, 2002. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. J. Pharm. Pharmaceut. Sci., 5(3) : 272-278.
- Bollag, D.M. and S. Edelstein. 1991. Protein Methods. USA : Wiley-Liss.
- Drewnoski and Gomez-Caneros. 2000. Bitter taste, phytonutrients and consumer : a review. Am. J. Clin. Nutr., 72 : 1424-1435.
- 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
- Gaspersz, V. 1995. Teknik Analisis dalam Penelitian Percobaan. Penerbit Tarsito. Bandung
- Lay, B.W. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Lhomme, B. and J.C. Roux, 1991. Utilization of experimental designs for optimization of *Rhizopus arrhizus* culture. Bioresource Technol. 35 (30):301-312
- Manzanares, P., L.H. de Graaff and J. Visser. 1997. Purification and characterization of an α -L-rhamnosidases from *Aspergillus niger*, FEMS Microbiol. Lett. 157 : 279-283.
- 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*. Appl. Environ. Microbiol. 56 : 2230-2234.
- Palamakula, A.M.T.H. Nutan and M.A. Khan, 2004. Response surface methodology for optimization and characterization of limonene-based coenzyme Q10 self-nanoemulsified capsule dosage form. AAPS Pharm. Sci. Tech. 5 (4) Article 66 : 1 - 8.
- Prakash, S., R.S. Singhal and P. R. Kulkarni. 2002. Enzymic debittering of Indian grapefruit (*Citrus paradisi*) juice. J. Sci. Food Agric. 82 : 394-397.
- 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.
- Rzaieva, O.M., N.V. Borzova and L.D. Varbanets. 2005. Screening of microorganism-producers of alpha-L-rhamnosidase. Microbiol. Z. 67 (5) : 19-27.
- Scaroni, E., C. Cuevas, L. Carillo and G. Ellenrieder. 2002. Hydrolytic properties of crude α -L-rhamnosidase produced by several wild strains of mesophilic fungi. Lett. Appl. Microbiol. 34: 461-465.
- Setyadjit, DA. Setiabudi, E. Sukasih, N. Harimurti, Suyanti, Yulianingsih, I. Agustinisari, A. Budiyo, K. Dewandari dan I. Mulyawanti. 2006. Pengembangan Teknologi Pengolahan Jeruk Siam di Kalbar Laporan Akhir Tahun. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian.
- Sukasih E., W. Haliza, I. Agustinisari, E. Y. Purwani dan Setyadjit. 2007. Karakterisasi enzim rhamnosidase yang dihasilkan oleh kapang. Laporan Penelitian. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian. Bogor.
- Yanai, T and Sato, M. 2000. Purification and characterization of an α -L-Rhamnosidase from *Pichia angusta* X349. Biosci. Biotechnol. Biochem., 64 (10) : 2179-2185.
- Yu, X., S.G. Hallet, J. Sheppard and A.K. Watson. 1997. Application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements for the production of *Colletotricum coccodes* spore. Appl. Microbiol. Technol., 47(3):301-305.
- Zhang, J., C. Marcin, M.A. Shifflet, P. Salmon, T. Brix, R. Greasman, B. Bouklund and M. Chartrain. 1996. Development of a defined medium fermentation process for physotigmine production by *Streptomyces griseofuscus*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 44(5): 568-575.
- Zverlov, V.V., C. Hertel, K. Bronnenmeier, A. Hroch, J. Kellermann, and W.H. Schwarz. 2000. The thermostable α -L-rhamnosidase RamA of *Clostridium stercoarum*: biochemical characterization and primary structure of a bacterial α -L-rhamnosidase hydrolase, a new type of inverting glycoside hydrolase. Molecular Microbiol. 35: 173-179.