

KARAKTERISASI ENZIM PEKTINASE YANG DIHASILKAN DARI ISOLAT KHAMIR INDIGENUS YANG DIISOLASI SELAMA FERMENTASI BIJI KOPI ROBUSTA

(Characterisation Of Pectinase Enzymes Produced From Indigenous Yeast Isolates Isolated During Robusta Coffee Bean Fermentation)

Hasanul Fitri^{1*)}, Subari Yanto², Reski Praja Putra³

^{1, 2, 3} Program Studi Pendidikan Teknologi Pertanian Fakultas Teknik, Universitas Negeri Makassar
Jalan Daeng Tata Raya, Parang Tambung, Mannuruki, Kec. Tamalate,
Kota Makassar, Sulawesi Selatan 90224

*Email: hasanulfitri98@gmail.com

Abstrak

Riset berikut bertujuan guna memahami isolat khamir indigenus yang bersifat pektinolitik, pengaruh waktu inkubasi pada aktivitas enzim pektinase, dan sifat pH dan suhu enzim pektinase yang diperoleh dari khamir indigenus hasil fermentasi spontan biji kopi robusta. Jenis riset berikut ialah eksperimen melalui RAL (Rancangan Acak Lengkap). Riset ini terlebih dahulu dilaksanakan penyeleksian khamir pektinolitik, selanjutnya dilakukan penetapan durasi inkubasi optimum, pH maupun suhu optimum enzim pektinase. Isolat khamir yang digunakan diseleksi menggunakan media (1% pektin + congo red 0,1% + 2% agar) untuk mengetahui kemampuan pektinolitik tertinggi. Isolat khamir pektinolitik terpilih akan dilanjutkan ketahap penentuan waktu inkubasi optimum dengan rentan waktu 24, 48, 72, 96, 120, serta 144 jam dimana setiap 24 jam dilakukan ekstraksi enzim. Selanjutnya ekstrak kasar enzim pektinase yang dihasilkan dari Isolat khamir pektinolitik terpilih dikarakterisasi pada pH (3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6) dan suhu (30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C) untuk mengetahui pH dan suhu optimumnya. Hasil riset memperlihatkan bahwasanya pengujian terhadap tujuh isolat khamir indigenus bersifat pektinolitik dan yang memiliki kemampuan pektinolitik paling tinggi ialah isolat K24I7 berdiameter zona bening 3.13 mm. Pada penentuan waktu inkubasi optimum, diperoleh pada waktu inkubasi 24 jam isolat K24I7 telah mampu menghasilkan aktivitas enzim yang serupa dengan waktu inkubasi lainnya dengan aktivitas spesifik enzim bernilai 10.08 U/mg. Hasil karakterisasi enzim pektinase yang dihasilkan dari isolat K24I7 optimum pada pH 5.5 dengan nilai aktivitas spesifik enzim ialah 10.09 U/mg dan suhu optimum pada kisaran 40°C-60°C dengan rata-rata aktivitas spesifik enzim yaitu 10.08 U/mg. Enzim pektinase yang dihasilkan dari isolat K24I7 bersifat termofil karena masih aktif pada suhu 70°C.

Kata Kunci: Khamir, Enzim Pektinase, Karakterisasi pH dan suhu

PENDAHULUAN

Khamir ialah mikroorganisme yang sering dimanfaatkan pada perindustrian lantaran fungsinya mampu memfermentasi substrat untuk menghasilkan produk yang berguna bagi kehidupan. Kapabilitasnya tersebut kerap digunakan pada bidang gizi, kesehatan, serta energi. Khamir menghasilkan sejumlah enzim diperlukan diantaranya fosfatase, selulase, proteinase, lipase, serta pektinase, sehingga berperan penting pada penguraian senyawa organik dan bisa dipakai

dalam kebutuhan industri (Spencer & Spencer, 1997).

Khamir merupakan salah satu mikroorganisme yang menjadi sumber utama penghasil enzim pektinase. Salah satu jenis mikroorganisme yang sanggup mendegradasi pektin dinamakan khamir pektinolitik. Khamir pektinolitik mampu mendegradasi pektin dengan cara memproduksi enzim pektinase. Pektinase ialah enzim yang dapat memperbaharui substrat pektin lewat reaksi depolimerisasi (hidrolase dan lyase) dan reaksi

diesterifikasi (esterase). Enzim tersebut termasuk pada golongan enzim hidrolitik yang umum ditemukan di tumbuhan dan mikroorganisme (Glazer & Nikaido, 2007).

Riset sebelumnya sudah dilaksanakan perihal produksi enzim dari isolat khamir hasil fermentasi alami biji kopi Robusta asal Bantaeng. Dalam riset ini, 24 khamir terisolasi dilibatkan pada tahap fermentasi spontan biji kopi Robusta. Lima dari isolat khamir yang diperoleh selanjutnya dilaksanakan uji aktivitas enzim dan diketahui sebagai khamir yang memiliki sifat pektinolitik dan tujuh lainnya memiliki sifat selulolitik (Hikmah *et al.*, 2021).

Riset tersebut masih diperlukan pengkajian lebih lanjut melalui pelaksanaan seleksi terhadap keseluruhan isolat khamir yang dihasilkan, isolat khamir mana yang dapat dikembangkan menjadi starter maupun sebagai penghasil enzim pektinase ekstraseluler. Adanya isolat khamir dari penelitian sebelumnya dapat dimanfaatkan dan dikembangkan dalam melakukan pengujian karakterisasi enzim pektinase hasil fermentasi spontan biji kopi robusta sehingga memudahkan dan meminimalisir dari segi ekonomi tanpa harus membeli kultur lain untuk melakukan penelitian.

Penelitian ini akan melakukan pengembangan terhadap penelitian sebelumnya dengan memperhatikan beberapa faktor yaitu waktu inkubasi, karakterisasi pH, serta suhu optimumnya. Isolat khamir yang diperoleh melalui riset sebelumnya belum dilakukan pengoptimalan dalam menghasilkan enzim pektinase. Oleh karena itu, dalam penelitian ini penyeleksian isolat khamir dalam menghasilkan enzim pektinase beserta penentuan waktu inkubasi, pH, dan suhu optimumnya sangat perlu dikaji agar dapat diketahui kelayakannya sebagai starter maupun sebagai penghasil enzim pektinase ekstraseluler.

Hasil dari riset berikut ialah dapat memperoleh ekstrak kasar enzim pektinase dari isolat khamir asal fermentasi spontan biji kopi robusta melalui cara memahami sifat dari enzim tersebut waktu inkubasi, pH maupun suhu optimum dari isolat khamir penghasil enzim pektinase. Sehingga, ekstraksi enzim

pektinase dari khamir pektinolitik tersebut diharapkan dapat memenuhi kebutuhan enzim pektinase yang semakin meningkat.

METODE PENELITIAN

Riset berikut ialah riset eksperimen dan memakai jenis permodelan rancangan acak lengkap (RAL), memakai satu variabel yakni waktu inkubasi yang dibagi dalam enam tahap yakni 24, 48, 72, 96, 120, serta 144 jam, dan diulang tiga kali.

Waktu dan Tempat Penelitian

Riset berikut berlangsung di bulan Agustus-Desember 2021 yang dilaksanakan di Lab. Pendidikan Teknologi Pertanian Fakultas Teknik Universitas Negeri Makassar.

Alat dan Bahan

Alat yang dipakai pada riset berikut diantaranya, tabung reaksi, cawan petri, timbangan analitik, rak tabung reaksi, gelas ukur, labu ukur, bunsen, korek api, pipet ukur, bulb karet, botol semprot, mikropipet, *hot plate*, oven, batang pengaduk, jangka sorong, *laminar air flow*, mikroskop, jarum ose, autoklaf, kaca objek, Erlenmeyer, *freezer*, spektrofotometer, sentrifus, *refrigerator*, *beaker glass*, *water bath*, pipet tetes, cawan, spatula, plastik anti panas, botol vial.

Material yang dipakai pada riset berikut diantaranya isolat khamir, media PDA (*Potato Dextrose Agar*), alkohol 70%, spiritus, aluminium foil, kapas steril, minyak imersi, *methylene blue*, pektin, pewarna *congo red* 0,1%, akuades, NaCl 0,85%, KNa-tartarat, *Dinitrosalicylic acid* (DNS), buffer sitrat fosfat 0,05 M pH 6 dan 7, buffer sitrat 0,05 M pH 5, buffer Tris-HCL 0,05 M pH 8 dan 9, buffer fosfat 0,05 M pH 7, kertas cakram, plastik *wrap*, agar-agar.

Prosedur Penelitian

Tahap Persiapan

Langkah persiapan yang dilakukan meliputi pembersihan peralatan alat lab dan media, penyegaran kultur isolat khamir yang akan diuji, dan identifikasi khamir. Alat-alat yang dipakai pada riset berikut pertama-tama disterilkan dalam oven atau autoclave. Kultur disebarkan dengan media PDA pada tabung

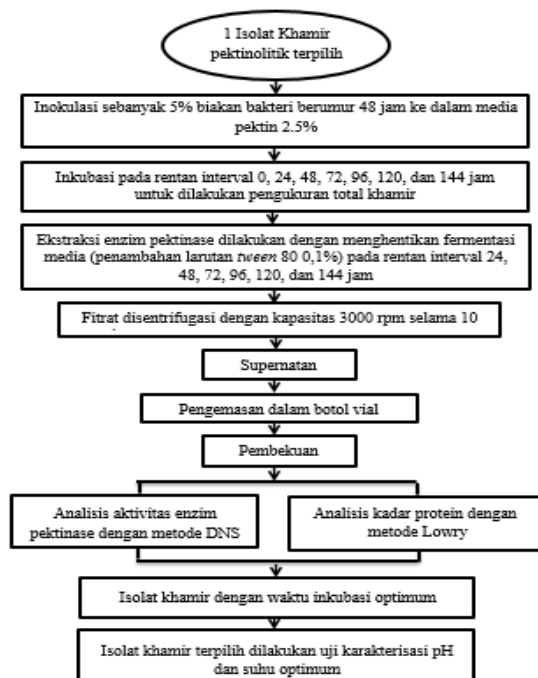
reaksi. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang sekitar 48 jam. Proses identifikasi khamir dilaksanakan guna menjamin bahwasanya kultur pengujian yang dipakai ialah khamir. Identifikasi khamir dilaksanakan dengan memakai *methylene blue*.

Tahap Seleksi

Isolat yang diidentifikasi sebagai khamir selanjutnya dipersiapkan guna inokulasi memakai kertas cakram berdiameter 6 mm yang dipasang di media pektin 1% + 0,1% indikator *red congo* + 2% agar. Tahapan seleksi berikut dilaksanakan guna mengidentifikasi isolat khamir yang bisa memproduksi enzim pektinase. Isolat khamir yang mampu memproduksi enzim pektinase bisa dicermati melalui pembentukan zona bening di sekitar koloni maupun kertas cakram. Isolat khamir pektinolitik dengan diameter zona bening terbesar dipilih guna uji coba lebih lanjut.

Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Diagram alir penentuan durasi inkubasi optimum bisa dicermati melalui diagram di bawah:



Gambar 1. Diagram Alir Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Karakterisasi Enzim

Uji karakterisasi enzim dilaksanakan setelah dihasilkannya enzim pektinase yang telah disiapkan pada pengujian sebelumnya dengan waktu inkubasi optimal. Karakterisasi yang dilaksanakan mencakup pH dan suhu optimal untuk aktivitas enzim pektinase. Nilai pH optimal ditentukan pada tujuh langkah: pH 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, serta 6. Nilai pH optimal selanjutnya dipakai untuk menentukan enzim pektinase dan menentukan suhu optimal. Pengujian ini tersusun atas lima tingkatan suhu: 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, serta 70°C. Di tahap karakterisasi enzim ini, enzim pektinase ekstraseluler dengan nilai waktu, pH, dan suhu yang optimal dihasilkan melalui isolat khamir pektinolitik.

Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data yang dipakai pada riset berikut ialah uji klinis. Uji berikut tersusun atas pemilihan khamir pektinolitik, uji total khamir, uji aktivitas enzim pektinase, pengukuran kandungan protein, dan analisis aktivitas enzim pektinase menggunakan metode DNS untuk menentukan pH dan suhu optimal.

Seleksi Khamir Pektinolitik

Pemilihan khamir pektinolitik dilaksanakan melalui tahapan seperti:

1. Mengambil 20 µl suspensi khamir usia 48 jam kemudian masukkan ke dalam cakram kertas steril berdiameter 6 mm.
2. Tempelkan kertas cakram yang berisi suspensi khamir pada media (1% pektin + 0,1% indikator *red congo* + 2% agar).
3. Khamir yang ditumbuhkan di media diinkubasi sekitar 48 jam di suhu ruang,
4. Mengukur tingkat degradasi pektinase ditunjukkan melalui munculnya zona bening di media.

Pengujian Total Khamir dengan Metode Perhitungan Cawan

Jumlah khamir dihitung (skala 10-150 koloni) dan dinyatakan pada Cfu/g melalui persamaan (Antoni, 2016) :

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n1) + (0,1 \times n2)] \times (d)} \dots\dots\dots(1)$$

Dimana :

- N = Banyaknya koloni (ml/gram)
 ΣC = Banyaknya koloni pada keseluruhan cawan yang dihitung
 n1 = Banyaknya cawan (pengenceran pertama)
 n2 = Banyaknya cawan (pengenceran kedua)
 d = Taraf pengenceran yang didapatkan melalui cawan yang dihitung pertama.

Pengujian Aktivitas Enzim Pektinase dengan Metode DNS

Metode DNS ialah metode uji kuantitatif yang umumnya dipakai untuk mengukur kadar gula reduksi konsekuensi hidrolisis enzimatik pada substrat. Satu unit aktivitas enzim bermakna jumlah 1 μmol glukosa yang diproduksi melalui hidrolisis oleh 1 ml ekstrak enzim kasar selama proses inkubasi. Aktivitas pektinase (unit/mL) ditentukan dengan perhitungan seperti berikut (Aryani, 2012) :

$$\text{Aktivitas Enzim (U/ml)} = \frac{(X \times 1000) \times Fp \times (v) \times L \times 1000}{v \times bm \text{ galakturonat} \times t} \dots\dots\dots(2)$$

Dimana:

- X = Nilai enzim - kontrol (μg/mL)
 L = Jumlah keseluruhan sampel (ml)
 Fp = Faktor pengencer (v)
 v = Volume sampel (ml)
 t = Waktu inkubasi (menit)

Analisis Aktivitas Spesifik Enzim Pektinase

Aktivitas spesifik enzim ditentukan melalui pembagian aktivitas setiap enzim dengan protein di masa inkubasi yang berbeda. Di bawah ini ialah persamaan dalam menentukan spesifikasi aktivitas enzim (Siska dan Astuti, 2018) :

$$N = \frac{\text{Aktivitas Enzim}}{\text{Protein Enzim}} = \text{U/mg} \dots\dots\dots(3)$$

Dimana:

- N = Akifitas spesifik pada unit/mg
 Total Protein = mg protein

Analisis Kadar Gula Reduksi

Analisis kadar gula reduksi pada substrat media dilakukan menggunakan metode *Dinitrosalicylic acid* (DNS). Analisis gula reduksi dilaksanakan guna memahami kandungan gula reduksi di substrat untuk menentukan masa inkubasi optimum. Berikut persamaan dalam menghitung kandungan gula reduksi enzim:

$$\text{Kadar Gula Reduksi (\%)} = \frac{\text{Konsentrasi (mg/L)} \times FP}{W_{\text{substrat}}} \times 100\% \dots\dots(4)$$

Dimana :

- W_{substrat} = Berat Substrat (mg)

Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Kandungan protein bisa diketahui melalui perhitungan memakai metode Lowry. Metode Lowry yang dipakai untuk menguji kandungan protein enzim pektinase dijelaskan melalui rumus berikut (Lowry *et al.*, 1951) :

$$\text{Protein Enzim (\%)} = \frac{(X \times 1000) \times FP \times (v) \times L \times 1000}{v \times 100} \dots\dots\dots(5)$$

Teknik Analisis Data

Teknik analisis data yang dipakai diantaranya uji persyaratan analisis yang tersusun atas uji normalitas dan homogenitas. Bila data yang didapatkan normal dan homogen, kemudian dilaksanakan analisis melalui uji varian statistik ANOVA. Apabila H diterima alhasil dilaksanakan uji lagi yakni uji Duncan (DMRT) dengan taraf signifikansi α = 0,05. Teknologi pengolahan data yang dipakai ialah melalui SPSS versi 23.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Khamir

Isolat khamir yang digunakan pada riset berikut ialah isolat khamir indigenus yang berperan pada fermentasi spontan biji kopi robusta yang diisolasi pada waktu fermentasi 24 jam diantaranya yaitu isolat K24I1, K24I2, K24I3, K24I4, K24I5, K24I6, dan K24I7. Identifikasi khamir dilakukan melalui pewarnaan *methylene blue* yang dilihat memakai mikroskop pada skala 400 kali.

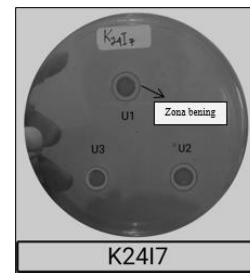
Hasil pengujian pewarnaan *methylene blue* menunjukkan bahwa seluruh isolat berwarna biru dan transparan di bawah mikroskop, hal ini menandakan bahwa isolat khamir masih hidup. Pernyataan tersebut ditunjang oleh riset dari Suryaningsih *et al.*, (2018) yang menjelaskan bahwasanya sel khamir hidup memiliki warna bening lantaran metilen biru tidak bisa melewati membran sel, sementara sel khamir mati memiliki warna biru lantaran metilen biru bisa melewati membran sel. Boyd dkk (2003), sel-sel hidup dapat mengurangi pigmen tersebut, sehingga menghasilkan sel-sel mati yang berwarna biru.

Bentuk sel khamir setelah diamati secara mikroskopis ditemukan terdapat dua isolat yang berbentuk oval yaitu K24I4 dan K24I6, dua isolat yang berbentuk pseudomiselium yaitu K24I1 dan K24I3, satu isolat berbentuk ogiva yaitu K24I2, satu isolat berbentuk silinder yaitu K24I5, dan satu isolat berbentuk bulat yaitu K24I7. Sel khamir bisa berbentuk subglobose, bulat, ovoid, ellipsoid, silindris, obovoid, bacilliform, botuliform, apiculate, elongate, luning, segitiga, maupun ogival (Angraini *et al.*, 2019).

Seleksi Khamir Pektinolitik

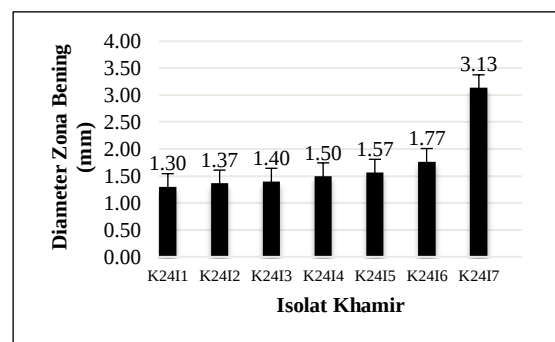
Uji khamir pektinolitik dilaksanakan melalui penumbuhan tujuh isolat khamir dalam medium yang terkandung (1% pektin + 0,1% indikator *congo red* + 2% agar) dan diinkubasi sekitar 24 jam di suhu ruang. Pemilihan tersebut bersumber pada terbentuknya zona transparan di sekeliling koloni maupun cakram kertas. Berdasarkan Herdyastuti dkk (2009), aktivitas enzim ekstraseluler dapat diuji secara kualitatif melalui cara menentukan terdapatnya zona bening di sekeliling pertumbuhan koloni dalam media uji.

Terbentuknya zona bening dalam media pektin menunjukkan bahwasanya isolat tersebut sanggup mendegradasi senyawa pektin yang ada pada medium. Pengujian aktivitas enzim pektinase untuk isolat K24I7 yang mempunyai diameter zona teransparan paling tinggi diperlihatkan melalui Gambar 2 :



Gambar 2. Uji Aktivitas Enzim Pektinase pada Isolat K24I7

Hasil pengujian indeks aktivitas pektinolitik menunjukkan seluruh isolat khamir yang diuji sanggup mendegradasi media yang mengandung pektin sebagai satu-satunya sumber karbon. Kondisi tersebut bisa dicermati melalui terciptanya zona tranparan di sekitar kertas cakram yang diproduksi. Isolat K24I7 ialah isolat dengan diameter zona transparan terbesar yakni 3,13 mm, sementara isolat dengan diameter zona transparan terkecil ialah isolat K24I1 berdiameter 1,30 mm. Grafik indeks aktivitas pektinolitik isolat khamir ditunjukkan pada Gambar 3 :



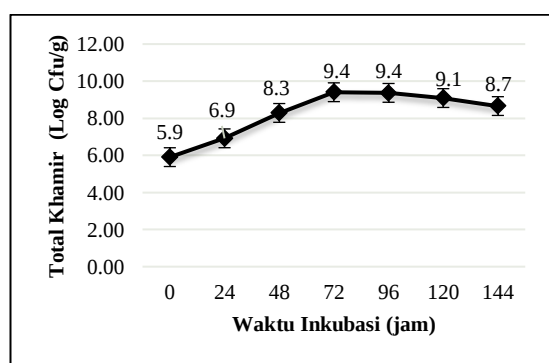
Gambar 3. Indeks Aktivitas Pektinolitik Isolat Khamir

Indeks aktivitas pektinolitik dari isolat khamir memperlihatkan bahwasanya terdapat perbedaan indeks pektinolitik yang diproduksi saat mendegradasi substrat pektin oleh setiap isolat. Adanya perbedaan indeks aktivitas pektinolitik yang dihasilkan, karena tingkat degradasi enzim pektinase oleh setiap isolat khamir berbeda kemampuannya dalam mendegradasikan substrat pektin pada media pertumbuhan. Kian besar diameter zona teransparan, akan kian besar juga aktivitas pektinolitik yang dihasilkan atau semakin banyak pektin yang terurai menjadi asam galakturonat. Temuan tersebut selaras

terhadap penurunan Kusiyanto *et al.*, (2019) yang mengungkapkan bahwasanya kian besar indeks pektinolitik, akan kian besar juga aktivitas pektinolitik yang diproduksi. Diameter zona transparan terbesar pada Isolat selanjutnya diteruskan menuju tahapan karakterisasi enzim.

Perhitungan Total Khamir

Isolat K24I7 merupakan isolat khamir terpilih didasarkan pada diameter zona bening tertinggi yang terbentuk. Selanjutnya, isolat ini ditumbuhkan dalam media produksi enzim pektinase yang terdiri atas (pektin 2.5%, glukosa 1%, dan larutan mineral 50%) selama 144 jam, dimana setiap interval 24 jam dilakukan perhitungan total khamir yang ditumbuhkan pada media biakan *Potato Dextrose Agar* (PDA) kemudian dihitung menggunakan metode perhitungan cawan. Grafik perhitungan total khamir ditunjukkan pada Gambar 4 :



Gambar 4. Perhitungan Total Khamir

Hasil analisis Duncan memperlihatkan pertumbuhan nilai total khamir pada waktu inkubasi 0 hingga 24 jam berbeda signifikan dengan peningkatan 1 log Cfug. Peningkatan yang signifikan ini terus terjadi hingga 72 jam. Hal tersebut diakibatkan karena pada masa inkubasi 24 hingga 72 jam, pertumbuhan isolat K24I7 sudah menyentuh fase logaritmik. Fase logaritmik merupakan puncak dari perkembangbiakan khamir (Hardianto *et al.*, 2018). Pada waktu ini, khamir mampu memanfaatkan nutrisi pada media pertumbuhan dengan baik dan melakukan proses metabolisme secara maksimal serta membelah dengan cepat.

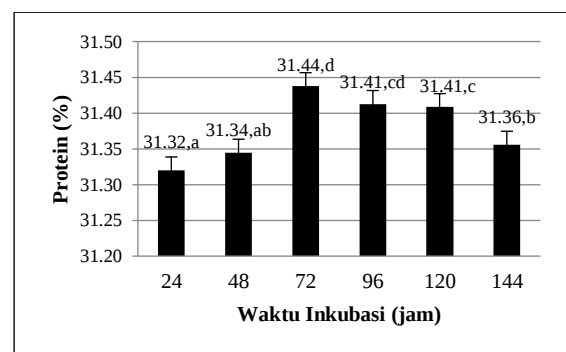
Pada masa inkubasi 72 sampai 120 jam, nilai total khamir meningkat namun relatif

konstan yakni berada pada kisaran 9.1 Log Cfug sampai dengan 9.4 Log Cfug, karena pada fase ini masuk dalam fase pertumbuhan stasioner. Tahap stasioner nantinya memperlihatkan bahwasanya jumlah pertumbuhan sel tetap dan turun seiring pada kurangnya nutrisi pada medium bertambahnya waktu (Mashitoh, 2012).

Pada waktu inkubasi 144 jam, nilai total khamir mengalami penurunan karena waktu inkubasi ini sudah masuk dalam fase kematian, nilai total khamir menurun menjadi 8.7 Log Cfug. Pada fase ini jumlah nutrisi yang terkandung pada media pertumbuhan tersisa sedikit sehingga sel khamir tidak bisa tumbuh optimal dan bahkan mengalami kematian. Menurut Safitri & Novel (2013) menyatakan bahwa setelah pertumbuhan mendatar (fase statis), nutrisi pada media akan berkurang dan akhirnya diikuti oleh suatu penurunan populasi sel (fase kematian).

Kadar Protein

Dalam memahami produksi enzim pektinase bisa dilaksanakan melalui cara penentuan kandungan protein dalam varians masa fermentasi. Kian lama masa fermentasi konsentrasi protein kian naik (Sumardjo, 2009). Grafik kadar protein pektinase diperlihatkan melalui Gambar 5 :



Gambar 5. Kadar Protein Pektinase oleh Isolat K24I7

Hasil analisis Duncan memperlihatkan bahwasanya sejak masa inkubasi 24 hingga 72 jam kadar protein meningkat signifikan, dengan peningkatan kadar protein 31.33%. Hasil ini sejalan pada kenaikan isolat K24I7 di masa inkubasi 24-72 jam yang ditumbuhkan pada media produksi yang mengandung (pektin 2.5 % + glukosa 1% + larutan mineral

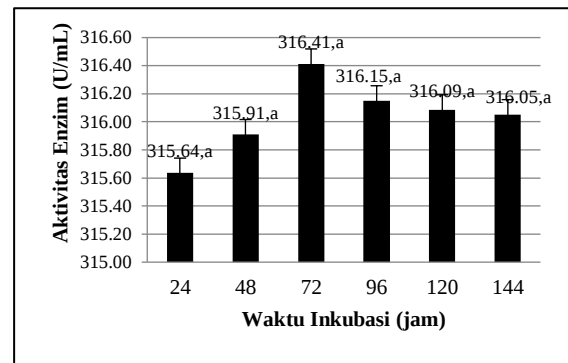
50%) ada dalam tahap logaritmik. Dalam tahap logaritmik, proses metabolisme khamir berlangsung begitu cepat, baik dari proses anabolisme ataupun katabolisme.

Kadar protein pada waktu inkubasi 72 jam hingga 96 jam menunjukkan jumlah kadar protein yang serupa atau konstan, tetapi kadar protein menurun sejak waktu inkubasi 120 hingga 144 jam sebesar 0.05%. kondisi tersebut berhubungan positif pada tumbuhnya isolat K24I7 di masa inkubasi 72 jam hingga 120 jam merupakan fase stasioner, sedangkan waktu inkubasi 144 jam sudah masuk dalam fase kematian.

Isolat K24I7 memanfaatkan protein sebagai sumber nitrogen. Dimana, nitrogen memiliki peran fisiologis bagi mikroorganisme yakni sebagai komponen protein (Franistika *et al.*, 2012). Nitrogen pada protein tersebut digunakan menjadi sumber nutrisi dan energi untuk perkembangan sel. Kondisi tersebut mengurangi jumlah protein yang diproduksi isolat K24I7 selama masa inkubasi 120–144 jam. Pernyataan tersebut senada pada penyampaian Purkan *et al.*, (2015) menjelaskan bahwasanya khamir memakai protein yang ada dalam substrat untuk menjadi sumber makanan bagi pertumbuhan.

Aktivitas Enzim dan Aktivitas Spesifik Enzim Pektinase pada Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

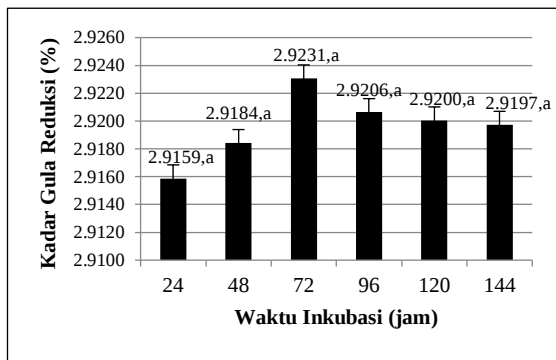
Waktu inkubasi optimal ditentukan menurut nilai aktivitas enzim dan aktivitas spesifik isolat K24I7. Selama masa inkubasi 24–72 jam, aktivitas enzim pektinase yang diproduksi isolat K24I7 ada di kisaran 31,32 U/ml hingga 31,34 U/ml. Kondisi tersebut memperlihatkan bahwasanya waktu inkubasi tidak berpengaruh nyata pada aktivitas enzim pektinase yang diproduksi isolat K24I7. Nilai aktivitas enzim pektinase pada waktu inkubasi yang berbeda diperlihatkan melalui Gambar 6 :



Gambar 6. Aktivitas Enzim Pektinase pada Penentuan Waktu Inkubasi Optimum oleh Isolat K24I7

Nilai aktivitas enzim pektinase tertinggi diperoleh pada waktu inkubasi 72 jam dengan nilai 316.41 U/mL, sedangkan aktivitas enzim pektinase terendah dihasilkan pada waktu inkubasi 24 jam dengan nilai 315.64 U/mL. Nilai aktivitas enzim pektinase terendah pada waktu inkubasi 24 jam disebabkan pertumbuhan masih dalam kondisi awal peretumbuhan sel khamir. Sejak waktu inkubasi 48 hingga 72 jam, aktivitas enzim pektinase oleh isolat K24I7 mengalami peningkatan yang disebabkan telah memasuki fase pertumbuhan logaritmik. Pada waktu inkubasi 96 jam, aktivitas enzim pektinase mulai mengalami penurunan. Setelah waktu inkubasi 120 sampai dengan 144 jam, aktivitas enzim semakin menurun karena sudah berada pada fase kematian dengan nilai aktivitas enzim 316.09 U/mL hingga 316.05 U/mL. Pada beberapa keadaan terjadi penurunan dan peningkatan dari nilai aktivitas enzim karena salah satunya dipengaruhi oleh konsentrasi substrat maupun nutrisi yang tersedia (Haq *et al.*, 2010).

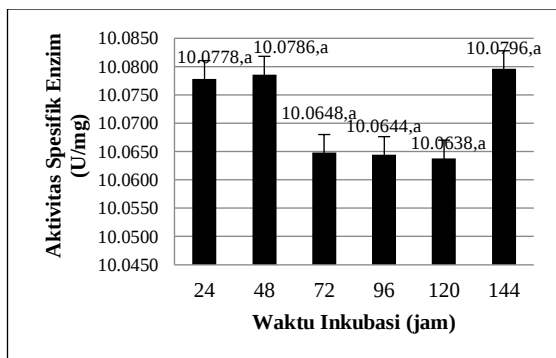
Dalam uji berikut, pektin dalam medium kultur dipecah sebagai asam galakturonat. Proses penguraian pektin sebagai gula pereduksi dikenal sebagai tahap sakarifikasi. Penurunan kadar gula saat masa inkubasi yang berbeda diperlihatkan melalui Gambar 7 untuk mengetahui waktu inkubasi optimal enzim pektinase.



Gambar 7. Kadar Gula Reduksi Enzim Pektinase pada Penentuan Waktu Inkubasi Optimum oleh Isolat K24I7

Hasil analisis kadnungan gula reduksi dalam menentukan masa inkubasi optimal berhubungan positif pada aktivitas enzimatik isolat K24I7. Hasil pengujian Duncan memperlihatkan masa inkubasi selama 24 jam merupakan waktu yang optimal untuk aktivitas enzim pektinase yang diproduksi isolat K24I7, lantaran kandungan gula reduksi yang diproduksi sangat tinggi. Kondisi tersebut memengaruhi aktivitas enzim pektinase di masa inkubasi berikutnya yang bisa dilihat melalui produksi asam galakturonat yang berkelanjutan.

Aktivitas spesifik suatu enzim ditentukan melalui perbandingan unit aktivitas enzim pada kandungan protein masing-masing enzim. Aktivitas spesifik menunjukkan banyaknya unit enzim per miligram protein, maupun jumlah aktivitas enzim per jumlah protein yang ada pada pengujian campuran enzim (Triana, 2013). Gambar 8 menunjukkan nilai aktivitas spesifik enzim pektinase untuk menentukan masa inkubasi optimal.



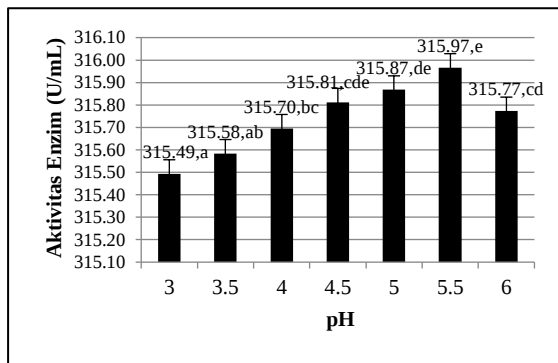
Gambar 8. Aktivitas Spesifik Enzim Pektinase pada Penentuan Waktu Inkubasi Optimum oleh Isolat K24I7

Hasil analisis menunjukkan bahwa pada waktu 24 jam aktivitas spesifik enzim pektinase yang dihasilkan oleh isolat K24I7, sudah tinggi dan serupa jika dibandingkan dengan aktivitas spesifik enzim pada waktu inkubasi yang lebih lama yaitu waktu inkubasi yang berada pada kisaran 48 sampai 144 jam. Hasil tersebut memperlihatkan bahwasanya masa inkubasi 24 jam sudah menjadi waktu inkubasi optimum bagi enzim pektinase yang dihasilkan oleh isolat K24I7. Sehingga waktu inkubasi 24 jam yang akan digunakan sebagai uji lanjut pada penentuan pH maupun suhu optimum enzim pektinase.

Aktivitas Enzim dan Aktivitas Spesifik Enzim Pektinase pada Penentuan pH Optimum

Karena sifat ionik gugus karboksil dan amonia, aktivitas enzim terpengaruh oleh pH. Kinerja enzim pada proses katalis reaksi bekerja dengan baik bila kondisi pH optimal berlaku (Safaria *et al.*, 2013). Dalam menentukan nilai pH optimum suatu enzim dilakukan mirip dengan uji aktivitas enzim. Uji dilaksanakan di perubahan pH 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, serta 6.

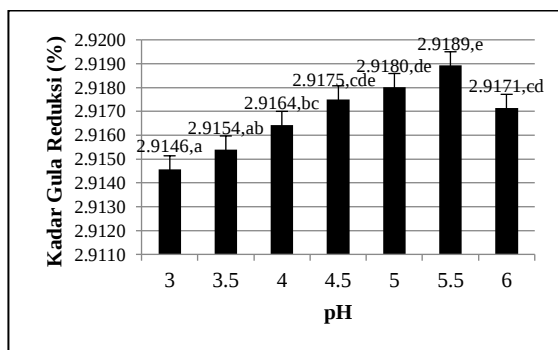
Hasil analisis aktivitas enzim dalam menentukan pH optimum memperlihatkan perbedaan aktivitas enzim yang diproduksi isolat K24I7 di setiap pH yang digunakan. Aktivitas enzim pektinase mengalami peningkatan sejak pH 3 hingga pH 5.5. Aktivitas enzim pektinase tinggi didapatkan pada pH 5.5 dengan nilai pH yaitu 315.97 U/mL, dimana pada kondisi pH ini aktivitas enzim terbesar ketika mengubah substratnya sebagai unit sederhana. Temuan tersebut selaras pad riset yang dilaksanakan Yopi *et al.*, (2013) yang mengungkapkan bahwasanya pektinase yang diproduksi *Aspergillus ustus* BL5 memiliki aktivitas optimum di pH 5. Sementara itu, Siero *et al.*, (2012) mengungkapkan bahwasanya enzim pektinase mempunyai kisaran pH optimal 3,5 – 11. Nilai aktivitas enzim pektinase pada nilai pH yang berbeda ditunjukkan melalui Gambar 9 :



Gambar 9. Aktivitas Enzim Pektinase pada Penentuan pH Optimum oleh Isolat K24I7

Aktivitas enzim pektinase isolat K24I7 berangsur turun di pH 6, namun tidak signifikan. Kondisi tersebut diakibatkan oleh adanya pergantian pH yang bisa mempengaruhi tempat aktif enzim pada substrat enzim, dengan begitu enzim tidak lagi dapat berfungsi dengan maksimal dan nilai aktivitasnya menurun. Penurunan tersebut memperlihatkan bahwasanya struktur enzim dan substrat berubah dengan begitu melemahkan ikatan antar keduanya. Besarnya aktivitas suatu enzim tergantung pada gugus aktif pada rantai samping enzim yang bekerja pada sisi katalitik ketika mengikat substrat (Lahniger, 1997).

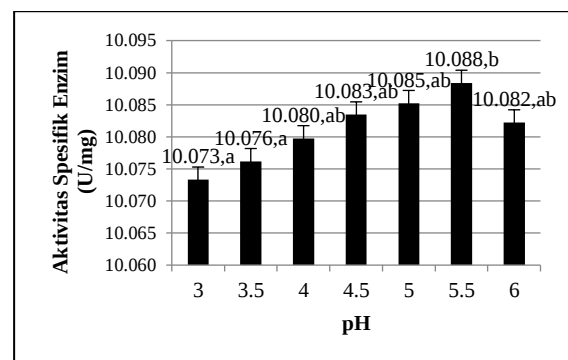
Riset berikut memperlihatkan kadar gula reduksi isolat K24I7 meningkat dari pH 3 menjadi pH 5,5 dengan konsentrasi gula reduksi berkisar antara 2,9146% hingga 2,9189%. Selanjutnya kadar gula pereduksi berangsur menurun di pH 6. Kadar gula pereduksi pada nilai pH yang berbeda ditunjukkan melalui Gambar 10 untuk menentukan pH optimum enzim pektinase.



Gambar 10. Kadar Gula Reduksi Enzim Pektinase pada Penentuan pH Optimum oleh Isolat K24I7

Kadar gula reduksi yang dihasilkan isolat K24I7 berkorelasi positif dengan aktivitas enzim yang dihasilkan. Pada pH 5.5 merupakan pH optimum dengan nilai tertinggi yaitu 2.9189%, sehingga mampu menghasilkan gula-gula sederhana (gula reduksi) yang telah dipecah dan dimanfaatkan untuk produksi asam organik. Sebaliknya, pada pH 3 kadar gula reduksi yang dihasilkan merupakan nilai terendah yaitu 2.9146 %. Pada pH yang rendah akan membuat aktivitas enzim pektinase dari khamir pektinolitik yaitu isolat K24I7 ini kurang maksimal, sehingga gula reduksi yang dihasilkan rendah.

Nilai aktivitas spesifik enzim pektinase sesuai pada aktivitas enzim dan jumlah gula pereduksi yang diproduksi. Hasil tersebut memperlihatkan bahwasanya aktivitas spesifik enzim terbesar diproduksi di pH 5,5. Nilai aktivitas spesifik enzim pektinase di nilai pH yang berbeda ditunjukkan melalui Gambar 11 :



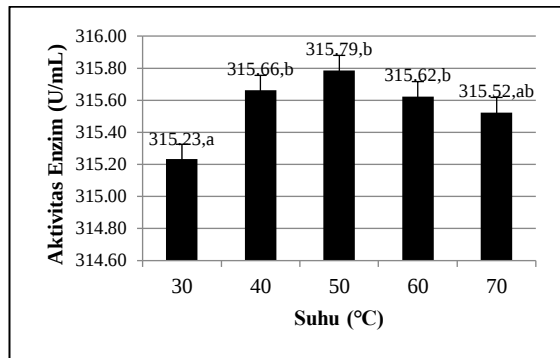
Gambar 11. Aktivitas Spesifik Enzim Pektinase pada Penentuan pH Optimum oleh Isolat K24I7

Keterkaitan aktivitas spesifik enzim pektinase terhadap perlakuan pH menunjukkan bahwasanya dari pH 3 ke pH 5,5 aktivitas tersebut meningkat 0,0003 U/mg, sementara dari pH 5,5 ke pH 6 menurun. Aktivitas terbesar terdapat di pH 5,5 dimana nilainya 10,088 U/mg, sementara yang paling kecil terjadi di pH 3 dimana nilainya 10,073 U/mg. Maka sebab itu, pH 5,5 ialah nilai pH optimal yang dipakai untuk mengkarakterisasi suhu optimal enzim pektinase dengan isolasi K24I7.

Aktivitas Enzim dan Aktivitas Spesifik Enzim Pektinase pada Penentuan Suhu Optimum

Penentuan suhu optimal enzim dilakukan dengan cara yang serupa dengan uji aktivitas enzim, namun dalam uji tersebut

digunakan sejumlah suhu: 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C. Kapabilitas enzim untuk menghidrolisis substrat tergantung pada suhu. Kinerja enzim pada proses katalis reaksi bekerja dengan baik bila terdapat suhu optimal (Purkan et al., 2015). Nilai aktivitas enzim pektinase di suhu yang berbeda diperlihatkan melalui Gambar 12 :



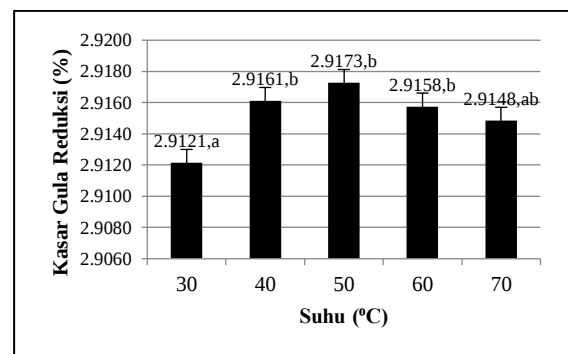
Gambar 12. Aktivitas Enzim Pektinase pada Penentuan Suhu Optimum oleh Isolat K24I7

Aktivitas enzim pektinase yang dihasilkan oleh isolat K24I7 pada suhu 30°C berbeda nyata dengan aktivitas enzim pektinase pada suhu 40°C dengan nilai masing-masing 315.23 U/mL dan 315.66 U/mL. Aktivitas enzim pektinase ini terus meningkat hingga suhu 50°C dan setelahnya enzim pektinase masih aktif pada suhu 60°C dan 70°C. Pada Suhu 60°C hingga 70°C enzim pektinase yang dihasilkan oleh isolat K24I7 masih berjalan dengan efektif. Hal ini ditandai dengan masih diperolehnya aktivitas enzim yang bahkan lebih tinggi dibandingkan pada suhu 30°C. Oleh karena itu, enzim pektinase yang dihasilkan oleh isolat K24I7 bersifat termofil atau tahan terhadap suhu tinggi. Peningkatan suhu sampai batas tertentu akan memperbesar aktivitas enzim hingga mencapai keadaan optimal, akan tetapi peningkatan suhu yang berlebih bisa menurunkan aktivitas enzim (Oktavia et al., 2014).

Aktivitas enzim pektinase pada suhu 40°C hingga 60°C tidak berbeda signifikan. Suhu tersebut merupakan rentan suhu yang dapat menghasilkan aktivitas enzim pektinase tertinggi. Hasil ini menunjukkan bahwa suhu optimum enzim pektinase yang dihasilkan oleh isolat K24I7 berada pada kisaran suhu 40°C sampai dengan 60°C. Kondisi tersebut sesuai dengan pernyataan Yopi et al., (2013) bahwa

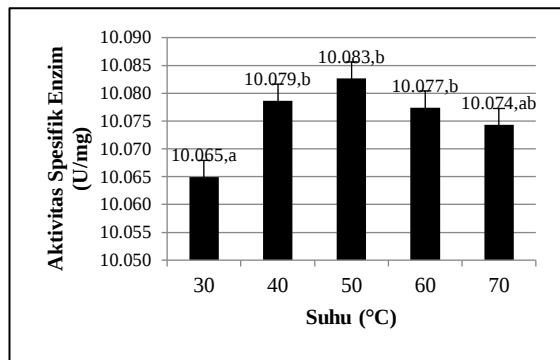
Pektinase yang diproduksi *Aspergillus utus* BL5 menunjukkan tingginya aktivitas saat dioperasikan di suhu antara 40°C hingga 50°C. Kenaikan suhu hingga suhu optimum akan meningkatkan laju reaksi enzim lantaran peningkatan energi kinetik sehingga memudahkan pergerakan enzim dan substrat. (Mulyani et al., 2009).

Kadar gula reduksi yang diproduksi dalam menentukan suhu optimum di rentang suhu 30°C sampai dengan 70°C konsisten pada aktivitas enzim pektinase isolat K24I7. Kadar gula reduksi mengalami peningkatan yang tidak berbeda nyata pada suhu 40°C hingga 60°C, dengan rata-rata kadar gula reduksi yang dihasilkan 2.9164 U/mL. Kadar gula reduksi yang dihasilkan pada suhu 40°C hingga 60°C merupakan rentan suhu optimum enzim pektinase isolat K24I7 yang dapat menghasilkan kadar gula reduksi tertinggi. Kondisi tersebut sesuai pada aktivitas enzim. Kian tinggi aktivitas enzim, akan kian baik metabolisme sel khamir dalam keadaan tersebut dan kian tinggi kandungan senyawa gula pereduksi. Peningkatan kadar gula saat menentukan suhu optimal enzim pektinase yang diproduksi isolat K24I7 diperlihatkan melalui Gambar 13 :



Gambar 13. Kadar Gula Reduksi Enzim Pektinase pada Penentuan Suhu Optimum oleh Isolat K24I7

Aktivitas spesifik suatu enzim memperlihatkan derajat kemurnian enzim tersebut. Semakin tinggi aktivitas spesifik suatu enzim akan kian tinggi juga kemurnian enzim (Wuryanti, 2003). Aktivitas spesifik enzim pektinase dalam suhu yang berbeda diperlihatkan melalui Gambar 14 :



Gambar 14. Aktivitas Spesifik Enzim Pektinase pada Penentuan Suhu Optimum oleh Isolat K24I7

Nilai aktivitas spesifik enzim pektinase yang dihasilkan oleh isolat K24I7 mengalami peningkatan pada suhu 40°C hingga 50°C yaitu 10.079 U/mg sampai dengan 10.083 U/mg. Pada suhu 60°C dan 70°C, aktivitas spesifik enzim belum mengalami penurunan aktivitas yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa enzim pektinase yang dihasilkan oleh isolat K24I7 belum terdenaturasi oleh suhu yang tinggi, sehingga enzim pektinase masih dapat aktif dalam memecah pektin menjadi asam galakturonat. Hasil ini memperlihatkan bahwasanya suhu optimum enzim pektinase yang dihasilkan oleh isolat K24I7 yakni ada di kisaran suhu 40°C hingga 60°C dengan nilai rata-rata aktivitas spesifik enzim pektinase 10.080 U/mg. Bersumber temuan tersebut bisa ditarik simpulan bahwasanya enzim pektinase yang diproduksi isolat K24I7 asal fermentasi spontan biji kopi robusta sanggup berfungsi maksimal di waktu inkubasi 24 jam pada keadaan pH 5.5 dan suhu 40-60°C.

KESIMPULAN

Isolat khamir indigenus yang terlibat pada fermentasi spontan biji kopi robusta diantaranya K24I1, K24I2, K24I3, K24I4, K24I5, K24I6, dan K24I7 diketahui bersifat pektinolitik. Isolat K24I7 menghasilkan aktivitas pektinase tertinggi yang ditandai dengan diameter zona bening yaitu 3.13 mm. Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim pektinase yang diperoleh dari isolat K24I7 adalah pada waktu inkubasi 24 jam isolat K24I7 telah mampu menghasilkan aktivitas enzim yang serupa dengan waktu inkubasi lainnya dengan nilai aktivitas spesifik enzim pektinase yaitu 10.0778 U/mg.

Karakterisasi pH dan suhu terhadap enzim pektinase yang diperoleh dari isolat K24I7 adalah pH optimum berada pada pH 5.5 dengan nilai aktivitas spesifik enzim pektinase yaitu 10.088 U/mg, sedangkan suhu optimumnya berada pada kisaran 40°C-60°C dengan nilai rata-rata aktivitas spesifik enzim pektinase yaitu 10.080 U/mg dan enzim pektinase yang dihasilkan oleh isolat K24I7 ini bersifat termofil karena masih aktif pada suhu 70°C.

DAFTAR PUSTAKA

- Angraini, I., Rejeki, S. F., & Endang, K. 2019. Isolasi Khamir Fermentatif dari Batang Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum*. L) dan Hasil Identifikasinya Berdasarkan Sekuens Internal Transcribed Spacer. *Berkala Bioteknologi*, Vol. 2, No.2
- Antoni, H. 2016. Fermentasi Spontan Bekasam Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Menggunakan Kerak Nasi Kering. Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor : Bogor
- Aryani, S. W. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Selulase dari Kapang Selulolitik *Mucor* sp.B2. *Skripsi*. Surabaya: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga
- Boyd, A. R., Gunasekera, T. S., Attfield, P. V., Simic, K., Vincent, S. F., & Veal, D. A. 2003. A Flow-Cytometric Method For Determination Of Yeast Viability And Cell Number In A Brewery. *FEMS Yeast Research* 3
- Fransistika, R., Nora, I., & Lia, D. 2012. Pengaruh Waktu Fermentasi Campuran *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* Terhadap Kandungan Protein dan Serat Kasar Ampas Sagu. *JKK*, Vol 1 (1) : 35-39
- Glazer, A. N., & Nikaido, H. 2007. Microbial Biotechnology: *Fundamental of Applied Microbiology*. Ed ke-2. Cambridge: Cambridge Univ Pr
- Hardianto., Anton, M., & Antok, W.S. 2018. Optimalisasi Fosfat untuk Meningkatkan Pertumbuhan Kerapatan Populasi dan Kemampuan Antagonis *Saccharomyces cerevisiae* terhadap *Fusarium* sp. *Jurnal Sains dan Teknologi*. Vol. 10 No.2 : 27-41
- Haq, H., M.A. Ashaf & J. Qadeer. 2010. *Pearl*

- millet, a source of α -amylase production by Bacillus licheniformis*. Bioresour. Technol., 96:1201-1204
- Herdyastuti, N., Raharjo, T. J., Mudasir, & Matsjeh. S. 2009. *Chitinase and Chitinolytic Microorganism: Isolation, Characterization, and Potential*. Indo J. Chem. 9 (1): 37-47
- Hikmah, A. N. 2021. Isolasi dan Identifikasi Khamir Indigenus pada Fermentasi Spontan Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Asal Kabupaten Bantaeng. *Skripsi*. Program Studi Pendidikan Teknologi Pertanian Fakultas Teknik Universitas Negeri Makassar. Makassar
- Kusiyanto, G., Purwatiningsih., & Kahar, M. 2019. Skrining dan Identifikasi Bakteri Pektinolitik Endosymbion dalam sistem Pencernaan serangga Penggerek Kopi (*Hypothenemus hampei* Ferr.). *Journal Of Tropical Biology*, Vol. 7. No. 2
- Lahninger, A. L. 1997. *Dasar-Dasar Biokimia*. Thenawidjaja M, penerjemah. Jakarta : Erlangga. Terjemahan dari : Principles of Biochemistry
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. 1951. Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem*, 193: 265-275
- Mashitoh, Ema. 2012. Pengaruh Konsentrasi Sukrosa Terhadap Pertumbuhan Khamir Roti *Saccharomyces cerevisiae* pada Media Bekatul dalam Produksi Protein Sel Tunggal. *Skripsi*. Universitas Sebelas Maret Surakarta
- Mulyani, N. S., Asy'ari, M., & Prasetyoningsih, H. 2009. Penentuan Konsentrasi Optimum Oat Spelt Xylan Pada Produksi Xilanase dari *Aspergillus Niger* dalam Media PDB (Potato Dextrose Borth). *Jurnal Kimia Sains dan Apl*. 12 (1) : 6-8
- Oktavia, Y., Andhikawati, A., Nurhayati, T., & Tarman, K. 2014. Karakterisasi Enzim Kasar Selulase Kapang Endofit dari Lamun. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 6 (1) : 209-218
- Purkan., Purnama, H. D., & Sumarsih, S. 2015. Produksi Enzim Selulase dari *Aspergillus niger* Menggunakan Sekam Padi dan Ampas Tebu sebagai Induser. *Jurnal ilmu dasar*. 16 (2): 95-102
- Safaria, S., Idiawati, N., & Zaharah, T. A. 2013, Efektivitas Campuran Enzim Selulase dari *Aspergillus niger niger* dan *Trichoderma reesei* dalam Menghidrolisis Substrat Sabut Kelapa, *JKK*, 2 (1), 46-51
- Safitri, R., & S. S. Novel. 2013. *Medium Analisis Mikrorganisme (Isolasi dan Kultur)*., Jakarta : Trans Info Media. p. 29-34
- Sieiro, C., Fraga¹, B.G., Seijas¹, J.L., Silva¹, A.F., & Villa, T.G. 2012. *Microbial Pectic Enzymes in the Food and Wine Industry*. Food Industrial Processes Methods and Equipment
- Siska, F., & Astuti, W. 2018. *Isolasi dan Penentuan Kondisi Kerja Optimum Amilase dari Rebung Bambu Serit (Gigantochloa robusta Kurz.)*. Kimia FMIPA UNMUL
- Spencer, J.F.T., & D.M. Spencer. 1997. *Yeasts in Natural and Artificial Habitats*. Berlin: Springer Verlag
- Sumardjo, Darmin. 2009. *Pengantar Kimia : Buku Panduan Kuliah Mahasiswa Kedokteran dan Program Strata I Fakultas Bioeksakta*. Jakarta: EGC
- Suryaningsih, V., Rejeki, S.F., & Endang, K. 2018. Karakteristik Morfologi, Biokimia, dan Molekuler Isolat Khamir IK-2 Hasil Isolasi dari Jus Buah Sirsak (*Annona muricata* L.). *Jurnal Biologi*. Vol 7 No. 1
- Triana, R. 2013. Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Glukosa Oksidase dari Isolat Lokal *Aspergillus niger* (IPBCC.08.610). *Skripsi*. Departemen Biokimia-FMIPA, Institut Pertanian Bogor
- Wuryanti. 2003. Penentuan aktivitas spesifik heksokinase dari limbah anggur pisangbiji. *JSKA* 7(3) : 2,4
- Yopi., Nanik, R., Ade, A., Fitria, D., & Anja, M. 2013. Purifikasi dan Karakterisasi Enzim pektinase dari *Aspergillus utus* BL5. *J. Berita Biologi*. 12 (3)