

## PENGARUH AKTIVITAS $\beta$ -GLUKOSIDASE EKTERNAL DARI KAPANG TERHADAP KADAR VANILIN BUAH VANILI

Dwi Setyaningsih<sup>1)</sup>, Kania Tresnawati<sup>1)</sup>, Maggy T. Soehartono<sup>3)</sup>, dan A. Apriyantono<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB

<sup>2)</sup>Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB

### ABSTRACT

*Vanilla is one of the most widely used and important flavoring materials worldwide. The Indonesian natural vanilla has known for having lower quality than Bourbon due to immature harvested bean and uncompleted curing process. The objective of this research was to increase the vanillin content of cured vanilla by improving the  $\beta$ -glucosidase activity. This research studied the best mold (between *Aspergillus niger* and *A. oryzae*) and the optimum time for producing  $\beta$ -glucosidase enzyme. The analysis was including the  $\beta$ -glucosidase activity, vanillin and glucovanillin content, and reducing sugar content. The mold that produced the highest  $\beta$ -glucosidase activity was *A. niger* with 72 incubation time was 193.7 unit/mg protein. The optimum pH and temperature of enzyme from *A. niger* was 4.5 and 60°C, respectively. The highest vanillin content produced from vanilla homogenat with enzyme extract *A. niger* at 18 hour incubation time was 0.514 mg/100 ml. The homogenate that is incubated with enzyme extract from *A. niger* has the highest glucose content at 48 hour incubation time (8.61 mg/ml). The glucovanillin content from three kind of homogenate was decreasing as long as incubation time from 0.44 mg/ml to 0.00 mg/ml (mold), from 0.26 mg/ml to 0.03 mg/ml (emulsin) and from 0.38 mg/ml to 0.12 mg/ml (endogen).*

**Keywords :**  $\beta$ -glucosidase activity, vanillin, vanilla

### PENDAHULUAN

Vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) adalah salah satu komoditas Indonesia yang memiliki nilai ekonomis tinggi karena kandungan flavor vanili yang dihasilkannya. Produksi vanili Indonesia pada tahun 2000 adalah 1.681 ton senilai US\$ 40.84 juta, tahun 2001 produksi 2.198 ton senilai US\$ 90.69 juta, dan tahun 2002 produksi 2.731 ton senilai US\$ 14.54 juta. Pada tahun 2002 terjadi peningkatan volume ekspor vanili sebesar 769% namun nilai ekspor per tonnya menurun sebesar 12.89% (Statistik Perkebunan Indonesia, 2003). Penurunan nilai ekspor ini disebabkan karena mutu vanili Indonesia belum sesuai dengan standar importir. Mutu ekspor vanili Indonesia sebagian besar berada pada tingkat standar mutu ketiga. Pada bulan Oktober 2005, harga vanili kering Indonesia US\$ 121.03/kg. Harga ini 47.79% lebih rendah dibandingkan harga vanili kering Bourbon yang mencapai US\$ 253.31/kg ([www.amadeusvanillabeans.com](http://www.amadeusvanillabeans.com)). Dengan demikian, peningkatan kualitas vanili kering Indonesia menjadi tingkat pertama merupakan keharusan untuk meningkatkan nilai ekspor (Loeillet, 2003).

Upaya yang dapat dilakukan untuk mengatasi permasalahan mutu vanili kering salah satunya adalah dengan memperbaiki proses *curing* sehingga senyawa prekursor flavor dalam buah vanili dapat berubah seluruhnya menjadi senyawa flavor. Flavor

vanili alami dihasilkan oleh transformasi enzimatik yang terjadi selama proses *curing*. Enzim  $\beta$ -glukosidase berperan terutama dalam menghidrolisis senyawa glikosida menjadi aglikon yang memiliki aktivitas flavor. Rendahnya kualitas flavor vanili diduga terjadi karena tidak semua glikosida terhidrolisis menjadi aglikon yang disebabkan karena rendahnya aktivitas enzim  $\beta$ -glukosidase.

Penambahan aktivitas enzim  $\beta$ -glukosidase eksternal ke dalam homogenat vanili diduga dapat mempercepat terjadinya hidrolisis senyawa glikosida. Hal ini disebabkan terbatasnya kemampuan enzim vanili endogenus karena sifatnya yang kurang tahan panas, pH optimum yang tinggi dan terhambat oleh adanya glukosa. Untuk membuktikan hal tersebut, dilakukan penelitian dengan cara menambahkan enzim  $\beta$ -glukosidase kapang dan enzim  $\beta$ -glukosidase komersial dari almond (emulsin) ke dalam homogenat buah vanili dan selanjutnya diinkubasi dalam inkubator goyang selama 48 jam dan diamati setiap 6 jam.

Penelitian ini bertujuan untuk memilih jenis kapang yang menghasilkan aktivitas enzim  $\beta$ -glukosidase yang tinggi, mengetahui karakteristik enzim dari kapang yang terpilih, dan pengaruhnya terhadap karakteristik (aktivitas enzim, kadar vanillin, kadar gula pereduksi dan glukovanillin) homogenat vanili.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah vanili segar berumur 6-7 bulan, kapang *A. niger* dan *A. oryzae*, xilan (*oat spelt xylan*), pepton,  $K_2HPO_4$ ,  $(NH_4)_2HPO_4$ , ekstrak khamir, buffer asetat pH 4.5, buffer fosfat, vanillin standar, bovine serum albumin untuk standar protein, glukosa, NaOH,  $Na_2CO_3$ , PNPG,  $(NH_4)_2SO_4$ , pereaksi DNS, enzim  $\beta$ -glukosidase komersial, dan perekasi Bradford.

Alat-alat yang digunakan adalah autoklaf, neraca analitik, *blender*, inkubator, mikropipet, labu goyang, penangas air, *hot plate magnetic stirrer*, *magnetic bar*, spektrofotometer, penyaring hampa, pemusing, membran selofan, serta alat-alat gelas.

### Metode Penelitian

#### Penyegaran Biakan

Biakan kapang *A. niger* dan *A. oryzae* diinkubasi pada media PDA dengan metode agar miring selama 5-7 hari suhu 30°C. Setiap 2-4 minggu inokulum kapang disegarkan kembali.

#### Produksi Enzim dengan Metode Fermentasi Terendam

Suspensi inokulum dibuat dengan menambahkan 10 ml air suling steril ke dalam biakan murni yang ditumbuhkan pada media PDA pada suhu 30°C. Selanjutnya suspensi inokulum sebanyak 2 ml diinokulasikan ke dalam 100 ml medium produksi dan diinkubasikan selama 3-4 hari di atas labu goyang dengan suhu 30°C. Komposisi medium produksi adalah *oat spelt xylan* 2%, pepton 1%,  $K_2HPO_4$  0.4%,  $(NH_4)_2HPO_4$  1%, ekstrak khamir 0.3% dan 50 mM buffer asetat pH 4.5 sampai 100%. Setiap 24 jam, medium yang telah terfermentasi diambil untuk diuji aktivitas enzim  $\beta$ -glukosidase. Contoh tersebut disaring terlebih dahulu dan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Filtrat yang dihasilkan diencerkan 10 kali dan dianalisis aktivitas enzimnya dengan substrat pnp-g

#### Semipurifikasi dan Karakterisasi

Media inkubasi kapang yang telah disentrifugasi ditambahkan garam amonium sulfat hingga mencapai tingkat kejenuhan 80%. Setelah dibiarkan satu malam pada suhu rendah (sekitar 5°C), campuran ini selanjutnya disentrifugasi kembali pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Endapan yang terbentuk dilarutkan dengan 50 mM buffer asetat

pH 4.5 sampai volume mencapai 50 ml. Penentuan pH optimum aktivitas enzim  $\beta$ -glukosidase dilakukan pada larutan buffer asetat (pH 4.0-5.5) dan buffer fosfat (pH 6.0-8.0). Suhu optimum ditentukan pada berbagai kisaran suhu mulai dari suhu ruang sampai dengan suhu 80°C.

#### Penerapan Enzim dalam Homogenat Vanili

Buah vanili yang berumur 6-7 bulan disortasi terlebih dahulu. Selanjutnya buah vanili dipotong-potong sepanjang 1-2 cm dan dimasukkan ke dalam *blender*. Larutan enzim dari kapang dan emulsin dilarutkan ke dalam buffer dalam jumlah unit enzim yang sama yaitu 35 IU/l. Larutan enzim ditambahkan ke dalam buah vanili dengan nisbah buah dan larutan 1kg : 2 liter. Selanjutnya campuran diblender selama 10-20 detik. Homogenat yang dihasilkan diinkubasi dalam inkubator goyang suhu 40°C selama 48 jam. Setiap 6 jam homogenat diambil untuk dianalisis. Sebelum dianalisis, contoh terlebih dahulu disaring dan disentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit. Analisis yang dilakukan meliputi aktivitas enzim  $\beta$ -glukosidase, kadar vanillin, dan glukovanillin dengan metode spektrofotometrik, kandungan protein dengan metode Bradford dan kandungan gula pereduksi dengan metode DNS. Diagram alir penelitian dapat dilihat pada Gambar 1.

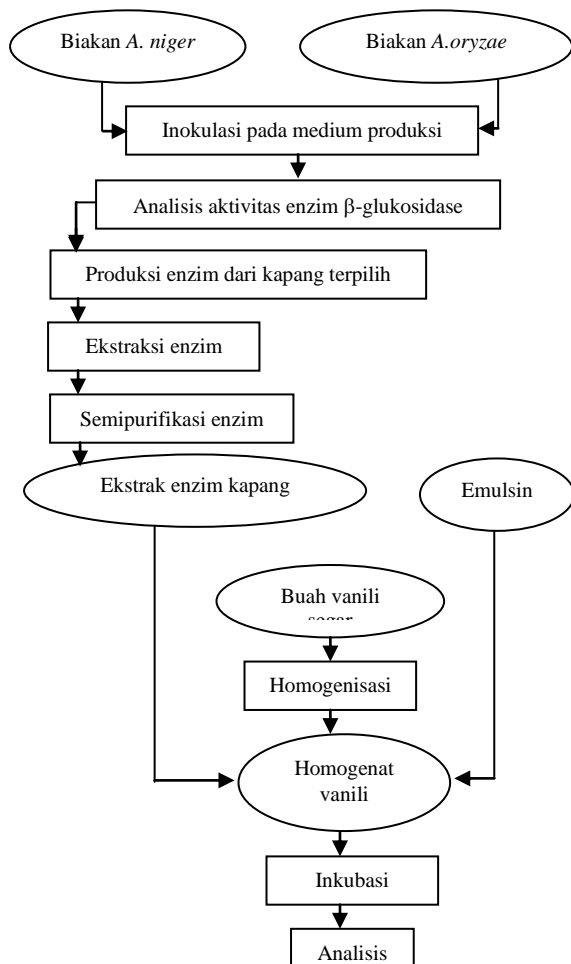
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pemilihan Jenis Kapang

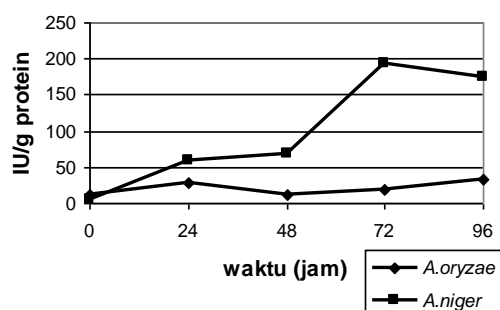
Pada tahap awal, dilakukan pemilihan jenis kapang yang menghasilkan aktivitas enzim  $\beta$ -glukosidase ekstraselular tertinggi dan menentukan waktu inkubasi yang tepat untuk menghasilkan aktivitas tertinggi. Pada tahap penelitian ini digunakan dua jenis kapang yaitu *A. oryzae* dan *A. niger* yang diisolasi dari ragi kecap. Kapang ditumbuhkan dalam medium yang mengandung *oat spelt xylan* 2% untuk menginduksi produksi enzim  $\beta$ -glukosidase. Aktivitas enzim diamati setiap 24 jam sampai 96 jam waktu inkubasi. Pada Gambar 2 terlihat bahwa aktivitas enzim  $\beta$ -glukosidase dari kapang *A. niger* jauh lebih tinggi dibanding kapang *A. oryzae* dan aktivitas mencapai maksimum setelah inkubasi selama 72 jam. Hal ini berhubungan dengan kemampuan *A. niger* dalam menghidrolisis xilan sebagai sumber karbon utamanya, sehingga sel dapat tumbuh dengan baik.

Produksi enzim  $\beta$ -glukosidase meningkat sejalan dengan pertumbuhan sel pada fase logaritmik, karena berhubungan dengan metabolisme primer dalam sel. Selanjutnya pada waktu inkubasi 96 jam terjadi penurunan aktivitas enzim karena telah ter-

capai fase stasioner dimana kecukupan nutrisi dalam medium kurang mendukung pertumbuhan sel.



Gambar 1. Diagram alir metode penelitian



Gambar 2. Aktivitas enzim  $\beta$ -glukosidase dari *A. oryzae* dan *A. niger*

Enzim  $\beta$ -glukosidase dari *A. niger* dapat dipisahkan dengan campuran dekstran dan polietilen glikol dengan kelipatan kemurnian 2-3 kali (Johansson dan Reczey, 1998). Enzim glikosidase komersial dari *A. niger* yaitu Hemicellulose, Pectinol, Rohapect memiliki pH optimum 4.5-6. Meessen *at al.* (1996) menggunakan *A. niger* pada

biokonversi asam ferulat menjadi asam vanilat karena dapat memutuskan rantai propenoat, selanjutnya asam vanilat direduksi menjadi vanillin oleh enzim dari *Pycnoporus cinnabarinus*.

Agar supaya dapat diterapkan ke dalam homogenat vanili, enzim  $\beta$ -glukosidase dari *A. niger* ditingkatkan kemurniannya melalui pengendapan terfraksi dengan garam  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , kemudian dilanjutkan dengan dialisis untuk menghilangkan garam dan senyawa berbobot molekul rendah. Tahapan awal pemurnian dilakukan dengan mengendapkan protein dengan cara penambahan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  secara bertahap hingga tingkat kejenuhan 80%. Pada tingkat kejenuhan ini hampir seluruh enzim  $\beta$ -glukosidase berhasil diendapkan. Keuntungan proses ini adalah protein yang diendapkan tetap mempertahankan bentuk aslinya sehingga dapat dilarutkan kembali tanpa mengalami denaturasi.

Aktivitas  $\beta$ -glukosidase menjadi semakin kecil seiring dengan semakin kecilnya kandungan protein yang terpisahkan pada setiap tahapan proses pemurnian. Hal tersebut berarti bahwa kandungan protein yang diperoleh akan semakin kecil dan spesifik, sehingga aktivitas spesifik semakin meningkat dan tingkat serbasamaan dan kemurnian enzim  $\beta$ -glukosidase semakin tinggi. Diketahui enzim  $\beta$ -glukosidase dari *A. niger* merupakan glikoprotein yang memiliki bobot molekul 116-200 kDa dan menjadi 91 kDa setelah proses deglikosilasi kimiawi (Decker *at al.* 2000).

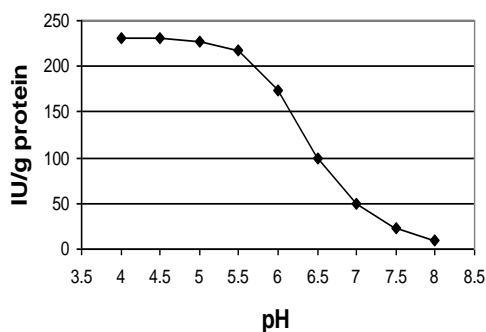
### Karakterisasi Enzim $\beta$ -glukosidase dari Kapang *A. niger*

#### Aktivitas Enzim pada Berbagai Nilai pH

Beberapa karakteristik aktivitas enzim  $\beta$ -glukosidase yang penting dalam reaksi hidrolisis dicirikan untuk mengetahui kondisi proses yang sesuai. Karakteristik tersebut adalah nilai pH, suhu optimum dan stabilitas panas. Dari Gambar 3 diketahui bahwa ekstrak enzim kasar dari *A. niger* memiliki aktivitas  $\beta$ -glukosidase yang tinggi pada pH 4.5. Kemungkinan pada pH ini sisi aktif enzim berada pada kondisi yang stabil sehingga dapat memotong ikatan  $\beta$ -glikosidik menggunakan air sebagai aseptor (Glew *at al.* 1993).

Sisi aktif enzim  $\beta$ -glukosidase memiliki dua gugus fungsional yaitu Asp- $\beta$ -COO dan Glu- $\beta$ -COO, gugus karboksilat (pKa 3.9) berfungsi untuk menstabilkan ion antara oksokarbonium dan gugus asam (pKa 7.3) berfungsi untuk protonasi oksigen anomerik pada substrat glikosida. Pengukuran Decker *at al.* (2000) terhadap enzim  $\beta$ -glukosidase *A. niger* yang telah dimurnikan menggunakan kromatografi, menghasilkan dua jenis enzim yang

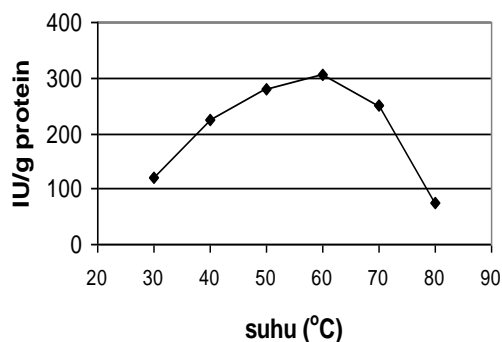
masing-masing memiliki pH optimum 4.2 dan 4.8 dengan titik isoelektrik 4.0.



Gambar 3. Aktivitas enzim β-glukosidase *A. niger* pada berbagai pH

#### Aktivitas Enzim pada Berbagai Suhu

Enzim β-glukosidase kapang *A. niger* memiliki suhu optimum pada 60°C (Gambar 4). Nilai ini tidak berbeda jauh dari penelitian Decker *at al.* (2000) yaitu 65°C. Suhu ini lebih tinggi dibanding enzim β-glukosidase vanili yaitu 40°C. Hal ini sangat menguntungkan karena suhu reaksi dapat ditingkatkan sehingga kecepatan reaksi meningkat.



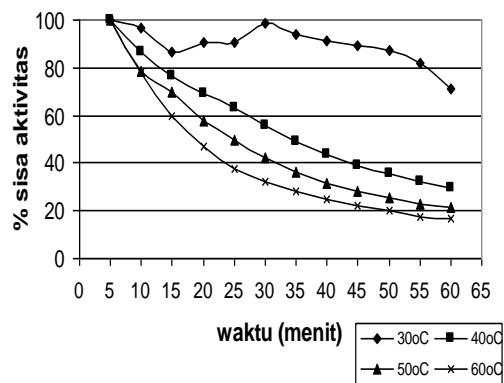
Gambar 4. Nilai suhu optimum aktivitas enzim β-glukosidase *A. niger*

#### Stabilitas Panas

Enzim β-glukosidase dari kapang juga terlihat memiliki stabilitas panas yang sangat baik dibanding enzim endogen dari buah vanili. Perhitungan aktivitas tersisa dapat dilihat pada Gambar 5. Aktivitas enzim β-glukosidase pada suhu 30°C paling stabil yaitu masih tersisa 70% selama pemanasan 60 menit. Aktivitas enzim β-glukosidase mencapai 50% setelah 35, 25 dan 20 menit masing-masing pada suhu 40, 50 dan 60°C. Hal ini berkaitan dengan stabilitas konformasi enzim terhadap denaturasi oleh panas.

Suhu dan waktu merupakan faktor penting untuk mengontrol reaksi kimiawi, enzimatik dan

mikrobiologi sehingga berjalan sesuai dengan yang diinginkan. Reaksi penonaktifan enzim dan mematikan mikroba dapat dianggap sebagai reaksi orde pertama. Waktu yang dibutuhkan pada suhu tertentu untuk menurunkan aktivitas 10 kali dari aktivitas awal disebut nilai D. Berdasarkan pengukuran aktivitas tersisa dari enzim pada masing-masing suhu dihitung besarnya nilai k. Nilai  $\ln k$  terhadap  $1/T$  digambar dalam kurva Arrhenius yang selanjutnya digunakan untuk menghitung energi aktivasi ( $E_a$ ).



Gambar 5. Aktivitas tersisa enzim β-glukosidase kapang *A. niger*

$E_a$  untuk reaksi enzimatik berkisar antara 4-15 kkal/mol, sedangkan katalisator asam atau basa berkisar 20-40 kkal/mol (Winarno, 1986).  $E_a$  reaksi enzimatik bergantung pada jenis substrat, khususnya jika enzim memiliki lebih dari satu substrat. Sebagai contoh enzim alkohol dehidrogenase biji kacang memiliki kisaran  $E_a$  untuk reaksi dehidrogenasi alkohol berkisar 15-40 kJ/mol, sedangkan untuk reaksi reduksi aldehida berkisar 18-21 kJ/mol. Hal ini juga memperlihatkan reaksi kebalikan yaitu reduksi aldehida kurang dipengaruhi oleh jenis substrat (Hoyem dan Kvalle, 1977).

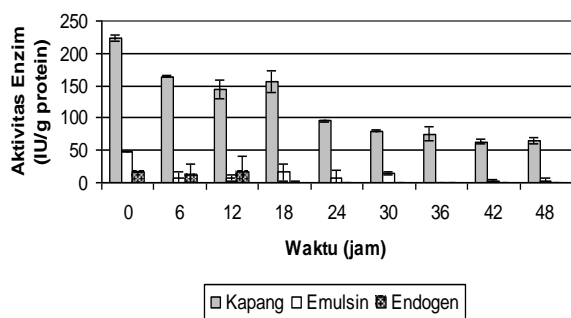
Berdasarkan hasil perhitungan diperoleh nilai energi aktivasi (hidrolisis) untuk ekstrak enzim β-glukosidase *A. niger* adalah sebesar 8.12 kkal/mol. Nilai yang rendah menunjukkan bahwa reaksi hidrolisis oleh enzim dapat ditingkatkan oleh kenaikan suhu, namun kenaikan aktivitas tidak berlangsung secara drastis. Hal ini juga dapat dilihat pada kurva suhu optimum enzim dimana pada kisaran 40-60 °C terjadi kenaikan aktivitas hidrolisis yang landai (Gambar 5). Setelah tercapai suhu 60°C terjadi penurunan aktivitas enzim, diduga  $E_a$  untuk penonaktifan lebih tinggi karena kurvanya lebih curam. Hal ini juga terjadi pada enzim β-amilase dengan nilai  $E_a$  (inaktivasi) sebesar 295 kJ/mol jauh lebih tinggi dibanding  $E_a$  (hidrolisis) sebesar 20 kJ/mol (Hoyem dan Kvalle, 1977). Reaksi enzimatik memiliki nilai optimum yang mana ketergantungan terhadap suhu

mencapai maksimum sebagai hasil pengaruh reaksi katalitik dan reaksi penonaktifan enzim. Kedua reaksi ini memiliki nilai energi aktivasi ( $E_a$ ) yang sangat berbeda. Kedua nilai  $E_a$  dapat digunakan untuk menduga laju relatif reaksi katalitik dan reaksi penonaktifan pada berbagai suhu.

Energi aktivasi ( $E_a$ ) enzim  $\beta$ -glukosidase vanili pada kisaran suhu 40-80°C adalah 5.78 kkal/mol, sementara  $E_a$  enzim  $\beta$ -glukosidase ekstrak *A. niger* pada kisaran suhu 40-60 °C adalah 8.12 kkal/mol.  $E_a$  enzim vanili yang diperoleh adalah untuk reaksi inaktivasi karena pada suhu tersebut telah terjadi penurunan aktivitas enzim, sedangkan pada *A. niger* adalah untuk reaksi hidrolisis karena masih terjadi kenaikan aktivitas hidrolisis. Kedua jenis enzim ini memiliki nilai  $E_a$  yang hampir sama, hal ini menunjukkan panas atau kenaikan suhu menghasilkan pola pengaruh yang hampir sama meski pada kisaran suhu aktivitas yang berbeda.

#### ***Inkubasi Homogenat Buah Vanili dengan Penambahan Enzim***

Bagian ketiga dari penelitian ini merupakan penerapan ekstrak enzim  $\beta$ -glukosidase dari kapang *A. niger* ke dalam homogenat buah vanili. Pada penelitian ini digunakan suhu inkubasi 40°C dengan harapan enzim endogen dari buah vanili masih dapat berperan. Dengan demikian, aktivitas enzim endogen ini dapat digunakan sebagai pembanding.



Gambar 6. Aktivitas enzim selama inkubasi homogenat buah vanili

Gambar 6 memperlihatkan bahwa aktivitas enzim  $\beta$ -glukosidase pada homogenat vanili yang diinkubasi dengan ekstrak enzim dari kapang *A. niger* lebih tinggi dibanding emulsin dan enzim endogen vanili (tanpa penambahan enzim). Dengan demikian, pemanfaatan enzim  $\beta$ -glukosidase dari *A. niger* cukup tepat untuk proses hidrolisis senyawa glikosida dalam homogenat buah vanili. Enzim ini tahan terhadap pH rendah dan aktivitasnya mendekati optimum pada pH homogenat vanili yaitu sekitar 5.0. Enzim juga memiliki stabilitas yang baik terhadap pemanasan. Hal ini sesuai dengan fungsinya

sebagai enzim ekstraselular yang berperan dalam memecah substrat di luar sel.

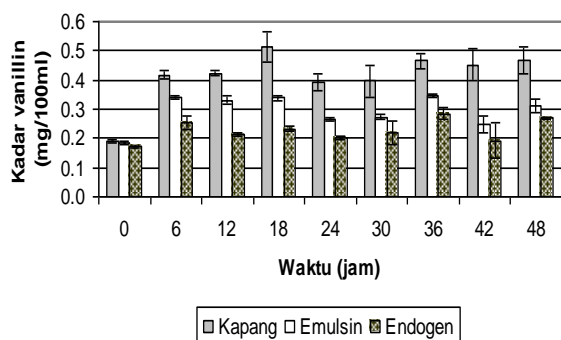
Selain itu, meskipun telah dimurnikan sebagai ekstrak kapang ini mungkin masih mengandung enzim-enzim lain yang juga memiliki aktivitas hidrolitik tinggi. Seperti dijelaskan oleh Sulistyono *et al.* (1998), bahwa enzim dari *A. pulverulentus* selain memiliki aktivitas  $\beta$ -glukosidase juga memiliki aktivitas pektinase dan  $\beta$ -xilosidase yang cukup tinggi. Enzim ini kemungkinan dapat melonggarkan serat-serat selulosa dalam homogenat buah vanili sehingga substrat glukovanillin lebih mudah terlepas ke media dan kontak dengan enzim.

Sementara itu, aktivitas enzim emulsin sangat sedikit diatas kontrol dan aktivitas enzim  $\beta$ -glukosidase endogen buah vanili tidak dijumpai lagi setelah 18 jam inkubasi. Hal ini menunjukkan bahwa emulsin kurang stabil untuk digunakan dalam sistem homogenat vanili. Enzim endogen vanili dan emulsin keduanya berasal dari tanaman sehingga mungkin memiliki struktur yang mirip dan memiliki stabilitas panas dan ketahanan terhadap pH yang rendah. Selain itu, aktivitas enzim ini mungkin dihambat oleh adanya inhibitor berupa senyawa fenolik yang berasal dari buah vanili sendiri. Pada jaringan buah vanili utuh, kemungkinan enzim  $\beta$ -glukosidase terikat pada dinding sel atau pada sitoplasma sementara metabolit terdapat pada vakuola sehingga tidak memungkinkan terjadi kontak yang menyebabkan penonaktifan enzim.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa homogenat vanili dan waktu inkubasi memiliki pengaruh yang berbeda nyata terhadap aktivitas enzim. Berdasarkan uji lanjut Duncan diketahui bahwa aktivitas enzim tertinggi diperoleh dari homogenat yang diinkubasi dengan ekstrak enzim dari kapang. Aktivitas enzim tertinggi dicapai pada jam ke-0.

Vanilin merupakan senyawa mudah menguap yang paling dominan dan menentukan klas mutu buah vanili kering. Senyawa vanillin berada dalam bentuk konjugat gliko glukovanillin, yaitu vanilin yang terikat dengan satu gugus  $\beta$ -D-glukosa. Kadar vanilin dari perlakuan inkubasi dengan enzim *A. niger* menunjukkan nilai yang lebih tinggi dibanding enzim emulsin dan kontrol. Dari Gambar 7 terlihat bahwa kecenderungan pembentukan vanilin ini sejalan dengan kecenderungan yang terjadi pada aktivitas enzim  $\beta$ -glukosidase yang terukur. Hal ini juga terlihat pada pengamatan jam ke 18, yang terjadi sedikit kenaikan aktivitas enzim dan kenaikan kadar vanilin pada homogenat yang diinkubasi dengan enzim dari *A. niger*. Akan tetapi kenaikan aktivitas glukosidase karena enzim dari *A. niger* yang rata-rata sekitar 15 kali dibanding enzim emulsin, tidak menghasilkan kenaikan kadar vanilin sebanyak itu pula, kadar vanilin hanya meningkat 1.2-1.8 kali.

Hal ini mungkin karena ketersediaan glukovanillin yang terbatas pada homogenat vanili.



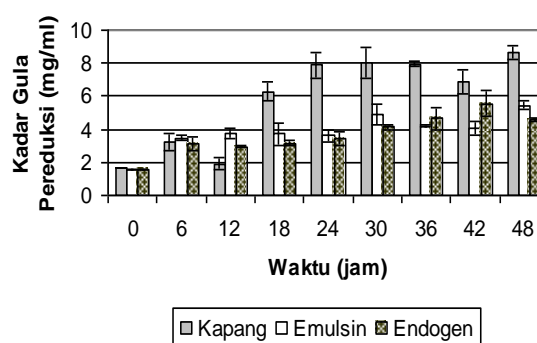
Gambar 7. Kadar vanillin selama inkubasi homogenat buah vanili

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa homogenat vanili dan waktu inkubasi memiliki pengaruh yang berbeda nyata terhadap kadar vanilin. Berdasarkan uji lanjut Duncan diketahui bahwa kadar vanilin tertinggi diperoleh dari homogenat yang diinkubasi dengan ekstrak enzim dari kapang dicapai pada jam ke-18.

Pada penelitian ini diperoleh kadar vanilin sebesar 0.514 mg/ml selama 18 jam inkubasi. Kadar vanilin yang diperoleh sangat tergantung dari satuan pengukuran dan proses ekstraksi, perbandingan air dan buah vanili, serta kondisi bahan baku buah vanili segar yang digunakan. Lamanya inkubasi pada penelitian ini disebabkan aktivitas enzim yang digunakan sangat rendah dibandingkan dengan penelitian Brunerie (1998) dan Ruiz-Teran *at al.* (2001). Penelitian Brunerie (1998) menunjukkan bahwa enzim pektinase 220 unit/g buah vanili menghasilkan kadar vanilin tertinggi yaitu 1.5 g/kg buah vanili selama inkubasi 7 jam dalam bufer sitrat fosfat pH 5 (1:1).

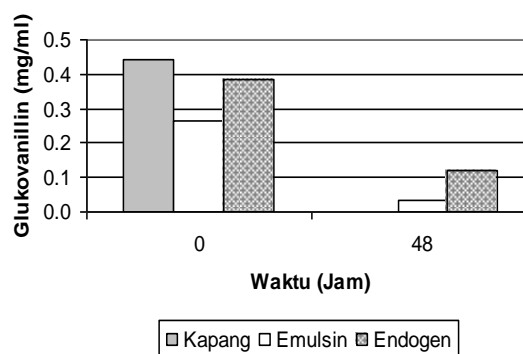
Penelitian serupa oleh Ruiz-Teran *at al.* (2001) menggunakan enzim komersial 1% (v/v) Celluclast dan 1% (v/v) Viscozyme (aktivitas  $\beta$ -glukosidase masing-masing 5.0 dan 5.8 mg glukosa/ml enzim.min) dalam 150 air suling, menghasilkan kadar vanilin 3.66 g/100g (bk) dalam 50 g potongan buah vanili yang diinkubasi selama 8 jam, suhu 50°C diikuti dengan penambahan etanol 1:1 pada cairan hasil inkubasi. Jika tanpa penambahan etanol kadar vanilin hanya 2.30 g/100g (bk). Vanili kering menghasilkan kadar vanilin 1.14 g/100g (bk) dan vanili segar tanpa enzim 1.07 g/100g (bk). Hasil yang diperoleh Ruiz-Teran (2001) ini tampak sangat tinggi mengingat hasil penelitian sebelumnya kenaikan kadar vanilin dari vanili kering jika ditambah enzim hanya berkisar 14-24% (Ranadive, 1992; Mane dan Zucca, 1993) dan vanili segar hanya mengandung vanilin 0.2 g/100g (bk).

Glukosa merupakan gula yang paling banyak dijumpai pada senyawa glikosida. Pengukuran kadar gula pereduksi dapat digunakan untuk menduga jumlah senyawa glikosida yang terhidrolisis. Substrat glukovanilin terhidrolisis menghasilkan glukosa dan vanilin dengan perbandingan yang sama. Oleh karena itu kecenderungan kenaikan kadar glukosa dari homogenat terlihat sejalan dengan kenaikan kadar vanilin yang kadarnya relatif stabil setelah 24 jam. Homogenat vanili yang diinkubasi dengan enzim dari *A. niger* menunjukkan kenaikan kadar gula pereduksi yang lebih tinggi dibanding perlakuan lainnya (Gambar 8). Diduga pada inkubasi ini belum terjadi kontaminasi oleh mikroba yang dapat memanfaatkan glukosa sebagai substrat, karena homogenat vanili mengandung vanillin dan senyawa fenolik lain yang bersifat antimikroba.



Gambar 8. Kadar gula pereduksi selama inkubasi homogenat buah vanili

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa homogenat vanili dan waktu inkubasi memiliki pengaruh yang berbeda nyata terhadap gula pereduksi. Berdasarkan uji lanjut Duncan diketahui bahwa gula pereduksi tertinggi diperoleh dari homogenat yang diinkubasi dengan ekstrak enzim dari kapang. Gula pereduksi tertinggi dicapai pada jam ke-48.



Gambar 9. Kadar glukovanillin selama inkubasi homogenat buah vanili

Untuk mengetahui kesempurnaan reaksi hidrolisis senyawa glukovanilin, dilakukan pengukuran kadar glukovanilin pada awal (0 jam) dan akhir proses inkubasi (setelah 48 jam). Berdasarkan Gambar 9, terlihat bahwa kadar glukovanilin dari ketiga jenis homogenat mengalami penurunan seiring dengan semakin lamanya waktu inkubasi.

Hal ini menunjukkan proses hidrolisis senyawa glukovanilin dapat berlangsung dengan baik pada ketiga jenis contoh, karena pada akhir proses inkubasi yaitu setelah 48 jam terjadi penurunan kadar glukovanilin. Penurunan yang tertinggi terjadi pada homogenat dengan penambahan enzim *A. niger* yaitu sebesar 100%, yang mana pada akhir proses tersisa lagi senyawa glukovanilin. Tampaknya reaksi hidrolisis pada homogenat ini telah sempurna jauh sebelum waktu 48 jam, karena kadar vanilin telah mencapai maksimum setelah 18 jam. Sedangkan contoh yang menggunakan emulsi masih tersisa glukovanilin sebesar 13.2% dan tanpa penambahan enzim tersisa sebesar 31.4%. Kemungkinan sisa senyawa glukovanilin pada kedua homogenat ini tidak dapat terhidrolisis lebih lanjut meskipun waktu inkubasi diperpanjang karena hilangnya aktivitas enzim  $\beta$ -glukosidase.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa homogenat vanili dan waktu inkubasi memiliki pengaruh yang berbeda nyata terhadap glukovanilin. Berdasarkan uji lanjut Duncan diketahui bahwa glukovanilin tertinggi diperoleh dari homogenat yang diinkubasi dengan ekstrak enzim dari endogen.

Berdasarkan hasil penelitian ini diketahui bahwa aktivitas enzim  $\beta$ -glukosidase berperan penting terhadap hidrolisis senyawa glikosida dan kenaikan kadar vanilin. Akan tetapi, peranan enzim  $\beta$ -glukosidase endogen yang berasal dari buah vanili sendiri kurang terlihat pada sistem homogenat ini. Hal ini sesuai dengan pengamatan pada proses *curing* dimana aktivitas enzim  $\beta$ -glukosidase vanili yang terlarut tidak memiliki hubungan langsung dengan peningkatan kadar vanilin.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

*A. niger* mampu menghasilkan aktivitas enzim  $\beta$ -glukosidase yang lebih tinggi dari pada *A. oryzae*. Aktivitas tertinggi diperoleh pada waktu inkubasi 72 jam (193.7 IU/g protein), pH optimum 4.5 (231.5 IU/g protein), suhu optimum 60°C (307.1 IU/g protein).

Ekstrak enzim dari kapang *A. Niger* memberikan pengaruh yang lebih baik dibanding enzim  $\beta$ -glukosidase komersial. Homogenat vanili yang diinkubasi dengan ekstrak enzim dari kapang *A. niger* memiliki aktivitas enzim tertinggi pada waktu

inkubasi 0 jam (223.4 IU/g protein), kadar vanilin tertinggi pada waktu inkubasi 18 jam (0.514 mg/100ml), kadar gula pereduksi tertinggi pada waktu inkubasi 48 jam (8.61 mg/ml), dan kadar glukovanilin menurun seiring dengan waktu inkubasi (dari 0.44 mg/ml menjadi 0.00 mg/ml).

### Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat pengaruh penambahan enzim murni  $\beta$ -glukosidase dari kapang *A. niger* terhadap proses *curing* buah vanili.

## DAFTAR PUSTAKA

- Brunerie, P.M. 1998. Process for the production of natural vanilla extract by enzymatic processing of green vanilla pods, and extract thereby obtained. US Patent 5,705,205
- Decker, C.H., J. Visser, P. Schreier. 2000.  $\beta$ -Glucosidase from five black *Aspergillus* species : study of their physico-chemical and biocatalytic properties. J. Agric. Food Chem. 48, 4929-4936
- Glew, R.H., V. Gopalan, G.W. Forsyth dan D.J. Vanderjagt. 1993. The mammalian cytosolic broad specificity  $\beta$ -glucosidase. Di dalam  $\beta$ -Glucosidases Biochemistry and Molecular Biology. Esen, A (ed). American Chemical Society. Washington DC
- <http://www.amadeusvanillabeans.com>. 2005. Whole vanilla beans and vanilla extracts.
- Hoyem, K dan O. Kvale. 1977. Physical, chemical and biological changes in food caused by thermal processing. Applied Science Publishers Ltd. London
- Johansson, G. dan K. Reczey. 1998. Concentration and purification of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* by using aqueous two-phase partitioning. J. Chromatogr. B, 711, 161-172
- Loeillet, D. 2003. *The international vanilla market Price is the main handicap*. Fruitrop. Januari, no. 98
- Mane, J, Zucca, J. 1993. *Process for Production of Natural Vanilla Flavour by Treatment of Vanilla Pods and Vanilla Flavour so Produced*. Fr. Patent Appl. PN FR 2691880A1.
- Meessen-Lesage L., Delattre M., Haon M., Thibault J-F., Ceccaldi B. C., Brunerie P dan Asther M. 1996. *A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining Aspergillus niger and Pycnoporus cinnabarinus*. J.

- Ranadive, A.S. 1992. *Vanillin and related flavor compounds in vanilla extracts made from beans of various global origins*. J. Agric. Food Chem. 40, 1922-1924
- Ruiz-Teran, F., I. Perez-Amador, A. Lopez-Munguia. 2001. *Enzymatic extraction and transformation of glucovanillin to vanillin from vanilla green Pods*. J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 5207-5209
- Statistik Perkebunan Indonesia. 2003. Vanili. Direktorat Jendral Bina Produksi Perkebunan. Jakarta
- Sulistyo, J., Y. S. Soeka, P. Dewi. 1998. Semipurifikasi dan uji reaksi transglukosilasi  $\alpha$ -glukosidase dari *Aspergillus purverulentus*. Berita Biologi vol. 4.
- Winarno, F.G. 1986. Enzim pangan, PT. Grmedia Jakarta.