

KARAKTERISASI ENZIM β -GLUKOSIDASE VANILI

[Characterization of β -glucosidase Enzyme from Vanilla Bean]

Dwi Setyaningsih¹⁾, Maggy T. Soehartono²⁾, Anton Apriyantono²⁾, dan Ika Mariska³⁾

¹⁾ Departemen Teknologi Industri Pertanian, FATETA-IPB

²⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan FATETA-IPB

³⁾ Balai Penelitian Biologi dan Sumberdaya Genetika Tanaman, Cimanggung, Bogor

Diterima 2 Februari 2007/ Disetujui 13 Desember 2007

ABSTRACT

The Indonesian natural vanilla is known for having a unique woody, smoky, and phenolic flavor. Development of the aroma and flavor vanilla was formed by the action of a hydrolytic enzyme β -glucosidase on glucovanillin. The objective of this research was to characterize vanilla β -glucosidase. The vanilla β -glucosidase activity was increased by detergent. The enzyme was found as heat labile. Scalding should be conducted at 40°C for 25-30 minutes or at 60°C for 2-3 minutes. The result from β -glucosidase activity in each part of vanilla and microscopic analysis of vanilla bean slice showed that the highest β -glucosidase activity and vanillin concentrations were found in the seed funicles and placental tissue of the vanilla bean. The activity of vanilla β -glucosidase was optimum at pH 6,0, and temperature of 40°C, found as and activation energy was 5,78 kcal/mole. After 44 minutes incubation time at 40°C. The activity was reduced down to 10%. The apparent of molecular weight was 100-400 kDa according to gel setration (Sephacryl S-300) analysis.

Key words : *Vanilla planifolia*, β -glucosidase

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. 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).

Vanili Indonesia memiliki flavor kurang manis dan creamy serta flavor kayu, asap dan jerami. Profil vanili Indonesia hanya memiliki satu dimensi dibanding Bourbon (Brownell, 1997). Syarat penting untuk memperbaiki flavor adalah pengetahuan mengenai jalur biosintesis vanillin dan peranan enzim dalam pembentukan komponen flavor selama proses curing.

Dalam buah vanili segar, beberapa komponen flavor vanili seperti vanillin, p-hidroksi benzaldehid, asam vanillat, asam p-hidroksi benzoat, berada dalam bentuk glikosidiknya (Leong et al., 1989; Kanisawa et al., 1994). Enzim β -glucosidase pada buah vanili terdistribusi

berbeda antar bagian-bagian buah. Bagian pangkal, ujung, daging, kulit dan biji mempunyai kandungan enzim β -glucosidase yang berbeda-beda.

Senyawa glikosida berubah menjadi senyawa flavor volatil jika ikatan glikosida terhidrolisis terutama oleh enzim β -glucosidase (Arana, 1943). Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa enzim terikat pada dinding sel buah vanili. Oleh karena itu untuk mendapatkan ekstrak enzim yang memiliki aktivitas tinggi digunakan *detergent* untuk melepaskan enzim yang terikat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik enzim β -glucosidase meliputi pengaruh penambahan *detergent* terhadap aktivitas spesifik dan aktivitas total enzim, stabilitas panas, suhu dan pH optimum, distribusi enzim dan vanillin pada buah vanili, energi aktivasi, serta berat molekul enzim.

METODOLOGI

Bahan utama yang digunakan adalah buah vanili segar umur 6-8 bulan tipe Bogor, bufer Bis-tris propan 150 mM, bufer fosfat, Triton X-100, Tween-20, Dithiothreitol (DTT), *polyvinyl polypyrrolidone* (PVPP), *paranitrophenyl- β -glucopyranosidase* (pnp-g), dan vanillin standar. Peralatan yang digunakan mikroskop, blender, corong *buchner*, timbangan, sentrifuse, pompa vakum, kolom kromatografi, mikropipet, spektrofotometer dan peralatan gelas.

Analisis dilakukan terhadap tiga macam ekstrak dari buah vanili segar, yaitu ekstrak dengan buffer Bis tris

propan 150 mM, pH 8,0 dengan penambahan Triton X-100 1%, ekstrak dengan penambahan Tween-20 1% dan tanpa penambahan *detergent*. Sebagai pembanding juga dilakukan ekstraksi menggunakan buffer fosfat 34 mM, pH 6.6. Selama ekstraksi ditambahkan PVPP yang berfungsi untuk mengikat senyawa fenolik. Selanjutnya ekstrak disaring, disentrifus dan disaring kembali dengan corong *buchner*. Ekstrak kasar didialisis selama semalam dengan akuades dan disimpan pada suhu 4°C sebelum digunakan.

Pengujian dilakukan terhadap aktivitas enzim β-glukosidase dari ketiga jenis ekstrak, penentuan suhu optimum, pH optimum dan stabilitas terhadap suhu. Spesifitas enzim terhadap glukovanillin dan pnp-g ditentukan dengan cara ekstrak enzim (tanpa *detergent*) dielusi dalam kolom *anion exchanger* Q Sepharose dan setiap fraksi genap dianalisis aktivitas β-glukosidase menggunakan substrat glukovanillin dan pnp-g. Analisis aktivitas enzim juga dilakukan pada berbagai bagian buah yaitu ujung, pangkal dan bagian tengah yang terbagi menjadi kulit, daging, dan biji serta pengamatan terhadap bagian-bagian tersebut secara mikroskopis.

Analisis aktivitas enzim dilakukan dengan cara buah vanili segar dipotong-potong sepanjang 1 cm dan dimasukkan ke dalam blender. Ditambahkan bufer bis-tris propan 150 mM pH 8,0 yang mengandung 2 mM EDTA dan 3 mM DTT, sebanyak 1:1 dan 5% PVPP. Campuran diblender selama 10 detik dan disentrifus 3000g selama 30 menit suhu 4°C dan disimpan pada suhu 4°C. Ekstrak untuk karakterisasi enzim disentrifus 8000 rpm selama 30 menit suhu 4°C dan didialisis semalam dengan air destilata.

Uji dengan substrat pnp-g

Assay β-glukosidase berdasarkan Lujijendijk et al. (1998). Sebanyak 25 µl ekstrak enzim ditambah bufer fosfat 0,1 M pH 6,3 sebanyak 450 µl dan substrat pnp-g 40 mM sebanyak 25 µl. Setelah inkubasi 30 menit (tergantung dari pembentukan warna), reaksi dihentikan dengan penambahan 800 µl larutan 1 M Na₂CO₃. Setelah sentrifus, absorbansi diukur pada panjang gelombang 400 nm. Aktivitas dihitung menggunakan E = 18.500 M⁻¹cm⁻¹. Aktivitas diukur dalam satuan IU/g protein (IU = µmol/menit).

Pengujian skala makro dilakukan menurut metode Grover et al., (1977). Campuran reaksi yang mengandung 0,5 ml substrat pnp-g 5 mM diinkubasikan dengan 0,5 ml larutan enzim pada suhu 40°C selama 15 menit, pada pH 4,5. Reaksi dihentikan dengan penambahan 5 ml larutan Na₂CO₃ 0,55 M. Campuran reaksi dibiarkan selama 30 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400 nm.

Uji dengan substrat glukovanillin

Sintesis glukovanillin dilakukan dengan mereaksikan vanillin dengan aseto bromoglukosa dalam aseton untuk menghasilkan glukosida terasetilasi, selanjutnya deasetilasi dilakukan dengan sodium

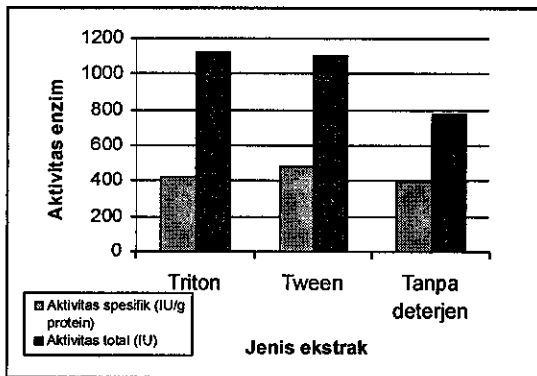
metoksida. Glukovanillin dinetralkan dengan Amberlite LH-120 dan dikromatografi dengan kolom silika.

Fraksi dari kolom Q Sepharose sebanyak 50 µl direaksikan dengan 20 µl, 4 mM glukovanillin dalam 450 µl bufer fosfat pH 6,3 dan diinkubasi selama 60 menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh *detergent* terhadap aktivitas enzim β-glukosidase

Penambahan *detergent* diketahui meningkatkan nilai aktivitas spesifik (IU/g protein) dan aktivitas enzim (pmol/menit) dari total volume ekstrak enzim. Aktivitas spesifik dan aktivitas total dari ketiga jenis ekstrak dapat dilihat pada Gambar 1. Aktivitas spesifik tertinggi diperoleh dari ekstrak dengan penambahan Tween-20 1%. Akan tetapi, aktivitas total tertinggi diperoleh dari ekstrak Triton X-100 1%.

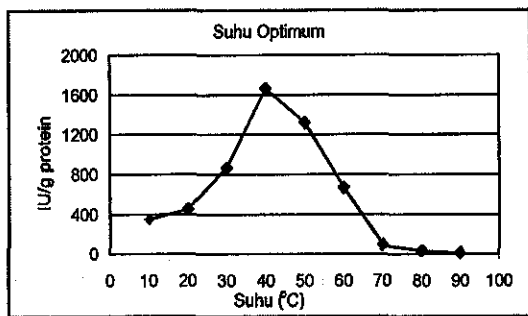


Gambar 1. Pengaruh *detergent* terhadap aktivitas enzim β-glukosidase

Detergent memudahkan pelepasan enzim dari dinding sel tanaman. Diketahui pada kebanyakan tanaman enzim β-glukosidase berada pada bagian apoplastik atau ruang antar sel (Seo et al., 1995). Menurut Michaud dan Asselin (1995) penggunaan *detergent* dapat melarutkan protein membran serta mengikat senyawa fenolik secara efektif.

Suhu optimum

Analisis untuk mengetahui suhu optimum aktivitas enzim dilakukan terhadap ekstrak Triton X-100 1%. Dari Gambar 2 diketahui bahwa suhu optimum untuk aktivitas enzim β-glukosidase dengan waktu reaksi 10 menit adalah 40°C.

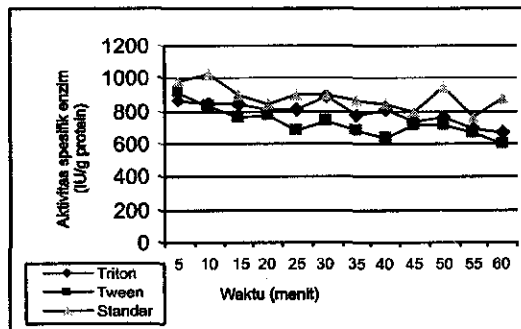


Gambar 2. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim β-glukosidase

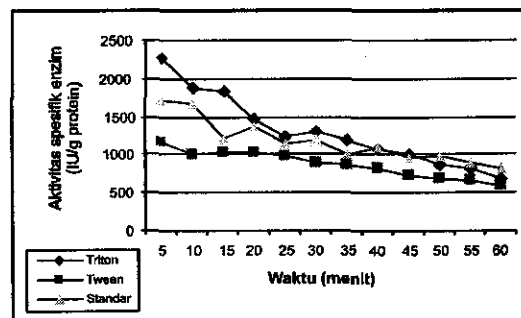
Enzim β-glukosidase vanili yang telah dimurnikan memiliki suhu optimum 40°C (Odoux et al., 2003). Suhu optimum sebagian besar enzim adalah 30-50°C. Pengukuran suhu optimum tergantung dari lamanya reaksi enzim dan substrat serta nilai pH. Enzim, biasanya paling stabil pada pH mendekati titik isoelektriknya (Hoyen dan Kvale, 1997). Enzim β-glukosidase dari vanili relatif kurang stabil di suhu tinggi. Hal ini diduga disebabkan struktur lipatan enzim yang mudah terdenaturasi oleh panas. Perkiraan BM β-glukosidase pada penelitian ini adalah $1-4 \times 10^5$ (kolom Sephacryl S-300). Odoux et al., (2003) menyatakan enzim vanili β-glukosidase merupakan protein terglukosilasi yang memiliki BM 201 kDa, berbentuk tetramer dari 4 subunit yang berukuran sama (50 kDa).

Stabilitas panas

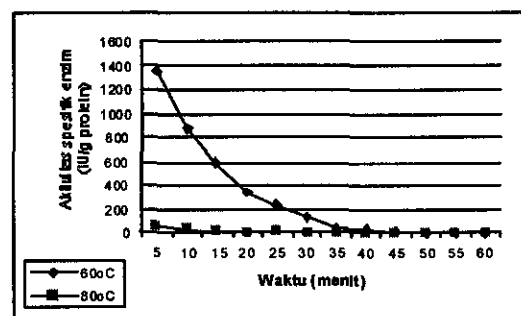
Untuk mengetahui pengaruh berbagai suhu terhadap stabilitas panas enzim, pengukuran aktivitas enzim dilakukan pada suhu 30°C, 40°C, 60°C dan 80°C, diamati setiap 5 menit selama waktu inkubasi 60 menit. Pada suhu 30°C, pembentukan produk berjalan secara linier sampai menit ke-50 dan selanjutnya mulai konstan. Dilihat dari aktivitas spesifik (Gambar 3), pada suhu 30°C ekstrak standar memiliki nilai yang tertinggi pada menit ke-10 sebesar 1031,5 IU/g protein. Hasil pengukuran aktivitas spesifik pada suhu 40°C (Gambar 4), memperlihatkan bahwa ekstrak Triton X-100 1% memiliki nilai yang tertinggi pada menit ke-5 sebesar 2278,8 IU/g protein. Pada suhu 60°C (Gambar 5), laju pembentukan produk hanya berlangsung selama 15 menit dan selanjutnya enzim menjadi kurang aktif dan pada waktu 35 menit enzim sudah kehilangan seluruh aktivitasnya. Pengamatan pada suhu 80°C (Gambar 5) menunjukkan bahwa aktivitas spesifik enzim turun dengan tajam menjadi kurang dari 1% aktivitas awalnya setelah 5 menit dan tidak terukur setelah 20 menit.



Gambar 3. Aktivitas spesifik enzim β-glukosidase pada suhu 30°C



Gambar 4. Aktivitas spesifik enzim β-glukosidase pada suhu 40°C



Gambar 5. Aktivitas spesifik enzim β-glukosidase pada suhu 60°C dan 80°C

Pada suhu 30°C, analisis varian (ANOVA), menunjukkan bahwa macam ekstrak dan waktu ekstraksi mempunyai pengaruh yang berbeda nyata terhadap aktivitas spesifik (IU/g protein). Melalui uji lanjut *Duncan* diketahui bahwa ekstrak tanpa penambahan *detergent* (ekstrak standar), memiliki nilai aktivitas spesifik yang paling tinggi pada waktu ekstraksi 10 menit. Hal ini disebabkan ekstrak dengan penambahan *detergent* Triton X-100 dan Tween-20 memiliki konsentrasi protein yang tinggi, yang berarti terdapat banyak protein lain selain enzim β-glukosidase yang ikut terekstrak.

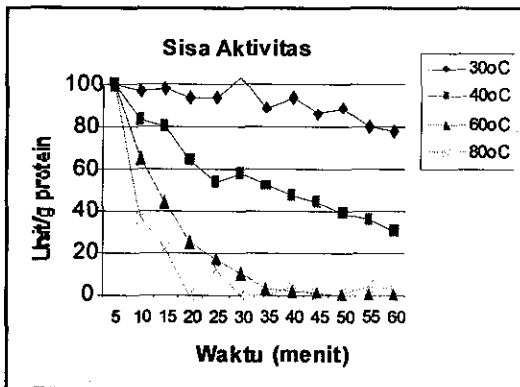
Pada suhu 40°C, analisis varian (ANOVA), menunjuk bahwa macam ekstrak dan waktu ekstraksi mempunyai pengaruh yang berbeda nyata terhadap aktivitas spesifik. Melalui uji lanjut *Duncan* diketahui

bahwa ekstrak dengan penambahan Triton memiliki nilai aktivitas spesifik yang paling besar pada waktu ekstraksi 5 menit. Hasil ini menunjukkan bahwa penambahan *detergent* berhasil melepaskan enzim terikat yang memiliki stabilitas panas lebih tinggi, sehingga aktivitas ekstrak meningkat. Hal ini disebabkan penambahan *detergent* dapat melarutkan protein membran serta mengikat senyawa fenolik. Data ini juga membuktikan bahwa aktivitas spesifik enzim β -glukosidase meningkat hampir dua kali lipat dengan kenaikan suhu sekitar 10°C. Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya terhadap aktivitas enzim yang terikat pada ampas/serat buah vanili. Namun perlu diperhatikan bahwa pelayuan jika dilakukan lebih dari 25 menit akan menurunkan aktivitas enzim.

Berdasarkan analisis varian (ANOVA), diketahui bahwa pada suhu 60°C dan suhu 80°C, waktu ekstraksi mempunyai pengaruh yang berbeda nyata terhadap aktivitas spesifik (IU/g protein) pada ekstrak Triton. Odoux et al., (2003) mengamati pada suhu 70°C, enzim kehilangan seluruh aktivitasnya setelah 30 menit (bufer fosfat 0,1 M, pH 7,0). Nilai aktivitas spesifik yang diperoleh selama 5 menit pertama hampir sama dengan kondisi suhu 30°C. Hal ini menunjukkan bahwa enzim tidak tahan panas dan pelayuan sampai suhu 60°C tidak menyebabkan aktivasi enzim. Berdasarkan hasil diatas, maka proses pelayuan pada kuring vanili harus dilakukan pada suhu 40°C selama 25-30 menit atau 60°C selama 2-3 menit.

Energi aktivasi

Pengukuran aktivitas enzim tersisa digunakan untuk menghitung energi aktivasi (Ea) yaitu energi yang dibutuhkan untuk dapat mengaktifkan enzim pada kondisi optimum. Besarnya aktivitas tersisa dari enzim β -glukosida vanili pada suhu 30°C, 40°C, 60°C dan 80°C terlihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Sisa aktivitas enzim (%) setelah pemanasan pada berbagai suhu

Reaksi penurunan aktivitas enzim ini biasanya mengikuti kinetika ordo pertama. Nilai gradien kemiringan grafik yang linier dari perhitungan aktivitas tersisa digunakan untuk menghitung nilai konstanta laju

reaksi (k). Menurut Winarno (1986), laju reaksi kimia dapat diterangkan dengan menggunakan rumus Arrhenius yang menunjukkan hubungan suhu absolut (T) dengan konstanta kecepatan reaksi kimia. Gradien plot antara ln k dengan 1/T adalah nilai $-E_a/R$. Bila nilai E_a besar, berarti perubahan suhu sangat mempengaruhi kecepatan reaksi, sedangkan bila nilai E_a kecil, maka perubahan suhu tidak banyak mempengaruhi kecepatan reaksi. Enzim-enzim dapat menurunkan harga E_a menjadi sangat kecil sehingga reaksi tetap berlangsung pada suhu rendah. Nilai energi aktivasi enzim β -glukosidase yang rendah menunjukkan bahwa penurunan aktivitas enzim tidak berlangsung secara drastis dengan meningkatnya suhu.

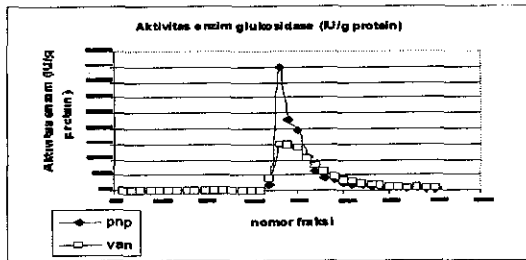
Berdasarkan hasil perhitungan diperoleh energi aktivasi enzim β -glukosidase vanili adalah 5,78 kkal/mol. Pada enzim β -glukosidase vanili, waktu yang dibutuhkan untuk mengurangi aktivitas enzim sampai 10% dari awalnya pada suhu 40 dan 60°C masing-masing adalah 44 dan 22 menit.

Nilai pH optimum

Nilai pH optimum diperlukan untuk mengetahui kondisi yang tepat agar diperoleh aktivitas yang tertinggi. Nilai pH yang paling sesuai untuk aktivitas enzim ini adalah pH 5,5-6,0. Odoux et al., (2003) berhasil memumikan enzim β -glukosidase vanili dari pulau Comoro yang memiliki pH optimum 6,5, sama dengan vanili dari Costa Rica dan Reunion. Sedangkan Hanum (1997) memperoleh nilai pH optimum 4,0 dari vanili Indonesia. Perbedaan ini mungkin disebabkan adanya perbedaan varietas dan kondisi lingkungan.

Perkiraan nilai pl β -glukosidase vanili menggunakan *chromatofocusing* adalah 4,9. Pada pH optimum diduga enzim β -glukosidase memiliki muatan negatif karena berada di atas titik isoelektiknya. Aktifitas enzim β -glukosidase dipengaruhi oleh pH karena tingkat ionisasi dua gugus fungsional, yaitu gugus karboksilat (pKa 3,9) yang berfungsi untuk menstabilkan ion intermediet oksokarbonium dan gugus asam (pKa 7,3) yang berfungsi untuk protonasi oksigen anomerik pada substrat glikosida.

Enzim β -glukosidase pada buah vanili secara umum diukur kemampuannya dalam menghidrolisis substrat sintetik pnp-g. Sedangkan diketahui bahwa secara alamiah pada buah vanili, substrat bagi enzim β -glukosidase adalah senyawa glikosida fenolik terutama glukovanillin. Pada penelitian ini ingin diketahui apakah terdapat perbedaan kemampuan enzim dalam menghidrolisis kedua jenis substrat. Aktivitas enzim dijumpai pada fraksi nomor 32-50 pada konduktivitas NaCl 16-20 %.



Gambar 7. Aktivitas enzim hasil elusi dengan kolom Q Sepharose

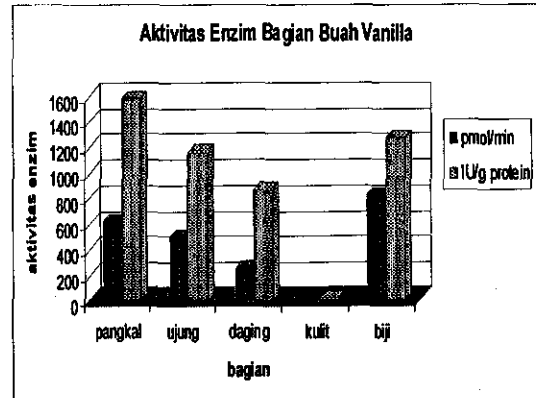
Berdasarkan Gambar 7, diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan kemampuan enzim dalam menghidrolisis substrat sintetik pnp-g maupun substrat glukovanillin, keduanya memiliki puncak aktivitas yang sama yaitu pada fraksi ke-36.

Pada proses kuring vanili diketahui tidak ada hubungan yang erat antara aktivitas enzim β -glukosidase dengan kadar vanillin. Semula diduga hal ini terjadi karena adanya isozim yang spesifik menghidrolisis substrat glukovanillin namun tidak mampu menghidrolisis pnp-g (Dignum, 2002). Pada kecambah sorghum, elusi kolom DE-52 menunjukkan terdapat enzim β -glukosidase yang spesifik terhadap dhurrin sebagai glikosida endogous dan tidak dapat menghidrolisis pnp-g serta sebaliknya yaitu hanya menghidrolisis pnp-g (Esen, 1993).

Namun dugaan adanya isozim spesifik terhadap substrat tampaknya tidak terbukti karena berdasarkan Gambar 7, diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan kemampuan enzim dalam menghidrolisis substrat sintetik pnp-g maupun substrat glukovanillin, keduanya memiliki puncak aktivitas yang sama yaitu pada fraksi ke-36. Odoux et al., (2003) juga menegaskan bahwa enzim β -glukosidase murni memiliki V_{max} dan K_m ($40^{\circ}C$, pH 7) sebesar $4,5 \mu\text{kat}/\text{mg}$ dan $1,1 \text{ mM}$ terhadap pnp-g serta $5,0 \mu\text{kat}/\text{mg}$ dan $20,0 \text{ mM}$ terhadap glukovanillin. Nilai K_m menunjukkan bahwa enzim lebih reaktif terhadap pnp-g dibandingkan glukovanillin. Enzim ini juga memiliki aktivitas relatif dibanding pnp-g sebesar 215 kali terhadap pnp- β -D-fucopyranoside, 61 kali terhadap β -D-galactopyranoside, β -D-xylopyranoside 5 kali, prunasin 300 kali, esculin 92 kali dan salicin 4 kali (Odoux et al., 2003).

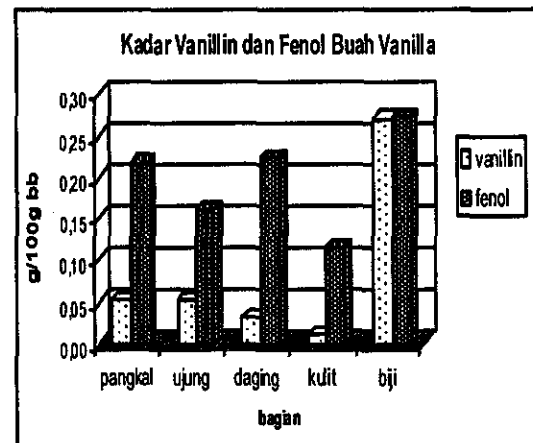
Distribusi enzim β -glukosidase dan vanillin dalam buah vanilla

Enzim β -glukosidase vanili terdistribusi berbeda antar bagian-bagian buah. Pada penelitian ini diamati aktivitas enzim β -glukosidase dan kadar vanillin di bagian pangkal, ujung, kulit, daging dan biji. Gambar 8 menunjukkan bahwa aktivitas enzim β -glukosidase (pmol/menit) pada pangkal dan ujung buah vanili relatif sama, namun aktivitas spesifik enzim (IU/g protein) pada bagian pangkal lebih tinggi.



Gambar 8. Distribusi aktivitas enzim β - glukosidase pada bagian-bagian buah

Kadar fenol juga lebih tinggi pada pangkal buah dibandingkan pada ujung buah, sementara kadar vanillin hampir sama (Gambar 9). Bagian pangkal ($\pm 1 \text{ cm}$) memiliki aktivitas yang lebih tinggi dibanding ujung buah.



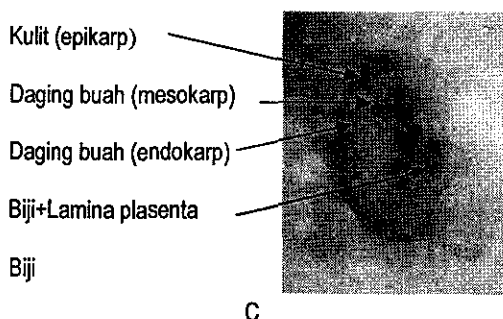
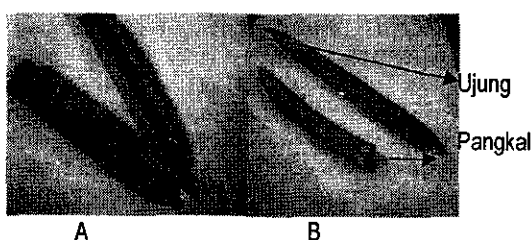
Gambar 9. Distribusi kadar vanillin dan fenol pada bagian-bagian buah

Bagian tengah buah pada penelitian ini dibagi menjadi tiga bagian, yaitu kulit, daging dan biji+jaringan plasenta. Bagian kulit memiliki aktivitas enzim yang terendah, demikian pula dengan kadar vanillin dan fenol. Aktivitas enzim tertinggi terdapat pada biji, meskipun pada bagian ini kadar protein relatif tinggi sehingga aktivitas spesifik lebih rendah dibanding pangkal. Berbeda dengan bagian-bagian lain, kadar vanillin dan fenol pada biji hampir sama (Gambar 9).

Menurut Arana (1994), Vanillin terdistribusi secara longitudinal dengan kadar vanillin tertinggi mulai dari ujung buah (*blossom-end*) dan selanjutnya menurun sampai terendah pada bagian pangkal (*stem-end*) sesuai dengan perubahan warna buah selama pemasakan. Namun pada penelitian ini tidak terbukti demikian.

Bagian pangkal (± 1 cm) memiliki aktivitas yang lebih tinggi dibanding ujung buah. Senyawa vanillin terkonsentrasi pada biji, sedangkan senyawa fenolik lain menyebar pada daging buah.

Hasil pengamatan secara visual seperti yang terlihat pada Gambar 10, Gambar 10 A menunjukkan buah vanili segar yang berbentuk kapsul (panjang), bersudut tiga, panjang 10-25 cm, diameter 5-15 mm dan mempunyai permukaan licin. Gambar 10 B menunjukkan buah vanili yang diiris membujur dengan ribuan biji yang berukuran sangat kecil, biji tidak mempunyai lembaga tetapi mempunyai protocorm. Gambar 10 C menunjukkan irisan melintang buah panili segar untuk pengamatan secara mikroskopis.



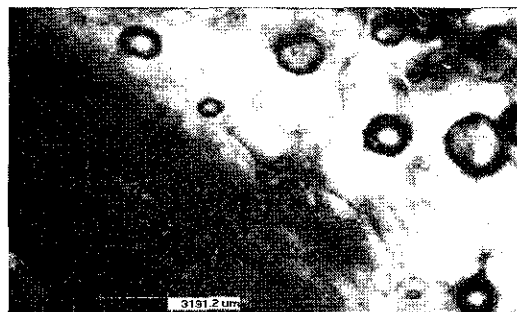
Gambar 10. Buah vanili segar

Keterangan :

- A. Buah vanili segar
- B. Irisan membujur buah vanili segar
- C. Irisan melintang buah vanili segar yang diamati di bawah mikroskop

Arana (1943), menyatakan bahwa enzim β -glukosidase terdapat pada daging buah dan tidak terdapat pada biji, sehingga Dignum (2002) menduga bahwa rendahnya kadar vanillin pada vanili kering disebabkan karena terhambatnya difusi substrat glukovanillin yang pada bagian biji ke dalam bagian daging dimana terdapat enzim β -glukosidase. Namun pada penelitian ini terlihat bahwa baik substrat maupun enzim terkonsentrasi pada bagian yang sama yaitu biji+plasenta buah. Terhambatnya kontak enzim-substrat dalam buah vanili segar disebabkan perbedaan letaknya dalam sel. Substrat terdapat dalam vakuola, yang secara umum merupakan kantung sekresi metabolit sekunder, sementara enzim terdapat di bagian dinding sel atau ruang antar sel. Penelitian sederhana dilakukan dengan melihat irisan melintang buah vanili di bawah mikroskop

berkamera dengan *image processing* yang menangkap gambar secara kontinyu. Perlakuan penambahan substrat pnp-g di sekitar biji + jaringan plasenta menyebabkan terbentuknya gumpalan-gumpalan berwarna kuning yang menandakan adanya aktivitas enzim β -glukosidase (Gambar 11).

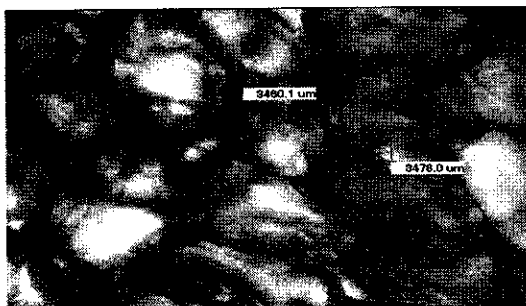


Gambar 11. Pembentukan warna kuning di sekitar biji dan jaringan plasenta dengan pemberian pnp-g sebagai substrat enzim β -glukosidase

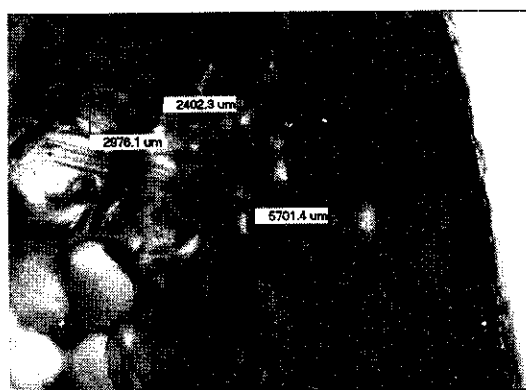
Pengamatan mikroskopis pembesaran 100 kali dilakukan pada jaringan buah untuk melihat bentuk dan ukuran sel serta aktivitas enzim. Penambahan substrat pnp-g pada jaringan daging dan kulit tidak memberikan perubahan warna sel menjadi kuning secara nyata. Hal ini dapat dilihat pada Gambar (12 - 14). Warna kuning pada beberapa sel jaringan daging tampak telah ada sebelum penambahan pnp-g. Hal ini memperkuat dugaan bahwa enzim β -glukosidase sebagian besar terdapat pada jaringan plasenta.



Gambar 12. Bagian biji-jaringan plasenta buah vanili segar pembesaran 100x



Gambar 13. Bagian daging buah vanili segar pembesaran 100x



Gambar 14. Bagian kulit buah vanili segar pembesaran 100 x

Biji buah vanili memiliki ukuran 0,31-0,34 mm (Gb 12). Pada bagian biji terdapat kantung sekresi oleoresin yang berwarna coklat di sekitar biji berukuran diameter panjang 0,26-0,47 mm dan lebar 0,16-0,35 mm (Gambar 12). Menurut Small (1942) di dalam *Purseglove* (1981) vanillin bebas banyak terdapat pada bagian kantung sekresi ini. Hal ini sesuai dengan pengukuran kadar vanillin dimana bagian sekitar biji mengandung kadar vanillin dan fenol yang tertinggi dibanding bagian-bagian buah yang lain. Hal ini mungkin berhubungan dengan peranan senyawa fenolik pada germinasi biji.

Bagian daging buah (mesokarp) terdiri dari sel-sel yang berukuran 0,15-0,31 mm (Gambar 13) berwarna kekuningan. Odoux et al., (2003) menyatakan bahwa sel memiliki vakuola, sementara sitoplasma yang berisi mitokondria dan retikulum endoplasma hanya terdapat sepanjang dinding sel dengan volume kurang dari 3% volume intraseluler. Sel pada bagian kulit (epikarp) tampak lebih kecil dan padat dibanding bagian daging buah dan mengandung pigmen berwarna hijau (Gambar 14). Pada tiga sudut daging buah tampak sel berwarna kuning yang mengelompok dan sel berbentuk batang memanjang di sekitarnya membentuk bundel vaskular. Irisan tipis kulit buah bagian terluar menghasilkan selapis sel yang rapat berbentuk kotak memanjang searah panjang buah berukuran kira-kira 0,09 x 0,37 mm (Gambar 14). Buah vanili yang telah dikeringkan memiliki

kulit luar yang berkerut dan ukuran sel daging buah yang lebih kecil (0,1 mm) serta tidak jelas batas antar sel karena proses kering telah mengeluarkan sebagian besar air dari dalam sel dan merusak struktur sel.

Berdasarkan hasil ini diduga sebagian besar aktivitas enzim β -glukosidase dan substrat glukovanillin berada pada bagian jaringan plasenta di sekitar biji. Reaksi hidrolisis glukovanillin tidak terjadi pada buah vanilla hijau. Pada buah vanilla lewat masak dan atau setelah proses kering terbentuk vanillin karena adanya dekopartementasi akibat perubahan tonoplas, membran vakuola atau dinding sel.

DAFTAR PUSTAKA

- Arana, F. E. 1943. Action of a β -glucosidase in the kuring of *Vanilla pods*. *FoodRes.* 8,343.
- Brownell, R. 1997. A look into the future of vanilla. *Cereal Foods World* 40(4), 795-796.
- Dignum, M. J. W. 2002. Biochemistry of the processing of vanilla beans. Thesis Leiden University.
- Esen, A. and G. Gungor. 1993. Stability and activity of plant and fungal β -glucosidases under denaturing conditions. Di dalam β -Glucosidases Biochemistry and Molecular Biology. Esen, A (ed). American Chemical Society. Washington DC
- Hanum, T. 1997. Perubahan kadar vanillin, aktivitas β -glukosidase dan oksidase selama pengolahan pasca panen vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *Bul. Teknol. dan Industri Pangan*, vol VIII no. 1 hal. 46-52
- Leong, G., Uzio., and R.,Derbesy,M. 1989. Synthesis, identification and determination of glucosides present in green vanilla beans (*Vanilla fragrans* Andrews). *Flav. Fragr. J.* 4, 163-167
- Kanisawa, T., K. Tokoro, and S. Kawahara. 1994. Flavor development in the beans of *Vanilla planifolia*. In: *Olfaction Taste XI*, Proc. Int. symp. (Eds. Kurihara, K.,N. Suzuki, H. Ogawa). Springer. Tokyo. 268-270
- Michaud, D. and A. Asselin. 1995. Application to plant proteins of gel electrophoretic methods. *Journal of Chromatography A*, 698 (1995): 263-279
- Odoux, E., J. Escoute., J.-L. Verdeil, and J.-M. Brillouet. 2003. Localization of β -glucosidase activity and glucovanillin in *Vanilla bean* (*Vanilla planifolia* Andrews). *Annals of Botany* 92: 437-444
- Hoyem, K and O. Kvale. 1977. *Physical, chemical and biological changes in food caused by thermal*

- processing. Applied Science Publishers Ltd. London
- Statistik Perkebunan Indonesia. 2003.** *Panili*. Direktorat Jendral Bina Produksi Perkebunan. Jakarta
- Seo, S., K. Ishizuka, and Y. Ohashi. 1995.** Induction of salicylic acid β glucosidase in tobacco leaves by exogenous salicylic acid. *Plant Cell Physiol.* 36(3): 447-453
- Small, J. 1942.** Vanilla: a pocket-lens study. *Food Proc, Packefing, Marketing* (137-141). Di dalam Purselove, J.W., E.G. Brown, C.L. Green dan S.R.J. Robbins. 1981. *Spices vol. 2*. Longman. London
- Parve, K. 2005.** Whole vanilla beans and vanilla extracts. <http://www.amadeusvanillabeans.com>. [13 Jan 2006].
- Winarno, F.G. 1986.** *Enzim pangan*. PT. Gramedia Jakarta.