Pengaruh Pektin terhadap Produksi Ekso-poligalakturonase oleh *Aspergillus niger* pada Fermentasi Medium Padat daun *Nephrolepis biserrata*

[1]Halifah Pagarra, [1]Abd. Muis dan [1]Arifah Novia Arifin
[1]Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Makassar
corresponding author: halifah.pagarra@unm .ac.id

Abstrak Produksi ekso-poligalakturonase oleh *Aspergillus niger* yang difermentasi dalam medium padat daun *Nephrolepis biserrata* dengan waktu inkubasi 24 jam sampai 192 jam. Fermentasi medium padat atau Solid State Fermentation (SSF) menggunakan pektin sitrus komersial, pektin daun *Nephrolepis biserrata*, dan tanpa pektin. Hasil analisis aktivitas ekso-poligalakturonase tertinggi di produksi pada waktu inkubasi 96 jam menggunakan pektin sitrus komersial sebanyak 40,82 U/g dan biomassa *Aspergillus niger* 0,42 mg/gdsf, hasil aktivitas ekso-poligalakturonase yang optimal menggunakan pektin daun *Nephrolepis biserrata* pada waktu inkubasi 120 jam sebanyak 39,16 U/g dan biomassa *Aspergillus niger* 0,39 mg/gdsf. Hasil aktiviti yang paling rendah adalah tanpa pektin sebanyak 23,21 U/g dan biomassa *Aspergillus niger* 0,22 mg/gds pada waktu inkubasi 120 jam. Hal ini menunjukkan bahwa pektin daun *Nephrolepis biserrata* dapat sebanding dengan pektin sitrus komersial dalam memproduksi ekso-poligalakturonase dengan selisih 1,66 U/g.

Kata kunci: Pektin, *Aspergillus niger*, daun *Nephrolepis biserrata*, Fermentasi medium padat, Ekso-poligalakturonase.

I. PENDAHULUAN

Pektinase dihasilkan dari berbagai jenis mikroorganisme yang menggunakan pektin sebagai sumber karbon [1]. Ada berbagai limbah pertanian dan agroindustri yang digunakan sebagai sumber karbon untuk merangsang produksi pektinase oleh mikroorganisme [2].. Sisa pertanian dan agroindustri merupakan bahan alami yang kompleks yang terdiri dari tiga komponen utama yaitu hemiselulosa, lignin dan selulosa. Umumnya, tiga komponen utama dinding sel juga dinamakan lignoselulosa. Contoh lignoselulosa yang digunakan dalam produksi pektin seperti ampas tebu, bubur sitrus, dedak gandum, dedak padi, jerami jagung, biji-bijian, kulit buah dan kulit sayuran [3].

Pektin digunakan sebagai substrat dan juga yang paling utama adalah sebagai pemicu di dalam proses fermentasi untuk produksi pektinase dari mikrooganisma. Pektin adalah struktur asam polisakarida dengan tulang belakang residu asam galakturonik yang dihubungkan oleh rantai α- (1-4). Berdasarkan jenis modifikasi rantai tulang belakang, bahan pektik diklasifikasikan ke protopektin, asam pektik, asam pektinik dan pektin [4-5].

Selain itu, pektin sitrus komersil dalam waktu yang sama sebenarnya menambahkan nutrien kepada pertumbuhan kulat di dalam proses fermentasi keadaan padat tersebut secara tidak langsung. [6] dalam kajian mereka menyatakan bahawa pektin daripada sitrus yang digunakan didapati menjadi substrat kepada pertumbuhan A*spergillus niger*. Mikroorganisme yang merupakan sumber utama enzim dalam bidang industri terdiri dari 50% jamur dan ragi, 35% dari bakteri, sedangkan sisanya 15% adalah apakah dari hewan atau tumbuhan. Filamen jamur dinyatakan sebagai mikroorganisme yang dapat mengeluarkan berbagai enzim yang terlibat dalam penguraian dan daur ulang biopolimer kompleks dari kedua tumbuhan dan jaringan hewan. Enzim-enzim yang disekresikan jamur ini kebanyakan bersifat hidrolitik dan memainkan peran yang penting dalam pertumbuhan jamur, emisi karbon dan nitrogen. Kemampuan produksi enzim dan sekresi jamur menarik perhatian banyak peneliti untuk mengkaji produksi berbagai jenis enzim menggunakan jamur filamen pada skala besar dalam proses industri [7]. Diantara jamur berfilamen yang paling praktis dalam proses fermentasi padat adalah seperti genera *Mucor, Ascomycetes, Aspergillus niger, Fusarium oxyporum* dan *Penicillium decumbens* [8]. Pada dasarnya, *Aspergillus niger* dapat dikultur dengan dua metode fermentasi yang berbeda yaitu fermentasi cair atau fermentasi medium padat, untuk penghasilan pektinase. Perbandingan beberapa laporan penghasilan pektinase antara dua metode tersebut menunjukkan bahwa fermentasi medium padat adalah lebih baik karena pembentukan produk terjadi pada permukaan hampir tidak adanya air [9].

Fermentasi medium padat (*Solid State Fermentation*) didefinisikan sebagai pertumbuhan mikroba tanpa fase berair bebas mengalir [10]. Beberapa tahun terakhir teknik fermentasi medium padat telah dikembangkan dan digunakan secara lebih ekstensif. Ini memiliki kelebihan dibandingkan proses fermenasi lainnya seperti teknik sederhana, investasi modal rendah, produksi enzim yang lebih murah memiliki sifat fisiokimia yang lebih baik, tingkat represi katabolit yang lebih rendah dan produk yang lebih baik [11]. Umumnya, fermentasi medium padat (SSF) didefinisikan sebagai pertumbuhan mikroorganisme dalam substrat padat dehidrasi, dimana kelembapannya cukup untuk mempertahankan pertumbuhan mikroba[12]. SSF didefinisikan sebagai proses yang melibatkan pertumbuhan mikroorganisme dalam partikel padat bahan

padat antara ruang partikel yang diisi dengan fase gas kontinu [13].

II. METODE PENELITIAN/EKSPERIMEN

Aspergillus niger ditumbuhkan pada medium potato dextrose agar (PDA), pada suhu kamar (27 ° C ± 1) selama 7 hari untuk memungkinkan pertumbuhan miselium. Setelah 7 hari inkubasi, spora dipanen dari petridish dengan menggunakan 5 mL 1% (v/v) Tween 80 sebagai pelumas. Spora dan Tween 80 kemudian dilemparkan pada 4000 psm pada suhu 4°C selama 20 menit untuk memisahkan spora dari larutan pelumas. Setelah sentrifugasi, supernatan dihilangkan dan spora diperoleh dalam bentuk pelet. Jumlah spora dari *Aspergillus niger* dihitung dengan menggunakan hemocytometer (Neubauer) 10% (v / v) larutan spora yang mengandung 1 x 10^7spora/mL digunakan sebagai inokulum.

3.2. Produksi Ekso-poligalakturonase pada Fermentasi Medium Padat

Komposisi medium pada fermentasi medium padat adalah (g/L): (NH4) SO4, 0,1; MgSO4.7H2O, 0,5; KH2PO4, 0,5; FeSO4.7H2O, 0,005; Yeast 1.0; Glukosa, 10,0 dan pektin sitrus komersilal, 10,0; pektin daun *Nephrolepis biserrata* 10,0. Substrat dicampur dalam autoklaf selama 1 jam pada suhu 121°C dan didinginkan sampai suhu kamar (27°C±1) sebelum inokulasi dengan jamur. Untuk fermentasi masing-masing 10,0 g substrat daun *Nephrolepis biserrata* dimasukkan kedalam erlenmeyer 500 mL Selanjutnya, buffer 0,05 M sitrat pH 5,0 ditambahkan sampai kadar kelembaban mencapai 70%. Substrat kelembaban diukur dengan menggunakan alat analisa kelembaban (AND MX-50). Campuran substrat dimasukkan ke dalam autoklaf selama 1 jam pada suhu 121°C untuk sterilisasi dan didinginkan sampai suhu kamar (27°C±1) sebelum diinokulasi dengan jamur *Aspergillus niger*. Fermentasi dilakukan 24 jam sampai 192 jam, pengambilan sampel setiap 24 jam. Untuk analisis aktiviti ekso-poligalakturonase dan biomassa *Aspergillus niger*, dilakukan penimbangan 1 g sampel yang difermentasi setiap 24 jam, kemudian dicampur dengan 10 mL buffer Citric Phosphate (pH 5.0). Campuran dicelupkan selama 1 menit untuk memastikan bahwa semua enzim dan gula pada permukaan medium diekstraksi ke dalam buffer. Selanjutnya, zat tersuspensi sentrifus pada 4.000 psm pada temperatur 4°C selama 30 menit untuk mengisolasi padatan (pelet) dan cairan (supernatan atau enzim mentah). Supernatan digunakan untuk mengetahui aktiviti enzim ekso-poligalakturonase dan protein. Penentuan aktivitas enzim didasarkan pada metode metode DNS kit (*Dinitro Salicylic Acid Reagent*) dengan modifikasi minimal [14]. Untuk aktivitas ekso-poligalakturonase dapat diidentifikasi melalui intensitas warna dengan menggunakan spektrofotometer pada 540 nm [15]. Unit enzim ekso-poligalakturonase adalah jumlah µM gula reduksi yang diukur dalam bentuk glukosa, dihasilkan sebagai hasil aksi ekstrak enzim 1,0 ml dalam 1 menit pada suhu 35^{o}C ± 1°C [16].

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses fermentasi medium padat yang dijalankan bagi produksi ekso-poligalakturonase dari *Aspergillus niger* adalah dengan menggunakan medium pertumbuhan, daun *Nephrolepis biserrata* sebagai substrat dan juga pektin sitrus komersial sebagai nutrisi bagi produksi ekso-poligalakturonase. Perbandingan penghasilan ekso-poligalakturonase dengan menggunakan pektin sitrus komersial. Proses fermentasi padat yang dijalankan bagi penghasilan ekso-poligalakturonase dari *Aspergillus niger* adalah dengan menggunakan medium pertumbuhan, daun *Nephrolepis biserrata* sebagai substrat dan juga pektin sebagai nutrisi bagi penghasilan ekso-poligalakturonase. Dalam penelitian ini, pektin daun *Nephrolepis biserrata* telah digunakan di dalam produksi ekso-poligalakturonase oleh *Aspergillus niger*. Jadi, penelitian yang berikutnya dilakukan adalah untuk menguji dan membandingkan kemampuan pektin daun *Nephrolepis biserrata* ini dengan pektin sitrus komersial dalam produksi ekso-poligalakturonase. Perbandingan penghasilan ekso-poligalakturonase juga amatlah perlu untuk mengevaluasi kemampuan pektin daun *Nephrolepis biserrata* ini dibandingkan penggunaan pektin sitrus komersial. Tabel 1 dan Gambar 1a-1b menunjukkan penghasilan ekso-poligalakturonase dan biomassa *Aspergillus niger* dengan menggunakan pektin sitrus komersial pada waktu inkubasi 24 jam sampai 192 jam. Pada waktu inkubasi 96 jam dengan menggunakan pektin sitrus komersial menunjukkan aktivitas ekso-poligalakturonase yang optimal dibandingkan dengan tanpa pektin dan pektin daun *Nephrolepis biserrata*. Aktivitas ekso-poligalakturonase optimal tanpa pektin pada waktu inkubasi 120 jam sebanyak 23.21 U/g dan biomassa *Aspergillus niger* sebanyak 0,22 mg/gds. Hal utama yang dibandingkan dalam studi ini adalah efek penggunaan pektin sitrus komersial yang tersedia tidak banyak berbeda dengan penggunaan pektin daun *Nephrolepis biserrata* bagi penghasilan ekso-poligalakturonase. Nilai optimal penghasilan ekso-poligalakturonase dari penggunaan pektin sitrus komersial ini adalah sebanyak 40,816 U/g dan biomassa *Aspergillus niger* sebesar 0,42 mg/gdsf dengan perbedaan hanya 1,656 U/g saja dibandingkan dengan penggunaan pektin daun *Nephrolepis biserrata* yaitu pada 39,160 U/g, namun biomassa cukup tinggi sebesar 0.,6 mg/gdsf dibandingkan dengan biomassa *Aspergillu niger* menggunakan pektin komersial. Oleh yang demikian, jelaslah bahwa penggunaan pektin yang diekstrak dari lignoselulosa ini dapat menghasilkan pektin yang sebanding dengan pektin sitrus komersial yang bersumberkan sitrus (sitrus).

Namun melihat ke waktu inkubasi hasil optimal penghasilan ekso-poligalakturonase yang diperoleh dengan penggunaan pektin daun *Nephrolepis biserrata* adalah beragam dibandingkan dengan penggunaan pektin sitrus komersial yang optimal pada 96 jam. [17] juga memperoleh penghasilan pektinase optimal oleh *Aspergillus awamori* dalam fermentasi kondisi padat pada masa inkubasi pada jam ke 72 dengan menggunakan substrat yang berbeda yaitu dedak padi (67,37 U/mL) dan ampas tebu (73,86 U/mL) pada metode percobaan yang sama. Hal serupa dilaporkan

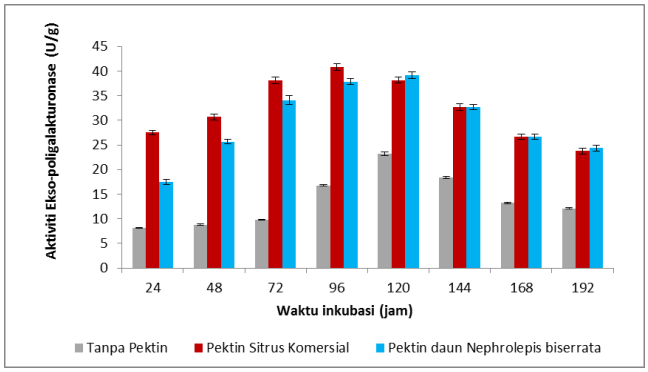
oleh [18] yang menggunakan ampas tebu (162,50 U/mL) dan penghasilan ekso-poligalakturonase pada substrat yang berbeda yaitu dedak gandum (113,50 U/mL) dan campuran dedak gandum dengan ampas optimal yang diperoleh pada masa inkubasi yang sama yaitu pada jam ke 96 dalam fermentasi medium padat. Namun, penghasilan ekso-poligalakturonase dalam penelitian ini apakah dengan menggunakan pektin daun *Nephrolepis biserrata* ataupun pektin sitrus komersial, tergantung pada tingkat pertumbuhan biomassa *Aspergillus niger* Ini adalah disebabkan pektin tidak dapat memasuki sel mikrorganisma langsung dan enzim ekso-poligalakturonase dihasilkan dari reaksi mikroorganisme yang menggunakan pektin sebagai pencetusnya [19]. Produksi ekso-poligalakturonase dilakukan dalam penelitian ini menggunakan pektin sitrus komersial dengan pertumbuhan biomassa *Aspergillus niger* yang optimal. Medium dan substrat yang sama digunakan pada kedua proses apakah dengan menggunakan pektin daun *Nephrolepis biserrata* ataupun yang komersial, namun tingkat pertumbuhan biomassa lebih tinggi dengan menggunakan pektin sitrus komersial dan aktiviti ekso-poligalakturonase yang lebih tinggi. Hal ini terjadi mungkin disebabkan oleh kandungan pektin daun *Nephrolepis biserrata* yang sedikit rendah dibandingkan dengan pektin sitrus komersial.

Selain itu, pektin sitrus komersial dalam waktu yang sama sebenarnya menambahkan nutrisi untuk pertumbuhan jamur di dalam proses fermentasi solid state tersebut secara tidak langsung. [6] dalam penelitiannya menyatakan bahwa pektin dari sitrus yang digunakan tersedia menjadi substrat bagi pertumbuhan *Aspergillus niger* di samping sebagai pemicu terhadap penghasilan ekso-poligalakturonase. Oleh yang demikian, amatlah penting bagi membandingkan penghasilan ekso-poligalakturonase dengan menggunakan pektin (apakah dari penelitian ini atapun yang komersial) dan juga tanpa penambahan pektin dalam media fermentasi yang dilakukan.

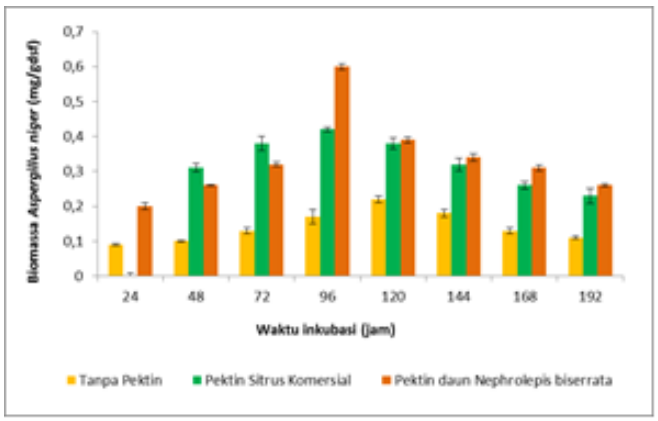
Tabel 1 menunjukkan penghasilan ekso-poligalakturonase dalam penelitian ini tanpa penambahan pektin. Dari hasil penelitian tersebut jelas menunjukkan bahwa tanpa penambahan pektin, kegiatan ekso-poligalakturonase yang dihasilkan sangat sedikit dibandingkan dengan penambahan pektin sebagai pemicu penghasilan ekso-poligalakturonase.

Tabel 1. Aktiviti ekso-poligalakturonase (U/g) dengan Tanpa Penambahan pektin dan penambahan pektin sitrus komersial dan pektin daun *Nephrolepis biserrata* pada waktu inkubasi 24 jam sampai 192 jam

Waktu Inkubasi (jam)	Tanpa pektin		Pektin sitrus komersil		Pektin daun *Nephrolepis biserrata*	
	Aktiviti ekso-poligalakturonase (U/g)	Biojisim *Aspergillus niger* (mg/gdsf)	Aktiviti ekso-Poligalakturonase (U/g)	Biojisim *Aspergillus Niger* (mg/gdsf)	Aktiviti ekso-poligalakturonase (U/g)	Biojisim *Aspergillus niger* (mg/gdsf)
24	8,13±0,078	0,09±0,003	27,51±0,44	0,27±0,010	17,51±0,53	0,20±0,010
48	8,83±0,116	0,10±0,002	30,67±0,60	0,31±0,012	25,67±0,49	0,26±0,003
72	9,82±0,051	0,13±0,008	38,07±0,66	0,38±0,021	34,07±0,92	0,32±0,007
96	16,80±0,099	0,17±0,021	40,82±0,63	0,42±0,006	37,82±0,62	0,.6±0,009
120	23,21±0,439	0,22±0,010	38,16±0,63	0,38±0,016	39,16±0,69	0,39±0,008
144	18,39±0,236	0,18±0,011	32,65±0,67	0,32±0,018	32,65±0,56	0,34±0,010
168	13,22±0,197	0,13±0,009	26,68±0,53	0,26± 0,011	26,68±0,49	0,31±0,008
192	12,09±0,151	0,11±0,004	23,77±0,59	0,23±0,021	24,34±0,62	0,26±0,004



Gambar 1a. Aktivitas Ekso-poligalakturonase (U/g) dengan tanpa pektin dan pektin yang berbeda pada waktu inkubasi 24 jam sampai 192 jam.



Gambar 1b. Biomassa *Aspergillus niger* dengan pektin yang berbeda pada waktu inkubasi 24 jam sampai 192 jam

[20] melaporkan bahwa penghasilan ekso-poligalakturonase tanpa penambahan pektin adalah sebesar 206,22 U/g dan setelah penambahan 1% (g/g) pektin menunjukkan peningkatan aktivitas ekso-poligalakturonase adalah pada 301,56 U/g dengan menggunakan kulit sitrus sebagai substrat pada masa inkubasi selama 8 hari.

IV. KESIMPULAN

Hasil penelitian ini jelas menunjukkan bahwa besarnya aktiviti ekso-poligalakturonase tanpa penambahan pektin memberikan hasil yang rendah dibandingkan aktivitas ekso-poligalakturonase dengan penambahan pektin baik dari pektin daun *Nephrolepis biserrata* maupun penambahan pektin sitrus komersial. Nilai optimal penghasilan ekso-poligalakturonase dari penggunaan pektin sitrus komersial dapat sebanding dengan aktviti ekso-poligalakturonase menggunakan pektin daun *Nephrolepis biserrata* karena perbedaannya hanya 1,656 U/g lebih tinggi untuk aktiviti ekso-poligalakturonase menggunakan sitrus komersial. Pektin yang dihasilkan dari daun *Nephrolepis biserrata* ini dapat ditelusuri kegunaannya dalam skrining faktor-faktor yang mempengaruhi produksi pektinase secara optimal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Jurusan Biologi FMIPA UNM dan Bioprocess Engineering Department, UTM.

PUSTAKA

Artikel jurnal:

[1] Tariq, A.L. and Reyaz, A.L. (2012).The Influence of Carbon and Nitrogen Sources on Pectinase Productivity of *Penicillium chrysogenum* in Solid State Fermentation. *International Research Journal of Microbioloby*, 3(5): 202-207.

[2] Hannan, A., Bajwa, R. And Latif, Z. (2009). Status of *Aspergillus Niger* Strains For Pectinases Production Potential*Pak. J. Phytopathol.*, 21 (1): 77-82

[3] Bansal, N., Tewari, R., Kishore, J.G., Soni, R. And Kumar, S.S. (2011). A Novel Strain of *Aspergillus niger* Producing a Cocktail of Hydrolytic Depolymerising Enzymes for the Production of Second Generation Biofuels. *Bioresources*, 6(1): 552-569

[4] Tapre, A. R. and Jain, R. K. (2014). Pectinases: Enzymes for Fruit Processing Industry.*International Food Research Journal*, 21(2): 447-453.

[5] Sieiro, C., Garcia, B. F., Lopez, J. S., Da Silva, A. F. And Villa, T. G. (2012). Microbial Pectic Enzymes in the Food and Wine Industry, *Food Industrial Processes - Methods and Equipment*, Dr. Benjamin Valdez (Ed.), 201-218

[6] Fontana, R.C., Suzielle, E.S. and Moura, M. S. (2005). Influence of Pectin and Glucose on Growth and Polygalacturonase Production by *Aspergillus niger* in Solid-State Cultivation, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 32: 371–377.

[7] El-Enshasy, H., Abuoul-Enein, A., Helmy, S. and El Azaly, Y.(2008). Optimization Of The Industrial Production Of Alkaline Protease By *Bacillus licheniformis* In Different Production Scales.*Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(3): 583-593.

[8] Mamma, D., Kourtoglou, E. And Christokopoulos, P. (2007). Fungal Multienzyme Production on Industrial By-Products of the Citrus-Processing Industry, *Bioresource Technology* 99: 2373–2383

[9] Martin, N., Regina, S.S, Silva, R. and Gomes, E. (2004). Pectinase Production by Fungal Strains in Solid-State Fermentation Using Agro-Industrial Bioproduct. *Brazilian Ar chives of Biology and Technology*, 47(5):813-819..

[10] Bhargav SS, Panda BP, Ali M, Javed S. (2008). Solid-state Fermentation: An Overview, Chem. Biochem. Eng. Q.; 22(1)49-70.

[11] Baysal, Z.; Uyar, F.; Aytekin, C. (2003). Solid state fermentation for production of α-amylase by a thermotolerant B. subtilis from hot-spring water. Process Biochem. 38, 1665-1668.

[12] Raharjo. (2005). *Fungal Mats in Solid-State Fermentation.* Doctor of Philosophy, Wageningen University, Wageningen. Netherlands.

[13] Mitchell, D.A., Kriegre, N. and Berovi, M. (Eds). (2006). *Solid State Fermentation. Bioreactor*. Springer-Verlag, Berlin.

[14] Miller., G.L. (1959). Use of Dinitrosalycylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chemical*, 1: 426-428.

[15] Kumar, D.P., Thangabalan, B., Rao, P.V. and Yugandhar, N.M. **(**2010).Production of Pectinase Enzyme by *Aspergillus niger* using *Ficus religiosa*Leaves in Solid-State

[16] Ali, J., Ahmed, J.S., Assad, Q., Hussain, A., Abid, H., and Gul, F. (2010). Optimization of Pectinase Enzyme Production using Sour Oranges Peel (*Citrus aurantium* L) as Substrate. *Pak. J. Biochem. Mol. Biol*., 43(3): 126-130.

[17] Suresh, B. and Viruthagiri, T. (2011). Optimization and Kinetics of Solid-State Fermentative Production of Pectinase by *Aspergillus awamori*. *International Journal of ChemTech Research*, 3(4): 1758-1764.

[18] Suresh, B. and Viruthagiri, T. (2010). Optimization and Kinetics of Pectinase Enzyme using *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. *Indian Journal of Science and Technology*, 3(8).

[19] Pedrolli D.B., Monteiro A. C., Gomes E. And Carmonal E. C. (2009). Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzyme

[20] Ibrahim, D., Hawani, N.S., Sheh, L.H., Ahmad, R. and Weloosamy, H. (2013). Pomelo Peels as Alternative Substrate for Extracellular Pectinase Production by *Aspergillus niger*