

EKSTRAKSI DAN KARAKTERISASI ENZIM POLIGALAKTURONASE ENDOJINUS PADA PULP BIJI KAKAO

Extraction and Characterization of Endogenous Polygalacturonase Enzyme in Cocoa Pulp

G.P. Ganda Putra¹⁾, Harijono²⁾, Tri Susanto²⁾, Sri Kumalaningsih²⁾
dan Aulanni'am³⁾

¹⁾Staf Pengajar FTP, Universitas Udayana, Denpasar

E-mail: putu_gandaputra@yahoo.com

²⁾Staf Pengajar FTP, Universitas Brawijaya, Malang

³⁾Staf Pengajar FMIPA, Universitas Brawijaya, Malang

ABSTRACT

Endogenous polygalacturonase (PG) enzymes in cocoa pulp have not been studied yet. The research, aimed to extract and characterize endogenous PG enzymes in cocoa pulp, was carried in two steps: (i) extraction of endogenous PG enzyme and (ii) enzyme characterization i.e. enzyme activity assay and determination of enzymatic kinetics (K_m and V_{max}), molecular weight (MW) by electrophoresis, and determination of its optimum temperature and pH.

The results showed that the characteristics of endogenous PG in cocoa pulp were as followed: the relative activity of $4,58 \pm 0,06$ Units/ml, V_{max} of 6,69 Units/ml, K_m of 0,37 %, MW was 32,84 and 63,58 kDa, and the combination of temperature and pH optimum were 42,5°C and 4,6.

Key words: endogenous polygalacturonase (PG), cocoa pulp

PENDAHULUAN

Tahapan pengolahan kakao yang paling dominan mempengaruhi mutu hasil biji kakao kering adalah fermentasi (Hardiman dan Kartika, 1980; Alamsyah, 1991). Fermentasi biji kakao bertujuan untuk menghancurkan pulp dan mengusahakan kondisi untuk terjadinya reaksi kimia dan biokimia dalam keping biji. Pulp yang telah hancur akan mudah lepas dari biji sehingga biji kakao menjadi bersih dan cepat kering. Selanjutnya reaksi kimia dan biokimia dalam keping biji dimaksudkan untuk pembentukan prekursor cita rasa dan warna coklat (Haryadi dan Supriyanto, 1991).

Penghancuran pulp mungkin terjadi karena proses depolimerisasi menggunakan enzim pektolitik endojinus. Pulp tersusun diantaranya oleh pektin, yang merupakan polisakarida struktural yang

terdapat pada dinding sel primer dan ruang antar sel. Depolimerisasi pektin dapat berlangsung karena adanya aktivitas enzim pektolitik yang menghidrolisis substrat pektin. Menurut Fox (1991), enzim pektolitik selain terdapat di dalam jaringan tanaman (enzim endojinus) juga dapat dihasilkan oleh sekresi mikroba (enzim eksojinus)

Pulp biji kakao mengandung pektin 1-1,5% (Case, 2004). Depolimerisasi pektin yang merupakan bahan perekat dari lamela tengah sel, menyebabkan jaringan pulp rusak dan terdisintegrasi, membentuk cairan dan menetes keluar tumpukan biji (*watery sweatings*). Selama ini mekanisme penghilangan pulp biji kakao didasarkan atas pendapat yang cenderung menekankan hanya pada aktivitas mikroba (enzim eksojinus). Sedangkan peranan enzim pektolitik endojinus, khususnya poligalakturonase (PG), yang terdapat pada

pulp biji kakao belum pernah diungkap. Sehubungan dengan hal tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui karakteristik enzim PG endojinus yang terdapat dalam pulp biji kakao.

Menurut Fox, (1991) dan Whitaker (1996), klasifikasi enzim pektolitik berdasarkan mekanisme kerjanya pada molekul pektin, yaitu: (1) pektin metilesterase (PME), (2) poligalakturonase (PG), (3) pektat liase (PAL) dan (4) pektin liase (PL). Enzim PME dan PG banyak ditemukan pada jaringan tanaman, walaupun juga dapat diproduksi oleh beberapa strain jamur, bakteri dan *yeast* (Blanco *et al.*, 1999). Sedangkan enzim PAL dan PL hanya diproduksi oleh mikroorganisme (Stephen, 1995).

Di sisi lain, pengurangan sebagian pulp tidak mempengaruhi fermentasi dan pengurangan pulp sebelum fermentasi bahkan dapat meningkatkan kualitas biji kakao (Said *et al.*, 1990; Almasyah dan Naibaho, 1991; Figueira *et al.*, 1993; Musta'ana *dkk.*, 2000). Kondisi ini memungkinkan pula memanfaatkan sisa ekstrak pulp biji kakao tersebut sebagai sumber enzim PG.

Penelitian ini ditujukan untuk melakukan ekstraksi dan karakterisasi enzim PG endojinus yang terdapat dalam pulp biji kakao. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran mengenai karakteristik enzim PG endojinus, untuk nantinya dapat digunakan sebagai acuan dalam pengembangan proses fermentasi pada pengolahan kakao.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan penelitian adalah buah kakao jenis lindak yang langsung dipetik dari kebun kakao milik petani di desa Tumpakrejo, kecamatan Kalipare, kabupaten Malang. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah: alkohol teknis 90%, Na-bisulfit, Polietilen glikol (PEG) 4000, bufer Na-asetat 0,05M, NaCl, citrus pektin dengan kadar asam galakturonat 93,5% dan metoksil 9,4% (SIGMA), asam D-galakturonat standar (SIGMA), pereaksi

Nelson A, pereaksi Nelson B, pereaksi Arsenomolibdat, *marker* BM 7 jenis protein (*FBI Fermentas*) dan pereaksi untuk elektroforesis.

Peralatan yang digunakan adalah: timbangan, termometer, lemari es (*freezer*), pengaduk magnetik, *cool chamber*, sentrifusa, spektrofotometer, *water bath*, pH meter, *hot plate*, peralatan elektroforesis dan alat-alat gelas.

Metode

(1) Ekstraksi enzim

Ekstraksi enzim PG menggunakan prosedur ekstraksi enzim pektolitik pada buah-buahan (Munoz and Barcelo, 1996; Zhou *et al.*, 2000).

Ekstrak pulp biji kakao, yang diperoleh dengan cara biji kakao diaduk dengan pengaduk magnetik selama 10 menit, lalu diperas secara manual dalam kain saring, ditimbang sebanyak 40 g, lalu ditambahkan 80 ml polietilen glikol (PEG) 4000 12%; Na-bisulfit 0,2%. Campuran diaduk dengan pengaduk magnetik selama 10 menit dalam ruangan suhu 4°C (*cool chamber*). Setelah itu disentrifugasi pada 5.000 rpm, 4°C selama 20 menit. Supernatan dibuang, residunya dicuci dengan menambahkan Na-bisulfit 0,2% sebanyak 2 kali volume residu dan disentrifugasi lagi seperti di atas selama 10 menit.

Residu yang diperoleh ditampung dalam erlenmeyer 100 ml, kemudian ditambahkan 75 ml larutan bufer Na-asetat 0,05 M; NaCl 0,5 M (pH 5,0). Campuran tersebut, diinkubasi sambil diaduk dengan pengaduk magnetik selama 1 jam pada suhu 4°C. Setelah itu disentrifugasi pada 5.000 rpm, 4°C selama 20 menit. Supernatan yang didapat sebagai filtrat enzim PG, ditampung dalam botol dan disimpan dalam lemari es (suhu -20°C).

(2) Karakterisasi enzim

a. Pengujian aktivitas relatif

Prosedur pengujian aktivitas enzim PG dengan metode kombinasi Munoz and Barcelo, (1996) dan Zhou *et al.* (2000): larutan substrat citrus pektin (*SIGMA*) 0,75 % disiapkan dalam bufer Na-asetat 0,05 M; NaCl 0,15 M (pH 4,5). Sebanyak 4 ml

larutan substrat pektin dan 1 ml filtrat enzim PG dimasukkan dalam tabung reaksi. Campuran diinkubasi pada suhu 35°C dalam *water bath* selama 60 menit, setelah itu reaksi dihentikan dengan pemanasan pada suhu 100°C selama 5 menit. Sementara itu, blanko juga disiapkan dengan menginkubasi campuran sebanyak 1 ml filtrat enzim yang ditambahkan dengan 4 ml bufer Na-asetat 0,05 M; NaCl 0,15 M (pH 4,5). Setelah itu, diambil sebanyak 0,1 ml campuran dan ditambahkan 0,9 ml aquadest dengan mikro pipet, selanjutnya diperlakukan sesuai prosedur penentuan kadar asam galakturonat dengan metode *Somogyi-Nelson*. Nilai absorbansi selanjutnya dikonversi menjadi kadar asam galakturonat berdasarkan kurva standar asam D-galakturonat. Unit aktivitas relatif enzim (U) per ml filtrat enzim PG = 1 µmol asam galakturonat yang terbentuk per menit per ml filtrat enzim PG atau µmol asam galakturonat/menit/ml (U/ml).

b. Penentuan kinetika enzim

Penentuan kinetika enzim (V_{maks} dan K_m) didasarkan atas plot grafik hubungan antara konsentrasi substrat [S] dan aktivitas enzim (V) (Fayyaz *et al.*, 1995; Dinu, 2001).

Larutan substrat pektin (*SIGMA*) dibuat dengan konsentrasi antara 0,1 – 1,0%, interval 0,1% dalam larutan bufer, lalu dilakukan pengujian aktivitas enzim seperti prosedur sebelumnya. Setelah itu ditentukan aktivitas enzim (U/ml) pada masing-masing konsentrasi substrat.

Selanjutnya dibuat tabel V dan [S] dan dikonversi menjadi 1/V dan 1/[S] serta dibuat plot grafik hubungan antara 1/V dan 1/[S], lalu ditentukan persamaan garis regresinya, yaitu: $1/V = (K_m/V_{maks}) \cdot (1/[S]) + 1/V_{maks}$ ($Y = aX + b$), untuk kemudian dapat dihitung nilai V_{maks} dan K_m .

c. Penentuan berat molekul (BM)

Penentuan BM filtrat enzim PG dengan elektroforesis *SDS-PAGE* menurut metode Laemli (1970), dengan menggunakan *marker* BM 7 jenis protein (*FBI Fermentas*). Penentuan BM pita-pita protein yang terbentuk didasarkan atas persamaan garis regresi kurva standar

hubungan antara nilai mobilitas relatif (*Rf*), yaitu perbandingan antara jarak pergerakan pita protein dari tempat awal dengan jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal, dengan logaritma BM dari masing-masing protein *marker* yang telah diketahui berat molekulnya.

d. Penentuan suhu dan pH optimum

Penentuan suhu dan pH optimum aktivitas enzim PG dilakukan dengan menguji aktivitas enzim pada variasi suhu dan pH. Variasi suhu terdiri atas: 30, 40, 50 dan 60°C, sedangkan pH terdiri atas: 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5. Setelah itu dilakukan pengujian aktivitas relatif filtrat enzim (U/ml) sesuai dengan prosedur dan kondisi spesifikasi pengujian aktivitas enzim PG. Analisis data dilakukan dengan metode regresi multivariat (ortogonal polinomial) untuk pembentukan kurva respon permukaan aktivitas relatif enzim.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas relatif

Aktivitas relatif filtrat enzim PG endojinus yang diekstraksi dari pulp biji kakao (Tabel 1) adalah rata-rata sebesar $4,58 \pm 0,06$ U/ml. Aktivitas enzim PG mampu menghidrolisis substrat pektin pada mekanisme reaksi katalitiknya. Pektin sebagai substrat enzim pektolitik merupakan polisakarida struktural yang terdapat pada dinding sel primer dan ruang antar sel (*middle lamella*), terutama pada jaringan parenkim. Struktur pektin terdiri atas unit-unit rantai linier α (1→4) D-asam galakturonat dengan varian proporsi metoksil (metil ester) (Stephen, 1995).

Tabel 1. Aktivitas relatif filtrat enzim PG

Ulangan	Aktivitas relatif (U/ml)
I	4,51
II	4,62
III	4,61
Rata-rata	$4,58 \pm 0,06$

Enzim PG atau poli- α -1,4-D-galakturonida glikano-hidrolase (EC 3.2.1.15 dan 3.2.1.67) menghidrolisis

ikatan glikosidik antar unit-unit asam galakturonat yang berdekatan dengan gugus karboksilat bebas. Ini menyebabkan pektin mengalami depolimerisasi dan terjadi penurunan kekuatan tekstur atau viskositas larutan (Fox, 1991; Whitaker, 1996). Adanya gusus karboksilat bebas yang terbentuk oleh aktivitas enzim PME pada substrat pektin juga akan meningkatkan aktivitas enzim PG.

Aktivitas enzim PG endojinus pada pulp biji kakao (4,58 U/ml) lebih rendah dibandingkan dengan enzim PG eksojinus yang diisolasi dari bakteri tanah (*Bacillus sp.*), berkisar antara 30,55 - 37,03 U/ml (Wardhani, 2005). Hal ini dapat terjadi karena enzim PG endojinus hasil ekstraksi tersebut masih dalam bentuk filtrat enzim kasar dan belum dilakukan pemurnian. Pemurnian enzim dapat dilakukan dengan pengendapan bertingkat dalam amonium sulfat jenuh (*salting out*), untuk memisahkan fraksi protein non enzim. Namun demikian ternyata aktivitas enzim PG endojinus tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan enzim PG yang dihasilkan oleh *Tubercularia vulgaris* pada media pektin citrus sebesar 0,69 U/ml (Fonseca and Said, 1994) dan *Aspergillus japonicus* 586 sebesar 0,427 U/ml (Teixeira *et al.*, 2000).

Kinetika enzim (V_{maks} dan K_m)

Penentuan V_{maks} dan K_m dilakukan dengan terlebih dahulu menguji aktivitas enzim pada beberapa konsentrasi substrat. Aktivitas relatif enzim PG pada beberapa konsentrasi substrat pektin (Tabel 2), menunjukkan bahwa aktivitas relatif PG mula-mula meningkat secara signifikan sejalan dengan meningkatnya konsentrasi substrat, sampai pada konsentrasi substrat 0,9%, tetapi tidak signifikan setelah konsentrasi substrat ditingkatkan menjadi 1,0%. Hal ini terjadi karena suatu reaksi enzimatis akan meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat [S], akan tetapi setelah [S] meningkat lebih lanjut akan sampai pada kecepatan yang tetap. Pada kondisi dimana kecepatan reaksi enzimatis tidak dapat bertambah lagi dengan bertambahnya [S] disebut

kecepatan maksimum (V_{maks}) (Wiesman, 1989).

Tabel 2. Aktivitas relatif enzim PG pada beberapa konsentrasi substrat pektin

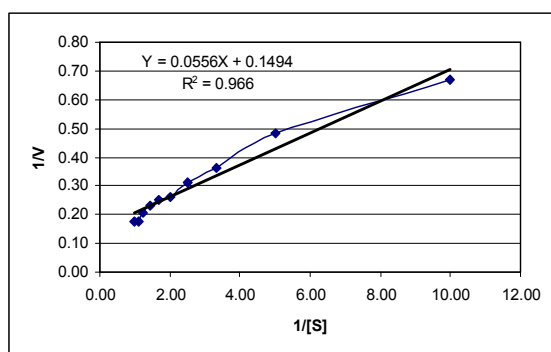
Konsentrasi substrat (%) [S]	Rata-rata aktivitas relatif (U/ml) (V)	
0,1	1,49	g
0,2	2,07	fg
0,3	2,77	ef
0,4	3,23	de
0,5	3,85	cd
0,6	4,01	c
0,7	4,36	bc
0,8	4,89	b
0,9	5,61	a
1,0	5,64	a
BNT 5%	0,8076	

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada (0,05

Penentuan V_{maks} akan menghasilkan gambaran tentang sifat-sifat kinetika enzim lain, $\frac{1}{2} V_{maks}$, yaitu suatu konsentrasi substrat yang separuh lokasi aktifnya telah terisi atau bila kecepatan reaksi enzimatis telah mencapai setengah dari kecepatan maksimum, yang dikenal dengan K_m (tetapan Michaelis-Menten). Nilai K_m digunakan selain sebagai ukuran afinitas E-S juga berhubungan dengan tetapan keseimbangan disosiasi kompleks E-S menjadi E dan S., Bila nilai K_m kecil berarti kompleks E-S mantap dan afinitas enzim terhadap substrat tinggi, sedangkan bila nilai K_m besar afinitasnya menjadi rendah Fox (1991). Harga K_m enzim sangat bervariasi tergantung dari jenis substrat, keadaan lingkungan dan kekuatan ion.

Dari grafik hubungan antara $1/[S]$ dan $1/V$, diperoleh persamaan garis regresi $Y = 0,0556X + 0,1494$, dengan $R^2 = 0,966$ (Gambar 1). Berdasarkan persamaan garis regresi tersebut maka didapatkan nilai $V_{maks} = 6,69$ U/ml dan $K_m = 0,37\%$.

Enzim Poligalakturonase Endojinus pada Pulp Biji Kakao (Ganda Putra)



Gambar 1. Grafik hubungan antara $1/[S]$ dan $1/V$

Nilai K_m filtrat enzim PG endojinus pada pulp biji kakao sebesar 0,37% lebih besar dibandingkan dengan K_m enzim PG eksojinus yang diisolasi dari bakteri tanah (*Bacillus sp.*) berkisar antara 0,04 – 0,09 mg/ml (0,004 – 0,009%) (Wardhani, 2005), tetapi relatif sama dengan K_m enzim ekso-PG I *Penicillium frequentans* sebesar 1,6 g/l (0,16%) (Barense *et al.*, 2001). Data lain yang dilaporkan oleh Dinu (2001), menunjukkan bahwa K_m enzim PG yang diisolasi dari *Aspergillus niger*, berturut-turut sebesar: 0,94 mg/ml (0,094%) pada substrat natrium poligalakturonat, 1,1 mg/ml (0,11%) pada substrat pektin termetilasi 6% dan 1,98 mg/ml (0,198%) pada substrat pektin termetilasi 30%.

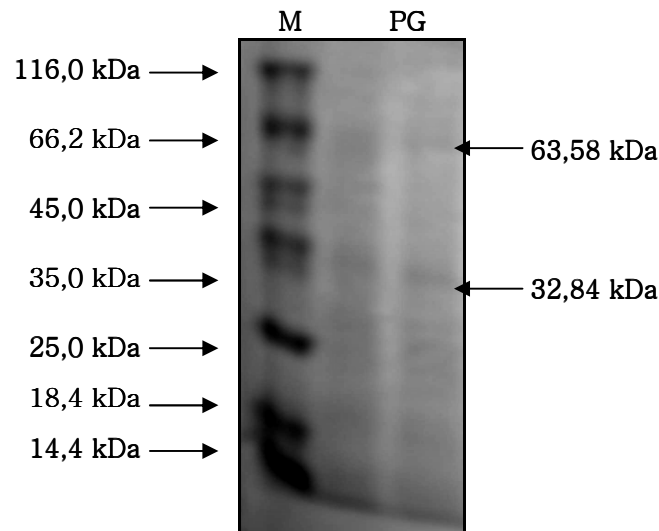
Sementara itu, V_{maks} enzim PG endojinus pada pulp biji kakao sebesar 6,69 U/ml (μmol asam galakturonat/menit/ml) cenderung tidak dapat dibandingkan dengan V_{maks} enzim PG eksojinus yang diisolasi dari bakteri tanah (*Bacillus sp.*) berkisar antara 9,07 – 11,51 μmol asam galakturonat/menit/mg protein (Wardhani, 2005) dan enzim ekso-PG I *Penicillium frequentans* sebesar 2571 μmol asam galakturonat/menit/mg protein (Barense *et al.*, 2001), karena berupa aktivitas relatif (per ml) sedangkan yang lain berupa aktivitas spesifik (per mg protein). Begitu pula dengan V_{maks} enzim PG yang diisolasi dari *Aspergillus niger* sebesar 3133,3; 2974,4 dan 1892,9 μmol

asam galakturonat/menit/mg protein, masing-masing untuk substrat natrium poligalakturonat, pektin termetilasi 6% dan pektin termetilasi 30% (Dinu, 2001).

Perbedaan nilai K_m dan mungkin juga V_{maks} seperti di atas berhubungan dengan tingkat kemurnian enzim. Enzim yang murni memungkinkan sisi-sisi aktifnya dapat bereaksi secara lebih baik, sehingga meningkatkan aktivitasnya yang berdampak pada penurunan nilai K_m . Enzim PG endojinus pulp biji kakao masih berupa filtrat enzim kasar, sehingga berdampak pada nilai K_m yang lebih besar. Selain itu enzim yang diekstraksi dari sumber berbeda akan memiliki sifat-sifat berbeda, terutama responnya terhadap kondisi lingkungan, seperti: suhu, pH dan konsentrasi NaCl optimum untuk aktivitasnya. Dinu (2001), menerangkan bahwa pada enzim PG, perbedaan nilai V_{maks} dan K_m juga dapat terjadi karena perbedaan derajat metilasi substrat pektin. Pektin dengan derajat metilasi lebih tinggi akan menghambat kecepatan reaksi enzimatis oleh enzim PG, sehingga akan meningkatkan nilai K_m . Hal ini terlihat dari nilai K_m enzim PG endojinus pulp biji kakao sebesar 0,37% pada substrat citrus pektin termetilasi 9,4%, yang juga masih lebih tinggi dibandingkan dengan substrat pektin termetilasi 30% (0,198%) karena masih berupa filtrat enzim kasar.

Berat molekul (BM)

Penentuan BM filtrat enzim dilakukan dengan teknik elektroforesis SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*). Hasil elektroforesis protein filtrat enzim PG endojinus pulp biji kakao dan protein *marker* dalam bentuk elektroforegram pita-pita protein, menunjukkan bahwa BM enzim PG sebesar 32,84 kDa dan 63,58 kDa (Gambar 2).



Gambar 2. Elektrofogram pita-pita protein filtrat enzim PG serta protein *Marker* (M) hasil elektroforesis SDS-PAGE

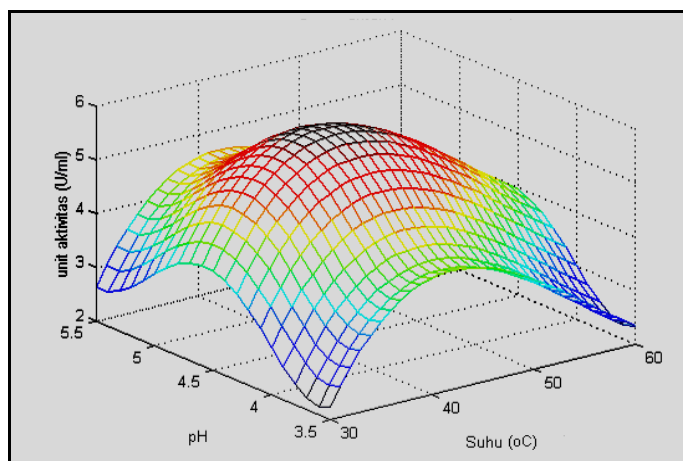
Salah satu pita protein hasil elektroforesis filtrat enzim PG, yaitu BM 32,84 kDa, relatif sama dengan BM enzim PG pada *Verticillium albo-atrum* (37 kDa) (Huang and Mahoney, 1993), *Botrytis cinerea* (36 kDa) (Martínez *et al.*, 1988), alpukat (41 kDa) (Wakabayashi and Huber, 2001), *Saccharomyces cerevisiae* (36 kDa) (Hammarso, 1999) dan bakteri tanah (*Bacillus sp.*) (34,7 kDa) (Wardhani, 2005). Selain itu juga terdapat pita protein dengan BM 63,58 kDa, namun belum ditemukan referensi BM enzim PG pada kisaran BM tersebut. Hal ini kemungkinan karena enzim PG yang diekstraksi dari pulp biji kakao masih kasar sehingga masih dimungkinkan terdapat protein non enzim. Kemungkinan lainnya adalah karakteristik dari protein enzim, selain berupa *monomer* juga dapat dalam bentuk *dimer*, untuk itu perlu dilakukan pengujian spesifitas enzim menggunakan metode *western blotting* dengan cara melakukan elektroelusi masing-masing pita protein tersebut, sehingga dapat dibuktikan apakah salah satu atau kedua pita protein tersebut mempunyai spesifitas sebagai enzim PG.

Suhu dan pH optimum

Hasil analisis regresi multivariat (ortogonal polinomial) untuk pembentukan

kurva respon permukaan aktivitas relatif enzim PG diperoleh model persamaan regresi kurva respon permukaan: $Y = 750 + 2,27X_1 - 0,0434X_1^2 + 0,000260X_1^3 - 721X_2 + 245X_2^2 - 36,5X_2^3 + 2,01X_2^4$, dengan $R^2 = 0,929$ (Gambar 3). Dari persamaan regresi tersebut diperoleh kombinasi suhu dan pH optimum yang memberikan aktivitas relatif enzim PG maksimum adalah kombinasi suhu 42,5°C dan pH 4,6, dengan respon maksimum sebesar 5,85 U/ml.

Grafik perubahan aktivitas relatif enzim PG akibat perlakuan suhu terjadi karena pengaruh suhu berkaitan dengan laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim. Semakin tinggi suhu menyebabkan meningkatnya energi kinetik molekul-molekul yang bereaksi, sehingga laju reaksinya semakin meningkat. Tetapi karena enzim adalah protein, sehingga semakin tinggi suhu, proses inaktivasi enzim juga meningkat. Selanjutnya sampai batas suhu tertentu (optimal), peningkatan suhu justru menurunkan aktivitas enzim akibat laju kerusakan enzim melampaui laju aktivitas enzim. Lebih lanjut menurut Sofro (1990), kerusakan enzim menyebabkan perubahan struktur enzim, sehingga sisi aktif enzim tidak dapat lagi digunakan dalam mengikat substrat.



Gambar 3. Kurva respon permukaan aktivitas relatif enzim PG pada variasi suhu dan pH

Pengaruh pH berkaitan dengan terjadinya aktivitas enzim yang maksimal pada pH optimum, sedangkan diatas dan dibawah pH optimum aktivitas enzim mengalami penurunan. Di sekitar pH optimum, enzim mempunyai stabilitas yang tinggi, sedangkan bila diatas atau dibawah pH optimum kestabilan enzim menurun. Enzim bersifat amfolitik, yaitu enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus asam maupun gugus basa, terutama pada gugus residu terminal karboksil dan gugus terminal amino. Perubahan aktivitas enzim akibat perubahan pH disebabkan oleh perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim-substrat. Ketika pH lingkungan berubah, struktur tiga dimensi protein akan terganggu dan perubahan pH yang ekstrim akan menyebabkan denaturasi protein (Whitaker, 1996).

Penentuan kondisi optimum enzim sering dilakukan secara bertahap, pH dulu baru kemudian suhu. Penentuan dengan cara ini lazim dilakukan, namun tidak akan dapat menjelaskan bagaimana aktivitas enzim tersebut pada kondisi stabilitas tertentu akibat pengaruh pH dan laju reaksi katalisis akibat pengaruh suhu secara bersamaan, sebagaimana yang terjadi pada pengaruh kombinasi pH dan suhu. Selain itu, pengaruh kombinasi pH dan suhu juga akan memberikan gambaran aktivitas

enzim pada kisaran pH dan suhu yang lebih luas.

Suhu optimum enzim enzim PG endojinus pulp biji kakao (42,5°C) yang juga hampir sama dengan suhu optimum enzim *endo*-PG pada *Verticillium albo-atrum* sebesar 46°C (Huang and Mahoney, 1999), PG bakteri tanah (*Bacillus sp.*) sebesar 40°C (Wardhani, 2005) dan PG pada pepaya sebesar 45°C (Fox, 1991). Begitu pula halnya dengan pH optimum enzim PG endojinus pulp biji kakao (4,6) berada pada kisaran pH optimum enzim PG (antara 4,5 - 5,0) yang dihasilkan dari beberapa buah-buahan (Fox, 1991) dan PG bakteri tanah (*Bacillus sp.*) sebesar 4,0 - 5,2 (Wardhani, 2005). Kondisi suhu dan pH optimum tersebut ditentukan secara bertahap, namun dapat digunakan sebagai gambaran komparasi suhu dan pH optimum enzim PG dari sumber-sumber yang lain. Atas dasar kondisi suhu dan pH optimum enzim PG endojinus pulp biji kakao tersebut, akan dapat digunakan sebagai kondisi proses depolimerisasi pulp biji kakao. Depolimerisasi pulp biji kakao oleh enzim PG endojinus akan berlangsung maksimal pada kondisi optimum enzim tersebut. Selanjutnya, kondisi proses depolimerisasi pulp biji kakao optimum yang didapat akan diaplikasikan sebagai acuan pengembangan proses fermentasi pada pengolahan kakao.

KESIMPULAN

Enzim PG endojinus dapat diekstrak dari pulp biji kakao. Adapun karakteristik enzim PG endojinus pulp biji kakao tersebut, meliputi: aktivitas relatif rata-rata sebesar $4,58 \pm 0,06$ U/ml, $V_{maks} = 6,69$ U/ml, $K_m = 0,37$ %, BM 32,84 dan 63,58 kDa, dan kombinasi suhu dan pH optimum adalah $42,5^\circ\text{C}$ dan 4,6.

Namun masih perlu dilakukan permurnian filtrat enzim lebih lanjut untuk mendapatkan karakteristik enzim yang lebih komprehensif. Selanjutnya berdasarkan karakteristik enzim PG endojinus pulp biji kakao, khususnya kondisi suhu dan pH optimum, dapat digunakan sebagai acuan untuk pengembangan proses fermentasi pada pengolahan kakao.

DAFTAR PUSTAKA

- Alamsyah, T.S. 1991. Peranan fermentasi dalam pengolahan biji kakao kering. Suatu Tinjauan. *Berita Perkebunan*, **1** (2) : 97-103.
- Alamsyah, T.S. dan P. Naibaho. 1991. Pengaruh pengempaan sebelum fermentasi, pengadukan dan waktu fermentasi terhadap mutu biji kakao kering. *Prosiding Konferensi Nasional Kakao III, Medan, Hal* : 109-117.
- Barense, R.I., M.A. Chellegatti, M.J.V. Fonseca and S. Said. 2001. Partial purification and characterization of exopolygalacturonase I and II of *Penicillium frequentans*. *Braz. J. Microbiol.*, **32** (4): 5-8.
- Blanco, P., C. Sieiro and T. G. Villa. 1999. Production of pectic enzymes in yeasts (Mini Review). *FEMS Microbiology Letters*, **175** : 1-9
- Case, C.L. 2004. The Microbiology of Chocolate. <http://smccd.net/accounts/case/chocolate.html>. Diakses tanggal 18 Maret 2004.
- Dinu, D. 2001. Enzymatic hydrolysis of pectic acid and pectins by polygalacturonase from *Aspergillus niger*. *Roum. Biotechnol.*, **6** (5) : 397-402.
- Fayyaz, A., B.A. Asbi, H.M. Ghazali, Y.B. Che-Man and S. Jinap. 1995. Kinetics of papaya pectinesterase. *Food Chemistry*, **53** : 129-135.
- Figueira, A., J. Janick, and J.N. BeMiller. 1993. New products from *Theobroma cacao*: Seed pulp and pod gum. p. 475-478. In J. Janick and J.E. Simon (eds.). *New Crops*. Wiley, New York.
- Fox, P. F. 1991. *Food Enzymology*. Vol. 1. Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London.
- Hardiman dan B. Kartika. 1980. *Pedoman Pemungutan dan Pengolahan Hasil-hasil Perkebunan*. Kerjasama Dirjen Perkebunan dengan FTP UGM, Yogyakarta.
- Haryadi dan M. Supriyanto. 1991. *Pengolahan Kakao Menjadi Bahan Pangan*. Pusat Antar Universitas. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Huang, L.K. and R.R. Mahoney. 1999. Purification and characterization of an endo-polygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*. *J. App. Microb.*, **86** (1) : 145-156.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of A. *Bacteriophage T4*. *Nature*, **227** : 680-685.
- Martinez, M.J., R. Martinez and F. Reyes. 1998. Effect of pectin on pectinases in autolysis of *Botrytis cinerea*. *Mycopathologia (Historical Archive)*, **102** (1): 37-43
- Munoz, R. and A.R. Barcelo. 1996. Enzymes. In L.M.L. Nollet (Ed.). *Handbook of Food Analysis*. Vol. 1. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Musta'ana, U., Haryadi dan M. Supriyanto. 2000. Pengaruh pengurangan pulp dan pemanasan awal sebelum fermentasi terhadap suhu, oksigen dan pH profil selama fermentasi dan karakteristik fisiko-kimiawi dan organoleptik biji kakao kering (Abstract). Program Pasca Sarjana, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Said, M.B., M.P.G.S. Jayawardena, R.J. Samarakhody and W.T. Parera. 1990. Preconditioning of fresh cocoa beans prior to fermentation to improve quality : A commercial approach. *The Planter*, **66** : 332-345.
- Sofro, A.S.M. 1990. *Biokimia*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, UGM, Yogyakarta.

- Stephen., A.M. 1995. Food Polysaccharides and Their Applications. Marcel Dekker Inc., New York.
- Teixeira, M.F.S., J.L. Filho and D. Nelson. 2000. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. *Braz. J. Microbiol.*, **31** (4).
- Wakabayashi, K and D. J. Huber. 2001. Purification and catalytic properties of polygalacturonase isoforms from ripe avocado (*Persea americana*) fruit mesocarp. *Physiologia Plantarum*, **113** (2) : 210 - 218.
- Wardhani, O.R. 2005. Karakterisasi parsial poligalakturonase yang diisolasi dari bakteri tanah. Tesis S-2. Tidak Dipublikasikan. Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya, Malang.
- Whitaker, J. R. 1996. Enzymes. In O. R. Fennema (Ed.). Food Chemistry. 3rd Edition. Maecel Dekker, Inc., New York.
- Wiseman, A. 1989. Handbook of Enzymes Biotechnology. 2nd. Edition. Ellis Howard, New York.
- Zhou, H.W., R. Ben-Arie and S. Lurie. 2000. Pectin esterase, polygalacturonase and gel formation in peach pectin fractions. *Phytochemistry*, **55** : 191-195.