

## Aktivitas Enzim Tanin Asil Hidrolase pada Kondisi Optimum Fermentasi *Lactobacillus plantarum* Menggunakan Tepung Ganyong (*Canna edulis* Kerr) Sebagai Substrat

Azor Yulianus Tefa<sup>a</sup>, Marselina Theresia Djue Tea<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Fakultas Pertanian, Universitas Timor, Kefamenanu, TTU–NTT, Indonesia, email: azor.tefa29@gmail.com

<sup>b</sup> Fakultas Pertanian, Universitas Timor, Kefamenanu, TTU–NTT, Indonesia, email: marselina.yumitea@unimor.ac.id

### Article Info

#### Article history:

Received 1 Oktober 2022

Received in revised form 3 Oktober 2022

Accepted 6 Oktober 2022

#### DOI:

<https://doi.org/10.32938/sc.v7i04.1932>

#### Keywords:

Ganyong

*Lactobacillus Plantarum*

Tanin Asil Hidrolase

### Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas enzim tanin asil hidrolase yang dihasilkan pada kondisi optimum fermentasi *Lactobacillus plantarum* dengan substrat tepung ganyong (*Canna edulis* Kerr). Prosedur pengujian dimulai dengan produksi enzim tanin asil hidrolase, dilanjutkan dengan isolasi enzim kasar, dan diuji aktivitas tanin asil hidrolase. Variasi volume inokulum pada penelitian ini adalah 1 mL, 3 mL, dan 5 mL pada massa substrat 2 gram. Variasi pH yang digunakan untuk mengukur aktivitas enzim adalah pH 4, pH 5, pH 6, dan pH 7, dan variasi suhu yang digunakan adalah 35°C, 40°C, 45°C, dan 50°C, serta variasi waktu inkubasi adalah 12 jam, 24 jam, 36 jam, 48 jam. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas enzim tanin asil hidrolase tertinggi diperoleh pada 1.13 U/mL pada pH optimum 6, 0.88 U/mL pada suhu optimum 45°C, dan 0.89 U/mL pada waktu inkubasi optimum 36 jam.

### 1. Pendahuluan

Enzim merupakan komponen protein yang berperan sebagai biokatalisator dalam berbagai reaksi kimia dalam sistem biologi. Semua proses biologis yang berlangsung di dalam sel membutuhkan enzim untuk dilakukan dengan cepat. Reaktan dalam reaksi yang dikatalisis enzim disebut substrat dan diubah menjadi berbagai produk. Enzim memiliki aktivitas spesifik yang mengkatalisis hanya satu reaksi (Robinson, 2015). Enzim dapat diproduksi oleh mikroorganisme dan diklasifikasikan sebagai enzim ekstraseluler dan intraseluler. Aktivitas enzim ekstraseluler tinggi dan stabil, sehingga lebih mudah diproduksi dan diterapkan daripada enzim intraseluler (Li et al., 2019). Aktivitas enzim dapat dipengaruhi oleh pH, suhu, waktu inkubasi, konsentrasi inokulum, dan konsentrasi substrat (Battestin & Macedo, 2007)

Enzim tanin asil hidrolase merupakan golongan enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis ikatan ester senyawa tanin menjadi asam galat dan glukosa (Murugan et al., 2007). Tanin merupakan senyawa polifenol yang terdapat pada beberapa tanaman yang biasa digunakan sebagai bahan makanan dan dapat berikatan dengan protein membentuk kompleks tidak larut yang mengganggu aktivitas enzim-enzim pencernaan (Obrique-Slier et al., 2010). Salah satu tanaman yang mengandung tanin adalah ganyong. Pengolahan ganyong secara mikrobial dengan cara fermentasi pada kondisi yang optimum dapat menurunkan kadar senyawa tanin pada tanaman tersebut.

*Lactobacillus plantarum* merupakan salah satu bakteri yang dapat menghasilkan enzim tanin asil hidrolase pada suhu optimum (Aguilar-Zarate & Aguilar, 2014). Menurut Curiel et al., (2009), pH dan suhu optimum untuk produksi enzim tanin asil hidrolase pada *Lactobacillus plantarum* berturut-turut adalah 7,0 dan 40°C. Sementara itu, Matsuda et al., (2016) mengemukakan bahwa pH optimum enzim tanin asil hidrolase adalah 5,0 – 6,0, dan Jiménez et al., (2014) menyatakan bahwa temperatur optimum enzim tanin asil hidrolase adalah 30°C. Berdasarkan penjelasan tersebut maka dilakukan penelitian yang tujuannya ialah mengetahui aktivitas enzim tanin asil hidrolase pada kondisi optimum fermentasi *Lactobacillus plantarum* menggunakan tepung ganyong sebagai substrat.

### 2. Metode

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya pada bulan Mei – Juli 2018, dengan menggunakan tepung ganyong sebagai substrat fermentasi, MRS Broth, asam tanat, etanol 95%, larutan buffer sitrat, dan aquades. Mikroorganisme yang digunakan adalah *Lactobacillus plantarum*. Peralatan yang digunakan yakni erlenmeyer, batang pengaduk, inkubator merek Haraeus Type B 50042, pH meter merek inoLab WTW, autoclave merek all American Model 20X, dan spektrofotometer UV-Vis merek Thermo Scientific Genesys 20. Penelitian ini dilakukan menggunakan metode eksperimen dengan 3 perlakuan (pH, temperatur, waktu inkubasi) dan 3 ulangan.

#### 2.1 Produksi enzim tanin asil hidrolase

Produksi enzim tanin asil hidrolase dilakukan dengan mengacu pada metode Arian et al., (2007). Crude enzim tanin asil hidrolase diisolasi dengan cara mengekstrak media fermentasi. Sebanyak 50 mL aquades yang mengandung polisorbitat 80 0,01% ditambahkan ke dalam media fermentasi dan diaduk menggunakan magnetic stirrer kemudian dipisahkan melalui cara sentrifugasi. Supernatan yang dihasilkan disaring menggunakan kertas Whatman No. 1.

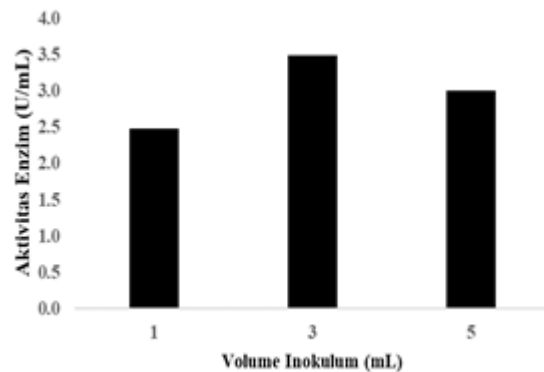
#### 2.2 Uji aktivitas enzim tanin asil hidrolase

Pengujian aktivitas enzim tanin asil hidrolase dilakukan menggunakan spektrofotometer sesuai metode Rajakumar & Nandy (1983). Sebanyak 0.5 mL larutan enzim dimasukkan ke dalam 2 mL asam tanat 0.35 % kemudian ditambahkan ke dalam larutan buffer sitrat 0.05 M dengan pH 6. Selanjutnya, diambil sebanyak 0,1 mL larutan tersebut lalu ditambahkan 10 mL etanol 95%

dan dikocok selama 30 detik untuk menghentikan reaksi enzimatik. Campuran tersebut kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 310 nm. Aktivitas enzim ditunjukkan dalam international unit (IU), dengan satu unit didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghidrolisis 1 µmol ikatan ester permenit.

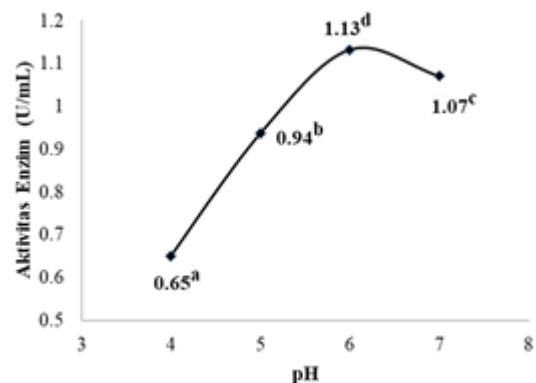
### 3. Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, volume inokulum yang digunakan untuk memproduksi enzim tanin asil hidrolase yakni 3 mL sesuai yang ditunjukkan pada Gambar 1 di bawah ini.



Gambar 1. Pengaruh volume inokulum terhadap aktivitas enzim tanin asil hidrolase

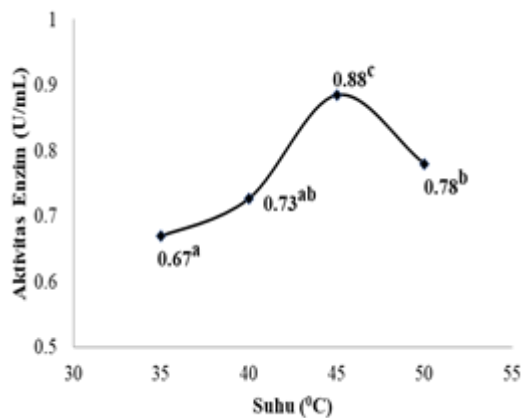
Komposisi medium cair dan substrat dapat mempengaruhi laju produksi enzim oleh mikroorganisme (Anto et al., 2006). Volume medium cair yang tinggi dapat menyebabkan perubahan struktur substrat pada yang digunakan sehingga menurunkan aktivitas perpindahan oksigen. Demikian juga apabila volume medium cair rendah dapat menyebabkan kelarutan substrat berkurang sehingga produksi enzim tidak optimal (Aida & Hanan, 2016). Aktivitas enzim tanin asil hidrolase optimal pada pH 6, yakni sebesar 1.13 U/mL sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim tanin asil hidrolase

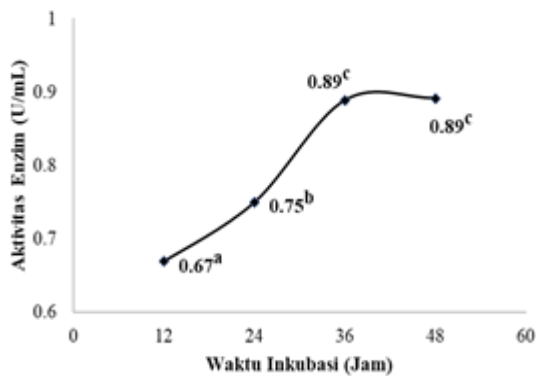
Pada Gambar 2 di atas terlihat bahwa aktivitas enzim tanin asil hidrolase mencapai optimum pada pH 6. Hasil uji beda nyata terkecil (BNT) ( $\alpha = 5\%$ )

menunjukkan aktivitas enzim tanin asil hidrolase pada pH 6 berbeda nyata dengan aktivitas enzim tanin asil hidrolase pada pH 4, pH 5, dan pH 7. Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Sharma *et al.*, (1999) juga menunjukkan hasil yang sama dengan menggunakan *Aspergillus niger* untuk menghasilkan enzim tanin asil hidrolase. Aktivitas katalitik dari suatu enzim dapat dipengaruhi oleh perubahan pH melalui berbagai cara. Sama halnya dengan protein, enzim mempunyai gugus yang mudah terionisasi sehingga menyebabkan perubahan struktur pada gugus tersebut. Perubahan struktur ini mengakibatkan enzim kehilangan aktivitasnya.



Gambar 3. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim tanin asil hidrolase

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas enzim tanin asil hidrolase optimum pada suhu 45°C yakni sebesar 0.88 U/mL seperti yang ditunjukkan pada Gambar 3. Hasil uji BNT ( $\alpha = 5\%$ ) menunjukkan aktivitas enzim tanin asil hidrolase berbeda nyata pada setiap variasi suhu fermentasi. Pada penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Mahendran *et al.*, (2006) disebutkan bahwa enzim tanin asil hidrolase memiliki suhu optimum antara 30 – 50°C, sedangkan Sabu *et al.*, (2006) juga menyimpulkan bahwa suhu optimum enzim tanin asil hidrolase berada pada 30 – 40°C. Penelitian yang dilakukan oleh Ramírez-Coronel *et al.*, (2003) menyebutkan bahwa suhu optimum enzim tanin asil hidrolase ada di antara 60 – 70°C, ini disebabkan oleh perbedaan isolat mikroorganisme yang digunakan untuk produksi enzim tanin asil hidrolase. Setiap mikroorganisme memiliki suhu maksimum, suhu minimum dan suhu optimum untuk metabolisme dan pertumbuhannya (Shao *et al.*, 2020). Hal ini disebabkan karena di atas suhu maksimum atau di bawah suhu minimum, aktivitas enzim yang dihasilkan oleh suatu organisme akan terhenti, dan pada suhu yang sangat tinggi akan terjadi denaturasi enzim. Waktu inkubasi memiliki peranan yang penting pada aktivitas metabolik mikroorganisme, pertumbuhan, serta biosintesis berbagai enzim (Sedrah, 2020). Pengaruh lama waktu inkubasi saat proses fermentasi terhadap aktivitas enzim tanin asil hidrolase pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3 di bawah ini.



Gambar 4. Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim tanin asil hidrolase

Pada Gambar 4 di atas terlihat bahwa semakin lama waktu yang dibutuhkan untuk proses fermentasi, aktivitas enzim tanin asil hidrolase semakin meningkat. Hasil uji BNT ( $\alpha = 5\%$ ) menunjukkan adanya pengaruh variasi waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim tanin asil hidrolase. Aktivitas tertinggi ditunjukkan pada saat diinkubasi selama 36 jam, yakni sebesar 0.89 U/mL, di mana hasil ini berbeda nyata dengan perlakuan waktu inkubasi 12 jam dan 24 jam tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan waktu inkubasi 48 jam yang juga menghasilkan aktivitas enzim tanin asil hidrolase sebesar 0.89 U/mL. Apabila perlakuan dengan jumlah waktu lebih sedikit tetapi memiliki pengaruh yang sama dengan perlakuan dengan jumlah waktu lebih banyak dalam meningkatkan aktivitas enzim tanin asil hidrolase, maka perlakuan dengan jumlah waktu lebih sedikit tersebut lebih baik dari perlakuan dengan jumlah

waktu lebih banyak, sehingga dapat dikatakan bahwa waktu inkubasi optimum aktivitas enzim tanin asil hidrolase adalah 36 jam.

#### 4. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa aktivitas tertinggi enzim tanin asil hidrolase sebesar 1.13 U/mL pada pH optimum 6, 0.88 U/mL pada suhu optimum 45°C, dan 0.89 U/mL pada waktu inkubasi optimum 36 jam.

#### Pustaka

- Aguilar-Zarate, P., & Aguilar, C. N. (2014). Bacterial Tannases: Production, Properties and Applications. *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica*, 13(1). [www.redalyc.org/html/620/62031166005/](http://www.redalyc.org/html/620/62031166005/)
- Aida, M. F., & Hanan, M. A. N. (2016). Production, optimization and characterization of extracellular amylase from halophilic *Bacillus licheniformis* AH214. *African Journal of Biotechnology*, 15(17), 670–683. <https://doi.org/10.5897/ajb2015.15073>
- Anto, H., Trivedi, U., & Patel, K. (2006). Alpha amylase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid-state fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 241–245.
- Arian, Y., Anwar, S., & Artika, I. M. (2007). The Production of Tannin Acyl Hydrolase from *Aspergillus niger*. *Microbiology Indonesia*, 1(2), 94–97.
- Batstein, V., & Macedo, G. A. (2007). Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by *Paecilomyces variotii*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(2), 191–199. <https://doi.org/10.2225/vol10-issue2-fulltext-9>
- Curiel, J. A., Rodríguez, H., Acebrón, I., Mancheño, J. M., De Blanca Rivas, L., & Muñoz, R. (2009). Production and physicochemical properties of recombinant *Lactobacillus plantarum* tannase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 6224–6230. <https://doi.org/10.1021/jf901045s>
- Jiménez, N., Esteban-Torres, M., Mancheño, J. M., De las Rivas, B., & Muñoz, R. (2014). Tannin degradation by a novel tannase enzyme present in some *Lactobacillus plantarum* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(10), 2991–2997. <https://doi.org/10.1128/AEM.00324-14>
- Li, Y., Sun, L. L., Sun, Y. Y., Cha, Q. Q., Li, C. Y., Zhao, D. L., Song, X. Y., Wang, M., McMinn, A., Chen, X. L., Zhang, Y. Z., & Qin, Q. L. (2019). Extracellular Enzyme Activity and Its Implications for Organic Matter Cycling in Northern Chinese Marginal Seas. *Frontiers in Microbiology*, 10(September), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02137>
- Mahendran, B., Raman, N., & Kim, D. J. (2006). Purification and characterization of tannase from *Paecilomyces variotii*: Hydrolysis of tannic acid using immobilized tannase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(4), 444–450. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0082-y>
- Matsuda, M., Hirose, Y., Kanauchi, M., Hatanaka, S., & Totsuka, A. (2016). Purification and characteristics of tannase produced by lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum* H78. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 74(4), 258–266. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2016-4298-01>
- Murugan, K., Saravanababu, S., & Arunachalam, M. (2007). Screening of tannin acyl hydrolase (E.C.3.1.1.20) producing tannery effluent fungal isolates using simple agar plate and SmF process. *Bioresource Technology*, 98(4), 946–949. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.04.031>
- Obreque-Slier, E., Lopez-Solis, R., Peña-Neira, Á., & Zamora-Marín, F. (2010). Tannin-protein interaction is more closely associated with astringency than tannin-protein precipitation: Experience with two oenological tannins and a gelatin. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(12), 2629–2636. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02437.x>
- Rajakumar, G. S., & Nandy, S. C. (1983). Isolation, Purification, and Some Properties of *Penicillium chrysogenum* Tannase. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(2), 525–527. <https://doi.org/10.1128/aem.46.2.525-527.1983>
- Ramírez-Coronel, M. A., Viniegra-González, G., Darvill, A., & Augur, C. (2003). A novel tannase from *Aspergillus niger* with  $\beta$ -glucosidase activity. *Microbiology*, 149(10), 2941–2946. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26346-0>
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1–41. <https://doi.org/10.1042/BSE0590001>
- Sabu, A., Augur, C., Swati, C., & Pandey, A. (2006). Tannase production by *Lactobacillus* sp. ASR-S1 under solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 41(3), 575–580. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.05.011>
- Sedrah, Z. (2020). Optimization of Tannase Production By Local Isolate of *Aspergillus Aculeatus*. *Plant Archives*, 20(2), 6980–6984.
- Shao, Y., Zhang, Y. H., Zhang, F., Yang, Q. M., Weng, H. F., Xiao, Q., & Xiao, A. F. (2020). Thermostable tannase from *Aspergillus niger* and its application in the enzymatic extraction of green tea. *Molecules*, 25(4). <https://doi.org/10.3390/molecules25040952>
- Sharma, S., Bhat, T. K., & Dawra, R. K. (1999). Isolation, purification and properties of tannase from *Aspergillus niger* van Tieghem. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(6), 673–677. <https://doi.org/10.1023/A:1008939816281>