

PRODUKSI TANNASE MENGGUNAKAN *Aspergillus niger* DALAM MEDIA LIMBAH KULIT BUAH KOPI

(Production of Tannase Using *Aspergillus niger* on Coffee Pulp Cherries)

Giyarto¹⁾

¹⁾ Staf Pengajar Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember
E-mail: giyartocipto@yahoo.co.id

ABSTRACT

The presence of recalcitrant and toxic compounds such as caffeine, tannins and polyphenols limit the use of coffee pulp cherries and can cause serious environmental contamination. Tannins could be breakdown by tannase. The fungal tannase was produced from coffee pulp cherries using *Aspergillus niger*, which is applications of the solid state fermentation (SSF) system. The aim of the research was to produce the extracellular fungal tannase from coffee pulp cherries by *Aspergillus niger*. The result showed that gallic acid formed as result of tannin degradation by *Aspergillus niger* activity on SSF. The best tannase production was occurred at the time fermentation between 4 to 6 days, that indicated by the enzyme activity $0.189 - 0.211 \mu\text{mol of gallic acid ml}^{-1} \text{ minute}^{-1}$, gallic acid content of $0.1004 - 0.1121 \text{ gL}^{-1}$, pH of $4.45 - 5.01$, and protein content of $2.367 - 2.733 \text{ gL}^{-1}$.

Key words: *Aspergillus niger*, coffee pulp cherries, extracellular fungal tannase, gallic acid, solid state fermentation,

PENDAHULUAN

Kopi merupakan komoditi perkebunan andalan Indonesia, yang diusahakan oleh perkebunan negara, swasta maupun rakyat. Pengolahan kopi secara basah menghasilkan limbah kulit buah, yang sering menyebabkan pencemaran lingkungan. Praktisi industri pengolahan kopi hanya menjadikan kulit buah kopi sebagai kompos.

Kulit buah kopi banyak mengandung karbohidrat dan protein, namun adanya senyawa kafein, tannin dan polifenol lainnya (asam kafeat dan klorogenat) memiliki efek gangguan bagi pertumbuhan hewan bila ditambahkan dalam ransum pakan (Porres, *et al*, 1993). Tannin pulp kopi berkisar 1,80 - 8,56 persen berat kering (Ellias, 1979). Kecukupan nutrisi kulit buah kopi berpotensi sebagai media fermentasi pada produksi metabolit sekunder, seperti enzim. Enzim dapat dihasilkan

secara intraseluler dan ekstraseluler, seperti enzim tannase.

Tannase adalah protein asam dengan pH optimum 5,5 dan suhu 30°C (Lekha and Lonsane, 1997), menghidrolisis asam tannat menjadi glukosa dan asam galat (Bradoo *et.al*, 1997). Tannase memiliki potensi untuk digunakan dalam industri makanan, farmasi dan obat-obatan (Deschamps and Lebeault, 1984), dan secara luas digunakan dalam pengolahan teh instan, pembuatan wine, produksi asam gallat dan bahan tinambah pakan (Lekha and Lonsane, 1997).

Beberapa jenis fungi dan bakteri diketahui bisa mendegradasi tannin sebagai sumber karbon. *Aspergillus niger* dan *Aspergillus japonicus* sebagai produsen terbaik dengan aktifitas enzim masing-masing sebesar 29.13 U/ml dan 25.6 U/ml, dengan sumber karbon asam tannat secara kultur terendam (Bradoo, *et.al* (1997). Spesies lain yang mampu menghasilkan tannase adalah *Penicillium*

sp (Neville and Webster, 1995), *Penicillium glaucum* (Lekha and Lonsane, 1997), *Aspergillus fischerii*, *Fusarium solani* dan *Trichoderma viride* (Bajpai *et.al*, 1997), dan *Penicillium frequentans* (Lageemat *et.al*, 2000), *Aspergillus flavus* (Paranthaman, R. *et.al*, 2009), *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407 (Natarajan, K dan Aravindan Rajendran, 2009).

Produksi tannase dengan *Aspergillus niger* atau *Penicillium sp* menggunakan sistem SSF model, yaitu memakai *inert carrier* busa (*foam*) dan inokulum spora sebanyak $3,5 \times 10^{10}$ spora per gram sumber karbon (asam tannat) ditumbuhkan selama 6 hari pada pH 5,5 dan suhu 30°C (Lageemat, 1999). Bila tannase diproduksi secara fermentasi terendam (*submerged fermentation*) pH optimum untuk produksinya adalah antara 4,5–6,5 (Barthomeuf *et.al.*, 1994). Penggunaan suhu fermentasi 35°C dan lama inkubasi 96 jam dengan media asam tannat 2% merupakan kondisi terbaik untuk produksi tannase menggunakan *Aspergillus flavus* secara fermentasi terendam (Paranthaman *et al.*, 2009).

Produksi tannase oleh *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407 memiliki kondisi fermentasi optimal untuk nilai pH, suhu dan kecepatan agitasi berturut-turut adalah 6,0, 30°C dan 125 rpm, dengan aktivitas tannase maksimum sebesar 9.29 U/mL (Natarajan, K and Aravindan Rajendran, 2009). Produksi tannase dapat dihambat oleh asam gallat dan sumber-sumber nitrogen seperti NH_4NO_3 , NH_4Cl , KNO_3 , asam aspartat, urea dan EDTA (Srivastava, A dan Rita Kar, 2009).

Eliminasi bahan anti nutrisi dapat dilakukan secara mekanik atau khemis seperti ekstraksi cair, ekstraksi alkalin, penggilingan dan dengan panas. Namun cara-cara tersebut hanya mampu mereduksi sebagian kecil senyawa anti fisiologis. Cara mikrobiologis atau enzimatis mampu memecah lebih

efisien, akan diperoleh produk bernilai ekonomi tinggi (misal enzim) dan mengurangi pencemaran. Pada sistem SSF, pertumbuhan mikroba dan pembentukan produk fermentasi terjadi pada permukaan bahan padatan hampir tanpa adanya air bebas (Sargantanis, *et al*, 1993). Beberapa tipe bioreaktor SSF yang umum digunakan dalam industri antara lain tipe rak, drum dan sebagainya (Ramana Murthy, *et.al*, 1993).

Proses fermentasi tipe SSF telah banyak digunakan luas untuk mengeksploitasi pada produksi enzim yang dihasilkan oleh kelompok jamur (Lonsane *et.al.*, 1985). Kelebihan fermentasi tipe ini adalah lebih mudahnya dalam mengontrol sporulasi jamur. Karena bahan padat merupakan habitat alami jamur, dan pengontrolan secara morfologi dari siklus jamur lebih mudah (Viniegra-Gonzalez, 1997).

Selain kaya akan karbohidrat dan protein, kulit buah kopi mengandung senyawa tannin didalamnya. Kondisi substrat seperti itu dapat memungkinkan beberapa jenis jamur dapat tumbuh dengan baik, diantaranya *Aspergillus niger*. Namun kemampuan spesies ini menggunakan tannin kulit buah kopi untuk memproduksi tannase belum diketahui. Untuk itu dilakukan penelitian dengan tujuan memproduksi tannase dengan media limbah kulit buah kopi oleh *Aspergillus niger* menggunakan tipe SSF.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah kulit buah kopi Robusta dari petani kopi di Silo, Jember, biakan *Aspergillus niger* (dari FNCC PAU UGM), glukosa, NaCl, Kalium Permanganat, H_2SO_4 , Malt Ekstrakt Agar(Oxoid), NaOH, NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , CaCl_2 , Buffer K-phthalat pH 5.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, membrane filter, asam tannin.

Alat-alat yang digunakan meliputi laminar air flow (Crumair 9005-FL), neraca analitik, spektrofotometer, autoklaf, pompa vacum, inkubator (Heraeus), erlenmeyer, vortek, haemacytometer (Assistant).

Rancangan Penelitian

Penelitian laboratoris ini (*pure experiment*) dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember. Tahap penelitian utama yang dilakukan terdiri atas : 1) persiapan media kulit buah kopi, 2) produksi inokulum, 3) produksi enzim tannase ekstraseluler, 4) analisis aktivitas enzim tannase.

Persiapan media kulit buah kopi

Kulit buah kopi dibersihkan dari kotoran dan diseragamkan ukuran dengan memotong kecil-kecil $\pm 0,5 \times 0,5 \text{ cm}^2$. Menimbang sejumlah kulit buah kopi dan ditempatkan dalam baki beralaskan aluminium foil dengan ketebalan sekitar 0,5 cm. Kulit buah kopi tersebut disterilkan dengan sinar UV selama 2 jam. Selanjutnya kulit buah kopi dimasukkan dalam labu Erlenmeyer 500 ml steril.

Produksi inokulum

Aspergillus niger diperbanyak dengan menumbuhkan pada media PDA dalam labu Erlenmeyer 250 ml pada suhu 30°C untuk memproduksi spora. Setelah umur 5 sampai 6 hari dilakukan pemanenan spora dengan mensuspensikannya dalam larutan fisiologis NaCl 0,85 % sebagai kultur sediaan.

Produksi enzim Tannase ekstraseluler

Menginokulasikan $\pm 3.5 \times 10^8$ spora *A. niger* per g bahan pada media kulit buah kopi. Fermentasi dilakukan secara *batch* statik dalam bioreaktor erlenmeyer selama 8 hari pada suhu 30°C,

dengan pengamatan setiap 24 - 48 jam. Separasi enzim dilakukan dengan mengencerkan media fermentasi dalam larutan buffer fosfat atau aquades steril dan disaring. Filtrat hasil sentrifugasi pada 4000 rpm selama 20 menit (larutan enzim kasar), selanjutnya diuji karakteristiknya.

Rancangan Percobaan

Penelitian dilakukan dengan memfermentasi kulit buah kopi menggunakan *Aspergillus niger* dalam *batch static* fermentor secara SSF selama 8 hari. Pengambilan sampel dan pengamatan dilakukan setiap 24 – 48 jam. Percobaan diulang sebanyak 3 kali. Deskripsi data hasil penelitian disajikan dalam bentuk grafik.

Metode Analisis

Aktifitas enzim

Aktifitas enzim ditentukan berdasarkan metode Bhakti Bajpai, dimana satu unit enzim tannase adalah kemampuan enzim menghasilkan 1 μg asam gallat per ml per menit. Untuk uji ini diperlukan reagent: larutan 0,667 % (w/v) rhodanine (2-thio-4-ketothiazolidine) dalam ethanol; asam gallat 0,2 g/l dalam 0,2 N H₂SO₄; larutan 2N H₂SO₄; dan larutan 0,5N KOH.

Pembuatan kurva standar

Sebanyak 100 μl larutan standar ditambah 150 μl larutan rhodanine 0,667 % (w/v), divortex hingga homogen. Diamkan selama 5 menit tepat lalu ditambah 2,25 ml larutan 0,5 N KOH hingga larutan berwarna merah. Diamkan selama 20 menit, diukur absorbansinya ($\lambda = 520 \text{ nm}$). Memplotkan nilai absorbansi dengan kadar asam gallat.

Komposisi larutan dalam pembuatan kurva standar disajikan pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Komposisi larutan standar pengujian aktivitas enzim tannase

Konsentrasi (g/l)	Larutan asam gallat (ml)	Larutan 0,2 N H ₂ SO ₄ (ml)
0.00	0.0	1.0
0.02	0.1	0.9
0.04	0.2	0.8
0.06	0.3	0.7
0.08	0.4	0.6
0.10	0.5	0.5
0.12	0.6	0.4
0.14	0.7	0.3
0.16	0.8	0.2
0.18	0.9	0.1
0.20	1.0	0.0

Pengujian aktivitas enzim sampel

Sampel (filtrat enzim kasar) disentrifuse selama 10 menit pada 13000 rpm. Filtrat yang diperoleh dihidrolisa dengan larutan 2,5 ml 2 N H₂SO₄ untuk setiap 0,5 ml enzim kasar. Larutan campuran enzim dan asam dipanaskan selama 26 jam pada suhu 100°C (dilakukan dalam Water bath). Selesai hidrolisa diambil 100 µl dan ditambah 150 µl larutan rhodanine dan divortex. Diamkan selama tepat 5 menit, lalu ditambah 2,25 larutan 0,5 N KOH. Diamkan selama 20 menit, lalu dibaca absorbansinya.

Pengukuran nilai pH

Nilai pH enzim kasar ditentukan dengan menggunakan pH-meter digital.

Pengukuran kadar protein enzim

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowry menggunakan standar bovine serum albumin (BSA). Mengambil 250 µl sampel atau filtrat enzim kasar (blanko digunakan aquades) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditambahkan 250 µl NaOH 2 N, lalu

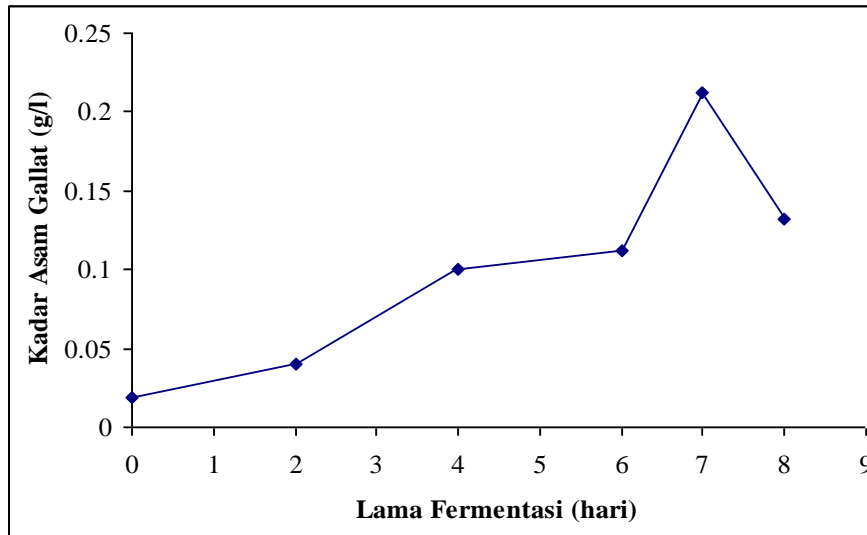
dipanaskan selama 10 menit. Setelah dingin, ditambah campuran reagen Lowry sebanyak 2,5 ml dan dibiarkan selama 10 menit. Lalu ditambah reagen folin 250 µl 1N dan divortex. Filtrat hasil pemisahan didiamkan selama 30 menit, lalu ditambah aquades sebanyak 1,75 ml, dan diukur absorbansinya pada $\lambda = 750$ nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktifitas Enzim Tannase

Pengukuran aktivitas enzim tannase didasarkan pada perubahan absorbansi dari ekstrak yang mengandung asam tannat, dimana aktivitas enzim tannase ditentukan dengan jumlah asam gallat dalam hidrolisat (filtrat enzim) dikurangi dengan asam gallat dalam blanko.

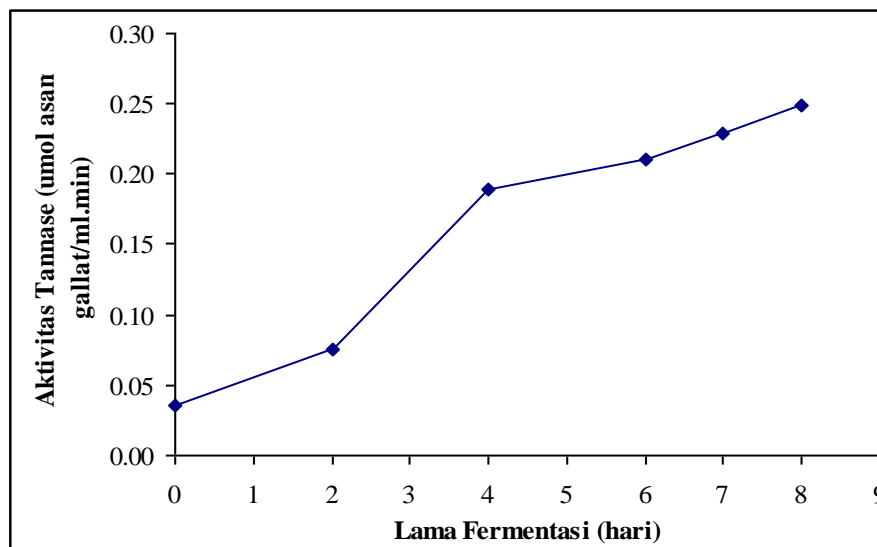
Jumlah asam gallat yang terkandung dalam filtrat enzim kasar hasil fermentasi oleh *Aspergillus niger* dalam media kulit buah kopi cenderung meningkat seiring penambahan masa inkubasi (**Gambar 1**).



Gambar 1. Kadar asam gallat filtrat enzim tannase kasar selama fermentasi

Gambar 1 menunjukkan bahwa selama fermentasi terjadi pembentukan asam gallat sebagai hasil aktivitas *Aspergillus niger* dalam mendegradasi senyawa tannin yang terdapat dalam kulit buah kopi. Hidrolisis senyawa tannin oleh

tannase menghasilkan asam gallat. Akumulasi asam gallat yang dibentuk oleh enzim tannase meningkat seiring dengan bertambahnya waktu fermentasi. Hal ini terlihat dari peningkatan aktivitas enzim tannase selama fermentasi (**Gambar 2**).



Gambar 2. Aktivitas enzim tannase dari filtrat enzim tannase kasar selama fermentasi

Peningkatan produksi enzim akan menghasilkan peningkatan aktivitasnya. Dari **Gambar 2** dapat diketahui bahwa pembentukan enzim mengalami peningkatan seiring dengan lama fermentasi, dimana pada akhir fermentasi dengan tipe SSF didapatkan nilai aktivitas enzim sebesar 0,249 μmol

asam gallat/ml. menit. Berarti setiap ml filtrat enzim tannase kasar hasil aktivitas *Aspergillus niger* dalam media kulit buah kopi mampu membentuk 0,249 μmol asam gallat setiap menit. Produksi enzim tannase meningkat tinggi pada lama fermentasi antara 2 sampai 4 hari, kemudian peningkatannya kecil. Hal ini

menunjukkan bahwa degradasi tannin makin berkurang sebagai akibat substrat (tannin) berkurang.

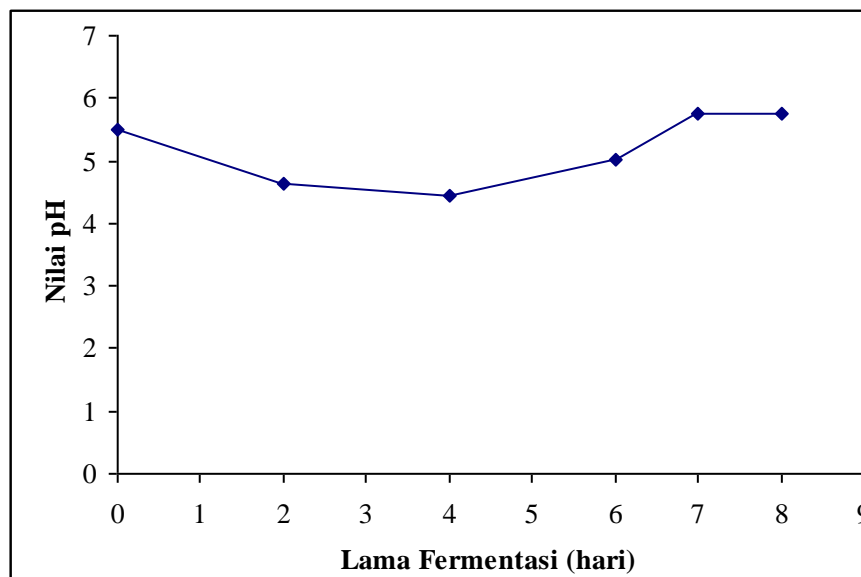
Hasil tersebut ternyata masih lebih kecil dari hasil penelitian Bradoo, *et.al* (1997), dimana *Aspergillus niger* mampu menghasilkan tannase dengan aktivitas sebesar 29,13 U/ml. Perbedaan ini terjadi karena pada penelitian sebelumnya digunakan sumber karbon dari asam tannat murni. Seperti diketahui bahwa kulit buah kopi mengandung berbagai zat bersifat *non-nutrisious*, sehingga dimungkinkan memberikan efek kurang baik bagi pertumbuhan *Aspergillus niger*. Akibatnya kemampuan jamur ini dalam mendegradasi tannin menjadi rendah.

Nilai pH

Nilai pH berkaitan dengan jumlah asam tannat dan asam gallat hasil hidrolisis tannin oleh tannase. Perubahan

pH media didapat dari keseimbangan antara degradasi asam tannat (sumber karbon) selama pertumbuhan dan akumulasi asam gallat hasil metabolisme *Aspergillus niger*. Nilai pH filtrat enzim kasar hasil fermentasi oleh *Aspergillus niger* selama fermentasi berkisar antara 4,45 dan 5,57.

Dari **Gambar 3** terlihat bahwa selama fermentasi terjadi perubahan pH pada media fermentasi kulit buah kopi. Pada awal fermentasi pH menurun dari 5,5 menjadi 4,45 hingga hari ke-4, lalu cenderung meningkat lagi menjadi 5,57 pada hari ke-7, lalu relatif stabil. Hal ini seiring dengan jumlah asam gallat yang terbentuk sebagai hasil degradasi senyawa tannin kulit buah kopi oleh aktivitas *Aspergillus niger*. Nilai pH terendah sebesar 4,45 diperoleh pada fermentasi hari ke-4. Pada saat tersebut diperkirakan jumlah enzim tannase juga mencapai nilai tertinggi.

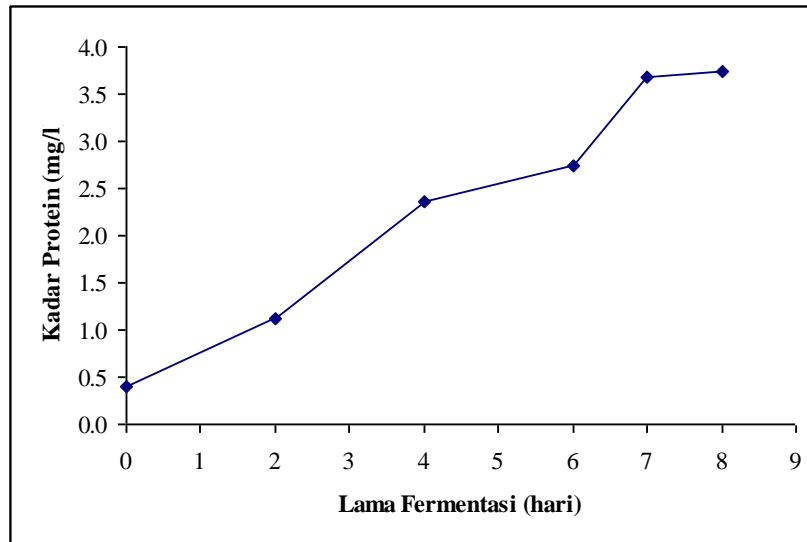


Gambar 3. Nilai pH dari filtrat enzim tannase kasar selama fermentasi

Kadar Protein Filtrat Enzim Tannase Kasar

Kadar protein filtrat enzim tannase kasar hasil fermentasi oleh

Aspergillus niger dalam media kulit buah kopi cenderung meningkat seiring penambahan lama fermentasi (**Gambar 4**).



Gambar 4. Kadar protein filtrat enzim tannase kasar selama fermentasi

Gambar 4 menunjukkan bahwa *A. niger* mampu melakukan metabolisme dengan membentuk senyawa protein selama fermentasi. Pembentukan protein diyakini berkaitan dengan reaksi enzimatik yang dihasilkan jamur untuk mendegradasi molekul tannin, yaitu memproduksi tannase. Pembentukan enzim tannase menyebabkan peningkatan kadar protein, karena enzim adalah senyawa protein. Oleh karena itu dapat dinyatakan bahwa selama fermentasi *A.niger* mampu membentuk enzim tannase, yang ditandai juga dengan peningkatan kadar asam gallat dan aktivitas enzim, serta penurunan pH filtrat enzim.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa bahwa enzim tannase dapat diproduksi oleh *Aspergillus niger* dengan media kulit buah kopi segar yang telah dikeringkan secara *solid state fermentation*. Produktivitas enzim tannase paling tinggi diperoleh pada lama fermentasi antara 4 sampai 6 hari, dimana kadar asam gallat mencapai 0,1004-0,1121g/l, aktivitas enzim tannase mencapai 0,189-0,211 μ mol asam gallat/ml. menit, pH

sebesar 4,45-5,01 dan kadar protein 2,367-2,733 g/l.

DAFTAR PUSTAKA

- Antier PA, Roussos MS, Raimbault M and Gonzales GV (1993). Pectinase hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* c28b25 for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme Microbial Technology* 15:254 - 260.
- Bajpai B and Patil S (1997). Induction of tannin acyl hydrolase (ec 3.1.1.20) activity in some members of fungi imperfecti. *Enzyme and Microbial Technology* 20:612 – 614.
- Bradoo SR, Gupta and Saxena RK (1997). Parametric optimization and characterization of a tannase from *Aspergillus japonicus*. *Process Biochemistry* 32:135 – 139.
- Deschamps AM and Lebeault JM (1984). Production of gallic acid from tara tannin by bacterial strains. *Biotechnology Letters* 6:237 – 242.

- Ellias LG (1979). *Chemical composition of coffe berry by products. In coffe pulp : composition, tecnology and utilization*. J.E. Braham and R. Bressani (Ed). Ottwa : IDRC.
- Lekha PK and Lonsane BK (1997). Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Advances in Appliede Microbiology* 44:216 – 260.
- Hartoto L (1992). *Petunjuk praktikum teknologi fermentasi*. Depdikbud RI, Dirjen Pendidikan Tinggi, PAU Bioteknologi IPB, Bogor.
- Natarajan K and Rajendran A (2009). Effect of fermentation parameters on extra cellular tannase production by *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407. *E-Journal of Chemistry* 6(4), 979-984. <http://www.e-journals.net>
- Paranthaman R, Vidyalakshmi S, Muruges and Singaravadivel K (2009). Optimiza-tion of various culture media for tannase production in submerged fermenta-tion by *Aspergillus flavus*. *Advances in Biological Research* 3(1-2): 34-39
- Porres C, Alvarez D and Calzada J (1993). Caffeine reduction in coffe pulp trough silage. *Biotechnology Advantages* 11:519 – 523.
- Ramana Murthy MV, Karanth NG and Raghava Rao KS (1993). Biochemical engineering aspect of solid state fermentation. *Advances Applied Microbiology* 38:99 – 147.
- Sargantanis J, Karim MN, Murphy VG and Tengerdy RP (1993). Effect of opera-ting condition on solid state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 42: 149 – 158.
- Srivastava A and Rita Kar (2009). Characterization and application of tannase produced by *Aspergillus niger* ITCC 6514.07 on pomegranate rind. *Brazilian Journal of Microbiology* 40:782-789
- Van de Lagemaat J, Augur C and Pyle DL (2000). Screening of filamentous fungi for the production of extracellular tannase in solid state fermentation. In : Serra T, Soccol CR, Pandey A and Roussos S (Ed) *Coffee Biotechnology and Quality. Dordrecth. Kluwer Academic Publisher*, pp 455 – 460.
- Zuluaga VJ (1989). Utilization integral de los subproductos del cafe'. In: Roussos S, Licon R and Gutierrez M (Ed), *Memorias I Seminar International Bitechnology Agroindustry Cafe' (I SIBAC)*, Xalapa, Mexico, pp 63 – 76.