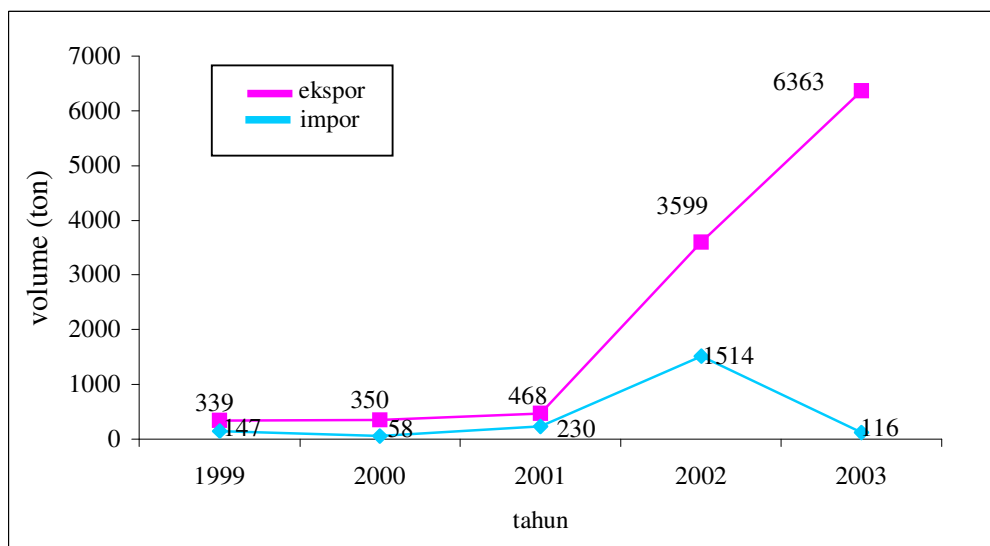


## TINJAUAN PUSTAKA

### TINJAUAN STATISTIK KOMODITAS VANILI DI INDONESIA

Salah satu komoditas hasil perkebunan yang mempunyai nilai ekonomi relatif tinggi adalah buah vanili. *Trend* ekspor dan impor vanili di Indonesia dari tahun 1999 sampai dengan 2003 dapat dilihat pada Gambar 2.

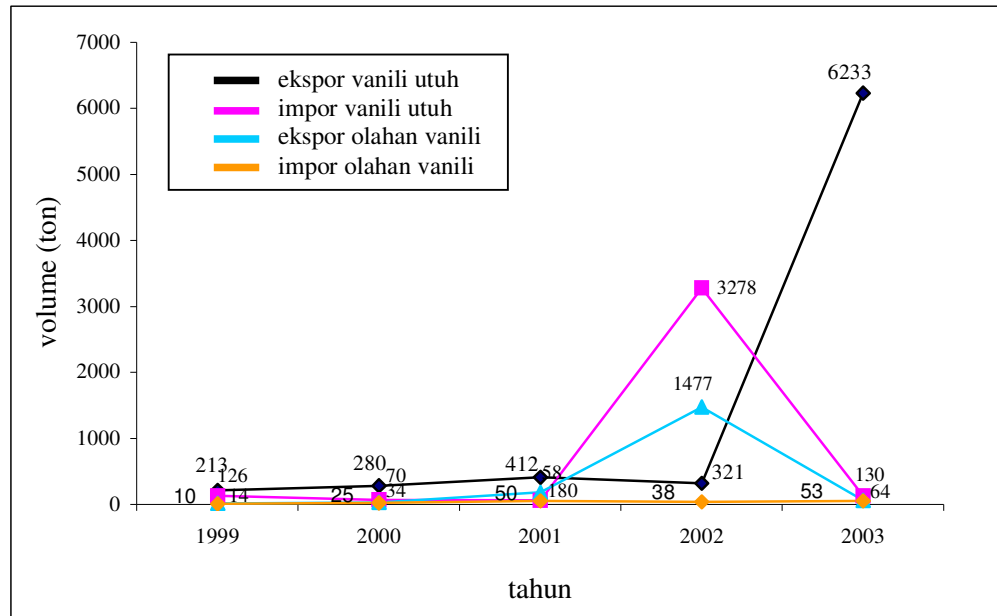


Gambar 2 Ekspor dan impor komoditas vanili di Indonesia pada tahun 1999-2003 ( BPS, diolah Deptan 2004)

Bentuk komoditas vanili yang diekspor dan diimpor dapat dikelompokkan menjadi 2 yakni *whole bean* dan *other vanilla*. Bentuk *whole bean* merupakan bentuk vanili utuh kering yang telah mengalami proses kuring. Sedangkan *other vanilla* merupakan bentuk olahan vanili lainnya setelah dilakukan proses kuring, yakni berupa ekstrak vanili, oleoresin, bubuk dan lain-lain. Adapun bentuk komoditas vanili yang diekspor dan impor dapat dilihat pada Gambar 3.

Berdasarkan data Biro Pusat Statistik (BPS) yang diolah Deptan (2004), 3 negara tujuan ekspor Indonesia terbesar pada tahun 2002 untuk bentuk vanili utuh kering antara lain Amerika Serikat 241.786 ton, Jerman 51.315 ton dan Hongkong 9.356 ton. Posisi ini berubah pada tahun 2003 dimana peringkat pertama digantikan oleh Cina sebesar 6.000.000 ton, disusul Amerika Serikat 190.010 ton dan Jerman 25.028 ton. Untuk ekspor olahan vanili, 3 negara tujuan ekspor Indonesia terbesar pada tahun 2002 antara lain Cina sebesar 3.000.000 ton, Malaysia 216.919 ton dan Amerika Serikat 36.539 ton. Posisi ini berubah pada

tahun 2003 dimana urutan pertama digantikan oleh Amerika Serikat 63.971 ton, disusul Korea 26.030 ton dan Singapura 19.815 ton. Sedangkan data dari Cina sendiri yang tahun sebelumnya menempati peringkat pertama sebagai negara tujuan ekspor bentuk olahan vanili Indonesia, masih belum tercantum.

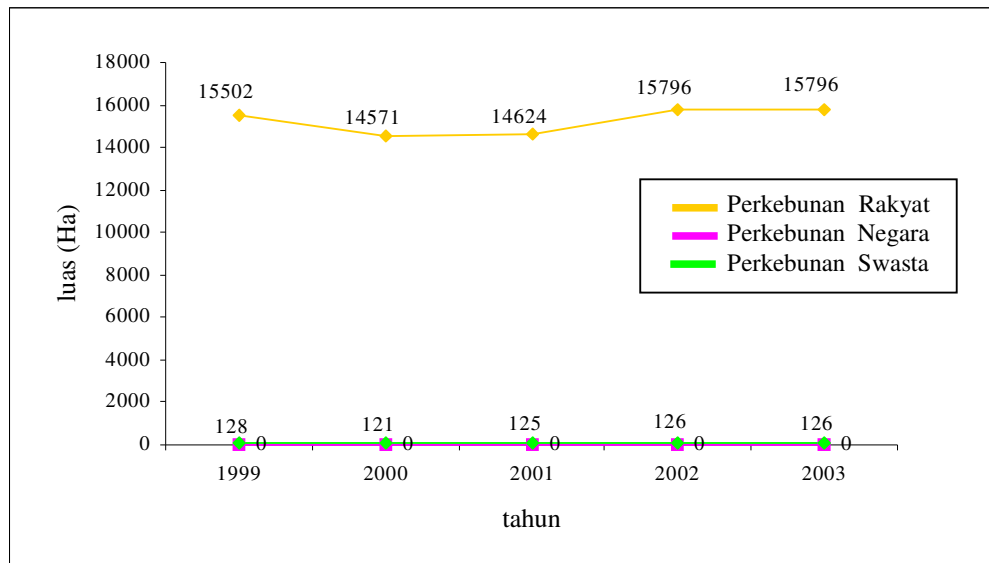


Gambar 3 Bentuk ekspor dan impor komoditas vanili di Indonesia pada tahun 1999-2003 (BPS, diolah Deptan 2004)

Negara pengimpor terbesar pada tahun 2002 berdasarkan data Biro Pusat Statistik (BPS) yang diolah Deptan (2004), untuk bentuk vanili utuh kering adalah Papua New Giunea 1.476.789 ton. Pada tahun 2003, 3 negara pengimpor terbesar adalah Papua New Giunea sebesar 53.418 ton, Amerika Serikat 8.121 ton dan Singapura 1.050 ton. Sedangkan untuk impor olahan vanili, 3 negara pengimpor terbesar pada tahun 2002 antara lain Timor Timur 14.804 ton, Australia 10.457 ton dan Malaysia 8.277 ton. Posisi ini berubah pada tahun 2003 dimana posisi pertama digantikan oleh Korea 33.025 ton, disusul Amerika Serikat 16.814 ton dan Papua New Giunea 1.148 ton. Sedangkan data dari Timor Timur sendiri yang tahun sebelumnya menempati urutan pertama sebagai negara pengimpor, masih belum tercantum.

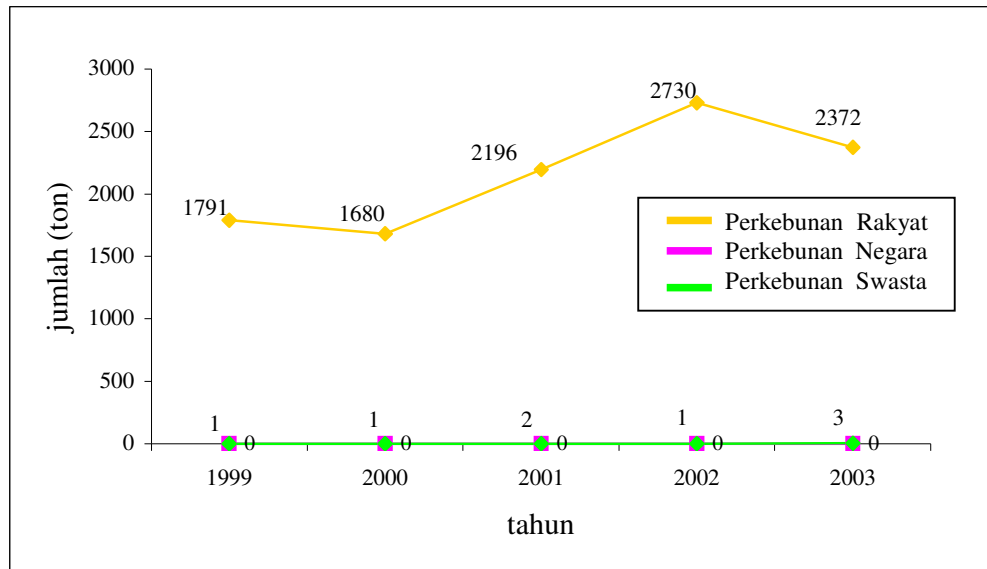
Negara terbesar yang memproduksi dan mengekspor vanili, dimana memenuhi kebutuhan pasar dunia adalah Indonesia (682 ton, 40%), Madagaskar

(673 ton, 40%), Comoros (211 ton, 12%), dan Tonga (38 ton, 2%). Negara Asia Tenggara lainnya yang mengekspor sejumlah kecil vanili adalah Malaysia, Filipina, Thailand dan Singapura (de Guzman dan Siemonsma 1999). Adapun profil luas area perkebunan vanilli berdasarkan status pengusahaan di Indonesia dapat dilihat pada Gambar 4.



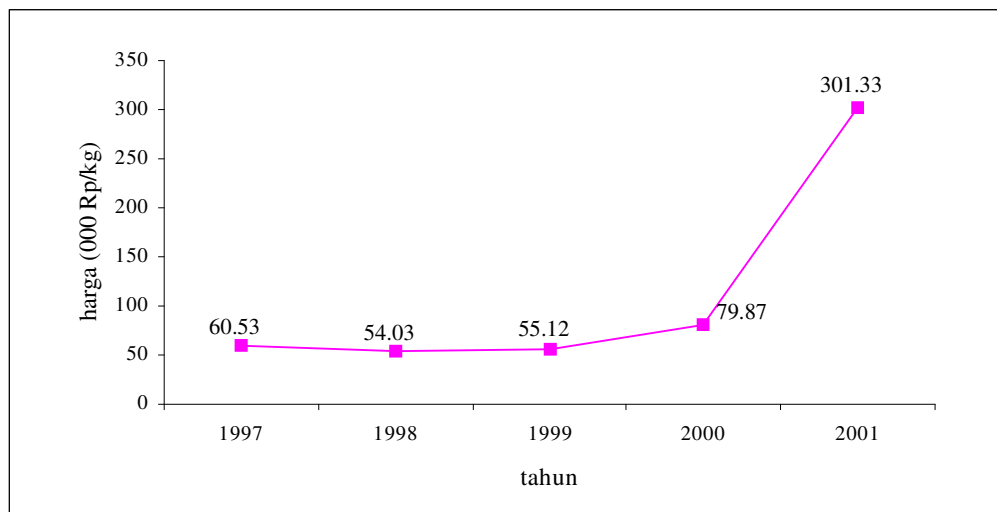
Gambar 4 Luas areal perkebunan vanilli berdasarkan status pengusahaan di Indonesia pada tahun 1999-2003 (BPS, diolah Deptan 2004)

Berdasarkan data Biro Pusat Statistik (BPS) yang diolah Deptan (2004), luas areal tanaman vanili yang mayoritas Perkebunan Rakyat (PR) tersebut, tersebar di berbagai provinsi di Indonesia. Sejak tahun 2001 sampai 2003 areal terluas yang digunakan untuk tanaman vanilli terdapat di Prov. Sulawesi Utara dengan rata-rata 5877 ha, Sulawesi Selatan 2742 ha dan Nusa Tenggara Timur 2175 ha. Di provinsi lainnya pun terdapat perkebunan vanilli milik rakyat, tapi dengan luas yang lebih rendah, kecuali untuk Provinsi Nanggroe Aceh Darussalam, Riau, Bangka Belitung, DKI Jakarta, Kalimantan Barat, Kalimantan Tengah, Sulawesi Tenggara dan Irian Jaya yang sama sekali tidak memiliki perkebunan vanili dengan status PR, Perkebunan Negara (PN) maupun Perkebunan Swasta (PS). Adapun profil produksi vanilli kering berdasarkan status pengusahaan dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5 Produksi vanili kering berdasarkan status perusahaan di Indonesia pada tahun 1999-2003 (BPS, diolah Deptan 2004)

Seperti halnya harga vanili kering, harga vanili segar pun naik turun. Profil harga vanili segar rata-rata di pasar dalam negeri dapat dilihat pada Gambar 6 (BPS, diolah Deptan 2004). Harga tahun 2000 dan 2001 yang terlihat pada Gambar 6 adalah data daerah Provinsi Jawa Tengah. Pada awal tahun 2005 ini, menurut informasi yang diperoleh dari para petani di Kabupaten Kuningan, Jawa Barat, harga vanilli segar berkisar Rp.65.000/kg dan vanili kering Rp.700.000/kg.



Gambar 6 Harga vanili segar di pasar dalam negeri pada tahun 1997-2001 (BPS, diolah Deptan 2004)

## BOTANI, STRUKTUR DAN SENYAWA KIMIAWI PENYUSUN BUAH VANILI

Secara sistematis, vanili termasuk bunga monokotil famili *Orchidaceae* yang merupakan famili tumbuhan bunga terbesar dengan 700 genus dan 20.000 spesies. Untuk tujuan komersial, terdapat 3 spesies yang mempunyai nilai ekonomi tinggi yakni *Vanilla planifolia* Andrews, *Vanilla pompana* Schieda dan *Vanilla tahitensis* JW Moore. Jenis vanili yang paling banyak ditemui di Indonesia adalah *Vanilla fragrans* (Salibs.) Ames (syn. *V. planifolia* Andrews) yang sangat terkenal bermutu tinggi dan menduduki peringkat 1 dunia karena kadar vanilinnya yang tinggi (Deptan 2004). Buah vanili jenis *V. planifolia* Andrews dapat dilihat pada Gambar 7 ([http://www.uyseg.org/greener\\_industry/pages/vanilin/1Vanilin\\_AP.htm](http://www.uyseg.org/greener_industry/pages/vanilin/1Vanilin_AP.htm) 2005; <http://www.ipa.gov.pg.com> 2005).



(a)



(b)

Gambar 7 Bunga serta buah vanili mentah (a) dan buah vanili matang (b)

Vanili dapat tumbuh dengan baik di iklim tropis dengan curah hujan 1000-3000 mm/tahun, suhu 20<sup>0</sup>C serta kelembaban 60-80%. Tanaman vanili merupakan tanaman hutan dan hidup di bawah naungan pohon-pohon rindang. Tanaman ini tumbuh melekat pada pohon dengan sulur panjangnya, hingga mencapai tinggi berpuluh-puluh meter (<http://www.kpel.or.id/TTGP/komoditi/PANILII> 2005)

Tanaman vanili mulai masuk ke Pulau Jawa pada tahun 1846 oleh Teysmann, Direktur *Buitenzorg Botanic Garden* (Kebun Raya Bogor). Ia menemukan metode yang memuaskan dengan penyerbukan menggunakan tangan. Metode ini dilakukan karena penyerbukan bunga *V. planifolia* Andrews alami

hanya dapat terjadi di Meksiko, Guatemala dan bagian lain dari Amerika Tengah, yakni dengan lebah genus *Melapona*, disamping burung kolibri yang juga diperkirakan sebagai agen penyerbukan. Metode penyerbukan menggunakan tangan ditemukan pertama kali oleh Morren di Liege tahun 1836 dan Edmond Albius yang menemukan metode praktis penyerbukan buatan pada tahun 1841, dimana metode ini masih digunakan sampai sekarang (Purseglove *et al.* 1981).

Tanaman vanili akan berbunga setelah 2 tahun, mulai berbuah setelah 3 tahun dan mencapai hasil maksimum dalam waktu 10-12 tahun. Vanili berbunga satu kali dalam setahun dan hanya 50 bunga dari setiap tanaman yang dapat dilakukan penyerbukan menggunakan tangan (Heath dan Reineccius 1986). Setelah pembuahan berhasil, buah membutuhkan waktu 6 bulan untuk mencapai ukuran yang maksimal (6-10 inci) dan 8-9 bulan untuk matang. Masa panen vanili di Indonesia berlangsung sekitar 2-3 bulan antara Mei sampai dengan Juli (<http://www.kpel.or.id/TTGP/komoditi/PANILI1> 2005).

Buah vanili berbentuk silinder dengan panjang 10-25 cm dan diameter 5-15 mm (Purseglove *et al.* 1981). Secara prinsip terdapat 2 bagian dalam buah vanili yakni dinding buah atau daerah hijau yang meliputi epidermis, *ground* dan jaringan vaskular dari dinding buah. Kedua adalah bagian putih yang terdiri dari 3 plasenta *parietal* (tidak termasuk biji) dan 3 pita dari *glandular* rambut yang berperan penting dalam biosintesis vanilin. Daerah hijau terdapat sekitar 60% dan daerah putih serta biji masing-masing sekitar 20% dari berat buah.

Epidermis mengandung sel-sel epidermal dengan diameter yang sama. Setiap sel epidermal mengandung suatu kristal romboidal dari kalsium oksalat dan terikat rapat di dinding sel. Dinding buah mengandung suatu cincin yang terdiri dari 15 bundel vaskular yang tidak bercabang, dimana masing-masing mengandung satu untai silem terdiri dari elemen-elemen anular sampai helikal serta retikulum dan floem dengan satu *sclerotic bundle sheath*.

Jaringan di luar cincin bundel vaskular terdiri dari sel-sel parenkim ber dinding tipis. Setiap dasar sel parenkim dalam dinding buah bagian luar mengandung kloroplas dan kadang-kadang kristal romboidal kalsium oksalat. Dinding buah bagian luar yang mengandung kantung rafid dapat melepaskan rafid yang mengandung *mucilage* jika buah dipotong. Dibandingkan dengan dinding

buah bagian luar, jaringan dinding di samping cincin dari bundel vaskular mengandung sel-sel lebih besar, tapi sedikit mengandung kloroplas sehingga tidak begitu hijau.

Perkembangan buah menyebabkan rambut inter plasenta membentuk dinding yang lunak dan suatu sitoplasma yang kompleks. Akibat ukuran, jumlah dan lunaknya dinding, rambut dengan mudah dapat dilihat dalam potongan melintang buah vanili sebagai 3 *lustrous white band*. Beberapa biji dapat tertekan masuk ke dalam rambut dalam buah matang. Dimana sel-sel rambut tersebut mengandung sejumlah besar lemak, yang dilepaskan ke dalam lokul dan menyelimuti biji jika kemudian rambut tersebut matang dalam buah masak (Havkin-Frenkel *et al.* 2004). Struktur buah vanili segar sebagaimana telah dijelaskan di atas, akan berubah jika buah mengalami proses kering (Gambar 8) (<http://wwwchem.uwimona.edu.jm:1104/lectures/vanilla.html> 2005).



Gambar 8 Buah vanili kering

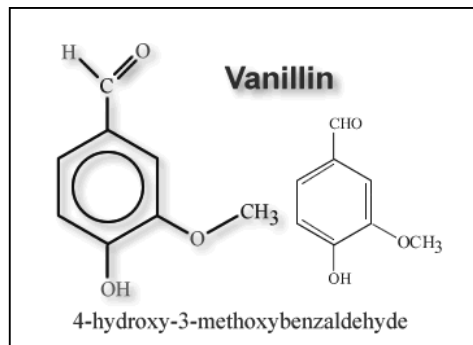
Vanilin merupakan komponen aroma utama yang terdapat dalam buah vanili yakni sebesar 85% dari total senyawa volatil. Komponen lainnya adalah p-hidroksi benzaldehid (sampai 9%) dan p-hidroksi benzil metil eter (1%). Disamping itu, khusus untuk vanili Tahiti memiliki flavor berbeda akibat adanya komponen tambahan yakni piperonal (heliotropin, 3,4-dioksimetilen benzaldehid) dan diasetil (butandion) (<http://www.portal.remarkablefoods.com> 2005).

Selain prekursor dan enzim pembentuk flavor, buah vanili mengandung komponen zat gizi lengkap yang meliputi protein, lemak, karbohidrat, vitamin dan mineral. Menurut de Guzman dan Siemonsma (1999), per 100 g berat buah vanili

kering *Vanilla planifolia* Andrews, mengandung 20 g air, 3-5 g protein, 11 g lemak, 7-9 g gula, 15-20 g serat, 5-10 g abu, 1.5-3 g vanilin, 2 g *soft resin* dan asam vanilat yang tidak berflavor.

### PREKURSOR DAN ENZIM PEMBENTUK VANILIN DI DALAM BUAH VANILI

Flavor dan aroma unik vanili berasal dari senyawa fenolik vanilin (98% dari total komponen flavor vanili) serta dari senyawa lainnya. Vanilin (4-hidroksi-3-metoksi benzaldehid) dengan rumus kimia  $C_8H_8O_3$  dan berat molekul 152.14 merupakan komponen utama senyawa aromatik volatil dari buah vanili (<http://wwwchem.uwimona.edu.jm:1104/lectures/vanilla.html> 2005). Struktur kimia senyawa vanilin dapat dilihat pada Gambar 9 ([http://www.uyseg.org/greener\\_industry/pages/vanilin/1Vanilin\\_AP.htm](http://www.uyseg.org/greener_industry/pages/vanilin/1Vanilin_AP.htm) 2005).



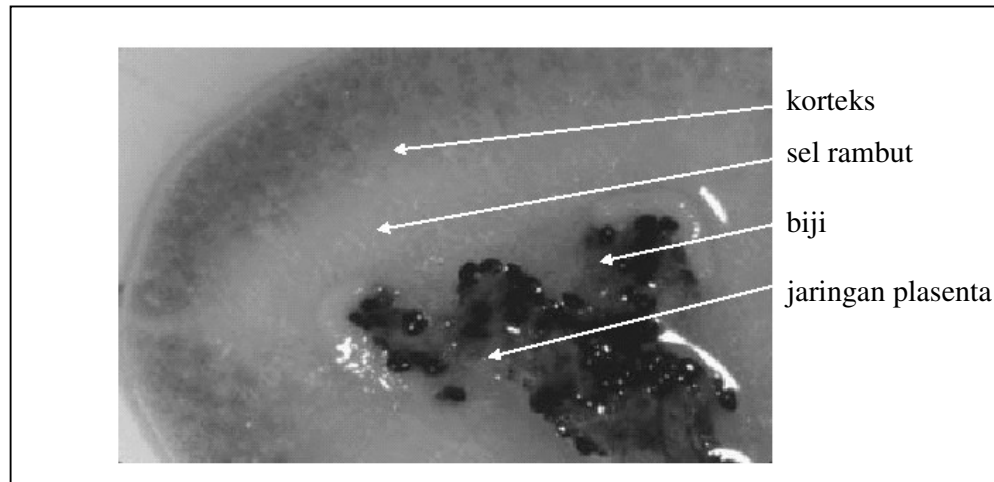
Gambar 9 Struktur kimia vanilin

Senyawa vanilin dapat diperoleh melalui kerja enzim terhadap suatu komponen heterosida (glukosida). Prekursor vanilin dalam buah vanili hijau adalah koniferosida, dimana melalui reaksi oksidasi akan terpecah menjadi vanilosida (glukovanilin) yang menghasilkan vanilin dan glukosa jika dihidrolisis oleh enzim. Disamping itu, terdapat mekanisme alternatif dari pembentukan vanilin dimana glukosida dari vanililalkohol dioksidasi menjadi glukovanilin. Selanjutnya diketahui bahwa vanili hijau mengandung paling sedikit 4 glukosida yang menghasilkan vanilin dan komponen flavor lainnya. Jumlah yang terbanyak adalah glukovanilin, sedangkan glukovanililalkohol ditemukan dalam jumlah yang lebih sedikit, diikuti oleh glukosida dari asam protokatekuat (asam 3,4-dihidroksibenzoat) (Purseglove *et al.* 1981).

Setelah penyerbukan, sejumlah besar serbuk sari mendekati putik. Tabung serbuk sari terdapat dalam 3 kelompok, dimana masing-masing berlokasi dalam suatu kantung pada salah satu sisi dari setiap 3 plasenta, diapit oleh rambut. Biasanya *glandular* rambut mulai berkembang cepat dalam wilayah antara plasenta. Masing-masing rambut tidak bercabang dan kemudian mencapai panjang sekitar 300 mikrometer (Gambar 10). Rambut menjadi terikat bersama-sama selama masa pengembangan dan kemudian rusak lalu melepaskan kandungannya ke dalam lokul. Rambut yang berkembang memiliki banyak retikulum endoplasma, struktur ribosom dan plastida yang mengandung globula lemak dan komponen lainnya yang menandai adanya sel-sel aktif secara metabolik. Swamy (1947) diacu dalam Odoux *et al.* (2003), menunjukkan bahwa vanilin dihasilkan dalam *glandular* rambut. Pendapat ini dikonfirmasi oleh Havkin-Frenkel *et al.* (2004), yang membuktikan bahwa vanilin dan intermediet yang berhubungan dalam biosintesis vanilin terakumulasi dalam jaringan putih bagian dalam (pada buah matang), di sekeliling rambut plasenta. Dengan kata lain selama pengembangan buah yakni sekitar 8-10 bulan, prekursor flavor terakumulasi dalam jaringan plasenta disekeliling biji. Ditemukan juga bahwa jaringan plasenta mengandung intermediet dari biosintesis vanilin yang meliputi asam 4-kumarat, 4-hidroksi benzaldehid dan 3,4-dihidroksi benzaldehid.

Penemuan Kuras *et al.* (1999) diacu dalam Odoux *et al.* (2003), menunjukkan bahwa dalam buah matang, prekursor vanilin terutama terdapat dalam plasenta dan pada jumlah yang lebih sedikit terdapat dalam papila. Keberadaan glukovanilin dalam bagian tengah buah yang mengelilingi biji (plasenta dan papila) berhubungan dengan adanya pengaruh komponen fenolik dalam germinasi biji. Hal ini didukung oleh hipotesis Swamy (1947) diacu dalam Odoux *et al.* (2003), mengenai adanya pengaruh papila dalam biosintesis prekursor aroma glikosilasi yang selanjutnya akan disekresikan ke dalam medium di sekeliling biji. Sedangkan biji sendiri menurut Odoux *et al.* (2003), tidak mengandung glukovanilin sama sekali. Beberapa hasil penelitian di atas, mematahkan hipotesis Arana (1943) diacu dalam Odoux *et al.* (2003), yang menyatakan bahwa glukovanilin terutama terdistribusi dalam dinding buah bagian luar (60-80% dari total glukovanilin), sementara bagian pusat buah yakni jaringan

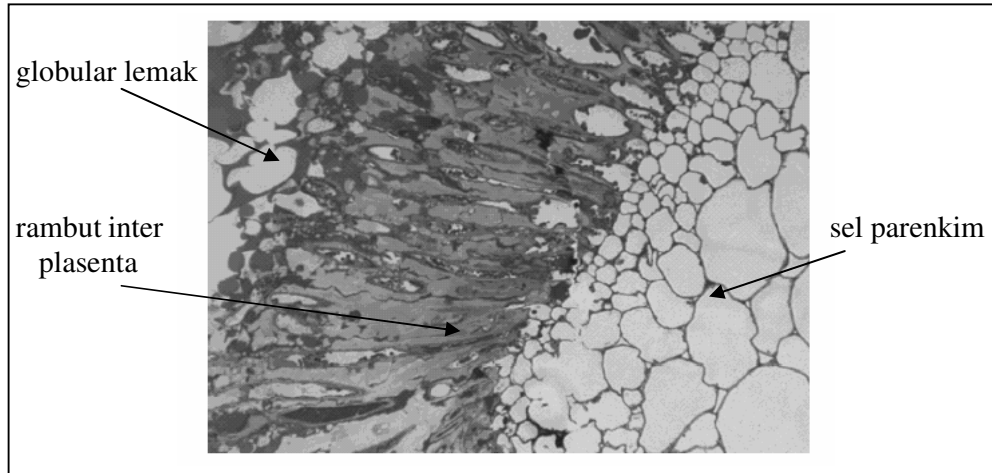
plasenta serta biji hanya mengandung 20-40% dari total glukovanilin. Pada Gambar 10 ditunjukkan jaringan plasenta yang mengelilingi biji (berwarna hitam) dan sel rambut yang merupakan daerah hijau.



Gambar 10 Komposisi bagian dalam buah vanili dengan potongan melintang pembesaran 20 kali (Havkin-Frenkel *et al.* 2004)

Mengenai lokasi utama enzim  $\beta$ -glukosidase dalam buah vanili, Havkin-Frenkel *et al.* (2004), berpendapat bahwa enzim-enzim hidrolitik ( $\beta$ -glukosidase) atau enzim degradatif lainnya yang mengkatalisis pelepasan komponen flavor dari prekursor flavor, berlokasi paling banyak dalam daerah dinding buah bagian luar. Diperkirakan bahwa aktifitas  $\beta$ -glukosidase beberapa kali lebih tinggi dalam dinding buah bagian luar dari pada dalam jaringan plasenta dan *glandular* sel rambut. Sedangkan Arana (1943) diacu dalam Odoux *et al.* (2003), menyatakan bahwa  $\beta$ -glukosidase terdapat dalam dinding buah bagian luar, sedangkan jaringan plasenta sama sekali tidak mengandung aktifitas  $\beta$ -glukosidase. Mengenai vanilin yang dilepaskan selama proses kering, ia menyimpulkan bahwa glukovanilin berdifusi dalam air dari bagian pusat ke permukaan buah sehingga terjadi hidrolisis.

Pada Gambar 11 ditunjukkan inter jaringan plasenta (kiri) dan sel-sel parenkim putih dalam dinding buah (kanan). Sel-sel seperti rambut mengandung enzim-enzim yang diperlukan dalam biosintesis vanilin. Sel-sel tersebut melepaskan sejumlah lemak yang terlihat berbentuk globular (kiri atas).



Gambar 11 Potongan melintang buah vanili hijau dengan pembesaran 400 kali (Havkin-Frenkel *et al.* 2004)

Akan tetapi, pendapat Havkin-Frenkel *et al.* (2004) dan Arana (1943) diacu dalam Odoux *et al.* (2003) tersebut, disanggah oleh Odoux *et al.* (2003), yang menunjukkan bahwa distribusi jaringan dari aktifitas  $\beta$ -glukosidase sama dengan glukovanilin, meskipun sejumlah kecil aktifitas  $\beta$ -glukosidase terdeteksi dalam bagian luar yang berdaging, dimana glukovanilin tidak terdeteksi. Enzim ini terutama berlokasi dalam lamina plasenta dan dengan jumlah yang lebih sedikit terdapat dalam papila. Disamping itu ditemukan pula bahwa antara enzim dan substrat terdapat dalam jaringan yang sama, meskipun mungkin terdapat dalam 2 bagian berbeda di dalam sel (sitoplasma dan atau periplasma untuk  $\beta$ -glukosidase dan vakuola untuk glukovanilin). Hal inilah yang menyebabkan mengapa vanilin tidak dilepaskan hingga buah matang atau saat kering. Hidrolisis glukovanilin yang terjadi pada tahap pematangan lambat ketika buah menjadi hitam dan pada tahap awal kering, dapat disebabkan perubahan tonoplas sehingga membran sitoplasma dan dinding sel bersatu.

Kandungan glukovanilin buah vanili secara bertahap meningkat seiring dengan tingkat kematangan buah dan terdistribusi di dalam buah. Distribusi glukovanilin berhubungan dengan perubahan warna dari hijau, kuning lalu menjadi coklat saat matang. Jumlah glukovanilin terbanyak terdapat pada *blossom-end* dan paling sedikit pada *stem-end*. Hal ini dibuktikan dengan

kenyataan bahwa kristalisasi vanilin lebih banyak terjadi pada bagian *blossom-end* matang dibanding pada *stem-end* (Purseglove *et al.* 1981).

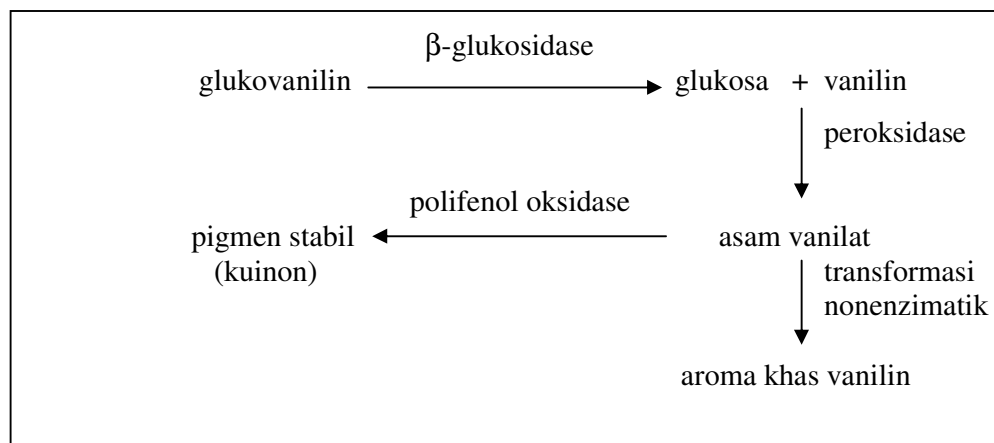
Begitu pula dengan kandungan dan aktifitas  $\beta$ -glukosidase yang meningkat dengan meningkatnya kematangan buah (seiring dengan terbentuknya glukovanilin). Pada saat buah hijau, aktifitas  $\beta$ -glukosidase dan kandungan vanilin bebas dapat diabaikan. Aktifitas maksimum  $\beta$ -glukosidase terjadi saat fase *split blossom-end yellow* dan kandungan vanilin bebas paling tinggi terdapat pada tahap yang mengakibatkan warna buah menjadi coklat. Aktifitas  $\beta$ -glukosidase sebagian tidak aktif jika buah menjadi coklat (*chocolate brown*) pada setengah panjangnya, tapi dapat diaktifkan kembali selama kuring (Purseglove *et al.* 1981).

### **REAKSI ENZIMATIK SELAMA PROSES KURING**

Tujuan proses kuring secara umum adalah untuk menginduksi kontak antara prekursor flavor dengan enzim yang mengkatalisis hidrolisis senyawa prekursor menjadi vanilin sebagai komponen flavor utama. Proses kuring ini terdiri dari 4 tahap yakni *killing* yang merupakan tahap pertama dari kuring dengan menggunakan air panas (*blanching*), pembekuan atau dengan metode lainnya, bertujuan untuk mencegah pertumbuhan vegetatif buah dan untuk mendegradasi jaringan buah sehingga terjadi kontak antara substrat dengan enzim (memicu reaksi enzimatik). Metode *killing* yang biasa digunakan karena kepraktisannya adalah pencelupan dalam air panas 60-70<sup>0</sup>C selama 3 menit. Tahap kedua adalah pemeraman (*sweating* atau *fermenting*) dengan kelembaban dan suhu tinggi (45<sup>0</sup>C-65<sup>0</sup>C) selama 7-10 hari. Tujuannya adalah untuk menyediakan kondisi dengan kelembaban tinggi, untuk mengkatalisis berbagai proses hidrolisis dan oksidasi hingga diproduksi komponen flavor secara enzimatik dan non enzimatik (Havkin-Frenkel *et al.* 2004). Peningkatan suhu pada tahap ini menyebabkan meningkatnya kerja enzim dan dapat mencegah fermentasi (kebusukan buah) (Anandaraj *et al.* 2001). Pada akhir masa pemeraman, buah berwarna coklat dan mengembangkan karakteristik flavor dan aroma vanili kering. Akan tetapi, buah masih mengandung kadar air cukup tinggi yakni 60-70%. Untuk mencegah kerusakan oleh mikroba dan mencegah aktifitas enzim lebih jauh, maka dilakukan pengeringan selama 15 sampai 20 hari hingga kadar air buah mencapai 25-30%.

Selanjutnya dilakukan *conditioning* selama beberapa bulan yang bertujuan agar dihasilkan vanili kering dengan flavor optimum. Seluruh proses kering ini memakan waktu sekitar 3 sampai 6 bulan atau lebih lama lagi tergantung metode kering yang digunakan (Havkin-Frenkel *et al.* 2004).

Pada tahap awal proses kering terjadi degradasi dinding sel buah secara enzimatis oleh enzim-enzim tertentu seperti selulase, pektinase, hemiselulase dan lain-lain. Setelah itu diikuti oleh transformasi prekursor flavor oleh enzim  $\beta$ -glukosidase yang termasuk tipe ketiga dari enzim selulase. Mekanisme transformasi glukovanilin menjadi vanilin dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12 Transformasi glukovanilin dan vanilin (Purselove *et al.* 1981)

Penelitian-penelitian telah banyak dilakukan untuk mengidentifikasi komponen kimia yang membentuk flavor vanili kering, tapi sangat sedikit penelitian yang mempublikasikan bagaimana komponen-komponen tersebut terbentuk selama proses kering. Proses panas, reaksi enzim dan aktifitas mikroba adalah yang digambarkan penting dalam pembentukan flavor (Roling *et al.* 2001).

## EKSTRAKSI BUAH VANILI

### Ekstraksi Vanili Konvensional

Ekstraksi adalah metode efisien yang digunakan untuk memisahkan dan mengkonsentrasikan suatu bahan. Ekstraksi dengan pelarut dapat memisahkan campuran berdasarkan perbedaan kelarutan dari komponen-komponen yang terkandung didalamnya.. Ekstraksi konvensional vanilin dapat dilakukan melalui

pencampuran buah vanili dengan pelarut polar seperti etanol dan air. *Like dissolves like* adalah acuan untuk memilih jenis pelarut yang digunakan (Tesla 2000; [http://www.ktf-split.hr/glossary/en\\_o.php?def=extraction](http://www.ktf-split.hr/glossary/en_o.php?def=extraction) 2005).

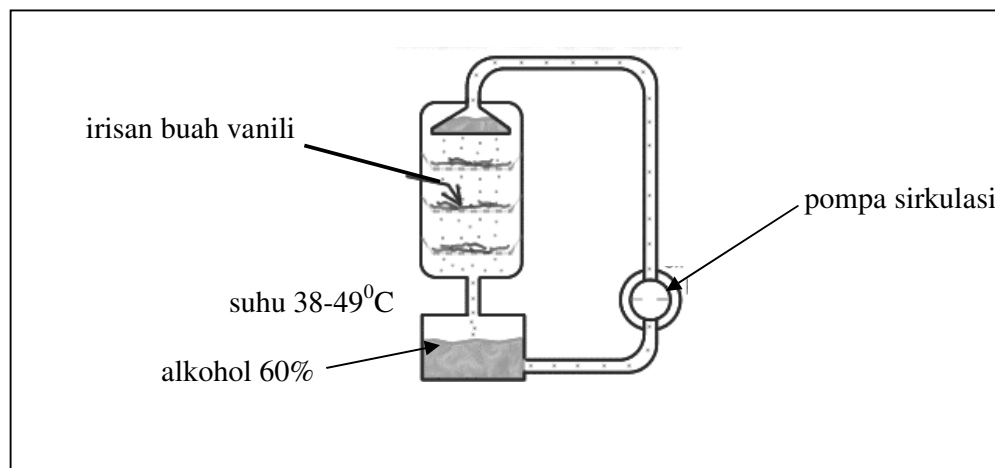
Air merupakan molekul polar yang memiliki ujung muatan negatif dan positif sehingga molekul air dapat berinteraksi satu dengan yang lainnya. Molekul air juga dapat berinteraksi dengan molekul polar lainnya. Polaritas dari suatu ikatan adalah distribusi muatan listrik atom yang digabungkan melalui ikatan. Muatan listrik pada beberapa atom yang tidak sama disebut muatan parsial dan keberadaan muatan parsial tersebut adalah terdapat dalam suatu ikatan polar. Sedangkan molekul non polar adalah molekul yang mengandung distribusi yang simetris dari muatan listrik (Tesla 2000).

Jenis pelarut lainnya yang biasa digunakan dalam ekstraksi vanili adalah etanol. Etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) merupakan suatu alkohol yang mengandung gugus hidroksil (-OH) yang terikat pada atom karbon. Titik didih etanol adalah  $78.5^\circ\text{C}$  dan memiliki berat jenis  $0.789 \text{ g/ml}$  pada  $20^\circ\text{C}$ . Etanol bersifat polar yang dapat dicampur dengan air dan pelarut organik lainnya (<http://www.scifun.chem.wisc.edu/chemweek/ethanol/ethanol.html> 2005). Pelarut etanol cair yang digunakan dalam pembuatan ekstrak vanili mampu mengekstrak senyawa aromatik yang terdapat dalam buah vanili. Kandungan alkohol minimum adalah  $35\%v/v$  dan kandungan buah vanili adalah 1 bagian (berat) dalam 10 bagian (volume) dari ekstrak. Di Australia kandungan alkohol dari ekstrak vanili bervariasi antara  $50-57\%$  (Cowley 1973).

Disisi lain, beberapa industri besar yang memproduksi ekstrak vanili mengacu pada *Food and Drug Administration (FDA)* yang mengatur bahwa ekstrak vanili alami harus mengandung alkohol minimum  $35\%$ , bahan terlarut dari  $13.5 \text{ ons per galon}$  (dengan kandungan air buah tidak lebih dari  $25\%$ ) serta mengandung bahan lainnya seperti air, gliserin, propilen glikol, gula, dekstrosa atau sirup jagung. Spesifikasi ini menghasilkan konsentrasi *single fold* dan ekstrak biasanya dibuat pada konsentrasi *two* ( $26.7 \text{ ons per galon}$ ) atau *four fold* ([http://www.uyseg.org/greener\\_industry/pages/vanilin/1Vanilin\\_AP.htm](http://www.uyseg.org/greener_industry/pages/vanilin/1Vanilin_AP.htm) 2005).

Ekstrak vanili merupakan bentuk olahan vanili yang biasa digunakan sebagai *flavouring*. Ekstraksi dapat dilakukan dengan metode maserasi yakni

merendam buah vanili dalam larutan alkohol dan air. Campuran tersebut biasanya disimpan selama beberapa bulan untuk menghasilkan cairan coklat jernih dengan flavor vanili yang kuat. Pemanasan campuran dapat mempercepat proses, tapi hal ini dapat menyebabkan beberapa komponen flavor yang bersifat volatil menjadi hilang. Beberapa industri merekomendasikan proses ekstraksi dingin yang lebih lambat menggunakan resirkulasi pelarut (perkolasi) diatas buah untuk meminimalkan kehilangan komponen volatil. Salah satu metode perkolasi yang digunakan untuk ekstraksi vanili dapat dilihat pada Gambar 13 ([http://www.uyseg.org/greener\\_industry/pages/vanilin/1Vanilin\\_AP.htm](http://www.uyseg.org/greener_industry/pages/vanilin/1Vanilin_AP.htm) 2005).



Gambar 13 Ekstraksi vanili dengan metode perkolasi

### Ekstraksi Vanili Secara Enzimatik

Meningkatnya permintaan terhadap produk-produk alami menyebabkan proses alternatif terus dikembangkan. Pengertian alami yang digunakan di Eropa dan Amerika Serikat adalah jika produk tersebut dihasilkan dari suatu bahan baku alami melalui proses biologis (misalnya enzim atau *whole cells*) atau proses *mild* (misalnya ekstraksi dan destilasi). Pada tahun-tahun terakhir, mulai dilakukan penelitian-penelitian mengenai biosintesis ekstrak vanili murni dan vanilin alami menggunakan mikroorganisme atau isolat enzim.

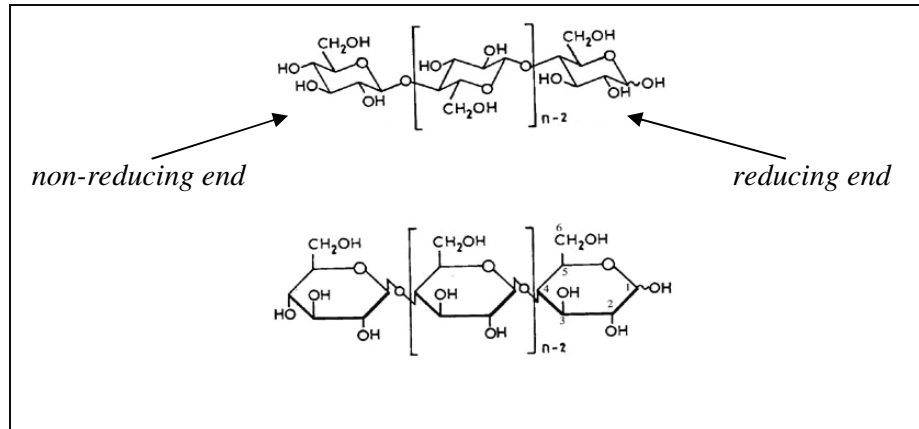
Enzim komersial yang digunakan dalam ekstraksi buah vanili segar pada umumnya merupakan enzim-enzim hidrolase. Hal ini berdasarkan kenyataan bahwa pada tahap awal kuring, diperkirakan mulai terjadi reaksi enzimatik yang berhubungan dengan degradasi dinding sel buah (terutama terdiri dari

polisakarida, protein serta lignin) dan kemudian terjadi transformasi prekursor vanilin menjadi vanilin oleh enzim hidrolitik. Biopolimer tersebut bergabung bersama-sama dengan sejumlah kecil komponen lainnya seperti kelompok asetil dan senyawa fenolik. Adapun polisakarida utama penyusun dinding sel buah antara lain selulosa, hemiselulosa dan pektin (Aman dan Westerlund 1996).

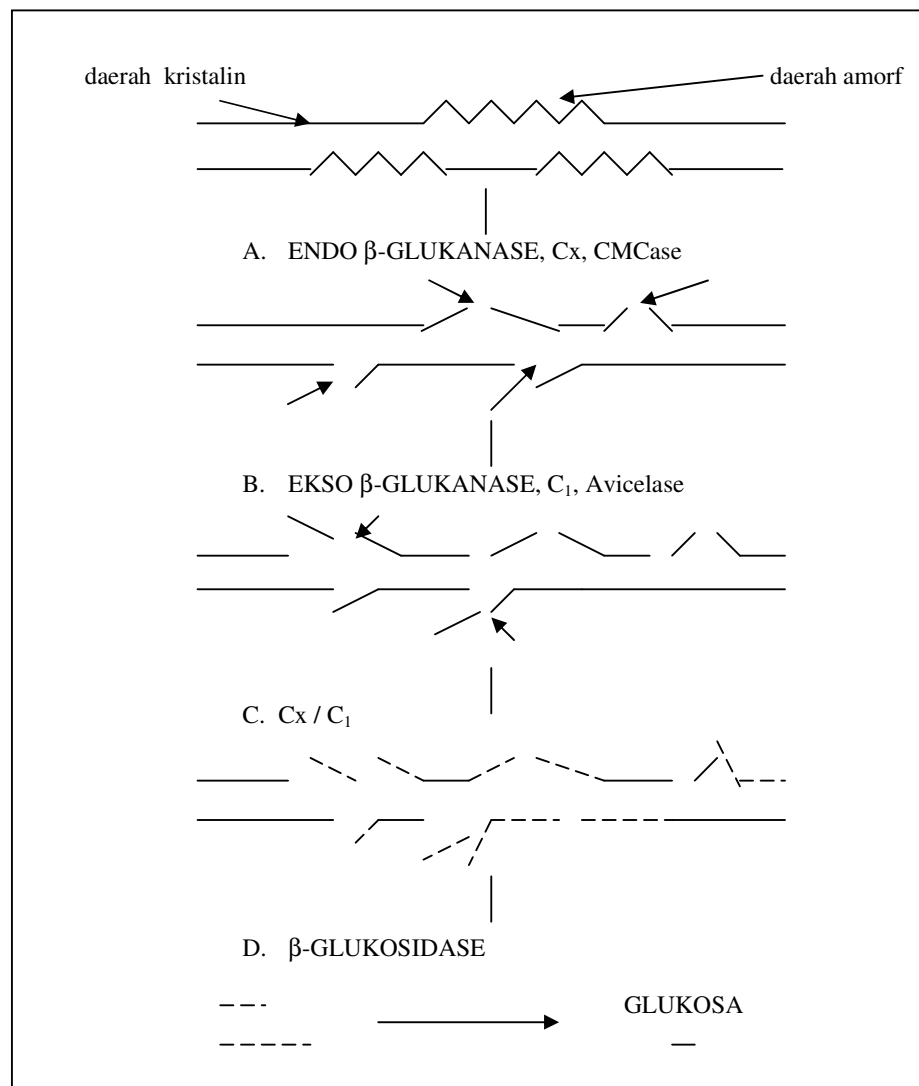
Selulosa merupakan polisakarida linier dari residu glukosa, yang dihubungkan oleh ikatan  $\beta$ -1,4. Selulosa terdiri dari daerah kristalin dan daerah amorf (non-kristalin) yang membentuk suatu struktur dengan kekuatan tegangan tinggi, yang pada umumnya tahan terhadap hidrolisis enzimatik terutama pada daerah kristalin. Selulosa dapat dihidrolisis oleh kelompok enzim selulase yang terdiri dari suatu kompleks campuran dari enzim dengan spesifisitas berbeda dalam menghidrolisis ikatan glikosidiknya (Howard *et al.* 2003).

Enzim selulase terdiri dari 3 komponen besar yakni endoglukanase atau endo-1,4- $\beta$ -glukanase (EC 3.2.1.4)/Cx, ekso-1,4- $\beta$ -glukanase atau selobiohidrolase (EC 3.2.1.91)/C1 serta  $\beta$ -glukosidase atau selobiase (EC 3.2.1.21). Endoglukanase yang sering disebut karboksimetil selulosa (CM)-selulase, berperan dalam memulai serangan acak pada sisi internal daerah amorf dari serat selulosa sehingga sisi yang terbuka dapat diserang oleh selobiohidrolase. Enzim ini dapat memutuskan ikatan selulosa secara random menghasilkan glukosa dan selooligosakarida. Sedangkan ekso-1,4- $\beta$ -glukanase atau selobiohidrolase menyerang bagian luar *non-reducing end* (Gambar 14) dari selulosa dengan selobiosa sebagai struktur utamanya (<http://www.fibersource.com/f-tutor/selulosa.htm> 2005). Ekso-1,4- $\beta$ -glukanase adalah komponen utama dari sistem selulase fungi yakni sekitar 40-70% dari total protein selulase dan mampu menghidrolisis daerah kristalin. Ekso-1,4- $\beta$ -glukanase memisahkan mono- dan dimer dari ujung rantai glukosa (Pilnik dan Voragen 1991; Howard *et al.* 2003).

Tipe ketiga dari enzim selulase adalah enzim  $\beta$ -glukosidase yang dapat menghidrolisis dimer glukosa dan dalam beberapa kasus mengubah selooligosakarida menjadi glukosa. Enzim  $\beta$ -glukosidase ini dapat menghidrolisis selobiosa dan selodekstrin (Pilnik dan Voragen 1991; Howard *et al.* 2003). Pada Gambar 15. dapat dilihat mekanisme kerja enzim selulase dari ketiga tipe yang telah dijelaskan di atas (<http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e08.htm> 2005).



Gambar 14 Struktur selulosa



Gambar 15 Skema tahapan dalam selulolisis

Beberapa mikroorganisme yang menghasilkan selulase antara lain fungi (*Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. aculeatus*, *Acremonium cellulolyticus*, *Fusarium solani*, *Irpex lacteus*, *Penicillium funniculosum*, *Phanerochaete*, *Chrysosporium*, *Schizophyllum commune*, *Sclerotium rolfii*, *Sporotrichum cellulophilum*, *Talaromyces emersonii*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma koningii*, *T. reesii* dan *T. viride*). Selain itu bakteri *Clostridium thermocellum*, *Ruminococcus albus*, *Streptomyces* sp. serta *Actinomycetes* seperti *Streptomyces* sp. dan *Thermomonospora curvata* dapat juga memproduksi enzim selulase.

Meskipun sejumlah besar mikroorganisme dapat mendegradasi selulosa, tapi hanya sedikit yang memproduksi enzim yang dapat secara sempurna menghidrolisis selulosa kristalin *in vitro*. Fungi adalah mikroorganisme utama yang memproduksi selulase. Genus *Trichoderma* dan *Aspergillus* menghasilkan selulase dan enzim kasar yang dihasilkan oleh mikroorganisme tersebut diproduksi secara komersial. Mikroorganisme dari genus *Trichoderma* menghasilkan sejumlah besar endo- $\beta$ -glukanase dan ekso- $\beta$ -glukanase, tapi hanya sedikit menghasilkan  $\beta$ -glukosidase. Sedangkan *Aspergillus* memproduksi endo- $\beta$ -glukanase dan  $\beta$ -glukosidase dalam jumlah besar, tapi sedikit menghasilkan ekso- $\beta$ -glukanase (<http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e08.htm> 2005). Pada umumnya enzim komersial selulase dari *T. viride* mengandung beberapa aktifitas enzim yang mampu mendegradasi dinding sel. Enzim kasar tersebut meliputi selulase, pektinase, hemiselulase dan lain-lain (<http://www.serva.de/products/knowledge/061097.shtml> 2005).

Disamping selulosa, komponen penyusun dinding sel lainnya adalah hemiselulosa. Hemiselulosa merupakan polisakarida larut dalam alkali, berhubungan dengan selulosa dalam dinding sel dan meliputi non-selulosa  $\beta$ -D-glukan, senyawa pektik (poligalakturonan) dan beberapa heteropolisakarida yang terdiri dari manosa (galaktogluko- dan glukomanan) serta silosa (arabinoglukurono- dan glukuronosilan). Akan tetapi, hanya heteropolisakarida yang memiliki derajat polimerisasi lebih rendah (100-200 unit) daripada selulosa (10,000-14,000 unit) yang dianggap sebagai hemiselulosa. Komponen gula utama dari hemiselulosa adalah D-silosa, D-manosa, D-glukosa, D-galaktosa, L-arabinosa, asam D-glukuronat, asam 4-O-metil-D-glukuronat dan asam D-

galakturonat. Sedangkan komponen yang jumlahnya lebih sedikit antara lain L-ramnosa, L-fukosa dan berbagai gula O-metil (Howard *et al.* 2003).

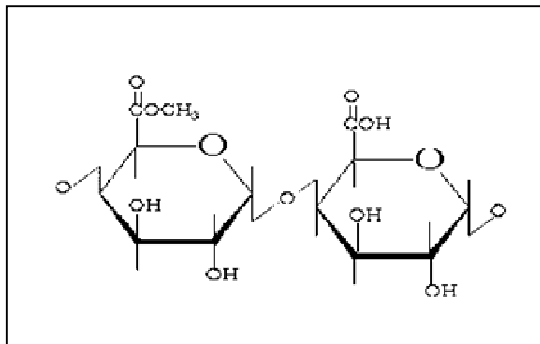
Hemiselulase seperti enzim-enzim lainnya yang menghidrolisis polisakarida dinding sel tanaman, merupakan protein multidomain. Protein tersebut pada umumnya mengandung modul katalitik dan non katalitik yang berbeda secara struktur. Modul non katalitik paling penting terdiri dari daerah yang mengikat karbohidrat, dimana memfasilitasi penargetan enzim pada polisakarida, pengikat interdomain dan modul dokerin yang menghubungkan pengikatan daerah katalitik melalui interaksi kohesi dokerin pada permukaan sel mikroba atau pada kompleks enzimatik seperti selulosom (Howard *et al.* 2003).

Senyawa silan merupakan hemiselulosa paling banyak dan silanase adalah salah satu hemiselulase terbesar yang menghidrolisis ikatan  $\beta$ -1,4 dalam rantai silan menghasilkan silooligomer pendek dimana lebih jauh dapat dihidrolisis menjadi unit silosa tunggal oleh  $\beta$ -silosidase. Silanase lainnya adalah  $\alpha$ -D-glukuronidase yang menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,2-glikosidik dari asam 4-O-metil-D-glukuronik rantai samping silan. Hemiselulolitik esterase meliputi asetil esterase yang menghidrolisis substitusi asetil pada silosa dan feruloil esterase yang menghidrolisis ikatan ester antara substitusi arabinosa dan asam ferulik. Feruloil esterase dapat melepaskan hemiselulosa dari lignin dan membuat produk polisakarida bebas lebih mudah didegradasi oleh hemiselulase lainnya (Howard *et al.* 2003). Makro molekul hemiselulosa merupakan suatu polimer dari pentose (silosa dan arabinosa), heksosa (paling banyak manosa) dan sejumlah asam-asam gula. Sedangkan selulosa merupakan polimer homogen dari glukosa yang lebih tahan dibanding hemiselulosa karena struktur kristalinnya tinggi (Howard *et al.* 2003).

Enzim yang juga dapat menghidrolisis dinding sel adalah pektinase yang digunakan dengan selulase dalam industri jus buah untuk membantu ekstraksi, klarifikasi dan modifikasi. Enzim pektinase ini dihasilkan selama pematangan alami buah dan bersama dengan selulase menyebabkan pelunakan dinding sel. Enzim-enzim tersebut juga disekresikan oleh patogen tumbuhan seperti fungi *Monilinia fructigena* dan bakteri *soft-rot Erwinia carotovora*, sebagai bagian dari strategi mereka untuk berpenetrasi ke dalam dinding sel tumbuhan inang (Pilnik

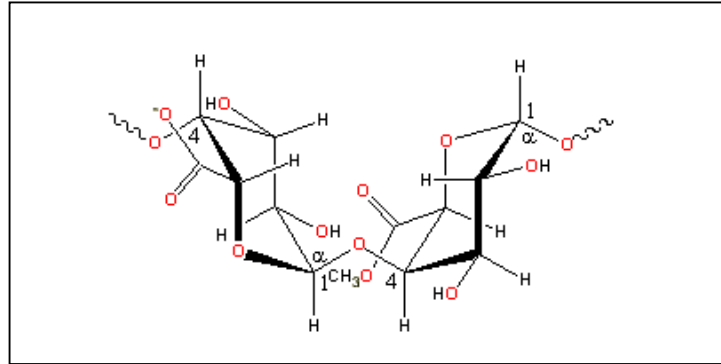
dan Rombouts 1981; <http://www.saps.plantsci.cam.ac.uk/osmoweb/pektinase.htm> 2005).

Semua tumbuhan hijau mengandung pektin yang bersama selulosa dapat mempengaruhi sifat struktural buah dan sayuran. Pektin terdiri dari unit-unit asam galakturonat dan asam galakturonatmetil ester yang membentuk rantai polisakarida linear dan secara normal diklasifikasikan berdasarkan derajat esterifikasinya. Pektin termasuk karbohidrat koloid larut air yang terdapat dalam buah atau sayuran matang dan dapat digunakan dalam pembuatan jeli dan jam buah (<http://www.cpkelco.com/food/pektin.html> 2005). Struktur pektin dapat dilihat pada Gambar 16 (<http://www.cpkelco.com/food/pektin.htm> 2005).

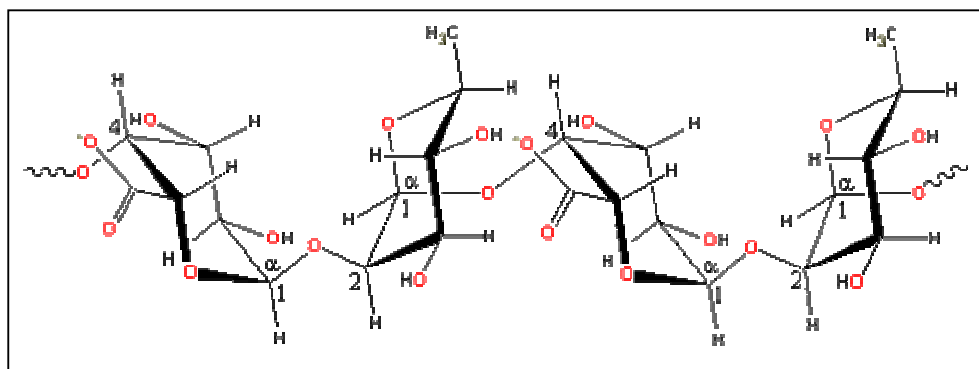


Gambar 16 Struktur kimia pektin

Pektin adalah suatu kelompok heterogen dari struktur asam polisakarida yang terdapat terutama dalam dinding sel dan lamela tengah pada buah dan sayuran. Pektin memiliki struktur kompleks yang terdiri dari homopolimer termetilasi sebagian asam poli- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-galakturonat (*smooth*, Gambar 17) dan terdapat wilayah *non-gelling rambuty* (Gambar 18) dari perubahan bagian  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-L-ramnosil- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-galakturonosil yang mengandung *branch-points* dengan rantai samping netral (1-20 residu) dari L-arabinosa dan D-galaktosa (ramnogalakturonan I). Pektin dapat juga mengandung rantai samping ramnogalakturonan II yang mengandung residu lainnya seperti D-silosa, L-fukosa, asam D-glukuronat, D-apiosa, asam 3-deoksi-D-mano-2-oktulosonat (Kdo) dan asam 3-deoksi-D-likso-2-heptulosonat (Dha) yang terikat pada daerah asam poli- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-galakturonat (Chaplin 2004).



Gambar 17 Wilayah *smooth* homopolimer pektin termetilasi (Chaplin 2004)



Gambar 18 Wilayah *non-gelling rambuty* pektin (Chaplin 2004)

Pada umumnya, pektin tidak menunjukkan struktur yang pasti. Bentuk residu asam D-galakturonat paling banyak dari molekul, dalam memisahkan daerah '*smooth*' dan '*rambuty*' (Chaplin 2004). Campuran enzim dengan sifat khusus yang dapat meningkatkan aktifitas spesifik, dapat dibuat dengan mengkombinasikan masing-masing protein murni atau setiap domain dari organisme yang memproduksinya atau dari rekombinan organisme. Kombinasi tersebut dapat enzim murni yang berasal dari organisme berbeda atau suplementasi enzim kasar dengan enzim murni atau suplementasi enzim murni dengan domain yang mengikat selulosa dari organisme lainnya atau dengan ko-faktor spesifik (Howard *et al.* 2003).

Beberapa produk enzim komersial merupakan campuran dari beberapa enzim yang berbeda, sehingga enzim komersial pektinase mungkin mengandung enzim pektinase, hemiselulase, silanase dan selulase. Campuran enzim tersebut bersama-sama bekerja secara sinergis mendegradasi dinding sel tanaman

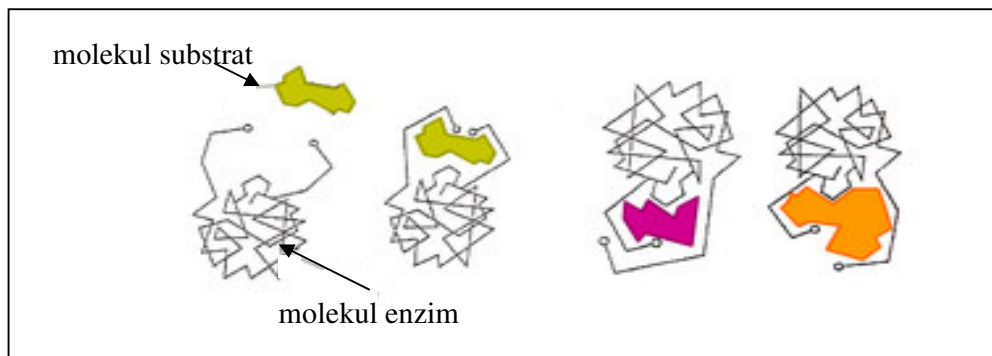
(<http://worhington-biochem.com> 2005). Disisi lain produk enzim komersial lainnya mungkin hanya mengandung 1 jenis enzim, terutama jika enzim tersebut diproduksi oleh strain termodifikasi secara genetik atau yang tingkat kemurniannya tinggi. Enzim yang terdapat dalam pektinase campuran meliputi poligalakturonase, pektin metil esterase dan pektin liase. Enzim-enzim pektin tersebut bekerja dengan berbagai cara terhadap pektin (<http://www.saps.plantsci.cam.ac.uk/osmoweb/pektinase.htm> 2005).

Penggunaan enzim komersial dalam ekstraksi vanili segar telah banyak dikembangkan karena mampu meningkatkan rendemen serta mempercepat reaksi pembentukan vanilin. Enzim memiliki fungsi penting sebagai katalisator reaksi biokimia yang mampu mengaktifkan senyawa lain secara spesifik. Seperti katalis lainnya, enzim mampu bekerja dengan menurunkan energi aktivasi sehingga reaksi kimia dapat berlangsung lebih cepat. Dalam hal ini, enzim bergabung dengan reaktan, sedemikian rupa sehingga dihasilkan keadaan transisi yang mempunyai energi bebas lebih rendah dibanding keadaan transisi reaksi tanpa katalisator. Setelah hasil reaksi (produk) terbentuk, enzim dibebaskan kembali ke keadaan semula. Keuntungan enzim dibanding katalis lainnya adalah sifat stereoregio, kemoselektivitas dan spesifisitasnya yang tinggi (Chaplin dan Bucke 1990; Dordick 1991; Tucker 1995; <http://wikipedia.org/wiki/Enzyme> 2006).

Suatu bagian yang sangat kecil dari suatu molekul besar protein enzim berperan mengkatalisis reaksi. Bagian kecil yang disebut bagian aktif (*active site*) ini melalui suatu mekanisme khas dan selektif dalam hubungan yang disebut kunci dan anak kunci (*lock and key*), dapat berikatan dengan substrat. Selain bagian katalitik yang merupakan bagian reaktif karena mengandung gugus fungsi, bagian sisanya yang besar dari molekul enzim juga dibutuhkan untuk berlangsungnya reaksi katalisis. Dalam hal ini aktifitas enzim ditentukan juga oleh struktur 3 dimensinya (Price dan Steven 1991; Wirahadikusumah, 2001). Interaksi enzim dan substrat yang merupakan hipotesis Daniel Koshland pada tahun 1958 dapat dilihat pada Gambar 19 (<http://wikipedia.org/wiki/Enzyme> 2006).

Enzim digambarkan memiliki struktur tidak terlalu kaku. Sisi aktif enzim dapat terbentuk ketika substrat berinteraksi dengan enzim. Sisi aktif enzim berubah akibat beberapa interaksi lemah antara enzim dengan substrat. Rantai

samping asam amino yang menyebabkan sisi aktif yang terbentuk menjadi suatu bentuk yang tepat sehingga memudahkan enzim untuk melakukan fungsi katalitiknya. Hanya substrat yang dapat terikat pada enzim dan menginduksi perubahan konformasi enzim yang cocok, yang baik bagi substrat (Price dan Steven 1991; <http://wikipedia.org/wiki/Enzyme> 2006)



Gambar 19 Model *induced fit* Koshland

Beberapa faktor penting yang mempengaruhi aktifitas enzim antara lain suhu, pH dan keberadaan inhibitor. Reaksi-reaksi yang dikatalisis enzim akan sangat menguntungkan jika dilakukan pada suhu tinggi. Walaupun demikian, enzim bersifat labil dan menjadi inaktif pada suhu yang terlalu tinggi (Tucker 1995). Denaturasi enzim oleh panas adalah akibat dari perubahan ikatan-ikatan non kovalen penstabil konformasi enzim seperti ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, jembatan garam internal dan ikatan disulfida (Price dan Steven 1991). Kondisi suhu selama ekstraksi vanili secara enzimatik menjadi hal penting yang harus diperhatikan. Laju reaksi pembentukan vanilin akan meningkat, jika suhu dinaikan. Namun pengaruhnya terhadap aktifitas enzim dan komponen flavor harus menjadi pertimbangan. Suhu ekstraksi vanili antara 38-49<sup>0</sup>C dapat digunakan, tanpa merusak flavor (Purselove *et al.* 1981).

Enzim merupakan molekul amfoter yang mengandung sejumlah besar gugus asam dan basa di permukaannya. Muatan pada gugus tersebut bervariasi tergantung pada konstanta disosiasi asamnya dengan pH lingkungannya. Ini akan mempengaruhi muatan total dari enzim dan distribusi muatan pada permukaan luar, juga pada reaktifitas gugus yang aktif secara katalitik. Perubahan muatan oleh pH akan mempengaruhi aktifitas, stabilitas struktur dan kelarutan enzim

(Chaplin dan Bucke 1990). Apabila pH terlalu rendah maka terlalu banyak ion-ion  $H^+$  yang mengelilingi enzim dan kemudian ion-ion  $H^+$  akan tertarik pada enzim membentuk ikatan hidrogen. Sedangkan jika pH terlalu tinggi, terlalu banyak ion-ion  $OH^-$ , maka akan berinteraksi dengan daerah-daerah positif dalam enzim, yang mungkin daerah ini merupakan sisi aktif enzim. Akibat adanya kenyataan bahwa interaksi enzim dengan substrat sangat spesifik, maka terjadinya perubahan bentuk sisi aktif, secara langsung ataupun tidak langsung akan menyebabkan kerja enzim yang tidak tepat. Perubahan ini jika permanen akan mendenaturasi enzim (<http://en.wikipedia.org/wiki/Pectinase> 2006). Di dalam ekstraksi vanili, tingkat keasaman medium alami yang dihasilkan telah sesuai dengan kondisi pH yang diperlukan enzim-enzim hidrolitik penting. Berbagai penelitian ekstraksi vanili secara enzimatik menggunakan pH sekitar 5 yang merupakan pH alami buah.

Faktor lainnya yang mempengaruhi aktifitas enzim adalah keberadaan penghambat. Penghambat bersaing (*competitive inhibitor*) terikat secara *reversible* pada enzim, sehingga mencegah pengikatan substrat. Penghambatan bersaing menyebabkan nilai  $K_m$  meningkat, tapi tidak mempengaruhi  $V_{maks}$ . Sedangkan penghambat tidak bersaing (*non competitive inhibitor*) tidak terikat pada sisi aktif enzim. Penghambatan ini bersifat *irreversible*, artinya enzim tidak akan berfungsi lebih lama karena konformasinya berubah. Penghambatan tidak bersaing menyebabkan penurunan  $V_{maks}$ , tapi tidak mengubah nilai  $K_m$ . Tipe ketiga adalah penghambatan bersaing sebagian (*partially competitive inhibitor*), dimana sama dengan penghambatan tidak bersaing, tapi kompleks enzim-penghambat-substrat mempunyai aktifitas katalitik. Penghambatan ini menyebabkan penurunan  $V_{maks}$ , tapi tidak mengubah  $K_m$ . Tipe selanjutnya adalah penghambat yang hanya terikat pada kompleks enzim-substrat, tidak pada enzim bebas (*uncompetitive inhibitor*). Kompleks enzim-penghambat-substrat secara katalitik tidak aktif. Tipe penghambatan ini jarang menyebabkan penurunan  $V_{maks}$  dan  $K_m$ . Tipe terakhir adalah penghambatan campuran (*mixed inhibitor*), dimana penghambat dapat terikat pada enzim dan kompleks enzim-substrat, bersifat bersaing ataupun tidak (*mixed inhibitor*) serta menyebabkan penurunan  $V_{maks}$  dan peningkatan  $K_m$  (Chaplin dan Bucke 1990; Price dan Steven 1991; Tucker 1995; <http://wikipedia.org/wiki/Enzyme> 2006).