

KARAKTERISASI BAKTERI PEKTINOLITIK DARI LIMBAH KULIT JERUK DAN KARAKTERISASI PEKTINASE YANG DIHASILKAN SERTA STUDI APLIKASINYA UNTUK PENJERNIHAN SARI BUAH JERUK PONTIANAK

Characterization of Pectinolytic Bacteria from Citrus Peel Waste, Characterization of Pectinase Produced and Its Application for Pontianak Citrus Juice Clarification Process

Esti Widowati^{1*}, Rohula Utami¹, Edhi Nurhartadi¹, Fenny¹

¹Program Studi Ilmu Teknologi Pangan Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret Surakarta, Jl. Ir. Sutami 36 A Ketingan Jebres Surakarta 57126

*) Penulis korespondensi: estiwidowati@staff.ums.ac.id

Submisi 25.6.2020; Penerimaan 1.8.2020

ABSTRAK

Kejernihan merupakan salah satu parameter penting kualitas sari buah. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri pektinolitik dari limbah kulit jeruk. Dilakukan pula karakterisasi enzim pektin hidrolase ekstraseluler yang dihasilkan meliputi kondisi optimum untuk aktivitas dan kestabilannya, serta nilai K_M dan V_{max} . Pengaruh penambahan enzim pektin hidrolase ekstraseluler terhadap kekeruhan, viskositas, dan total padatan terlarut sari buah jeruk Pontianak juga diamati. Hasil dari penelitian didapatkan 10 isolat bakteri dengan karakter semua isolat bakteri merupakan Gram negatif, endospora negatif, dan katalase positif. Pada penjernihan sari buah jeruk Pontianak terpilih 3 isolat bakteri untuk karakterisasi enzim yaitu isolat A, H, dan I. Karakter enzim ditentukan berdasarkan pH optimum, suhu optimum, kestabilan pH dan suhu, serta nilai K_M dan V_{maks} . Enzim isolat A optimum pada pH 4 dan stabil pada pH 4-5; enzim isolat H optimum pada pH 4 dan stabil pada pH 3-4; enzim isolat I optimum pada pH 4-4,5 dan stabil pada pH 3-5. Ketiga enzim isolat optimum pada suhu 50°C dan stabil pada suhu 30-50°C. Nilai K_M enzim isolat A, H dan I berturut-turut adalah 0,022; 0,011; 0,017 mg mL⁻¹ dan nilai V_{maks} berturut-turut adalah 0,041; 0,038; 0,039 U mL⁻¹. Enzim pektin hidrolase ekstraseluler dari ketiga isolat tersebut dapat diaplikasikan pada penjernihan sari buah jeruk Pontianak.

Kata kunci : bakteri pektinolitik, pektinase, Jeruk Pontianak, penjernihan sari buah

ABSTRACT

Clarity is one of the quality parameters of juice. This research aimed to isolate and characterize pectinolytic bacteria from citrus peel waste. The extracellular pectin hydrolase from the isolates then characterized for the optimal condition for its activity and stability, K_M , and V_{max} value. The effect of this enzyme on turbidity, viscosity, and total soluble solids for the Pontianak citrus juice clarification process was also observed. Ten isolates bacteria showed Gram-negative, negative endospores, and positive catalase. Three isolates bacteria selected from Pontianak orange juice clarification were A, H, and I isolates and further characterized. Enzyme characters were determined by optimum pH and temperature, pH and temperature stability, K_M , and V_{max} values. The enzyme of isolate A had optimum pH at four and stable between 4 and 5; the enzyme of isolate H had optimum pH at four and stable between 3 and 4; the enzyme of isolate I had optimum pH at 4 to 4.5 and stable between 4 and 5. All enzymes of isolate A, H, and I had an optimum temperature at 50°C and stable between 30 and 50°C. K_M value for enzymes of isolates A, H and I were 0.022; 0.011; 0.017 mg mL⁻¹ and V_{max} value were 0.041; 0.038; 0.039 U mL⁻¹. Pectin hydrolase enzymes from all isolates can be applied to orange juice clarification.

Keywords : enzymes, clarification process, pectin, Pontianak citrus juice

PENDAHULUAN

Jeruk siam Pontianak merupakan varietas unggul menurut keputusan menteri pertanian tahun 2003 mengenai pelepasan jeruk siam Pontianak sebagai varietas unggul. Jeruk memiliki kulit buah yang tipis, licin mengkilap, menempel pada daging buah sehingga sulit dikupas, diameter 5-6 cm dan berwarna hijau kekuningan. Jeruk ini memiliki rasa manis dan warna jingga cerah sehingga sering dikonsumsi dalam bentuk sari buah. Sari buah merupakan salah satu produk olahan buah-buahan yang banyak ditemui di pasaran dan merupakan salah satu tren produk minuman saat ini (Martasari *et al.*, 2015).

Sari buah adalah cairan buah jernih atau keruh yang diperoleh dari proses ekstraksi buah secara mekanis, serta memiliki karakteristik warna, aroma dan flavor seperti buah asalnya (Syamsir, 2010). Permasalahan yang sering terjadi pada sari buah jeruk adalah kenampakan sari buah yang cenderung semakin keruh dan kental selama penyimpanan. Kekeruhan dan viskositas meningkat disebabkan adanya kandungan protein, pektin, hemiselulosa, dan selulosa yang terdapat dalam sari buah jeruk. Pektin dapat berikatan dengan partikel-partikel lain sehingga membentuk partikel yang lebih besar dan terjadi endapan pada sari buah (Sharma dan Chand, 2012; Widowati *et al.*, 2017). Oleh karena itu, diperlukan klarifikasi (penjernihan) untuk mencegah terbentuknya endapan serta menjaga stabilitas sari buah jeruk.

Beberapa metode yang digunakan untuk klarifikasi sari buah antara lain metode fisika kimia (penggunaan gelatin atau enzim), mekanis (sentrifugasi dan filtrasi), ataupun kombinasi kedua metode tersebut. Penambahan gelatin kurang efektif karena masih terdapat partikel koloid yang tidak larut disebabkan efek stabilitas senyawa pektin. Sentrifugasi berfungsi untuk mengendapkan dan filtrasi memisahkan antara padatan dan cairan (Farikha *et al.*, 2013). Penggunaan enzim merupakan sebuah cara efektif dalam klarifikasi sari buah karena kemampuan enzim pektinase untuk menghidrolisis senyawa pektin sehingga menurunkan viskositas, mengurangi

kekeruhan, menjaga stabilitas sari buah, serta meningkatkan kinerja dari proses filtrasi (Prathyusha dan Suneetha, 2011; Widowati *et al.*, 2014).

Salah satu cara memproduksi enzim yang banyak dilakukan adalah mengembangbiakkan mikroba penghasil enzim. Beberapa keuntungan yang diperoleh dengan penggunaan enzim dari mikroba, antara lain biaya produksi relatif ringan, dapat diproduksi dalam waktu singkat serta mudah dikontrol (Kumalasari, 2010). Biasanya enzim pektinase diproduksi dari kapang dengan genus *Aspergillus* dan sebagian dari bakteri *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp. (Geetha *et al.*, 2012).

Penelitian ini memanfaatkan bakteri sebagai penghasil enzim pektinase karena bakteri memiliki keunggulan antara lain laju pertumbuhan sel yang cepat serta mudah dibiakkan pada kondisi nutrisi, suhu, dan pH yang bervariasi. Untuk memperoleh isolat bakteri indigenous, maka cara yang dapat digunakan adalah menggunakan limbah kulit buah (Widowati *et al.*, 2014).

Limbah kulit jeruk dalam penelitian ini digunakan sebagai sumber isolat bakteri pektinolitik dan penelitian ini juga mengaplikasikan enzim pektinase ekstraseluler pada penjernihan sari buah jeruk Pontianak. Selama ini jeruk Pontianak hanya dikonsumsi segar secara langsung oleh konsumen dan jarang digunakan dalam industri sari buah dikarenakan kadar pektin tinggi yang dilihat dari kenampakan sari buah keruh (Jori *et al.*, 2015). Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang disekresikan ke luar sel untuk mengkatalis reaksi metabolisme di luar sel (Agnajanzadeh *et al.*, 2017). Aplikasi enzim pektinase ekstraseluler pada sari buah jeruk akan mengurangi kekeruhan dan menurunkan viskositas sari buah jeruk sehingga dapat memberikan peluang pemanfaatan jeruk Pontianak digunakan sebagai bahan baku pembuatan sari buah, terutama pada skala industri.

Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh dan mengkarakterisasi isolat bakteri pektinolitik dari limbah kulit jeruk; mengetahui karakter enzim pektin hidrolase ekstraseluler yang dihasilkan meliputi pH dan suhu optimum, kestabilan suhu dan pH,

nilai K_M dan V_{maks} , mengetahui pengaruh penambahan enzim terhadap kekeruhan, viskositas, dan total padatan terlarut sari buah jeruk Pontianak.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan analisis penelitian antara lain *yeast extract*, natrium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4) (Merck, Germany), kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) (Merck, Germany), magnesium sulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Germany), kalium klorida (KCl) (Merck, Germany), reagen asam dinitrosalisilat (DNS) (Merck, Germany), natrium asetat (CH_3COONa) (Merck, Germany), kalium-natrium-tartrat tetrahidrat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Germany), hidrogen peroksida (H_2O_2) (Merck, Germany), amonium sulfat ($(\text{NH}_4)\text{SO}_4$) (Merck, Germany), pektin citrus (*pectin from citrus peel with galacturonic acid $\geq 74\%$ (db)*) (Sigma, Singapore), *bacteriological agar* (Oxoid, USA), pewarna Gram A, Gram B, Gram C, Gram D, larutan biuret, natrium klorida (NaCl) (Oxoid, USA), asam asetat (CH_3COOH) (Merck, Germany), dan pewarna Malakit Hijau.

Sampel penelitian ini adalah campuran limbah kulit buah jeruk yang terdiri dari jeruk manis, jeruk Pontianak, dan jeruk nipis. Sampel didiamkan selama 7 hari dalam kantong plastik hitam terbuka di dalam ruangan pada suhu kamar. Klarifikasi jus jeruk menggunakan buah jeruk Pontianak yang diperoleh di pasar Gedhe Surakarta. Buah jeruk Pontianak memiliki karakter kulit buah tipis, permukaannya halus, licin, mengkilap, menempel lekat pada daging buahnya, dengan diameter ± 6 cm dan berwarna hijau kekuningan.

Rancangan Percobaan dan Analisa Data

Karakter morfologi koloni dan sel bakteri dianalisis secara kualitatif. Kurva standar asam D-galakturonat, kurva standar isolat, aktivitas enzim pektin hidrolase ekstraseluler dan konstanta kinetika enzim K_M dan V_{maks} dianalisis secara kuantitatif dengan regresi linier. Faktor yang diteliti dalam penelitian ini adalah pengaruh variasi suhu dan variasi pH terhadap aktivitas enzim pektin hidrolase ekstraseluler yang

dihasilkan. Penelitian ini menggunakan 2 kali ulangan sampel dan 2 kali ulangan analisis.

Prosedur Penelitian

Penelitian Tahap I

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pektinolitik (Benson, 2002; Hadioetomo, 1990) dari limbah campuran kulit jeruk (jeruk manis, jeruk Pontianak, dan jeruk nipis) dan limbah kulit jeruk Pontianak. Sampel kulit jeruk didiamkan selama 7 hari pada suhu ruang untuk pembusukan. Sampel yang telah mengalami fermentasi dihaluskan menggunakan mortar steril dan ditimbang tepat sebanyak 5 g. Sampel diencerkan pada seri 10^{-1} - 10^{-6} menggunakan larutan pengencer garam fisiologis (NaCl) 0,85%. Masing-masing seri pengenceran dilakukan inokulasi sebanyak 1 mL secara *pour plate* pada media pektin agar. Sampel selanjutnya diinkubasi pada 37 dan 50°C selama 24 dan 48 jam. Isolat dimurnikan dengan metode *quadrant streak*. Morfologi koloni bakteri diamati berdasarkan bentuk, tepian, elevasi, struktur dalam, warna dan diameter. Karakterisasi morfologi sel isolat bakteri dilakukan dengan pewarnaan Gram, pewarnaan endospora, dan pengukuran sel sedangkan uji biokimia dilakukan dengan uji katalase.

Penelitian Tahap II

Penentuan isolat uji dilakukan menggunakan metode Widowati et al. (2014) dengan modifikasi. Pengujian aktivitas enzim kasar dan klarifikasi sari buah jeruk Pontianak serta depolimerisasi pektin cair 1%. Pengujian aktivitas enzim kasar dengan pengukuran gula reduksi yaitu menggunakan metode asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) dengan asam D-galakturonat sebagai standar. Aktivitas pektinase dinyatakan dalam U mL^{-1} . Satu unit merupakan jumlah enzim yang dibutuhkan untuk memecah 1 μmol pektin menjadi asam galakturonat per menit pada kondisi pengujian. Penentuan aktivitas enzim dengan metode DNS adalah enzim sebanyak 0,1 mL ditambah media pereaksi sebanyak 0,9 mL (0,7% (w/v) pektin *citrus* dan 0,025 M bufer sodium asetat) dan diinkubasi selama 30 menit. Sampel kemudian ditambahkan 1 mL reagen DNS dan dipanaskan selama 10 menit pada suhu 90°C.

Larutan didinginkan dan ditambah larutan K-Na-Tartrat 40% 0,5 mL. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Penentuan aktivitas enzim dengan mengonversi nilai absorbansi asam D-galakturonat dengan persamaan regresi linear kurva standar asam D-galakturonat 100 ppm.

Parameter yang diamati untuk sari buah jeruk adalah viskositas, transmitansi dan Total Padatan Terlarut (TPT), sedangkan untuk pektin cair 1% diamati pula viskositas dan transmitansinya. Buah jeruk Pontianak dicuci, dipotong, dan diekstraksi menggunakan *hand juicer* tanpa penambahan air. Jus jeruk disaring dengan menggunakan kertas saring untuk memisahkan ampas. Pektin cair 1% digunakan untuk mengetahui aktivitas depolimerisasi pektin oleh enzim. Sari buah jeruk serta pektin cair 1% sebanyak 30 mL masing-masing ditambah enzim dari setiap isolat uji sebanyak 3 mL. Inkubasi dilakukan pada suhu 37 dan 50°C sesuai isolat uji selama 30 menit. Penentuan viskositas menggunakan viskometer Ostwald, TPT dengan *hand refractometer*, dan transmitansi dengan spektrofotometer. Isolat uji ditentukan berdasarkan aktivitas enzim, nilai viskositas, nilai transmitansi, dan nilai total padatan terlarut (Akesowan dan Choonhahirun, 2013; Widowati *et al.*, 2014)

Penelitian Tahap III

Produksi, Ekstraksi, Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Pektin Hidrolase Ekstraseluler dilakukan sesuai metode Sinatari *et al.* (2013) dan Widowati *et al.* (2014). Produksi enzim pektin hidrolase ekstraseluler dilakukan dengan mengambil stok inokulum sebanyak 10% kemudian diinokulasikan pada media produksi enzim. Agitasi dengan kecepatan 144 rpm dilakukan sampai fase logaritma. Fase logaritma ditentukan dari kurva pertumbuhan isolat dan kurva aktivitas enzim yang digabungkan untuk mengetahui hubungan antara jumlah sel dengan aktivitas enzim.

Isolat bakteri yang telah mencapai fase logaritma kemudian diekstraksi dengan sentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 6.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipresipitasi dengan fraksinasi amonium sulfat 10-90% untuk memisahkan enzim kemudian dilakukan sentrifugasi pada

kecepatan 12.000 rpm suhu 4°C selama 10 menit. Setelah itu dilanjutkan tahap pemurnian selanjutnya dengan dialisis. Pellet hasil sentrifugasi dilarutkan dalam bufer asetat 0,05 M pH 5,2 (1:1) kemudian dimasukkan dalam membran selofan dan direndam dalam 300 mL larutan bufer asetat 0,05 M pH 5,2 dalam gelas *beaker* 500 mL dan diaduk dengan magnetik *stirrer* selama 24 jam dalam *cool chamber* bersuhu 4°C.

Karakterisasi enzim pektin hidrolase ekstraseluler meliputi pH dan suhu optimum, kestabilan pH dan suhu, serta penentuan nilai K_M dan V_{maks} .

Penentuan pH optimum enzim

Penentuan pH optimum enzim dilakukan dengan mencampurkan 0,1 mL enzim dan 0,9 mL media pereaksi (0,7% (w/v) pektin *citrus* dan larutan bufer sodium asetat 0,025 M dengan pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; dan 6,0. Larutan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, kemudian sampel dianalisis dengan metode DNS.

Penentuan suhu optimum enzim

Penentuan suhu optimum enzim dilakukan dengan mencampurkan 0,1 mL enzim dan 0,9 mL media pereaksi (0,7% (w/v) pektin *citrus* dan larutan bufer sodium asetat 0,025 M pH 4,8 pada suhu inkubasi suhu 35; 45; 50; 55; dan 60°C selama 30 menit. Kadar gula sampel dianalisis dengan metode DNS (Widowati *et al.*, 2014)

Penentuan kestabilan enzim

Penentuan kestabilan pH enzim dilakukan dengan menginkubasikan 0,1 mL enzim dalam 0,1 mL bufer sodium asetat 0,025 M pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 dan 10 selama 30 menit pada suhu 50°C. Penentuan kestabilan suhu enzim dilakukan dengan menginkubasikan 0,1 mL enzim dalam 0,1 mL buffer sodium asetat 0,025 M pH 7,0 selama 30 menit pada suhu 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C. Kadar gula dianalisis dengan metode DNS.

Penentuan [S], nilai K_M dan V_{maks}

Penentuan [S], nilai K_M dan V_{maks} dilakukan dengan mencampurkan 0,1 mL enzim dan 0,9 mL media pereaksi (0,7% (w/v) pektin *citrus*, dengan [S] sesuai perlakuan yaitu 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 dan 0,8 mg mL⁻¹ dan larutan bufer sodium asetat 0,025

M pH 4,8. Larutan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit kemudian sampel dianalisis dengan metode DNS. Nilai K_M dan V_{maks} dapat ditentukan dengan kurva $1/[S]$ terhadap $1/aktivitas\ enzim$ sehingga diperoleh garis linier dengan hubungan,

$$1/v = 1/v_{maks} + K_M/v_{maks} \cdot 1/[S], \text{ atau}$$

$$y = a + bx, \text{ dengan}$$

$$y = 1/aktivitas\ enzim\ \text{atau}\ 1/kecepatan\ enzim\ (1/v)$$

$$x = 1/konsentrasi\ substrat\ (1/[S])$$

Sehingga v_{maks} dan K_M ($1/2 V_{maks}$) dapat ditentukan dengan cara:

$$a = 1/v_{maks}\ \text{maka}\ V_{maks} = 1/a$$

$$b = K_M/v_{maks}\ \text{maka}\ K_M = b \cdot v_{maks}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian Tahap I

Pada tahapan isolasi dan karakterisasi bakteri pektinolitik diperoleh 10 isolat bakteri dari limbah campuran kulit jeruk (jeruk manis, jeruk Pontianak, dan jeruk nipis) dan limbah kulit jeruk Pontianak. Sampel yang digunakan dalam tahap isolasi bakteri bersumber dari limbah kulit jeruk. Pektin secara umum terdapat pada dinding sel tanaman, berfungsi sebagai perekat dan menjaga stabilitas jaringan dan sel. Apel dan kulit jeruk merupakan bahan baku yang sering digunakan dalam produksi pektin komersial.

Suhu inkubasi yang digunakan adalah 37 dan 50°C. Penggunaan suhu 37°C dimaksudkan untuk bakteri mesofilik sedangkan suhu 50°C untuk bakteri termofilik. Hal ini dikarenakan proses klarifikasi sari buah jeruk yang melibatkan enzim biasanya berlangsung pada suhu 35-55°C. Menurut Sharma *et al.* (2014), bakteri mesofilik adalah bakteri yang dapat tumbuh optimum pada suhu 20-40°C sedangkan bakteri termofilik pada suhu 45-60°C. Isolasi dari limbah campuran kulit jeruk berjumlah 6 isolat, dengan suhu inkubasi 37°C berjumlah 4 isolat dan suhu inkubasi 50°C berjumlah 2 isolat. Sedangkan isolasi dari limbah kulit jeruk Pontianak berjumlah 4, dengan suhu

inkubasi 37°C dan 50°C masing-masing berjumlah 2 isolat. Pada tahap ini didapatkan bahwa semua isolat merupakan bakteri Gram negatif karena hasil pewarnaan Gram menunjukkan warna merah. Pada pewarnaan endospora menunjukkan hasil negatif, artinya tidak terjadi pembentukan endospora. Sementara itu, pada uji katalase menunjukkan hasil positif, artinya semua isolat bakteri merupakan bakteri aerob.

Penelitian Tahap II

Pada penelitian tahap II dilakukan penentuan isolat uji yang terdiri dari dua seleksi yaitu seleksi uji aktivitas enzim kasar dan klarifikasi jus jeruk Pontianak serta depolimerisasi pektin citrus 1%. Penentuan uji aktivitas enzim kasar menggunakan pengukuran jumlah gula reduksi dengan metode DNS. Hasil dari uji aktivitas enzim kasar ini berkisar antara 0,0151 sampai 0,117 U mL⁻¹. Sari buah jeruk Pontianak dengan penambahan enzim pektin hidrolase ekstraseluler mempunyai nilai viskositas yang lebih kecil dibandingkan kontrol (tanpa penambahan enzim), sama halnya dengan uji depolimerisasi pektin cair 1%. Penurunan viskositas terjadi disebabkan adanya depolimerisasi pektin menjadi asam galakturonat.

Sari buah jeruk Pontianak dengan penambahan enzim pektin hidrolase ekstraseluler mempunyai nilai TPT yang lebih tinggi dibandingkan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi depolimerisasi pektin yang menambah jumlah padatan dalam sari buah jeruk, dalam hal ini adalah gula. Menurut Sari *et al.* (2012), peningkatan jumlah gula sederhana menyebabkan total padatan terlarut juga meningkat. Sari buah jeruk Pontianak dengan penambahan enzim pektin hidrolase mempunyai nilai transmitansi yang lebih tinggi dibandingkan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi depolimerisasi pektin menjadi asam galakturonat sehingga endapan berkurang dan sari buah jeruk terlihat menjadi lebih jernih.

Pemilihan isolat uji didasarkan pada keempat parameter yaitu aktivitas enzim kasar, viskositas, total padatan terlarut, dan transmitansi. Isolat yang terpilih adalah isolat A, H, dan I. Isolat A merupakan isolat yang

menggunakan suhu inkubasi 37°C. Enzim isolat A memiliki nilai aktivitas enzim kasar yang tinggi. Enzim isolat A yang diujikan pada klarifikasi sari buah jeruk Pontianak menunjukkan nilai transmitansi yang tinggi dengan viskositas rendah, walaupun nilai TPT hanya 8,8°Brix. Sementara itu, depolimerisasi pektin citrus 1% menggunakan enzim isolat A menunjukkan nilai transmitansi yang tinggi dan viskositas yang rendah. Isolat H dan I merupakan isolat yang menggunakan suhu inkubasi 50°C. Enzim isolat H yang diujikan pada klarifikasi jus jeruk Pontianak mempunyai nilai transmitansi dan TPT yang tinggi serta viskositas rendah, namun enzim isolat H mempunyai nilai aktivitas enzim kasar rendah. Enzim isolat I mempunyai nilai aktivitas enzim kasar yang tinggi. Enzim isolat I yang diujikan pada klarifikasi jus jeruk Pontianak menunjukkan nilai transmitansi dan TPT yang tinggi, namun nilai viskositas yang masih terlalu tinggi. Sementara itu, depolimerisasi pektin citrus 1% menggunakan enzim isolat I menunjukkan nilai transmitansi yang tinggi dan viskositas yang rendah.

Enzim merupakan biomolekul berupa protein yang berfungsi sebagai katalis dalam suatu reaksi kimia. Kekhususan dari aktivitas enzim adalah peranannya sebagai katalis hanya terhadap satu reaksi atau beberapa reaksi sejenis saja. Oleh karena itu, dasar pemilihan dari isolat uji adalah kemampuan dari enzim pektin hidrolase ekstraseluler untuk menghidrolisis komponen pektin yang terdapat dalam sari buah jeruk Pontianak. Hasil dari klarifikasi sari buah jeruk Pontianak menunjukkan bahwa enzim pektin hidrolase ekstraseluler yang dihasilkan tiap isolat mampu mendegradasi pektin yang terdapat dalam sari buah jeruk, namun masih menunjukkan perbedaan yang kecil dengan kontrol (sari buah yang tidak ditambahkan enzim). Hal yang berpengaruh pada hasil penjernihan sari buah jeruk Pontianak antara lain, enzim yang digunakan masih merupakan enzim kasar sehingga diduga mengandung lebih dari satu enzim pektinase. Menurut Winarno (2010), untuk mendapatkan sari buah jeruk yang stabil dapat ditambahkan enzim yang mempunyai keaktifan poligalakturonase yang tinggi.

Selain itu, karakter enzim pektin hidrolase yang dihasilkan belum diketahui karena aktivitas enzim sangat dipengaruhi oleh konsentrasi substrat dan enzim, pH, suhu, kekuatan ionik, serta adanya inhibitor.

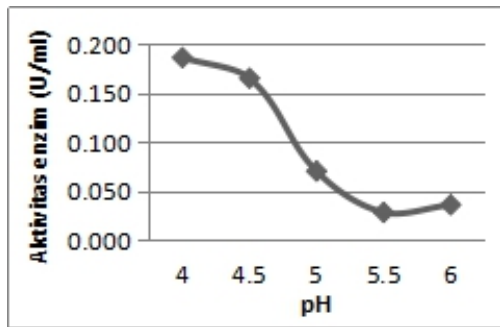
Penelitian Tahap III

Produksi enzim ditentukan berdasarkan kurva pertumbuhan isolat pada fase logaritma isolat. Produksi enzim isolat A selama 7 jam setelah inokulasi, isolat H selama 8 jam setelah inokulasi, dan isolat I selama 10 jam setelah inokulasi. Setelah itu dilakukan ekstraksi enzim kasar dan pemurnian enzim parsial berupa presipitasi dan dialisis. Presipitasi adalah metode pemisahan dengan mengendapkan protein yang menggunakan prinsip *salting out*, yaitu mengendapnya protein (enzim) karena air berikatan dengan garam. Metode selanjutnya untuk meningkatkan kemurnian enzim dengan menghilangkan sisa garam dan ion pengganggu lainnya adalah dialisis. Dialisis menggunakan membran selofan untuk memisahkan protein dengan berat molekul lebih kecil dari 12 kDa dan molekul nonprotein. Karakterisasi enzim perlu dilakukan karena penanganan masalah menggunakan enzim membutuhkan enzim dengan karakter tertentu. Karakter utama yang perlu diketahui dalam pengukuran aktivitas enzim adalah suhu dan pH optimum. Enzim pektinase akan optimum pada pH 4,5-5,5 dan suhu 45-55°C (Bhardwaj dan Garg, 2010; Widowati *et al.*, 2014).

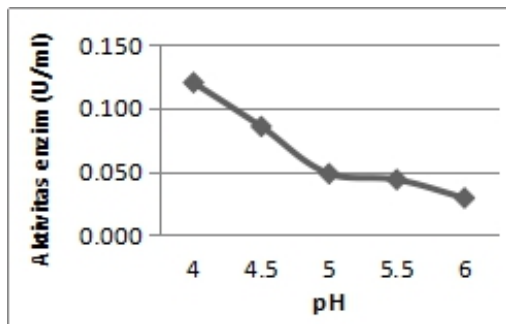
pH Optimum Enzim

Perubahan pH dengan skala kecil akan menyebabkan aktivitas enzim menurun karena terjadinya perubahan ionisasi gugus fungsionalnya. Hal ini dikarenakan enzim merupakan protein yang tersusun atas asam amino yang dapat mengadakan ionisasi (mengikat) dan melepaskan proton atau ion hidrogen pada gugus amino ataupun gugus yang lain. Sebaliknya, perubahan pH dengan skala besar akan mengakibatkan enzim mengalami denaturasi karena adanya gangguan pada interaksi non kovalen yang menjaga kestabilan struktur enzim. Gugus ionik berperan penting menjaga konformasi sisi aktif enzim untuk mengikat dan mengubah substrat menjadi produk (Hames

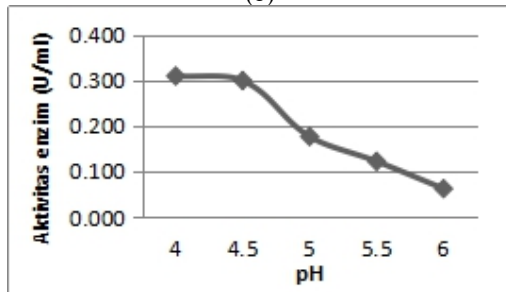
dan Hooper, 2000). Pada pengujian pH optimum (Gambar 1), enzim isolat A dan H optimum pada pH 4,0 sedangkan enzim isolat I optimum pada pH 4,0 sampai 4,5. Menurut Agnajanazadeh *et al.*, (2017), sari buah jeruk mempunyai kisaran pH antara 4,0 sampai 5,0 sehingga enzim ini dapat diaplikasikan dalam klarifikasi sari buah jeruk.



(a)



(b)



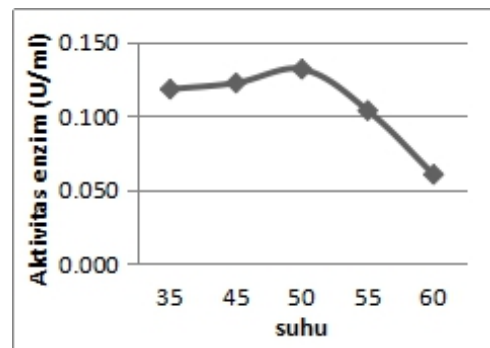
(c)

Gambar 1. Hubungan pH dengan Aktivitas Enzim Isolat A (a), H (b), dan I (c)

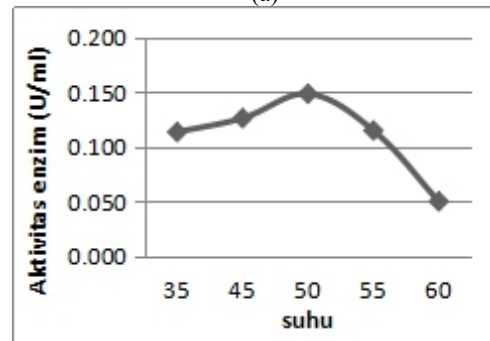
Suhu Optimum Enzim

Suhu dapat mempengaruhi laju reaksi katalis enzim dengan dua cara. Pertama, kenaikan suhu akan meningkatkan energi molekul substrat sehingga meningkatkan

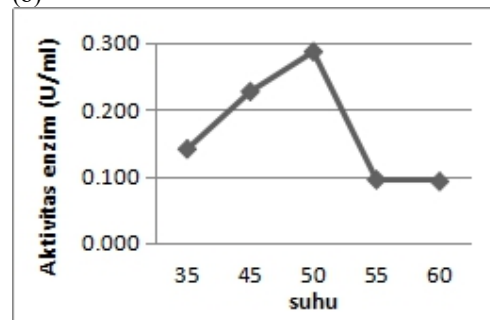
aktivitas enzim. Apabila peningkatan suhu cukup besar, dapat mengakibatkan perubahan konformasi substrat, sehingga sisi reaktif substrat mengalami hambatan untuk memasuki sisi aktif enzim sehingga menurunkan aktivitas enzim. Kedua, peningkatan energi molekul yang membentuk struktur protein enzim akan menyebabkan rusaknya interaksi non kovalen yang menjaga struktur tiga dimensi enzim sehingga enzim akan mengalami denaturasi.



(a)



(b)



(c)

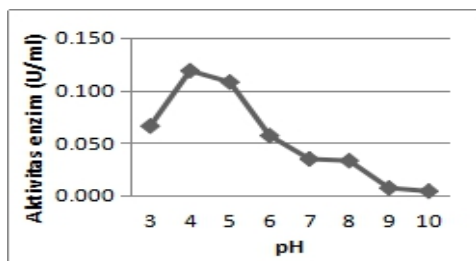
Gambar 2. Hubungan Suhu dengan Aktivitas Enzim Isolat A (a), H (b), dan I (c)

Denaturasi menyebabkan struktur lipatan enzim membuka pada permukaannya sehingga sisi aktif enzim berubah dan

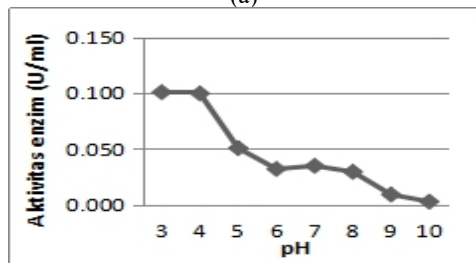
aktivitas enzim menjadi turun (Hames dan Hooper, 2000). Pada penentuan suhu optimum (Gambar 2), kondisi optimum suhu enzim isolat A, H, dan I adalah pada suhu 50°C. Sementara proses klarifikasi sari buah menggunakan enzim biasanya berlangsung pada suhu 35-55°C (Widowati *et al*, 2016). Hal ini menunjukkan bahwa enzim uji tersebut dapat diaplikasikan dalam klarifikasi sari buah jeruk karena memenuhi suhu proses klarifikasi.

Kestabilan Enzim

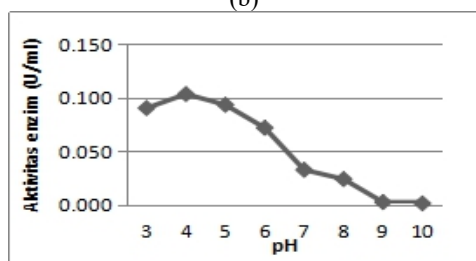
Aktivitas enzim dipengaruhi oleh lingkungannya, seperti suhu dan pH. Stabilitas enzim didefinisikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim, serta kestabilan terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti pelarut tertentu (asam, basa) dan oleh pengaruh suhu dan pH ekstrim.



(a)



(b)

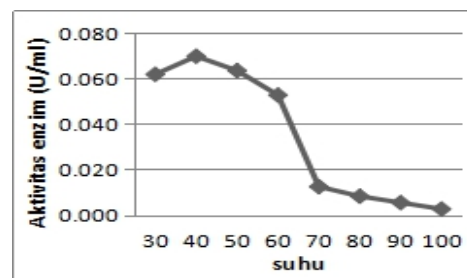


(c)

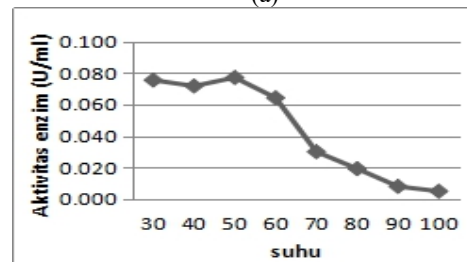
Gambar 3. Kestabilan pH Enzim Isolat A (a), H (b), dan I (c) pada suhu 50°C

Pada pengamatan kestabilan pH (Gambar 3), enzim isolat A stabil pada pH 4,0 sampai 5,0 sementara enzim isolat H stabil pada pH 3,0 sampai 4,0, dan enzim isolat I stabil pada pH 3,0 sampai 5,0. Kondisi pH optimum enzim isolat A dan H adalah pada pH 4,0 sedangkan enzim isolat I optimum pada pH 4,0-4,5 (Gambar 1).

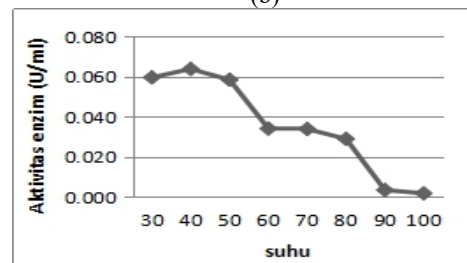
Pada pengamatan kestabilan suhu, enzim isolat A, H, dan I stabil pada suhu 30 sampai 50°C. Setelah itu terjadi penurunan aktivitas enzim pada suhu 60°C dan inaktif pada suhu 90°C (Gambar 4) dengan kondisi optimum suhu enzim isolat A, H, dan I adalah pada suhu 50°C (Gambar 2). Hal ini juga sesuai dengan penelitian menurut Widowati *et al*. (2014), enzim pektin hidrolase ekstraseluler stabil pada pH 3-4 dan suhu 30-50°C.



(a)



(b)



(c)

Gambar 4. Kestabilan Suhu Enzim Isolat A (a), H (b), dan I (c) pada pH 7,0
 Nilai K_M dan V_{maks}

Dalam reaksi enzim dikenal adanya kecepatan reaksi hidrolisis, penguraian, atau reaksi katalisasi lain yang disebut *Velocity* (v). Harga v dari suatu reaksi enzimatik pada umumnya sangat tergantung pada substrat. Semakin tinggi konsentrasi substrat, maka reaksi enzim semakin cepat sampai mencapai kecepatan tetap. Pada konsentrasi enzim tetap (tertentu), harga v hampir linier dengan konsentrasi substrat $[S]$. Pada konsentrasi substrat yang tinggi (berlebihan), kecepatan reaksi v akhirnya mencapai maksimum. Harga K_M suatu enzim bergantung pada jenis substrat dan keadaan lingkungan seperti suhu dan kekuatan ion. K_M merupakan konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai setengah kecepatan maksimumnya (Widowati *et al.*, 2014).

Tabel 1. Nilai K_M dan v_{maks} dari pektinase isolat

Isolat	K_M (mg mL ⁻¹)	v_{maks} (U mL ⁻¹)
A	0,022	0,041
H	0,011	0,038
I	0,017	0,039

Menurut Widowati *et al.* (2017), nilai K_M dapat digunakan untuk menentukan afinitas substrat-enzim, yang merupakan indikator bahwa kekuatan ikatan kompleks enzim-substrat atau suatu tetapan keseimbangan untuk disosiasi kompleks enzim-substrat menjadi enzim dan substrat. Nilai K_M besar menunjukkan bahwa afinitas substrat dan enzim rendah sedangkan apabila nilai K_M kecil menunjukkan bahwa afinitas substrat dan enzim tinggi. Nilai K_M dan V_{maks} enzim isolat A, H, dan I mempunyai nilai yang berbeda-beda. Nilai K_M dan V_{maks} tertinggi ada pada enzim isolat A, sementara nilai K_M dan V_{maks} terendah ada pada enzim isolat H. Enzim isolat I memiliki nilai K_M dan V_{maks} di antara enzim isolat A dan H. Hasil dari kinetika enzim menunjukkan bahwa enzim isolat 8 mempunyai nilai K_M terkecil sehingga mempunyai afinitas yang tinggi terhadap substrat pektin (Tabel 1). Pada Widowati *et al.* (2014) dihasilkan nilai K_M isolat A, H, dan I berturut-turut yaitu 0,022; 0,009; 0,017 mg mL⁻¹ dan nilai V_{maks} berturut-turut 0,041; 0,036; 0,039 U mL⁻¹.

Pada karakterisasi enzim pektin hidrolase ekstraseluler, diduga bahwa enzim yang diproduksi oleh isolat A, H, dan I

merupakan enzim poligalakturonase. Hal ini dikarenakan sari buah jeruk mengandung enzim pektin esterase secara alami yang dapat memecah pektin menjadi asam pektat dalam sari buah. Menurut Akeson dan Choonhahirun (2013), enzim yang dapat memecah substrat asam pektat adalah poligalakturonase dan pektat liase. Enzim poligalakturonase mempunyai kestabilan pH 2,5-6 dan kestabilan suhu 30-50°C sementara enzim pektat liase mempunyai kestabilan pH 6-10 dan kestabilan suhu 30-40°C. Hasil dari karakterisasi enzim menunjukkan bahwa enzim mempunyai kestabilan pH berkisar antara 3-5 dan kestabilan suhu berkisar antara 30-50°C sehingga dapat diduga bahwa enzim yang dihasilkan merupakan enzim poligalakturonase (Sharma *et al.*, 2014). Namun masih diperlukan pengujian lebih lanjut untuk menguatkan pendugaan, misalnya dengan penentuan massa molekul protein enzim menggunakan elektroforesis. Enzim yang berbeda mungkin mempunyai berat molekul yang bervariasi dalam kisaran yang amat luas.

KESIMPULAN

Diperoleh sepuluh isolat bakteri pektinolitik dari penelitian ini. Semua isolat merupakan bakteri Gram negatif, tidak menunjukkan adanya pembentukan endospora, dan katalase positif (menunjukkan bakteri aerob). Kesepuluh enzim isolat yang diperoleh mampu menurunkan viskositas dan kekeruhan serta meningkatkan total padatan terlarut pada jus jeruk Pontianak. Tiga isolat dideteksi sebagai penghasil pektin hidrolase ekstraseluler yang potensial (isolat A, H, dan I) dengan pH dan suhu optimum berturut-turut 4-4,5 dan 50°C. Enzim pektin hidrolase dari ketiga isolat tersebut stabil pada suasana asam (pH 3-5) dan pada kisaran suhu 30-50°C. V_{maks} enzim pektin hidrolase ketiga enzim tersebut adalah 0,038-0,410 U mL⁻¹ dengan nilai K_M yang bervariasi, yaitu 0,022; 0,011; dan 0,017 mg mL⁻¹ untuk isolat A, H dan I.

DAFTAR PUSTAKA

Agnajanzadeh, S.A., Kashaninejad, M., Ziaifar, A.M., 2017. Cloud Stability of Sour Orange Juice as Affected by

- Pectin Methylsterase during Come Up Time: Approached through Fractal Dimension. *International Journal of Food Properties*, 20(3), S2508-2519.
- Akesowan, A., Choonhahirun, A., 2013. Effect of Enzyme Treatment on Guava Juice Production Using Response Surface Methodology. *J. Anim.Plant.Sci.*, 23(1), 114-120.
- Benson, H. J. 2002. *Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology*, Eight Edition. Mc Graw Hill, Boston.
- Bhardwaj, V., Garg, N., 2010. Exploitation of Micro-Organisms for Isolation and Screening of Pectinase from Environment. In *Proceedings of 8th International Conference, Making Innovation Work for Society: Linking, Leveraging and Learning*, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia, 1–3 November 2010.
- Farikha, I.N., Anam, C., Widowati, E., (2013). Pengaruh jenis dan konsentrasi bahan penstabil alami terhadap karakteristik fisikokimia sari buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) selama penyimpanan. *Jurnal Teknosains Pangan*, 2(1), 30-38.
- Geetha, M., Saranraj, P., Mahalakshmi, S., Reetha, D., 2012. Screening of Pectinase Producing Bacteria and Fungi for its Pectinolytic Activity Using Fruit Wastes. *International Journal of Biochemistry & Biotech Science* 1, 30-42.
- Hadieotomo, R. S., 1990. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek Teknik Dasar dan Prosedur Laboratorium*. PT. Gramedia, Jakarta.
- Hames, B.D., Hooper, N.M. 2000. *Biochemistry*. Springer-Verlag, Hongkong.
- Jori, D.B., Pawar, A.V. dan Kudake, D.C., (2015). Multienzymatic clarification of blended pineapple and mango pulp using response surface methodology. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 6(1), 49-56.
- Kumalasari, A. 2010. *Kajian Media Produksi Enzim Pektinase pada Fermentasi Media Padat oleh Kapang*. IPB, Bogor.
- Martasari, C., Supriyanto, A., Hardiyanto, Agisimanto, D., Mulyanto, H. 2015. Keragaman Jeruk Siam di Indonesia. <http://balitjestro.litbang.pertanian.go.id/keragaman-jeruk-siam-di-indonesia/> [24 Juni 2020]
- Prathyusha, K., Suneetha, V. 2011. Bacterial Pectinases and their Potent Biotechnological Application in Fruit Processing/Juice Production Industry: A Review. *Journal of Phytology*, 3(6), 16-19.
- Sari, E.K.N., Susilo, B., Sumarlan, S. H., 2012. Proses Pengawetan Sari Buah Apel (*Mallus sylvestris* Mill) secara Non-Termal Berbasis Teknologi Oscillating Magneting Field (OMF). *Jurnal Teknologi Pertanian*, 13(12), 78-87.
- Sharma, P. K., Chand, D. 2012. *Pseudomonas* sp. Xylanase for Clarification of Mausambi and Orange Fruit Juice. *International Journal of Advancements in Research & Technology*, 1(2), 1-3.
- Sharma, H.P, Patel, H., Sharma, S., 2014. Enzymatic Extraction and Clarification of Juice from Various Fruits-A Review. *Trends in Post-Harvest Technology*, 2(1), 1-14. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.977434>.
- Sinatari, H. M., Aminin, A.L.N., Sarjono, P.R., 2013. Pemurnian selulase dari isolat Kb kompos termofilik desa bayat klaten menggunakan fraksinasi amonium sulfat. *Chem Info*, 1(1), 130-140.
- Widowati, E., Utami, R., Nurhartadi, E., Andriani, M.A.M., Wigati, A.W. 2014. Produksi dan Karakterisasi Enzim Pektinase oleh Bakteri Pektinolitik dalam Klarifikasi Jus Jeruk Manis

- (*Citrus cinensis*). Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan, 3(1), 16-20.
- Widowati E., Utami R., Nurhartadi, E., Putro, R., 2016. Screening and Characterization of Cellulase Enzyme in Sweet Orange (*Citrus sinensis*) Juice Clarification. Proceeding 6th Indonesian Biotechnology Conference. Enhancing Industrial Competitiveness through Biotechnology Innovation. Solo, 6-8 September 2016. pp 397-403.
- Widowati, E., Utami, R., Kalistyatika, K., 2017. Screening and Characterization of Polygalacturonase as Potential Enzyme for Keprok Garut Orange (*Citrus nobilis* Var. Chrysocarpa) Juice Clarification. Journal of Physics. Conference Series, 909(1), 1-10. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/909/1/012088>.
- Winarno, F.G., 2010. Food Enzyme. M-Brio Press, Bogor.