

PRODUKSI DAN KARAKTERISASI ENZIM PEKTINASE BAKTERI PEKTINOLITIK DARI LIMBAH KULIT JERUK UNTUK KLARIFIKASI JUS LEMON (*Citrus limon*)

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION PECTINASE ENZYME PEKTINOLITIC BACTERIA FROM CITRUS PEEL WASTED FOR LEMON JUICE (*Citrus Limon*) CLARIFICATION

Esti Widowati, Rohula Utami, Edhi Nurhartadi, M.A.M Andriani, Ririn Hanifah

Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret

Email: esti_widowati@yahoo.com

ABSTRACT

The aims of this research were to isolate and characterize the pectinolytic bacteria from citrus peel waste, determine the character of the optimum (pH, temperature, K_M and V_{max}) of the pectinase enzyme and determine the effect of the enzyme on the characteristics of lemon juice. Isolation and characterization of the pectinolytic bacteria were the first stage of the research. Isolation, precipitation, dialysis and determination of the pectinase enzyme characters (optimum pH and temperature, K_m and V_{maks}) were the second stage of the research. From ten selected bacterial isolates obtained three isolates that produce enzymes that are best in the lemon juice clarification process that isolates 1, 4 and 9. Selection is based on the value of a low viscosity, the value of a high total dissolved solids and high transmittance value. From the results known that all bacterial isolates were obtained Gram-negative bacteria, negative endospores and positive catalase. Isolates 1, 4 and 9 optimum at pH 4.0, optimum temperature at 50°C stable in the pH range 3.0-4.0, stable at a temperature of 30-50°C. K_M value for isolates 1, 4 and 9 in succession is 0.022 mg / ml, 0.009 mg / ml, 0.017 mg / ml, whereas the V_{max} value in succession is 0.041 U / ml, 0.036 U / ml, 0.039 U / ml.

Keywords : Enzyme, Juice Clarification, Pectin, Pectinases

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri pektinolitik dari limbah kulit jeruk, mengetahui karakter optimum (pH, suhu, K_M dan V_{maks}) dari enzim pektinase dan mengetahui pengaruh penambahan enzim terhadap karakteristik jus lemon. Penelitian tahap pertama yaitu dilakukan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri pektinolitik. Penelitian tahap kedua dilakukan isolasi, presipitasi, dialisis dan penentuan karakteristik enzim pektinase (pH dan suhu optimum, kestabilan pH dan suhu, K_m and V_{maks}). Dari sepuluh isolat bakteri dipilih tiga isolat yang menghasilkan enzim yang cocok dalam proses klarifikasi jus lemon yaitu isolat 1, 4 dan 9. Pemilihan ini berdasarkan pada nilai viskositas yang rendah, nilai total padatan terlarut yang tinggi dan nilai transmitansi yang tinggi. Berdasarkan hasil yang diperoleh semua isolat bakteri yang didapatkan termasuk bakteri Gram negatif, endospora negatif dan positif pada uji katalase. . Isolat 1, 4 dan 9 optimum pada pH 4,0, optimum pada suhu 50°C stabil pada kisaran pH 3,0-4,0 stabil pada suhu 30-50°C. Nilai K_M isolat 1, 4 dan 9 berturut-turut yaitu 0,022 mg/ml; 0,009 mg/ml; 0,017 mg/ml, sedangkan nilai V_{maks} berturut-turut yaitu 0,041 U/ml; 0,036 U/ml; 0,039 U/ml.

Kata kunci : Pektin, Enzim Pektinase, Klarifikasi Jus

PENDAHULUAN

Kekeruhan pada produk jus lemon merupakan kendala tersendiri bagi produsen jus buah dalam menciptakan jus yang jernih, selain kekeruhan masalah lain yaitu jus cepat membentuk *jelly*. Proses klarifikasi pada jus merupakan salah satu proses untuk mendapatkan jus yang jernih sehingga jus yang dihasilkan tidak akan membentuk gel. Jeruk lemon (*Citrus limon*) banyak digunakan dalam pembuatan jus atau sering juga digunakan sebagai penambah cita rasa suatu

masakan, karena rasanya yang menyegarkan. Kandungan pektin yang tinggi pada jeruk lemon menyebabkan jus yang dihasilkan dari jeruk lemon cepat mengalami kekeruhan dan membentuk *jelly*.

Pektin adalah substansi alami yang terdapat pada sebagian besar tanaman pangan. Disebutkan dalam Baker (1997) bahwa kadar pektin jeruk lemon berkisar 2,80-2,99%. Pada industri jus dan konsentrat jus, keberadaan pektin dapat menjadi masalah untuk menghasilkan produksi jus yang jernih. Setiap produsen jus akan melakukan pengujian kandungan pektin, yang kemudian

akan melakukan depektinasi. Depektinasi sangat penting, terutama untuk jus dalam bentuk konsentrat yang kemudian akan mengalami proses rekonstitusi untuk diminum. Jika tidak dilakukan depektinasi, koloid pektin dapat mengendap pada produk akhir. Jus rekonstitusi akan menjadi keruh dan berkabut atau bahkan berikatan dengan partikel lain membentuk partikel yang lebih besar, jika pektin tetap berada dalam suspensi (Noer, 2008).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Banik dan Ghosh (2008) menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri *Bacillus* sp dan *Streptomyces* sp lebih tinggi sehingga enzim yang dihasilkan lebih banyak dibandingkan dengan jamur *Aspergillus* sp dan *Penicillium* sp. Selain itu waktu yang dibutuhkan untuk isolasi bakteri pektinolitik lebih cepat dibandingkan dengan isolasi dari jamur. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi enzim pektinase dari limbah kulit jeruk; mengetahui karakter (pH optimum, suhu optimum, kestabilan pH dan suhu, K_M , V_{maks}) enzim pektinase; mengetahui pengaruh enzim pektinase terhadap kekeruhan, viskositas, dan total padatan terlarut dalam klarifikasi jus Lemon.

METODE PENELITIAN

Penelitian Tahap I

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pektinolitik (Benson, 2002; Hadioetomo, 1990) dan Penentuan Isolat Uji (Ordonez et al., 1998; Modifikasi Arthey and Ashurst, 2001)

Sampel kulit jeruk ditimbang tepat sebanyak 5 g kemudian dihancurkan dengan mortar steril. Seri pengenceran pada 10^{-1} – 10^{-6} dengan larutan pengencer garam fisiologis (NaCl) 0,85%. Media pektin agar (Yeast extract 1,0 g; Na_2HPO_4 0,9 g; KH_2PO_4 1,0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; KCl 0,2 g; Pektin Citrus 1,0 g; Bacteriological Agar 15 g dalam 1 L) sebagai media selektif bakteri pektinolitik. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C dan 50°C selama 24-48 jam. Morfologi koloni bakteri diamati berdasarkan bentuk, tepian, elevasi, struktur dalam, warna dan diameter.

Preservasi isolat dilakukan dalam media pektin agar miring pada suhu 4°C .

Karakterisasi morfologi sel isolat meliputi pewarnaan Gram, pewarnaan endospora dan pengukuran sel. Uji biokimia dilakukan dengan uji katalase. Seleksi isolat uji dilakukan berdasarkan aktivitas enzim kasar (U/ml), dan klarifikasi jus jeruk (viskositas, % T dan total padatan terlarut (TPT)) dan depolimerisasi pektin cair 1% (viskositas dan % T).

Penelitian Tahap II

Produksi, Ekstraksi dan Karakterisasi Enzim Pektinase (Fonseca and Said, 1994; Salvador et al., 2002; Barensse dkk, 2001; Ordonez et al, 1998)

Produksi enzim dilakukan pada fase logaritmik masing-masing isolat bakteri. Kurva pertumbuhan enzim dihitung dengan metode turbidimetri yaitu dengan menentukan nilai absorbansi setiap sampel. Agitasi dilakukan sampai pada fase logaritmik sesuai dengan kurva standar pada kecepatan 144 rpm sesuai dengan suhu masing-masing isolat. Aktivitas enzim dianalisis dengan metode DNS. Kurva pertumbuhan isolat dan kurva aktivitas enzim kemudian digabungkan untuk mengetahui hubungan antara jumlah sel dengan aktivitas enzim.

Ekstraksi dilakukan dengan sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit pada kultur isolat pada fase logaritmik. Presipitasi supernatan menggunakan fraksinasi ammonium sulfat 10%-90%. Sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 12.000 rpm suhu 4°C selama 10 menit. Uji aktivitas enzim dilakukan pada fase supernatan dengan metode DNS.

Fraksi kejenuhan dengan aktivitas enzim tertinggi didialisis dengan cara memasukkan enzim kedalam kantung membran selofan. Membran selofan direndam selama 24 jam dengan magnetik stirer pada suhu 4°C dalam gelas beaker yang telah diisi dengan buffer asetat 0,05 M pH 5,2.

Karakterisasi enzim pektinase (Ordonez *et al.*, 1998; Barense *et al.*, 2001)

Metode DNS yang digunakan yaitu enzim sebanyak 0,1 ml dicampur dengan 0,9 ml media pereaksi (campuran 0,7% pektin citrus dan buffer sodium asetat 0,025 M pH 4,8) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Selanjutnya sampel ditambahkan 1 ml larutan DNS dan dipanaskan pada suhu 90°C selama 10 menit. Setelah dingin sampel ditambahkan dengan 0,5 ml K-Na-Tartrat 40% dan dihomogenkan. Setelah itu sampel ditera absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Aktivitas enzim ditentukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi asam D-galakturonat dengan persamaan regresi linier kurva standar asam D-galakturonat 100 ppm.

1. pH Optimum Enzim

0,1 ml enzim dan ditambahkan dengan 0,9 ml media pereaksi (0,7% (w/v) pektin citrus dan larutan buffer sodium asetat 0,025 M) dengan menggunakan kisaran pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 dan 6,0. Selanjutnya larutan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Sampel dianalisis dengan metode DNS.

2. Suhu Optimum Enzim

0,1 ml enzim dan ditambahkan dengan 0,9 ml media pereaksi (0,7% (w/v) pektin citrus dan larutan buffer sodium asetat 0,025 M pH 4,8) pada kisaran suhu inkubasi 35; 45; 50; 55 dan 60°C selama 30 menit. Sampel dianalisis dengan metode DNS.

3. [S], nilai K_M dan V_{maks}

0,1 ml enzim dan ditambahkan dengan 0,9 ml media pereaksi (0,7% (w/v) pektin citrus, [S] sesuai perlakuan yaitu 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 dan 0,8 mg/ml dan larutan buffer sodium asetat 0,025 M pH 4,8). Larutan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Sampel dianalisis dengan metode DNS.

Nilai K_M dan V_{maks} ditentukan dengan kurva $1/[S]$ terhadap $1/$ aktivitas enzim sehingga diperoleh garis linier dengan hubungan

$$1/v = 1/V_{maks} + K_M/V_{maks} \cdot 1/[S]$$

atau $y = a + bx$

dengan $Y = 1/$ aktivitas enzim atau $1/$ kecepatan enzim ($1/v$)

$X = 1/$ konsentrasi substrat ($1/[S]$)

Sehingga untuk menentukan V_{maks} dan K_M ($1/2 V_{maks}$) adalah

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

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

4. Kestabilan Enzim

Enzim sebanyak 0,1 ml diinkubasi dalam 0,1 ml buffer sodium asetat 0,025 M pH 3,4,5,6,7,8,9 dan 10 selama 30 menit pada suhu 50°C. Kestabilan suhu enzim dilakukan dengan enzim sebanyak 0,1 ml diinkubasi 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 dan 100°C. Aktivitas enzim dianalisis dengan metode DNS.

Analisis data

Karakter morfologi koloni dan sel bakteri dianalisis secara kualitatif. Kurva standar asam galakturonat, kurva standar isolat, aktivitas enzim pektin hidrolase ekstraseluler dan konstanta kinetika enzim K_M dan V_{maks} ditentukan dengan regresi linier.

HASIL DAN PEMBAHASAN

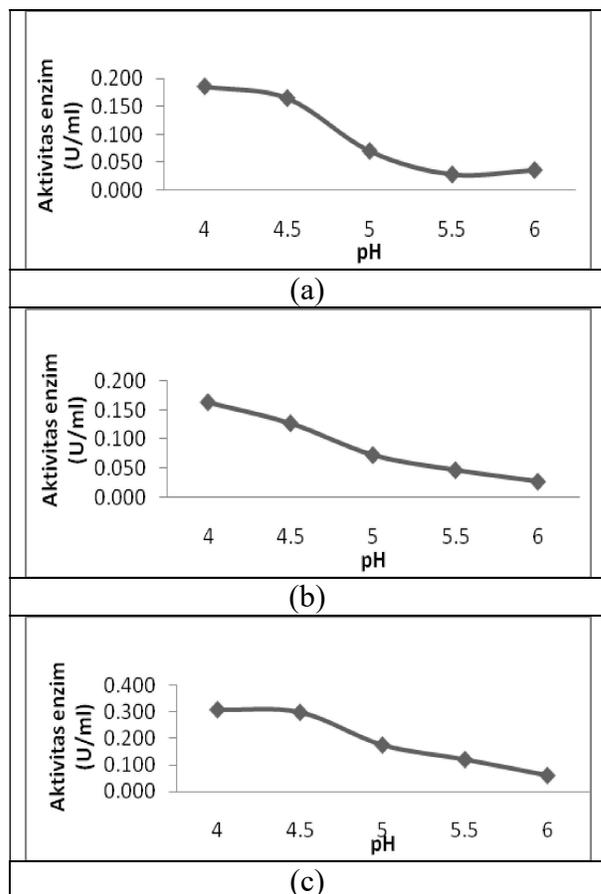
10 isolat bakteri pektinolitik yang diisolasi dari sampel kulit jeruk pontianak dan campuran kulit jeruk pontianak, jeruk manis dan jeruk nipis. 6 sampel didapatkan pada suhu 37°C dan 4 sampel pada suhu 50°C inkubasi dilakukan selama 24 jam.

Penentuan isolat uji dilakukan dengan dua tahap. Tahap pertama isolat uji ditentukan berdasarkan uji aktivitas enzim kasar dan jumlah sel bakteri yang telah diinkubasi selama 24 jam. Aktivitas enzim mengacu pada kurva standar asam galakturonat. Seleksi tahap kedua dilakukan berdasarkan pada kemampuan enzim kasar terhadap klarifikasi jus lemon dan depolimerasi pektin cair 1% maka diperoleh isolat 1,4 dan 9. Pemilihan isolat untuk klarifikasi jus lemon berdasarkan pada nilai viskositas yang rendah, tingkat kecerahan yang tinggi dan total padatan terlarut yang tinggi. Isolat 1 dan 4 merupakan isolat yang tumbuh pada suhu 37°C, sedangkan isolat 9 merupakan isolat bakteri yang tumbuh pada suhu 50°C.

Pada fase logaritmik enzim membelah menjadi 2 kali lebih cepat sehingga pada saat fase logaritmik aktivitas enzim akan meningkat. Fase logaritmik isolat 1 dimulai pada jam ke 11 setelah inokulasi. Fase logaritmik Isolat 4 dimulai pada jam ke 10 setelah inokulasi. Fase logaritmik isolat 9 dimulai pada jam ke 10 setelah inokulasi

Presipitasi isolat 1 dengan menggunakan fraksi ammonium sulfat 80%. Presipitasi isolat 4 dengan menggunakan fraksi ammonium sulfat 70%. Presipitasi isolat 9 dengan menggunakan fraksi ammonium sulfat 75%.

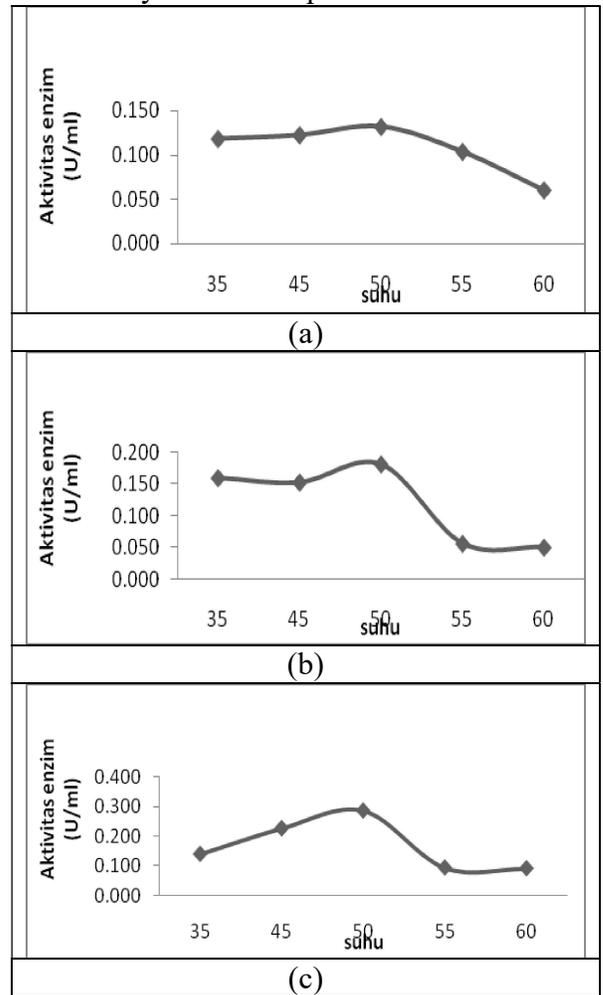
Konsentrasi protein enzim ditentukan dengan menggunakan uji biuret dengan menggunakan kurva standar Bovine Serum Albumin (BSA). Konsentrasi enzim isolat 1, 4 dan 9 berturut-turut yaitu 0,23913 mg/ml; 0,108696 mg/ml; 0,086957 mg/ml.



Gambar 1. Hubungan antara pH dengan Aktivitas Enzim Isolat 1 (a), Isolat 4 (b) dan Isolat 9 (c)

Isolat 1, 4 dan 9 optimum pada pH 4,0 pada suhu inkubasi 50°C (Gambar 1). Enzim

pektinase memiliki kisaran pH optimal 3,5-11(Sieiro *et al.*, 2012). Aktivitas enzim pektinase akan terus menurun seiring dengan semakin tinggi pH. Adanya perubahan muatan ion pada rantai samping residu asam amino enzim yang terlalu besar menyebabkan menurunnya aktivitas spesifik enzim.



Gambar 2. Hubungan Antara Suhu Dengan Aktivitas Enzim Isolat 1 (a), Isolat 4 (b) dan Isolat 9 (c)

Ketiga isolat enzim optimum pada suhu 50°C (Gambar 2). Kisaran suhu optimum enzim pektinase pada suhu 40-75°C (Sieiro *et al.*, 2012). Ini menunjukkan bahwa ketiga isolat enzim mampu bekerja optimum pada suhu termofilik yang dapat digunakan pada proses klarifikasi jus. Suhu yang tinggi menyebabkan energi kinetik meningkat sehingga menyebabkan hilangnya struktur primer yang berikatan dengan ikatan kovalen sehingga menurunkan aktivitas enzim.

Pada kisaran pH 3,0-10 isolat KJ1, isolat KJ4 dan isolat KJ9 stabil pada pH 3,0-

5,0 dan inaktif pada pH 10. Dengan stabilnya enzim pada kisaran pH 3,0-4,0 menunjukkan bahwa enzim dapat bekerja pada klarifikasi jus jeruk yang memiliki pH asam yaitu pada pH 4,0. Ketiga isolat enzim stabil pada suhu 30-50⁰C dan mengalami penurunan pada suhu 60⁰C dan inaktif pada suhu 100⁰C. Enzim tersebut juga dapat diaplikasikan dalam klarifikasi jus jeruk skala industri karena stabil pada suhu 30-50⁰C. Kestabilan pH dan suhu enzim dapat menentukan besarnya pH dan suhu yang akan digunakan dalam produksi enzim dan dalam proses klarifikasi jus.

Salah satu karakteristik enzim yang perlu dipelajari adalah kinetika enzim, berupa parameter K_M dan V_{maks} . Salah satu parameter kinetika enzim yaitu konstanta Michaelis-Menten, yang lebih dikenal dengan K_M . K_M merupakan konsentrasi substrat yang separuh dari lokasi aktifnya telah terisi, yaitu bila kecepatan reaksi enzim telah mencapai $\frac{1}{2} V_{maks}$. Nilai K_M yang kecil menunjukkan bahwa enzim memiliki afinitas yang tinggi terhadap substrat, dan nilai K_M yang besar menunjukkan kebalikannya. Harga V dari suatu reaksi enzimatik akan meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat $[S]$, akan tetapi setelah $[S]$ meningkat lebih lanjut akan sampai pada kecepatan yang tetap. Pada konsentrasi enzim tetap (tertentu) harga V hampir linier dengan $[S]$. Pada kondisi dimana V tidak dapat bertambah lagi dengan bertambahnya $[S]$ disebut kecepatan maksimum (V_{maks}). V_{maks} merupakan salah satu parameter kinetika enzim (Putra, 2009).

Tabel 1. Nilai K_M (mg/ml) dan V_{maks} (U/ml) Enzim Isolat 1, 4 dan 9

Isolat	K_M (mg/ml)	V_{maks} (U/ml)
Isolat 1	0,022	0,041
Isolat 4	0,009	0,036
Isolat 9	0,017	0,039

Berdasarkan Tabel 1, Nilai K_M dan V_{maks} isolat 1 masing-masing yaitu 0,022 mg/ml dan 0,041 U/ml. Nilai K_M dan V_{maks} Isolat 4 masing-masing yaitu 0,009 mg/ml dan 0,036 U/ml. Nilai K_M dan V_{maks} isolat 9 masing-masing yaitu 0,017 mg/ml dan 0,039

U/ml. Dari ketiga isolat enzim dapat diketahui bahwa isolat yang memiliki nilai K_M dan V_{maks} yang paling kecil adalah isolat 1. Hal ini menunjukkan bahwa isolat 1 memiliki afinitas terhadap substrat yang paling besar dibandingkan dengan dua enzim isolat lainnya.

KESIMPULAN

1. Bakteri pektinolitik diisolasi dari limbah kulit jeruk Pontianak dan limbah kulit jeruk campuran antara jeruk nipis dan jeruk Pontianak. Inkubasi dilakukan pada suhu 37⁰C dan 50⁰C. Pada suhu 37⁰C diperoleh 6 isolat yang tumbuh, dan 4 isolat yang tumbuh pada suhu 50⁰C.
2. isolat 1, isolat 4 dan isolat 9 optimum pada pH 4,0, optimum suhu 50⁰C. Ketiga isolat stabil pada pH 3,0-5,0 dan pada suhu 30-50⁰C. Nilai K_m enzim isolat1, isolat 4 dan isolat 9 berturut-turut yaitu 0,022 mg/ml; 0,009 mg/ml; 0,017 mg/ml. Nilai V_{maks} enzim isolat 1, isolat 4 dan isolat 9 berturut-turut yaitu 0,041 U/ml; 0,036 U/ml; 0,039 U/ml.
3. Ketiga isolat enzim mampu menurunkan viskositas, meningkatkan nilai tranmitansi atau kecerahan jus lemon dan meningkatkan nilai total padatan terlarut pada jus lemon dan pektin cair 1%.

DAFTAR PUSTAKA

- Arthey, D and P.R. Ashurst. 2001. *Fruit Processing Nutrition Products and Quality Management*, Second Edition. AM Aspen Publication. Maryland. p. 86-148
- Baker, R. A. 1997. *Reassessment of Some Fruit and Vegetable Pectin Levels*. Journal Of Food Science Volume 62, No. 2, 1997
- Banik, S and S.N.Ghost. 2008. *Pectinolytic Activity of Microorganisms in Piling of Jute*. Indian journal of Fibre & Textile Research Vo.33, June 2008,pp. 151-156.
- Barense, R.I., M.A. Chellegati., M.J.V. Fonseca and S. Said. 2001. Partial Purification and Characterization of Exopolygalacturonase II and III of

Penicillium frequentans,
Braz.J.Microbiology. **32** (4) : 5-8

- Benson, H. J. 2002. *Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology*. Eight Edition. Mc Graw Hill. Boston.
- Fonseca, M, J. V and S. Said. 1994. *The Pectinase Produced by Tubercularia vulgaris in Submerged Culture Using Pectin or Orange Pulp Pellets as Inducer*. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Brazil.
- Hadieotomo, R. S. 1990. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek Teknik Dasar dan Prosedur Laboratorium*. PT. Gramedia. Jakarta.
- Noer, H. 2008. *Pectinase: Small, but Important*. <http://foodreview.biz>. Diakses pada tanggal 5 Januari 2013 pukul 10.00 WIB.
- Ordenez, R. G., J. Morlon-Guyot, S. Casparian and J. P. Guyot. 1998. *Occurrence of a Thermoacidophilic Cell-bound Exo-Pectinase in Alicyclobacillus acidocaldarius*. Folia Microbiology. 43 (6). Mexico.
- Putra, Ganda G.N. 2009. *Penentuan Kinetika Enzim Poligalakturonase (PG) Endogenous dari Pulp Biji Kakao*. Jurnal Biologi XIII (1) : 21 -24
- Salvador, L.D., T. Singanuma., K. Kitahara., Y. Fukusage and H. Tanoue. 2002. Degradation of Cell Wall Materials from Sweet Potato, Cassava and Potato by A Bacterial Protopectinase and Terminal Sugar Analysis of The Resulting Solubilized Products, *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **93** (1) : 64-72
- Sierio, C. 2012. *Microbial Pectic Enzymes in the Food and Wine Industry*. Food Industrial Processes – Methods and Equipment