

ISOLASI DAN KARAKTERISASI PEKTIN HIDROLASE EKSTRASELULER BAKTERI PEKTINOLITIK DALAM KLARIFIKASI JUS JERUK

ISOLATION AND CHARACTERIZATION EXTRACELLULAR PECTIN HYDROLASE OF PECTINOLYTIC BACTERIA FOR CITRUS JUICE CLARIFICATION

Esti Widowati ¹⁾, Harijono ²⁾, Aji Sutrisno ²⁾

¹⁾ Staf Pengajar Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret

²⁾ Staf Pengajar Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Brawijaya

ABSTRACT

*The aims of this research were to obtain and characterize pectinolytic bacteria isolate from vegetable waste, citrus peel and soil, determine enzyme characters (optimum pH and temperature, K_M and V_{maks}) and reveal the influence of enzyme in the citrus juice clarification. The research was conducted in two stages. Isolation and characterization of isolate from vegetable waste, citrus peel and soil and screening isolate were the first stage of the research. Isolation, presipitation, dialysis and determination of pectin hydrolase enzyme characters (optimum pH and temperature, K_M and V_{maks}) were the second stage of the research. Isolate 15 was the isolate from citrus peel with incubation temperature at 37°C and isolate 19 and 21 from mix of citrus peel and soil with incubation temperature in part 50°C and 55°C. Screening isolates results came out with isolates 15, 19 and 21 responded with rod-shaped, Gram positive, positive catalase and motile. Isolate 15 responded positive to MR-VP test, positive to Simmon's Citrate test and nonsporing. Isolate 19 responded positive to VP test, negative to Simmon's Citrate test and sporing with terminal type. Isolate 21 responded positive to VP test, negative to Simmon's Citrate test and non sporing. Isolate 19 was proven to be *Bacillus* sp. Pectic hydrolase extracellular enzyme of isolate 15 had optimum pH at 4,0 whereas isolate 19 and 21 optimum at pH 5,0. Enzyme from isolates 15, 19 and 21 had optimum temperature at 50 °C. K_M value of isolate 15, 19 and 21 were 0,121; 0,126 and 0,182 mg/ml. V_{maks} value of isolate 15, 19 and 21 were 0,550; 0,541 and 0,601 U/ml. Enzymes from isolate 15, 19 and 21 was able to reduce citrus juice viscosity, increased citrus juice clearness and increased total soluble solute of citrus juice and 1% pectin broth.*

Keywords : Clarification, Extracellular pectin hydrolase, Pectinolytic

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh dan mengkarakterisasi isolat bakteri pektinolitik dari sampah sayuran, kulit buah jeruk dan tanah; menentukan karakter enzim pektin hidrolase ekstraseluler (pH optimum, suhu optimum, K_M dan V_{maks}) dan mengetahui pengaruh enzim pektin hidrolase ekstraseluler dalam klarifikasi jus jeruk. Penelitian tahap I dilakukan isolasi dan karakterisasi bakteri dan seleksi bakteri uji. Penelitian tahap II dilakukan ekstraksi, presipitasi, dialisis dan karakterisasi enzim pektin hidrolase ekstraseluler (pH dan suhu optimum, V_{maks} dan K_M). Hasil seleksi isolat uji diperoleh isolat 15 hasil isolasi dari kulit buah jeruk yang dibusukkan suhu inkubasi 37°C dan isolat 19 dan 21 dari sampel kulit jeruk dicampur tanah dengan suhu inkubasi masing-masing 50°C dan 55°C. Isolat 15 berbentuk batang pendek, Gram positif, katalase positif dan motil. Isolat 15 positif uji MR-VP, positif uji Simmon's Citrate dan tidak membentuk endospora. Isolat 19 positif uji VP, negatif uji Simmon's Citrate dan membentuk endospora dengan tipe terminal. Isolat 21 positif uji VP, negatif uji Simmon's Citrate dan tidak membentuk endospora. Isolat 19 diduga merupakan genus *Bacillus*. Enzim pektin hidrolase ekstraseluler isolat 15 memiliki pH optimum 4,0 sedangkan pH optimum enzim isolat 19 dan 21 adalah 5,0. Ketiga isolat memiliki suhu optimum enzim 50°C. Nilai K_M enzim isolat 15, 19 dan 21 adalah 0,121; 0,126 dan 0,182 mg/ml dengan nilai V_{maks} enzim isolat 15, 19 dan 21 sebesar 0,550; 0,541 dan 0,601 (U/ml). Enzim isolat 15, 19 dan 21 mampu menurunkan viskositas, meningkatkan kecerahan jus melalui peningkatan nilai transmitansi dan meningkatkan nilai total padatan terlarut pada jus jeruk dan pektin cair 1%.

Kata Kunci : klarifikasi, pektin hidrolase ekstraseluler, pektinolitik

PENDAHULUAN

Jus jeruk merupakan suspensi koloid dari pektin, gula, protein dan mineral. Molekul-molekul tersebut menyebabkan kekeruhan dan viskositas yang tinggi pada jus jeruk (Benitez and Lozano, 2006).

Klarifikasi jus jeruk dapat dilakukan dengan filtrasi atau sentrifugasi untuk mengendapkan pulp. Pektin larut air dalam jus jeruk masih menyebabkan kekeruhan dan dapat menyumbat pori membran filter sehingga menghambat proses klarifikasi

(Pilnik and Voragen, 1993). Oleh karena itu diperlukan enzim pektinase.

Mekanisme klarifikasi jus jeruk dengan keterlibatan enzim dilakukan dengan memperkecil molekul pektin menjadi senyawa pektat yang larut air sehingga viskositas jus menurun (Pilnik and Voragen, 1993). Selain itu melalui mekanisme pengendapan agregat (de Man, 1997).

Enzim pektinase yang berperan dalam klarifikasi jus dapat diperoleh dari tanaman maupun mikroorganisme. Keunggulan bakteri antara lain bakteri memiliki laju pertumbuhan sel yang cepat, mudah dibiakkan pada kondisi nutrisi, suhu dan pH yang bervariasi dan kemampuan membentuk endospora. Eksplorasi bakteri sebagai sumber enzim pektinase terutama dari daerah tropis belum banyak dilakukan.

Sumber pektin yang melimpah seperti sampah sayuran dan kulit buah jeruk belum dimanfaatkan secara maksimal untuk memperoleh isolat pektinolitik yang mensekresikan enzim pektin hidrolase ekstraseluler yang optimum dan stabil dalam proses klarifikasi jus jeruk. Berdasarkan asumsi tersebut maka penelitian ini memanfaatkan sampah organik pasar untuk seleksi isolat pektinolitik yang mampu berperan dalam klarifikasi jus jeruk.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh dan mengkarakterisasi isolat bakteri pektinolitik dari sampah sayuran, kulit buah jeruk dan tanah; menentukan karakter enzim pektin hidrolase ekstraseluler (pH optimum, suhu optimum, K_M dan V_{maks}) dan mengetahui pengaruh enzim pektin hidrolase ekstraseluler dalam klarifikasi jus jeruk.

METODE PENELITIAN

Penelitian Tahap I

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pektinolitik (Holt *et al*, 1994; Yuwono dan Susanto, 2001; Benson, 2002) dan Seleksi Isolat Uji (Fonseca dan Said, 1994; Ordonez *et al*, 1998; Barense *et al*, 2001)

Sampel yang digunakan adalah kulit jeruk dicampur tanah kebun didekat tanaman lapuk yang selalu tersinari matahari langsung

(1:1) (sampel I), sayuran (sampel II) dan kulit jeruk (sampel III). Seluruh sampel didiamkan selama 5 hari dalam kantong plastik hitam terbuka di dalam ruangan. Sampel kemudian dihaluskan dengan blender steril. Sampel masing-masing ditimbang tepat sebanyak 5 g. Seri pengenceran dilakukan dari 10^{-1} - 10^{-6} menggunakan media pektin agar (ekstrak khamir 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 dan bacteriological agar 15 g dalam 1 L) sebagai media selektif bakteri pektinolitik. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C, 40°C, 50°C dan 55°C selama 24 jam. Morfologi koloni bakteri diamati berdasarkan bentuk, tepian, elevasi, struktur dalam, warna dan diameter. Koloni yang tumbuh kemudian dimurnikan. Preservasi isolat dilakukan dalam media pektin agar miring dan dalam gliserol 12% pada suhu 4°C.

Karakterisasi isolat bakteri dilakukan berdasarkan morfologi koloni dan morfologi sel meliputi pewarnaan Gram, pewarnaan endospora dan pengukuran sel. Uji fisiologis dilakukan dengan uji motilitas. Uji biokimia dilakukan dengan uji katalase, uji MR-VP dan uji Simmon's citrate.

Seleksi isolat uji dilakukan berdasarkan jumlah sel/ml, aktivitas enzim (U/ml) menggunakan metode DNS berdasarkan kurva standar asam D-galakturonat 100 ppm dan klarifikasi jus jeruk keprok (viskositas, %T dan Total Padatan Terlarut (TPT)) dan depolimerisasi pektin cair 1% (%T dan TPT).

Penelitian Tahap II

Produksi, Ekstraksi dan Pemurnian Enzim Pektin Hidrolase Ekstraseluler (Salvador *et al*, 2002; Rolinek, 2003)

Produksi enzim ditentukan pada fase logaritma isolat. Penentuan kurva pertumbuhan bakteri dilakukan dengan penentuan panjang gelombang maksimum dan kurva standar isolat dalam media pektin cair. Kurva pertumbuhan dilakukan pada media pektin cair dengan agitasi 144 rpm sesuai dengan suhu masing-masing isolat. Aktivitas enzim kasar diuji dengan metode DNS pada setiap titik pengambilan sampel kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan

isolat dan kurva aktivitas enzim kemudian digabungkan untuk penentuan hubungan antara jumlah sel dan fase pertumbuhan sel dengan aktivitas enzim.

Isolat bakteri yang telah mencapai fase logaritma kemudian diekstraksi dengan sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm 4°C selama 15 menit. Supernatan dipresipitasi dengan fraksinasi ammonium sulfat 10-90%. Sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 12000 rpm selama 10 menit 4°C. Pellet ditambah dengan buffer asetat 0,05 M pH 5,2 (1:1). Uji aktivitas enzim kemudian dilakukan dengan metode DNS pada fase supernatan dan pellet.

Fase dengan aktivitas enzim tertinggi dimasukkan dalam kantung membran selopon untuk prosedur dialisis. Membran tersebut direndam selama 24 jam pada suhu 4°C dalam gelas beaker 600 ml berisi 300 ml buffer asetat 0,05 M pH 5,2 yang dilengkapi magnetic stirer.

Karakterisasi Enzim Pektin Hidrolase (Van Rijssel *et al*, 1993; Munoz and Ros, 1996; Wilson and Walker, 2004)

Metode pengukuran aktivitas enzim pektin hidrolase didasarkan pada pengukuran gula reduksi yang dilepaskan. Penentuan gula reduksi dilakukan dengan metode DNS dengan asam D-galakturonat sebagai standar.

Satu unit aktivitas enzim pektin hidrolase dinyatakan sebagai 1 µmol gugus reduksi yang mampu dihidrolisis oleh enzim per menit pada kondisi yang sesuai atau banyaknya enzim yang melepaskan 1 µmol gugus gula reduksi per menit pada suhu dan pH tertentu.

Penentuan aktivitas enzim dengan metode DNS adalah enzim sebanyak 0,1 ml dicampur dengan 0,9 ml media pereaksi (0,7% pektin citrus ditambah buffer sodium asetat 0,025 M pH 4,8) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Sampel ditambah 1 ml DNS kemudian dipanaskan selama 10 menit dalam air mendidih bersuhu 90°C. Seluruh tabung reaksi didinginkan. Larutan K-Na-Tartrat 40% ditambahkan sebanyak 0,5 ml dan dihomogenkan. Masing-masing sampel ditera 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

Enzim 0,1 ml ditambah 0,9 ml media pereaksi (0,7% pektin citrus dalam buffer 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. Sampel dianalisis dengan metode DNS.

2. Suhu Optimum enzim

Enzim 0,1 ml ditambah 0,9 ml media pereaksi (0,7% pektin citrus dalam buffer sodium asetat 0,025 M pH 4,8) pada suhu inkubasi 35,40,45,50,55 dan 60°C selama 30 menit. Sampel dianalisis dengan metode DNS.

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

Enzim 0,1 ml ditambah 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 0,025M 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 $1/\text{aktivitas enzim}$ sehingga diperoleh garis linier dengan hubungan $1/v = 1/V_{maks} + K_M/V_{maks} \cdot 1/[S]$ atau $y = a + bx$ dengan

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

$X = 1/\text{konsentrasi substrat}$ ($1/[S]$)

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

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

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

Analisis Data

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

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bakteri pektinolitik sebanyak 11 isolat diperoleh dari sampel kulit jeruk dan tanah

kebun, sampah sayuran dan kulit jeruk pada suhu inkubasi 37°C. Bakteri pektinolitik sebanyak 8 isolat diperoleh dari sampel yang sama pada suhu inkubasi 40°C. Bakteri pektinolitik yang diisolasi dari kulit jeruk dicampur tanah kebun pada suhu inkubasi 50°C diperoleh 2 isolat dan 6 isolat diperoleh dari suhu inkubasi 55°C.

Seleksi isolat uji berdasarkan jumlah sel/ml, diameter zona jernih (mm), aktivitas enzim (U/ml), kemampuan dalam klarifikasi jus jeruk dan depolimerisasi pektin cair 1% maka diperoleh isolat 15, 19 dan 21.

Isolat 15 diisolasi dari sampel kulit jeruk pada suhu inkubasi 37°C. Isolat 19 dan 21 diisolasi dari sampel kulit jeruk dicampur tanah kebun dengan suhu inkubasi masing-masing 50°C dan 55°C.

Bakteri pektinolitik isolat 15, 19 dan 21 berbentuk batang pendek, Gram positif, katalase positif dan motil. Isolat 15 positif uji MR-VP, positif uji Simmon's Citrate dan tidak membentuk endospora. Isolat 19 positif uji VP, negatif uji Simmon's Citrate dan membentuk endospora dengan tipe terminal. Isolat 21 positif uji VP, negatif uji Simmon's Citrate dan tidak membentuk endospora. Isolat 19 diduga merupakan genus *Bacillus*.

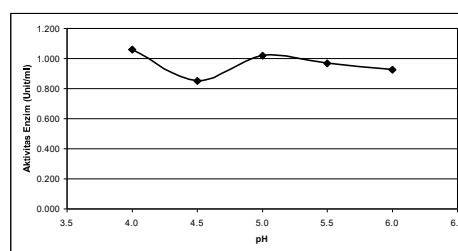
Fase logaritma isolat 15 dimulai pada jam ke 8 (8 jam setelah inokulasi). Isolat 19 memulai fase logaritma pada jam ke 12 (12 jam setelah inokulasi) sedangkan fase logaritma isolat 21 dimulai pada jam ke 4 (4 jam setelah inokulasi). Peningkatan jumlah sel/ml setiap isolat mempengaruhi produksi dan aktivitas enzim.

Aktivitas enzim isolat 15 tertinggi pada fraksi kejenuhan ammonium sulfat 60 % yaitu 0,916 U/ml. Enzim isolat 19 memiliki aktivitas sebesar 0,832 U/ml pada fraksi kejenuhan ammonium sulfat 50%. Enzim isolat 21 memiliki aktivitas tertinggi pada fraksi kejenuhan ammonium sulfat 80% sebesar 0.683 U/ml. Aktivitas enzim terdapat pada fase pellet.

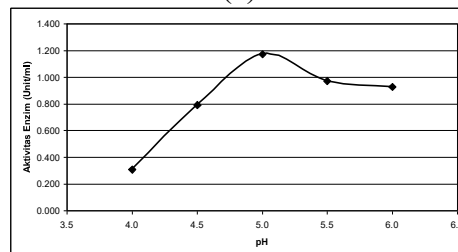
Konsentrasi protein enzim isolat 15 adalah 0,109 mg/ml. Enzim isolat 19 dan 21 masing-masing memiliki konsentrasi protein enzim sebesar 0,087 dan 0,065 mg/ml.

Isolat 15 optimum pada pH 4,0 sedangkan isolat 19 dan 21 optimum pada pH 5,0. Isolat 15 dimungkinkan memiliki dua

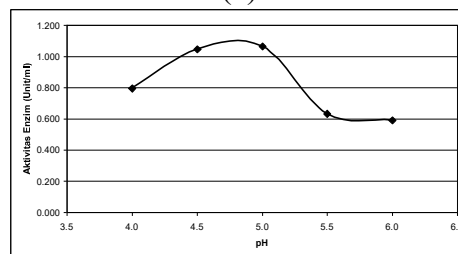
enzim karena memiliki nilai pH optimum pada 4,0 dan 5,0. Ketiga enzim isolat uji dapat diterapkan dalam proses klarifikasi jus jeruk karena optimum pada pH jus jeruk (pH 4,0-5,0). Perubahan pH yang menurun akan menyebabkan kelebihan ion H⁺ di sekitar protein dan akan menyerang sisi aktif enzim. Protein menjadi lebih bersifat negatif daripada enzim. Jika pH meningkat maka semakin banyak ion OH⁻ sehingga protein akan bermuatan positif. Perbedaan muatan positif atau negatif pada sisi aktif enzim dapat merubah bentuk enzim sehingga mempengaruhi interaksi enzim-substrat yang spesifik.



(a)



(b)

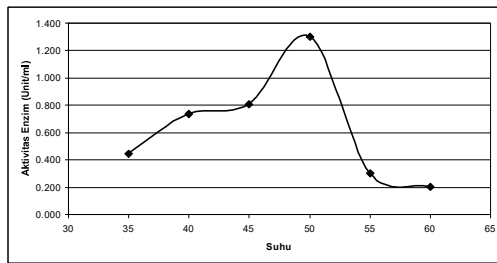


(c)

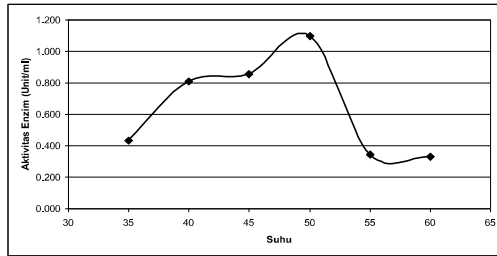
Gambar 1. Hubungan antara pH dengan Aktivitas Enzim Isolat 15 (a), 19 (b) dan 21 (c)

Ketiga enzim isolat uji optimum pada suhu 50°C sehingga dapat diaplikasikan dalam proses klarifikasi jus jeruk. Peningkatan suhu reaksi akan menyebabkan peningkatan reaksi antarmolekul dan jumlah produk enzim. Suhu reaksi yang terlalu tinggi akan menyebabkan perubahan konformasi struktur pada enzim dan perubahan sifat alami pada substrat sehingga substrat tidak

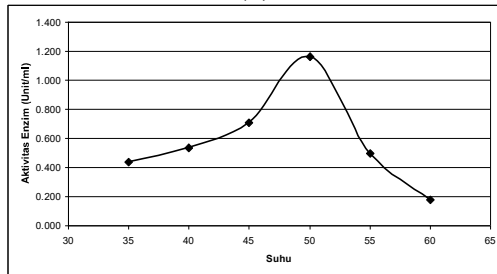
dapat memasuki sisi aktif enzim. Energi aktivasi akan mengalami penurunan jika reaksi berlangsung pada suhu rendah.



(a)



(b)



(c)

Gambar 2. Hubungan antara Suhu dengan Aktivitas Enzim Isolat 15 (a), 19 (b) dan 21 (c)

Analisis kinetika reaksi enzimatis adalah laju reaksi maksimum (V_{maks}) dan konstanta Michaelis-Menten (K_M). V_{maks} adalah batas secara teori laju reaksi yang tercapai jika konsentrasi substrat tinggi sehingga sisi aktif enzim secara tetap selalu ditempati oleh substrat dan nilainya tergantung pada konsentrasi enzim pada larutan. Reaksi enzim akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat tetapi jika konsentrasi substrat kembali dinaikkan maka kecepatan reaksi mencapai maksimum. Kondisi kecepatan reaksi enzim tidak dapat meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat disebut Kecepatan maksimum (V_{maks}). Nilai V_{maks} dapat menentukan nilai $\frac{1}{2} V_{maks}$ yaitu kondisi substrat yang diperlukan untuk mencapai kecepatan reaksi enzimatis $\frac{1}{2}$ dari kecepatan maksimum atau K_M (McGilvery and Goldstein, 1996).

Tabel 1. Nilai K_M (mg/ml) dan V_{maks} (U/ml) Enzim Murni Parsial Isolat 15, 19 dan 21

Isolat	K_M (mg/ml)	V_{maks} (U/ml)
15	0.121	0.550
19	0.126	0.541
21	0.182	0.601

Nilai K_M dan V_{maks} tertinggi adalah isolat 21 sebesar 0,182 mg/ml dan 0,601 Unit/ml. Enzim isolat 21 memiliki nilai K_M yang terbesar sehingga memiliki afinitas yang lebih rendah terhadap substrat pektin. Isolat 15 memiliki nilai K_M yang terkecil sehingga memiliki afinitas yang tinggi terhadap substrat pektin. Isolat 15 lebih berperan dalam klarifikasi jus jeruk.

Menurut Patil and Dayanand (2006), aktivitas enzim endopektinase dapat diketahui dari penurunan viskositas larutan pektin dengan viscometer Ostwald. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang mereduksi viskositas spesifik dalam larutan (20% atau 50%) selama waktu dan suhu tertentu. Aktivitas enzim eksopektinase dapat diketahui berdasarkan pengukuran gula reduksi. Satu unit aktivitas enzim dinyatakan sebagai 1 μ mol gugus reduksi yang mampu dihidrolisis oleh enzim per menit pada kondisi yang sesuai atau banyaknya enzim yang melepaskan 1 μ mol gugus gula reduksi per menit pada suhu dan pH tertentu. Berdasarkan pernyataan diatas dapat diketahui bahwa aktivitas enzim dalam penelitian ini merupakan enzim eksopektinase.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Bakteri pektinolitik sebanyak 11 isolat diperoleh dari sampel kulit jeruk dan tanah kebun, sampah sayuran dan kulit jeruk pada suhu inkubasi 37°C. Bakteri pektinolitik sebanyak 8 isolat diperoleh dari sampel yang sama pada suhu inkubasi 40°C. Bakteri pektinolitik yang diisolasi dari kulit jeruk dicampur tanah kebun pada suhu inkubasi 50°C diperoleh 2 isolat dan 6 isolat diperoleh dari suhu

inkubasi 55°C. Isolat uji yang digunakan adalah isolat 15, 19 dan 21 dengan karakter batang pendek, Gram positif, katalase positif dan motil. Isolat 15 positif uji MR-VP, positif uji Simmon's Citrate dan tidak membentuk endospora. Isolat 19 positif uji VP, negatif uji Simmon's Citrate dan membentuk endospora dengan tipe terminal. Isolat 21 positif uji VP, negatif uji Simmon's Citrate dan tidak membentuk endospora. Isolat 19 diduga merupakan genus *Bacillus*.

- Enzim pektin hidrolase ekstraseluler isolat 15 memiliki pH optimum 4,0 sedangkan pH optimum enzim isolat 19 dan 21 adalah 5,0. Ketiga isolat memiliki suhu optimum enzim 50°C. Nilai K_M enzim isolat 15, 19 dan 21 adalah 0,121; 0,126 dan 0,182 mg/ml dengan nilai V_{maks} enzim isolat 15, 19 dan 21 sebesar 0,550; 0,541 dan 0,601 (U/ml). Berdasarkan analisis diatas terdapat aktivitas enzim poligalakturonase.
- Ketiga enzim tersebut mampu menurunkan viskositas, meningkatkan kecerahan jus berdasarkan peningkatan nilai transmitansi dan meningkatkan nilai total padatan terlarut pada jus jeruk dan pektin cair 1%.

Saran

Penelitian ini memerlukan eksplorasi lebih lanjut mengenai

- Sumber pektin yang lebih bervariasi untuk memperoleh bakteri pektolitik
- Isolasi perlu dilakukan untuk memperoleh isolat termofilik
- Uji biokimia perlu diperkuat dengan menggunakan API System
- Purifikasi enzim dilanjutkan dengan kromatografi (kromatografi penukar ion, afinitas atau filtrasi gel)
- Uji aktivitas enzim pada kondisi optimum dan kestabilan enzim perlu dilanjutkan dengan interval pH atau suhu yang lebih pendek

DAFTAR PUSTAKA

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

- Benitez, E.I and J.E. Lozano. 2006. Influence of The Soluble Solids on Zeta Potential of a Cloudy Apple Juice, *Lat.Am.Appl.Res. Scielo*. **36** (3)
- Benson, H.J. 2002. *Microbiological Applications Laboratory Manual In General Microbiology*, Eighth Edition. Mc Graw Hill. Boston. p. 64-68, 72-74, 130-131, 157-175
- deMan, J.M. 1997. Kimia Makanan, Edisi Kedua. K. Padmawinata (Penerjemah). Penerbit ITB. Bandung. p. 201-205, 438-446, 457-461, 472
- 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*. **42** : 32-35
- Holt, J.G., N.R. Krieg., P.H.A. Sneath., J.T. Staley., S.T. Williams., L. Williams and Wilkins. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition. A Wolters Kluwer Company. Philadelphia. p. 559, 562, 566, 568, 570
- McGilvery, R.W and G.W. Goldstein. 1996. *Biokimia Suatu Pendekatan Fungsional*. Edisi Ketiga. Toyibhi (Penerjemah). Erlangga. Jakarta. 10 p
- Munoz, R and A.B. Ros. 1996. Enzymes in M.L. Leo (Ed.). *Handbook of Food Analysis, Volume I. Physical Characterization and Nutrient Analysis*, Marcel Dekker. New York. 10 p
- Ordenez, R.G., J. Morlon-Guyot., S. Casparian and J.P. Guyot. 1998. Occurrence of a Thermoacidophilic Cell Bound Exo-pectinase in *Alicyclobacillus Acidoceldarius*. *Folia Microbiology*. **43** (6) : 657-660
- Patil, S.R and A. Dayanand. 2006. Production of Pectinase from Deseeded Sunflower Heed by *Aspergillus niger* in Submerged and Solid-State Conditions. *Biosource Technology*. **97** : 2054-2058

- Pilnik, W and A.G.J. Voragen. 1993. *Pectic Enzymes in Fruit and Vegetable. Juice Manufacture. Enzymes in Food Processing*. Academic Press Limited. London. Third Edition. p. 363-392
- Rolinek, R. 2003. Separation of Three Isoforms of Polygalacturonase from Fermentation Supernatant of *Sclerotium rolfsii* with Pro Team FFE Compared to Chromatography. <http://www.tecan.com/com-pdf>. April, 04, 2008
- 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
- Van Rijssel, M., G.J. Gerwig and T.A. Hansen. 1993. Isolation and Characterization of an Extracellular Glycosylated Protein Complex from *Clostridium thermosaccharolyticum* with Polygalacturonase and Pectin Methyl Esterase Hydrolase Activity, *J. Applied and Enviromental Microbiology*. **59** (3) : 828-836
- Wilson, K and J. Walker. 2004. Principles and Techniques of Practical Biochemistry. Fourth Edition. Cambridge University Press. Cambridge. 15 p
- Yuwono, S dan T. Susanto. 2001. Pengujian Fisik Pangan. Penerbit UNESA. Surabaya. P. 49-53