

Optimasi dan Karakterisasi Pektinase dari Isolat Bakteri Asam Laktat Asal Fermentasi Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Optimization and Characterization of Pectinase Based On Isolates of Lactic Acid Bacteria from Fermentation of Robusta Coffee Beans (Coffea Canephora)

Andi Dwi Asri Yanti, Program Studi Pendidikan Teknologi Pertanian Fakultas Teknik,
Universitas Negeri Makassar, email: andidwhyasriyanti@gmail.com

Jamaluddin, Program Studi Pendidikan Teknologi Pertanian Fakultas Teknik,
Universitas Negeri Makassar, email: mamal_ptm@yahoo.co.id

Andi Sukainah, Program Studi Pendidikan Teknologi Pertanian Fakultas Teknik,
Universitas Negeri Makassar, email: andisukainah@yahoo.com

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui isolat Bakteri Asam Laktat (BAL) pektinolitik yang terlibat dalam fermentasi biji kopi robusta, pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas BAL pektinolitik serta karakterisasi pH dan suhu enzim pektinase ekstraseluler. Jenis penelitian ini adalah deskriptif dan termasuk penelitian eksperimen model Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian yang dilakukan meliputi seleksi BAL pektinolitik, penentuan waktu inkubasi optimum, pH, dan suhu optimum enzim pektinase. Isolat BAL yang dihasilkan dari fermentasi spontan biji kopi robusta ditumbuhkan pada media agar yang mengandung pektin untuk mendapatkan isolat BAL dengan kemampuan pektinolitik tertinggi. Isolat BAL pektinolitik terpilih diinkubasi pada rentan interval 0, 24, 48, 72, 96, dan 120 jam untuk mengetahui waktu inkubasi optimum serta melakukan ekstraksi enzim. Enzim yang dihasilkan kemudian dilakukan pengujian karakterisasi untuk menentukan pH maupun suhu optimumnya. Karakterisasi enzim dilakukan pada pH 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, dan 6 dengan suhu 35°C; 40°C; 45°C; 50°C; 55°C dan 60°C. Hasil menunjukkan bahwa 6 isolat BAL *indigenus* yang diuji bersifat pektinolitik. Isolat yang menghasilkan pektinolitik tertinggi yaitu isolat BT48I1 dengan diameter zona bening 5.67 mm. Waktu inkubasi optimum selama 48 jam dengan nilai spesifikasi enzim 158.43 U/ml, pH optimum pada kisaran pH 3.5 (10.0511 U/ml) dengan suhu 40-45°C dan nilai kemurnian enzim yaitu 10.085 U/mg dan 10.087 U/mg.

Kata Kunci: BAL, pektinase, pektinolitik, waktu inkubasi.

Abstract

This study aims to determine the isolates of pectinolytic Lactic Acid Bacteria (LAB) involved in the fermentation of robusta coffee beans, the effect of time interaction on pectinolytic LAB activity and characterization of pH and temperature of extracellular pectinase. This type of research is descriptive and includes experimental research with Completely Randomized Design (CRD) model. The research includes the selection of pectinolytic LAB, determining the optimum incubation time, pH, and temperature of the optimum pectinase enzyme. LAB isolates produced from spontaneous fermentation of robusta coffee beans were grown on agar media containing pectin to obtain LAB isolates with the highest pectinolytic ability. Selected pectinolytic LAB isolates were incubated at intervals of 0, 24, 48, 72, 96, and 120 hours to determine the optimal incubation time and perform enzyme extraction. The enzymes produced were then subjected to characterization tests to determine the optimum pH and temperature. Enzyme characterization was carried out at pH 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, and 6 with a temperature of 35°C; 40°C; 45°C; 50°C; 55°C and 60°C. The result

showed that 6 indigenous LAB isolates tested were pectinolytic. The isolate that produced the highest pectinolytic was BT48II isolate with a clear zone diameter of 5.67 mm. The optimum storage time was 48 hours with the enzyme specification value of 158.43 U/ml, the optimum pH was in the range of pH 3.5 (10,0511 U/ml) with a temperature of 40-45°C and the enzyme purity values were 10,085 U/mg and 10,087 U/mg.

Keywords: BAL, pectinase, pectinolytic, incubation time

Pendahuluan

Salah satu mikroorganisme yang terlibat dalam fermentasi biji kopi robusta ialah Bakteri Asam Laktat (BAL) *indigenus*. BAL termasuk makhluk hidup penghasil enzim. Salah satunya mampu menghasilkan enzim pektinase. Bakteri ini biasa disebut bakteri pektinolitik karena kemampuannya dalam mendegradasi pektin dengan cara memproduksi enzim pektinase. Pektinase merupakan kelompok enzim yang mampu mengkatalis substansi pektin dengan reaksi degradasi melalui depolimerisasi dan desterifikasi (Coutinho et al., 2003)

Pemilihan BAL pektinolitik hasil isolasi dari fermentasi biji kopi robusta didasari oleh berbagai penelitian yang melaporkan bahwa adanya peranan bakteri pektinolitik yang bekerja dalam fermentasi biji kopi tersebut. Kusiyanto *et al.*, (2019) menyatakan bahwa bakteri penghasil enzim pektinase diisolasi dari lingkungan yang mengandung pektin tinggi. Pektin pada biji kopi sebesar 2%.

Penelitian terdahulu juga telah melaporkan mengenai produksi enzim dari beberapa produk pangan salah satunya pada fermentasi biji kopi robusta asal Bantaeng. Hasil penelitian tersebut telah mengemukakan bahwa terdapat 12 isolat BAL terlibat dalam proses fermentasi biji kopi robusta asal Bantaeng. Dua diantara isolat tersebut kemudian dilakukan pengujian aktivitas enzim dan terindikasi merupakan BAL yang bersifat selulolitik dan pektinolitik atau BAL yang mampu

menghasilkan enzim selulase dan pektinase (Azhara *et al.*, 2021).

Penelitian tersebut masih perlu dikembangkan dengan melakukan pengkajian seleksi BAL pektinolitik, penentuan waktu inkubasi optimum serta karakterisasi enzim yaitu pH dan suhu optimumnya. Penyeleksian dilakukan untuk mendapatkan isolat BAL dengan aktivitas pektinolitik tertinggi. Isolat BAL dengan aktivitas pektinolitik tertinggi perlu diketahui waktu inkubasi optimumnya dalam memproduksi enzim, karena setiap isolat memiliki kinerja yang berbeda dalam memproduksi enzim. Enzim yang diproduksi pada waktu yang optimum ialah enzim dengan nilai aktivitas yang tinggi sehingga mampu bekerja secara optimal.

Suhu dan pH juga merupakan faktor utama yang perlu diketahui karena setiap enzim akan berfungsi secara optimal pada suhu dan pH tertentu. Enzim pektinase memiliki pH optimum antara 3 – 6 dan suhu optimum 40°C -70°C (Sieiro *et al.*, 2012). Enzim merupakan protein yang akan terdenaturasi pada suhu tinggi (Fitriani, 2003) dan pergeseran pH dari pH optimum akan menyebabkan terjadinya perubahan besar pada reaksi yang dikatalisis enzim (Murray *et al.*, 2003). Hal ini disebabkan karena asam amino merupakan pusat aktif enzim yang harus berada dalam keadaan ionisasi yang tetap agar menjadi aktif.

Hasil penelitian ini menghasilkan ekstrak enzim pektinase dari isolat BAL asal fermentasi biji kopi robusta dengan mengetahui karakteristik dari enzim tersebut

termasuk waktu inkubasi, pH dan suhu optimum. Isolat tersebut juga diharapkan dapat dijadikan sebagai starter dalam fermentasi terkontrol pada fermentasi biji kopi robusta maupun sebagai penghasil enzim pektinase ekstraseluler. Selain itu, ekstrak enzim pektinase yang dihasilkan dapat lebih mudah dimanfaatkan oleh dunia industri dalam pengembangan produk fungsional karena sudah diketahui kondisi optimum pertumbuhannya.

Metode Penelitian

Jenis penelitian ini ialah deskriptif dan eksperimen model Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan satu variabel yaitu waktu inkubasi yang terbagi menjadi 5 taraf yaitu 24, 48, 72, 96, dan 120 jam. Penelitian ini dilakukan dengan pengulangan sebanyak 3 kali.

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai Desember 2021 di Laboratorium Pendidikan Teknologi Pertanian Fakultas Teknik Universitas Negeri Makassar.

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini ialah cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, timbangan analitik, labu ukur, gelas ukur, korek api, bunsen, bulb karet, pipet ukur, mikropipet, botol semprot, batang pengaduk, oven, *hot plate*, *laminar air flow*, autoklaf, mikroskop, jarum ose, Erlenmeyer, kaca objek, spektrofotometer, *freezer*, tip, refrigerator, jangka sorong, sentrifus, gelas beker, spatula, botol vial dan cawan.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini ialah kultur isolat BAL asal fermentasi biji kopi robusta, MRSB *Merck*, agar-agar, NaCl 0,85%, spiritus, aluminium

foil, kapas, kristal violet, larutan iod, alkohol 70%, safranin, minyak imersi, *malachite green*, akuades, larutan hidrogen peroksida (H_2O_2) 3%, pektin, media *De Mann Rogosa Shape Agar* (MRSA), *congo red*, reagen *dinitrosalicylic acid* (DNS), KNa-tartarat, buffer sitrat, plastik *wrap* dan kertas cakram.

Prosedur Penelitian

Tahap Persiapan

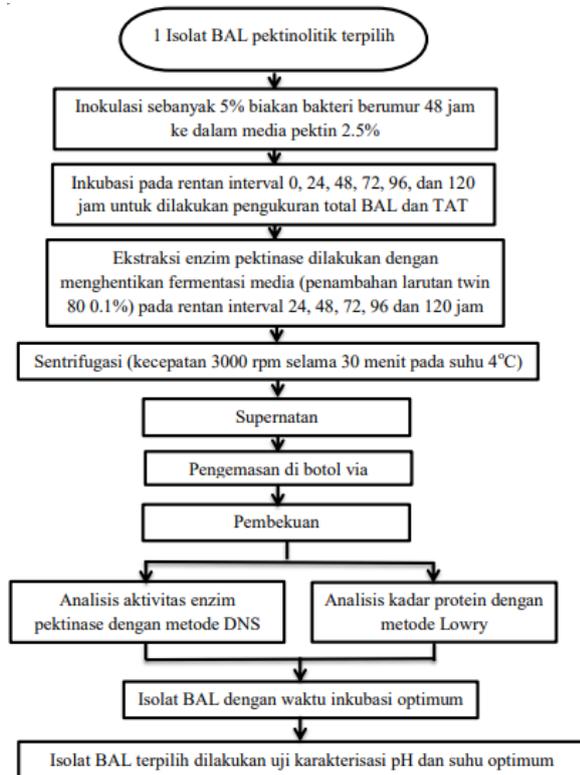
Tahap persiapan termasuk sterilisasi media dan peralatan penelitian, penyegaran kultur isolat BAL yang diuji serta identifikasi BAL. Alat yang digunakan dalam penelitian terlebih dahulu disterilisasi menggunakan oven ataupun autoklaf. Penyegaran kultur dilakukan menggunakan media agar miring MRSA di dalam tabung reaksi. Kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Proses identifikasi BAL dilakukan untuk memastikan kultur uji yang akan digunakan ialah BAL. Identifikasi BAL meliputi uji katalase, uji pewarnaan Gram dan uji pewarnaan endospora.

Tahap Seleksi

Isolat yang telah teridentifikasi sebagai BAL kemudian disiapkan untuk diinokulasi menggunakan kertas cakram diameter 6 mm yang ditempelkan pada media pektin 1% + indikator *congo red* 0.1% + agar 2%. Tahap seleksi ini dilakukan untuk mengetahui isolat BAL yang dapat menghasilkan enzim pektinase (isolat BAL pektinolitik) dengan aktivitas pektinolitik tertinggi. Isolat BAL pektinolitik ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni atau kertas cakram. Isolat yang memiliki diameter zona bening tertinggi dipilih untuk pengujian produksi dan karakterisasi enzim.

Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Diagram alir penentuan waktu inkubasi optimum dapat dilihat pada Gambar 1 berikut ini :



Gambar 1. Diagram Alir Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Karakterisasi Enzim

Enzim pektinase pada waktu inkubasi optimum yang dihasilkan pada pengujian sebelumnya, dilanjutkan ke pengujian karakterisasi enzim. Karakterisasi yang dilakukan meliputi pH dan suhu optimum dari aktivitas enzim pektinase. Penentuan pH optimum dilakukan dengan 7 taraf yaitu pada pH 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, dan 6. Enzim pektinase dengan pH optimum dilanjutkan pada penentuan suhu optimum. Pada pengujian ini, terdiri dari 6 taraf meliputi suhu 35°C; 40°C; 45°C; 50°C; 55°C dan 60°C. Pada tahap karakterisasi enzim ini dihasilkan enzim pektinase ekstraseluler dengan waktu,

pH, dan suhu optimum dari isolat BAL pektinolitik.

Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini ialah menggunakan pengujian dalam laboratorium. Pengujian ini terdiri dari seleksi BAL pektinolitik, pengujian total BAL, pengujian total asam tertitrisasi, pengujian aktivitas enzim pektinase, penentuan kadar protein, analisis aktivitas enzim pektinase dengan metode DNS dalam penentuan pH dan suhu optimum.

Seleksi Bakteri Asam Laktat (BAL) Pektinolitik

Seleksi BAL pektinolitik dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

1. Suspensi bakteri yang berumur 48 jam diambil sebanyak 20 μ l dan ditetesi pada kertas cakram berdiameter 6 mm yang telah steril.
2. Kertas cakram yang telah diberikan suspensi mikroba ditempel ke dalam media (agar 2% + pektin 1% + indikator congo red 0,1%).
3. Mikroba yang telah ditanam pada media diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang.
4. Pengukuran kemampuan mendegradasi pektinase ditandai dengan terbentuknya zona bening pada media.

Pengujian Total Bakteri Asam Laktat (BAL) dengan Metode Perhitungan Cawan

Menurut Antoni (2016), jumlah bakteri yang dihitung berada pada skala 30-300 koloni menggunakan rumus di bawah ini (dinyatakan dalam cfu/g):

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)] \times (d)} \dots \dots \dots (1)$$

Keterangan :

- N = Jumlah koloni (ml/gram)
- ΣC = Jumlah koloni pada keseluruhan cawan yang dihitung
- n1 = Jumlah cawan (pengenceran pertama)
- n2 = Jumlah cawan (pengenceran kedua)
- d = Tingkat pengenceran yang diperoleh dari cawan yang pertama dihitung.

Pengujian Total Asam Tertitrasi (TAT) dengan Metode Titrasi

Titration merupakan salah satu metode untuk mengukur total asam. Total asam tertitrasi adalah total asam laktat yang terbentuk saat proses fermentasi. Prosedur dalam pengujian total asam tertitrasi ialah sebagai berikut :

1. Sampel sebanyak 1 ml ditambahkan 9 ml akuades kemudian dihomogenkan
2. Sampel ditambahkan 3 tetes indikator phenolptalein (PP)
3. Sampel dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N hingga terbentuk warna merah muda yang bertahan 10 detik. Adapun penentuan total asam dihitung berdasarkan rumus (AOAC, 2000) :

$$\% \text{ Asam Laktat} = \frac{V_{NaOH} \times N_{NaOH} \times BM \times 100\%}{V_{sampel} \times 1000} \dots(2)$$

Keterangan :

- V_{NaOH} = Volume NAOH (ml)
- N_{NaOH} = Konsentrasi NAO
- V_{sampel} = Volume sampel (ml)
- BM = Berat molekul asam laktat (U)

Pengujian Aktivitas Enzim Pektinase dengan Metode DNS

Metode Dinitrosalicylic acid atau DNS ialah metode uji kuantitatif yang biasa digunakan dalam pengukuran kadar gula reduksi hasil hidrolisis enzim terhadap substrat. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya 1µmol glukosa yang dihasilkan dari hidrolisis oleh

1 mL ekstrak enzim kasar selama inkubasi. Aktivitas pektinase (Unit/mL) diketahui melalui perhitungan sebagai berikut (Aryani, 2012) :

$$\text{Aktivitas Enzim (U/ml)} = \frac{(X \times 1000) \times F_p \times (v) L \times 1000}{v \times bm \text{ galakturonat} \times t} \dots(3)$$

Keterangan :

- X = Nilai enzim - kontrol (µg/mL)
- F_p = Faktor pengencer (v)
- L = Jumlah keseluruhan sampel (ml)
- t = Waktu inkubasi (menit)
- v = Volume sampel (ml)

Analisis Aktivitas Spesifik Enzim Pektinase

Aktivitas spesifik enzim diperoleh dengan membagi masing-masing aktivitas enzim pada berbagai waktu inkubasi dengan protein. Berikut rumus dalam penentuan aktifitas spesifikasi enzim (Siska dan Astuti, 2018) :

$$N = \frac{\text{Aktivitas Enzim}}{\text{Protein Enzim}} = U/mg \dots(4)$$

Keterangan :

- N = Akifitas spesifik dalam unit/mg
- Total Protein = mg protein

Analisis Kadar Gula Reduksi

Kadar gula reduksi didapatkan dengan mengkonversi nilai aktivitas enzim ke perhitungan analisis kadar gula reduksi. Konversi nilai aktivitas enzim terhadap gula reduksi dilakukan untuk mengetahui kadar gula reduksi pada substrat dalam penentuan waktu inkubasi optimum. Adapun analisis kadar gula reduksi dihitung menggunakan persamaan 5 :

$$\text{Kadar Gula Reduksi (\%)} = \frac{\text{Konsentrasi (mg/L)} \times FP}{W_{substrat}} \times 100\% \dots(5)$$

Keterangan :

- W_{substrat} = Berat Substrat (mg)

Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Kadar protein ditentukan dengan menggunakan metode Lowry. Metode Lowry yang digunakan dalam uji kadar protein enzim pektinase memiliki persamaan sebagai berikut (Lowry *et al.*, 1951) :

$$\text{Protein Enzim (U/ml)} = \frac{(X \times 1000) \times Fp \times (v) \times L \times 1000}{v \times 100} \dots(6)$$

Teknik Analisis Data

Data yang dihasilkan pada penelitian ini berupa data kualitatif dan kuantitatif. Penelitian kualitatif disajikan secara deskriptif sedangkan teknik analisis data yang digunakan meliputi uji persyaratan analisis yang terdiri dari uji normalitas dan uji homogenitas. Apabila data yang diperoleh bersifat normal dan homogen maka akan dilanjutkan dengan analisis uji statistik sidik ragam ANOVA. Jika nilai sig <0.05 maka analisis data dilanjutkan dengan uji Duncan (DMRT) pada taraf signifikan $\alpha=0.05$. Data diolah menggunakan perangkat SPSS versi 20.

Hasil dan Pembahasan

Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL)

Isolat yang digunakan ialah BAL yang memiliki karakteristik endospora negatif, Gram positif dan katalase negatif. Hal ini didukung oleh pernyataan Carr (2002) yang menyatakan bahwa BAL merupakan bakteri yang memiliki bentuk batang atau bulat, tidak membentuk spora, Gram positif dan katalase negatif.

Hasil menunjukkan bahwa dari enam isolat yaitu BT3I3, BT3I7, BT24I1, BT24I2, BT6I5 dan BT48I1 terdapat isolat yang berbentuk batang dan bulat. Hasil ini menunjukkan bahwa pada umumnya isolat yang digunakan berbentuk batang. Namun,

terdapat satu isolat yaitu BT6I5 berbentuk bulat.

Hasil analisis menunjukkan bahwa seluruh isolat BAL yang diujikan ketika diberikan *malachite green* dan ditambahkan dengan safranin memperlihatkan semua sel berwarna merah. Hal ini mengindikasikan bahwa seluruh isolat yaitu BT3I3, BT3I7, BT6I5, BT24I1, BT24I2, dan BT48I1 merupakan bakteri non spora. Reagen yang digunakan pada uji endospora adalah *malachite green* dan safranin. Bakteri sel vegetatif (non spora) ketika diberikan *malachite green* akan mampu berikatan dengan pewarna tersebut (Buchanan, 2003).

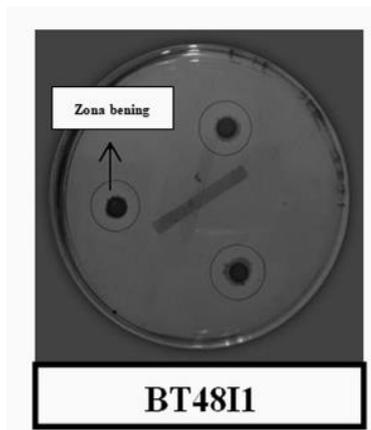
Hasil analisis pewarnaan gram menunjukkan bahwa seluruh isolat BAL yang diujikan menunjukkan seluruh sel berwarna ungu. Hal ini mengindikasikan seluruh sel merupakan bakteri Gram positif. Bakteri Gram negatif saat diwarnai dengan safranin akan berwarna merah (Waluyo, 2008).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua isolat BAL yang diujikan tidak memperlihatkan adanya gelembung setelah ditetesi H₂O₂. Artinya, semua isolat termasuk katalase negatif. Tidak terbentuknya gelembung menandakan bahwa tidak terjadinya pemecahan H₂O₂ menjadi hidrogen dan oksigen. Hal ini disebabkan karena tidak dihasilkannya enzim katalase sehingga seluruh isolat BAL tersebut dinyatakan negatif. Menurut Laily *et al.*, (2013) bakteri asam laktat memiliki sifat katalase negatif, dikarenakan tidak memiliki kemampuan menghasilkan enzim katalase yang dapat memecah H₂O₂ menjadi air dan oksigen.

Seleksi Bakteri Asam Laktat (BAL) Pektinolitik

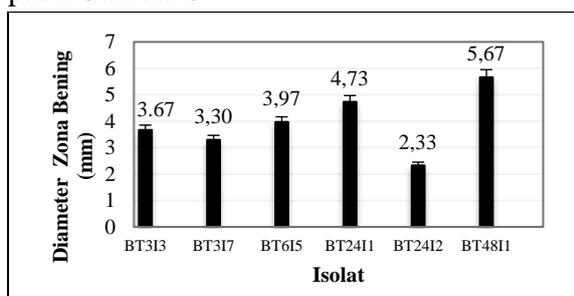
Pada tahap seleksi, bakteri uji ditumbuhkan di media pektin yang telah

diberikan congo red sebanyak 0.1%. Kemampuan aktivitas pektinolitik pada setiap bakteri uji dapat dilihat berdasarkan zona bening yang muncul di sekelilingnya. Zona bening menandakan bahwa isolat bakteri memanfaatkan substrat pektin pada media untuk pertumbuhan. Uji aktivitas enzim pektinase isolat BT48I1 dengan diameter zona bening tertinggi ditunjukkan pada Gambar 2 :



Gambar 2. Uji Aktivitas Enzim Pektinase pada Isolat BT48I1

Diagram indeks bakteri dalam menghidrolisis enzim pektinase ditunjukkan pada Gambar 3 :



Gambar 3. Indeks Aktivitas Bakteri dalam Menghidrolisis Pektinase

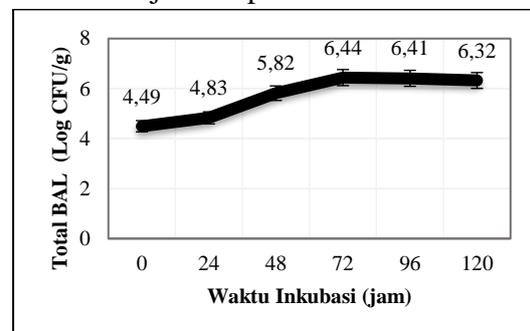
Hasil indeks aktivitas bakteri dalam menghidrolisis pektinase mengindikasikan bahwa 6 isolat BAL pada uji pektinolitik menunjukkan hasil yang positif pada seluruh isolat. Namun, terdapat perbedaan indeks aktivitas bakteri dalam menghidrolisis pektinase. BT48I1 merupakan isolat dengan diameter zona bening tertinggi dengan nilai

5.67 mm, sedangkan isolat yang memiliki zona bening terendah adalah BT2412 dengan nilai 2.33 mm.

Perbedaan indeks aktivitas pektinolitik yang ditunjukkan oleh masing-masing isolat disebabkan oleh kemampuan atau potensi masing-masing isolat berbeda dalam menguraikan substrat pada media pertumbuhan. Selain itu, salah satu penyebab perbedaan lebarnya zona bening pada BAL pektinolitik yaitu gen yang dimiliki oleh setiap bakteri serta aktivitas enzim pektinase yang dihasilkan pada setiap isolat berbeda. Menurut Suhartono (1991), perbedaan urutan asam amino yang dimiliki oleh setiap isolat bakteri akan menghasilkan enzim dengan aktivitas yang berbeda-beda. Isolat dengan diameter zona bening tertinggi kemudian dilanjutkan ke tahap karakterisasi enzim.

Perhitungan Total Bakteri Asam Laktat (BAL)

Isolat BT48I1 (BAL pektinolitik terpilih) kemudian ditumbuhkan pada media pektin cair 2,5% yang telah ditambahkan larutan mineral dan glukosa 1%. Perbandingan media pektin cair dan larutan mineral adalah 1:1. Kemudian diinkubasi mulai dari waktu inkubasi 0, 24, 48, 72, 96 sampai 120 jam. Grafik perhitungan total BAL ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Perhitungan Total BAL

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa selama waktu inkubasi

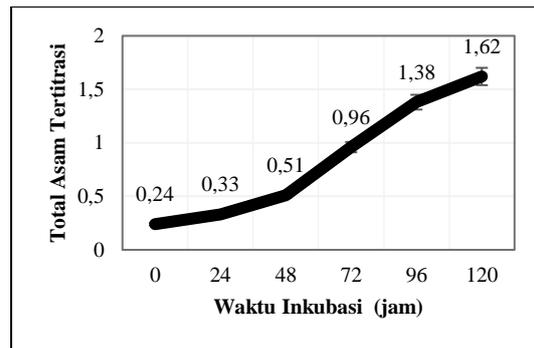
terjadi perbedaan signifikan dari total BAL. Peningkatan signifikan mulai terjadi pada waktu inkubasi 24 jam. Peningkatan itu terjadi 0.3 log Cfu/g. Peningkatan yang signifikan ini disebabkan karena pada waktu inkubasi 24 jam, isolat BT48I1 telah mencapai fase logaritmik. Pertumbuhan peningkatan signifikan ini terjadi hingga 72 jam. Dimana peningkatan ini dari 4.4 log Cfu/g mencapai 6.4 log Cfu/g. Pertumbuhan ini menunjukkan bahwa dari 24 jam hingga 72 jam termasuk ke dalam fase logaritmik. Pada fase ini, aktivitas metabolisme sel berada pada kondisi yang optimum sehingga mampu menghasilkan senyawa metabolit yang maksimal (Purkan, 2004).

Waktu inkubasi 72 hingga 96 jam, nilai total BAL mengalami pertumbuhan yang konstan. Hasil ini mengindikasikan bahwa isolat BT48I1 dari waktu inkubasi 72 hingga 96 jam telah memasuki fase stasioner. Menurut Talaro (2005), pada fase stasioner ini, jumlah bakteri yang tumbuh sama dengan jumlah bakteri yang mati. Sehingga pertumbuhan bakteri relatif lebih stasioner atau tetap bahkan berhenti.

Total BAL, setelah waktu inkubasi 120 jam, sudah mengalami penurunan yang mengindikasikan bahwa isolat BT48I1 tersebut sudah masuk fase kematian di media agar yang mengandung pektin. Menurut Volk dan Wheeler (1993), fase kematian adalah fase dengan peningkatan jumlah laju kematian yang melebihi jumlah laju pertumbuhan bakteri.

Total Asam Tertitrasi (TAT)

Pengukuran total asam bertujuan mengetahui perubahan total asam yang terjadi pada saat fermentasi. Total asam tertitrasi pada medium pertumbuhan bakteri asam laktat ditunjukkan pada Gambar 5 :

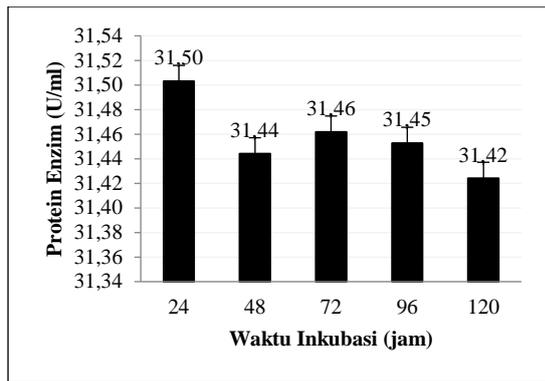


Gambar 5. Total Asam Tertitrasi (TAT)

Hasil analisis total asam tertitrasi pada Gambar 5 diketahui bahwa semakin lama waktu inkubasi maka semakin besar kadar asam laktat yang dihasilkan. Hal ini terjadi akibat dari banyaknya produk asam organik yang terbentuk. Penjelasan tersebut sesuai dengan pernyataan Al Baarri (2014) dalam jurnalnya bahwa asam laktat akan semakin meningkat selama fermentasi berlangsung dan menyebabkan kadar asam juga meningkat. Substrat dimanfaatkan oleh BAL sebagai sumber energi dalam membentuk asam laktat. Hal tersebut yang akan menyebabkan total asam yang tinggi dan terjadi penurunan pH pada medium pertumbuhan mikroba.

Kadar Protein

Enzim merupakan molekul protein kompleks yang dihasilkan oleh sel hidup yang tersusun dari asam amino dalam komposisi dan susunan rantai teratur dan tetap. Enzim diproduksi dan digunakan oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi antara lain konversi energi dan metabolisme pertahanan sel (Arfarita, 2015). Diagram kadar protein pektinase ditunjukkan pada Gambar 6 :



Gambar 6. Kadar Protein Pektinase oleh Isolat BT48I1

Hasil analisis uji Duncan menunjukkan bahwa waktu inkubasi kadar protein tertinggi dihasilkan pada waktu 24 jam. Kadar protein pada waktu inkubasi tersebut ialah 31,5%. Hasil ini berkorelasi positif dengan pertumbuhan isolat BT48I1 pada waktu inkubasi 24 jam. Pada waktu 24 jam, BT48I1 yang ditumbuhkan pada media pektin sudah masuk pada fase pertumbuhan logaritmik. Pada fase logaritmik, metabolisme terjadi sangat cepat, baik proses katabolismenya maupun anabolismenya khususnya sintesis protein.

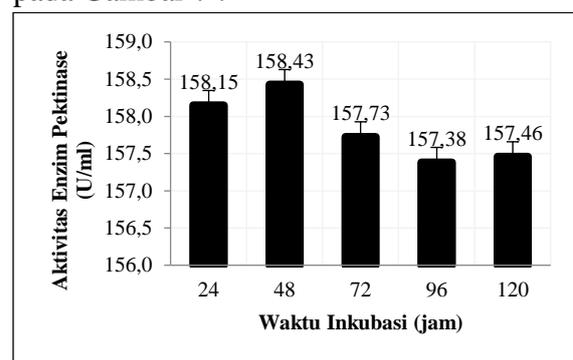
Pada kadar total protein enzim pektinase yang dihasilkan oleh isolat BT48I1 pada waktu inkubasi 48 jam hingga 96 jam mengalami nilai yang serupa. Hal ini berkorelasi positif dengan pertumbuhan isolat BT48I1 dari 48 jam hingga ke 72 jam yang merupakan fase logaritmik dan 96 jam yang merupakan fase awal kematian. Pada waktu pertumbuhan tersebut, khususnya logaritmik, sumber energi sangat diperlukan karena pembelahan sel semakin cepat, sehingga memerlukan sumber energi baik dalam bentuk sumber karbon maupun dalam bentuk sumber nitrogen. Isolat BT48I1 memanfaatkan protein sebagai sumber nitrogen.

Kadar protein enzim pektinase yang dihasilkan oleh isolat BT48I1 kembali mengalami penurunan yang signifikan pada waktu inkubasi 120 jam. Hal ini disebabkan

karena isolat BT48I1 pada waktu inkubasi tersebut, sudah memasuki fase kematian. Menurut Rachman (1989) menurunnya protein disebabkan karena dikonsumsi oleh bakteri sebagai sumber nitrogen. Bakteri memerlukan protein sebagai salah satu nitrogen organik dalam pertumbuhannya.

Aktivitas Enzim dan Aktivitas Spesifik Enzim Pektinase pada Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Penentuan waktu inkubasi optimum dilihat berdasarkan nilai aktivitas enzim dan juga nilai aktivitas spesifik enzim yang dihasilkan oleh isolat BT48I1. Aktivitas enzim yang dihasilkan pada waktu inkubasi 24 jam yaitu 158,15 U/ml dan meningkat signifikan pada waktu inkubasi 48 jam dengan nilai 158,43 U/ml. Waktu inkubasi 48 jam merupakan waktu inkubasi dengan aktivitas enzim pektinase yang tertinggi. Hal ini berkaitan dengan pertumbuhan BT48I1 yang berada pada fase log. Pada fase ini, pertumbuhan BT48I1 berada pada pertumbuhan yang optimal sehingga mampu menghasilkan enzim dengan aktivitas yang optimum. Nilai aktivitas enzim pektinase diberbagai waktu inkubasi ditunjukkan pada Gambar 7 :

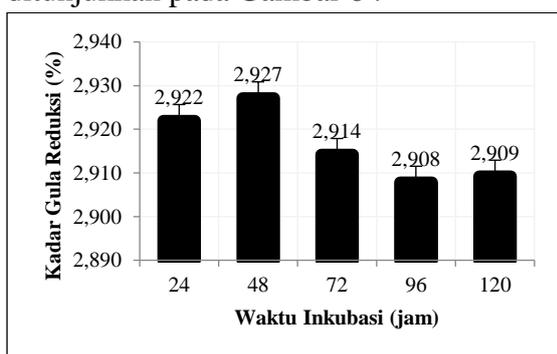


Gambar 7. Aktivitas Enzim Pektinase pada Penentuan Waktu Inkubasi Optimum oleh Isolat BT48I1

Aktivitas enzim pektinase yang dihasilkan oleh isolat BT48I1 sudah mulai mengalami penurunan yang signifikan pada

waktu inkubasi 72 jam yaitu 157.72 U/ml. Penurunan aktivitas enzim ini tetap berlanjut hingga waktu inkubasi 96 jam dan 120 jam. Kedua waktu ini, 96 dan 120 jam menunjukkan aktivitas enzim pektinase terendah dari isolat BT48I1 dengan nilai kisaran 157 U/ml. Penurunan ini disebabkan karena isolat BT48I1 pada waktu inkubasi 96 jam sudah memasuki fase akhir stasioner dan pada waktu inkubasi 120 jam sudah masuk pada fase kematian. Pada fase akhir stasioner, persediaan nutrisi pada media berkurang sehingga kemampuan isolat BT48I1 dalam mensekresikan enzim juga mengalami penurunan. Hal ini selaras dengan pendapat Haq *et al.*, (2010) yang mengatakan bahwa penurunan aktivitas pektinase disebabkan adanya penumpukan sisa metabolisme bakteri dan juga terjadinya penurunan nutrisi pada media.

Proses pemecahan pektin menjadi gula reduksi disebut sebagai proses sakarifikasi. Pada pengujian ini, pektin yang terkandung pada media diurai menjadi asam galakturonat. Kadar gula reduksi pada berbagai waktu inkubasi dalam penentuan waktu inkubasi optimum enzim pektinase ditunjukkan pada Gambar 8 :

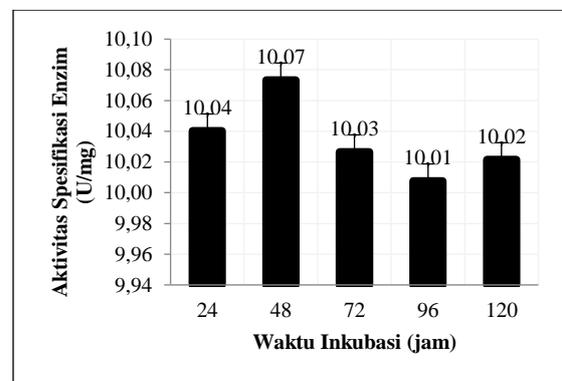


Gambar 8. Kadar Gula Reduksi Enzim Pektinase pada Penentuan Waktu Inkubasi Optimum oleh Isolat BT48I1

Hasil analisis kadar gula reduksi dalam hal ini ialah asam galakturonat menunjukkan hasil yang sangat berkorelasi positif dengan aktivitas enzim pektinase

yang dihasilkan. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa kadar gula reduksi dari media pektin 0.7% yang diujikan pada saat analisis menghasilkan kadar gula reduksi tertinggi atau asam galakturonat tertinggi yaitu 2.927% yang berada pada waktu inkubasi 48 jam.

Aktivitas spesifik menyatakan jumlah unit enzim per mg protein atau besarnya aktivitas enzim per jumlah protein yang terkandung dalam campuran enzim yang diuji (Triana, 2005). Nilai aktivitas spesifik enzim pektinase pada penentuan waktu inkubasi optimum dapat dilihat pada Gambar 9 :

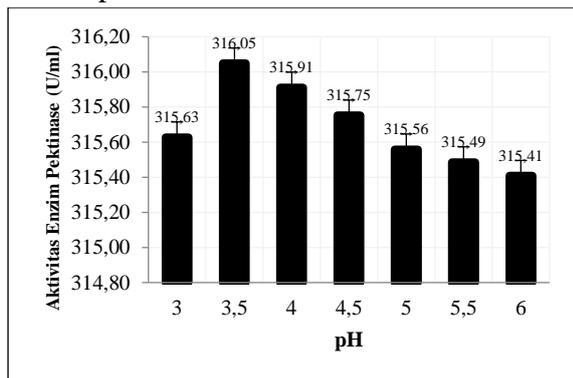


Gambar 9. Aktivitas Spesifik Enzim Pektinase pada Penentuan Waktu Inkubasi Optimum oleh Isolat BT48I1

Hasil analisis menunjukkan bahwa aktivitas spesifik enzim pektinase tertinggi yang dihasilkan oleh isolat BT48I1 berada pada waktu inkubasi 48 jam dengan nilai 10.07 U/mg. Hasil ini menjadi salah satu pertimbangan bahwa waktu inkubasi 48 jam merupakan waktu yang dibutuhkan oleh isolat BT48I1 dalam media agar yang mengandung pektin untuk menghasilkan aktivitas enzim pektinase optimum. Waktu inkubasi ini akan diuji pada tahap karakterisasi pH.

Aktivitas Enzim dan Aktivitas Spesifik Enzim Pektinase pada Penentuan pH Optimum

Penentuan pH optimum enzim yang dilakukan, sama seperti pada uji aktivitas enzim. Pengujian dilakukan pada variasi pH 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, dan 6. Nilai aktivitas enzim pektinase pada berbagai pH dapat dilihat pada Gambar 10.



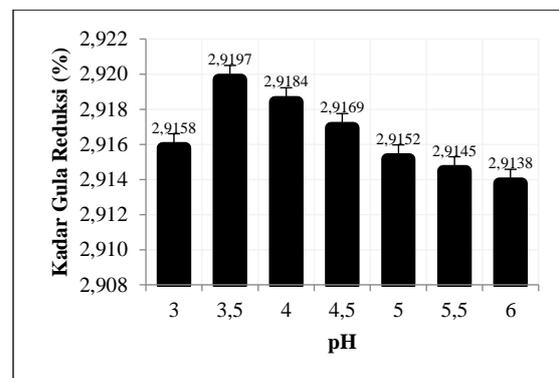
Gambar 10. Aktivitas Enzim Pektinase pada Penentuan pH Optimum oleh Isolat BT48I1

Aktivitas enzim pektinase yang dihasilkan oleh isolat BT48I1 pada rentang pH 3 hingga 6 menunjukkan bahwa enzim pektinase masih bekerja dengan baik dalam memecah pektin menjadi asam galakturonat. Aktivitas enzim pektinase pada pH 3 memiliki kenaikan nilai aktivitas enzim sebesar 0,42 U/ml terhadap pH 3.5. Nilai aktivitas enzim pada pH 3.5 dengan nilai 316,05 U/ml merupakan nilai aktivitas enzim tertinggi. Hal ini serupa dengan penelitian Widowati *et al.*, (2014) yang mengemukakan bahwa isolat bakteri yang diisolasi dari limbah kulit jeruk menghasilkan enzim pektinase yang mampu bekerja dengan stabil pada pH 3,0-4,0. Selain itu, Siero *et al.*, (2012) mengemukakan bahwa enzim pektinase memiliki kisaran pH optimal 3,5 – 11.

Aktivitas enzim yang dihasilkan oleh BT48I1 pada pH 4 hingga 6 terus mengalami penurunan. Nilai aktivitas enzim

terendah berada pada pH 6 dengan nilai 315,41 U/ml. Penurunan tersebut disebabkan karena perubahan pH yang signifikan dapat mengganggu sisi aktif enzim sehingga tidak mampu bekerja secara optimal dan dapat menurunkan nilai aktivitasnya. Menurut Hames dan Hooper (2000), perubahan pH pada skala deviasi kecil sehubungan dengan perubahan ionisasi gugus-gugus fungsionilnya karena pada hakikatnya enzim adalah protein yang tersusun atas asam amino yang dapat mengadakan ionisasi (mengikat) dan melepaskan proton atau ion hidrogen pada gugus amino, karboksil dan gugus fungsionil lainnya.

Pada pengujian ini menunjukkan bahwa kadar gula reduksi yang dihasilkan oleh isolat BT48I1 mengalami kenaikan kadar gula reduksi pada pH 3 hingga 3.5 dengan kenaikan 0,0039%. Selanjutnya, mengalami penurunan kadar gula reduksi hingga pH 6. Kadar gula reduksi pada berbagai pH dalam penentuan pH optimum enzim pektinase ditunjukkan pada Gambar 11:

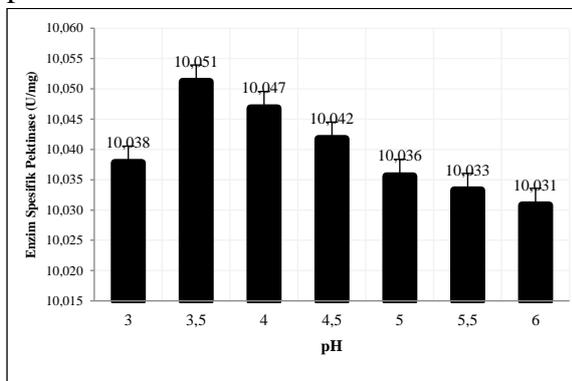


Gambar 11. Kadar Gula Reduksi Enzim Pektinase pada Penentuan pH Optimum oleh Isolat BT48I1

Hasil menunjukkan bahwa kadar gula reduksi berbanding lurus dengan aktivitas enzim pektinase oleh isolat BT48I1. Konsentrasi gula reduksi terendah dihasilkan pada kondisi enzim pada pH 6 dengan nilai 2.9138% dan konsentrasi kadar

gula reduksi tertinggi dihasilkan pada kondisi enzim dengan pH 3.5 dengan nilai 2.9197%. Hal ini menunjukkan bahwa pada pH 3,5 merupakan pH optimum yang dapat menghasilkan kadar gula reduksi.

Nilai aktivitas spesifik enzim pektinase sejalan dengan aktivitas enzim dan kadar gula reduksi yang dihasilkan. Hasil ini menunjukkan bahwa aktivitas spesifik enzim yang tertinggi dihasilkan pada pH 3,5. Nilai aktivitas spesifik enzim pektinase pada berbagai pH dapat dilihat pada Gambar 12.

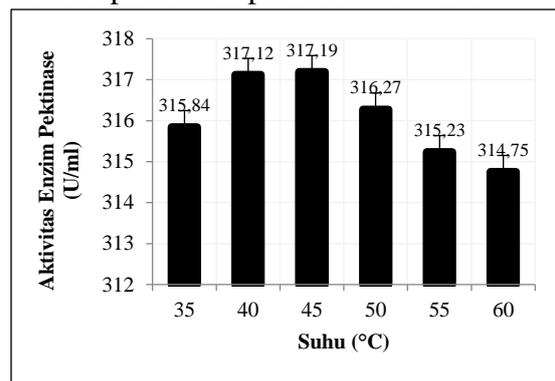


Gambar 12. Aktivitas Spesifik Enzim Pektinase pada Penentuan pH Optimum oleh Isolat BT48I1

Hubungan aktivitas spesifik enzim pektinase dengan perlakuan pH ialah pada pH 3 hingga pH 3.5 menunjukkan terjadinya peningkatan aktivitas spesifik enzim sebesar 0,0013 U/mg, sedangkan pada pH 3.5 hingga pH 6 mengalami penurunan. Aktivitas spesifik enzim pektinase tertinggi berada pada pH 3.5 dengan nilai 10,051 U/mg sedangkan aktivitas spesifik enzim pektinase terendah berada pada pH 6 dengan nilai 10,031 U/mg. Waktu inkubasi 72 jam dan pH 3.5 adalah waktu dan pH optimum yang dilakukan dalam karakterisasi suhu enzim pektinase yang dihasilkan oleh isolat BT48I1.

Aktivitas Enzim dan Aktivitas Spesifik Enzim Pektinase pada Penentuan Suhu Optimum

Penentuan suhu optimum enzim sama seperti pada uji aktivitas enzim, akan tetapi pada pengujian ini dilakukan penggunaan beberapa suhu yaitu 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C dan 60°C. Suhu dapat mempengaruhi reaksi yang dikatalisis oleh enzim. Salah satunya ialah kenaikan suhu akan mengubah struktur protein yang menyusun enzim sehingga terjadi pemutusan interaksi non kovalen yang menopang struktur tiga dimensi enzim atau yang biasa dikenal dengan denaturasi enzim (Hames dan Hooper, 2005). Nilai aktivitas enzim pektinase pada berbagai suhu dapat dilihat pada Gambar 13 :

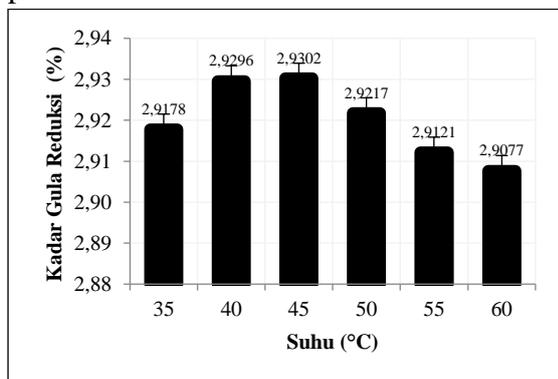


Gambar 13. Aktivitas Enzim Pektinase pada Penentuan Suhu Optimum oleh Isolat BT48I1

Aktivitas enzim pektinase yang dihasilkan oleh isolat BT48I1 pada rentan suhu 35°C sampai 40°C sudah mengalami peningkatan dalam memecah pektin menjadi bentuk yang lebih sederhana. Pada suhu 35°C, aktivitas enzim pektinase yang dihasilkan oleh isolat BT48I1 yaitu 315,84 U/ml. Nilai aktivitas enzim pada suhu 40°C meningkat jika dibandingkan dengan suhu 35°C yaitu 317,12 U/ml. Aktivitas enzim tersebut stabil hingga pada suhu 45°C. Tingginya aktivitas enzim disebabkan karena seiring bertambahnya suhu

menyebabkan terus meningkatnya aktivitas enzim hingga seluruh tapak enzim berikatan dengan substrat dan membentuk kompleks enzim substrat, hal ini terjadi hingga batas suhu optimum (Girindra, 1993).

Aktivitas enzim pektinase yang dihasilkan oleh isolat BT48I1 menunjukkan penurunan hingga suhu inkubasi dinaikkan dari 50°C sampai 60 °C. Pada suhu tersebut, aktivitas enzim pektinase mengalami penurunan dari 316,27 U/ml menjadi 314,75 U/ml. Penyebab terjadinya penurunan aktivitas enzim juga bisa disebabkan karena adanya kadar gula reduksi yang tinggi. Kadar gula reduksi yang tinggi bisa saja menghambat kerja dari enzim sehingga aktivitas enzim akan mengalami penurunan. Kadar gula reduksi merupakan banyaknya gula sederhana yang telah dipecah dan digunakan oleh BAL untuk proses metabolisme (Rahayu dan Sudarmardji, 1989). Kadar gula reduksi dalam penentuan suhu optimum enzim pektinase yang dihasilkan oleh isolat BT48I1 ditunjukkan pada Gambar 14 :

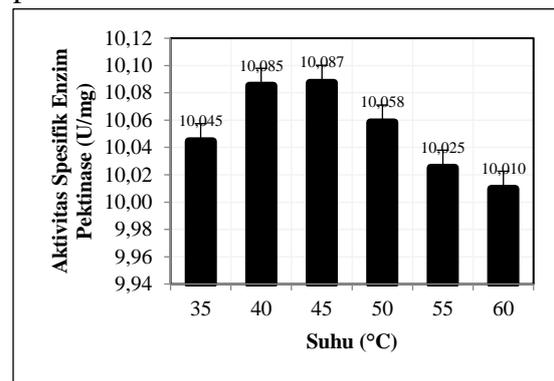


Gambar 14. Kadar Gula Reduksi Enzim Pektinase pada Penentuan Suhu Optimum oleh Isolat BT48I1

Nilai aktivitas enzim dan kadar gula reduksi yang dihasilkan menunjukkan bahwa pada suhu 40°C dan 45°C cenderung lebih stabil dan memiliki nilai yang lebih tinggi dibanding suhu lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi

aktivitas enzimnya maka semakin bagus pula metabolisme sel bakteri pada kondisi tersebut sehingga menghasilkan senyawa kadar gula reduksi lebih tinggi.

Aktivitas spesifik merupakan suatu ukuran kemurnian enzim dan menjadi maksimum atau tetap (konstan) jika enzim sudah berada pada keadaan murni (Lehninger, 1982). Aktivitas spesifik enzim pektinase pada berbagai suhu dapat dilihat pada Gambar 15 :



Gambar 15. Aktivitas Spesifik Enzim Pektinase pada Penentuan Suhu Optimum oleh Isolat BT48I1

Suhu optimum enzim pektinase yang dihasilkan oleh isolat BT48I1 yaitu berada pada suhu 40 dan 45°C dengan nilai aktivitas spesifik enzim yaitu 10.085 U/mg dan 10.087 U/mg. Hal ini disebabkan pada suhu tersebut, nilai aktivitas enzim maupun nilai spesifik enzim pektinase pada suhu 40 dan 45°C tidak memiliki perbedaan yang signifikan jika dianalisis secara statistik. Selisih dari nilai aktivitas spesifik enzim yang dihasilkan ialah 0.002 U/mg. Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa enzim pektinase yang dihasilkan oleh isolat BT48I1 asal fermentasi spontan biji kopi robusta mampu bekerja secara optimal pada waktu inkubasi 72 jam dengan kondisi pH 3.5 dan suhu 40-45°C.

Simpulan

Isolat BAL yang terlibat dalam fermentasi biji kopi robusta asal Bantaeng

diantaranya yaitu BT3I3, BT3I7, BT6I5, BT24I1, BT24I2, dan BT48I1 bersifat pektinolitik. Isolat BAL BT48I1 menghasilkan aktivitas pektinase tertinggi yang ditandai dengan diameter zona bening tertinggi yaitu 5,67 mm. Waktu inkubasi optimum isolat BT48I1 yang ditumbuhkan pada media agar yang mengandung pektin ialah berada pada waktu inkubasi 48 jam dengan aktivitas enzim dan aktivitas spesifik enzim pektinase yaitu 158.43 U/ml dan 10.07 U/mg. Karakterisasi pH optimum enzim pektinase ekstraseluler yang dihasilkan oleh Isolat BT48I1 yang ditumbuhkan pada media pektin berada pada pH 3.5 dengan aktivitas enzim dan aktivitas spesifik enzim pektinase yaitu 316.05 U/ml dan 10.05 U/mg, sedangkan suhu optimum pektinase berada pada kisaran suhu 40-45°C dengan aktivitas enzim dan aktivitas spesifik enzim pektinase yaitu \pm 317 U/ml dan 10.08 U/mg.

Daftar Pustaka

- Al-Baarri, A.N., Abduh, S.B.M., Pramono, Y. B., Legowo, A.M., Jannah, A.M. (2004). Total Bakteri Asam Laktat, pH, Keasaman, Citarasa dan Kesukaan Yogurt Drink dengan Penambahan Ekstrak Buah Belimbing. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 3 (2) : 7-11.
- Antoni H. (2016). Fermentasi Spontan Bekasam Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Menggunakan Kerak Nasi Kering. Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor: Bogor.
- AOAC. (1995). *Official Methods of Analisis Chemist*. 1A. AOAC Inc., Washington.
- AOAC International. (2000). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, Gaithersburg, USA.
- Arfarita, N & El-Hayah. 2015. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Protease yang Diskrining dari Terasi. 5 (3) : 119-122
- Aryani, S. W. (2012). Isolasi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Selulase dari Kapang Selulolitik *Mucor* sp.B2. *Skripsi*. Surabaya: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.
- Azhara, I., Rais, M., Sukainah, A., & Putra, R. P. (2021). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat pada Fermentasi Spontan Biji Kopi Robusta. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 23 (1) : 49-60.
- Baker, R. A. (1997). Reassessment of Some Fruit dan Vegetable Pectin Levels. *Journal of Food Science*. 62 (2).
- Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. (2003). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The William & Wilkins Company Baltimore.USA.
- Coutinho, P.M., Stam, M., Blanc, E., & Henrissat, B. (2003). Why are There so Many Carbohydrate-Active Enzyme-Related Genes in Plants. *Trends Plant Sci*. 8 : 563-565.
- Fitriani, E. (2003). *Aktivitas Enzim Karboksimetil Selulase Bacillus pumilus Galur 55 pada Berbagai Suhu Inkubasi*. Bogor: Kimia FMIPA IPB
- Hames, BD., & Hooper, NM,. (2000). *Biochemistry: The Instant Notes*. Ed.ke-2. Hongkong: Springer-Verlag.
- Hames, D., Hooper, N. (2005). *BioChemistry*. Ed ke-4. New York: Taylor and Francis Group
- Haq, H., M.A. Ashaf & J. Qadeer. (2010). Pearl millet, a source of α -amylase production by *Bacillus licheniformis*. *Bioresour. Technol.*, 96:1201-1204.

- Kashyap DR, PK Vohra & R Tewari. (2001). Application of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour Technol* 77:215-27.
- Kusiyanto, G., Purwatiningsih & Muzakhar, K. (2019). Skrining dan Identifikasi Bakteri Pektinolitik Endosimbion dalam Sistem Pencernaan Serangga Penggerek Kopi (*Hypothenemus hampei Ferr.*). *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, 7 (2)
- Laily IN, Utami R & Widowati E. (2013). Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Riboflavin dari Produk Fermentasi Sawi Asin. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 2(4): 179-284
- Lehninger, A. L., (1982). *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, Inc. Maryland
- Lowry HO, Rosenbrough, NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biology and Chemistry*. 193:265-275
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. (2003). *Harper's Illustrated Bio Chemistry*. Ed ke-26. San Fransisco: McGraw-Hill.
- Poedjiadi A. (1994). *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: Universitas Indonesia
- Purkan., Azizah, B., Baktir, A. & Sumarsih, S. (2014). Eksplorasi Bakteri Kitinolitik dari Sampah Organik: Isolasi dan Karakterisasi Enzim Kitinase. *Jurnal Ilmiah Kimia Molekul*. 9(2): 128-135.
- Rachman, A. (1989). *Pengantar Teknologi Fermentasi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Rahayu K & Sudarmadji. (1989). *Mikrobiologi Pangan*. PAU-UGM. Yogyakarta.
- Rahmawati, Atik & Yunianta. (2015). Hidrolisis Pati Jahe Emprit dengan Enzim Alfa Amilase. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3 (3) : 1252-1262.
- Sieiro, C., Fraga1, B.G., Seijas1, J.L., Silva1, A.F., Villa, T.G. (2012). *Microbial Pectic Enzymes in the Food and Wine Industry*. Food Industrial Processes Methods and Equipment.
- Siska, F & Astuti, W. (2008). Isolasi dan Penentuan Kondisi Kerja Optimum Amilase dari Rebung Bambu Serit (*Gigantochloa robusta Kurz.*). *Prosiding Seminar Nasional Kimia* : 34-38.
- Suhartono, MT. (1991). *Protease*. Bogor: Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB
- Talaro, K.P. (2005). *Microbiology*. New York: McGraw-Hill
- Triana, R. (2013). Pemurnian dan karakterisasi enzim glukosa oksidase dari isolat lokal *Aspergillus niger* (IPBCC.08.610). *Skripsi*. Departemen BiokimiaFMIPA, Institut Pertanian Bogor
- Usman, D., Supriyadi, A., Kusdiyantini, E. (2015). Fermentasi Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Menggunakan Isolat Bakteri Asam Laktat dari Faces Luwak dengan Perlakuan Lama Waktu Inkubasi. *Jurnal Biologi*. 4 (3) : 31-40.
- Volk, W. A. & M. F. Wheeler. 1993. *Mikrobiologi Dasar*. Edisi elima. Jilid 1. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Waluyo, L. (2008). *Teknik Metode Dasar dalam Mikrobiologi*. UMM Press, pp. 222-258.
- 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.