

AMOBILISASI ENZIM PEKTINASE DARI *ASPERGILLUS NIGER* DENGAN Matrik Kitosan–Natrium Tripolifosfat

IMMOBILIZATION OF PECTINASE FROM *ASPERGILLUS NIGER* WITH MATRIX CHITOSAN-SODIUM TRIPOLYPHOSPHATE

Sasangka Prasetyawan

Departemen Kimia, Universitas Brawijaya

E-mail: sasangka@ub.ac.id

Abstrak

Pektinase adalah enzim yang banyak dibutuhkan dalam industri pangan khususnya digunakan dalam proses penjernihan jus buah. Kelemahan penggunaan enzim secara bebas adalah hanya dapat digunakan untuk sekali proses, sehingga perlu diamobilisasi agar dapat digunakan berulang dan produknya mudah untuk dipisahkan. Pektinase diisolasi dari *Aspergillus niger* kemudian dimurnikan dengan menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 0-40%, 40-80% dan 80-100%. Pektinase diamobilisasi dengan metode penjebakan menggunakan matriks kitosan-natrium tripolifosfat. Pada penelitian ini ditentukan konsentrasi kitosan optimum, konsentrasi enzim optimum dan efisiensi pemakaian ulang pektinase amobil. Konsentrasi kitosan yang digunakan berkisar antara (1; 1,5; 2; 2,5; 3)% w/v. Kadar protein enzim ditentukan dengan reagen Biuret sedangkan aktivitas enzim ditentukan metode DNS dengan menghitung asam galakturonat yang dihasilkan dari hidrolisis pektin sebagai substrat oleh sejumlah enzim per menit. Kadar protein pektinase bebas diperoleh sebesar 0,51 mg/mL dengan aktivitas spesifik sebesar 155,87 unit. Hasil menunjukkan bahwa konsentrasi kitosan optimum berada pada konsentrasi 2,5% w/v sedangkan aktivitas pektinase tertinggi sebesar 49,6 unit. Efisiensi pektinase amobil menggunakan matriks kitosan-natrium tripolifosfat dapat digunakan sebanyak lima kali pengulangan dengan aktivitas akhir sebesar 54,03%.

Kata kunci: amobilisasi, pektinase, kitosan-natrium tripolifosfat

Abstract

*Pectinase is very potential enzymes in the food industry, especially used in the juice clarification. The weakness of the use of free enzyme is only one used, so it needs to be immobilized so that it can be used over and the product is easy to be separated. Pectinase which have been isolated from *Aspergillus niger* and then purified by using ammonium sulfate at 0-40%, 40-80% dan 80-100% saturation level. Pectinase was immobilized by entrapment method using sodium tripolyphosphate-chitosan matrix. In this study determined the optimum chitosan concentration, enzyme concentration and efficiency optimum reuse of immobilized pectinase. Chitosan concentration used ranged from (1, 1.5, 2, 2.5, 3)% w/v. Enzyme protein content was determined by Biuret reagent while enzyme activity was determined with DNS method by calculating the galacturonic acid generated from the hydrolysis of pectin as a substrate by a number of enzyme per minute. The protein content of free pectinase obtained by 0.51 mg / mL with a specific activity of 155.87 units. The results showed that the optimum concentration of chitosan was at a concentration of 2.5% w/v, while the highest aktivitas pektinase at 49, 6 units. The efficiency of pectinase immobilized using chitosan-sodium tripolyphosphate matrix can be used as many as five repetitions with a final activity of 54.03%.*

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Pektin merupakan komponen yang menyebabkan suatu produk seperti jus, atau sari buah memiliki kekentalan yang

tinggi. Adanya pektin seringkali menyebabkan pengolahan pangan menjadi lebih sulit, karenanya seringkali komponen ini perlu dikurangi atau bahkan dihilangkan. Cara yang telah berkembang adalah

menggunakan degradasi yang dikatalisis pektinase (Jayani *et al.*, 2005). Pektinase adalah enzim yang mendegradasi senyawa pektat melalui reaksi depolimerase dan deesterifikasi menghasilkan senyawa galaktouronat (Pedrolli, *et al.*, 2009). Penggunaan enzim pektinase dalam industri sari buah dapat meningkatkan persen hasil, liquifaksi dan dapat mempermudah penjernihan dan penyaringan.

Enzim pektinase dapat dihasilkan dari berbagai jenis mikroorganisme seperti jamur, kapang dan bakteri. Aktivitas pektinase serta karakter enzim yang dihasilkan dipengaruhi oleh sumber mikroba dan kondisi lingkungan saat diproduksi. Pektinase dari *Aspergillus niger* mempunyai aktivitas maksimum pada pH 4, dan temperatur 50°C, untuk strain lain pada pH 4,5 dan suhu 35°C (Joshi, *et al.*, 2011). Enzim pektinase yang dihasilkan dari *Aspergillus niger* dapat menurunkan viskositas pure wortel dari 90 poise menjadi 65 poise (Demir *et al.*, 2011).

Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh mobilitasnya, jika digunakan enzim bebas aktivitasnya lebih tinggi dibandingkan enzim amobil, namun penggunaan enzim amobil akan menguntungkan karena pemisahan enzim dari produk akan lebih mudah sehingga dapat digunakan berulang (Demir *et al.*, 2001).

Beberapa metoda amobilisasi yang dapat digunakan adalah amobilisasi melalui pembentukan ikatan kovalen, adsorpsi, penjebakan dan pembentukan ikatan silang. Masing-masing metoda mempunyai kekhasan, adanya ikatan kovalen akan menyebabkan ikatan yang kuat antara lipase dan matriks sehingga dapat dipakai ulang lebih banyak dibandingkan amobilisasi secara adsorpsi atau penjebakan. Cara lain adalah dengan adsorpsi, merupakan teknik yang sederhana dan umumnya tidak

mengubah aktivitas dari enzim yang teramobilkan. Amobilisasi enzim dengan adsorpsi dapat melalui gaya elektrostatis, ikatan hidrogen atau gaya Van der Waals. Keseimbangan dinamik antara enzim dan matriks umumnya dipengaruhi oleh pH dan kuat ion pada media reaksi. Sifat pengikatan yang reversibel sering digunakan untuk recovery matriks secara murah. Berbagai matriks yang banyak dipakai untuk amobilisasi enzim antara lain material anorganik seperti silikagel, zeolit, bentonit dan aluminosilikat. Sedangkan pemanfaatan matriks organik antara lain beberapa jenis polimer yaitu polietilen, PE, polipropilen, PP dan OPP (Roosdiana *dkk.*, 2007) serta resin penukar ion (Demir *et al.*, 2001). Suatu potensi lain adalah dengan menggunakan karagenan yang dapat diperoleh dari alam.

Kitosan dapat digunakan sebagai matriks karena mempunyai dua gugus aktif, yaitu gugus amino (-NH₂) dan hidroksil (-OH). Sebagai matriks pendukung pada proses amobilisasi enzim, kitosan mempunyai beberapa keuntungan karena mudah didapat, prosedur isolasinya mudah, tidak beracun dan tidak membahayakan. Kitosan mempunyai beberapa sifat yang menguntungkan antara lain *hydrophilicity*, *biocompatibility*, *biodegradability*, sifat anti bakteri dan mempunyai afinitas yang besar terhadap enzim. Kitosan sebagai media amobilisasi enzim dapat diubah strukturnya oleh adanya senyawa pengikat silang. Salah satu agen pengikat silang adalah natrium tripolifosfat. Dengan penambahan natrium tripolifosfat, ukuran pori dan porositas kitosan dapat berubah, sehingga akan mempengaruhi jumlah enzim yang tertahan pada matriks.

Pada penelitian ini dipelajari lebih lanjut mengenai pengaruh konsentrasi

kitosan terhadap amobilisasi pektinase dari *Aspergillus niger* dan ditentukan konsentrasi kitosan optimum, dan efisiensi pemakaian ulang pektinase amobil.

Rumusan Masalah:

1. Berapakah konsentrasi kitosan optimum pada amobilisasi pektinase menggunakan matrik natrium tripolifosfat- kitosan?
2. Bagaimana efisiensi penggunaan pektinase sistem amobil?

Tujuan dan Manfaat Penelitian

Tujuan

1. Mengamobilisasi yang enzim pektinase hasil isolasi dari *Aspergillus niger* dengan Kitosan Tripolifosfat
2. Uji keberulangan dan kestabilan enzim pektinase dari *Aspergillus niger*

Manfaat:

Hasil dari penelitian diharapkan untuk mengetahui potensi pektinase dari *Aspergillus niger* amobil untuk menunjang industri pangan khususnya penjernihan buah.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan adalah *Aspergillus niger* yang diperoleh dari Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya. Bahan kimia yang digunakan dengan kualitas *for microbiology* antara lain *bacto* agar, pektin, pepton (Oxoid), kasein, dan *yeast extract* (Difco). Bahan kimia lain yang digunakan memiliki kualitas pro analisis antara lain Na_2HPO_4 , asam sitrat, KH_2PO_4 , CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, BaCl_2 , glukosa, asam dinitrosalisilat, NaOH , kristalin fenol, natrium sulfit, $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, natrium tripolifosfat, HCl (37% w/w; $\text{bj}=1,19 \text{ g/cm}^3$) dan asam asetat

glasial ($\text{bj}=1,05 \text{ g/cm}^3$) yang bermerk Merck dan kitosan.

Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas, neraca analitik (Mettler Toledo AL 204), inkubator (Heraeus Type B 5042), jarum ose, *magnetic stirrer*, pH meter (Inolab WTW), penangas air (Mettmert W 200), oven, kapas steril, autoklav (Tipe LS-C35L), *shaker* (Edmund Buhler SM 25 24B), *sentrifuse* dingin (Denley), *Spectronic-20* (Bausch & Lomb), Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 1601 *double beam*), *refrigerator*, kantong selofan, aluminium foil, kertas saring *Whatman* No. 40, *syringe*.

Tahapan Penelitian

1. Produksi dan Isolasi ekstrak kasar pektinase
2. Pemurnian ekstrak kasar pektinase
3. Amobilisasi pektinase dengan kitosan- natrium tripolifosfat
4. Uji aktivitas pektinase amobil
5. Penentuan efisiensi pemakaian enzim amobil

Prosedur Kerja Penelitian

Pembuatan media padat

Media pertumbuhan bakteri yang digunakan adalah media padat agar miring untuk peremajaan kultur murni *Aspergillus niger*. Media ini terdiri dari 0,25 gram pepton, 0,02 gram KH_2PO_4 , 0,03 gram CaCl_2 , 0,14 gram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan 0,03 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 gram *yeast extract* dan 0,5 gram pektin, kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia, setelah itu diatur pada pH 7 dengan ditambahkan larutan buffer sitrat fosfat pH 7 sebanyak 5 mL, setelah itu ditambahkan 1,5 gram *bacto* agar. Larutan dibuat sebanyak 100 mL. Campuran diaduk dan dipanaskan

hingga mendidih lalu dipipet 4 mL ke dalam tabung reaksi, kemudian ditutup kapas dan disterilkan dalam autoklaf pada 121°C, tekanan 15 psi selama 20 menit. Tabung kemudian diangkat dari autoklaf dan diletakkan pada posisi miring.

Pembuatan media cair

Media pertumbuhan *Aspergillus niger* untuk menghasilkan enzim pektinase dibuat dengan menimbang 1,25 gram pepton, 0,1 gram KH₂PO₄, 0,15 gram CaCl₂, 0,7 gram (NH₄)₂SO₄ dan 0,15 gram MgSO₄.7H₂O, 0,5 mL yeast dan 2,5 gram substrat pektin, kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia, setelah itu diatur pada pH 7,0 dengan menambahkan larutan buffer sitrat fosfat pH 7 sebanyak 25 mL. Larutan dibuat sebanyak 500 mL. Campuran diaduk dan dipanaskan hingga mendidih. Lalu dipipet 100 mL ke dalam Erlenmeyer 250 mL kemudian ditutup kapas dan disterilkan dalam autoklav pada suhu 121°C, tekanan 15 psi, selama 20 menit, selanjutnya disimpan dalam kulkas.

Produksi dan isolasi ekstrak kasar pektinase

Inokulum sebanyak 10 mL diinokulasikan ke dalam 250 mL media pertumbuhan kemudian diinkubasi dengan shaker dengan kecepatan putar 125 rpm pada suhu kamar sampai awal fase stasioner (24 jam). pH media pertumbuhan selanjutnya diatur dengan menambahkan buffer sitrat fosfat pH 7 sebanyak 12,5 mL. Media pertumbuhan selanjutnya disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan putar 3000 rpm selama 20 menit. Supernatan merupakan ekstrak kasar pektinase kemudian diukur volumenya dan disimpan dalam refrigerator.

Pemurnian ekstrak kasar pektinase

Ekstrak kasar pektinase dimurnikan menggunakan ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 0-40%, 40-80% dan 80-

100%. Terlebih dahulu dibuat fraksi 0-40% yaitu sebanyak 8,55 gram (NH₄)₂SO₄ dicampurkan dalam 75 mL larutan ekstrak kasar pektinase lalu diaduk hingga (NH₄)₂SO₄ larut sempurna. Larutan disentrifugasi pada 3000 rpm, suhu 4°C selama 30 menit. Supernatan ditambahkan 19,65 gram (NH₄)₂SO₄ lalu disentrifugasi menghasilkan fraksi 40-80%.

Endapan yang terbentuk dilakukan dialisis yaitu dengan menambahkan 10 mL buffer sitrat fosfat 0,2 M pH 7 dan dimasukkan dalam kantong selofan. Kemudian direndam dalam 100 mL buffer sitrat fosfat 0,07 M pH 7 dalam gelas kimia 250 mL sambil diaduk menggunakan stirer pada suhu rendah 4°C. Dialisis dilakukan selama tiga jam. Kemudian larutan buffer perendam diganti dengan buffer perendam yang baru sampai semua garam terpisah. Untuk mengetahui bahwa dialisis sudah selesai, diuji dengan 5 mL buffer perendam diambil dan dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah 1 mL larutan HCL 0,1 M dan ditambah 5 tetes larutan BaCl₂ 0,1 M. Apabila tidak ada endapan, dialisis dihentikan. Larutan enzim yang diperoleh untuk selanjutnya dilakukan uji kadar protein awal dan aktivitas bebasnya.

Preparasi matriks kitosan

Sebanyak (0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5) g bubuk kitosan ditimbang dan dilarutkan di dalam 50 mL larutan asam asetat 3% (w/v), kemudian diaduk dengan pengaduk magnetik hingga homogen (berbentuk larutan) pada suhu kamar.

Amobilisasi pektinase dengan kitosan-natrium tripolifosfat

Penentuan konsentrasi kitosan optimum

Amobilisasi enzim dilakukan dengan cara mencampurkan 1 ml larutan enzim hasil pemurnian pada berbagai perlakuan kitosan (1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0)% sebanyak

4 mL. Larutan campuran masing-masing dimasukkan ke dalam *syringe* dan ditekan sehingga campuran menetes ke dalam wadah berisi 10 mL larutan natrium tripolifosfat 3%. Manik-manik yang terbentuk dibiarkan terendam dalam larutan natrium tripolifosfat 3% selama 75 menit. Enzim amobil dengan larutan dipisahkan melalui penyaringan. Filtrat yang didapat diuji kadar protein sisanya dan pektinase amobil yang didapat diuji aktivitasnya.

Uji aktivitas pektinase amobil

Penentuan aktivitas pektinase amobil dilakukan dengan cara mengukur jumlah senyawa pereduksi yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis substrat pektin. Larutan uji terdiri dari 1 mL substrat pektin 1%, 1 mL buffer sitrat fosfat pH 7, dan 0,5 gram enzim amobil serta 1 mL akuades. Campuran ini diinkubasi pada 35°C selama 50 menit. Kemudian ditambahkan 2 ml reagen DNS yang selanjutnya dipanaskan selama 15 menit lalu didinginkan hingga suhu kamar. Larutan diencerkan pada labu takar 25 mL. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 540 nm. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi yang diperoleh, pada persamaan kurva standar sehingga dapat diketahui beberapa konsentrasi gula pereduksi yang diperoleh dari hasil hidrolisis pektin yang dikatalisis enzim pektinase. Satu unit aktivitas enzim amobil (U) diartikan sebagai 1 µg asam galakturonat yang dihasilkan per menitnya tiap g enzim.

Penentuan Pemakaian Efisiensi enzim amobil

Efisiensi pemakaian ulang pektinase amobil, dilakukan pada pH 7, suhu 35°C dan lama waktu inkubasi 50 menit. Pektinase amobil dimasukkan ke dalam

larutan uji pertama kemudian dipisahkan dengan cara disaring dan langsung dimasukkan ke dalam larutan uji yang baru untuk diproses berikutnya dengan kondisi yang sama. Filtrat yang diperoleh ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan air mendidih selama 15 menit. Larutan didinginkan pada suhu kamar kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Perlakuan ini diulangi sebanyak lima kali dan dihitung aktivitas enzim pada setiap pengulangan.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Pemurnian Pektinase Hasil Isolasi dari *Aspergillus niger*

Sebelum diamobilisasi enzim pektinase perlu dilakukan pemurnian. Pemurnian dilakukan dengan metoda pengendapan bertingkat menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 0-40%, 40-80% dan 40-80%. Tingkat kemurnian enzim dapat ditentukan berdasarkan nilai aktivitas spesifik, karena semakin tinggi aktivitas spesifik maka enzim semakin murni

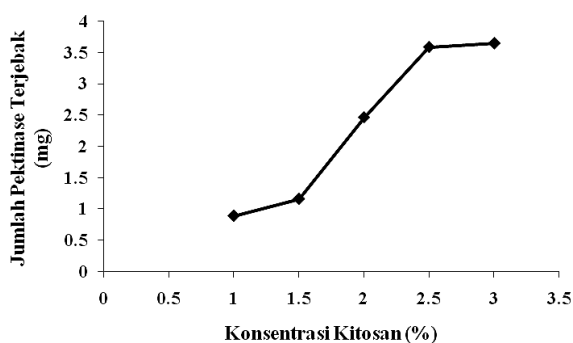
Tabel 1. Aktivitas Spesifik Pektinase Hasil Isolasi Dari *Aspergillus Niger* yang Dimurnikan Pada Berbagai Fraksi Kejenuhan Ammonium Sulfat

Fraksi	Aktivitas enzim ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\text{menit}^{-1}$)	Kadar protein (mg mL^{-1})	Aktivitas spesifik (U mg^{-1})
Ekstrak kasar	70,53	0,64	111,07
0-40%	74,16	0,53	141,25
40-80%	79,80	0,51	155,87
80-100%	77,05	0,50	154,10

Pada fraksi 40-80% didapatkan aktifitas spesifik pektinase yang tertinggi.

Penentuan Konsentrasi Kitosan Optimum Amobilisasi Pektinase

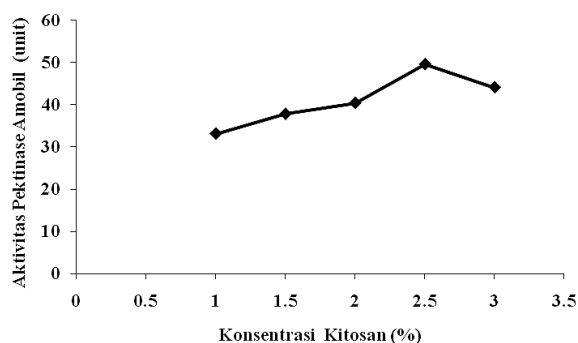
Pada penelitian ini, pektinase diamobilkan pada berbagai konsentrasi kitosan. Pektinase yang diamobilkan akan terjebak dalam kitosan yang berikatan silang dengan natrium tripolifosfat. Kitosan yang dilarutkan dalam asam asetat akan mengalami protonasi pada gugus aminanya menjadi $-NH_3^+$. Peningkatan konsentrasi kitosan yang digunakan untuk amobilisasi pektinase akan meningkatkan jumlah pektinase terjebak. Pada konsentrasi kitosan 3%, jumlah pektinase yang terjebak paling banyak yaitu sebesar 3,652 mg/mL. Semakin besar konsentrasi kitosan maka ikatan silang yang terbentuk juga semakin banyak, akibatnya pori yang dihasilkan juga semakin rapat. Kerapatan pori ini akan mencegah pektinase yang terjebak untuk lepas kembali selama proses amobilisasi, selain itu kerapatan pori mempengaruhi kemampuan sisi aktif pektinase untuk bergerak bebas dan berikatan dengan substrat.



Gambar 1. Grafik Hubungan Antara Konsentrasi Kitosan Terhadap Jumlah Pektinase Terjebak

Peningkatan jumlah pektinase terjebak ini tidak diiringi dengan peningkatan nilai aktivitas pektinase amobil. Nilai aktivitas pektinase amobil semakin meningkat sampai pada konsentrasi kitosan 2,5%, sedangkan pada konsentrasi kitosan 3%, nilai aktivitas

mengalami penurunan. Adanya variasi konsentrasi kitosan berpengaruh terhadap aktivitas pektinase amobil. Penurunan aktivitas ini disebabkan pada konsentrasi kitosan 3%, pektinase yang terjebak berada pada kondisi yang paling banyak. Semakin banyak pektinase terjebak, akan menyebabkan sisi aktif dari pektinase tidak dapat bergerak secara bebas dan membuat substrat susah untuk berikatan dengan sisi aktif dari pektinase.



Gambar 2. Grafik Hubungan Antara Konsentrasi Kitosan Terhadap Aktivitas Pektinase Amobil

Konsentrasi kitosan optimum berada pada saat aktivitas pektinase amobil yang dihasilkan maksimum. Pada variasi konsentrasi matriks kitosan, kondisi optimum berada pada konsentrasi kitosan 2,5% w/v dengan nilai aktivitas sebesar 49,6 unit.

Penentuan Efisiensi Pemakaian Ulang Pektinase Amobil

Suatu enzim amobil mempunyai kelebihan dapat digunakan berulang kali, namun pemakaian berulang enzim dapat menurunkan nilai aktivitasnya. Pada penelitian ini, pektinase amobil dilakukan pemakaian berulang sebanyak lima kali. Hasil pemakaian berulang pektinase amobil terhadap nilai aktivitasnya dapat dilihat pada Tabel berikut:

Tabel 2. Efisiensi Pemakaian Ulang Pektinase Amobil

Pemakaian Ke-	Aktivitas Pektinase (unit)	Efisiensi (%)
1	49,6	100
2	44,6	89,91
3	38,2	77,02
4	34,4	69,35
5	26,8	54,03

Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa pektinase amobil yang digunakan berulang sebanyak lima kali mengalami penurunan nilai aktivitas. Penurunan aktivitas pektinase amobil ini dimungkinkan karena rusaknya pori yang terbentuk akibat pemakaian berulang-ulang. Rusaknya pori ini menyebabkan pektinase yang awalnya terjebak dapat terlepas. Selain itu, apabila pektinase yang terlepas ini terjadi pada saat pemanasan suhu 100°C, sangat dimungkinkan pektinase mengalami denaturasi akibat adanya pemanasan. Akibatnya jumlah pektinase yang masih ada semakin sedikit untuk berikatan dengan substrat. Enzim amobil dikatakan masih baik digunakan jika efisiensinya masih di atas 50%.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian yang telah dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Aktivitas amobilisasi pektinase dalam matriks kitosan- Natirum Tripolifosfat sebesar 49,6 Unit
2. Efisiensi pemakaian ulang pektinase pada sitem amobil dengan matriks kitosan-natrium tripolifosfat dapat dilakukan sampai lima kali pengulangan dengan aktifitas terakhir 54,03%

Saran

Pada penelitian selanjutnya, sebaiknya dilakukan penelitian tentang konsentrasi pektinase dan natrium

tripolifosfat optimum untuk mendapatkan kondisi optimum amobilisasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Demir, N., Jale, A., Kemal, S. and Mehmet, M., 2001, The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment, *Journal of Food Engineering* Vol 47, pp. 275–280.
- Jayani, Ranveer Singh, Shivalika Saxena, Reena Gupta , 2005, Microbial pectinolytic enzymes: A review, *Process Biochemistry* 40 (2005) 2931–2944.
- Joshi V.K., Mukesh, P. and Neerja, R., 2011, Purification and characterization of pectinase produced from apple pomace and evaluation of its efficacy in fruit juice extraction and clarification, *Indian Journal of Natural Products and Resources*. Vol 2(2), pp. 189-197.
- Manuel Pinelo, Birgitte Zeuner and Anne S. Meyer, 2010, Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity, *Food and Bioproducts Processing* Vol 88, pp. 259–265.
- McLellan M. R., R. W. Kime, and L. R. Lind, 1985, Apple Juice Clarification with The Use of Honey and Pectinase, *Journal of Food Science* vol 50, pp. 206-208.
- Mutlu, M., Kemal S., Nilay D., Meral T. E. and Jale, A., 1999, The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity, *Journal of Food Engineering* Vol 41, pp. 147–150.
- Pedrolli, B.P., Monteiro, AC., Gomes, E., dan Carmona, EC., 2009, Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial

- Application of Microbial Pecnolytic Enzymes, *The Open Biotechnologi Journal*. Vol.3, p2.
- Roosdiana, A., A. Srihardyastuti, S. Prasetyawan dan C. Mahdi, 2009, Isolasi mikroba potensial dari susu sapi Blitar untuk keperluan pembuatan keju, Laporan Penelitian, Universitas Brawijaya.
- Sarioglu, K., Nilay, D., Jale, A. dan Mehmet, M.,2001, The use of commercial pectinase in the fruit juice industry, part 2: Determination of the kinetic behaviour of immobilized commercial pectinase, *Journal of Food Engineering* Vol 47, pp. 271–274.