

**SCREENING DAN KARAKTERISASI POLIGALAKTURONASE  
SEBAGAI ENZIM POTENSIAL DALAM KLARIFIKASI SARI BUAH  
JERUK KEPROK GARUT (*Citrus nobilis* var. *chrysocarpa*)**

**SKRIPSI**

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan guna memperoleh derajat  
Sarjana Teknologi Pertanian di Fakultas Pertanian  
Universitas Sebelas Maret**



**Oleh :**

**KHESIA KALISTYATIKA**

**H 0910040**

**PROGRAM STUDI ILMU DAN TEKNOLOGI PANGAN  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS SEBELAS MARET  
SURAKARTA**

**2014**

**SCREENING DAN KARAKTERISASI  
POLIGALAKTURONASE SEBAGAI ENZIM POTENSIAL  
DALAM KLARIFIKASI SARI BUAH  
JERUK KEPROK GARUT (*Citrus nobilis* var. *chrysocarpa*)**

Yang dipersiapkan dan disusun oleh  
**Khesia Kalistiyatika**  
H 0910040

Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji  
Pada tanggal :22 September 2014  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

**Susunan Dewan Penguji**

**Ketua**

**Penguji II**

**Penguji III**

  
**Esti Widowati, S.Si, M.P.**  
NIP. 19830505 200912 2 006

  
**Rohula Utami, S.TP, M.P.**  
NIP. 19810306 200801 2 008

  
**Ir. M.A.M Andriani, M.S.**  
NIP. 19500525 198609 2 001

Surakarta, 23 September 2014

Mengetahui,  
Universitas Sebelas Maret  
Fakultas Pertanian  
Dekan,



**Prof. Dr. Ir. Bambang Pujiasmanto, M.S.**  
NIP. 195602251986011001

## KATA PENGANTAR

Puji syukur senantiasa kami panjatkan kepada Tuhan Yang maha Esa, karena kasih karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Screening dan Karakterisasi Poligalakturonase sebagai Enzim Potensial dalam Klarifikasi Sari Buah Jeruk Keprok Garut (*Citrus nobilis* var. *chrysocarpa*)”**.

Penulisan skripsi ini merupakan salah satu syarat yang harus dipenuhi mahasiswa untuk mencapai gelar Sarjana Stratum Satu (S-1) pada program studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Dengan terselesaikannya penulisan skripsi ini maka dengan segala kerendahan hati penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Bambang Pujiasmanto, MS selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret.
2. Ir. Bambang Sigit A, MS. selaku Ketua Program Studi S1 Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret atas dukungannya.
3. Ibu Esti Widowati, S.Si., M.Si. selaku Pembimbing Utama atas bimbingannya baik dalam menyelesaikan skripsi maupun selaku mentor dalam mendalami ilmu mikrobiologi selama penulis menempuh 4 tahun perkuliahan.
4. Ibu Rohula Utami, S.TP., M.P. selaku Pembimbing Pendamping sekaligus mentor dalam mendalami ilmu mikrobiologi selama penulis menempuh 4 tahun perkuliahan.
5. Bapak Sih Kadarnoto, S.H. dan Ibu Dra.Ida Thamarlina selaku orang tua saya tercinta yang telah memberikan doa, dan dukungan tak putus-putusnya kepada saya.
6. Bu Sri Liswardani, SP., Pak Slamet, Mbak Dinda, Pak Giyo, dan Pak Jokoselaku laboran dan staf administrasi jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan UNSatas bantuannya kepada penulis selama menempuh kuliah, serta Pak Dar Laboran Biologi Tanah Agroteknologi yang senantiasa memandu penulis selama penelitian.



7. Kawan-kawan ITP 2010 : Olin, Tika, Nita, Dena, Betha, Aris, Rahma, Adi Wisnu, R. Adi, Adika, Wahyu, Desin, Wahib, Restu, Titiek, Baskoro, Angga, Azizah, Aini, Ratri, Tyas, Ratih Dwi, Ratih N, Iim, Dewi, Haje, Bram, Restio, Sandy, Gilang, Cristy, Icha, Mita, Ida, Hajar, Candra, Wulan, Eky, Rini, Flora, Nisa, Arifah, Aulia, Marcel, Rila, Vero, Rina, Tiwi, Lukman, Ina, Sarah, Bawani, Eva, Asti, Iqbal, Maman, Devi, Intan, Ambar, Ayun, Fini, Nadia, Nisa H, Ruli, Landep, Pandan, Siswandi, dan Apin, bangga berjuang bersama-sama kalian selama empat tahun ini.
8. Genk Malaikat (GM) : Carolina, Nita, Dena, Tika, Nisa, tanpa kalian tak ada suntikan semangat baru buatku.
9. Arifah Rahayu, *patner* skripsi yang sama-sama merasakan suka duka penelitian.
10. Dhimas Sentanu Murti, orang spesial yang senantiasa memberikan doa dan semangat dalam suka maupun duka, dalam masa jaya maupun susah.
11. Para koas mikrobiologi (umum, industri, fermentasi) : mbak Lili, mbak Fenny, mbak Eva, mbak Tutik, Arifah, Christy, Restio, Guruh, Prakoso, Latifa, Aya, Rara, Retha, Gerry, Nurul. Kalian teman belajar mikrobiologi yang menyenangkan.
12. FMK FP, PMK UNS, PMK Surakarta, IAAS UNS, IAAS Indonesia terima kasih buat kesempatannya untuk berkarya dan jadi tempat pengembangan diri.
13. Semua adik-adik tingkat dan kakak tingkat, semua dosen, semua karyawan UNS yang tidak sempat saya sebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa tidak ada di dunia ini yang sempurna kecuali DIA Sang Pencipta alam semesta, oleh karena itu kritik dan saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi penulis pada khususnya dan semua pihak pada umumnya. Amin.

Surakarta, September 2014

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>iii</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>v</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>ix</b>
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>x</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>xi</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
A. Latar Belakang .....	1
B. Perumusan Masalah .....	3
C. Tujuan .....	3
D. Manfaat .....	4
<b>BAB II LANDASAN TEORI .....</b>	<b>5</b>
A. Tinjauan Pustaka .....	5
1. Komoditas Jeruk.....	5
2. Sari Buah .....	7
3. Kulit Jeruk .....	8
4. Pektin .....	8
5. Enzim Pektinase .....	9
6. Enzim Termotabil .....	15
7. Mikroorganisme Penghasil Poligalakturonase.....	16
8. Klarifikasi Sari Buah.....	16
B. Kerangka Berfikir .....	19
C. Hipotesis .....	19
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>20</b>
A. Tempat dan Waktu Penelitian .....	20
B. Alat dan Bahan .....	20

1. Alat .....	20
2. Bahan .....	20
C. Tahapan Penelitian .....	21
1. Penelitian Tahap I Penentuan Isolat Bakteri .....	21
2. Penelitian Tahap II Seleksi Isolat Uji .....	22
3. Penelitian Tahap III Produksi, Ekstraksi, Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Enzim Poligalakturonase .....	25
D. Analisis .....	29
E. Analisis Data .....	30
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>32</b>
A. Penelitian Tahap I- Isolasi dan Karakteristik Bakteri Pektinolitik .....	32
B. Penelitian Tahap II- Penentuan Isolat Uji .....	36
1. Penentuan Kurva Pertumbuhan Isolat dan Aktivitas Enzim Poligalakturonase.....	42
C. Penelitian Tahap III- Produksi, Ekstraksi, Pemurnian, dan Karakterisasi Enzim Poligalakturonase.....	47
1. Produksi Enzim Poligalakturonase .....	47
2. Ekstraksi, Pemurnian dan Konsentrasi Protein Enzim Poligalakturonase .....	47
3. Karakterisasi Enzim Poligalakturonase.....	50
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>63</b>
A. Kesimpulan .....	63
B. Saran .....	64
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>65</b>
<b>LAMPIRAN</b>	



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 2.1</b> Kandungan Vitamin dan Zat Mineral dalam Setiap 100 Gram Buah Jeruk.....	6
<b>Tabel 2.2</b> Klarifikasi Enzim secara Internasional berdasarkan reaksi yang dikatalisis Menurut (Lehninger, 1990) .....	11
<b>Tabel 2.3</b> Klasifikasi Enzim Pektinolitik Menurut Whitaker (1990).....	11
<b>Tabel 3.1</b> Analisis Klarifikasi Sari Buah Jeruk Keprok Garut Menggunakan Enzim Poligalakturonase .....	30
<b>Tabel 4.1</b> Karakterisasi Morfologi Koloni Bakteri Pektinolitik .....	34
<b>Tabel 4.2</b> Karakterisasi Morfologi Sel dan Uji Katalase Isolat Bakteri Pektinolitik .....	35
<b>Tabel 4.3</b> Seleksi Uji Isolat .....	37
<b>Tabel 4.4</b> Jumlah Sel (log sel/ml) dan Aktivitas Enzim Pektinase (U/ml) pada Kurva Pertumbuhan Isolat AR 2, AR 4, KK 4, dan KK 5 .....	44
<b>Tabel 4.5</b> Pemurnian Enzim Isolat AR 2, AR 4, KK 2, dan KK 4 .....	50
<b>Tabel 4.6</b> pH Optimum Enzim Isolat AR 2, AR 4, KK 4, dan KK 5 pada Kondisi Inkubasi Suhu 55 <sup>0</sup> C.....	52
<b>Tabel 4.7</b> Suhu Optimum Enzim Isolat AR 2, AR 4, KK 4, dan KK 5 pada Kondisi Media Pereaksi pH 4,8 .....	54
<b>Tabel 4.8</b> Kestabilan pH Enzim Isolat AR 2, AR 4, KK 4, dan KK 5 pada Suhu Optimum 60 <sup>0</sup> C.....	57
<b>Tabel 4.9</b> Kestabilan Suhu Enzim Isolat AR 2 pada pH 6; AR 4 pada pH 5,5; KK 4 pada pH 6; dan KK 5 pada pH 4,5 .....	59
<b>Tabel 4.10</b> K <sub>M</sub> m dan V <sub>maks</sub> Enzim Isolat AR 2, AR 4, KK 4, dan KK 5 .....	61

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2.1.</b> Jeruk Keprok Garut .....	5
<b>Gambar 2.2.</b> Struktur rantai utama pada pektin metilasi rendah (a) dan tinggi (b) dan wilayah degradasi kerja enzim .....	13
<b>Gambar 2.3.</b> Mekanisme pemotongan rantai galakturonat oleh empat enzim utama pektinase .....	14
<b>Gambar 2.4.</b> Kerangka Berfikir .....	19
<b>Gambar 3.1</b> Diagram Alir Penelitian .....	29
<b>Gambar 4.1</b> Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Enzim Isolat AR 2 .....	45
<b>Gambar 4.2</b> Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Enzim Isolat AR 4 .....	45
<b>Gambar 4.3</b> Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Enzim Isolat KK 4 .....	46
<b>Gambar 4.4</b> Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Enzim Isolat KK 5 .....	46
<b>Gambar 4.5</b> Hubungan pH dengan Aktivitas Enzim Isolat AR 2 (a), AR 4 (b), KK 4 (c), KK 5 (d) .....	52
<b>Gambar 4.6</b> Hubungan Suhu dengan Aktivitas Enzim Isolat AR 2 (a), AR 4 (b), KK 4 (c), KK 5 (d) .....	54
<b>Gambar 4.7</b> Kestabilan pH Enzim Isolat AR 2 (a), AR 4 (b), KK 4 (c), KK 5 (d) pada suhu 60 <sup>0</sup> C .....	57
<b>Gambar 4.8</b> Kestabilan Suhu Enzim Isolat AR 2 pada pH 6 (a); AR 4 pada pH 5,5 (b); KK 4 pada pH 6 (c); KK 5 pada pH 4,5 (d) .....	59



## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1.</b> Media Selektif Bakteri Pektinolitik .....	71
<b>Lampiran 2.</b> Bahan Pewarna dan Reagen Mikrobiologis .....	71
<b>Lampiran 3.</b> Buffer Asetat 0,05M pH 5,2 .....	72
<b>Lampiran 4.</b> Media Produksi Enzim .....	73
<b>Lampiran 5.</b> Media Pereaksi Uji Aktivitas Enzim .....	73
<b>Lampiran 6.</b> Reagen Uji Aktivitas Enzim.....	73
<b>Lampiran 7.</b> Penentuan Kurva Standar Asam D-Galakturonat.....	73
<b>Lampiran 8.</b> Penentuan Kurva Standar <i>Bovine Serum Albumine</i> (BSA) .....	74
<b>Lampiran 9.</b> Penentuan Kurva Standar Isolat .....	75
<b>Lampiran 10.</b> Aktivitas Enzim untuk Kurva Linearitas Lineweaver-Burk antara 1/[S] terhadap 1/V dan Kurva Linearitas Lineweaver-Burk Enzim Isolat AR 2, AR 4, KK 4, dan KK 5.....	77
<b>Lampiran 11.</b> Data Penelitian.....	79
<b>Lampiran 12.</b> Dokumentasi Penelitian.....	95

**SCREENING DAN KARAKTERISASI POLIGALAKTURONASE  
SEBAGAI ENZIM POTENSIAL DALAM KLARIFIKASI SARI BUAH  
JERUK KEPROK GARUT (*Citrus nobilis* var. *chrysocarpa*)**

**Khesia Kalistiyatika  
H0910040**

**RINGKASAN**

Pektin merupakan struktur polisakarida yang ditemukan pada dinding sel utama dan pada lamela tengah buah dan sayuran yang menyebabkan kekeruhan jus dan masalah pada proses filtrasi jus. Pektin merupakan komponen utama polisakarida yang menjadi penyebab utama kekeruhan dan kekentalan jus, komponen lainnya adalah selulosa, hemiselulosa, dan amilosa. Poligalakturonase merupakan solusi untuk mendegradasi pektin dengan mekanisme pemotongan ikatan 4-glikosidik (asam pektat) dan menghasilkan asam galakturonat sebagai produk utama.

Enzim termostabil paling dibutuhkan karena dapat tahan suhu proses klarifikasi jus di industri. Suhu tinggi bertujuan untuk mengurangi potensi kontaminan mesofilik dan untuk mempercepat reaksi pada proses klarifikasi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi bakteri pektinolitik termofilik penghasil enzim poligalakturonase termostabil dari limbah kulit jeruk dan sayuran, mengetahui hasil klarifikasi enzim poligalakturonase, dan mengkarakterisasi enzim poligalakturonase berdasarkan parameter pH optimum, suhu optimum, kestabilan enzim,  $K_M$ , dan  $V_{maks}$ .

Hasil isolasi bakteri pektinolitik di dapat 14 isolat yang kemudian diseleksi lebih lanjut menjadi 4 isolat terpilih berdasarkan aktivitas poligalakturonase tertinggi dan kemampuan klarifikasi jus jeruk keprok Garut. Enzim isolat terpilih yaitu AR 2, AR 4, KK 4, dan KK 5 memiliki kemampuan meningkatkan kecerahan jus, menurunkan viskositas dan menurunkan total padatan terlarut. Empat enzim isolat selanjutnya dimurnikan parsial menggunakan metode presipitasi amonium sulfat dan dialisis. Dari enzim isolat yang telah dimurnikan didapat karakter enzim sebagai berikut enzim isolat AR 2 optimum pada pH 6; AR 4 optimum pada pH 5,5; KK 4 optimum pada pH 6; serta KK 5 optimum pada pH 4,5. Keempat enzim isolat optimum pada suhu 60°C dan stabil pada suhu 50-60°C karakter ini menunjukkan enzim isolat merupakan enzim termostabil. Enzim isolat AR 2 menunjukkan aktivitas aktif stabil pada kisaran pH 4-6; AR 4 menunjukkan bahwa enzim stabil pH 6-7; KK 4 memiliki aktivitas enzim yang stabil pada kisaran pH 4-6; sedangkan enzim KK 5 stabil pada pH 4-5. Enzim isolat AR 2 dan KK 4 mulai inaktif pada pH 11, sedangkan AR 4 dan KK 5 inaktif pada pH 12. Nilai  $K_M$  AR 2, AR 4, KK 4, dan KK 5 secara berturut-turut adalah 0,0959; 0,0974; 0,0966; dan 0,178 mg/ml. Nilai  $V_{maks}$  AR 2, AR 4, KK 4, dan KK 5 secara berturut-turut adalah 0,0203; 0,0202; 0,0185; dan 0,0229 U/ml. Enzim isolat AR 2 merupakan isolat paling ideal untuk diaplikasikan pada klarifikasi jus jeruk keprok Garut karena memiliki nilai  $K_M$  paling rendah.



**SCREENING AND CHARACTERIZATION OF POLYGALACTURONASE  
AS POTENTIAL ENZYME FOR KEPROK GARUT ORANGE  
(*Citrus nobilis* var. *chrysocarpa*) JUICE CLARIFICATION**

**Khesia Kalistyatika  
H0910040**

**SUMMARY**

Pectin is a structural polysaccharide found in primary cell wall and middle lamella of fruits and vegetable that lead turbidity in juice and cause problem in juice filtration process. Pectin is the main compound of polysaccharide which become prime cause of turbidity and viscosity in juice, another compounds are cellulose, hemisellulose and amilose. Polygalacturonases is a solution to degradate pectin, as it catalyses the hydrolytic 4-glycosidic bonds (pectic acid) releasing galacturonic acid as the main product.

Thermostable enzyme is the most needed for it stable in industry clarification process condition. High temperature aimed to reduce mesophilic contaminant potential and to accelerate reaction of clarification process. The aimed of this research were to isolate thermophilic pectinolytic bacteria which produced thermostable polygalacturonase enzyme from orange peel and vegetable waste, to know polygalacturonase's ability in clarifying keprok Garut orange juice, and to characterize polygalacturonase based on pH optimum, temperature optimum, enzyme stability, enzyme kinetics  $K_M$ , and  $V_{maks}$ .

Obtained, 14 isolates that further selected to 4 best isolates based on highest polygalacturonase activity and keprok Garut orange juice clarification ability. Four selected enzyme isolates are AR 2, AR 4, KK 4, and KK 5 had ability to increase juice transmittance, decrease juice viscosity and also reduce total soluble solid. Furthermore 4 selected isolates were partially purified by ammonium sulphate precipitation and dialysis method. From purified enzyme, obtained, known that enzyme character AR 2 optimum at pH 6; AR 4 optimum at pH 5,5; KK 4 optimum at pH 6; and KK 5 optimum at pH 4,5. Four isolates optimum at temperature 60°C thus stable at temperature 50-60°C, this characteristic showed enzyme was thermostable. AR 2 showed active activity stable at pH 4-7; AR 4 showed active activity stable at pH 6-7; KK 4 showed active activity stable at pH 4-6; however KK 5 stable at pH 4-5. Isolate enzyme AR 2 and KK 4 was getting inactive at pH 11, thus AR 4 and KK 5 inactive at pH 12.  $K_M$  value of AR 2, AR 4, KK 4, and KK 5 was 0,0959; 0,0974; 0,0966; and 0,178 mg/ml respectively.  $V_{maks}$  of AR 2, AR 4, KK 4, and KK 5 was 0,0203; 0,0202; 0,0185; and 0,0229 U/ml respectively. Isolate enzyme AR 2 was the most ideal isolate to be applied in keprok Garut orange juice clarification for it had the lowest  $K_M$  value.