

“Akselerasi Hasil Penelitian dan Optimalisasi Tata Ruang Agraria untuk Mewujudkan Pertanian Berkelanjutan”

Pengaruh Rasio Kombinasi Enzim Pektinase, Selulase, dan Amilase pada Klarifikasi Sari buah Jeruk Manis Pacitan (*Citrus sinensis*)

Esti Widowati, Asri Nursiwi, Rohula Utami, Lusua Ardianti1

Program Studi Ilmu Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret

Email: lusiaardianto@gmail.com

Abstrak

Jeruk manis pacitan (*Citrus sinensis*) banyak diproduksi menjadi sari buah karena kandungan airnya yang tinggi dan rasanya yang manis, selain itu jeruk ini memiliki kulit yang tebal sehingga sulit dikupas dan tidak cocok untuk dikonsumsi sebagai buah meja. Namun dalam proses pengolahannya menjadi sari buah, sulitnya proses filtrasi akibat pembentukan gel dan kekeruhan sering terjadi. Hal ini disebabkan karena adanya pati, pektin, dan selulosa dalam sari buah. Klarifikasi dengan kombinasi enzim pektinase, selulase, dan amilase dimaksudkan untuk meningkatkan efisiensi proses dalam menghasilkan sari buah jeruk jernih. Rasio enzim yang tepat diperlukan untuk mendapatkan sari buah dengan kualitas terbaik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pektinase, selulase, dan amilase pada klarifikasi sari buah jeruk manis pacitan pada berbagai rasio berdasarkan total padatan terlarut (TPT), transmitansi, viskositas, parameter pH, dan menentukan rasio terbaik. Rasio enzim pektinase : selulase : amilase 1:1:1; 0,1:1,9:1,0; dan 1:3:2 digunakan. Penelitian ini menggunakan pektinase yang dimurnikan sebagian dari isolat KJ9, selulase dari isolat S6 *Bacillus subtilis* Kakrayal_1, dan amilase dari isolat K8. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rasio kombinasi enzim berpengaruh nyata terhadap parameter. Klarifikasi terbaik diamati pada rasio pektinase : selulase : amilase 1:3:2 yang menghasilkan TPT, transmitansi, viskositas, dan PH sebesar $9,55 \pm 0,084$ °Brix, $2,00 \pm 0,159\%$ T, $1,24 \pm 0,066$ cP, dan $5,82 \pm 0,065$ masing-masing.

Kata kunci: amilase, klarifikasi, pektinase, sari buah jeruk manis pacitan, selulase, rasio

Pendahuluan

Jeruk manis pacitan (*Citrus sinensis*) merupakan salah satu varietas unggulan jeruk lokal yang ada di Indonesia dengan kadar gula yang cukup tinggi yaitu sekitar 8,4-11. □Brix sehingga memiliki rasa yang manis. Karena albedonya yang tebal, buah ini cukup sulit untuk dikupas dan dikonsumsi secara langsung, oleh karena itu buah ini banyak dikonsumsi dalam

bentuk olahan misalnya sari buah (BPTP, 2015). Pengolahan jeruk manis pacitan menjadi sari buah juga didorong oleh kandungan airnya yang tinggi, yaitu sekitar 87,2% (Dirjen Dinas Kesehatan, 2018). Dalam pengolahan menjadi sari buah terdapat beberapa kendala seperti timbulnya kekeruhan, berkabut dan munculnya endapan. Kekeruhan ini terutama disebabkan oleh adanya polisakarida. Degradasi polisakarida secara enzimatis mampu menurunkan daya ikat air sehingga meningkatkan transmitansi sari buah (Kumar, 2015; Robin et al., 2013). Pektin dapat didegradasi menggunakan enzim pektinase (Garcia, 2018). Selain adanya pektinase, penggunaan enzim lain seperti selulase dapat dilakukan untuk meningkatkan efektifitas klarifikasi sari buah. Kombinasi enzim ini bekerja pada komponen pektin dan dinding sel buah yang larut untuk menurunkan viskositas (Ajayi et al., 2017). Kandungan pati juga berkontribusi terhadap munculnya kekeruhan. Enzim amilase dapat ditambahkan ke sari buah untuk menghidrolisis ikatan α -1-4-glikosidik pada pati sehingga dapat terdegradasi (Utami et al., 2016). Kombinasi penggunaan enzim pektinase, selulase, dan amilase mampu memberikan proses klarifikasi yang lebih efektif (Sharma et al., 2014). Namun rasio enzim yang berbeda menunjukkan hasil klarifikasi yang berbeda dalam meningkatkan nilai TPT dan transmitansi, serta menurunkan viskositas dan pH sari buah (Azman et al., 2021). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh rasio kombinasi enzim pektinase, selulase, dan amilase pada proses klarifikasi sari buah jeruk manis pacitan dan menentukan rasio kombinasi terbaik

Metode

Alat

Alat yang digunakan untuk produksi enzim meliputi kantong selofan 12 kDa (Carolina, USA), neraca analitik (Mettler toledo), autoklaf (Selecta, Spanyol), mikroskop binokular (Yazumi, Jepang), coolbox, hot plate, inkubator (Selecta, Spanyol), Laminar Air Flow (Labconco, USA), microcentrifuge (Hettich, Germany), pH meter (Senso Direct type 330) (USA), sentrifuge (Gemmy, Taiwan), shaker incubator (Selecta, Spain), stirrer (IKA Labortechnik, Jepang), dan vortex (Heidolph, Jerman). Peralatan yang digunakan untuk membuat sari buah antara lain alat peras jeruk manual (Ozon Fruit Juice), pisau, wadah sari buah, kain saring, dan beaker glass. Alat analisis yang digunakan adalah timbangan analitik (Mettler Toledo, USA), refraktometer tangan (ATAGO, Jepang), pH meter (Hanna, USA), spektrofotometer (UV-mini-1240 Shimadzu, Jepang), pipet volumetrik (IWAKI, Jepang).

Bahan

Jeruk manis pacitan, isolat bakteri pektinolitik KJ9, isolat bakteri selulolitik *Bacillus subtilis* Krakarya_1 S6, dan isolat bakteri amilolitik KJ9 digunakan dalam penelitian ini. Bahan kimia termasuk bacteriological agar (Difco, USA), CaCl₂ (Merck, Jerman), CMC (Merck, Jerman), FeSO₄.7H₂O (Merck, Jerman), glucose (Merck, Jerman), K₂PHO₄ (Merck, Jerman), KCl (Merck, Jerman), KH₂PO₄ (Merck, Jerman), KNO₃ (Merck, Jerman), meat extract (Merck, Jerman), MgSO₄.7H₂O (Merck, Jerman), Na₂HPO₄ (Merck, Jerman), pectin citrus (Sigma-Aldrich, Singapura), pepton from meat (OXOID, UK), soluble starch (Sigma-Aldrich, Singapura), dan yeast extract (Merck, Jerman) untuk tujuan produksi enzim. Bahan lainnya adalah (NH₄)₂SO₄ (Merck, Jerman), BaCl₂ (Merck, Jerman), CH₃COOH (Merck, Jerman), CH₃COONa (Merck, Jerman), Na₂HPO₄ (Merck, Jerman), dan NaH₂PO₄ (Merck, Jerman).

Metode

Produksi enzim pektinase, selulase, dan amilase

Produksi enzim dimulai dengan menginokulasi 100 mL inokulum KJ9 dalam 900 mL media pektin cair; 100 mL inokulum *Bacillus subtilis* Krakarya_1 S6 dalam 900 mL media CMC cair; dan 100 mL inokulum K8 dalam 900 mL media soluble starch cair. Kemudian isolat pektinolitik KJ9 diinkubasi dalam inkubator shaker dengan kecepatan 144 rpm dan suhu 50°C selama 10 jam, isolat selulolitik *B. subtilis* Krakarya_1 S6 diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 jam, sedangkan isolat amilolitik K8 diinkubasi dalam inkubator shaker dengan kecepatan 144 rpm dan 40°C selama 6 jam. Kemudian media disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm dan suhu 4 °C untuk mendapatkan supernatan yang mengandung enzim kasar (Widowati et al., 2017).

Pemurnian parsial enzim pektinase, selulase, dan amilase

Pemurnian enzim parsial dilakukan melalui proses presipitasi amonium sulfat sesuai dengan tingkat kejenuhan enzim masing-masing. Fraksi kejenuhan amonium sulfat adalah 10-90% untuk pektinase, 40% untuk selulase, dan 70% amilase (Widowati et al., 2014; Widowati et al., 2016; Utami et al., 2016). Selanjutnya pelet yang dihasilkan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Kemudian, dialisis dilakukan dalam kantong membran selofan ukuran 12 kDa (Utami et al., 2016).

Uji aktivitas enzim

Aktivitas pektinase, selulase, dan amilase ditentukan dengan menganalisis kadar gula pereduksi menggunakan metode DNS. Sebanyak 0,1 mL enzim ditambahkan ke dalam 0,9 mL media reagen yang terdiri dari 0,7% pektin jeruk dan 0,025 M buffer natrium asetat pH 4,8 untuk pektinase; 0,1 mL enzim ditambahkan ke dalam 0,9 mL media reagen CMC untuk selulase; sedangkan 0,1 mL ditambahkan ke dalam 0,9 mL media reagen soluble starch untuk amilase (Widowati et al., 2019). Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 50°C untuk pektinase, 37°C untuk selulase, dan 40°C untuk amilase dalam 30 menit. Aktivitas enzim diukur dengan menambahkan 1 mL reagen DNS kemudian dipanaskan pada suhu 90°C selama 10 menit. Larutan didinginkan dan diberi 0,5 mL K-Na-Tartarat 40% lalu divortex. Perlakuan kontrol dan blanko dilakukan secara bersamaan dengan metode dan tahapan yang sama dengan sampel, dimana kontrol adalah media reagen yang telah diinkubasi dan ditambahkan mengikuti metode DNS sebelum penambahan enzim dan pemanasan pada suhu 90°C, sedangkan blanko tidak. Kemudian absorbansi sampel yang diperoleh diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm dan nilainya disubstitusi ke dalam persamaan kurva standar. Aktivitas enzim (Unit/mL) diperoleh dari Persamaan 1 di bawah ini.

$$\text{Aktivitas enzim (Unit/mL)} = (1)$$

Catatan:

X = jumlah gula pereduksi dalam sampel

t = waktu inkubasi (menit)

BM = berat molekul glukosa (C₆H₁₂O₆)

(Widowati et al., 2019)

Aktivitas spesifik enzim dihitung dengan terlebih dahulu mengukur kadar protein mengikuti metode Lowry menggunakan BSA sebagai standar.

Tabel 1. Aktivitas enzim pektinase, selulase, dan amilase

Enzim	Aktivitas enzim (U/mL)		
Kasar	Dialisis		Murni parsial
Pektinase	0,0115	0,0081	0,0605
Selulase	0,0036	0,0020	0,0417
Amilase	0,0251	0,0043	0,0608

Analisis aktivitas enzim hanya menggunakan satu sampel untuk setiap enzim. Akibatnya, tidak ada standar deviasi untuk data ini.

Klarifikasi sari buah jeruk manis pacitan

Pektinase, selulase, dan amilase dengan konsentrasi total 10% (v/v) ditambahkan ke dalam sari buah jeruk manis pacitan masing-masing dengan rasio kombinasi enzim pektinase : selulase : amilase sebesar 1:1:1; 0,1:1,9:1,0; dan 1:3:2. Sampel sari buah diinkubasi pada suhu 50°C selama 60 menit dan dianalisis parameter TPT, transmitansi, viskositas, dan pH (Nursiwi et al., 2015).

Karakterisasi sari buah yang diklarifikasi

Sari buah jeruk manis pacitan diuji empat parameternya termasuk total padatan terlarut (TPT) menggunakan hand refractometer (Sharma dan Chand, 2012), transmitansi (%T) menggunakan spektrofotometer pada λ 660 nm (Sharma dan Chand, 2012), viskositas menggunakan pipet volumetrik dan stopwatch (Nursiwi et al., 2015), dan pH menggunakan pH meter (Akesowan dan Choonhahirun, 2013).

Analisis statistik

Data disajikan sebagai mean \pm deviasi. Digunakan tiga kali ulangan sampel dan dua kali ulangan analisis. Oleh karena itu untuk membandingkan perlakuan, analisis varians (ANOVA) digunakan. $P < 0,05$ dianggap signifikan secara statistik, bersama dengan Uji Post-Hoc Duncan yang signifikan dan pada interval kepercayaan 95%. Program SPSS versi 24.0 digunakan untuk analisis statistik.

Hasil dan Pembahasan

Hasil Klarifikasi Sari buah Jeruk Manis Pacitan (*Citrus sinensis*)

Total padatan terlarut (TPT)

Tabel 2 menunjukkan bahwa nilai TPT dari kontrol atau sari buah yang tidak diberi perlakuan enzimatis adalah $9,00 \pm 0,000$ Brix atau yang terendah. Diantara sampel yang diberi perlakuan, sampel K3 memiliki nilai TPT tertinggi yaitu $9,55 \pm 0,084$ Brix, diikuti sampel K2 sebesar $9,42 \pm 0,160$ Brix, dan sampel K1 sebesar $9,17 \pm 0,163$ Brix. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa penambahan kombinasi enzim dengan berbagai rasio mengakibatkan peningkatan total padatan terlarut sari buah. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Widowati et al. (2014) yang menyatakan bahwa penambahan pektinase mampu meningkatkan total padatan terlarut sari buah jeruk. Peningkatan nilai total padatan terlarut disebabkan oleh degradasi jaringan sel oleh enzim selulase yang melepaskan komponen gula ke dalam sistem

sehingga nilai TPT meningkat (Sharma et al., 2014). Berdasarkan Tabel 2, peningkatan total padatan terlarut sari buah tertinggi diperoleh pada penambahan kombinasi enzim dengan rasio pektinase : selulase : amilase 1:3:2, diikuti dengan rasio 0,1:1,9:1,0 dan 1:1:1. Menurut Sari et al. (2012), penggunaan enzim pektin hidrolase dalam klarifikasi sari jeruk pontianak menyebabkan nira memiliki nilai TPT yang lebih tinggi karena depolimerisasi pektin yang meningkatkan jumlah padatan dalam sari jeruk, dalam hal ini gula. Peningkatan jumlah gula sederhana menyebabkan total padatan terlarut juga meningkat. Sharma et al. (2014) menyatakan bahwa enzim selulase mampu meningkatkan total padatan terlarut pada sari buah terkait dengan semakin banyak jaringan buah yang terurai akan dihasilkan senyawa yang lebih kecil seperti gula yang berkontribusi terhadap peningkatan jumlah padatan terlarut. Penggunaan dari enzim amilase menurut Sondhi et al. (2021) diharapkan dapat menurunkan total padatan terlarut melalui degradasi berbagai polisakarida sehingga menurunkan viskositas dan meningkatkan transmitansi sari buah. Nursiwi et al. (2015) menyatakan bahwa sari buah jeruk pontianak dengan penambahan kombinasi enzim pektinase, amilase, dan selulase memiliki nilai TPT tertinggi dibandingkan dengan penggunaan secara terpisah. Peningkatan total padatan terlarut dikaitkan dengan peningkatan transmitansi sari buah buah. Semakin banyak padatan terlarut yang dihasilkan dari hidrolisis pektin, selulosa, dan amilosa, semakin banyak molekul sederhana yang terbentuk sehingga kekeruhan menurun dan transmitansi meningkat. Hidrolisis juga menyebabkan penurunan kapasitas pengikatan air. Air bebas dilepaskan ke dalam sistem sehingga viskositas turun.

Tabel 2. Total padatan terlarut sari buah jeruk manis pacitan

Sampel	TPT (□Brix)
R	9,00±0,000c
K1	9,17±0,163a
K2	9,42±0,160b
K3	9,55±0,084b

Catatan:

R = Kontrol

K1 = Pektinase : Selulase : Amilase
(1:1:1)

K2 = Pektinase : Selulase : Amilase
(0,1:1,9:1,0)

K3 = Pektinase : Selulase : Amilase
(1:3:2)

Transmitansi

Tabel 3 menunjukkan nilai transmitansi sari buah jeruk manis pacitan yang diberi perlakuan berkisar antara $1,49 \pm 0,097$ hingga $2,00 \pm 0,159\%T$, sedangkan nilai transmitansi sampel kontrol atau sampel yang tidak diberi perlakuan adalah $1,01 \pm 0,020\%T$. Diantara sampel yang diberi perlakuan, sampel K3 memiliki nilai transmitansi tertinggi sebesar $2,00 \pm 0,159\%T$, diikuti oleh sampel K2 sebesar $1,66 \pm 0,073\%T$, dan sampel K1 sebesar $1,49 \pm 0,097\%T$. Hal ini menunjukkan bahwa semua sampel yang diberi perlakuan memiliki nilai transmitansi yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa penambahan kombinasi enzim dengan berbagai rasio mengakibatkan peningkatan transmitansi sari buah. Widowati et al. (2021), menyatakan bahwa degradasi enzimatis senyawa polisakarida menurunkan daya ikat air yang dapat meningkatkan transmitansi sari buah. Sari buah buah yang diklarifikasi umumnya menunjukkan nilai transmitansi yang lebih tinggi berdasarkan pemecahan komponen sari buah. Nilai transmitansi ini menunjukkan tingkat kejernihan sari buah. Peningkatan transmitansi sari buah tertinggi diperoleh dengan menambahkan kombinasi enzim dengan rasio pektinase : selulase : amilase 1:3:2, diikuti dengan rasio 0,1:1,9:1,0, dan 1:1:1. Pektinase yang mengkatalisis hidrolisis enzimatis dinding sel buah dapat meningkatkan kejernihan sari buah. Pektinase dengan konsentrasi 4% mampu meningkatkan kejernihan sari buah apel sebesar 42,6% (Maryani et al., 2017). Enzim selulase menghidrolisis komponen selulosa dinding sel sedangkan amilase memecah pati yang merupakan salah satu komponen yang bertanggung jawab atas kekeruhan sari buah menjadi glukosa. Hidrolisis ini kemudian menyebabkan peningkatan nilai transmitansi sari buah (Sharma et al., 2014). Peningkatan transmitansi sari buah dikaitkan dengan peningkatan total padatan terlarut. Semakin banyak padatan terlarut yang dihasilkan dari hidrolisis pektin, selulosa, dan amilosa, semakin banyak molekul sederhana yang terbentuk sehingga kekeruhan menurun dan transmitansi meningkat. Penurunan daya ikat air menyebabkan penurunan viskositas, artinya semakin tinggi transmitansi maka viskositas menurun (Widowati et al., 2021). Molekul yang lebih sederhana terbentuk sehingga kekeruhan menurun dan transmitansi meningkat. Penurunan daya ikat air menyebabkan penurunan viskositas, artinya semakin tinggi transmitansi maka viskositas semakin rendah (Widowati et al., 2021). molekul yang lebih sederhana terbentuk sehingga kekeruhan menurun dan transmitansi meningkat. Penurunan daya ikat air menyebabkan penurunan viskositas, artinya semakin tinggi transmitansi maka viskositas semakin rendah (Widowati et al., 2021).

Tabel 4. Transmittansi sari buah jeruk manis pacitan

Sampel	Transmittansi (%T)
R	1,01±0,020a
K1	1,49±0,097b
K2	1,66±0,073c
K3	2,00±0,159d

Catatan:

R = Kontrol

K1 = Pektinase: Selulase : Amilase

(1:1:1)

K2 = Pektinase : Selulase : Amilase

(0,1:1,9:1,0)

K3 = Pektinase : Selulase : Amilase

(1:3:2)

Viskositas

Tabel 4 menunjukkan bahwa viskositas sari jeruk manis pacitan yang diberi perlakuan berkisar antara 1,24±0,066 hingga 1,35±0,035cP, sedangkan sampel kontrol atau tanpa perlakuan adalah 1,45±0,018 cP. Di antara sampel yang diberi perlakuan, sampel K3 memiliki nilai viskositas terendah yaitu 1,24±0,066cP, diikuti oleh sampel K2 sebesar 1,31±0,007cP, dan sampel K1 sebesar 1,35±0,035cP. Hal ini menunjukkan bahwa semua sampel yang diberi perlakuan memiliki nilai viskositas yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa penambahan kombinasi enzim dengan berbagai rasio mengakibatkan penurunan viskositas sari buah. Nursiwi et al. (2015) menyatakan bahwa penggunaan kombinasi enzim pektinase, selulase, dan amilase pada sari jeruk pontianak menyebabkan penurunan viskositas yang paling efektif. Nilai viskositas sari buah terendah diperoleh dengan penambahan kombinasi enzim dengan rasio pektinase : selulase : amilase 1:3:2, diikuti rasio 0,1:1,9:1,0, dan 1:1:1. Selain kandungan pektin yang menyebabkan tingginya viskositas pada sari buah, komponen selulosa juga memberikan peran penting. Sari buah yang digunakan dalam penelitian ini mengandung 0,888% selulosa. Selulosa merupakan bahan yang dapat dihidrolisis menjadi glukosa dan gula terlarut lainnya dengan bantuan enzim selulase. Selulase mengkatalisis hidrolisis ikatan 1,4-β-d-glikosidik pada rantai selulosa (Soeka et al., 2019). Santana et al. (2020) menyatakan bahwa enzim selulase 2% yang diekstraksi dari *Rhizopus oryzae* mampu menurunkan 51% viskositas sari jeruk dibandingkan

tanpa perlakuan enzimatis. Kandungan pati juga berperan dalam pembentukan viskositas, sehingga mendorong pembentukan gel. Sari buah buah yang digunakan mengandung 0,491% pati. Depektinasi dan pemecahan pati memainkan peran penting dalam sebagian besar proses klarifikasi sari buah buah. Pati dapat didegradasi dengan bantuan amilase. Amilase menghambat kemungkinan pembentukan molekul gabungan antara protein dan pektin sehingga mencegah pembentukan gel. Penggunaan amilase pada sari apel mampu menurunkan viskositas 40% dibandingkan tanpa perlakuan enzimatis (Dey dan Rintu, 2014). Penurunan viskositas sari buah disebabkan oleh berkurangnya daya ikat air akibat pemecahan polisakarida menjadi senyawa yang lebih sederhana akibat hidrolisis enzimatis yang terjadi. Keberhasilan proses hidrolisis ditunjukkan dengan peningkatan total padatan terlarut dan transmitansi.

Tabel 4. Viskositas sari buah jeruk manis pacitan

Sampel	Viskositas (cP)
R	1,45±0,018c
K1	1,35±0,035b
K2	1,31±0,007b
K3	1,24 ± 0,066a

Catatan:

R = Kontrol

K1 = Pektinase: Selulase : Amilase

(1:1:1)

K2 = Pektinase : Selulase : Amilase

(0,1:1,9:1,0)

K3 = Pektinase : Selulase : Amilase

(1:3:2)

Nilai pH

Tabel 5 menunjukkan bahwa nilai pH sari jeruk manis pacitan yang diberi perlakuan berkisar antara 5,82±0,065 sampai 5,87±0,081, sedangkan sampel kontrol atau tidak diberi perlakuan adalah 6,29±0,044. Diantara sampel yang diberi perlakuan, sampel K3 memiliki nilai pH terendah yaitu 5,82±0,065, diikuti oleh sampel K2 sebesar 5,84±0,131, dan sampel K1 sebesar 5,87±0,081. Hal ini menunjukkan bahwa semua sampel yang diberi perlakuan memiliki nilai pH yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa penambahan kombinasi enzim dengan berbagai rasio mengakibatkan penurunan pH sari buah. Widowati et al. (2020), menyatakan bahwa pemecahan pektin menghasilkan asam

galakturonat dan asam karboksilat yang menyebabkan penurunan pH (Widowati et al., 2020). Penambahan kombinasi enzim dengan berbagai rasio mengakibatkan penurunan pH nira. Nilai pH sari buah terendah diperoleh dengan menambahkan kombinasi enzim dengan rasio pektinase : selulase : amilase 1:3:2, diikuti dengan rasio 0,1:1,9:1,0, dan 1:1:1. Pektinase membantu hidrolisis ikatan α -1,4-glikosidik pada pektin menghasilkan asam galakturonat (Anggraini et al., 2013). Penurunan nilai pH disebabkan oleh penurunan total gula dan produksi asam galakturonat (Joshi et al., 2011). Penurunan pH jika dikaitkan dengan nilai TPT, transmitansi, dan viskositas terletak pada keberhasilan proses klarifikasi dimana hidrolisis senyawa polisakarida akan menghasilkan senyawa yang lebih sederhana yang ditunjukkan dengan nilai TPT yang lebih tinggi. Molekul yang lebih sederhana yang terbentuk menyebabkan kekeruhan menurun dan transmitansi meningkat, yang mengurangi daya ikat air sehingga viskositas menurun. Selain itu, hidrolisis pektin menghasilkan asam galakturonat dan asam karboksilat yang menyebabkan penurunan pH (Widowati et al., 2020).

Tabel 5. Nilai pH sari jeruk manis pacitan yang telah diklarifikasi

Sampel	pH
R	6,29±0,044b
K1	5,87±0,081a
K2	5,84±0,131a
K3	5,82±0,065a

Catatan:

R = Kontrol

K1 = Pektinase: Selulase : Amilase

(1:1:1)

K2 = Pektinase : Selulase : Amilase

(0,1:1,9:1,0)

K3 = Pektinase : Selulase : Amilase

(1:3:2)

Tabel 6 menunjukkan bahwa perlakuan kombinasi enzim pektinase : selulase : amilase 1:3:2 terpilih sebagai perlakuan terbaik karena memberikan nilai total padatan terlarut tertinggi untuk klarifikasi sari jeruk manis Pacitan. Sharma et al. (2017), menyatakan bahwa klarifikasi mampu meningkatkan total padatan terlarut sehingga berkontribusi dalam mempermudah proses filtrasi dan meningkatkan rendemen. Oleh karena itu, perlakuan yang dipilih adalah yang memberikan total padatan terlarut tertinggi. Nilai transmitansi menunjukkan tingkat kejernihan sari buah. Zhong et al. (2019) menyatakan bahwa proses klarifikasi mendorong

pemecahan padatan dan cairan sehingga tingkat kejernihan sari buah meningkat. Berdasarkan Tabel 6, rasio perlakuan kombinasi enzim pektinase : selulase : amilase sebesar 1:3 : 2 dipilih sebagai perlakuan terbaik karena memberikan hasil %T tertinggi diantara semua perlakuan. Viskositas merupakan salah satu sifat fisik yang penting dalam karakteristik zat cair. Viskositas bertanggung jawab atas kekeruhan dan menghambat proses filtrasi. Klarifikasi enzimatik berperan penting selain untuk meningkatkan kejernihan sari buah juga menurunkan viskositas (Ucan et al., 2014). Viskositas yang lebih rendah memberikan keuntungan dalam memudahkan proses lebih lanjut, seperti filtrasi. Oleh karena itu, berdasarkan **Tabel 6**, perlakuan rasio kombinasi enzim pektinase : selulase : amilase 1:3:2 dipilih sebagai perlakuan terbaik karena memberikan hasil viskositas yang paling rendah. Enzim pektinase mengkatalisis hidrolisis ikatan glikosidik dalam pektin untuk menghasilkan asam D-galakturonat yang bersifat asam. Selain pelepasan D-galacturonate, perlakuan dengan enzim juga menyebabkan lepasnya gugus karboksil dan menunjukkan penurunan nilai pH nira (Widowati et al., 2014). **Tabel 6** menunjukkan bahwa kombinasi rasio pektinase : selulase : enzim amilase 1:3:2 dipilih karena memberikan pH terendah. Oleh karena itu berdasarkan nilai TPT dan transmitansi tertinggi, serta viskositas dan pH terendah, rasio kombinasi terbaik adalah pektinase : selulase : amilase sebesar 1:3:2. Rasio ini menghasilkan sari buah dengan TPT $9,55\pm 0,084$ Brix, transmitansi $20,00\pm 0,159$ %T, viskositas $1,24\pm 0,066$ cP, dan pH $5,82\pm 0,065$ masing-masing.

Tabel 6. Rasio kombinasi enzim terbaik

Sampel	TPT (□Brix)	Transmitansi (%T)	Viskositas (cP)	nilai pH
R	$9,00\pm 0,000$	$1,01\pm 0,020$	$1,45\pm 0,018$	$6,29\pm 0,044$
K1	$9,17\pm 0,163$	$1,49\pm 0,097$	$1,35\pm 0,035$	$5,87\pm 0,081$
K2	$9,42\pm 0,160$	$1,66\pm 0,073$	$1,31\pm 0,007$	$5,84\pm 0,131$
K3	$9,55\pm 0,084$	$2,00\pm 0,159$	$1,24\pm 0,066$	$5,82\pm 0,065$

Catatan:

R = Kontrol

K1 = Pektinase: Selulase : Amilase
(1:1:1)

K2 = Pektinase : Selulase : Amilase
(0,1:1,9:1,0)

K3 = Pektinase : Selulase : Amilase
(1:3:2)

Kesimpulan dan Saran

Kombinasi rasio enzim pektinase, selulase, dan amilase mempengaruhi klarifikasi sari buah jeruk manis pacitan dengan meningkatkan total padatan terlarut dan transmitansi serta menurunkan viskositas dan pH. Rasio kombinasi terbaik berdasarkan parameter sari buah jeruk manis pacitan adalah kombinasi enzim pektinase: selulase : amilase sebesar 1:3:2.

Daftar Pustaka

- Ajayi, A.A., Eliagwu, E., Anosike, S.O., Onibokun, A.E., Agada, T., Enujeko, S.E., and Eze, K. 2017. Clarification of Different Fruit Juices with Cellulase Obtained from *Aspergillus niger*. Conference paper of 8th ISTEAMS Multidisciplinary Conference, Caleb University, Lagos, Nigeria : January 2017. p. 295–316.
- Akesowan, A. and Choonhahirun. 2013. Effect of Enzyme Treatment on Guava Juice Production Using Response Surface Methodology. *The Journal of Animal and Plant Science* 23(1):114–120.
- Anggraini, Dian P., Anna Roosdiana., Sasangka Prasetyawan., and Diah Mardiana. 2013. Pengaruh Ion-ion Logam terhadap Aktivitas Pektinase dari *Aspergillus niger* pada Penjernihan Sari Buah Jambu. *Natural* 2(1):66–72.
- Dey, Tapati Bhanja., and Rintu Banerjee. 2014. Application of Decolourized and Partially Purified Polygalacturonase and α -amylase in Apple Juice Clarification. *Brazilian Journal of Microbiology* 45(1):97-104.
- Directorate General of Health Service. 2018. Tabel Komposisi Pangan Indonesia Tahun 2017. Directorate General of Health Service Ministry of Health , Jakarta. p. 135.
- Garcia, Carlos A Ivarez. 2018. *Fruit Juices: Application of Enzymes for Fruit Juice Processing*. Elsevier. London.
- IAARD. 2015. *Inovasi Hortikultura Pengungkit Peningkatan Pendapatan Rakyat*. IAARD Press. Jakarta
- Joshi, V. K., Mukesh Parmar., dan Neerja Rana. 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* 2(2):189-197.
- Kumar, S. (2015). Role of Enzymes in Fruit Juice Processing and Its Quality Enhancement. *Advances in Applied Science Research* 6(6):114-124.
- Maryani, Cocok Ana., Fahrurrozi., and Anja Meryandini. 2017. Pectinase Production and Clarification Treatments of Apple (*Malus domestica*). *Annales Bogorienses* 21(2):63–68.

- Nursiwi, Asri., M.A.M. Andriani., Esti Widowati., Rohula Utami., Edwi Mahadjoeno., and Fitria Ratnasari. 2015. Klarifikasi Sari Buah Jeruk Pontianak Menggunakan Kombinasi Enzim Amilase, Pektinase, dan Selulase. Proceeding of Seminar Nasional PATPI, Semarang : 20–21 October 2015 p. 150–161.
- Robin., S.K., Singh, D., and Sharma, H.K. 2013. Optimization of Enzymatic Hydrolysis Conditions for Enhanced Juice Recovery with Optimum Quality from Alu Bukhara (*Prunus domestica* L.) Fruit. *International Journal of Advanced Research in Engineering and Applied Sciences* 2(11):50-67.
- Santana, Mona Liza., Jose Ailton Conceic Bispo., Amanda Reges de Sena., Elisa Teshima., Aila Riany de Brito., Floriatan Santos Costa., Marcelo Franco., and Sandra Aparecida de Assis. 2020. Clarification of Tangerine Juice Using Cellulases from *Pseudomyces* sp. *J Food Sci Technol*.
- Sari, E.K.N., Susilo, B., and Sumarlan, S.H. 2012. Proses Pengawetan Sari Buah Apel (*Mallus sylvestris* Mill) Secara Non-Termal Berbasis Teknologi Oscillating Magneting Field (OMF). *Jurnal Teknologi Pertanian* 13(12):78–87.
- Sharma, Harsh P., Hiral Patel., and Sugandha. 2017. Enzymatic Extraction and Clarification of Juice from Various Fruits – A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
- Sharma, Harsh P., Hiral Patel., dan Sugandha Sharma. 2014. Enzymatic Extraction and Clarification of Juice from Various Fruits - A Review. *Trends in Post Harvest Technology* 2(1):01–14.
- Sharma, P.K., and Chand, D. (2012). *Pseudomonas* sp. Xilanase for Clarification of Mozambi and Orange Fruit Juice. *International Journal of Advancement in Research & Technology* 1(2).
- Soeka, Yati. 2019. Characterization of Cellulase Enzyme Produced by Two Selected Strains of *Streptomyces Macrosporeus* Isolated from Soil in Indonesia. *Makara Journal of Science* 23(2):5-71.
- Sondhi, Sonica., Palki Sahib Kaur., Himansi Sura., Manisha Juglani., and Deepali Sharma. 2021. Amylase Based Clarification of Apple, Orange and Grape Juice. *International Journal of Contemporary Technology and Research* 3(2):187-190.
- Ucan, Filiz., Asiye Akyildiz., and Erdal Alcam. 2014. Effects of Different Enzymes and Concentrations in the Production of Clarified Lemon Juice. *Journal of Food Processing* 2014.
- Utami, Rohula., Esti Widowati., and Accesstia Christy. 2016. Screening and Characterization of Amylase Enzyme in Sweet Orange (*Citrus sinensis*) Juice Clarification. *Nusantara Bioscience* . 8(2):268–272.
- Widowati, E., Sanjaya, A.P., and Syahiidah, A. (2019). Aplikasi Enzim Poligalakturonase dan Enzim Selulase pada Klarifikasi Sari Buah Jambu Biji Merah (*Psidium guajava* L.). In

Seminar Nasional Dies Natalis ke 43 2019 Universitas Sebelas Maret . Surakarta, Indonesia 3(1):182.

- Widowati, E., Utami, R., and Kaistyatika, K. (2017). Screening and Characterization of Polygalacturonase as Potential Enzyme for Keprok Garut Orange (*Citrus nobilis* Var. *Chrysocarpa*) Juice Clarification. *Journal of Physics: Conference Series* 909(1):1-10.
- Widowati, Esti., Adhitya Pitara Sanjaya., Ardhea Mustika Sari., and Shindy Ambarwati. 2021. Effect of Partially Purified Polygalacturonase and Cellulase on Red Guava Juice Clarification at Various Incubation Times and Temperatures. *agriTECH* 41(2):145-151.
- Widowati, Esti., Rohula Utami., Bambang Sigit Amanto., Edwi Mahadjoeno., and Agrizka Armunanta Putri. 2020. Pengaruh Kombinasi Enzim Pektinesterase dan Poligalakturonase terhadap Klarifikasi Sari Buah Apel Varietas Manalagi. *agriTECH* 40(4):290-298.
- Widowati, Esti., Rohula Utami., Edhi Nurhartadi., and Restio Rahadyan Megawiranto Putro. 2016. Screening and Characterization of Cellulase Enzyme in Sweet Orange (*Citrus sinensis*) Juice Clarification. *Proceeding of The 6th Indonesian Biotechnology Conference, Surakarta : 6-7 September 2016* p. 397 – 403.
- Widowati, Esti., Rohula Utami., Edhi Nurhartadi., M. A. M. Andriani., and Ambar Wuri Wigati. 2014. Produksi dan Karakterisasi Enzim Pektinase oleh Bakteri Pektinolitik dalam Klarifikasi Jus Jeruk Manis (*Citrus sinensis*). *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan* 3(1):16–20.
- Widowati, Esti., Rohula Utami., Edhi Nurhartadi., M. A. M. Andriani., and Ririn Hanifah. 2014. Produksi dan Karakterisasi Enzim Pektinase Bakteri Pektinolitik dari Limbah Kulit Jeruk untuk Klarifikasi Jus Lemon (*Citrus limon*). *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian* 7(1):20–25.
- Zhong, Yingxue., Xiaofang Zhang., and Ruiqun Yang. 2019. Clarifying Effect of Different Clarifying Agents on Chaenomeles Juice and Wine. *AIP Conference Proceedings* 28 February 2019.