

Hidrolisis Pektin Pada Jus Buah Bidara (*Ziziphus mauritiana*) Menggunakan Pektinase *Aspergillus niger*

Imada Mella Shavieka, Endry Nugroho Prasetyo

Departemen Biologi, ITS, Surabaya

imadamellas@gmail.com (1), enpracorp@gmail.com (2)

ABSTRAK

Buah bidara (*Ziziphus mauritiana*) adalah buah tropis dan subtropis Asia yang memiliki nilai gizi tinggi, dan lebih unggul secara nutrisi dibandingkan buah apel dan jeruk. Kandungan polisakarida kompleks khususnya pektin dalam jus buah tersebut menyebabkan kekeruhan yang mengganggu tampilan jus buah dan tidak sesuai dengan Standar Nasional Indonesia (SNI). Penggunaan pektinase dikenal dapat mengurangi tingkat kekeruhan dari jus buah yang memiliki konsentrasi pektin tinggi, sehingga dalam penelitian ini akan diaplikasikan pektinase dari jamur *Aspergillus niger* sebagai agen hidrolisis pektin tanpa mengurangi kapasitas antioksidannya. Pengamatan klarifikasi jus buah dilakukan dengan analisis tingkat kekeruhan, kadar gula pereduksi, dan antioksidannya. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas pektinase kasar mulai meningkat sejak jam ke-12 masa inkubasi dan mencapai titik tertinggi pada jam ke-60 dengan aktivitas pektinase sebesar 3,93 U/ml. Klarifikasi jus buah bidara (*Ziziphus mauritiana*) yang ditambahkan pektinase meningkat secara signifikan dari semua variabel yaitu tingkat klarifikasi mencapai $0,2 \pm 0,08\%$, gula pereduksi terindikasi sebesar $1330 \pm 43,3$ mg/mL serta kapasitas antioksidan meningkat tajam dibandingkan kontrol yaitu sebesar $33,75 \pm 3,2$ % inhibisi DPPH.

Kata Kunci : Aspergillus, Hidrolisis, Pektin, Pektinase, *Ziziphus mauritiana*

ABSTRACT

Bidara fruit (*Ziziphus mauritiana*) is a tropical and subtropical fruit that has high nutritional value, and is nutritionally superior to apples and oranges. The complex polysaccharide content, especially pectin, in fruit juice causes turbidity which disrupts the appearance of the fruit juice and does not comply with SNI standards. The use of pectinase is known to reduce the level of turbidity of fruit juices that have high pectin concentrations, so in this research pectinase from the fungus *Aspergillus niger* will be applied as a pectin hydrolysis agent without reducing the antioxidant levels. The results showed that crude pectinase activity began to increase from the 12th hour of the incubation period and reached its highest point at the 60th hour with an activity of 3.93 U/ml. The clarification of bidara fruit juice (*Ziziphus mauritiana*) which added pectinase increased significantly in all variables, namely the level of clarification reached $0.2 \pm 0.08\%$, reducing sugars were indicated at 1330 ± 43.3 mg/mL and the antioxidant capacity increased sharply compared to the control, namely amounted to 33.75 ± 3.2 % DPPH inhibition.

Keywords : Aspergillus, Hydrolysis, Pectin, Pectinase, *Ziziphus mauritiana*

I. PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Buah bidara (*Ziziphus mauritiana*) merupakan anggota famili Rhamnaceae yang dapat ditemukan di daerah tropis dan subtropis Asia termasuk Indonesia, serta mampu bertahan hidup pada iklim sedang hingga ekstrim. Hingga saat ini, buah bidara banyak dimanfaatkan potensinya oleh masyarakat lokal mulai dari jus buah hingga obat-obatan herbal (Ninga et al, 2018). Jus buah bidara berpotensi menjadi produk pangan sehat yang kaya antioksidan sebesar tujuh kali lipat lebih tinggi dibandingkan buah apel dan mengandung 17% polisakarida kompleks salah satunya pektin (Koley et al., 2011). Polimer heteropolisakarida berupa pektin merupakan polisakarida kompleks yang terdapat di lamela tengah dinding sel tumbuhan. Pektin tersusun atas unit makromolekul glikosidik dengan berat molekuler tinggi dengan penyusun utamanya adalah polimer asam D-galakturonat yang terikat dengan α -(1,4)-glikosidik. Asam galakturonat memiliki gugus karboksil yang saling berikatan dengan ion Mg^{2+} atau Ca^{2+} sehingga unit-unit polimer berlekatan satu sama lain. Ikatan tersebut berstruktur amorf sehingga molekul air dapat terjebak diantara ruang-ruang dan menyebabkan pektin tidak larut dalam air. Asam D-galakturonat yang berikatan dengan selulosa dan hemiselulosa akan membentuk molekul besar dan menyebabkan timbulnya koloid pada jus buah bidara dan menyebabkan kekeruhan pada produk akhir (Widowati et al. 2021). Penggunaan katalis asam atau alkali serta reaksi enzimatik merupakan beberapa metode yang dapat digunakan untuk menghidrolisis koloid pektin. Pada prosesnya, penggunaan katalis tersebut tidak spesifik dalam mengurai pektin sehingga efisiensi hidrolisisnya lebih rendah (Ninga et al, 2018). Sedangkan penggunaan reaksi enzimatik yang digunakan dalam hidrolisis pektin berupa pektinase. Pektinase atau pektinolitik merupakan enzim kompleks dengan unit katalitik berbeda termasuk poligalakturonase, pektin esterase, dan pektin lyase untuk mendegradasi polimer pektin menjadi produk akhir yang berbeda. Pektinase secara alami diproduksi oleh berbagai mikroba seperti bakteri, yeast, kapang dan Aktinomisetes. Sebagian besar pektinase yang diaplikasikan dalam industri berasal dari kapang meliputi golongan *Aspergillus niger* yang merupakan jamur dalam kelas Eurotiomycetes yang banyak ditemukan di tanah dengan kondisi yang menguntungkan yaitu kadar air yang tinggi (setidaknya 7%) dan suhu yang tinggi (Kamalambigeswari, et al., 2018). Pada penelitian ini akan dilakukan produksi serta karakterisasi pektinase yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* pada submerged fermentation sebagai agen klarifikasi jus buah bidara

2. Perumusan Masalah

Bagaimana pengaruh hidrolisis pektin oleh pektinase dalam mengklarifikasi jus buah bidara (*Ziziphus mauritiana*) tanpa mengurangi kapasitas antioksidannya?

3. Tujuan Penelitian

Mengetahui pengaruh hidrolisis pektin oleh pektinase terhadap klarifikasi jus buah bidara (*Ziziphus mauritiana*) tanpa mengurangi kapasitas antioksidannya.

4. Manfaat Penelitian

Manfaat dalam penelitian ini adalah menghasilkan katalis pektinase untuk mengklarifikasi jus buah bidara (*Ziziphus mauritiana*) dengan kapasitas antioksidan yang meningkat.

I. METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu

Penelitian ini berlangsung sejak bulan Mei 2024 sampai bulan Desember 2024 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Departemen Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen kuantitatif yaitu aplikasi pektinase oleh *Aspergillus niger* pada Jus Buah bidara (*Ziziphus mauritiana*) dengan variasi volume pektinase. Rancangan percobaan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan satu faktor yakni variasi pektinase (ml).

Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat *Aspergillus niger* koleksi IPB Culture Collection, Potato Dextrose Broth (PDB), Glukosa, Potato Dextrose Agar (PDA), Pektin, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, KCl, $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, yeast extract, Akuades, Congo Red, Spektrofotometer, Kuvet, Kertas Whatmann, Buffer pH 7, Bradford, dan tube 1,5 ml. Peralatan yang digunakan pada penelitian ini yaitu Erlenmeyer 250 ml, cawan Petri, gelas ukur, mikropipet, vortex, laminar air flow (LAF), neraca analitik, pembakar Bunsen, kertas label, rotary shaker, jarum Ose, dan vacuum filter.

Tahapan Penelitian

Konfirmasi Kemampuan Produksi Pektinase

Pengujian potensi produksi pektinase diukur melalui pembentukan zona bening di sekitar koloni. Medium screening yang terdiri dari pektin 5 g/L, yeast extract 1 g/L, dan agar 15 g/L disterilkan dan dituangkan ke cawan Petri hingga memadat. Medium yang telah padat, kemudian diinokulasikan kultur *Aspergillus niger* 1x1 cm dengan metode spot inoculation pada area tengah cawan Petri dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 hari. Setelah inkubasi, cawan Petri ditetesi dengan larutan Congo Red untuk memperjelas area zona bening. Koloni dengan zona bening menandakan bahwa isolat jamur berpotensi sebagai mikroba penghasil pektinase (Sunitha et al. 2013).

Produksi Pektinase Secara Submerged Fermentation

Produksi pektinase dilakukan menggunakan media produksi yang terdiri dari (g/L): pektin, 30,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3,33; K_2HPO_4 , 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,05; KCl, 0,05; dan $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,10 dan pH disesuaikan menjadi 5,5 sebelum sterilisasi (Enshasy et al., 2018). Substrat yang digunakan yakni pektin dan setiap labu diinokulasi dengan 1% inokulum *Aspergillus niger* dimulai dari media aklimatisasi 1 dengan perbandingan substrat glukosa dibanding pektin (%) yaitu 70:30. Kultur diinkubasi pada rotary shaker (150 rpm) dengan suhu 30 °C hingga menyesuaikan hasil produksi dengan tanda biomassa dan aktivitas tertinggi menurut kurva pertumbuhan pada media produksi. Kultur dipanen dengan filtrasi menggunakan Whatman no.5 dan filtrat kemudian dilakukan sentrifugasi (10.000 rpm; 4 °C) selama 20 menit (Almansa et al., 2004).

Pengujian Aktivitas Lakase

Filtrat yang didapatkan kemudian dilakukan sentrifus dan diukur aktivitas menggunakan reagen 3-5 dinitrosalicylic acid (DNS). Tabung reaksi sebanyak 2 buah masing-masing diisi 1 ml substrat pektin 0,1% dengan melarutkan 0,01 gram pektin pada 10 ml akuades. 1 ml ekstrak kasar pektinase dan 1 ml buffer asetat pH 5, kemudian dipanaskan dalam penangas air pada temperatur 50 °C selama 55 menit, selanjutnya pada tabung 2 diisi dengan 1 ml akuades dan diberi perlakuan yang sama seperti sampel. Setelah itu ditambah dengan 2 ml reagen DNS dan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Selanjutnya campuran dimasukkan dalam labu ukur 25 ml dan ditambahkan dengan akuades hingga tanda batas. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 495 nm (Enshasy et al., 2018).

Klarifikasi Jus Buah Bidara (*Ziziphus mauritiana*)

Ekstrak jus buah bidara didapatkan dari buah bidara yang dihaluskan menggunakan food processor yang dicampurkan dengan air demineralisasi perbandingan 35% w/w. Kemudian disaring dan dilakukan pengaplikasian pektinase dengan volume yang berbeda yaitu 0,1; 0,25; dan 0,5 ml.

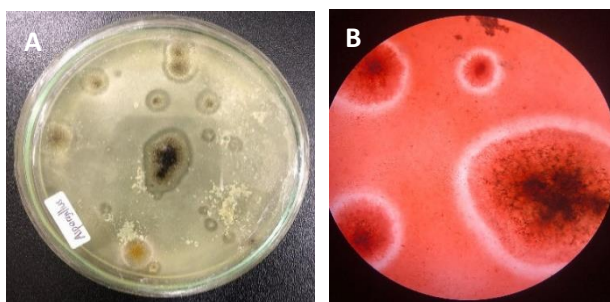
Pada pengukuran kapasitas antioksidan, disiapkan sampel jus buah bidara yang memiliki variasi volume pektinase. Kemudian disiapkan larutan perbandingan, yaitu larutan kontrol yang berisi 1 ml metanol dan 1 ml larutan DPPH 50 ppm. Disiapkan masing-masing 1 ml larutan sampel dan 1 ml larutan DPPH. Kemudian, di inkubasi selama 30 menit pada suhu 27°C hingga terjadi perubahan warna dari aktivitas DPPH. Semua sampel dibuat triplo dan setelah di inkubasi di uji nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer Uv-vis pada panjang gelombang 517 nm (Tristantini et al., 2016)

Tingkat kekeruhan dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer Uv-vis 420 nm dengan membandingkan kekeruhan yang didapatkan pada sampel kontrol dengan setiap sampel dengan variasi volume pektinase yang berbeda. Hasil akan didapatkan dalam bentuk persen (%). Kemudian untuk pengukuran kadar gula pereduksi dilakukan menggunakan reagen DNS. Uji DNS dilakukan dengan cara memasukkan 1 ml sampel ke dalam tabung reaksi berukuran 15 ml kemudian ditambahkan 2 ml reagen DNS. Campuran reaksi dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit. Spektrum serapan sampel uji diukur pada 540 nm dalam spektrofotometer UV-vis (Deshavath et al., 2020)

II. HASIL DAN PEMBAHASAN

Konfirmasi Isolat *Aspergillus niger* Sebagai Penghasil Pektinase.

Kemampuan isolat *Aspergillus niger* IPBCC dalam menghasilkan pektinase dapat diuji secara kualitatif. Adanya aktivitas pektinolitik ditunjukkan terbentuknya zona bening disekitar koloni pada media dengan penambahan pewarna congo red (Gambar 1).

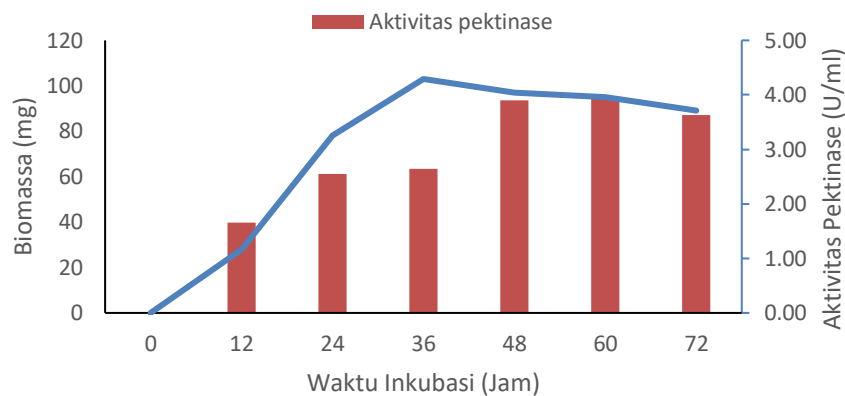


Gambar 1. Kultur *Aspergillus niger* IPBCC pada media spesifik pektin (A) Sebelum Penambahan congo red (B) Setelah Penambahan congo red dengan perbesaran mikroskop 10x

Diameter zona bening menjadi indikator kualitatif kemampuan mikroorganisme dalam memproduksi pektinase. Semakin besar diameter zona bening, semakin tinggi aktivitas enzim yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger*. Zona bening yang terdapat disekitar koloni mengindikasikan bahwa pektin pada media agar telah terhidrolisis pektinase menjadi senyawa yang lebih sederhana berupa asam galakturonat. Proses ini menunjukkan bahwa *Aspergillus niger* memiliki kemampuan adaptif untuk menghasilkan enzim ekstraseluler dalam lingkungan yang mengandung pektin sebagai satu-satunya sumber karbon (Kamalambigeswari, et al., 2018).

Produksi Pektinase *Aspergillus niger*

Pengukuran aktivitas pektinase kasar dilakukan bersamaan dengan pengukuran biomassa yaitu setiap 12 jam selama masa inkubasi. Hasil pengukuran biomassa dan aktivitas pektinase kasar disajikan pada Gambar 2. Pengukuran aktivitas pektinase kasar pada kultur dilakukan selama 72 jam yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas enzim tertinggi selama masa produksi sehingga penentuan waktu panen enzim kasar dilakukan secara tepat (Enshasy et al., 2018).



Gambar 2. Profil Biomassa *Aspergillus niger* dan Aktivitas Pektinase Pada Media Produksi. Berdasarkan Gambar 2. aktivitas pektinase kasar mulai meningkat sejak jam ke-12 sampai mencapai titik tertinggi pada jam ke-60 (3,93 U/ml) ketika biomassa jamur mencapai fase stasioner. Sekresi pektinase sejak awal waktu inkubasi menunjukkan bahwa pektinase merupakan gen terinduksi yang aktif ketika terdapat substrat pektin dan faktor pendukung seperti nutrisi atau kondisi lingkungan tertentu (pH dan suhu yang optimal) sebagai inducer. Selanjutnya produksi pektinase akan meningkat seiring dengan penipisan sumber karbon atau nitrogen mengawali terbentuknya metabolit sekunder (Ramadiyanti et al., 2020). Metabolit sekunder disintesis pada pertengahan hingga akhir fase stasioner pertumbuhan dan tidak terlibat dalam penambahan dan perkembangan sel. Menurut Gerlach et al. (2012), *Aspergillus niger* tidak menghasilkan konsentrasi pektinase yang dapat dideteksi ketika ditumbuhkan di media kaya nutrisi. Hal tersebut dikarenakan dalam kondisi nutrisi yang tercukupi, metabolisme primer lebih utama terjadi untuk pertumbuhan dan perkembangan sel melalui sintesis protein spesifik yang terkait dengan produksi enzim dan metabolit lain untuk penambahan jumlah sel. Namun, ketika kondisi pertumbuhan tercekam dan dibatasi, sel eukariotik mempunyai sistem adaptif yang memungkinkan perubahan metabolismenya. Kondisi media yang terbatas mengubah jalur metabolisme sel dengan mengaktifkan sintesis metabolisme sekunder (Akimova et al, 2024).

Aplikasi Pektinase Untuk Klarifikasi Jus Buah Bidara (*Ziziphus mauritiana*)

Pektinase *Aspergillus niger* kemudian diaplikasikan pada klarifikasi jus buah bidara. Hasil analisis tingkat kekeruhan (%), kadar gula pereduksi (Glukosa-Eq mg/mL) dan kapasitas antioksidan (% inhibisi) pada jus buah bidara disajikan pada Tabel 1.

Tabel 2 Aplikasi Pektinase *Aspergillus niger* Pada Jus Buah Bidara (*Ziziphus mauritiana*) dengan Beberapa Parameter.

Volume Pektinase (ml)	Tingkat Klarifikasi (%)*	Kadar Gula Pereduksi (Glukosa-Eq mg/mL)*	Kapasitas Antioksidan (% Inhibisi)*
0	0 ^c	1330±43,3 ^b	5,07±4,24 ^c
0,1	0,09±0,06 ^{bc}	1503±16,77 ^{ab}	18,58±2,98 ^b
0,25	0,13±0,07 ^{ab}	1745±208 ^a	23,73±5,48 ^{ab}
0,5	0,2±0,08 ^a	1821±122,7 ^a	33,75±3,21 ^a

*Huruf berbeda di dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan signifikan dengan $p < 0,05$

Klarifikasi jus buah ditunjukkan dengan penurunan nilai absorbansi, semakin rendah nilai absorbansi, semakin jernih jus yang dihasilkan. Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa penambahan pektinase pada jus buah bidara secara signifikan ($p < 0,05$) menurunkan rata-rata absorbansi dibandingkan dengan control. Kekeruhan tertinggi terdapat pada kontrol

yaitu tanpa penambahan pektinase, sementara tingkat kekeruhan teramati semakin menurun dengan penambahan pektinase mulai yang terendah yaitu 0,1 ml sampai yang tertinggi 0,5 ml. Penurunan absorbansi ini disebabkan oleh aktivitas pektinase yang memecah pektin dalam jus buah bidara menjadi molekul yang lebih kecil berupa asam galakturonat. Hidrolisis pektin oleh pektinase mengurangi viskositas dan memecah partikel penyebab kekeruhan, sehingga menghasilkan jus buah bidara yang terklarifikasi. Klarifikasi yang meningkat dengan bertambahnya volume enzim menunjukkan jumlah enzim yang lebih besar menghasilkan degradasi pektin yang lebih signifikan (Oladele, et al., 2021). Pada Tabel 1 tercantum bahwa kadar gula pereduksi berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol pada semua penambahan volume pektinase, tetapi penambahan tersebut tidak menunjukkan perbedaan signifikan antara masing-masing kelompok percobaan. Gula pereduksi merupakan hasil hidrolisis dari polimer pektin berupa asam galakturonat, sehingga penambahan pektinase tentunya akan mempercepat terbentuknya gula pereduksi pada waktu inkubasi yang sama. Fenomena ini sesuai dengan pertambahan tingkat kejernihan dari jus bidara pada kelompok percobaan di Tabel 1. Berdasarkan hasil yang diperoleh pada pengujian DPPH, penambahan pektinase pada kelompok percobaan menghasilkan kapasitas antioksidan (% inhibisi) jus buah bidara (*Ziziphus mauritiana*) mengalami peningkatan secara signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol (5,07%) yaitu masing-masing sebesar 18,58%; 23,73%; dan 33,75%. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Shukri (2020) yang menyatakan bahwa kapasitas antioksidan akan ikut meningkat seiring dengan meningkatnya volume pektinase yang ditambahkan. Hasil hidrolisis dari pektinase ini dapat meningkatkan pelepasan senyawa bioaktif, yang secara langsung meningkatkan antioksidan dalam jus buah. Ketika pektin dipecah oleh pektinase, sebagian besar produk pemecahan berupa asam galakturonat dan beberapa senyawa antioksidan lain terlepas menjadi senyawa yang terlarut dalam jus buah sehingga meningkatkan kapasitas antioksidannya.

III. KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa Klarifikasi jus buah bidara (*Ziziphus mauritiana*) yang ditambahkan pektinase dengan aktivitas 3,93 U/ml meningkat secara signifikan dari semua variabel yaitu tingkat klarifikasi hingga 0,2%, kemudian kadar gula pereduksi meningkat hingga 1821 Glukosa-Eq mg/mL dan kapasitas antioksidan mencapai 33,75% pada penambahan 0,5 ml volume pektinase.

DAFTAR PUSTAKA

- Akimova, Dinara, Kakimov, Aitbe, Sychinov, Anuarbek, Urazbayev, Zhumatay & Zharykbasov, Yerlan & Ibragimov, Nadir & Bauyrzhanova, Aigul & Utegenova, Assiya. (2024). Enzymatic hydrolysis in food processing: biotechnological advancements, applications, and future perspectives. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*. 18. 347-365. 10.5219/1962.
- Almansa, E., Kandelbauer, A., Pereira, L., Cavaco-Paulo, A., & Guebits, G. M. (2004). Influence of structure on dye degradation with laccase mediator systems. *Biocatalysis and Biotransformation*, 22(5–6), 315–324. <https://doi.org/10.1080/10242420400024508>
- Deshavath NN, Mukherjee G, Goud VV, Veeranki VD, Sastri CV., (2020). Pitfalls in the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *Int J Biol Macromol*. doi: 10.1016/j.ijbioma.
- Enshasy, H. A., Elsayed, E. A., Suhaimi, N., Malek, R. A., & Esawy, M. (2018). Bioprocess optimization for pectinase production using *Aspergillus niger* in a

- submerged cultivation system. *BMC Biotechnology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0481-7>
- Gerlach, Doreen, Yegin, Sirma, Tari, Canan & Fernandez Lahore, Marcelo. (2012). Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus niger* p. in solid-state fermentation: A comparative study. *Food and Bioproducts Processing*. 90. 102-110. 10.1016/j.fbp.2011.08.003.
- Kamalambigeswari, R., Yadav, S. A., Sivaswamy, N., & Ushani, U. (2018). Isolation, identification, screening and optimization of pectinase producing soil fungi (*Aspergillus niger*). *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 9(3), 762–768. <https://doi.org/10.26452/ijrps.v9i3.1561>
- Koley, T.K., Charanjit, K., Shweta, N., Shweta, W., Seema, J and Sarika., (2011). Antioxidant Activity and phenolic content in genotypes of Indian jujube (*Zyziphus mauritiana Lamk.*). *Arabian Journal of Chemistry*
- Ninga, Sengupta, S., Jain A., Desobgo Z.S., Nso E.J., Sirshendu., (2018). Kinetics of enzymatic hydrolysis of pectinaceous matter in guava juice. *Journal of Food Engineering*, Volume 221, Pages 158-166. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.10.022>.
- Oladele, & Aborisade. (2014). Activities Of Cellulase And Pectinases In Sweet Orange (*Citrus Sinensis* (L.) Osbeck) Fruits Infected With *Lasiodiplodia* Sp. And Treated With Hot Water. In *Niger. Nigerian Journal of Mycology* Vol.6
- Ramadiyanti, M., Djali, M., Mardawati, E., & Andoyo, R. (2020). Production of laccase enzyme by *marasmius* sp. From the bark of cocoa beans. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(3), 405–409. <https://doi.org/10.5530/srp.2020.3.51>
- Shukri, N. A., Mohd Zin, Z., Mohd Maidin, N., Hasmadi, M., & Zainol, M. K. (2020). Ramification of pH in pectinase-assisted extraction on the antioxidant capacity of arabica spent coffee ground (Scg) extract. *Food Research*, 4(4), 1303–1311. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.4\(4\).070](https://doi.org/10.26656/fr.2017.4(4).070)
- Sunitha, V.H., Nirmala Devi, D. & Srinivas, C., (2013). Extracellular Enzymatic Activity of Endophytic Fungal Strains Isolated from Medical Plant. *World Journal of Agricultural Sciences*. 9 (1), 1– 9. doi:10.5829/idosi.wjas.2013.9.1.72148.
- Tristantini D., Ismawati A., Pradana B.T., (2016). Pengujian Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH pada Daun Tanjung (*Mimusops elengi L*). Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia FT, Universitas Indonesia. ISSN 1693-4393
- Widowati, E., Utami, R., Amanto, B. S., Mahadjoeno, E., & Putri, A. A. (2021). Pengaruh Kombinasi Enzim Pektinesterase dan Poligalakturonase terhadap Klarifikasi Sari Buah Apel Varietas Manalagi. *AgriTECH*, 40(4), 290. <https://doi.org/10.22146/agritech.43165>

Accepted Date	Revised Date	Decided Date	Accepted to Publish
22 April 2025	28 April 2025	07 Mei 2025	Ya