

KARAKTERISASI LIPASE TERMOSTABIL (ISOLAT AL96) BERDASARKAN PARAMETER TEMPERATUR DAN pH PADA INDUSTRI MAKANAN

Septiani

Program Studi Gizi, Universitas Binawan, Jakarta Timur, Indonesia

Email: septiani@binawan.ac.id

ABSTRACT

This research aims to produce large amounts of lipase and have high activity so that it can be utilized in the food industry. Method of Research used a thermostable enzyme derived from compost AL96 microorganisms. Qualitative tests are carried out using *Thermus* media. Extracellular lipase enzyme expressed by AL96 culture at 70⁰C for 17 hours was isolated as much as 1000 mL and the crude extract obtained was deposited by fractionation of ammonium sulfate. After obtaining a fraction of 0-30%; 30 -50% fraction; 50-70% fraction; and 7-90% fraction was then tested for lipase enzyme activity using spectrophotometric techniques and testing of protein content determined by the Bradford method. Results Of research obtaining partial purification using ammonium sulfate into crude enzyme extract from AL96 isolate with a fraction of 50-70% resulted in the highest specific activity of protein 0.018 U / mg. Further analysis of lipase in the 30-50% fraction has the optimum temperature at 65 ⁰C and the fraction of 50-70% has the optimum temperature at 75 ⁰C. Characterization of the optimum pH for 50-70% fraction and 30-50% fraction showed that both fractions had optimum pH 10.

Keywords: thermostable lipase, isolate AL96, ammonium sulphate fractions, characterization of lipase, food industry.

PENDAHULUAN

Lipase merupakan enzim yang dapat mengkatalisis proses hidrolisis ikatan karboksil ester dalam lipid pada daerah antar muka minyak dan air yang terdiri dari rangkaian asam amino serta mempunyai komposisi dan pengaturan rantai struktur kesatuannya yang tetap. Lipase banyak digunakan diberbagai industri karena memiliki potensi yang cukup besar dan banyak memberikan kontribusi, salah satunya pada industri pangan (Sharma dan Kanwar, 2014). Lipase mampu menghidrolisis lemak susu menjadi lemak bebas yang diproduksi sehingga menghasilkan flavour keju yang khas. Lipase dapat dihasilkan oleh beberapa genus diantaranya; *Aspergillus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Geobacillus*, dan *Thermus* (Nurhanasah, 2015).

Berdasarkan suhu optimum pertumbuhannya, mikroorganismenya dapat dikelompokkan menjadi tiga jenis yaitu *Psikrotropik* (14⁰C -20⁰C), *Mesofilik* (30⁰C - 3⁰C) dan *Termofilik*

(42°C – 100°C). Mikroba Termofilik umumnya dapat diisolasi dari kompos dan sumber air panas sehingga mampu menghasilkan lipase termostabil yang dapat dimanfaatkan pada industri pangan (Sari, 2010). Beberapa keuntungan dapat dilakukannya proses enzimatik pada suhu tinggi di dalam proses industri pangan adalah berkurangnya peluang terkontaminasi dengan mikroba, peningkatan laju reaksi dari enzim termostabil serta penurunan biaya produksi. Sebagian besar lipase dapat aktif pada rentang pH dan temperatur yang luas, biasanya lipase dari bakteri banyak yang aktif pada pH basa, sehingga perlu dipelajari faktor-faktor penting seperti kondisi pertumbuhan, cara isolasi, serta cara pemurnian yang dilakukan sehingga diperoleh lipase dengan tingkat kemurnian tinggi (Zeikus dan Vieille, 2001).

Penelitian tentang pemanfaatan lipase pada industri pangan telah banyak dilakukan, namun pada penelitian ini akan memperdalam karakterisasi lipase dari mikroba termofilik (Isolat AL96) yang dikaji berdasarkan optimasi pH dan suhunya sehingga aktivitas optimum lipase dapat diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik temperatur dan pH pada pemanfaatan enzim lipase termostabil dalam industri pangan.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimen yang menggunakan enzim termostabil yang berasal dari mikroorganisme kompos isolat AL96. Uji kualitatif dilakukan dengan menggunakan media Thermus. Pengujian aktivitas enzim lipase dengan menggunakan tehnik spektrofotometri dan pengujian kadar protein ditentukan dengan metode Bradford. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia, Program Studi Kimia, FMIPA, Institut Teknologi Bandung. Waktu penelitian dilakukan dari Januari 2016 sampai dengan Januari 2017.

Isolasi Enzim Lipase Termostabil

Pembuatan media pertumbuhan dan media produksi

Media Thermus digunakan untuk menumbuhkan bakteri isolat AL96 yang berasal dari stok gliserol, dan mempunyai komposisi polipepton (0,08 % b/v), ekstrak ragi (0,04 % b/v), bakto agar (0,03 % b/v), NaCl (0,05 % b/v). Media yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri terdiri dari pepton (0,5 % b/v), ekstrak ragi (0,5 % b/v), CaCl₂.2H₂O (0,05 % b/v), NaCl (0,05 % b/v), dan bakto agar (2-3 % b/v) untuk media pertumbuhan padat).

Peremajaan Isolat AL96

Isolat AL96 diperoleh dari koleksi laboratorium Biokimia, FMIPA, ITB. Sebanyak 100 μ L stok gliserol isolat AL 96 dipindahkan secara aseptik menggunakan batang-L (*spreader*) pada media pertumbuhan padat. Bakteri kemudian diinkubasi pada suhu 55 °C selama 17 jam. Koloni tunggal bakteri kemudian dipindahkan ke media pertumbuhan padat menggunakan kawat ose secara aseptik dan diinkubasi pada suhu 55 °C selama 17 jam.

Produksi Enzim Lipase Termotabil

Produksi enzim dimulai dengan membuat media *stater* sebanyak 10 mL, kemudian satu koloni bakteri dari media padat dipindahkan ke dalam media *stater*, inkubasi dilakukan dalam inkubator kocok pada suhu 55 °C selama 17 jam dengan kecepatan 150 rpm. Sebanyak 0,1 % kultur pada media *stater* dipindahkan ke dalam 100 mL media produksi. Inkubasi pada media produksi dilakukan dalam inkubator kocok pada suhu 55 °C selama 17 jam dan kecepatan 150 rpm selama 17 jam. Untuk memisahkan sel bakteri dengan enzim maka dilakukan sentrifugasi pada 12000xg selama 20 menit pada suhu 4 °C. Enzim lipase yang dihasilkan akan berada pada fasa supernatan karena enzim lipase yang dihasilkan bersifat ekstraseluler.

Fraksinasi Amonium Sulfat

Fraksinasi amonium sulfat dilakukan pada empat tingkat fraksi yaitu fraksi 0-30% jenuh, fraksi 30-50% jenuh, fraksi 50-70% jenuh, dan fraksi 70-90% jenuh. Fraksinasi kemudian dilakukan pada ruang dingin, amonium sulfat ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam ekstrak kasar enzim sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* campuran didiamkan selama \pm 3 jam untuk menyempurnakan pengendapan protein, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10000xg selama 20 menit pada temperatur 4 °C. Supernatan dipisahkan dari endapan dan ditampung untuk fraksinasi selanjutnya. Sisa amonium sulfat dalam endapan dihilangkan kemudian endapan dilarutkan dalam 50 mM penyangga tris HCl pH 8.0 (Scopes, 1994).

Dialisis dilakukan dengan memasukkan enzim ke dalam kantong selofan yang diikat atas dan bawahnya, lalu plastik selofan direndam dalam penyangga tris HCl 20 mM pH 8.0 dengan volume 940 mL dialisis dilakukan hingga enzim terbebas dari amonium sulfat. Fraksi yang diperoleh kemudian diuji aktivitas lipase dan kadar proteinnya.

Uji Aktivitas Lipase dan Penentuan Kadar Protein

Uji Aktivitas Lipase

Aktivitas lipase diuji menggunakan tehnik spektrofotometri seperti dikemukakan oleh Lee dkk.,1999. Sebagai substrat digunakan p-nitrofenil laurat (pNP-L) yang

dilartukan dalam asetonitril dengan konsentrasi 10 mM. Emulsi substrat dibuat dengan mencampurkan larutan pNP-L dengan bufer fosfat (pH 7; 0,05 M). Sehingga diperoleh komposisi akhir asetonitril: etanol: bufer dengan perbandingan 1:95:4 (v/v/v). Sebanyak 900 μ L Larutan tersebut kemudian ditambahkan dengan 300 μ L larutan enzim dan diinkubasi pada suhu 55 $^{\circ}$ C dengan menggunakan inkubator selama 15 menit.

Aktivitas lipase diukur berdasarkan perubahan absorbansi pada panjang gelombang 405 nm yang menunjukkan pelepasan senyawa p-nitrofenol (pNP) dari substrat pNP-L. Data absorbansi kemudian dikonversi menjadi kadar pNP (μ mol) dengan cara interpolasi ke kurva standar. Sebagai standar digunakan senyawa p-nitrofenol dengan seri konsentrasi 2-12 μ g/mL yang diukur pada panjang gelombang 405 nm. Aktivitas lipase dinyatakan dalam satuan unit/mg yang didefinisikan sebagai μ mol produk (p-nitrofenol) yang dihasilkan oleh lipase per menit per mg enzim.

Penentuan Kadar Protein

Penentuan kadar protein dilakukan dengan menggunakan metode Bradford. Larutan enzim direaksikan dengan reagen Bradford dengan perbandingan 1:1 (v/v). Campuran diinkubasi selama lima menit pada suhu ruang dan absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 595 nm menggunakan spektrofotometer. Kurva standar dibuat dengan menggunakan BSA (*bovin serum albumin*) dengan seri konsentrasi 2-14 μ g/mL, yang direaksikan dengan reagen Bradford dengan kondisi pengujian yang sama seperti pengujian sampel protein (Bradford, 1976).

Elektroforesis Gel Akrilamid

Penyiapan Gel Elektroforesis

Gel pemisahan 10% untuk SDS-PAGE dibuat dengan mencampurkan 4760 μ L aquabidest, 4260 μ L acryamide 30%, 3260 μ L tris-Cl 1,5M (pH8,8), 130 μ L SDS 10%, 130 μ L APS 10%, dan 8 μ L TEMED. Campuran dituang diantara cetakan kaca gel hingga mencapai tiga per empat bagian cetakan kemudian ditambahkan aquades hingga mencapai bagian atas cetakan. Campuran didiamkan selama 30 menit hingga terjadi polimerasi (Sambrook dkk.,1989).

Selama menunggu polimerasi gel pemisahan, gel pemampat 5% dibuat dengan mencampurkan 2800 μ L aquadest, 660 μ L acryamide 30% b/v, 500 μ L tris-Cl 1,5M (pH 6,8), 40 μ L SDS 10% b/v, 40 μ L APS 10% b/v, dan 6 μ L TEMED. Setelah gel pemisahan memadat, campuran gel pemampat dituang diantara kaca gel hingga mencapai bagian atas kaca dan disisipkan sisir, campuran didiamkan selama 30 menit hingga terjadi polimerasi (Sambrook dkk.,1989).

Penyiapan Larutan Penyangga Beban

Stok larutan penyangga beban 5x untuk SDS-PAGE dibuat dengan mencampurkan 2 mL penyangga tris-Cl 1M pH 6,8; 0,8 g SDS (8%), 50 mg Bromophenol Blue (0,5%), 4 mL gliserol 40%, 3,6 mL aquadest dan 400 μ L β -merkaptoetanol (Sambrook dkk.,1989).

Penyiapan Larutan Penyangga Aliran

Larutan penyangga aliran dibuat dengan mencampurkan 14,4 g glisin 192 mM, 3,02 g tris 25 mM, dan 1 g SDS (0,1%), setelah itu campuran dilarutkan dengan H₂O dan diencerkan hingga 1000 mL (Sambrook dkk.,1989).

Penyiapan Larutan Pewarna

Larutan pewarna dibuat dengan mencampurkan 1,2 g komasi biru, 225 mL metanol, 50 mL asam asetat glasial diencerkan dalam 225 mL aquadest (Sambrook dkk.,1989).

Penyiapan Larutan Penghilang Warna

Larutan penghilang warna dibuat dengan mencampurkan 250 mL metanol, 75 mL asam asetat glasial dilarutkan dalam 325 mL aquadest (Sambrook dkk.,1989).

Penyiapan Larutan Substrat Untuk Zimografi

Larutan substrat untuk zimografi disiapkan dengan mensuspensikan 23,5 mg *fast blue* dalam 1 mL etanol, kemudian ditambah penyangga fosfat 0,005 M (pH 8,0) sebanyak 48 mL. Campuran tersebut kemudian diaduk dengan pengaduk magnetik hingga *fast blue* teraduk merata dalam larutan. Sebanyak 25,8 mg substrat naftil asetat yang telah dilarutkan dalam 1 mL etanol kemudian ditambahkan kedalam larutan *fast blue* yang telah disaring. Larutan substrat dibuat segar sesaat sebelum digunakan.

SDS-PAGE

Sebanyak 20 μ L larutan enzim hasil elektroelusi dicampurkan dengan 5 μ L larutan penyangga beban SDS-PAGE 5x. Campuran tersebut ditempatkan dalam sumur gel elektroforesis. Ke dalam salah satu sumur elektroforesis ditambahkan 5 μ L protein marker. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan tegangan 110 volt selama 100 menit. Gel hasil elektroforesis kemudian direndam dalam 20 mL larutan pewarna selama semalam (16) kemudian dilanjutkan dengan perendaman dalam 20 mL larutan warna selama 120 menit.

Zymografi

Pada zymografi, gel hasil elektroforesis tidak direndam dalam larutan pewarna melainkan dalam larutan substrat yang mengandung naftil asetat 3 mM, pewarna *fast blue*

1 mM, dan bufer fosfat 50 mM (pH 8,0). Selanjutnya gel hasil elektroforesis direndam dalam 20 mL aquabidest selama 20 menit.

Karakterisasi Lipase

Lipase hasil fraksinasi menggunakan amonium sulfat selanjutnya dikarakterisasi berdasarkan beberapa parameter sebagai berikut.

Pengaruh pH terhadap Aktivitas Lipase

Penentuan pengaruh pH terhadap aktivitas lipase dilakukan pada temperatur 55°C menggunakan 50 mM bufer dengan rentang pH dari 6-12. Pengukuran aktivitas lipase dilakukan sesuai prosedur yang dikemukakan oleh Lee dkk. (1999) seperti ditunjukkan pada sub bab III.4 di atas, sistem penyangga yang digunakan meliputi penyangga natrium fosfat (pH 6,0-8,0), dan penyangga glisin NaOH (pH 8,0-11).

Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Lipase

Efek temperatur terhadap aktivitas lipase ditentukan dengan mengukur aktivitas enzim pada berbagai suhu dalam rentang 35-85°C. Campuran reaksi diinkubasi pada temperatur tertentu dalam penangas air, dan aktivitas lipase diukur mengikuti prosedur yang dikemukakan oleh Lee dkk. (1999).

HASIL

Pertumbuhan Dan Aktivitas Enzim Lipase

Kurva pertumbuhan bakteri dan kurva aktivitas lipase berguna untuk mengetahui waktu inkubasi terbaik isolat tunggal dalam menghasilkan lipase. Pertumbuhan bakteri diamati *optical density* (OD) setiap satu jam. Kurva pertumbuhan dibuat dengan mengalurkan waktu inkubasi terhadap nilai OD pada panjang gelombang 600 nm, sedangkan kurva aktivitas dibuat dengan mengalurkan waktu inkubasi terhadap aktivitas lipase yang dihasilkan oleh isolat tunggal (Tabel 1).

Tabel 1. Data Kurva Pertumbuhan Dan Kurva Aktivitas Enzim Lipase

Kontrol	Sampel	Abs	Aktivitas	Jam	Aktivitas / 10 ⁻³	OD
0,1905	0,1995	0,0090	54,4653	1	0,0544	0,0225
0,1905	0,2090	0,0185	135,3122	2	0,1353	0,0245
0,1900	0,2130	0,0230	173,6081	3	0,1736	0,0250
0,1890	0,2185	0,0295	228,9244	4	0,2289	0,0265
0,1880	0,2340	0,0460	369,3428	5	0,3693	0,0350
0,1870	0,2370	0,0500	403,3836	6	0,4033	0,0705
0,1860	0,2375	0,0515	416,1489	7	0,4161	0,1990
0,1825	0,2365	0,0540	437,4244	8	0,4374	0,4835
0,1795	0,2510	0,0715	586,3530	9	0,5863	0,7405

Kontrol	Sampel	Abs	Aktivitas	Jam	Aktivitas / 10 ⁻³	OD
0,1765	0,2515	0,0750	616,1387	10	0,6161	0,7945
0,1710	0,2530	0,0820	675,7102	11	0,6757	0,8470
0,1675	0,2540	0,0865	714,0061	12	0,7140	0,8480
0,1620	0,2560	0,0940	777,8326	13	0,7778	0,8935
0,1590	0,2575	0,0985	816,1285	14	0,8161	0,9140
0,1530	0,2575	0,1045	867,1898	15	0,8671	1,0270
0,1525	0,2615	0,1090	905,4857	16	0,9054	1,0690
0,1505	0,2745	0,1240	1033,1388	17	1,0331	1,0590
0,1475	0,2700	0,1225	1020,3735	18	1,0203	1,0270
0,1440	0,2650	0,1210	1007,6082	19	1,0076	0,9890
0,1430	0,2615	0,1185	986,3326	20	0,9863	0,9880
0,139	0,2550	0,1160	965,0571	21	0,9650	0,9800
0,139	0,2300	0,0910	752,3020	22	0,7523	0,9400

Perbandingan Aktivitas Spesifik Tiap Fraksi

Keberadaan lipase pada keempat fraksi tersebut dilihat melalui penentuan aktivitas spesifik enzim lipase. Aktivitas spesifik dinyatakan sebagai aktivitas enzim per kadar proteinnya. Satu unit aktivitas didefinisikan sebagai satu nmol produk yang dilepaskan oleh satu mL enzim per menit pada kondisi pengukuran. Peningkatan nilai aktivitas spesifik enzim dalam tahapan-tahapan isolasi menunjukkan adanya peningkatan kemurnian lipase yang diperoleh (Tabel 2).

Tabel 2. Tabel Kurva Perbandingan Aktivitas Spesifik Tiap Fraksi

Sampel	Fraksi	A1	A2	Rata-Rata	(µg/mL enzim)	(mg/mL enzim)	Volume (mL)	Total (mg)
Blanko		0,192						
	EKE	0,276	0,286	0,281	175,789	0,175	940	165,242
AL96	0-30%	0,447	0,445	0,446	320,526	0,321	2	0,64105
	30-50%	0,566	0,567	0,566	426,228	0,426	2	0,85246
	50-70%	0,530	0,534	0,532	395,964	0,396	2	0,79193
	70-90%	0,450	0,460	0,455	328,421	0,328	2	0,65684

Karakterisasi Suhu Fraksi 30-50% dan Suhu Fraksi 50-70%

Isolat AL96 yang diujikan pada fraksi 30-50% dan 50-70% menunjukkan temperatur optimum pada fraksi 30-50% pada suhu 65 °C dan pada fraksi 50-70% pada suhu 75 °C (Gambar 1 dan Tabel 3).

Tabel 3. Data Kurva Karakterisasi Suhu Fraksi 30-50%

Suhu	Kontrol	A1	A2	Rata-rata	Sampel-Kontrol	(mmol/menit mg enzim)	(mmol/menit mg enzim)/ (mg/mL enzim)
35	0,0740	0,1040	0,0990	0,1015	0,0275	0,0006	0,0015
45	0,0790	0,1230	0,1090	0,1160	0,0370	0,0049	0,0117

Suhu	Kontrol	A1	A2	Rata-rata	Sampel-Kontrol	(mmol/menit mg enzim)	(mmol/menit mg enzim)/ (mg/mL enzim)
55	0,0950	0,0950	0,1630	0,1290	0,0340	0,0036	0,0084
65	0,1510	0,2090	0,2040	0,2065	0,0555	0,0134	0,0315
75	0,2280	0,1670	0,3650	0,2660	0,0380	0,0054	0,0127
85	0,180	0,2120	0,2170	0,2145	0,0345	0,0038	0,0090

Keterangan : Vol sampel : 0,025 mL, Vol total : 1,20 mL, Waktu inkubasi : 15 menit, Pers. Linier : $y=0,0838x + 0,0261$, Mr PNP : 139

Tabel 4. Data Kurva Karakterisasi Suhu Fraksi 50-70%

Suhu	Kontrol	A1	A2	Rata-Rata	Sampel - Kontrol	(mmol/menit mg enzim)	(mmol/menit mg enzim) / (mg/mL enzim)
35	0,0740	0,1170	0,1250	0,1210	0,0470	0,0095	0,0241
45	0,0790	0,1330	0,1390	0,1360	0,0570	0,0141	0,0357
55	0,0950	0,1510	0,1420	0,1465	0,0515	0,0116	0,0293
65	0,1510	0,2170	0,2130	0,2150	0,0640	0,0173	0,0438
75	0,2280	0,3980	0,3450	0,3715	0,1435	0,0537	0,1357
85	0,1800	0,2170	0,2210	0,2190	0,0390	0,0059	0,0149

Keterangan : Vol sampel : 0,025 mL, Vol total: 1,20 mL, Waktu inkubasi: 15 menit, Pers. Linier: $y=0,0838x + 0,0261$, Mr PNP : 139

Karakterisasi pH Fraksi 30-50% dan Fraksi 50-70%

Isolat AL 96 yang diujikan pada fraksi 30-50% menunjukkan pH optimum yaitu pH 10,0. Hasil serupa ditunjukkan oleh lipase pada fraksi 50-70% terdapat pH optimum yaitu pH 10,0 (Tabel 5).

Tabel 5. Data Kurva Karakterisasi pH Fraksi 30-50%

pH	Kontrol	A1	A2	Rata-Rata	Sampel - Kontrol	(mmol/menit mg enzim)	(mmol/menit mg enzim) / (mg/mL enzim)
6	0,0400	0,0650	0,0700	0,0675	0,0275	0,0006	0,0015
7	0,0430	0,0750	0,0740	0,0745	0,0315	0,0024	0,0058
8	0,1020	0,1390	0,1370	0,1380	0,0360	0,0045	0,0106
9	0,0920	0,1480	0,1490	0,1485	0,0565	0,0139	0,0326
10	0,1200	0,2490	0,1470	0,1980	0,0780	0,0237	0,0557
11	0,1620	0,2010	0,2070	0,2040	0,0420	0,0072	0,0170
12	0,1260	0,1680	0,1620	0,1650	0,0390	0,0059	0,0138

Keterangan: Vol sampel : 0,025 mL, Vol total: 1,20 mL, Waktu inkubasi : 15 menit, Pers. Linier : $y=0,0838x + 0,0261$, Mr PNP : 139

Tabel 6. Data Kurva Karakterisasi pH Fraksi 50-70%

pH	Kontrol	A1	A2	Rata-Rata	Sampel-Kontrol	(mmol/menit mg enzim)	(mmol/menit mg enzim) / (mg/mL enzim)
6	0,0400	0,0690	0,0670	0,0680	0,0280	0,0008	0,0021
7	0,0430	0,0720	0,0740	0,0730	0,0300	0,0017	0,0045
8	0,1020	0,1690	0,1670	0,1680	0,0660	0,0182	0,0461

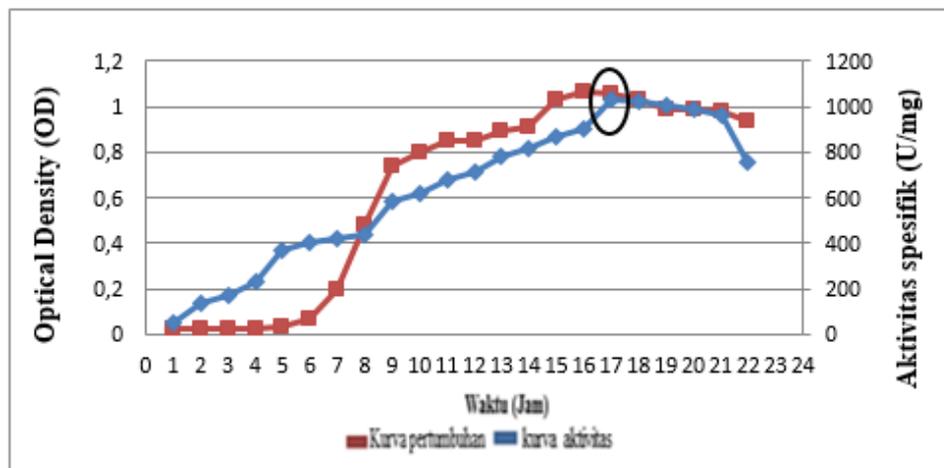
pH	Kontrol	A1	A2	Rata-Rata	Sampel-Kontrol	(mmol/menit mg enzim)	(mmol/menit mg enzim) / (mg/mL enzim)
9	0,0920	0,1580	0,1690	0,1635	0,0715	0,0207	0,0524
10	0,1200	0,2590	0,1870	0,2230	0,1030	0,0352	0,0889
11	0,1620	0,2050	0,2070	0,2060	0,0440	0,0081	0,0206
12	0,1260	0,1580	0,1690	0,1635	0,0375	0,0052	0,0131

Keterangan: Vol sampel : 0,025 mL, Vol total : 1,20 mL, Waktu inkubasi: 15 menit, Pers. Linier : $y=0,0838x+0,0261$, Mr PNP : 139

PEMBAHASAN

Pertumbuhan Bakteri Lipase

Pertumbuhan bakteri mengalami peningkatan dengan meningkatnya nilai OD, semakin keruh suspensi bakteri maka semakin banyak jumlah bakteri yang tumbuh. Meningkatnya jumlah biomassa menyebabkan jumlah bakteri yang dihasilkan akan meningkat kemudian turun setelah mencapai fase stasioner (Ogunbanwo and Adewara, 2013). Berdasarkan kurva pada Gambar 1, pertumbuhan bakteri terdiri dari fase adaptasi, fase eksponensial, dan fase stasioner. Fase adaptasi terjadi pada jam ke-0 sampai dengan pertengahan jam ke-5, fase adaptasi merupakan periode penyesuaian bakteri terhadap lingkungannya seperti : pH, suhu, nutrisi dan lain sebagainya, pada fase ini peningkatan jumlah sel bakteri berlangsung lambat.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan dan kurva aktivitas lipase termostabil

Fase kedua adalah fase eksponensial, dimana fase ini berlangsung sangat cepat, dimulai jam ke-6 sampai dengan jam ke-17. Pada fase ini suatu jenis mikroba memperbanyak diri dengan cara membelah diri menjadi dua, kemudian masing-masing membelah lagi menjadi dua, sehingga pada setiap generasi jumlahnya menjadi dua kali

populasi sebelumnya. Waktu yang dibutuhkan untuk terjadi proses ini disebut waktu generasi (Fardiaz, 1992).

Fase berikutnya adalah fase stasioner, terjadi mulai jam ke-17 sampai jam ke-24. Pada fase ini tidak terjadi penambahan jumlah bakteri, jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati karena cadangan makanan sudah mulai menipis dan pada fase ini bakteri akan menghasilkan metabolit sekunder sebagai pertahanan diri terhadap lingkungannya dan mikroorganisme lain.

Dari Kurva diatas dapat diketahui bahwa aktivitas lipase terbaik dihasilkan pada waktu inkubasi pada jam ke-17, dimana nilai OD pada jam itu sebesar 1,069. (dapat dilihat pada Tabel 1).

Karakter Lipase Isolat AL96

Lipase yang diproduksi pada penelitian ini merupakan lipase yang berada pada fase stasioner (Gambar 1). Lipase sebanyak 940 mL diinkubasi selama \pm 17 jam sampai mencapai OD sekitar 1,069. Setelah itu dipanen sel bakteri dengan cara sentrifugasi selama 45 menit pada 4500 g. Ekstrak kasar enzim diperoleh pada fasa supernatan karena enzim bersifat ekstraselluler. Ekstrak kasar enzim lipase termostabil yang diperoleh kemudian difraksinasi menggunakan amonium sulfat. Prinsip dari fraksinasi amonium sulfat adalah bila suatu larutan protein ditambahkan garam maka daya larut protein akan berkurang akibatnya protein akan terpisah membentuk endapan, ini merupakan proses *salting out*.

Fraksinasi dilakukan secara bertahap sehingga diperoleh empat fraksi, yaitu fraksi 0-30% jenuh, fraksi 30-50% jenuh, fraksi 50-70% jenuh, dan fraksi 70-90% jenuh, dan menghasilkan empat fraksi enzim aktif. Dialisis digunakan untuk meningkatkan kemurnian enzim. Prinsip dialisis yaitu memisahkan molekul-molekul besar dari molekul-molekul kecil dengan bantuan membran *semipermeable*. Dialisis dilakukan untuk menghilangkan garam yang ikut mengendap bersama protein agar tidak mengganggu tahap pemurnian selanjutnya dengan menggunakan membran selofan.

Membran selofan memiliki ukuran pori-pori yang lebih kecil dari ukuran protein sehingga protein tidak dapat keluar dari membran selofan, penggunaan membran selofan memiliki beberapa keuntungan yaitu mudah digunakan, memiliki harga yang relatif murah dan mudah didapatkan. Proses dialisis dilakukan sebanyak tiga kali untuk memastikan garam benar-benar hilang dari protein. Hasil fraksinasi amonium sulfat ditunjukkan pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Fraksinasi Lipase Menggunakan Amonium Sulfat

fraksi (amonium sulfat jenuh)	Massa amonium sulfat yang ditambahkan (g)	Volume enzim setelah dialisis (mL)
fraksi 0-30%	154,16	2,0
fraksi 30-50%	107,64	2,0
fraksi 50-70%	121,87	2,0
fraksi 70-90%	134,00	2,0

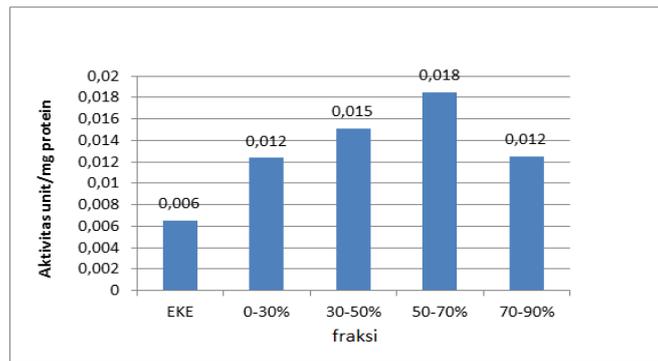
Hasil penentuan aktivitas spesifik menggunakan amonium sulfat ditunjukkan pada Tabel 8. Hasil penentuan aktivitas spesifik (Gambar 2 dan Tabel 2) menunjukkan adanya peningkatan aktivitas lipase setelah dilakukan fraksinasi amonium sulfat dan dialisis. Peningkatan aktivitas spesifik tersebut menunjukkan adanya peningkatan kemurnian enzim lipase.

Tabel 8. Hasil Penentuan Aktivitas Spesifik Menggunakan Amonium Sulfat

Tahap pemurnian	Protein total (mg)	Aktivitas total (unit)	Aktivitas spesifik (unit/mg)
Ekstrak Kasar Enzim	$1,65 \times 10^2$	$1,08 \times 10^2$	$6,56 \times 10^{-3}$
fraksi 0-30%	$6,41 \times 10^{-1}$	$7,94 \times 10^{-3}$	$1,24 \times 10^{-2}$
fraksi 30-50%	$8,52 \times 10^{-1}$	$1,29 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-2}$
fraksi 50-70%	$7,91 \times 10^{-1}$	$1,46 \times 10^{-2}$	$1,85 \times 10^{-2}$
fraksi 70-90%	$6,56 \times 10^{-1}$	$8,214 \times 10^{-3}$	$1,25 \times 10^{-2}$

Hasil pemurnian parsial dengan menggunakan amonium sulfat terhadap ekstrak kasar enzim dari isolat AL96 Hasil menunjukkan bahwa fraksi 50-70% yang paling tinggi aktivitas spesifik sebesar 0,018 U/mg protein, diikuti oleh fraksi 30-50% dengan aktivitas spesifik sebesar 0,015 U/mg protein.

Hal ini dapat disebabkan protein yang mengendap pada fraksi 50-70% relatif lebih sedikit jika dibandingkan dengan fraksi 30-50% dan fraksi lainnya. Protein yang terendapkan dapat dipengaruhi oleh fraksinasi amonium sulfat, bila suatu larutan protein ditambahkan garam maka daya larut protein akan berkurang akibatnya protein akan terpisah membentuk endapan.



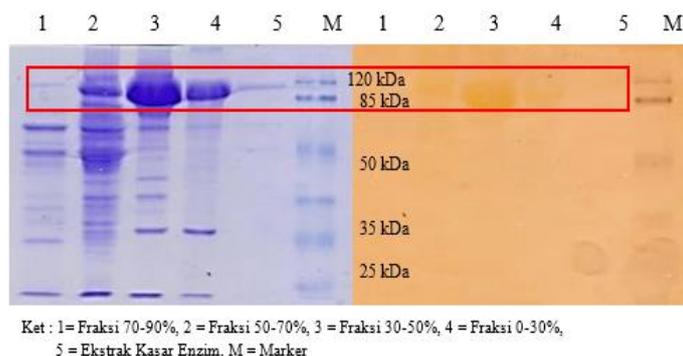
Gambar 2. Grafik perbandingan aktivitas spesifik tiap fraksi.

Penentuan Berat Molekul Lipase

Prinsip elektroforesis adalah proses Bergeraknya suatu molekul bermuatan pada suatu medan listrik, kecepatan molekul yang bergerak tergantung pada bentuk, muatan dan ukuran dari molekul tersebut sehingga protein dapat terpisahkan, Oleh karena komposisi protein akan berbeda pada berbagai fraksi, maka untuk mengetahui banyaknya komposisi dari tiap fraksi yang memiliki aktivitas lipase maka dilakukan SDS-PAGE dan zymogram.

SDS-PAGE merupakan metode pemisahan protein yang berdasarkan perbedaan ukuran protein, dimana protein yang berukuran kecil bergerak lebih cepat sedangkan protein yang besar bergerak lebih lambat karena terhambat oleh ukuran dan pori dari gel. Zymogram merupakan cara untuk menentukan dimana letak protein target yang telah didapatkan dari hasil SDS-PAGE.

Pada SDS-PAGE dan zymogram pita tebal pada 85 kDa, menunjukkan pita lipase dari fraksi yakni fraksi 50-70%, fraksi 30-50%, dan fraksi 0-30% yang ditandai dengan adanya warna kecoklatan. Warna kecoklatan merupakan produk hasil reaksi antara fast blue dengan α -naphthyl acetate. Ikatan ester pada α -naphthyl acetate dihidrolisis dengan adanya lipase sehingga terbentuk 1-naphthol. Pengikatan 1-naphthol oleh fast blue akan menghasilkan produk yang berwarna kecoklatan. Hasil pengujian menunjukkan bahwa keempat fraksi dan ekstrak kasar enzim memiliki aktivitas yang tidak jauh berbeda.



Gambar 3. Elektrofogram SDS-PAGE dan zymogram

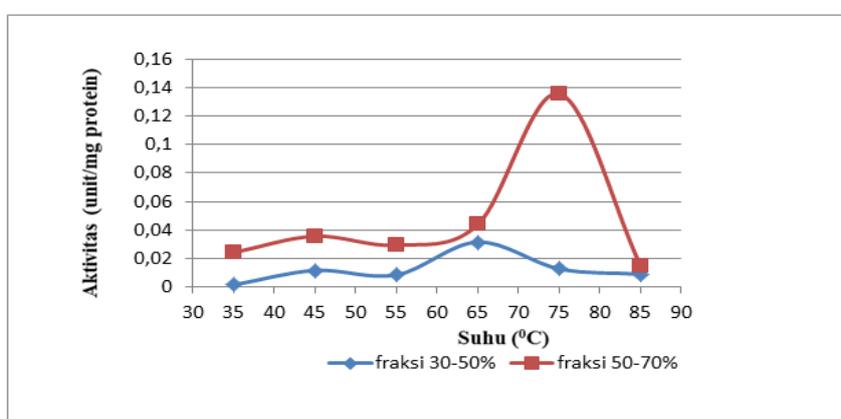
Hasil Karakterisasi

Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Lipase

Karakterisasi enzim dilakukan untuk memperoleh informasi mengenai sifat enzim yang diteliti. Informasi yang diperoleh akan memudahkan untuk mengetahui kondisi lingkungan dan jenis substrat yang cocok sehingga dapat diketahui potensi aplikasi untuk enzim tersebut. Faktor yang mempengaruhi struktur dan aktivitas dari enzim salah satunya adalah temperatur dan pH.

Pada temperatur di bawah temperatur optimum lipase cukup stabil, tetapi hidrolisis substrat oleh lipase tidak berjalan maksimal, dengan meningkatnya temperatur, energi kinetik molekul – molekul yang bereaksi bertambah sehingga molekul yang bereaksi semakin banyak dan produk yang dihasilkan semakin besar.

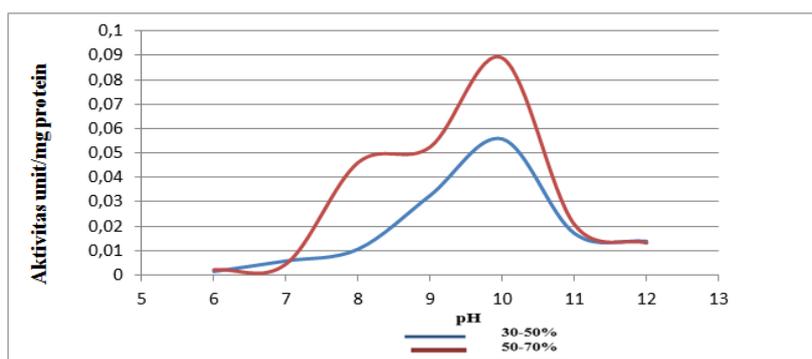
Diatas temperatur optimum, aktivitas lipase menurun tajam hal ini terjadi karena lipase mengalami denaturasi protein yang dapat merubah konformasi struktur molekul sehingga enzim kehilangan sifat alamiahnya. Pada temperatur tinggi, substrat juga dapat mengalami perubahan konformasi sehingga gugus reaktifnya mengalami hambatan dalam memasuki sisi aktif lipase (Suhartono, 1989). Gambar 4 menunjukkan bahwa kedua fraksi mungkin mengandung beberapa lipase atau terdapat lipase yang memiliki suhu optimum lebih dari satu, serta lipase ini dapat dikategorikan dalam lipase termostabil (Tabel 3).



Gambar 4. Kurva Karakterisasi Temperatur terhadap Aktivitas Lipase.

Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Lipase

Pada pH optimum muatan gugus samping asam amino berada pada keadaan yang sesuai sehingga enzim sangat efisien dalam mempercepat reaksi biokimia yang sangat spesifik.



Gambar 5. Kurva Karakterisasi pH terhadap Aktivitas Lipase

Pada kondisi pH 10,0 gugus pemberi dan penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada pada keadaan yang diinginkan sehingga aktivitas katalitiknya tinggi. Hasil Kurva karakterisasi pH terhadap aktivitas lipase ditunjukkan pada Gambar 5 dan Tabel 4.

Pemanfaatan Lipase dari Isolat AL96 dalam Industri Makanan

Peran fisiologis lipase adalah untuk menghidrolisis trigliserida menjadi digliserida, monogliserida, asam lemak, dan gliserol. Selain fungsi alami mereka menghidrolisis ikatan ester karboksilat, lipase dapat mengkatalisis esterifikasi, interesterifikasi, dan transesterifikasi reaksi berair media. Fleksibilitas ini membuat enzim lipase pilihan untuk aplikasi potensial dalam makanan, deterjen, farmasi, kulit, tekstil, kosmetik, dan industri kertas. Lipase bakteri umumnya lebih stabil daripada hewan atau pada tumbuhan. Lipase yang aktif di bawah kondisi ambient dapat meningkatkan kerusakan reaktan dan produknya labil (Jegannathan dan Nielsen, 2013). Sehingga diperlukan lipase pada suhu optimum untuk menjaga kestabilan produk di dunia industri khususnya makanan. Proses katalis lipase menawarkan efektivitas biaya, dibandingkan dengan proses hilir tradisional.

Berdasarkan pengamatan dan hasil yang telah dilakukan serta diuraikan diatas dapat diketahui bahwa lipase dari isolat AL96 yang diisolasi dari kompos memiliki suhu dan pH Optimum. Lipase dari isolat AL96 yang dikarakterisasi pada rentang suhu 35°C – 85°C memberikan suhu optimum sebesar 65°C untuk fraksi 30-50% sedangkan 75°C untuk fraksi 50-70%. Hal tersebut menandakan bahwa suhu yang diperoleh berada diatas suhu ambient sehingga sangat bagus untuk digunakan pada industri makanan. Derajat keasaman Lipase dari isolat AL96 yang dikarakterisasi pada rentang pH 6-12 didapatkan pH optimum sebesar 10 untuk fraksi 30-50% dan fraksi 50-70%. Penggunaan pH optimum pada industri makanan dapat memberikan manfaat untuk kestabilan dan daya tahan dari suatu produk, karena pH dapat mempengaruhi tingkat kepadatan dari suatu produk.

KESIMPULAN

Ekstrak kasar lipase dari isolat AL96 berhasil di isolasi diperoleh dua fraksi aktif lipase dengan aktivitas paling tinggi yaitu fraksi 30-50% dan fraksi 50-70%. Fraksi 30-50% memiliki suhu optimum 65°C dan fraksi 50-70% memiliki suhu optimum 75°C serta fraksi 30-50% dan fraksi 50-70% memiliki pH optimum 10. Suhu dan pH optimum dari Lipase isolat AL96 dapat digunakan pada industri makanan karena lebih stabil dibandingkan lipase dari hewan dan tumbuhan, sehingga mampu menjaga kestabilan produk dalam kurung waktu yang lama.

DAFTAR PUSTAKA

- Bradford, M., M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248 – 254.
- Cutler, P. (2004). Protein Purification Protocol Second Edition Method in Molecular Biology. Human Press, 244, 24 – 26.
- Fardiaz, S. (1992). Analisis Mikrobiologi Pangan. Jakarta: Raja Grafindo Persada.
- Jegannathan RK, Nielsen HP. (2013). Environmental Assessment of Enzyme Use in Industrial Production. *Journal of Cleaner Production*. 42, 22.
- Lee, D., Koh, Y., Kim, K., Choi, H., Kim, D., Suhartono, M. T., dan Pyun, Y. (1999). Isolation and Characterization of a Thermophilic Lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1, *FEMS Microbiology Letters*, 179, 393 – 400.
- Nurhasanah. (2015). *Kloning, Karakterisasi Dan Ekpresi Gen Pengkode Lipase Termostabil dari Kompos Melalui Pendekatan Metagenom*, Disertasi Program Doktor, Institut Teknologi Bandung.
- Ogunbanwo S. T and Adewara, A. O. (2013). Effects of Processing Variables on The Production Of 'Burukutu', A Nigerian Fermented Beverage. *Nature and Science Journal*, 1-11.
- Sari, D. K. (2010). *Modifikasi Lipase Isolat Lokal pada Sintesis Biodiesel*, Tesis Program Magister, Institut Teknologi Bandung.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning : a Laboratory Manual* 3rd edition, USA : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 18.47.
- Scopes, R. K., (1994). Protein Purification Principles and Practice. New York: Springer-Verley Inc.
- Sharma, S., dan Kanwar, S. S. (2014). Organic Solvent Tolerant Lipases and Applications. *Scientific World Journal*, 1 – 16.
- Suhartono, M.T. (1989). Enzim dan Bioteknologi. Bogor: PAU Bioteknologi IPB.
- Zeikus, G.J., dan Vieille, C. (2001). Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms For Thermostability, 65, 1 – 43.