

# Isolasi dan uji aktivitas enzim lipase termostabil dari bakteri termofilik pasca erupsi Merapi

(Isolation and activity test of thermo stable Lipase Enzyme from thermophilic bacteria post Merapi eruption)

Drajat Pramiadi, Evy Yulianti, dan Anna Rakhmawati

Jurusan Pendidikan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Yogyakarta (UNY),  
Kampus Karangmalang, Sleman, DI Yogyakarta 55281  
tel. 08122753549, faks. (0274) 548203 dan e-mail:

diterima 2 Desember 2013, disetujui 3 Februari 2014

---

## Abstrak

Pemanfaatan enzim yang berasal dari mikroorganisme lebih menguntungkan karena lebih mudah berkembang biak dalam waktu yang relatif singkat dan tidak memerlukan tempat yang luas, termasuk enzim lipase, yang banyak digunakan untuk industri. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi enzim lipase termostabil dari bakteri termofilik dan mengetahui aktivitas spesifiknya. Isolasi bakteri termofilik dilakukan dengan metode *pour plate*, seleksi bakteri penghasil lipase ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni pada medium minyak zaitun dengan 0,1% *Rhodamine-B*. Dua isolat penghasil zona bening terbesar dilanjutkan dengan isolasi enzim lipase dan uji aktivitasnya. Dari 253 isolat, 43 isolat dapat tumbuh pada medium yang mengandung olive oil dan 2 isolat menunjukkan zona jernih di sekeliling isolat, yaitu isolat 361 dan isolat 213. Hasil pengukuran kurva pertumbuhan selama 24 jam menunjukkan waktu eksponensial dicapai pada jam ke-10 untuk kedua isolat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi temperatur, pH dan jenis isolat mempengaruhi aktivitas enzim. Hasil pengujian aktivitas enzim menunjukkan bahwa pada isolat 361, aktivitas enzim yang paling baik adalah pada suhu inkubasi 50°C dengan pH 7, sedangkan pada isolat 213, aktivitas enzim terbaik ditunjukkan pada suhu inkubasi 70°C dengan pH 6.

Kata kunci: lipase, olive oil, bakteri termofilik, enzim termostabil, aktivitas enzim

## Abstract

The usage of enzyme which comes from microorganism is more advantageous because it is easier to be multiplied in a relatively short time and does not need a large space, including lipase enzyme, which is often used in industries. The objective of this research is to isolate thermo stable lipase enzyme from thermophilic bacteria and to understand specific activities. The thermophilic bacteria isolation is done using pour plate method. Selection of the bacteria producing lipase is shown from the presence of the biggest translucent zone around the colony on the olive oil medium with 0.1% Rhodamine-B. Two isolate produced by the biggest translucent zone are then continued by lipase enzyme isolation and activity tests. From 253 isolate, 43 isolate can grow on the medium that contains olive oil and 2 isolate shows translucent zone around the isolate, that is isolate 361 and isolate 213. The growth curve measurement for 24 hours shows that the exponential time is reached at the 10<sup>th</sup> hour for both isolates. The result of this research shows that temperature, pH, and enzyme isolate variation effects the enzyme activities. The enzyme activity tests show that on isolate 361, the best enzyme activities is obtained from incubation temperature of 50°C with pH 7, whereas for isolate 213, the best enzyme activities is reached when incubation temperature is 70°C with pH 6.

Key words: lipase, olive oil, thermophilic bacteria, thermo stable enzyme, enzyme activities

---

## Pendahuluan

Semenjak ditemukannya organisme yang dapat hidup pada lingkungan yang mempunyai suhu ekstrim, pH ekstrim, tekanan tinggi dan salinitas yang tinggi, hal ini sangat menarik perhatian pada bidang bioteknologi khususnya tentang potensi enzim yang dihasilkan oleh organisme tersebut [1]. Enzim memegang peranan penting dalam dunia industri seperti industri tekstil, detergen, bahan pangan, dan minuman, bahan kimia, obat-obatan dan industri kulit [2].

Organisme hipertermofil dapat tumbuh secara optimal pada temperatur antara 80 dan 110°C. Enzim dari organisme ini berkembang dan memiliki struktur dan fungsi yang unik dengan kemampuan termostabilitas yang tinggi dan memiliki aktivitas optimal pada temperatur di atas 70°C. Beberapa dari enzim ini bahkan dapat aktif pada temperatur di atas 110°C. Organisme termofilik dapat tumbuh secara optimal pada suhu antara 50 dan 80°C. Enzim termofilik ini dapat aktif pada suhu antara 60 dan 80°C [3].

Lipase atau disebut juga triasilgliserol hidrolase, merupakan enzim yang penting dalam bidang bioteknologi, dan memiliki banyak aplikasi di bidang industry makanan, susu, detergen dan farmasi. Lipase banyak dihasilkan oleh mikrobia terutama lipase yang dihasilkan oleh bakteri berperan penting dari segi komersial. Beberapa genus bakteri penghasil lipase antara lain adalah *Bacillus*, *Pseudomonas* dan *Burkholderia*. Lipase biasanya dihasilkan pada medium yang mengandung karbon lipid, seperti minyak, asam lemak, gliserol, tween dengan adanya sumber nitrohen organik. Enzim lipase yang dihasilkan bakteri biasanya bersifat ekstraseluler dan dihasilkan fermentasi [4].

Tujuan yang hendak dicapai dalam penelitian ini adalah 1) mengetahui isolat terbaik yang berpotensi dalam menghasilkan enzim lipase termostabil, 2) mengetahui pengaruh variasi temperatur pada aktivitas enzim lipase, 3) mengetahui pengaruh variasi pH terhadap aktivitas enzim lipase, 4) mengetahui pengaruh variasi jenis isolat terhadap aktivitas enzim lipase, dan 4) mengetahui temperatur dan pH optimum untuk aktivitas enzim lipase.

## *bakteri termofilik*

Mikroorganisme termofilik biasa ditemukan pada daerah yang memiliki aktivitas geothermal, seperti daerah pegunungan gunung berapi, sumber air panas, dan juga tempat cadangan minyak bumi atau batu bara. Mikroorganisme ini sangat menarik untuk dikaji dari sudut pandang ilmu dasar maupun terapan. Bidang penelitian dasar yang berhubungan yaitu biologi molekuler, genetika, biokimia, evolusi, taksonomi, ekologi dan asal usul kehidupan. Dari sudut pandang terapan dan bioteknologi, termofil merupakan sumber enzim-enzim yang unik dengan sifat luar biasa, khususnya yang tahan suhu tinggi [5].

## *enzim lipase*

Sebagian besar lipase dapat aktif pada rentang pH dan temperature yang luas, biasanya lipase dari bakteri banyak yang aktif pada pH basa. Lipase termasuk serin hidrolase dan memiliki stabilitas yang tinggi pada pelarut organik. Beberapa jenis lipase menunjukkan aktivitas chemo-, regio- dan enantioselectivity. Lipase termasuk enzim hidrolase yang bekerja pada lingkungan air pada ikatan ester karboksil yang terdapat pada triasilgliserol untuk memisahkan asam lemak dan gliserol. Substrat alami untuk lipase adalah triasilgliserol rantai panjang yang memiliki kelarutan yang rendah di dalam air, dan reaksi ini dikatalisis pada daerah yang berhubungan antara lipid dan air. Di bawah keadaan yang sedikit air, lipase memiliki kemampuan unik, yaitu melakukan reaksi yang sebaliknya, menyebabkan terjadinya esterifikasi, alkoholisis dan asidolisis. Selain lipolisis, lipase juga memiliki aktivitas esterolitik sehingga mempunyai substrat yang banyak [4].

Katalitik triad yang menyusun sisi aktif lipase tersusun atas Ser-Asp/Glu-His dan biasanya sekuen yang tetap (Glyx-Ser-x-Gly) ditemukan di sekitar sisi aktif serine. Struktur tiga dimensi lipase menunjukkan sifat  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold. Lipase banyak ditemukan di alam dan merupakan produk alami tanaman, hewan maupun mikroorganisme. Lipase yang dihasilkan oleh mikrobia, terutama bakteri dan fungi, merupakan enzim yang paling banyak digunakan di dalam aplikasi bioteknologi dan kimia organik. Beberapa jenis mikrobia penghasil lipase antara lain *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*,

Burkholderia, Chromobacterium dan Pseudomonas. Lipase yang dihasilkan oleh bakteri Pseudomonas paling banyak digunakan untuk aplikasi bioteknologi [4].

### Metode Penelitian

#### a) desain penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian ekperimental dengan perlakuan variasi suhu (50°C, 60°C, 70°C), pH (6, 7, 8), dan 2 jenis isolat.

#### b) objek penelitian

Objek dari penelitian ini adalah bakteri termofilik yang diisolasi dari pasir dan air sungai merapi.

#### c) waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 7 bulan. Sampel diambil dari pasir dan air sungai merapi, isolasi enzim lipase dilakukan di laboratorium mikrobiologi FMIPA UNY dan uji aktivitas enzim dilakukan di laboratorium biokimia FMIPA UNY.

#### d) alat dan bahan

Media NA, NB, minyak zaitun, *Rhodamine-B*, aquades, aseton : ethanol (1:1), 0,05M NaOH, buffer fosfat, *phenolphthalein* 1%, aluminium foil, kasa, kapas steril.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah botol sampel steril, thermometer, pH meter, forteks, water bath, Bunsen, pipet ukur, jarum ose, petridish, tabung reaksi, autoklaf, incubator, gelas objek, erlemeyer, hot plate, magnetic stirrer, oven, test tube, mikroskop, kamera foto, spektrofotometer, sentrifus, jangka sorong.

#### e) langkah penelitian

##### isolasi bakteri

Isolasi bakteri dilakukan dengan metode cawan tuang (*pour plate method*) pada media agar (NA) yang mengandung 10%

minyak zaitun dan 0,1 % *Rhodamine-B*. Selanjutnya kultur dituangkan pada cawan petri steril dengan penambahan media agar yang mengandung *Rhodamine-B*, kemudian diinkubasi pada suhu 55° C sampai tumbuh koloni bakteri. Aktifitas lipolitik diidentifikasi dengan terbentuknya warna orange yang berpendar pada permukaan koloni bakteri dan dari pengukuran lebar diameter koloni. Selesai diinkubasi dan didapatkan bakteri lipolitik, koloni yang tumbuh diamati dengan melihat morfologinya meliputi tipe, bentuk, warna dan diameter koloni. Berdasarkan diameter koloni bakteri yang terbentuk, maka dipilih dua isolat bakteri yang mempunyai aktivitas lipolitik tertinggi sebagai sumber untuk produksi enzim.

#### pembuatan kurva pertumbuhan isolat

Isolat sebanyak 10 mL ditumbuhkan dalam 90 mL medium NB yang mengandung 10% olive oil. Pengamatan dilakukan selama 48 jam dan pengambilan sampel dilakukan tiap 3 jam. Ulangan dilakukan sebanyak 3 kali. Sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm.

#### produksi enzim lipase

Enzim lipase diperoleh dengan cara mengambil 1 ml strain dari penyimpanan dan diinokulasikan ke dalam Erlenmeyer yang berisi 99 ml media NB yang mengandung 10% minyak zaitun, kemudian diinkubasi pada suhu 55°C sampai mencapai fase eksponensial. Enzim lipase kasar pada Erlenmeyer dipanen dari biakan dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 15 menit. Setelah itu supernatan yang terbentuk diambil dan dipindahkan ke Erlenmeyer lain, untuk selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim.

#### uji aktivitas lipase

Pengujian aktivitas lipase dilakukan dengan mencampur 2 mL minyak zaitun, 4 ml larutan buffer phosphate (pH (5,7,9)), 1 ml larutan enzim kasar (supernatan). Campuran dikultivasi pada suhu 60 °C, 70 °C, 80 °C selama 30 menit. Setelah waktu kultivasi habis, campuran substrat enzim diinaktifkan dengan penambahan larutan

aseton : ethanol (1:1) sebanyak 10 ml, lalu dilakukan titrasi dengan NaOH 0,05 M dengan menambah 2-3 tetes *phenolphthalien* 1% sebagai indikatornya. Titrasi dihentikan jika sudah terbentuk warna merah jambu. Aktivitas enzim ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi merah jambu. Ini adalah perlakuan yang diberikan pada sampel perlakuan, sedangkan untuk sampel kontrol, enzim kasar (supernatan) diberikan setelah kultivasi selama 30 menit. Aktivitas lipolitik dalam 1 unit didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dibutuhkan untuk menghidrolisis minyak menghasilkan 1  $\mu$ mol produk selama 1 jam. Aktivitas spesifik adalah jumlah unit aktivitas enzim/mg protein. Banyaknya konsentrasi asam lemak bebas atau FFA (CFFA) yang terkandung dalam 2 ml substrat minyak dihitung dengan: Mol FFA = mol NaOH = 0.05M x volume NaOH titrasi,

$$\%hidrolisis = \frac{\text{mol FFA hasil reaksi}}{\text{mol FFA secara teoritis}}$$

Tiap 2 ml sampel minyak zaitun memiliki berat 1.7 gram = 1700 mg trioleogliserol (trigliserida dari minyak zaitun) dengan rumus molekul  $(C_{17}H_{34}COO)_3$   $C_{3}H_5$  memiliki berat molekul 884 g/mol, berarti dalam 2 ml sampel minyak zaitun terdapat mol trigliserida sebanyak 1.923 mmol. Mol FFA yang maksimal terbentuk secara

teoritis dalam 2 ml sampel minyak zaitun adalah 3 x mol trigliserida, yaitu sebesar 5.769 mmol

#### f) identifikasi variabel penelitian

- variabel tergantung
  - suhu (50 °C, 60 °C, 70 °C)
  - pH (6,7,8)
  - jenis isolat (2 isolat terpilih yang menghasilkan zona jernih terbesar)
- variabel bebas
  - aktivitas enzim

#### Hasil dan Diskusi

##### *isolasi dan seleksi bakteri lipolitik*

Dari 253 isolat yang dapat ditumbuhkan pada suhu 55°C, terdapat 43 isolat yang dapat tumbuh pada medium yang mengandung olive oil. Jumlah isolat yang menunjukkan aktivitas lipolitik ada 2 isolat, yaitu isolat 361 dan isolat 213. Isolat tersebut diseleksi pada media NA yang mengandung 10% olive oil dan 0,1% *Rhodamine-B*. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya zona jernih di sekeliling isolat. Berikut adalah isolat-isolat yang dapat tumbuh pada medium yang mengandung olive oil.

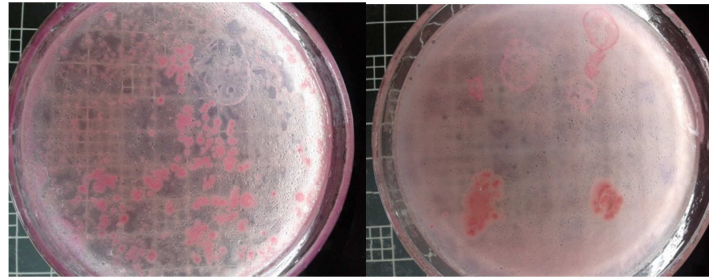
**Tabel 1.** Morfologi koloni isolat yang dapat tumbuh pada medium NA dengan 10% olive oil.

No	Isolat	Zona jernih	Suhu inkubasi 70°C	Suhu inkubasi 55°C	Morfologi Koloni				
					Warna	Bentuk	Ukuran	Tepi	Elevasi
1.	5	-		√	Putih susu	Sirkuler	Kecil	<i>Entire</i>	Rata
2.	6	-		√	Putih susu	Sirkuler	Kecil	<i>Entire</i>	Rata
3.	9	-		√	Putih susu	Irreguler	Kecil	<i>Entire</i>	Rata
4.	15	-		√	Putih susu	Irreguler	Kecil	<i>Entire</i>	Rata
5.	24	-		√	Putih susu	Irreguler	Kecil	<i>Entire</i>	Rata
6.	26	-		√	Putih susu	Sirkuler	Kecil	<i>Entire</i>	Rata
7.	38	-	√	√	Putih susu	Sirkuler	Kecil	<i>Entire</i>	Rata
8.	50	-		√	Putih susu	Sirkuler	Kecil	<i>Entire</i>	Rata
9.	52	-		√	Putih susu	Sirkuler	Sedang	<i>Entire</i>	Rata
10.	53	-	√	√	Merah	Sirkuler	Kecil	<i>Entire</i>	Rata
11.	68	-		√	Putih susu	Irreguler	Kecil	<i>undulate</i>	Rata
12.	93	-		√	Putih susu	Irreguler	Kecil	<i>undulate</i>	Rata

13.	101	-	√	√	Putih susu	Irreguler	Kecil	<i>undulate</i>	Rata
14.	106	-		√	Putih susu	Irreguler	Kecil	<i>undulate</i>	Rata
15.	114	-		√	Putih susu	Irreguler	Besar	<i>undulate</i>	Rata
16.	131	-		√	Putih susu	Sirkuler	Kecil	<i>Entire</i>	Rata
17.	132	-		√	Putih susu	Sirkuler	Kecil	<i>Entire</i>	Rata
18.	137	-		√	Putih susu	Irreguler	Besar	<i>undulate</i>	Rata
19.	140	-		√	Putih susu	Sirkuler	Besar	<i>Entire</i>	Rata
20.	142	-		√	Putih susu	Sirkuler	Kecil	<i>Entire</i>	Rata
21.	151	-		√	Putih susu	Sirkuler	Kecil	<i>Entire</i>	Rata
22.	153	-		√	Putih susu	Sirkuler	Kecil	<i>Entire</i>	Rata
23.	159	-		√	Putih susu	Sirkuler	Kecil	<i>Entire</i>	Rata
24.	163	-		√	Merah	Irreguler	Sedang	<i>undulate</i>	Rata
25.	172	-		√	Merah	Irreguler	Sedang	<i>lobate</i>	Rata
26.	174	-		√	Putih susu	Sirkuler	Kecil	<i>Entire</i>	Rata
27.	185	-		√	Putih susu	Sirkuler	Pinpoint	<i>Entire</i>	Rata
28.	186	-		√	Putih susu	Irreguler	Sedang	<i>undulate</i>	Rata
29.	187	-		√	Putih susu	Sirkuler	Pinpoint	<i>Entire</i>	Rata
30.	191	-		√	Putih susu	Sirkuler	Pinpoint	<i>Entire</i>	Rata
31.	194	-		√	Kuning	Sirkuler	Kecil	<i>Entire</i>	Rata
32.	197	-		√	Kuning	Irreguler	Sedang	<i>undulate</i>	Rata
33.	199	-	√	√	Putih susu	Sirkuler	Pinpoint	<i>Entire</i>	Rata
34.	204	-		√	Putih susu	Sirkuler	Pinpoint	<i>Entire</i>	Rata
35.	207	-		√	Putih susu	Sirkuler	Pinpoint	<i>Entire</i>	Rata
36.	208	-		√	Putih susu	Sirkuler	Pinpoint	<i>Entire</i>	Rata
37.	209	-	√	√	Putih susu	Sirkuler	Pinpoint	<i>Entire</i>	Rata
38.	213	√		√	Putih susu	Sirkuler	Pinpoint	<i>Entire</i>	Rata
39.	214	-		√	Putih susu	Irreguler	Pinpoint	<i>Entire</i>	Rata
40.	217	-		√	Putih susu	Irreguler	Kecil	<i>undulate</i>	Rata
41.	221	-		√	Putih susu	Sirkuler	Pinpoint	<i>Entire</i>	Rata
42.	361	√		√	Putih susu	Sirkuler	Pinpoint	<i>Entire</i>	Rata
43.	380	-		√	Putih susu	Sirkuler	Sedang	<i>Entire</i>	Rata

Dari hasil tersebut, tampak bahwa isolat 213 dan 361 merupakan isolat yang mempunyai kemampuan lipolitik.

Berikut adalah gambar zona jernih yang dihasilkan oleh dua isolat tersebut.



Gambar 1. Uji lipolitik isolat 213 (kiri) dan 361 (kanan).

Tabel 2. Diameter nisbah zona jernih yang dihasilkan isolat lipolitik.

Isolat	Diameter koloni (mm)	Diameter zona jernih (mm)	Nisbah zona jernih
213	1,15	2,6	2,26
361	2,6	6,57	2,53

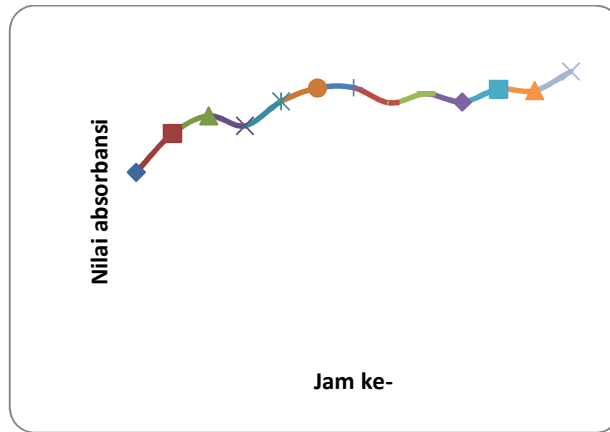
Secara umum, mikroorganisme dibagi dalam 4 kelompok berdasarkan suhu lingkungan di mana dia hidup, yaitu psikrofil, mesofil, termofil dan hipertermofil. Kelompok bakteri termofil termasuk dalam kelompok Archaeobacteria yang secara umum struktur selnya memiliki beberapa kelebihan dibanding kelompok bakteri lainnya. Kelompok ini umumnya memiliki daya adaptasi yang tinggi terhadap kondisi lingkungan yang bersifat ekstrim, seperti temperatur, kadar garam, pH, tekanan dan oksigen dimana mikroorganisma lain tidak dapat mempertahankan aktivitas hidupnya. Mikroorganisme termofil dapat bertahan hidup pada lingkungan yang ekstrim disebabkan karena struktur selnya yang mendukung kehidupan mikroorganisme tersebut di lingkungan yang ekstrim. Beberapa komponen struktur sel yang mendukung tersebut adalah membran sel. Membran sel setiap makhluk hidup tersusun atas senyawa lipid, protein dan karbohidrat. Bagian lipid terbesar yang menyusun membran sel adalah fosfolipid. Bagian lipid sel pada umumnya dihubungkan oleh ikatan ester, sedangkan pada organisme termofil senyawa lipid yang terdapat pada membran selnya memiliki ikatan eter. Ikatan ini terbentuk melalui proses kondensasi gliserol atau senyawa poliol kompleks lainnya dengan alkohol isoprenoid yang mengandung 20, 25 atau 40 atom karbon. Senyawa eter gliserol pada Archaeobacteria mengandung 2,3 *O-sn-gliserol* yang menyebabkan struktur lipoprotein dari membran sel termofil tersebut

lebih stabil. Selain struktur membrannya yang berbeda, sel pada organisme termofil memiliki sejumlah protein khusus. Dalam sel organisme termofil terdapat protein *chaperonin*, yaitu suatu protein yang berperan dalam mempertahankan kembali struktur tiga dimensi protein fungsional sel dari denaturasi akibat meningkatnya suhu lingkungan yang bersifat ekstrim. Protein ini memiliki struktur yang tetap stabil, tahan terhadap denaturasi dan proteolisis. Protein ini dapat membantu organisme termofil mengembalikan fungsi aktifitas enzimnya bila terdenaturasi oleh suhu yang tinggi. *Chaperonin* tersusun oleh molekul yang disebut *chaperone*, yang membentuk struktur *chaperonin* seperti tumpukan kue donat pada sebuah drum. Tiap cincin donat ini terdiri atas 7, 8 atau 9 subunit *chaperone* tergantung jenis organismanya. Dalam aktivitasnya mempertahankan struktur protein fungsional agar tetap stabil, *chaperonin* membutuhkan molekul ATP. Selain itu, pada organisme termofilik juga mengandung DNA gyrase yang merupakan salah satu anggota kelompok enzim topoisomerase yang berperan dalam mengontrol topologi DNA suatu sel dan memegang peran penting dalam proses replikasi dan transkripsi DNA. Semua jenis topoisomerase dapat merelaksasikan DNA tetapi hanya DNA gyrase yang dapat mempertahankan struktur DNA tetap berbentuk supercoil. DNA girase disusun oleh 90-150 pasangan basa-N DNA. DNA girase ini juga selalu dijumpai pada organisme yang hidup di lingkungan di atas 70°C dan juga dapat dijumpai

pada organisme yang hidup pada suhu sekitar 60°C. DNA girase ini merupakan salah satu kelengkapan sel dari organisme termofil.

Enzim diproduksi oleh bakteri pada fase eksponensial. Untuk mengetahui kapan

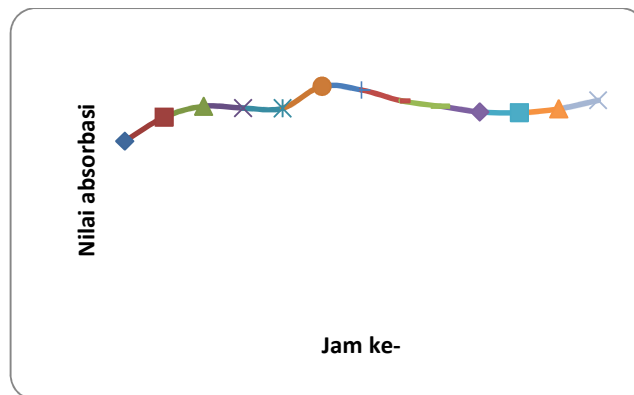
berlangsungnya fase tersebut, maka dibuat grafik kurva pertumbuhan untuk dua isolat terpilih yang ditumbuhkan pada medium NB yang mengandung 10% olive oil.



**Gambar 2.** Kurva pertumbuhan isolat 213 pada medium NB dengan 10% olive oil.

Gambar di atas adalah kurva pertumbuhan isolat 213 ditumbuhkan pada medium NB dengan 10% olive oil. Dari gambar

tersebut tampak bahwa isolat 213 mencapai puncak fase eksponensial pada jam ke-10.



**Gambar 3.** Kurva pertumbuhan isolat 361 pada medium NB dengan 10% olive oil.

Dari kurva pertumbuhan di atas, tampak bahwa isolat 361 memasuki puncak fase eksponensial dalam waktu yang sama, yaitu jam ke-10.

*pengaruh suhu dan pH terhadap kadar asam lemak bebas dan aktivitas enzim lipase*

Dari hasil pengujian kadar asam lemak bebas menggunakan metode titrasi dengan NaOH 0,05M, diperoleh data besar konsentrasi asam lemak bebas hasil hidrolisis olive oil seperti pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Pengaruh suhu dan pH terhadap konsentrasi asam lemak bebas (mmol), persentase hidrolisis dan aktivitas enzim.

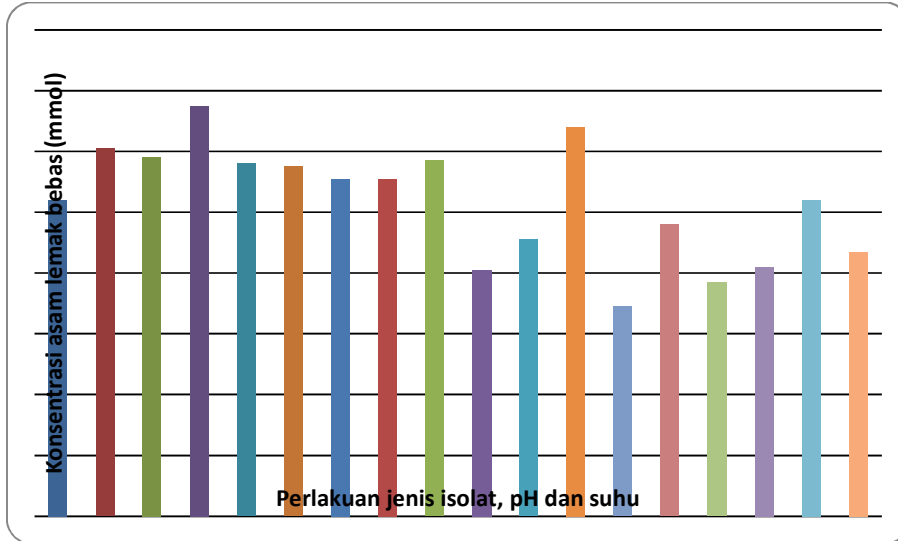
Isolat	pH	Suhu (°C)	Asam lemak bebas (mmol)	% hidrolisis	Aktivitas enzim (unit/jam)*
361	6	50	1,04	18,03	2,08
		60	1,21	20,97	2,42
		70	1,18	20,51	2,37
	7	50	1,35	23,31	2,69
		60	1,16	20,17	2,33
		70	1,15	19,99	2,31
	8	50	1,11	19,27	2,22
		60	1,11	19,30	2,23
		70	1,17	20,32	2,35
213	6	50	0,81	13,95	1,61
		60	0,91	15,69	1,81
		70	1,28	22,22	2,56
	7	50	0,69	11,96	1,38
		60	0,96	16,64	1,92
		70	0,77	13,29	1,53
	8	50	0,82	14,13	1,63
		60	1,04	18,09	2,09
		70	0,87	15,11	1,74

\*Aktivitas lipolitik dalam 1 unit didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dibutuhkan untuk menghidrolisis minyak menghasilkan 1 mmol produk selama 1 jam

Dari Tabel 3 tampak bahwa kadar asam lemak bebas tertinggi yang dihasilkan dari hidrolisis olive oil oleh enzim yang berasal dari isolat 361 adalah 1,35 mmol, yang diperoleh dari perlakuan inkubasi pada suhu 50°C dengan pH 7, sedangkan pada isolat 213, konsentrasi asam lemak bebas tertinggi yang dihasilkan adalah 1,28 mmol, yang diperoleh dari perlakuan suhu inkubasi 70°C dengan pH 6. Adapun persentase

hidrolisis tertinggi pada isolat 361 adalah 23,31%, sedangkan pada isolat 213 sebesar 22,22%. Aktivitas enzim tertinggi yang diisolasi dari isolat 361 yang tertinggi adalah 2,69 unit/jam, sedangkan dari isolat 213 sebesar 2,56 unit/jam. Perbedaan aktivitas enzim dari dua isolat bakteri ditunjukkan pada gambar di bawah ini.



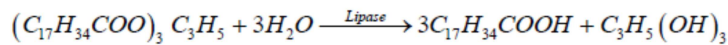


**Gambar 4.** Konsentrasi asam lemak bebas yang diperoleh dari hasil hidrolisis enzim lipase.

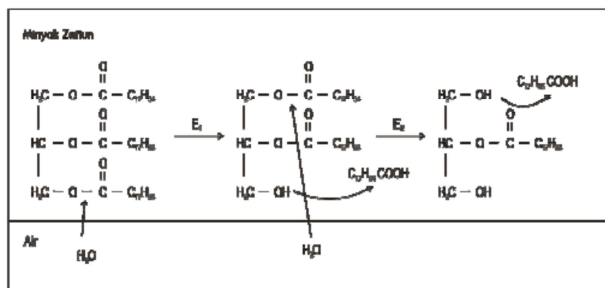
Dari gambar tersebut tampak bahwa kadar asam lemak naik seiring dengan kenaikan suhu, namun turun lagi pada perlakuan dengan suhu 70°C. Kadar asam lemak juga bervariasi dengan adanya perubahan pH.

Enzim lipase termostabil atau asilgliserol hidrolase (E.C 3.1.1.3) merupakan enzim yang dapat menghidrolisis rantai panjang trigliserida. Enzim ini memiliki potensi untuk digunakan memproduksi asam lemak, yang merupakan prekursor berbagai industri kimia. Enzim ini

digunakan untuk memecah lemak menjadi komponen asam lemak, yang amat dibutuhkan dalam metabolisme mikroorganisme yang bersangkutan. Enzim ini bersifat konstitutif artinya terus-menerus diekspresi tanpa membutuhkan inducer. Ekspresi enzim lipase meningkat saat mikroorganisme memasuki fase kematian karena jumlah produk lemak dari sel-sel yang mati meningkat. Reaksi hidrolisis trigliserida spesifik adalah sebagai berikut:



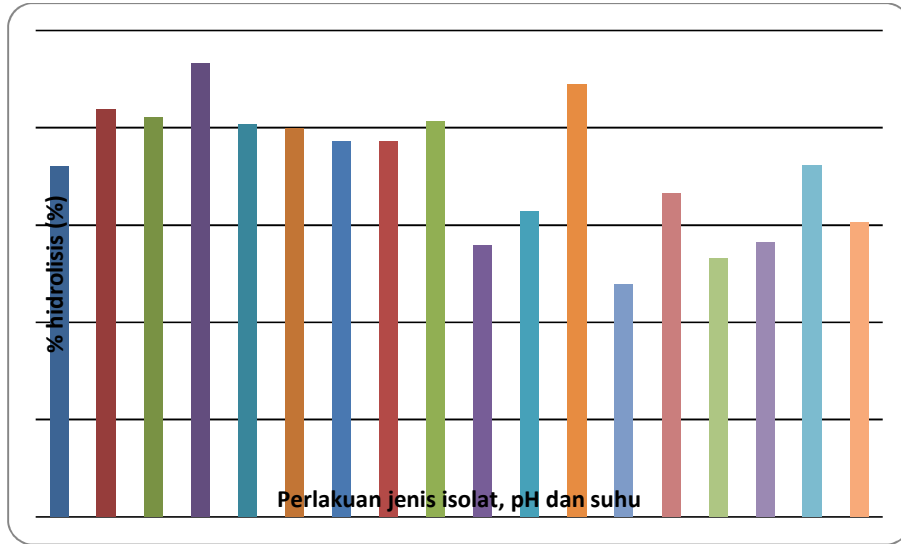
**Gambar 5.** Reaksi pemecahan triasilgliserol oleh lipase.



**Gambar 6.** Skema reaksi hidrolisis enzimatik spesifik pada *olive oil*.

Kemampuan enzim dalam mendegradasi olive oil dilihat dari % hidrolisis untuk melihat seberapa banyak pembentukan FFA per waktu.

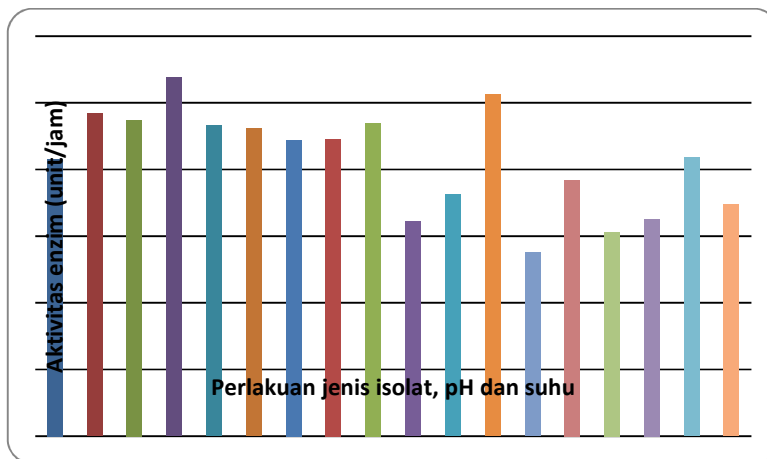
Berikut ini adalah hasil % hidrolisis dari isolat 361 dan 213 yang diberi perlakuan suhu, pH, dan jenis isolat yang disajikan pada Gambar 8.



**Gambar 7.** Persentase hidrolisis yang dilakukan oleh enzim selama 30 menit.

Dari gambar tersebut nampak bahwa % hidrolisis enzim tertinggi dicapai oleh isolat 361 yang diinkubasi pada suhu 50°C dan pH 7.

Kemampuan enzim dalam menghidrolisis olive oil dapat dilihat dari aktivitas enzim yang akan ditunjukkan pada gambar berikut ini.



**Gambar 8.** aktivitas enzim

Dari Gambar 8 tersebut tampak bahwa isolat 361 mempunyai aktivitas tertinggi pada suhu 50°C dan pH 7. Semakin meningkat suhu, aktivitas enzim tampak meningkat, namun aktivitas enzim menjadi turun pada suhu 80°C. Hasil yang berbeda juga ditunjukkan pada perlakuan dengan pH yang berbeda..

Peningkatan suhu dapat meningkatkan kecepatan reaksi, baik itu yang dikatalisis oleh enzim maupun yang tidak dikatalisis oleh enzim dengan meningkatkan energi kinetik dan frekuensi terjadinya tumbukan antara molekul-molekul yang bereaksi. Energi panas dapat meningkatkan energi kinetik enzim dan dapat

pula melampaui barrier energi sehingga dapat merusak interaksi non kovalen yang menjaga struktur tiga dimensi enzim. Rantai polipeptida enzim mulai terurai, atau mengalami denaturasi, yang diikuti dengan hilangnya aktivitas katalitik.

Kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim menunjukkan ketergantungan yang signifikan terhadap konsentrasi ion hidrogen. Hubungan aktivitas enzim terhadap konsentrasi ion hidrogen menunjukkan keseimbangan antara terjadinya denaturasi enzim pada pH yang terlalu rendah atau terlalu tinggi dan pengaruhnya pada perubahan status muatan pada enzim, substrat atau keduanya. Pada enzim yang mekanisme kerjanya melibatkan katalisis asam basa, residu yang terlibat harus berada pada status protonasi yang tepat untuk dapat berlangsungnya suatu reaksi.

Konsep tentang termostabilitas yang dimiliki oleh enzim yang berasal dari mikroorganisme termofil ini dilandaskan pada dua konsep yaitu pertama struktur molekular pada selnya yang memang tersusun oleh molekul protein yang termostabil, kedua termostabilitas itu berkaitan dengan adanya asosiasi senyawa protein enzim dengan molekul lainnya seperti lipid, polisakarida maupun protein lainnya yang menyebabkan terbentuknya suatu senyawa yang memiliki mekanisme yang memungkinkannya tetap stabil saat menghadapi kondisi yang dapat menginaktivasi.

Adapun faktor-faktor yang dianggap berhubungan dengan termostabilitas enzim-enzim dari mikroorganisme termofil bervariasi pada berbagai spesies termofil, namun beberapa hal umum yang ditemukan antara lain terjadinya peningkatan ikatan hidrogen dan *salt bridge* pada protein dari enzim termofilik. Selain itu ditemukan juga adanya perbedaan jenis dan komposisi asam amino penyusun protein enzim termofil bila dibandingkan dengan protein enzim yang mesofilik. Pada enzim termofilik terjadi penurunan jumlah sistein dan serin secara nyata, sedangkan jumlah arginin dan tirosin meningkat secara nyata. Asam amino prolin juga lebih sedikit ditemukan pada struktur  $\alpha$ -heliks pada protein termofilik.

## Kesimpulan

1. Isolat terbaik yang berpotensi dalam menghasilkan enzim lipase termostabil adalah isolat 361 dan 213.

2. Temperatur mempengaruhi aktivitas enzim lipase.
3. pH mempengaruhi aktivitas enzim lipase.
4. Setiap jenis isolat memiliki aktivitas enzim lipase yang berbeda.
5. Temperatur dan pH optimum untuk aktivitas enzim lipase pada isolat 361 adalah pada suhu 50°C dengan pH 7, sedangkan pada isolat 213 pada suhu 70°C dengan pH 6.

## Pustaka

- [1] M. W. W. Adam and R. M. Kelly, Chem. Eng. News (1995) pp. 32-42.
- [2] Muchtadi, S. Nurleni, dan Made, Enzim dalam Industri Pangan, Institut Pertanian Bogor, 1992.
- [3] C. and G. J. Zeikus, Microbiology And Molecular Biology Reviews, 1092-2172/01/\$04.0010 Vol. 65, No. 1 (2001) pp. 1–43.
- [4] R. Gupta, N. Gupta, P. Rathi, Appl Microbiol Biotechnol, 64 (2004) pp. 763–781.
- [5] T. D. Brock, and K. M. Brock, Thermophilic microorganism and life at high temperature, Springer Verlag, New York, 1978.