

**PRODUKSI ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ENZIM LIPASE DARI**

*Aspergillus oryzae* INDIGENUS



**NURUL FITRIAH  
H311 00 051**



PELOPOR	
Tgl. Terima	13-07-2005
Asal Dari	Buk - MIPA
Banyaknya	1 (satu) eks
Harga	H
No. Inventaris	316 / 13-7-05
No. MIPA	

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2005**

**PRODUKSI ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ENZIM LIPASE DARI**  
*Aspergillus oryzae* **INDIGENUS**

*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat  
untuk memperoleh gelar sarjana sains*

**Oleh**  
**NURUL FITRIAH**  
**H311 00 051**



**MAKASSAR**  
**2005**

**SKRIPSI**

**PRODUKSI ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ENZIM LIPASE DARI**

***Aspergillus oryzae* INDIGENUS**

**Disusun dan diajukan oleh**

**NURUL FITRIAH**

**H311 00 051**

**Skripsi telah diperiksa dan disetujui oleh:**

**Pembimbing Utama**



**Dra. Hj. Seniwati Dali, MSi**  
**NIP. 131 792 022**

**Pembimbing Pertama**



**Dr. Firman A.P., MSi**  
**NIP. 131 802 898**

*Teruntuk  
Teruntuk  
Ayahanda dan Ibunda  
tercinta dan terkasih*

## KATA PENGANTAR



Segala puji bagi Allah, SWT yang kasihNya senantiasa tercurah bagi segenap alam semesta raya orbit dari semua peredaran, pemberi petunjuk, limpahan karunia bagi penulis sehingga mampu menyelesaikan tugas akhir ini.

Sembah sujudku kupersembahkan untuk kedua orang tuaku tercinta Ayahanda **H. Dhamrah Bakrie, BA** dan Ibunda **Hj. Siti Normasyam**, terima kasih tulusku atas segala yang telah kalian berikan atas letih, peluh keringat dan do'amu dalam membentuk pribadi penulis.

Kepada saudara-saudaraku **Maulida Rahmah, SSi**, **Nasrum Nasir, ST**, **Nuril Farizah, SPi** dan adikku **Henry Gunawan** serta sahabat terbaikku **Marsela Onivika N.** yang tiada henti memberikan dorongan serta semangat kepada penulis.

Terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada Ibu **Dra. Hj. Seniwati Dali, MSi** selaku Pembimbing Utama dan Bapak **Dr. Firman A.P., MSi** selaku pembimbing Pertama, yang telah berkenan meluangkan waktu dan tenaganya dalam membimbing dan memberikan petunjuk yang begitu berharga dari awal penelitian hingga selesainya penyusunan skripsi ini.

Tak lupa ucapan terima kasih penyusun haturkan kepada:

1. Bapak Prof. Dr. H. Alfian Noor selaku Dekan Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin serta Bapak Drs. Alimin Bado, M.S., Bapak Alex Palinggi, M.S., serta Bapak Drs. H. Burhanuddin Taebe, masing-masing selaku Pembantu Dekan I, Pembantu Dekan II, Pembantu dekan III Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin.

2. Bapak Dr. Ir. Prastawa Budi dan Ibu Dra. Hj. Hasnah Natsir, M.Si masing-masing selaku Ketua dan Sekretaris Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin.
3. Tim penguji Bapak Drs. Beddu Jawahir, MS (Ketua merangkap anggota), Ibu Dra. Hj. Rohani Bahar, MSi (Sekretaris merangkap anggota), Ibu Dra. Hj. Seniwati Dali, MSi (ex officio), Bapak Drs. Syarifuddin Liong, MS (anggota), Bapak Ir. Abd. Hayat Kasim, MT (anggota) dan Bapak Dr. Firman A.P., MSi (ex officio). Seluruh staf dosen dan pegawai Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin.
4. Bapak Prof. DR. H. Umar Ubbe, MSi selaku pembimbing akademik yang telah memberikan banyak masukan, dorongan dan bimbingan kepada penulis.
5. Ibu Dra. Zaraswati selaku dosen mikrobiologi yang telah memberikan banyak masukan, bantuan dan bimbingan kepada penulis.
6. Seluruh staf dosen dan pegawai Teknik Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang yang telah memberikan bantuan dan masukan kepada penulis.
7. Untuk sahabatku **Wery Aslinda**, **Ainun Hadianita**, dan **Darnah** thanks for your love and support it make me strong, time and place can't make our friendship finish.
8. Terima kasih untuk: **Agnesta Theresia N.**, anak-anak kost **C2/2**, nirma, sarah SPi, mardia, A. nurhayati SSi, irma SSi, sri aryani SSi, asdiyani SSi, nirmala SSi, nursyamsiar SSi, rosmawaty SSi, hariyati, dwi, fransina, inna, yulia, kak hera, farida SSi, ardiyanti SSi, irianti, sopyan, shafaa SSi, A. saipul, ismail, dan teman-temanku yang tidak bisa saya sebutkan satu-persatu terima kasih atas bantuan dan kasih sayangnya. Semoga persaudaraan kita senantiasa terjalin erat walau terpisah jarak dan waktu. Adik-adikku (01, 02, 03, dan 04) yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu terima kasih atas bantuannya.

Penulis sadar akan kekurangan dalam skripsi ini baik materi maupun teknik penulisannya, oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun dalam perbaikan skripsi ini.

Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat dalam pengembangan wawasan bidang ilmu kimia secara umum dan bidang ilmu Biokimia khususnya.

Penulis

2005

## ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi fungi penghasil enzim lipase ekstrasellular yang diisolasi dari kopra, dengan menggunakan medium agar selektif pepton-minyak zaitun. Hasil isolasi dan identifikasi secara mikroskopik menunjukkan bahwa ada dua jenis fungi yaitu *Aspergillus oryzae* dan *Aspergillus niger*. *Aspergillus oryzae* aktif memproduksi enzim lipase tertinggi dalam medium produksi pepton-minyak kelapa pada hari ke delapan dengan aktivitas enzim lipase 4,940 Unit/mL. Uji aktivitas enzim lipase dari *Aspergillus oryzae* menggunakan metode Vorderwulbecke dengan substrat spesifik p-nitrophenil butirat (p-NB). Karakteristik enzim lipase dari *Aspergillus oryzae* dilakukan dengan penentuan pH dan suhu optimum. Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim lipase dari *Aspergillus oryzae* galur lokal berkerja secara optimal pada pH 9 dan suhu 35 °C, dengan aktivitas spesifiknya 0,327 Unit/mg.

**Kata kunci:** p-nitrophenil butirat (p-NB), Lipase ekstrasellular, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, Kopra.



## ABSTRACT

This research was aimed to isolate and identify fungi production an extracellular lipase by a fungal isolated from kopra, by using pepton-olive oil agar plates. Isolated and identification with microscope showed that at least two kinds of fungal are *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. *Aspergillus oryzae* produced lipases reached actively maximal in peptone-coconut oil medium after 8 days of incubation with 4,940 Unit/mL lipase activity. Lipase activities from *Aspergillus oryzae* were assessed by using Vorderwulbecke method with p-nitrophenyl butyrate (p-NB) as specific substrate. The characterization of lipases from *Aspergillus oryzae* was determined with pH and optimum temperatures. The optimum lipase activity result showed that lipase activity from *Aspergillus oryzae* indigenus achieved pH 9 and 35°C, with specific activity 0,327 Unit/mL.

**Key words:** p-nitrophenil butirat (p-NB), Extracellular lipase, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, Kopra

## DAFTAR ISI

	<b>halaman</b>
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN JUDUL DENGAN SPESIFIKASI.....	ii
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Maksud Penelitian.....	3
1.3.2 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3

BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	4
2.1 Uraian enzim.....	4
2.1.1 Penggolongan Enzim.....	5
2.1.2 Sifat-sifat Enzim.....	6
2.1.3 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Kerja enzim.....	6
2.1.4 Kofaktor.....	9
2.1.5 Sifat Katalis Enzim.....	10
2.1.6 Teknologi Enzim.....	10
2.2 Enzim Lipase.....	11
2.2.1 Lipid.....	14
2.3 Isolasi dan Pemurnian Enzim.....	15
2.4 Uraian Jamur.....	16
2.4.1 Jamur <i>Aspergillus oryzae</i> .....	16
2.4.2 Taksonomi <i>Aspergillus oryzae</i> .....	17
2.5 Teknik Biakan Murni .....	18
2.5.1 Media.....	19
2.5.2 Sterilisasi.....	20
2.6 Spektrofotometer.....	20
 BAB III METODE PENELITIAN.....	 21
3.1 Alat dan Bahan yang digunakan.....	21
3.1.1 Bahan.....	21
3.1.2 Alat.....	21
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	21

3.3 Cara Kerja.....	22
3.3.1 Pembuatan Media.....	22
3.3.2 Produksi Lipase.....	23
3.3.2.1 Isolasi Mikroba.....	23
3.3.2.2 Penyiapan Inokulum <i>Aspergillus oryzae</i> indigenus.....	23
3.3.2.3 Produksi Enzim Lipase dari Isolat <i>Aspergillus oryzae</i> indigenus.....	24
3.3.3 Uji Aktivitas Enzim dengan Metode Vorderwulbecke.....	24
3.3.4 Penentuan Kadar Protein Enzim Lipase.....	24
3.3.5 Karakterisasi Enzim Lipase.....	25
3.3.5.1 Penentuan pH Optimum.....	25
3.3.5.2 Penentuan Suhu Optimum.....	25
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	 26
4.1 Isolasi fungi <i>Aspergillus oryzae</i> indigenus.....	26
4.2 Produksi dan Isolasi Enzim Lipase dari <i>Aspergillus oryzae</i> indigenus.....	26
4.3 Karakteristik Enzim Lipase dari <i>Aspergillus oryzae</i> indigenus.....	30
4.3.1 Penentuan pH Optimum Terhadap Aktivitas Enzim Lipase dari <i>Aspergillus oryzae</i> indigenus.....	30
4.3.2 Penentuan Suhu Optimum Terhadap Aktivitas Enzim Lipase dari <i>Aspergillus oryzae</i> indigenus.....	32
4.4 Penentuan Aktivitas Spesifik.....	34

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	35
5.1 Kesimpulan .....	35
5.2 Saran .....	35
DAFTAR PUSTAKA .....	36
LAMPIRAN.....	40

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>halaman</b>
1. Produksi enzim lipase dari fungi <i>Aspergillus oryzae</i> indigenus.....	28
2. Penentuan pH optimum enzim lipase dari fungi <i>Aspergillus oryzae</i> indigenus .....	31
3. Penentuan suhu optimum enzim lipase dari fungi <i>Aspergillus oryzae</i> indigenus.....	33
4. Penentuan aktivitas spesifik enzim lipase dari fungi <i>Aspergillus oryzae</i> indigenus.....	34

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim.....	7
2. Pengaruh pH terhadap laju reaksi enzimatik.....	7
3. Pengaruh konsentasi enzim terhadap laju reaksi enzimatik.....	8
4. Kompleks enzim-substrat.....	10
6. Fungi <i>Aspergillus</i> .....	17
7. Waktu produksi enzim lipase yang dihasilkan dari fungi <i>Aspergillus oryzae</i> indigenus.....	28
8. Reaksi antara p-NB dengan enzim lipase.....	30
9. Penentuan pH optimum enzim lipase dari fungi <i>Aspergillus oryzae</i> indigenus.....	31
10. Penentuan suhu optimum enzim lipase dari fungi <i>Aspergillus oryzae</i> indigenus.....	33

## LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Komposisi media .....	40
2. Komposisi pereaksi A, pereaksi B, pereaksi C, dan pereaksi D .....	41
3. Tabel dan grafik kurva kalibrasi serapan (A) terhadap konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ ) bovine serum albumin (BSA).....	42
4. Tabel dan grafik penentuan panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{\text{max}}$ ) pada uji aktivitas enzim lipase.....	43
5. Tabel dan grafik panjang gelombang maksimum pada penentuan kadar protein.....	44
6. Perhitungan aktivitas enzim lipase.....	45
7. Perhitungan kadar protein enzim.....	49
8. Tabel pembuatan buffer phospat.....	50
9. Pembuatan buffer Tris-HCl 0,05 M.....	51
10. Skema kerja.....	52
11. Gambar medium fermentasi dan inokulum.....	53
12. Gambar medium fermentasi fungi <i>Aspergillus oryzae</i> indigenus.....	54
13. Gambar kopra yang berjamur.....	55
14. Identifikasi fungi <i>Aspergillus oryzae</i> secara mikroskopis.....	56



# BAB I

## PENDAHULUAN



### 1.1 Latar Belakang

Kopra merupakan salah satu andalan ekspor sektor pertanian di Indonesia. Kopra mengandung asam lemak tidak jenuh. Asam lemak adalah asam organik yang terdapat sebagai ester trigliserida atau lemak, baik yang berasal dari hewan atau tumbuhan. Asam lemak tidak jenuh dapat mengandung satu ikatan rangkap atau lebih dan mempunyai rantai karbon yang panjang.

Pada kopra yang rusak terdapat berbagai jenis mikroba yang tumbuh seperti bakteri dan fungi. Hal ini terjadi karena pembuatan dan penyimpanan kopra yang tidak baik atau kurang steril (Anonim, 2004). Mutu kopra dipengaruhi oleh dua faktor yaitu kelapa dan kadar air. Berdasarkan studi lapangan yang telah dilakukan, salah satu jenis fungi yang tumbuh pada kopra yang rusak adalah genus *Aspergillus*. Fungi *Aspergillus oryzae* berwarna hijau kekuningan banyak terdapat pada bahan-bahan pangan. Fungi ini dalam metabolismenya memproduksi enzim lipase yang berkerja menghidrolisis lemak dan minyak pada kopra.

Enzim adalah salah satu jenis protein yang reaktif dan terdapat di alam dengan sangat bervariasi. Di alam, enzim berperan sebagai pengatur metabolisme dan biosintesa, juga berperan dalam reaksi-reaksi kimia baik di laboratorium maupun dalam proses industri (Lehninger, 1992).

Berdasarkan studi literatur yang telah dilakukan, salah satu kelompok enzim yang paling banyak digunakan saat ini adalah enzim lipase, karena enzim lipase merupakan biokatalisator untuk reaksi hidrolisis dan sintesis senyawa ester. Berdasarkan hasil

penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Helisto dan Korpela (1998) isolat fungi *Penicillium* dan *Aspergillus* dapat menghasilkan enzim lipase dengan aktivitas hidrolisis senyawa esterase (p-NB). Enzim lipase berpotensi dalam sintesis senyawa organik seperti senyawa ester. Aplikasi lain yang penting dari enzim lipase adalah lipase memiliki enantio-/stereoselektif alami yaitu kemampuan untuk memisahkan senyawa enantiomer-enantiomer suatu pasangan rasemik. Kemurniaan senyawa enantiomer sangat penting dalam kimia farmasi, pertanian, dan sintesis senyawa organik. Stereospesifik suatu lipase tergantung pada struktur dari substrat, interaksi pada sisi aktif dan kondisi reaksi (Reetz, 2001; Lavayre *et al*, 1982; Muralidhar *et al*, 2002).

Dewasa ini, lipase adalah enzim yang berkembang pesat dalam bioteknologi. Oleh sebab itu enzim lipase digunakan secara luas dalam berbagai bidang yaitu: aplikasi industri, seperti teknologi pangan, deterjen, industri kimia dan ilmu kedokteran. Penggunaan enzim lipase untuk hidrolisis memberikan banyak keuntungan karena reaksi dapat berlangsung pada suhu dan tekanan yang tidak terlalu tinggi, pH sekitar netral sehingga kerusakan produk dapat dikurangi (Jaeger *et al*, 1994).

## 1.2 Rumusan Masalah

Kemampuan enzim yang unik dalam melaksanakan transformasi kimianya yang khas ketika diisolasi telah meningkatkan penggunaan enzim dalam berbagai proses industri, yang secara kolektif dinamakan teknologi enzim. Salah satu teknologi yang dikembangkan adalah teknologi enzim dari mikrobiologi untuk mempercepat proses katalisis sehingga dapat mengurangi biaya produksi.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui beberapa rumusan masalah yaitu:

1. Bagaimana metode isolasi enzim lipase dari fungi *Aspergillus oryzae* yang di

isolasi dari kopra.

2. Waktu produksi enzim (waktu optimum) untuk memperoleh enzim dengan aktivitas yang tinggi.
3. Bagaimana karakteristik dan aktivitas spesifik enzim lipase yang di isolasi dari fungi *Aspergillus oryzae* indigenus yang di isolasi dari kopra.

### **1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Maksud Penelitian**

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi fungi *Aspergillus oryzae* dari kopra yang rusak dan untuk mengetahui karakteristik enzim lipase yang dihasilkan dari *Aspergillus oryzae* indigenus.

#### **1.3.2 Tujuan Penelitian**

1. Memproduksi enzim lipase dari isolat *Aspergillus oryzae* indigenus.
2. Menentukan aktivitas spesifik enzim lipase dari *Aspergillus oryzae* indigenus.
3. Menentukan suhu dan dan pH optimum enzim lipase dari *Aspergillus oryzae* indigenus.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

Sebagai bahan informasi tentang isolasi dan identifikasi fungi penghasil enzim lipase dari kopra rusak dan karakteristik enzim lipase yang diproduksi dari fungi *Aspergillus oryzae* indigenus. Data yang diperoleh dapat dijadikan sebagai acuan dalam memproduksi enzim lipase dari fungi.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Uraian Enzim

Enzim merupakan molekul organik yang kompleks dan terdapat dalam sel-sel hidup, yang didalamnya enzim berkerja sebagai katalisator untuk menimbulkan perubahan kimiawi pada berbagai substansi. Dengan berkembangnya ilmu biokimia, pemahaman terhadap berbagai enzim yang ada dalam sel-sel hidup dan cara kerjanya semakin meningkat. Tanpa adanya enzim, tidak mungkin terdapat kehidupan. Meskipun enzim hanya terbentuk dalam sel-sel hidup, banyak diantaranya dapat dipisahkan dari selnya dan bisa terus berkerja secara *in vitro* (Smith, 1995).

Enzim dikenal untuk pertama kalinya sebagai protein oleh Summer pada tahun 1926 yang telah berhasil mengisolasi urease dari 'kara pedang' (jack bean). Selanjutnya makin banyak enzim yang telah dapat diisolasi dan telah dibuktikan bahwa enzim tersebut ialah suatu protein (Poedjiadi, 1994).

Aktivitas enzim umumnya bersifat spesifik. Nomenklatur yang mula-mula digunakan, sangat sederhana; yaitu dengan mencantumkan akhiran-ase pada nama substrat dimana enzim itu berkerja. Misalnya proteinase, yaitu enzim yang berkerja pada protein, karbohidrase, yaitu enzim yang berkerja pada karbohidrat, lipase, yaitu enzim yang berkerja pada lipid. Ada pula yang mencantumkan akhiran-ase pada jenis reaksinya misalnya oksidase, yaitu enzim yang bereaksi secara oksidasi; reduktase, yaitu enzim yang bereaksi secara reduksi. Namun semuanya itu masih memberikan kesimpang siuran atau kurang tepatnya nomenklatur enzim sehingga oleh International Union of

Biochemistry (IUB) menganut satu aturan kode dengan cara membagi enzim ke dalam enam kelas (Hardjasmita, 1992).

### 2.1.1 Penggolongan Enzim

Penggolongan ini berdasarkan atas reaksi kimia dimana enzim memegang peranan. Enam golongan tersebut ialah:

#### 1. Oksidoreduktase

Enzim-enzim yang termasuk dalam golongan ini dapat dibagi dalam dua bagian yaitu dehidrogenase dan oksidase.

#### 2. Transferase

Enzim yang termasuk golongan ini berkerja sebagai katalis pada reaksi pemindahan suatu gugus dari suatu senyawa kepada senyawa lain.

#### 3. Hidrolase

Enzim yang termasuk dalam kelompok ini berkerja sebagai katalis pada reaksi hidrolisis. Ada tiga jenis hidrolase, yaitu yang memecah ikatan ester, memecah glikosida dan yang memecah ikatan peptide.

#### 4. Liase

Enzim yang termasuk golongan ini mempunyai peranan penting dalam reaksi pemisahan suatu gugus dari suatu substrat (bukan cara hidrolisis) atau sebaliknya.

#### 5. Isomerase

Enzim yang termasuk golongan ini berkerja pada reaksi perubahan intramolekular.

## 6. Ligase

Enzim yang termasuk golongan ini berkerja pada reaksi-reaksi penggabungan dua molekul. Ikatan yang terbentuk dari penggabungan tersebut adalah ikatan C-O, C-S, C-N atau C-C (Poedjiadi, 1994).

### 2.1.2 Sifat-sifat Enzim

Enzim mempunyai sifat-sifat sebagai berikut: (1) Biokatalisator, mempercepat jalannya reaksi tanpa ikut bereaksi, (2) Thermolabil, mudah rusak bila dipanasi lebih dari suhu 60°C karena enzim tersusun dari protein yang mempunyai sifat thermolabil, (3) Merupakan senyawa protein sehingga sifat protein tetap melekat pada enzim, (4) Berkerjanya ada yang di dalam sel dan di luar sel, (5) Umumnya enzim berkerja mengkatalisis reaksi satu arah, meskipun ada juga yang mengkatalisis pembentukan dan penguraian lemak, (6) Bekerjanya spesifik; enzim bersifat spesifik, karena bagian yang aktif (permukaan tempat melekatnya substrat) hanya setangkup dengan permukaan substrat tertentu, dan (7) Umumnya enzim tak dapat bekerja tanpa adanya suatu zat non protein tambahan yang disebut kofaktor (Praweda, 2004).

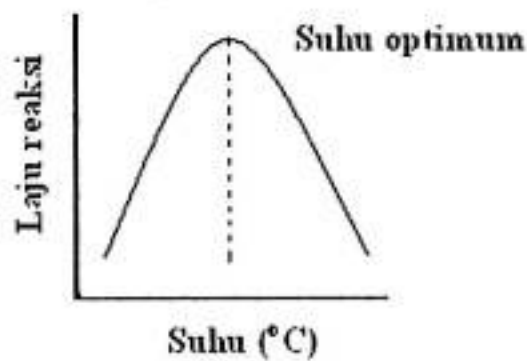
### 2.1.3 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim

Kecepatan reaksi enzimatik dipengaruhi oleh beberapa faktor, misalnya:

#### 1. Suhu

Diawali pada suhu 0°C (partikel enzim tidak bergerak). Selanjutnya setiap kenaikan suhu 10°C menaikkan kecepatan reaksi enzimatik dua kali lipat. Ini berlangsung sampai dicapai suhu optimal enzim yang bersangkutan (Hardjasmita, 1992). Aktivitas enzim mencapai optimum pada suhu tertentu yang

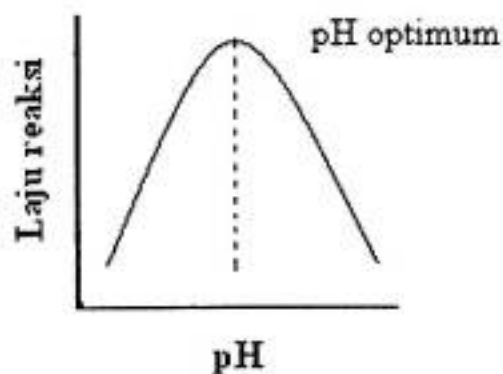
disebut sebagai suhu optimum. Pada suhu yang lebih rendah dari suhu optimumnya, aktivitas enzim juga menurun. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim ditunjukkan pada Gambar 2.1 berikut ini:



Gambar 2.1 Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim

## 2. Keasaman (pH)

Seperti protein pada umumnya, struktur ion enzim tergantung pada pH lingkungannya. Enzim dapat berbentuk ion positif, ion negatif atau ion bermuatan ganda (zwitter ion) (Poedjiadi, 1994). Hubungan antara aktivitas enzim dengan pH lingkungan seperti ditunjukkan pada Gambar 2.2 berikut ini:



Gambar 2.2 Pengaruh pH terhadap laju reaksi enzimatik

### 3. Inhibitor

Berdasarkan daya kerjanya maka kita bedakan dua macam inhibitor :

#### a. Inhibitor kompetitif

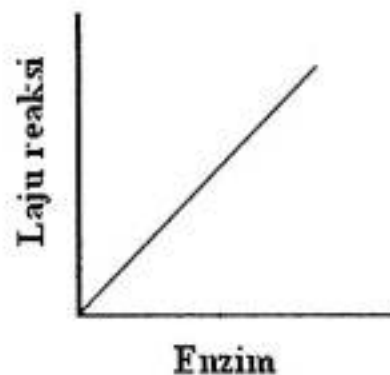
Inhibitor kompetitif mempunyai bentuk molekul yang mirip dengan substrat yang sebenarnya untuk enzim tersebut. Inhibitor kompetitif pengaruhnya bersifat reversibel.

#### b. Inhibitor non kompetitif

Inhibitor non kompetitif tidak dipengaruhi oleh besarnya konsentrasi substrat. Contoh inhibitor non kompetitif adalah pengaruh ion logam berat terhadap sifat protein molekul enzim, sehingga merubah konformasi molekul enzim dan mengakibatkan tidak terdapat kontak reaksi antara molekul enzim-substrat.

### 4. Kadar enzim

Kadar enzim berbanding lurus dengan kecepatan reaksi enzim. Kadar enzim tidak mempengaruhi konstanta keseimbangan. Semakin besar konsentrasi enzim, makin cepat laju reaksi. Dapat dikatakan, pada konsentrasi enzim yang besar, peluang besar, peluang untuk substrat diolah oleh enzim menjadi semakin besar.



Gambar 2.3 Pengaruh konsentasi enzim terhadap laju reaksi enzimatik



## 5. Kadar substrat

Ditinjau dari kerja enzim pada substrat tunggal. Apabila kadar substrat dinaikkan, kecepatan reaksi enzim meningkat bila kadar substrat terus dinaikkan, pada kadar substrat tertentu dicapai kecepatan reaksi enzim yang maksimal ( $V_{maks}$ ). Setelah  $V_{maks}$  dicapai, penambahan kadar substrat tidak lagi meningkatkan kecepatan reaksi enzim (Hardjasasmita, 1992).

### 2.1.4 Kofaktor

Sejumlah besar enzim membutuhkan suatu komponen lain untuk dapat berfungsi sebagai katalis, komponen ini secara umum disebut kofaktor. Kofaktor dapat dibagi dalam tiga kelompok yaitu:

#### a. Gugus prostetik

Gugus prostetik ialah kelompok kofaktor yang terikat pada enzim dan tidak mudah terlepas dari enzimnya.

#### b. Koenzim

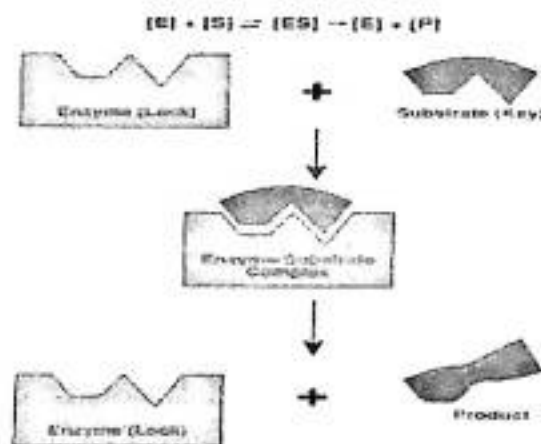
Bagian enzim yang tidak tersusun dari protein, tetapi dari ion-ion logam atau molekul-molekul organik (Praweda, 2004).

#### c. Aktivator

Aktivator pada umumnya adalah ion-ion logam yang dapat terikat atau mudah terlepas dari enzim yang berperan sebagai stabilisator agar enzim tetap aktif. Contoh aktivator logam ialah  $K^+$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Cu^{++}$  atau  $Zn^{++}$  (Poedjiadi, 1994).

### 2.1.5 Sifat Katalis Enzim

Sebagai katalis, enzim mirip dengan katalis lain, yang umumnya senyawa yang jauh lebih kecil, seringkali berupa senyawa anorganik dan bahkan berupa logam. Sifat inilah yang memungkinkan aneka reaksi dapat berlangsung di dalam sel. Dalam mengkatalisis suatu reaksi diasumsikan enzim berikatan lebih dulu dengan substrat. Akibat ikatan ini, terbentuklah suatu senyawa baru, yang dinamai kompleks **enzim-substrat**. Konsep kerja enzim dikembangkan oleh Emil Fischer di tahun 1894 yang mempopulerkan fenomena "gembok dan kunci" untuk menjelaskan interaksi substrat enzim (Sadikin, 2002).



Gambar 2.4 Kompleks enzim-substrat (Pugh, R and Chalfont (1993) dalam <http://suharjawanasuria.tripod.com>, 2004)

### 2.1.6 Teknologi Enzim

Teknologi enzim mencakup produksi, isolasi, pemurnian, serta penggunaan enzim dalam bentuk dapat-larut dan akhirnya amobilisasi serta pemakaian enzim dalam banyak jenis sistem reaktor. Enzim digunakan secara luas dalam bidang industri, terutama industri bioteknologi. Dalam bidang teknologi lingkungan, enzim juga digunakan dalam pengolahan air limbah serta dalam pengolahan sampah, terutama sampah organik.

Penggunaan lain yang tidak kalah luas dan pentingnya dari enzim ialah pemanfaatan enzim untuk tujuan diagnosis penyakit (Sadikin, 2002).

Sebagian besar enzim yang dipakai dalam industri adalah enzim hidrolase dan jenis enzim ini dapat berkerja tanpa adanya kofaktor yang kompleks. Enzim-enzim hidrolase mudah dipisahkan dari mikroorganisme tanpa memecahkan dinding sel dan bersifat dapat larut dalam air. Untuk menguji aktivitas enzim secara kuantitatif perlu diketahui hal-hal berikut ini:

1. Sifat reaksi yang dikatalisisnya
2. Kofaktor dan koenzim yang dibutuhkan
3. Konsentrasi baik substrat maupun kofaktor atau koenzim
4. pH optimum
5. Suhu optimum
6. Metode analitik sederhana untuk menentukan lenyapnya substrat atau munculnya produk-produk reaksi.

Aktivitas enzim dapat diatur melalui dua cara: (1) pengendalian katalisis secara langsung dan (2) pengendalian genetik. Pengendalian langsung kegiatan enzim dapat berupa pengendalian melalui pengganggangan mekanisme katalitik dengan proses-proses lain. Pengendalian genetik mencakup fenomena induksi dan represi enzim (Pelczar, 1986).

## **2.2 Enzim Lipase**

Lipase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis trigliserida menjadi gliserida, monogliserida, gliserol dan asam lemak. Dalam kondisi tertentu, lipase juga dapat mengkatalisis reaksi sebaliknya (sintesis, reaksi esterfikasi) membentuk gliserida

dari asam lemak dan gliserol. Lipase adalah suatu glikoprotein dengan berat molekul 48.000 dan dibuat serta disekresikan oleh kelenjar pankreas, lipase bekerja terhadap senyawa yang tidak larut dalam air, enzim lipase hanya dapat mengolah lemak yang bersinggungan dengan permukaan air (Sadikin, 2002).



Di alam enzim lipase terdapat dimana mana dan diproduksi oleh beberapa tumbuhan, binatang dan mikroorganisme. Sebagian besar enzim lipase diproduksi oleh mikroorganisme, yaitu bakteri dan fungi. Enzim lipase adalah kelompok enzim yang secara luas penggunaan dalam aplikasi bioteknologi dan kimia organik. Hal ini berhubungan dengan kelebihan enzim seperti aktivitas enzim pada temperatur dan cakupan pH yang luas, spesifik substrat, dan cakupan substrat yang berbeda. Permintaan akan enzim lipase semakin meningkat dalam beberapa industri, seperti makanan, deterjen, kimia, farmasi, dan lain lain (Gupta *et al*, 2004).

Kemampuan katalitik enzim lipase dapat ditingkatkan lebih lanjut dan dibuat selektif oleh perubahan molekular yang baru dan modifikasi pelarut serta pendekatan molekular seperti struktur protein (Jaeger *et al*, 1994).

Bakteri penghasil enzim lipase kebanyakan bakteri ekstrasellular yang mana metabolisme bakteri ini sangat dipengaruhi oleh nutrisi dan faktor fisika-kimia, seperti temperatur, pH, sumber nitrogen dan karbon, adanya lemak, garam-garam anorganik, guncangan dan konsentrasi oksigen dalam larutan (Kim *et al*, 1996). Liu dan Tsai (2003) melaporkan bakteri *A. radioresistens* memproduksi enzim lipase alkali.

Kazlaus dan Bornscheuer (1998) melaporkan bahwa lipase dari *P. cepacia* adalah suatu katalisator yang populer dalam sintesis organik karena memiliki resolusi kinetik dari campuran racemik alkohol sekunder dalam hidrolisis, esterifikasi dan

transesterifikasi (Schulz *et al*, 2000). Demikian juga Godfrey dan West (1996) melaporkan enzim lipase dari *Achromobacter sp.* merupakan lipase alkali. Enzim-enzim yang mempunyai pH optimum alkali memberikan nilai lebih tersendiri pada industri terutama industri tekstil. Pada beberapa mikroba yang telah diisolasi memiliki enzim yang bersifat alkali (Gupta *et al*, 2004).

Lipase yang diisolasi dari *Bacillus J33* bersifat alkali, termostabil dan kelarutan yang tinggi dalam pelarut organik sehingga dapat digunakan sebagai katalis dalam sintesis ester dan immobilisasi enzim dalam n-hexana (Nawani *et al*, 1998). Demikian pula lipase dari *Candida rugosa* diketahui mempunyai kemampuan yang tinggi untuk mengkonsentrasikan asam lemak omega-3 dalam campuran gliserida dengan cara hidrolisis minyak ikan (Utami dkk, 2001).

Pengetahuan tentang perilaku enzim lipase dalam masalah deterjen dimanfaatkan untuk tujuan industri dan ilmiah. Tujuan studi ini adalah untuk mengevaluasi efek beberapa deterjen yang bersifat ionik dan nonionik pada aktivitas enzim lipase prokaryotik dan eukaryotik dengan menggunakan fotometrik yang umum untuk menguji kadar logam dengan p-nitrophenylbutyrate sebagai substratnya (Helisto dan Korpela, 1998).

Beberapa sumber lipase dari bakteri antara lain: *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Acinetobacter sp.*, *A. calcoaceticus*, dan *Pseudomonas*. Lipase dari bakteri *Pseudomonas* paling banyak digunakan untuk berbagai aplikasi bioteknologi seperti industri deterjen (Jaeger *et al*, 1994; Pandey *et al*, 1999; Barbaro *et al*, 2001; Dharmsthiti *et al*, 1998).

Fungi adalah salah satu sumber lipase yang lebih baik karena enzim yang dihasilkan fungi umumnya dikeluarkan secara ekstrasellular, melalui ekstraksi media fermentasi. Sumber-sumber lipase dari fungi antara lain: *Mucor pusillus*, *Aspergillus carneus*, *A. niger*, *Penicillium sp.*, *Mucor meihei*, dan *Candida rugosa* (Somkuti dan Babel, 1986; Helisto dan Korpela, 1998; Ward *et al*, 1997; Hernaiz *et al*, 1999).

Penelitian terbaru produksi enzim lipase dari fungi *Fusarium solani* yang diisolasi dari buah *Carica papaya* telah dipelajari dalam kaitan dengan produksi enzim, pemurniaan dan kekayaan protein (Maia *et al*, 1999). Selain itu berdasarkan studi lapangan yang telah dilakukan ditemukan ada dua jenis fungi penghasil enzim lipase yang diisolasi dari kopra rusak yaitu dari genus *Aspergillus*.

Aktivitas enzim lipase diukur dengan menggunakan substrat spesifik seperti *p*-nitrophenyl butyrate, *p*-nitrophenyl caprylate, *p*-nitrophenyl palmitate, *p*-nitrophenyl laurate (Helisto dan Korpela, 1998; Tsujita *et al*, 1989; Mai *et al*, 1999)

### 2.2.1 Lipid

Lipid terdapat dalam semua bagian tubuh manusia terutama dalam otak, mempunyai peran yang sangat penting dalam proses metabolisme secara umum. Sebagian besar lipid sel jaringan terdapat dalam komponen utama membran sel dan berperan mengatur jalannya metabolisme di dalam sel (Wirahadikusumah, 1985).

Lemak dan minyak merupakan salah satu kelompok yang termasuk golongan lipida. Satu sifat yang khas dan mencirikan golongan lipida (termasuk minyak dan lemak) adalah daya larutnya dalam pelarut organik (misalnya eter, benzen, kloroform) atau sebaliknya ketidak-larutannya dalam pelarut air. Kelompok-kelompok lipida tersebut adalah:

1. Kelompok trigliserida (lemak, minyak, asam lemak)
2. Kelompok turunan asam lemak (lilin, aldehyd asam lemak dan lain-lain)
3. Fosfolipida dan serebrosida (termasuk glikolipida)
4. Sterol-sterol dan steroida
5. Karatenoida
6. Kelompok lipida lain (Sudarmadji dkk, 1996)

Dengan proses hidrolisis lemak akan terurai menjadi asam lemak dan gliserol. Proses ini berjalan dengan menggunakan asam, basa atau enzim tertentu. Proses hidrolisis yang menggunakan basa disebut proses penyabunan (Poedjadi, 1994).

Proses metabolisme lipid sebagai komponen bahan makanan yang masuk ke dalam tubuh hewan, dimulai dengan proses pencernaannya di dalam usus halus. Enzim lipase yang terdapat di dalam lambung tidak dapat melakukan tugasnya karena suasana keasaman lambung yang terlalu tinggi, pH 1,2 - 2,5. Enzim lipase yang dikeluarkan oleh kantung empedu, pangreas, dan sel usus halus, mengkatalisis proses hidrolisis ikatan ester pada trigliserida menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol (Wirahadikusumah, 1985)

### **2.3 Isolasi dan Pemurnian Enzim**

Pada prinsipnya isolasi dan pemurnian enzim adalah pemisahan protein enzim tertentu dari ekstrak mentah seluruh sel dari senyawa dan enzim-enzim lainnya. Sebelum melakukan isolasi enzim perlu diketahui karakteristik sumber enzim serta lokasinya dalam sel dan yang paling penting adalah bagaimana memisahkan enzim dari sumbernya tanpa menghilangkan keaktifannya. Hal lain yang perlu diperhatikan dalam isolasi dan pemurnian enzim yaitu kecepatan dan kecermatan karena perubahan waktu sangat mempengaruhi keaktifan enzim yang diisolasi (Ahyar, 1990).

Untuk menjaga keaktifan enzim selama isolasi biasanya digunakan larutan penyangga dan senyawa pelindung tertentu tergantung pada jenis enzim yang diisolasi. Dalam isolasi enzim lipase dari fungi *Aspergillus sp.* digunakan larutan penyangga Tris-HCl 0,05 M dengan pH 7 (Helisto dan Korpela, 1998).

## 2.4 Uraian Jamur

Jamur atau cendawan adalah organisme heterotrofik mereka memerlukan senyawa organik untuk nutrisinya. Bila mereka hidup dari benda organik mati yang terlarut, mereka disebut saprofit. Jadi mereka dapat sangat menguntungkan bagi manusia. Sebaliknya mereka juga dapat merugikan kita bilamana mereka membusukkan kayu, tekstil, makanan, dan bahan-bahan lain (Pelczar, 1986).

### 2.4.1 Jamur *Aspergillus oryzae*

Berdasarkan pada cara dan ciri reproduksinya terdapat empat kelas cendawan sejati atau berfilamen di dalam dunia fungi: (1) Phycomyetes, (2) Ascomyetes, (3) Basidiomycetes dan (4) Deuteromycetes (Pelczar, 1986). Jamur *Aspergillus* termasuk dalam golongan Ascomyetes. *Aspergillus* banyak digunakan dalam studi tentang enzimologi dan biokimia, sedangkan fisiologi pertumbuhan dan reproduksinya sudah banyak dipelajari (Dwidjoseputro, 1978).

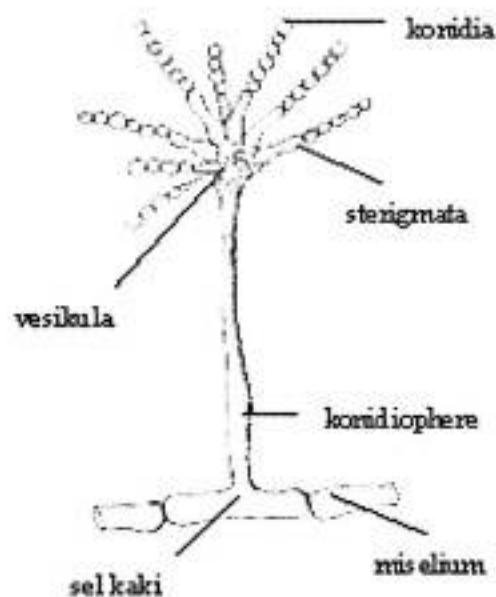
Ciri-ciri spesifik *Aspergillus* adalah sebagai berikut :

1. Hifa septat dan miselium bercabang, biasanya tidak berwarna, yang terdapat di bawah permukaan merupakan hifa vegetatif, sedangkan yang muncul di atas permukaan umumnya merupakan hifa fertil dan koloni kompak.



2. Konidiofora septat atau nonseptat, muncul dari “foot cell” (yaitu sel miselium yang membengkak dan berdinding tebal).
3. Konodiofora membengkak menjadi vesikel pada ujungnya, membawa sterigmata di mana tumbuh konidia dan sterigmata atau fialida biasanya sederhana, berwarna, atau tidak berwarna.
4. Konidia membentuk rantai yang berwarna hijau, cokelat atau hitam dan beberapa spesies tumbuh baik pada suhu 37°C atau lebih (Tjitrosoepomo, 1991).

#### 2.4.2 Taksonomi *Aspergillus oryzae*



Gambar 2.6 Fungi *Aspergillus*

Devisio : Thallophyta  
 Sub devisio : Fungi  
 Klas : Ascomycetes

Ordo : Moniliales  
Famili : Moniliaceae  
Genus : *Aspergillus*  
Species : *Aspergillus oryzae* (Fardiaz, 1992)

Fungi *Aspergillus* terdapat di mana-mana sebagai saprofit. Koloni yang sudah menghasilkan spora warnanya menjadi coklat kekuning-kuningan, kehijau-hijauan atau kehitam-hitaman, miselium yang semula berwarna putih sudah tidak tampak lagi (Dwidjoseputro, 1998).

## **2.5 Teknik Biakan Murni**

Penelitian yang layak mengenai mikroorganisme dalam berbagai habitat memerlukan teknik untuk memisah-misahkan populasi campuran yang rumit atau biakan campuran, menjadi spesies-spesies yang berbeda-beda sebagai biakan murni (Pelczar, 1986). Biakan murni terdiri dari suatu populasi sel yang semuanya berasal dari satu sel induk. Mikroorganisme dibiakkan di laboratorium pada bahan nutrien yang disebut medium (Gosalam, 2001).

Inokulasi adalah pekerjaan memindahkan bakteri dari medium yang lama ke medium yang baru. Terlebih dahulu harus diusahakan agar semua alat-alat yang ada sangkut paut dengan medium dan pekerjaan inokulasi itu benar-benar steril. Untuk menghindari kontaminasi, pekerjaan inokulasi dapat dilakukan di dalam suatu kotak kaca yang disebut enkas (Dwidjoseputro, 1998).

### 2.5.1 Media

Media yang digunakan untuk menumbuhkan mikroba di laboratorium terbagi atas tiga jenis media: (a) media cair, (b) media padat, dan (c) media semi solid (setengah padat). Media yang digunakan untuk pertumbuhan mikroba harus mengandung komponen-komponen yang dibutuhkan mikroba seperti: air, karbon, nitrogen, mineral dan lain-lain yang sesuai untuk kebutuhan setiap macam mikroba (Gosalam, 2001).

Mikroba juga memerlukan beberapa unsur logam seperti natrium, kalium, magnesium, mangan, besi, seng, tembaga, fosfor, dan kobalt dalam jumlah yang amat sedikit (Hadioetomo, 1990).

Menurut Somkuti dan Babel (1968) untuk memproduksi enzim lipase dari *Mucor pusillus* digunakan media gandum (wheat-bran) dengan pH 6.8, sedangkan untuk lipase dari *Bacillus J 33* digunakan media kaldu (nutrien both) dengan pH 8.0 (Nawani *et al*, 1998). Maia *et al* (1999) menggunakan media minyak zaitun-pepton untuk produksi enzim lipase secara ekstrasellular oleh fungi *Fusarium solani*.

Untuk produksi lipase dari *Aspergillus carneus* dan *Penicillium sp*, Helisto dan Korpela (1998) menggunakan media modifikasi Czapek dengan komposisi bahan yaitu:  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KHPO}_4$ ,  $\text{KCL}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4$ , tepung kedelai, minyak zaitun, agar dan pH media diatur 7 dengan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Liu dan Tsai (2003) melaporkan bahwa n-hexadecane dan minyak zaitun berfungsi sebagai sumber karbon untuk memproduksi enzim lipase alkali dari *A. radioresistens*. Sumber nitrogen dalam medium juga berpengaruh terhadap produksi enzim lipase. Umumnya sumber nitrogen yang digunakan adalah pepton dan ekstrak ragi, berpotensi meningkatkan produksi enzim lipase dari *Bacillus sp*, *Pseudomonas*, dan *Staphylococcus haemolyticus* (Gupta *et al*, 2004).

### **2.5.2 Sterilisasi**

Sterilisasi ialah suatu cara atau usaha membebaskan alat-alat atau bahan-bahan dari segala macam bentuk kehidupan, terutama mikroba. Sterilisasi yang biasa dilakukan di laboratorium mikrobiologi adalah sterilisasi basah dengan menggunakan autoklaf. Dibandingkan dengan panas lembab, panas kering kurang efisien dan membutuhkan waktu yang lebih lama untuk sterilisasi (Gosalam, 2001).

Sterilisasi dengan autoklaf, yaitu alat serupa tangki yang dapat diisi dengan uap. Medium yang akan disterilkan ditempatkan di dalam autoklaf ini selama 15 sampai 20 menit. Setelah pintu autoklaf ditutup rapat, barulah kran pada pipa uap dibuka, dan temperatur akan terus-menerus naik sampai 121 °C. Penghitungan waktu 15 atau 20 menit itu dimulai semenjak termometer pada autoklaf menunjuk 121 °C, medium yang sudah steril dapat disimpan dalam lemari es (Dwidjoseputro, 1998).

### **2.6 Spektrofotometer**

Teknik spektrofotometri telah lama digunakan sebagai teknik yang handal untuk deteksi, identifikasi, dan pengukuran kadar senyawa kimia dalam suatu larutan. Spektrum cahaya yang dapat terlihat oleh mata terentang antara 400 nm sampai 800 nm. Pada teknik spektrofotometri, cahaya dari sumber cahaya diuraikan dengan menggunakan prisma sehingga diperoleh cahaya monokromatis yang diserap oleh zat yang akan diperiksa (Soewoto, 2001).

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Alat dan Bahan yang digunakan**

##### **3.1.1 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan adalah kopra yang berjamur. Tauge.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Buffer Tris(Hidroksimetil aminometan)-HCl pH 7, 8, 9, 10 dan 11.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Pepton (Difco). Agar (AA). Minyak zaitun (fluka). 4-nitrophenylbutirat (Sigma). Buffer fosfat pH 6. Folin ciocalteau (sigma).  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . NaOH. Bovine Serum Albumin (sigma). Dimetil sulfoksida (DMSO). Aquadest. Minyak kelapa. Aluminium Foil. Kasa. Benang. Kertas Label. Kapas.

##### **3.1.2 Alat**

Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat gelas yang umum digunakan di Laboratorium Bioproses. pH meter Metrohm. Magnetik Stirrer Fisher. Water Bath Techne BLF-S21. Neraca Analitik. Spectrophotometer 20 Genesys. Shaker New Brunswick. Autoklaf. Incubator U-39060-13. Sentrifuge 800-KS Kubota. Hot Plate. Mikropipet. Enkas.

#### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioproses Teknik Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang dan Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin Makassar yang dilaksanakan pada bulan Oktober 2004 hingga Maret 2005.

### 3.3 Cara Kerja

Penelitian ini dibagi menjadi empat tahap yaitu: (1) isolasi dan identifikasi fungi penghasil enzim lipase dari kopra, (2) produksi enzim lipase dari isolat fungi *Aspergillus oryzae* indigenus, (3) uji aktivitas spesifik enzim lipase, dan (4) karakteristik enzim lipase.

#### 3.3.1 Pembuatan Media

##### 1. Media Agar Miring

Menimbang bahan-bahan sebagai berikut: pepton 0,5 gram,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 gram,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,001 gram, agar 1,5 gram, minyak zaitun 1 mL, kemudian semua bahan dilarutkan dalam ekstrak tauge 100 mL (tauge 10 gram direbus dengan aquadest sebanyak 100 mL) dan pH media diatur sekitar 7 dengan larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Selanjutnya larutan dipanaskan di atas Hot Plate. Setelah dipanaskan media agar dituangkan dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas, kemudian sterilisasi media dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu  $121^\circ\text{C}$ . Setelah sterilisasi dinginkan media pada suhu kamar dengan posisi dimiringkan sampai media agar memadat. Untuk media agar di cawan petri, media dan cawan petri disterilkan secara terpisah. Media agar steril dituang kedalam cawan petri, kemudian media disimpan pada suhu kamar.

##### 2. Media Inokulum

Menimbang bahan-bahan sebagai berikut: pepton 0,5 gram,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 gram,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,001 gram, minyak zaitun 1 mL, kemudian semua bahan dilarutkan dalam 100 mL aquadest dan pH media diatur sekitar 7 dengan larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Selanjutnya larutan dipanaskan di atas Hot Plate. Setelah dipanaskan media dituangkan dalam

erlenmeyer 250 mL, kemudian sterilisasi media dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121 °C. Setelah sterilisasi media didinginkan pada suhu kamar.



### 3. Media Produksi

Menimbang bahan-bahan sebagai berikut: pepton 0,5 gram,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 gram,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,001 gram, minyak kelapa 2 mL, kemudian semua bahan dilarutkan dalam 100 mL aquadest dan pH media diatur sekitar 7 dengan larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Selanjutnya larutan dipanaskan di atas Hot Plate. Setelah dipanaskan media dituangkan dalam erlenmeyer 250 mL, kemudian sterilisasi media dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121 °C. Setelah sterilisasi dinginkan media pada suhu kamar.

#### 3.3.2 Produksi Lipase

##### 3.3.2.1 Isolasi Mikroba

Fungi *Aspergillus oryzae* indigenus di isolasi dari kopra dengan menggunakan ose dan digoreskan pada media agar cawan petri secara steril, kemudian di simpan dalam inkubasi selama 4 hari pada suhu 37 °C. Hasil biakan dari cawan petri dipindahkan ke dalam tabung reaksi (media agar miring) untuk mendapatkan biakan murni dan di simpan dalam inkubasi selama 4 hari pada suhu 37 °C.

##### 3.3.2.2 Penyiapan inokulum *Aspergillus oryzae* Indigenus

Biakan fungi *Aspergillus oryzae* indigenus hasil isolasi ditumbuhkan ke dalam media cair (media inokulum) dan disimpan dalam shaker selama 4 hari pada suhu 37 °C.

### 3.3.2.3 Produksi Enzim Lipase dari Isolat *Aspergillus oryzae* Indigenus

Biakan fungi *Aspergillus oryzae* indigenus media inokulum diambil sebanyak 5 mL kemudian ditumbuhkan ke dalam media produksi dan diinkubasi dalam shaker dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37 °C. Setelah pertumbuhan media cair setiap dua hari (2, 4, 6, 8, dan 10) diambil sebanyak 5 mL dan dipisahkan antara sel dan supernatan dengan sentrifugasi biasa dengan kecepatan 1500 rpm selama 30 menit, kemudian disaring dengan kertas saring Whatman menggunakan metode Somkuti dan Babel, (1968). Supernatan yang mengandung enzim lipase ditentukan aktivitasnya.

### 3.3.3 Uji Aktivitas Enzim Lipase

Aktivitas enzim lipase ekstrasel ditentukan dengan menggunakan substrat p-nitrophenilbutirat (p-NB) dengan metode Vorderwulbecke, *et al.*, 1992. Sebanyak 0,1 mL larutan enzim lipase atau blanko (larutan enzim yang telah dipanaskan) ditambahkan ke dalam buffer reaksi 0,89 mL yang mengandung Tris-HCl 0,05 M pH 7,0. Reaksi diawali dengan penambahan 0,01 mL substrat p-nitrophenilbutirat 0,1 M (pelarut Dimetil sulfoksida) dan dikocok secepatnya lalu campuran reaksi, diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C, kemudian campuran reaksi diukur serapannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 410 nm selama 1 menit. Satu unit enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat mengkatalisis perubahan satu  $\mu$  mol substrat tiap menit pada kondisi tertentu.

### 3.3.4 Penentuan Kadar Protein Enzim

Kadar protein enzim lipase ditentukan dengan menggunakan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951) dengan prosedur sebagai berikut: sebanyak 0,2 mL larutan enzim



lipase direaksikan dengan 0,5 mL reagen C, kemudian dikocok dan dibiarkan selama 10 menit. Campuran reaksi ditambahkan dengan 0,1 mL reagen Folin ciocalteau 1 N, kemudian dikocok dan dibiarkan selama 30 menit dan serapan protein diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 750nm. Sebagai blanko dipipet 0,2 mL air, kemudian perlakuannya sama dengan prosedur uji kadar protein enzim lipase. Untuk kurva standar digunakan protein standar Bovine Serum Albumin (BSA) dengan berbagai konsentrasi : 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 150  $\mu\text{g/mL}$ , 200  $\mu\text{g/mL}$ , 250  $\mu\text{g/mL}$ , 300  $\mu\text{g/mL}$ .

### **3.3.5 Karakterisasi Enzim Lipase**

#### **3.3.5.1 Penentuan pH Optimum**

Penentuan pH optimum kerja enzim lipase dilakukan sesuai dengan penentuan aktivitas enzim lipase. Disini akan dilakukan variasi pH menggunakan buffer posfat 6, dan buffer Tris-HCl pH 7, 8, 9, 10 dan 11.

#### **3.3.5.2 Penentuan Suhu Optimum**

Penentuan suhu optimum kerja enzim lipase dilakukan sesuai dengan prosedur penentuan aktivitas enzim lipase. Disini akan dilakukan variasi suhu inkubasi reaksi enzim dari suhu 25 °C, 30 °C, 35°C, 40 °C, dan 45 °C.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan analisis enzim lipase dari *Aspergillus oryzae* indigenus maka diperoleh hasil sebagai berikut:

#### 4.1 Isolasi Fungi *Aspergillus oryzae* Indigenus

Untuk mendapatkan isolat *Aspergillus oryzae* indigenus yang di isolasi dari kopra yang berjamur, terlebih dahulu dilakukan isolasi dan identifikasi fungi yang tumbuh dari kopra dengan menumbuhkan fungi ke dalam media agar cawan petri dengan menggunakan ose secara aseptik, kemudian di inkubasi selama 4 hari pada suhu 37 °C. Hasil biakan cawan petri yang terpilih dipindahkan lagi ke media agar cawan petri untuk mendapatkan biakan murni fungi yang terpilih, selanjutnya diidentifikasi dengan pengamatan mikroskopis untuk menentukan spesies fungi. Dari pengamatan mikroskopis yang dilakukan diketahui bahwa spesies jamur adalah *Aspergillus oryzae*. Hasil biakan cawan petri yang terpilih dipindahkan lagi ke dalam tabung reaksi (media agar miring) untuk meremajakan biakan murni jamur *Aspergillus oryzae*. Biakan murni ini terdiri dari suatu populasi jamur yang semuanya berasal dari satu induk. Warna dan bentuk koloni jamur *Aspergillus oryzae* indigenus yang tumbuh sporanya berwarna hijau, pada awal pertumbuhan fungi *Aspergillus oryzae* indigenus berbentuk serabut berwarna putih seperti kapas, kemudian muncul spora berwarna hijau.

#### 4.2 Produksi dan Isolasi Enzim Lipase *Aspergillus oryzae* Indigenus

Untuk memproduksi enzim lipase dari *Aspergillus oryzae* indigenus melalui proses fermentasi, isolat *Aspergillus oryzae* indigenus terlebih dahulu diaktifkan selama

48 jam dalam medium aktivasi (inokulum) yang mengandung minyak kelapa. Proses ini berlangsung selama 48 jam pada suhu kamar dengan kecepatan aerasi 150 rpm. Sel yang tumbuh berbentuk pelet (bulatan) kecil menandakan bahwa sel jamur tersebut aktif dan dapat dilanjutkan dengan proses fermentasi. Sebanyak 5 % inokulum aktif dipindahkan ke medium fermentasi (produksi enzim) yang mengandung minyak kelapa. Selama proses fermentasi terjadi pertumbuhan miselium menjadi spora yang lebat dan berwarna kuning. Setelah hari ke enam dan ke tujuh pertumbuhan miselium tidak nyata hal ini diduga karena kapang tersebut mulai memasuki pertumbuhan statis. Minyak kelapa adalah komponen pada medium produksi yang bertindak sebagai inducer yaitu zat penginduksi atau perangsang dalam sintesis enzim lipase dari *Aspergillus oryzae* indigenus.

Selama proses fermentasi (produksi enzim) berlangsung, diperlukan pengocokan terus-menerus agar konsumsi oksigen selalu ada. Oksigen adalah gas yang sedikit larut dalam air, sebagai akibatnya perlu ditransfer terus-menerus ke dalam medium fermentasi dengan cara memperluas permukaan media terhadap udara. Penurunan oksigen terlarut menyebabkan penurunan dalam laju pertumbuhan sel-sel di dalam medium fermentasi. Setelah waktu pertumbuhan 24 jam, sel tumbuh pada medium produksi dengan bentuk bulatan kecil dalam jumlah yang cukup banyak.

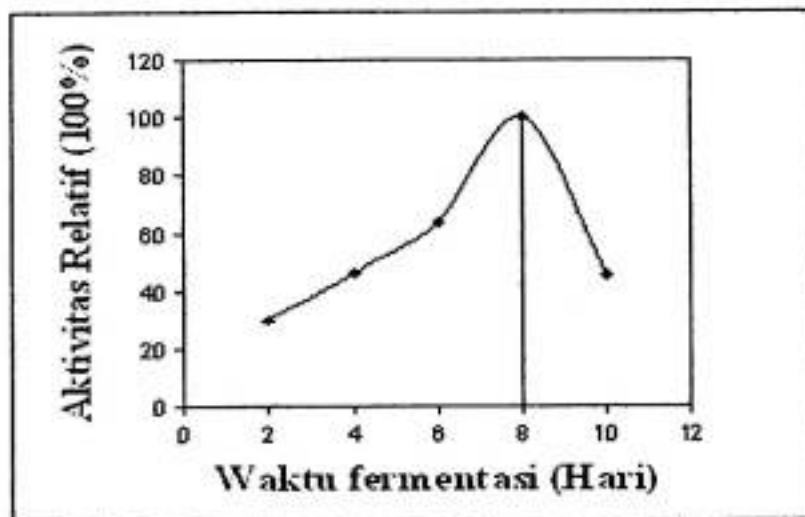
Umumnya enzim lipase yang dihasilkan oleh fungi bersifat ekstrasellular, termasuk isolat *Aspergillus oryzae* indigenus. Setelah dilakukan pemisahan sel dan supernatan, supernatan yang diperoleh merupakan enzim lipase ekstrak kasar, yang akan ditentukan aktivitasnya. Aktivitas enzim lipase yang diperoleh dari *Aspergillus oryzae* indigenus dengan beberapa variasi waktu fermentasi ditunjukkan pada Tabel atau

Gambar 4.1 produksi enzim lipase akan semakin meningkat sampai pada hari ke delapan dan mengalami penurunan pada hari ke sepuluh.

Menurut Pokorny *et al* (1994) penambahan minyak zaitun dalam konsentrasi 0.5%-2% meningkatkan produksi lipase dari fungi *Aspergillus niger* dengan waktu fermentasi 72 jam.

Tabel 4.1 Produksi enzim lipase dari fungi *Aspergillus oryzae* indigenus

No.	Waktu Fermentasi (hari)	Serapan ( $A_{410}$ )	Aktivitas (Unit/mL) Enzim lipase	Aktivitas relatif (100 %)
1	2	0,293	1,465	29,66
2	4	0,456	2,280	46,15
3	6	0,632	3,160	63,97
4	8	0,988	4,940	100
5	10	0,452	2,260	45,75



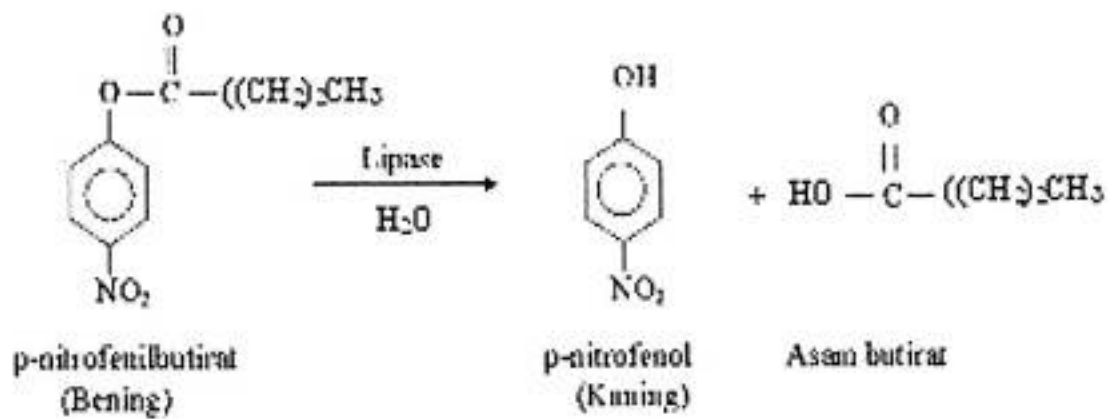
Gambar 4.1 Waktu produksi enzim lipase yang dihasilkan dari fungi *Aspergillus oryzae* indigenus

Dari hasil eksperimen ( Gambar 4.1) menunjukkan bahwa aktivitas enzim lipase yang diproduksi dari *Aspergillus oryzae* indigenus pada hari ke enam dan ke delapan mengalami peningkatan sampai pada aktivitas optimum sebesar 4,940 Unit/m, kemudian menurun pada hari ke sepuluh dengan aktivitas sebesar 2,260 Unit/mL. Hasil ini menunjukkan aktivitas enzim lipase mencapai optimum pada hari kedelapan, kemudian aktivitas enzim lipase menurun pada hari ke sepuluh. Hasil penelitian lain yang dilakukan oleh Somkuti dan Babel (1968), bahwa aktivitas enzim lipase dari fungi *Mucor sp.* mengalami peningkatan produksi enzim lipase setelah enam hari inkubasi pada suhu 35 °C.

Penurunan aktivitas enzim pada hari ke sepuluh disebabkan reaksi antara minyak kelapa (trigliserida) dengan enzim lipase pada hari ke sepuluh mengalami penjumlahan, sehingga terbentuknya asam lemak bebas yang menyebabkan penurunan aktivitas enzim, selain itu juga terjadi penurunan pH medium fermentasi dari pH 7 menjadi pH 5,57 dikarenakan terbentuk asam lemak bebas. Asam lemak ini merupakan hasil hidrolisis dari trigliserida dengan adanya air, lepasnya asam lemak menyebabkan bau tengik. Asam ini terbentuk karena ikatan ganda dua dalam komponen asam lemak tidak jenuh dari trigliserida terputus.

Reaksi kimia yang terjadi selama proses fermentasi, dimana trigliserida (minyak kelapa) dihidrolisis oleh enzim lipase yang dihasilkan secara ekstrasellular oleh fungi *Aspergillus oryzae* indigenus menjadi asam lemak dan gliserol. Uji aktivitas enzim menggunakan metode Vorderwulbecke *et al* (1992), menggunakan substrat spesifik yaitu: p-nitrophenil butirat (p-NB). Reaksi kimia antara substrat p-nitrophenil butirat (p-NB) dan enzim lipase ekstrak kasar menghasilkan asam butirat dan p-nitrophenol yang

berwarna kuning. Reaksi antara substrat p-NB dengan enzim lipase ditunjukkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Reaksi hidrolisis ester p-NB dengan enzim lipase

### 4.3 Karakterisasi Enzim Lipase

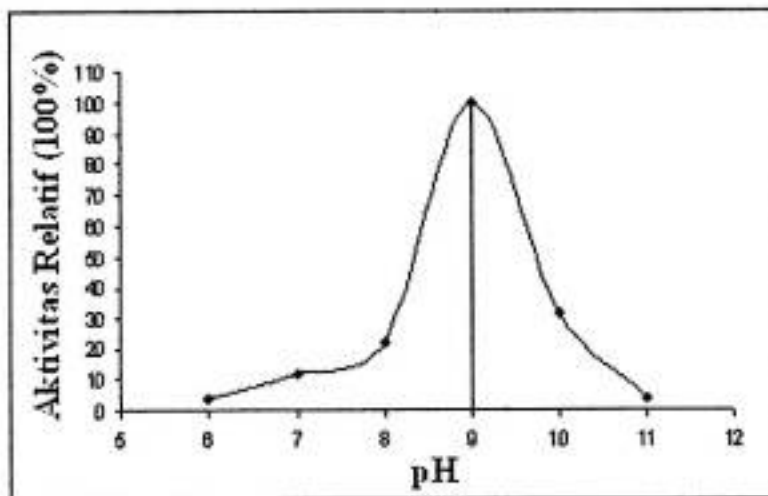
#### 4.3.1 Penentuan pH Optimum Terhadap Aktivitas Enzim Lipase

Hasil penelitian yang diperoleh pada Tabel 4.2 atau Gambar 4.3 menunjukkan bahwa aktivitas enzim lipase mengalami peningkatan pada pH 7 dengan aktivitas enzim 0,375 Unit/mL dan aktivitas enzim mencapai maksimum pada pH 9 dengan aktivitas enzim 3,155 Unit/mL, kemudian menurun pada pH 10 dengan aktivitas enzim 1,000 Unit/mL.

Kondisi pH berpengaruh terhadap aktivitas enzim perubahan ion  $\text{H}^+$  yang ada dalam larutan enzim memberikan efek pada bagian katalitik dan konformasi enzim lipase. dengan kondisi pH yang terlalu rendah atau terlalu tinggi menyebabkan terjadinya denaturasi sehingga aktivitas enzim akan menurun.

Tabel 4.2 Penentuan pH optimum enzim lipase dari fungi *Aspergillus oryzae* indigenus

No.	pH	Serapan ( $A_{410}$ )	Aktivitas Enzim Lipase (Unit/mL)	Aktivitas Relatif (100 %)
1	6	0,024	0,120	3,8
2	7	0,075	0,375	11,89
3	8	0,140	0,700	22,19
4	9	0,631	3,155	100
5	10	0,200	1,000	31,69
6	11	0,024	0,120	3,8



Gambar 4.3 Penentuan pH optimum enzim lipase dari fungi *Aspergillus oryzae* indigenus

Dari hasil eksperimen aktivitas enzim lipase mencapai maksimum pada pH 9 dengan aktivitas enzim 3,155 Unit/mL, hal ini menunjukkan bahwa enzim lipase yang dihasilkan fungi *Aspergillus oryzae* indigenus bersifat basa (alkali). Menurut penelitian yang dilakukan oleh Maia *et al.*, (1999) dan Nawani *et al.*, (1998) melaporkan bahwa

enzim lipase dari fungi *Fusarium Soloni* FS1 dan *Bacillus sp* mempunyai aktivitas optimum pada pH 8,6 dan 8. Demikian juga enzim lipase dari *Aspergillus niger* indigenus mempunyai aktivitas optimum pada pH 8 (Aslinda, 2005).

#### 4.3.2 Penentuan Suhu Optimum Terhadap Aktivitas Enzim Lipase

Menurut Whitaker (1972) adanya perubahan suhu dapat mempengaruhi konformasi enzim karena peningkatan energi akan mempengaruhi ikatan hidrogen atau interaksi hidrofobik yang berperan dalam menjaga konformasi molekul enzim. Perubahan konformasi akan mempengaruhi sisi aktif dari enzim, akibatnya aktivitas enzim akan menurun. Dengan adanya pemanasan dapat menyebabkan getaran pada ikatan hidrogen dari rantai polipeptida dan pada kondisi panas tertentu ikatan hidrogen tersebut akan putus. Putusnya satu ikatan hidrogen akan menyebabkan mudahnya pemutusan ikatan hidrogen selanjutnya dalam rantai polipeptida tersebut sehingga aktivitas enzim mengalami denaturasi.

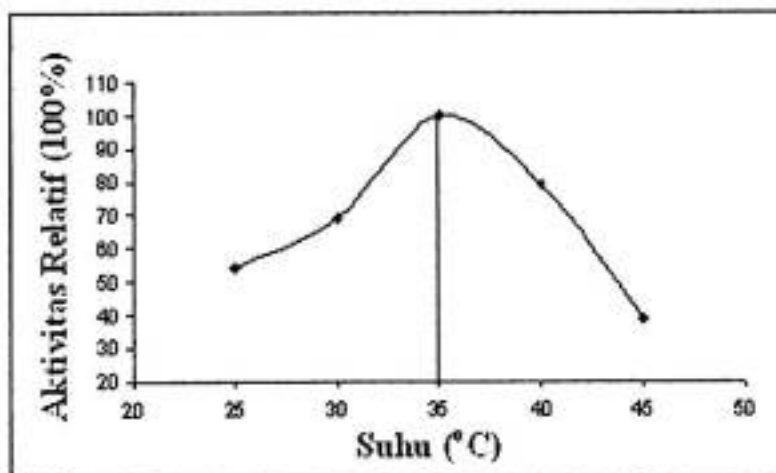
Dari hasil yang diperoleh (Tabel 4.3 atau Gambar 4.4) terlihat bahwa aktivitas enzim lipase tertinggi pada suhu 35 °C, yang merupakan suhu optimum untuk enzim tersebut. Di atas suhu tersebut, aktivitas menurun karena terjadi kerusakan struktur enzim.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Nawani *et al*, (1998) dan Ward *et al*, (1997), dilaporkan bahwa aktivitas optimum enzim lipase dari *Bacillus sp*. dan *Mucor meihei* adalah 60 °C, sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Somkuti dan Babel, (1968) dan Maia *et al*, (1999) menunjukkan bahwa aktivitas optimum enzim lipase dari *Mucor pusillius* NRRL 2543 dan PCC 410 adalah 35 °C dan 30 °C, sedangkan enzim lipase dari fungi *Aspergillus niger* indigenus mempunyai suhu optimumnya 35 °C (Aslinda, 2005).



Tabel 4.3 Penentuan suhu optimum enzim lipase dari fungi *Aspergillus oryzae* indigenus

No.	Suhu (°C)	Serapan ( $A_{410}$ )	Aktivitas Enzim Lipase (Unit/mL)	Aktivitas Relatif (100 %)
1	25	0,059	0,295	54,13
2	30	0,075	0,375	68,81
3	35	0,109	0,545	100
4	40	0,086	0,430	78,9
5	45	0,042	0,210	38,53



Gambar 4.4 Penentuan suhu optimum enzim lipase dari fungi *Aspergillus oryzae* Indigenus

Dari Tabel 4.3 atau Gambar 4.4 terlihat bahwa suhu optimum enzim lipase dari *Aspergillus oryzae* indigenus adalah 35°C dengan aktivitas 0,545 Unit/mL. Kenaikan aktivitas enzim pada suhu optimum disebabkan oleh kenaikan energi kinetika molekul enzim dan substrat, akan tetapi bila suhu dinaikkan terus maka energi kinetika enzim dan substrat menjadi demikian besar sehingga melampaui energi penghalang untuk memecah

ikatan-ikatan sekunder dan tersier disertai penurunan aktivitas sampai reaksi praktis terhenti. Penurunan aktivitas enzim lipase terjadi pada suhu 40 °C yaitu 0,430 Unit/mL.

#### 4.4 Penentuan Aktivitas Spesifik

Penentuan kadar protein dilakukan dengan tujuan untuk menentukan aktivitas spesifik. Berdasarkan hasil penelitian dengan menggunakan metode Lowry (Lowry *et al*, 1951), maka diperoleh hasil seperti yang tertera pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Penentuan aktivitas spesifik enzim lipase dari fungi *Aspergillus oryzae*

Sampel	Volume	Aktivitas Enzim Lipase (Unit/mL)	Protein (mg/mL)	Aktivitas Total (Unit)	Protein Total (mg)	Aktivitas Spesifik (Unit/mL)
Enzim lipase ekstrak kasar	200 mL	0,375	1,146	75	229,2	0,327

Dari Tabel 4.4 terlihat bahwa aktivitas spesifik dari enzim lipase yang disintesis oleh fungi *Aspergillus oryzae* indigenus setelah delapan hari inkubasi dalam medium fermentasi adalah 0,327 Unit/mL. Aktivitas spesifik adalah unit enzim yang menyebabkan perubahan satu  $\mu\text{mol}$  substrat per miligram protein.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diambil beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. Fungi *Aspergillus oryzae* indigenus yang diisolasi dari kopra menghasilkan enzim lipase.
2. Aktivitas enzim lipase yang optimum sebesar 4,940 Unit/mL diproduksi oleh *Aspergillus oryzae* indigenus pada waktu fermentasi delapan hari.
3. Aktivitas spesifik enzim lipase yang diproduksi dalam media cair (pertumbuhan) adalah 0,327 Unit/mg.
4. Enzim lipase dari *Aspergillus oryzae* indigenus bekerja optimal pada pH 9 dan suhu 35 °C.

#### 5.2 Saran


Enzim lipase merupakan enzim yang banyak digunakan untuk sintesis senyawa organik, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut antara lain:

1. Optimalisasi produksi enzim lipase dari fungi *Aspergillus oryzae* indigenus.
2. Pemurnian enzim lipase dari *Aspergillus oryzae* indigenus.
3. Melakukan pengujian lebih lanjut karakteristik enzim lipase dari fungi *Aspergillus oryzae* indigenus dengan menggunakan substrat spesifik lain, aktivator dan inhibitor.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahyar, 1990, *Isolasi Enzim Pemecah Protein dari Daun Gandum (Triticum vulgarea L.) yang Diradiasi dan Tanpa Diradiasi Studi Kasus: Penentuan pH, Suhu, dan Kepekatan Substrat Optimum*, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin, Ujung Pandang.
- Anonim, 2004, *Pengolahan Kelapa Menjadi Kopra*, (Online), (<http://www.otonomet.com/sulteng/index.asp?kabupaten=banggai>, diakses 16 september 2004).
- Aslinda, W., 2005, *Produksi Isolasi dan Uji Aktivitas Enzim Lipase dari Aspergillus niger Indigenus*, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Barbaro, SE., Trevors, JT., and Inniss WE., 2001, Effects of Low Temperature, Cold Shock, and Various Carbon Sources on Esterase and Lipase Activities and Exopolysaccharide Production by a Psychrotrophic *Acinebacter sp.*, *Can J Microbiol*, **47**, (194-205).
- Burdette, RA., and Quinn, DM., 1986, Interfacial Reaction Dynamics and Acyl-Enzyme Mechanism for Lipoprotein Lipase-Catalyzed Hydrolysis of Lipid p-Nitrophenyl Esters, *J. Biol. Chem.*, **261**, (12016-12021).
- Dwidjoseputro, D., 1998, *Dasar-dasar Mikrobiologi*, Djambatan, Malang.
- Dharmsthiti, S., and Kuhasuntisuk, B., 1998, Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602; Biochemical Properties and Application for Wastewater Treatment, *J Ind Microbiol Biotechnol*, **21**, (75-80).
- Fardiaz, S., 1992, *Mikrobiologi Pangan 1*, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Gupta, R., Gupta, N., and Rathi, P., 2004, Bactreial Lipases: an Overview of Production, Purification and Biochemical Properties, *Appl. Microbiol Biotechnol*, **64**, (263-781).
- Gosalam, S., 2001, *Penuntun Praktikum Mikrobiologi*, Laboratorium Mikrobiologi Laut Jurusan Ilmu Kelautan-FIKP Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Hadioetomo, R., S., 1990, *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek*, Gramedia, Jakarta.
- Hardjasasmita, P., 1992, *Biokimia Dasar A*, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.

- Helisto, P., and Korpela, T., 1998, Effects of detergents on Activity, of Microbial Lipases as Measured by The Nitrophenyl Alkanoate Esters Method, *Enzyme and Microbial Technology*, **23**, (113-117).
- Hernaiz, M.J., Sanchez-Montero, J.M., and Sinisterra, J.V., 1999, Modification of Purified Lipases from *Candida rugosa* with Polyethylene Glycol: A Systematic Study, *Enzyme and Microbial Technology*, **24**, (181-190).
- Jaeger, K-E., Ransac, S., Dijkstra, BW., Colson, C., Heuvel M van, and Misset, O., 1994, Bacterial Lipases, *FEMS Microbiol Rev*, **15**, (29-63).
- Kim, SS., Kim, EK., and Rhee, JS., 1996, Effects of Growth Rate on The Production of *Pseudomonas fluorescens* Lipase During The Fedbatch Cultivation of *E. coli*, *Biotechnol Prog*, **12**, (718-722).
- Lavayre, J., Verrier, J., and Baratti, J., 1982, Stereospecific Hydrolysis by Soluble and Immobilized Lipases, *Biotechnol Bioeng*, **24**, (2175-2188).
- Lehninger, dan Albert I., 1995, *Dasar-dasar Biokimia*, Erlangga, Jakarta.
- Liu, IL., and Tsai SW., 2003, Improvements in Lipase Production and Recovery from *Acinetobacter radioresistens* in Presence, *Appl Biochem Biotechnol*, **104**, (129-140)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randal, R.J., 1951, Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem*, **193**, (265-275)
- Maia, M.M.D., Morais, M. M.C., Morais, M.A., Melo, E.H.M., and Filho, J.L.L., 1999, Production of Extracellular Lipase by The Phytopathogenic Fungus *Fusarium solani* FSI, *Rev. Microbiol*, **30**.
- Muralidhar, RV., Chirumamilla, RR., Marchant, R., Ramachandran, VN., Ward, OP., and Nigam, P., 2002, Understanding Lipase Stereoseletivity, *World J Microbiol Biotechnol*, **18**, (81-97).
- Nawani, N., Dosanjh, N.S., and Kaur, J., 1998, A Novel Thermostable Lipase from A Thermophilic *Bacillus sp.* : Characterization and Esterification Studies, *Biotechnology Letters*, **20** (997-1000).
- Pandey, A., Benyamin, S., Soccol, CR., Nigam, P., Krieger, N., and Soccol, UT., 1999, The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology, *Biotechnol Appl Biochem*, **29**, (119-131).
- Pelczar, M. J., dan Chan, E.C.S., 1986, *Dasar-dasar Mikrobiologi*, Universitas Indonesia-Press, Jakarta.

- 
- Poedjiadi, A., 1994, *Dasar-dasar Biokimia*, Universitas Indonesia-Press, Jakarta.
- Pokorny D., Friedrich J., and Cimerman A.,(1994), Effect of Nutritional Factors on Lipase Biosynthesis by *Aspergillus niger*, *Biotechnol. Lett.*, **16**, (363-366).
- Praweda, 2004, *Penerapan Teknologi Enzim*, (Online), ([http://free.vlsm.org/v12/sponsor/sponsor\\_pendamping/praweda/biologi.htm](http://free.vlsm.org/v12/sponsor/sponsor_pendamping/praweda/biologi.htm)., diakses 16 september 2004).
- Reetz, M.T., 2001 Combinatorial and Evolution-based Methods in the Creation of Enantioselective Catalysts, *Angew Chem Int Ed*, **40**, (284-310).
- Sadikin, M., 2002, *Biokimia Enzim*, Widya Medika, Jakarta.
- Schulz, T., Plesis, J., and Schmid, RD., 2000, Stereoselectivity of *Pseudomonas cepacialipase* Toward Secondary Alcohols: a Quantitative Model, *Protein Sci*, **9**, (1053-1062).
- Smith, J., E., 1995, *Bioteknologi*, Edisi 2, Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Soewoto, H., 2001, *Biokimia FKUI*, Widya Medika, Jakarta.
- Somkuti, G.A., and Babel, F.J., 1968, Lipase Activity of *Mucor pusillus*, *Appl. Microbiol.*, **16**, (617-619).
- Sudarmadji, S., Haryono, B., dan Suhardi, 1996, *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Edisi keempat, Liberty, Yogyakarta.
- Suharjawanasuria, 2004, *Penambahan Enzim dalam Pakan Unggas*, (Online), (<http://suharjawanasuria.tripod.com>., diakses 16 september 2004).
- Tjitrosoepomo, B., 1991, *Taksonomi Tumbuhan*, Universitas Gadjah Mada-Press, Yogyakarta.
- Tsujita, T., Ninomiya, H., and Okuda, H., 1989, p-Nitrophenyl Butyrate Hydrolyzing Activity of Hormone-sensitive Lipase from Bovine Adipose Tissue, *Journal of Lipid Research*, **30**, (997-1004).
- Utami, T., Indrati, R., Hastuti, P., dan Kusumawaty, I., 2001, *Amobilisasi Lipase dari Candida rugosa secara Absorpsi Menggunakan Zeloit dan Polipropilena*, (Online), (<http://www.dikti.org/p3m/abstrakHB/abstrakHB03.pdf>, diakses 9 januari 2005).
- Vorderwulbecke, T., Kieslich, K., and Erdmann, H., 1992, Comparison of Lipase by Different Assays, *Enzyme Microb. Technol*, **14**, (631-639).

- Whitaker, R.J., 1972, *Principle of Enzymology for the Food Science*, Mergel Dekker inc, New York, 561-570
- Wirahadikusumah, M., 1985, *Biokimia: Metabolisme Energi, Karbohidrat dan Lipid*, ITB, Bandung.
- Ward, O.P., Fang, J., and Li, Z., 1997, Lipase-catalyzed Synthesis of a Sugar Ester Containing Arachidonic Acid, *Enzyme Microb. Technol*, **20**, (212-220).

## Lampiran 1. Komposisi Media

### 1. Media agar miring

- agar	1,5 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,1 g
- tauge	10 g
- pepton	0,5 g
- minyak zaitun	1 mL
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,001 g
- aquadest	100 mL

### 2. Media inokulum (per 100 mL)

- aquadest	100 mL
- pepton	0,5 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,1 g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,001 g
- minyak kelapa	1 mL

### 3. Media produksi (per 200 mL)

- aquadest	200 mL
- pepton	1 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,2 g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,002 g
- minyak kelapa	2 mL



Lampiran 2. Komposisi Pereaksi A, Pereaksi B, Pereaksi C, Pereaksi D

Pereaksi A : 0,5 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dan 1 g  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dengan air.  
suling sampai volume 100 mL

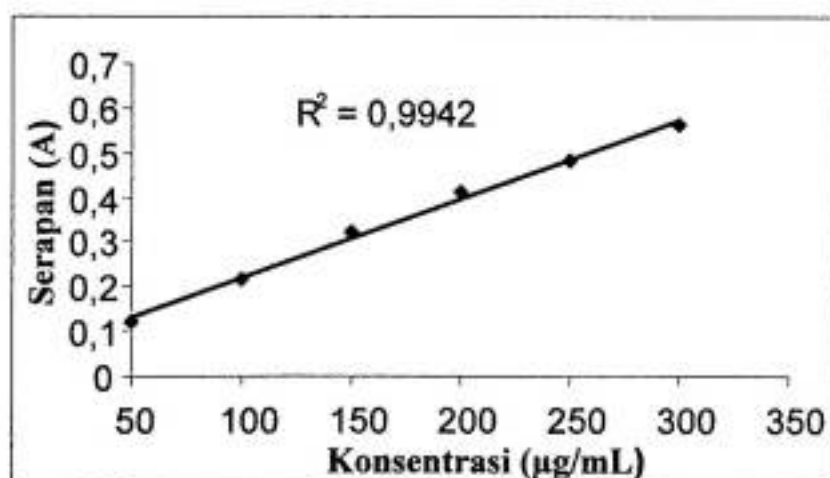
Pereaksi B : 2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dan 0,4 NaOH dengan air suling 100mL

Pereaksi C : 1 mL larutan A dan 50 mL larutan B

Pereaksi D : Larutan Folin Ciocalteau 1 N

Lampiran 3. Tabel dan Grafik Kurva Kalibrasi Serapan (A) Terhadap Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ ) Bovine Serum Albumin (BSA).

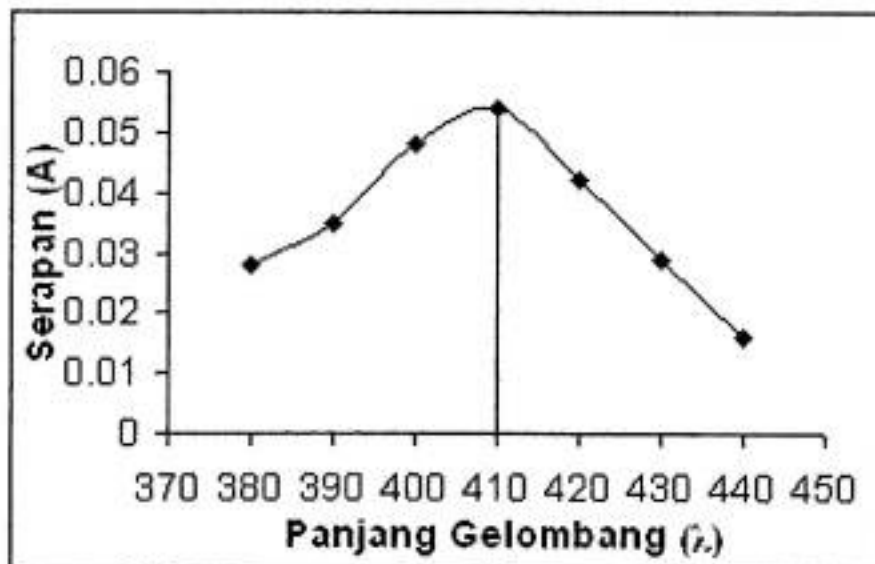
No.	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Serapan (A)
1	50	0,121
2	100	0,215
3	150	0,323
4	200	0,414
5	250	0,481
6	300	0,562



$$y = 0,0018x + 0,0433$$

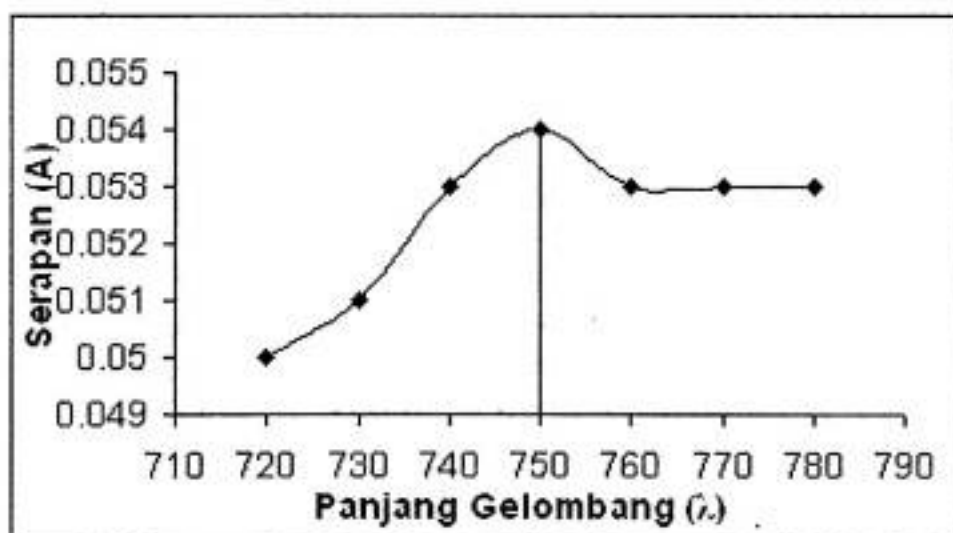
Lampiran 4. Tabel dan Grafik Penentuan Panjang Gelombang Maksimum ( $\lambda_{max}$ ) Pada Uji Aktivitas Enzim Lipase

No.	Panjang Gelombang (nm)	Serapan (A)
1	380	0,028
2	390	0,035
3	400	0,048
4	410	0,054
5	420	0,0420
6	430	0,029
7	440	0,016



Lampiran 5. Tabel dan Grafik Panjang Gelombang Maksimum Pada Penentuan Kadar Protein

No.	Panjang Gelombang (nm)	Serapan (A)
1	720	0,050
2	730	0,051
3	740	0,053
4	750	0,054
5	760	0,053
6	770	0,053
7	780	0,053



## Lampiran 6. Perhitungan aktivitas enzim lipase

### A. Aktivitas enzim lipase

$$\text{Aktivitas (Unit/mL)} = (\Delta A_2 - \Delta A_1) \times dF$$

Keterangan:  $\Delta A$  = serapan enzim

$dF$  = faktor pengenceran

Tabel 1. Produksi enzim lipase dari fungi *Aspergillus oryzae* indigenus

No.	Waktu Fermentasi (hari)	Serapan ( $A_{410}$ )	Aktivitas (Unit/mL)	Aktivitas Relatif (100%)
1	2	0,029	0,145	29,66
2	4	0,054	0,275	46,15
3	6	0,088	0,440	63,97
4	8	0,099	0,495	100
5	10	0,053	0,265	45,75

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim (Unit/mL)} &= 0,029 \times 5 \\ &= 0,145 \text{ Unit/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim (Unit/mL)} &= 0,054 \times 5 \\ &= 0,275 \text{ Unit/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim (Unit/mL)} &= 0,088 \times 5 \\ &= 0,440 \text{ Unit/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim (Unit/mL)} &= 0,099 \times 5 \\ &= 0,495 \text{ Unit/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim (Unit/mL)} &= 0,053 \times 5 \\ &= 0,265 \text{ Unit/mL} \end{aligned}$$

Tabel 2. Penentuan pH optimum enzim lipase dari fungi *Aspergillus oryzae* indigenus

No.	PH	Serapan ( $A_{410}$ )	Aktivitas (Unit/mL)	Aktivitas Relatif (100%)
1	6	0,024	0,120	3,8
2	7	0,075	0,375	11,89
3	8	0,140	0,700	22,19
4	9	0,631	3,155	100
5	10	0,200	1,000	31,69
6	11	0,024	0,120	3,8

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim (Unit/mL)} &= 0,024 \times 5 \\ &= 0,120 \text{ Unit/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim (Unit/mL)} &= 0,075 \times 5 \\ &= 0,375 \text{ Unit/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim (Unit/mL)} &= 0,140 \times 5 \\ &= 0,700 \text{ Unit/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim (Unit/mL)} &= 0,631 \times 5 \\ &= 3,155 \text{ Unit/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim (Unit/mL)} &= 0,200 \times 5 \\ &= 1,000 \text{ Unit/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim (Unit/mL)} &= 0,024 \times 5 \\ &= 0,120 \text{ Unit/mL} \end{aligned}$$

Tabel 3. Penentuan suhu optimum enzim lipase dari fungi *Aspergillus oryzae* indigenus

No.	Suhu (°C)	Serapan (A <sub>410</sub> )	Aktivitas (Unit/mL)	Aktivitas Relatif (100%)
1	25	0,059	0,295	54,13
2	30	0,075	0,375	68,81
3	35	0,109	0,545	100
4	40	0,086	0,430	78,9
5	45	0,042	0,210	38,53

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim (Unit/mL)} &= 0,059 \times 5 \\ &= 0,295 \text{ Unit/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim (Unit/mL)} &= 0,075 \times 5 \\ &= 0,375 \text{ Unit/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim (Unit/mL)} &= 0,109 \times 5 \\ &= 0,545 \text{ Unit/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim (Unit/mL)} &= 0,086 \times 5 \\ &= 0,430 \text{ Unit/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim (Unit/mL)} &= 0,042 \times 5 \\ &= 0,210 \text{ Unit/mL} \end{aligned}$$

## B. Aktivitas spesifik enzim lipase

$$\text{Aktivitas spesifik (Unit/mg)} = \text{Aktivitas (Unit/mL)} \times \frac{1}{C}$$

Keterangan: C = kadar protein (mg/mL)

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas spesifik enzim lipase} &= 0,375 \times \frac{1}{1,146} \\ &= 0,327 \text{ Unit/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim total} &= 0,375 \text{ Unit/mL} \times 200 \text{ mL} \\ &= 75 \text{ Unit} \end{aligned}$$



## Lampiran 7. Perhitungan Kadar Protein enzim

### ▪ Perhitungan Kadar Protein

$$y = ax + b \quad a = 0,0018x ; b = 0,0433$$

$$y = 0,0018x + 0,0433$$

$$x = \frac{y - 0,0433}{0,0018} \times Fp$$

Keterangan:

x = Kadar Protein

y = Serapan ( $A_{750}$ )

df = Faktor pengenceran

$$\begin{aligned} \text{Kadar protein} &= \frac{0,338 - 0,0433}{0,0018} \times 7 \\ &= 1146,05 \mu\text{g/mL} \\ &= 1,146 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar protein total} &= 1,146 \text{ mg/mL} \times 200 \text{ mL} \\ &= 229,2 \text{ mg} \end{aligned}$$

Lampiran 8. Tabel pembuatan buffer fosfat.

Larutan A : 0,2 M larutan Natrium Fosfat monobasis (27,8 gr dalam 1000 mL)

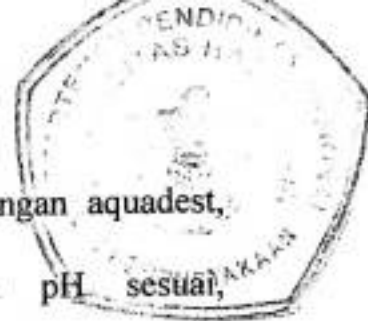
Larutan B : 0,2 M larutan Natrium fosfat dibasis (52,65 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  atau 71,7 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  dalam 1000 mL).

X mL larutan A + Y mL larutan B, diencerkan sampai 200 mL.

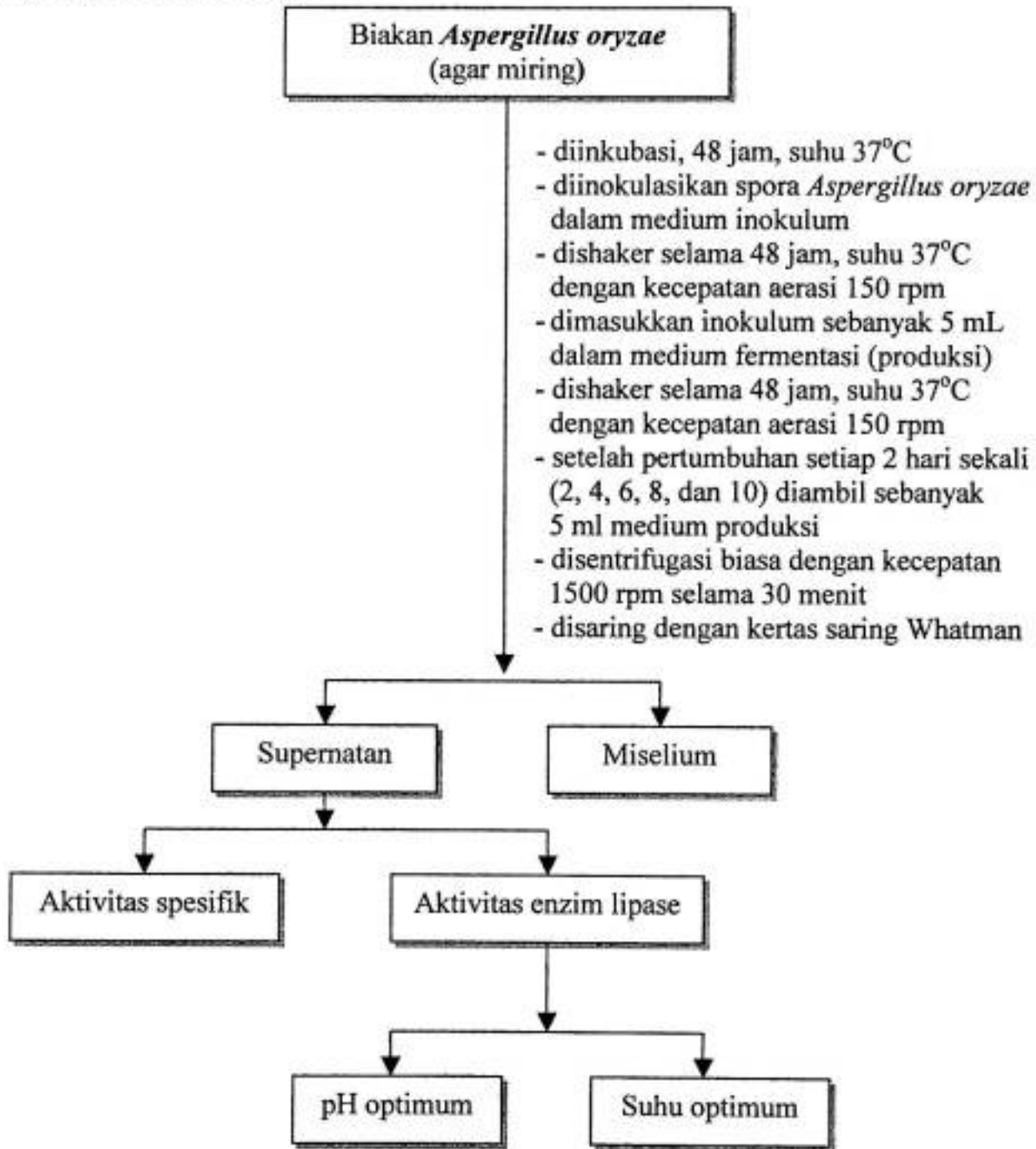
X	Y	pH
93,5	6,5	5,7
92	8	5,8
90	10	5,9
87,7	12,3	6
85	15	6,1
81,5	18,5	6,2
77,5	22,5	6,3
73,5	26,5	6,4
68,5	31,5	6,5
62,5	37,5	6,6
56,5	43,5	6,7
51	49	6,8
45	45	6,9
39	61	7
33	67	7,1
28	72	7,2
23	77	7,3
19	81	7,4
16	84	7,5
13	87	7,6
10,5	90,5	7,7
8,5	91,5	7,8
7	93	7,9
5,3	94,7	8

Lampiran 9. Pembuatan buffer Tris-HCl 0,05 M

0,6057 g tris (hidroksi metil) amino metan dan dilarutkan dengan aquadest, sesuaikan pH dengan penambahan HCl pekat tetes demi tetes setelah pH sesuai, tambahkan aquadest hingga volume 100 mL



Lampiran 10. Skema Kerja

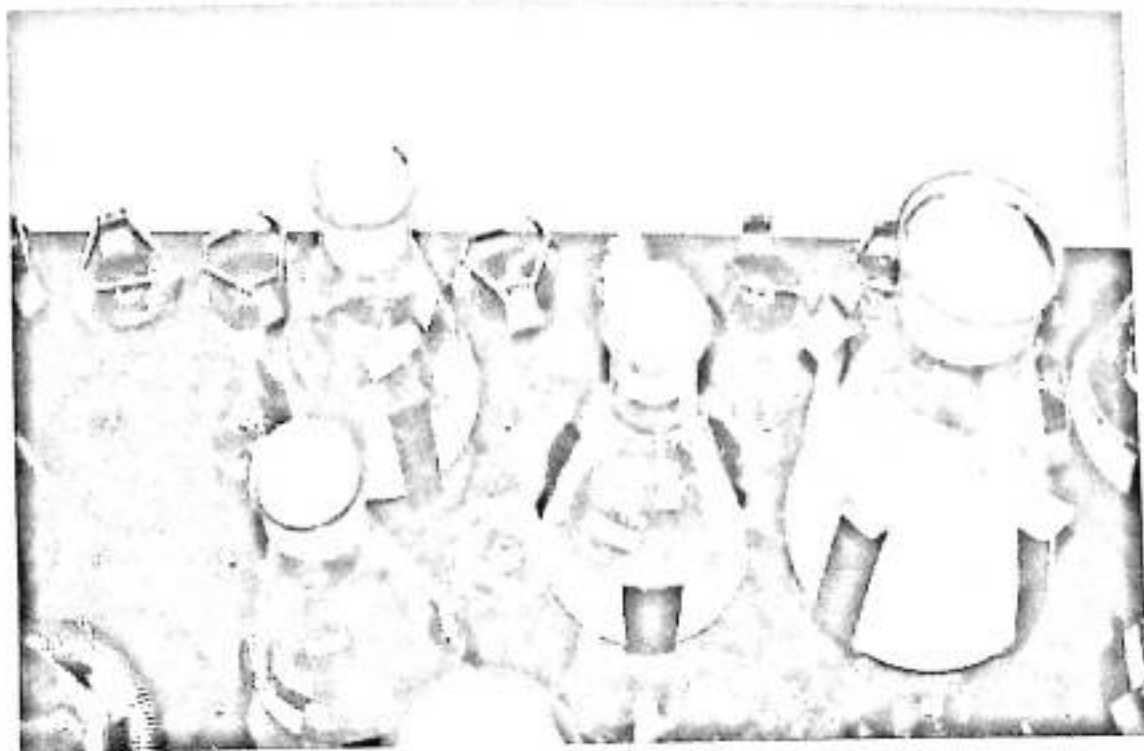


Lampiran 11. Gambar medium fermentasi dan inokulum



Gambar inokulum fungi *Aspergillus oryzae* indigenus

Lampiran 12. Gambar medium fermentasi fungi *Aspergillus oryzae* indigenus



Lampiran 13. kopra yang berjamur



Lampiran 14. Identifikasi fungi *Aspergillus oryzae* indigenus secara mikroskopis

