

Skripsi

**ISOLASI, KARAKTERISASI DAN AMOBILISASI LIPASE DARI
Rhizopus oryzae MENGGUNAKAN SUBSTRAT AMPAS KELAPA
MELALUI FERMENTASI FASE PADAT**

**AFHDHALIATUL KHUMAIRAH
H311 16 304**



**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

**ISOLASI, KARAKTERISASI DAN AMOBILISASI LIPASE DARI
Rhizopus oryzae MENGGUNAKAN SUBSTRAT AMPAS KELAPA
MELALUI FERMENTASI FASE PADAT**

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

Oleh:

**AFHDHALIATUL KHUMAIRAH
H311 16 304**



MAKASSAR

2022

LEMBAR PENGESAHAN (TUGAS AKHIR)

ISOLASI, KARAKTERISASI DAN AMOBILISASI LIPASE DARI
Rhizopus oryzae MENGGUNAKAN SUBSTRAT AMPAS KELAPA
MELALUI FERMENTASI FASE PADAT

Disusun dan diajukan oleh:

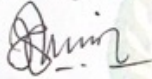
AFHDHALIATUL KHUMAIRAH

H31116304

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Kimia Fakultas
Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin
pada tanggal 21 Februari 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

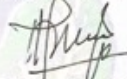
Menyetujui,

Pembimbing Utama,



Dr. Hasnah Natsir, M.Si
NIP. 19620320 198711 001

Pembimbing Pertama,



Dr. Seniwati Dali, M.Si
NIP. 19581231 198803 2 003

Ketua Departemen Kimia,



Dr. Abd. Karim, M.Si
NIP. 19620710 198803 1 002

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Afhdhaliatul Khumairah
NIM : H311 16 304
Program Studi : Kimia
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul:

ISOLASI, KARAKTERISASI DAN AMOBILISASI LIPASE DARI
Rhizopus oryzae MENGGUNAKAN SUBSTRAT AMPAS KELAPA
MELALUI FERMENTASI FASE PADAT

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 16 Februari 2022
Yang menyatakan,



Afhdhaliatul Khumairah

LEMBAR PERSEMBAHAN

“Dunia ini adalah tempat yang berbahaya, bukan karena kejahatan orang-orang melainkan mereka yang tidak berbuat apa-apa” –Albert Einstein

Skripsi ini saya persembahkan untuk kedua orang tua, saudara-saudara dan teman-teman yang saya cintai.

**Skripsi ini juga saya persembahkan untuk yang selalu bertanya:
“Kapan lulus?” “Kapan wisuda?”**

Terlambat lulus atau lulus tidak tepat waktu bukan sebuah kejahatan. Alangkah kerdilnya jika mengukur kepandaian seseorang hanya dari siapa yang cepat lulus. Bukankah sebaik-baiknya skripsi adalah skripsi yang selesai? Baik itu selesai tepat waktu maupun tidak tepat waktu.

PRAKATA

Segala puji dan syukur kehadirat Allah SWT atas segala limpahan berkat dan rahmat-Nya selama ini hingga penulis dapat menyelesaikan penelitian yang berjudul **“Isolasi, Karakterisasi dan Amobilisasi Lipase dari *Rhizopus oryzae* Menggunakan Substrat Ampas Kelapa Melalui Fermentasi Fase Padat”**. Berbagai kendala dan tantangan telah dialami penulis, namun berkat doa dan dukungan dari berbagai pihak akhirnya skripsi ini dapat diselesaikan.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada kedua orang tua tercinta Bapak Dr. Syahrudin Kasim, S.Si. M.Si. dan Mama Nur Asiah HM. SM. yang telah memberikan limpahan kasih sayang, memberikan kesempatan bagi penulis menikmati indahny alam semesta dan telah menjadi mentor terbaik sepanjang hidup penulis. Kepada saudara-saudara tersayang Ainun Novianti Zahrah S.Si., Anugrah Nur Auliani, Azizah Syahrunitul Mubaraq, dan Addini Naimatunnisa yang telah menjadi *support system* terhebat sepanjang masa.

Penulis juga mengucapkan terima kasih dan penghormatan setinggi-tingginya kepada Ibu Dr. Hasnah Natsir, M.Si. dan Ibu Dr. Seniwati Dali, M.Si. selaku pembimbing yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran dalam membantu penulis menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Tak lupa pula penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu Dr. Indah Raya, M.Si. dan Ibu Syadza Firdauziah, M.Sc. sebagai tim penguji yang telah memberikan arahan dan masukan dalam penyelesaian skripsi ini.

Segep hati tulus dan penuh hormat penulis juga mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Dekan FMIPA Unhas, Dr. Eng. Amiruddin, S.Si, M.Si. serta seluruh staf FMIPA Unhas.
2. Bapak Dr. Abd. Karim, M.Si. selaku Kepala Departemen Kimia dan Ibu Dr. St. Fauziah, M.Si. selaku Sekretaris Departemen Kimia dan seluruh dosen yang telah membimbing dan memberikan ilmunya kepada penulis selama menempuh pendidikan serta seluruh staf Departemen Kimia.
3. Ibu Dr. Seniwati Dali, M.Si. selaku penasehat akademik penulis yang telah membimbing dan mengarahkan penulis selama menempuh pendidikan.
4. Seluruh Analis Laboratorium Departemen Kimia FMIPA Unhas, Ibu Anti, Ibu Fibi, Ibu Tini, Pak Sugeng, Ibu Linda, Kak Hanna, Pak Taufik, dan Pak Ikkal yang telah banyak membantu penulis selama melakukan penelitian.
5. Sahabat penulis, KEMENTERIAN, Aldi, Angel, Anti, Chelsea, Rona, Silet, dan Yanda yang telah menghibur dan menyemangati penulis.
6. Sahabat penulis, ENA-ENA, Michael, Rey, Nisa, Septi, Mena, Fajar, Dira, Fian, Novi, dan Eka yang telah berbagi pengalaman dan ilmu selama menempuh pendidikan bersama.
7. Teman-teman KROMOFOR yang telah menjadi angkatan terkompak sejak maba hingga saat ini.
8. Teman panel tidak se-lab, Annisyah Aprilia Achman dan Wandu Ashar, yang telah memberikan dukungan, menemani dan membantu penulis pada masa krusial penelitian dan penulisan skripsi.
9. Kanda Akbar dan Kanda Emmy yang telah memberikan saran, arahan dan bimbingannya selama penelitian.
10. Teman-teman peneliti Lab Biokimia yang telah banyak membantu selama penulis melakukan penelitian.

11. *Crew Assay and Analytical Laboratory* PT. Freeport Indonesia (Pak Paulus, Pak Yopi, Pak Nunu, Kak Hana, Kak Amel, Kak Ulla, Kak Haidil, dan Kak Yusi), teman-teman magang PT. Freeport Indonesia (ODPTFI), seluruh staf Laboratorium Forensik Polri Cabang Makassar, teman-teman Bushido XI, dan teman-teman *Starbucks Makassar Airport 1* (SCF1) yang memberikan pengalaman dan pelajaran berkarir kepada penulis sembari menempuh pendidikan.
12. Semua pihak yang tidak sempat tertulis namanya yang telah memberikan dukungan maupun bantuan kepada penulis.
13. Last but not least, I wanna thank me, I wanna thank me for believing in me, I wanna thank me for doing all this hard work, I wanna thank me for having no days off, I wanna thank me for never quitting, and for just being me all this time, I did it man!

Penulis menyadari bahwa penyusunan dan penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu dengan segala kerendahan hati, penulis mengharapkan kritikan dan saran yang membangun dari berbagai pihak. Penulis juga berharap agar skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Penulis

2022

ABSTRAK

Lipase (triasilgliserol ester hidrolase, EC 3.1.1.3) merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis lemak dan minyak menjadi asam lemak bebas dan gliserol. Produksi lipase yang bersumber dari mikroba menunjukkan potensi besar sebagai biokatalis karena kemampuannya melakukan aktivitas hidrolitik pada berbagai medium fermentasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengamobilisasi lipase dari *Rhizopus oryzae* agar diperoleh enzim amobil yang dapat digunakan secara kontinyu sebagai biokatalis. Tahapan metode diawali dengan isolasi lipase melalui fermentasi fase padat menggunakan limbah agroindustri berupa ampas kelapa sebagai substrat, dilanjutkan dengan amobilisasi enzim dengan metode adsorpsi-*crosslinking*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas lipase tertinggi yaitu 0,1054 U/mL diperoleh pada kondisi waktu fermentasi 7 hari dan konsentrasi induser 3%. Karakterisasi lipase menunjukkan kondisi optimum pada suhu 45 °C, pH 7, konsentrasi substrat 40%, konsentrasi enzim 40%, serta penambahan ion logam Ca²⁺ (10 mM dan 50 mM) dan Mg²⁺ (50 mM) sebagai aktivator. Lebih lanjut dilakukan amobilisasi lipase menggunakan *macroporous anion resin* dan glutaraldehid. Konsentrasi lipase amobil yang diperoleh masing-masing yaitu 12,6% dan 92,8%. Penelitian ini membuktikan bahwa lipase dari *Rhizopus oryzae* dapat diisolasi menggunakan substrat ampas kelapa melalui fermentasi fase padat. Lipase dari *Rhizopus oryzae* berpotensi diamobilisasi dengan metode adsorpsi-*crosslinking* untuk memperoleh konsentrasi enzim amobil yang tinggi.

Kata kunci: Ampas kelapa, amobilisasi adsorpsi-*crosslinking*, fermentasi fase padat, lipase, *Rhizopus oryzae*.

ABSTRACT

Lipase (triacylglycerol ester hydrolase, EC 3.1.1.3) are enzymes that catalyze the hydrolysis of fats and oils, releasing free fatty acids and glycerol. Microbial lipase has shown great potentials as a biocatalyst due to the ability to perform hydrolytic activities at various fermentation media. This study aimed to isolate and immobilize lipase from *Rhizopus oryzae* to obtain immobilized enzyme that can be used continuously as a biocatalyst. Initially lipase isolated through solid state fermentation using agroindustrial waste such as coconut dregs as a substrate, followed by adsorption-crosslinking immobilization. The results showed that the highest activity unit of 0,1054 U/mL was obtained at 7 days incubation and 3% of inducer concentration. Lipase characterization showed optimum conditions at 45 °C, pH 7, substrate concentration 40%, enzyme concentration 40%, also the addition of Ca²⁺ (10 mM and 50 mM) and Mg²⁺ (50 mM) as enzyme activator. Furthermore, immobilization was carried out by macroporous anion resin and glutaraldehyde. The concentration of immobilized lipase was obtained 12,6% dan 92,8%, respectively. This research proves that lipase from *Rhizopus oryzae* can be isolated using coconut dregs as a substrate through solid state fermentation. Lipase from *Rhizopus oryzae* potential to be immobilized by adsorption-crosslinking method to obtain high concentration of immobilized enzymes.

Keyword: Coconut dreg, adsorption-crosslinking immobilization, solid state fermentation, lipase, *Rhizopus oryzae*.

DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA.....	v
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR SINGKATAN.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 <i>Rhizopus oryzae</i>	6
2.2 Enzim Lipase.....	8
2.3 Reaksi yang Dikatalisis Enzim Lipase.....	11
2.4 Fermentasi Fase Padat.....	13
2.5 Amobilisasi Enzim.....	15
2.6 Penelitian Terkait Amobilisasi Enzim dan Aplikasinya.....	19
BAB III METODE PENELITIAN.....	21

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	21
3.2 Bahan Penelitian	21
3.3 Alat Penelitian	21
3.4 Prosedur Penelitian.....	22
3.4.1 Subkultur Isolat <i>Rhizopus oryzae</i>	22
3.4.2 Penentuan Aktivitas Lipase dari <i>R. oryzae</i> Secara Kualitatif	22
3.4.3 Isolasi Enzim Lipase dari <i>R. oryzae</i>	22
3.4.3.1 Preparasi Substrat.....	22
3.4.3.2 Pembuatan Larutan Nutrien	23
3.4.3.3 Preparasi Medium Fermentasi.....	23
3.4.3.4 Fermentasi Fase Padat.....	23
3.4.3.5 Ekstraksi Enzim Lipase.....	23
3.4.4 Penentuan Kadar Protein Enzim Lipase dari <i>R. oryzae</i>	24
3.4.4.1 Pembuatan Reagen Lowry	24
3.4.4.2 Pembuatan Larutan Standar BSA.....	24
3.4.4.3 Uji Kadar Protein Enzim Lipase	24
3.4.5 Penentuan Aktivitas Lipase dari <i>R. oryzae</i> Secara Kuantitatif	25
3.4.5.1 Pembuatan Reagen Cu(II) Asetat 5% pH 6.....	25
3.4.5.2 Pembuatan Larutan Standar Asam Oleat	25
3.4.5.3 Uji Aktivitas Enzim Lipase	25
3.4.6 Karakterisasi Enzim Lipase dari <i>R. oryzae</i>	26
3.4.6.1 Penentuan Suhu Optimum.....	26
3.4.6.2 Penentuan pH Optimum.....	26
3.4.6.3 Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum.....	26

3.4.6.4 Penentuan Konsentrasi Enzim Optimum	26
3.4.6.5 Uji Pengaruh Ion Logam	26
3.4.7 Amobilisasi Adsorpsi-Crosslinking	27
3.4.8 Pengukuran Konsentrasi Lipase Amobil	27
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	28
4.1 Isolasi Enzim Lipase dari <i>R. oryzae</i>	28
4.2 Analisis Kualitatif Lipase dari <i>R. oryzae</i> dengan Metode <i>ROA Plate Assay</i>	32
4.3 Pengaruh Konsentrasi Induser Terhadap Produksi Lipase dari <i>R. oryzae</i>	33
4.4 Karakterisasi Enzim Lipase dari <i>R. oryzae</i>	35
4.4.1 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Lipase dari <i>R. oryzae</i> ...	35
4.4.2 Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Lipase dari <i>R. oryzae</i>	36
4.4.3 Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Enzim Terhadap Aktivitas Lipase dari <i>R. oryzae</i>	37
4.4.4 Pengaruh Penambahan Ion Logam Terhadap Aktivitas Lipase dari <i>R. oryzae</i>	39
4.5 Amobilisasi Lipase dari <i>R. oryzae</i>	44
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	47
5.1 Kesimpulan.....	47
5.2 Saran.....	47
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN.....	56

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Mikroba Penghasil Lipase.....	10
Kadar Protein dan Aktivitas Lipase dari <i>R. oryzae</i> Berdasarkan Waktu Fermentasi dan Konsentrasi Induser	31

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Morfologi <i>R. oryzae</i>	7
Struktur Enzim Lipase.....	9
Reaksi yang Dikatalisis Enzim Lipase.....	12
Ilustrasi Metode Amobilisasi Enzim.....	18
Prinsip Reaksi Penentuan Aktivitas Lipase Menggunakan Metode Kwon dan Rhee.....	29
Prinsip Reaksi Penentuan Kadar Protein Enzim Menggunakan Metode Lowry	30
Analisis Kualitatif Lipase dari <i>R. oryzae</i> pada Media ROA	32
Grafik Pengaruh Konsentrasi Induser Terhadap Produksi Lipase dari <i>R. oryzae</i>	34
Grafik Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Lipase dari <i>R. oryzae</i>	35
Grafik Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Lipase dari <i>R. oryzae</i>	37
Grafik Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Lipase dari <i>R. oryzae</i>	38
Grafik Pengaruh Konsentrasi Enzim Terhadap Aktivitas Lipase dari <i>R. oryzae</i>	38
Grafik Pengaruh Penambahan Ion Logam Terhadap Aktivitas Lipase.....	40
Struktur Kompleks Ca-Lipase <i>R. oryzae</i>	41
Struktur Kompleks Fe-Lipase <i>R. oryzae</i>	42
Struktur Kompleks Mg- Lipase <i>R. oryzae</i>	43
Skema Amobilisasi Adsorpsi-Crosslinking Lipase <i>R. oryzae</i>	44
Grafik Konsentrasi Enzim Amobil.....	45

Reaksi Amobilisasi Lipase dari <i>R. oryzae</i> dengan Metode Adsorpsi- <i>Crosslinking</i>	45
--	----

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Diagram Alir Penelitian	57
Subkultur Isolat <i>Rhizopus oryzae</i>	58
Penentuan Aktivitas Lipase dari <i>R. oryzae</i> Secara Kualitatif	59
Isolasi Enzim Lipase dari <i>R. oryzae</i>	60
Penentuan Kadar Protein Enzim Lipase dari <i>R. oryzae</i>	62
Penentuan Aktivitas Lipase dari <i>R. oryzae</i> Secara Kuantitatif	64
Karakterisasi Enzim Lipase dari <i>R. oryzae</i>	66
Amobilisasi Adsorpsi- <i>Crosslinking</i>	67
Pengukuran Konsentrasi Lipase Amobil.....	68
Perbandingan Produksi Lipase Menggunakan Metode Fermentasi Fase Padat pada Berbagai Mikroorganisme	69
Penentuan Kurva Standar BSA ($\lambda_{maks} = 738 \text{ nm}$)	72
Penentuan Kurva Standar Asam Oleat ($\lambda_{maks} = 676 \text{ nm}$)	73
Data Hasil Karakterisasi Ekstrak Lipase dari <i>R. oryzae</i>	74
Perhitungan Konsentrasi Lipase Amobil	76
Dokumentasi Penelitian	77

DAFTAR SINGKATAN

BSA	= <i>Bovine Serum Albumin</i>
dss	= <i>dry solid substrate</i>
FAME	= <i>Fatty Acid Methyl Ester</i>
LSF	= <i>Liquid State Fermentation</i>
PDA	= <i>Potato Dextro Agar</i>
PVA	= Polivinil Alkohol
ROA	= <i>Rhodamin-B Olive Oil Agar</i>
SmF	= <i>Submerged Fermentation</i> (Fermentasi Fase Cair)
SSF	= <i>Solid State Fermentation</i> (Fermentasi Fase Padat)

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang melimpah, berdasarkan petunjuk teknis pemetaan sebaran agen hayati tahun 2015 yaitu terdapat 25.000 spesies tumbuhan, 400.000 jenis hewan dan ikan serta ± 700 jenis mikroorganisme yang potensial dalam produksi enzim (Murtiningrum dan Firdaus, 2015). Enzim dihasilkan oleh semua makhluk hidup untuk mengkatalisis reaksi biokimia dalam tubuhnya agar dapat berlangsung lebih cepat. Selain itu, enzim juga dihasilkan sebagai bentuk pertahanan diri pada kondisi tertentu oleh mikroorganisme, seperti pada *Erwinia chrysantemi* (Kasipah dkk, 2013) dan *Aspergillus niger* (Indah dkk, 2017) yang menghasilkan enzim lipase pada kondisi menipisnya bahan makanan pada substrat. Enzim telah banyak dimanfaatkan untuk berbagai keperluan komersial dalam bidang industri, pertanian, farmasi dan medis yang menyebabkan peningkatan penggunaan enzim sebesar 10-15% per tahun (Rahmiati dkk, 2016). Salah satu enzim yang mendominasi produksi dan perdagangan pada berbagai bidang yaitu enzim lipase yang merupakan kelompok enzim hidrolitik.

Enzim lipase dapat bersumber dari hewan, tumbuhan dan mikroorganisme, namun lipase yang berasal dari mikroorganisme adalah sumber yang lebih baik karena memiliki stabilitas yang tinggi dan enzimnya bersifat ekstraseluler (Nema dkk, 2019). Jenis mikroorganisme yang dapat digunakan yaitu spesies jamur berfilamen seperti *Rhizopus sp.* karena secara ekonomi lebih mudah diperoleh dengan harga yang relatif murah dan dapat tumbuh pada media ekstrim berupa

limbah dengan aktivitas yang beragam (Vaseghi dkk, 2013; Indah dkk, 2017). Beberapa lipase dari *Rhizopus sp.* yaitu lipase *Rhizopus rhizopodiformis* memiliki aktivitas spesifik 30,5 U/g biomassa dengan substrat minyak kelapa (2% v/v) pada jam ke-48, sedangkan *Rhizopus oligosporus* memiliki aktivitas spesifik 16,23 U/g biomassa dengan substrat minyak kelapa pada jam ke-24 (Mangunwardoyo dkk, 2011). Penelitian lain dilakukan oleh Yu dkk (2013) menggunakan *Rhizopus oryzae* termodifikasi sebagai biokatalis produksi biodiesel dengan aktivitas 40,50 U/mL dan konversi *fatty acid methyl ester* (FAME) sebesar 91,9±2,5%.

Produksi enzim lipase dari mikroorganisme dapat dilakukan melalui teknik fermentasi fase padat atau *solid state fermentation* (SSF). Teknik ini dapat menekan biaya pada proses produksi enzim lipase karena tidak menggunakan banyak pelarut melainkan menggunakan medium padat sebagai sumber nutrisi. Tahapan yang perlu diperhatikan untuk mendukung keberhasilan SSF diantaranya, pemilihan jenis mikroorganisme, pengaturan kondisi proses (komposisi medium pertumbuhan, induser, pH, dan suhu) serta lama waktu fermentasi (Manan dan Webb, 2017). Menurut Murni dkk (2011), enzim hanya dapat diproduksi bila ada senyawa yang menginduksinya. Jika hanya terdapat substrat glukosa maka enzim lipase tidak dapat disintesis, sehingga konsentrasi induser dalam SSF perlu menjadi perhatian. Penelitian yang dilakukan oleh Pratiwi dkk (2013) menyatakan bahwa produksi lipase juga dipengaruhi oleh penambahan kofaktor berupa ion logam untuk dapat meningkatkan aktivitas dan kestabilan enzim.

Pemanfaatan limbah agroindustri sebagai substrat SSF seperti sekam padi, dedak gandum dan limbah biji jarak (Casas-Godoy dkk, 2018; Pau dan Omar, 2004)

telah dilakukan. Penggunaan limbah agroindustri sebagai substrat padat dapat mengurangi toksisitas dan alkalinitas dari limbah tersebut. Hal ini terbukti sangat potensial dalam mengurangi pencemaran lingkungan akibat buangan limbah agroindustri. Mengingat bahwa agroindustri adalah sektor yang menghasilkan limbah dalam jumlah besar dan mengandung polutan organik dengan konsentrasi yang tinggi (Suprihatin, 2009).

Penggunaan katalis enzim rentan mengalami deaktivasi akibat kelarutan alkohol rantai pendek dan minyak yang cukup kecil serta penurunan aktivitas enzim akibat adanya gliserol yang melapisi enzim. Ditambah lagi dengan biaya pengadaan enzim yang tinggi sehingga proses ini tidak ekonomis (Sari, 2014). Oleh karena itu, diperlukan suatu teknik reaksi tertentu yang dapat digunakan untuk mengatasi beberapa kelemahan katalis ini. Solusi yang dapat diterapkan yaitu melakukan amobilisasi pada enzim. Amobilisasi enzim berguna untuk mencegah inaktivasi enzim dan meningkatkan stabilitas kerja enzim sehingga dapat digunakan secara kontinyu (Stepani, 2012).

Istilah enzim amobil mengacu pada enzim yang secara fisik ditempatkan pada suatu matriks tertentu sehingga dapat menahan aktivitas katalitiknya. Amobilisasi enzim dilakukan pada permukaan maupun di dalam material pendukung dengan metode fisik (*adsorpsi*, *entrapment* dan *mikroenkapsulasi*) atau kimia (*crosslinking* dan *covalent attachment*) (Mohamad dkk, 2015). Proses amobilisasi ditentukan oleh jenis matriks dan metode amobilisasi yang digunakan. Menurut Ainiyah (2017), amobilisasi adsorpsi fisik atau *carrier binding* adalah metode amobilisasi yang sederhana, mudah dilakukan dan ekonomis. Enzim secara fisik diadsorpsi pada permukaan matriks berpori yang bersifat hidrofobik. Metode

amobilisasi adsorpsi terjadi melalui gaya nonspesifik yang lemah antara enzim dan matriks yang mengakibatkan rendahnya aktivitas dan stabilitas enzim amobil. Penggunaan glutaraldehid sebagai pengikat silang merupakan salah satu cara untuk meningkatkan stabilitas dan interaksi antara enzim dan matriks. Penelitian yang dilakukan Nuraliyah dkk (2017) menunjukkan efektifitas metode amobilisasi adsorpsi-*crosslinking* dari lipase *Candida rugosa* menggunakan kulit jagung sebagai matriks adsorpsi dan glutaraldehid sebagai pengikat silang . Aktivitas enzim amobil yang diperoleh yaitu 2,37 U/g selama 4 jam dan persentase konsentrasi enzim amobil yaitu 6,43% - 53,7%.

Berdasarkan studi literatur yang telah dilakukan, penelitian ini menitikberatkan pada produksi dan amobilisasi enzim lipase dari *R. oryzae*. Isolasi enzim lipase dilakukan dengan menggunakan teknik fermentasi fase padat dengan melakukan variasi terhadap konsentrasi induser, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, pH, suhu, penambahan ion logam, dan waktu fermentasi sebagai faktor pendukung keberhasilan produksi enzim. Substrat yang digunakan bersumber dari limbah agroindustri yaitu limbah ampas kelapa. Penggunaan ampas kelapa dari limbah produksi minyak kelapa memiliki kandungan lipid yang cukup tinggi yaitu sekitar 10-16%; protein 4,11%; serat kasar 30,58%; karbohidrat 79,34%; dan abu 0,66% (Suyanto dkk, 2015), sehingga berpotensi dimanfaatkan sebagai substrat pertumbuhan *R. oryzae* dimana lipid dapat berperan sebagai induser alami yang meningkatkan aktivitas lipase. Produksi lipase dapat dimaksimalkan dengan penambahan induser berupa minyak zaitun. Minyak zaitun dipilih sebagai penginduksi yang efektif karena mengandung tributirin, sejenis lipid yang secara struktural lebih mudah dicerna oleh mikroorganismenya (Prabaningtyas dkk, 2018).

Produksi lipase disertai dengan modifikasi enzim menggunakan teknik amobilisasi adsorpsi-*crosslinking*. Metode ini dilakukan agar diperoleh enzim amobil yang dapat digunakan secara kontinyu sebagai biokatalis yang efektif dan efisien.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian adalah:

1. bagaimana kondisi optimum produksi lipase dari *R. oryzae* melalui fermentasi fase padat dengan substrat ampas kelapa?
2. berapa konsentrasi enzim amobil yang diperoleh dari amobilisasi adsorpsi dan adsorpsi-*crosslinking* lipase *R. oryzae*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian adalah:

1. menentukan kondisi optimum produksi lipase *R. oryzae* melalui fermentasi fase padat dengan substrat ampas kelapa.
2. menentukan konsentrasi enzim amobil yang diperoleh dari amobilisasi adsorpsi dan adsorpsi-*crosslinking* lipase *R. oryzae*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah sebagai sumber informasi ilmiah mengenai isolasi lipase dari *R. oryzae* melalui fermentasi fase padat menggunakan substrat ampas kelapa, serta amobilisasi adsorpsi-*crosslinking* untuk memperoleh lipase amobil. Isolasi lipase memanfaatkan limbah agroindustri berupa ampas kelapa sebagai substrat dan lipase amobil yang dihasilkan dapat digunakan secara kontinyu sebagai biokatalisator yang efektif dan efisien.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

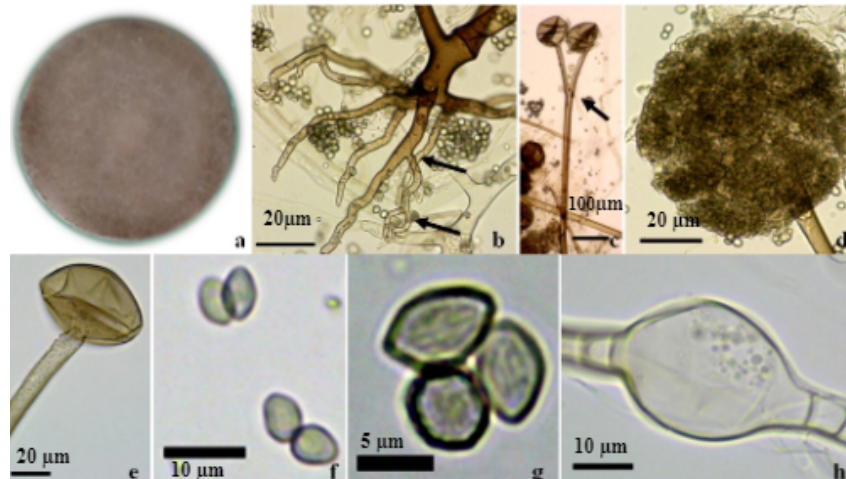
2.1 *Rhizopus oryzae*

Jamur *Rhizopus oryzae* yaitu koloni berwarna putih hingga keabuan dengan stolon yang halus hingga sedikit kasar, tidak berwarna hingga kuning kecoklatan. Jamur ini memiliki sporangiofora yang tumbuh dari stolon dengan menjulur keatas berjumlah satu hingga lima buah dimana spora berbentuk bulat, oval, maupun elips. Suhu optimal untuk pertumbuhan *R. oryzae* 35 °C dengan suhu tumbuh minimal adalah 5-7% dan suhu tumbuh maksimal 44 °C (Muryanto, 2012). Adapun taksonomi *R. oryzae* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Fungi
Divisi	: <i>Zygomycota</i>
Kelas	: <i>Zygomycetes</i>
Ordo	: <i>Mucorales</i>
Famili	: <i>Mucoroceae</i>
Genus	: <i>Rhizopus</i>
Spesies	: <i>Rhizopus oryzae</i>

Berdasarkan morfologi dan fisiologinya terdapat tiga kelompok besar *Rhizopus*, yaitu *R. microsporus*, *R. oryzae*, dan *R. stolonifer*. Penelitian yang dilakukan oleh Hartanti dkk (2019) menggunakan oncom hitam menunjukkan bahwa kelompok *R. oryzae* dapat dibedakan berdasarkan senyawa metabolit yang dihasilkan yaitu asam laktat disebut *R. oryzae* dan asam malat-fumarat disebut *R. delemar*. Selain itu *R. oryzae* memiliki sporangiospora yang seragam dalam bentuk dan ukurannya. Sedangkan *R. delemar* memiliki sporangiospora yang

bervariasi dalam bentuk dan ukurannya serta sporangiofornya mengalami pembengkakan pada bagian atasnya. Adapun secara mikroskopik *R. oryzae* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Morfologi *R. oryzae* (Hartanti dkk, 2019)

Rhizopus oryzae dapat dimanfaatkan dalam berbagai bidang seperti industri pertanian dan farmasi hingga produksi biodiesel. Beberapa enzim yang dapat diproduksi dari *R. oryzae* seperti enzim selulase dan endoglukanase menggunakan *R. oryzae* yang diisolasi dari tanah maupun limbah agroindustri. Metode isolasi yang digunakan dapat berupa LSF (*Liquid-state Fermentation*) dan SSF (*Solid-state Fermentation*) (Karmakar dan Ray, 2011). Selain itu, enzim xylanase juga dapat diproduksi dari *R. oryzae* melalui fermentasi menggunakan substrat agrikultur seperti jerami dan batang gandum, ampas tebu, kulit hazelnut, serta tongkol jagung pada kondisi anaerobik (Maas dkk, 2008). Beberapa enzim lain seperti pektinase yang diisolasi dari *R. oryzae* NBRC 4707 dengan metode fermentasi fase padat pada kondisi pH 4,5 dan suhu 45 °C (Saito dkk, 2004).

Pertumbuhan mikroorganisme dalam produksi enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti komposisi media pertumbuhan, induser dan represor, pH, suhu, serta aerasi dan pengadukan. Media pertumbuhan yang dipilih berfungsi

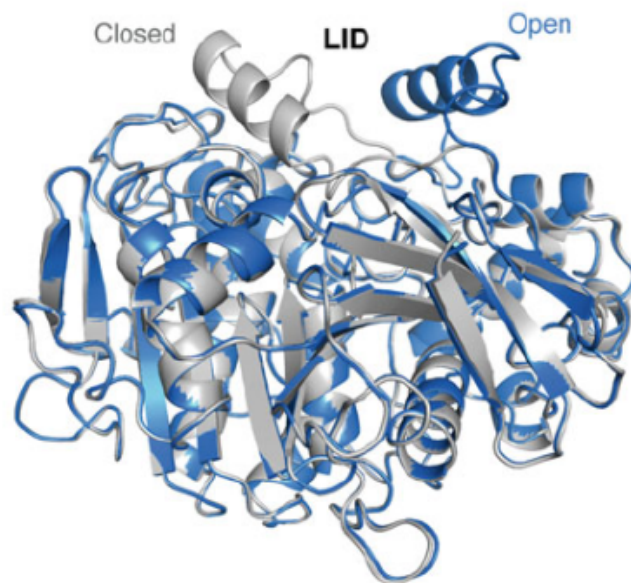
sebagai sumber nutrisi diantaranya C, N, P, S, Fe, dan Mg serta vitamin. Oleh sebab itu substrat pertumbuhan yang dipilih harus mengandung senyawa yang berperan sebagai represor pada produksi enzim berupa mono dan disakarida. Namun demikian enzim hanya dapat diproduksi apabila ada senyawa yang menginduksinya sehingga diperlukan induser sebagai senyawa yang mampu memacu kerja mikroorganisme untuk menghasilkan enzim (Murni dkk, 2011). Dalam penelitian yang dilakukan oleh Khayati dkk (2013) digunakan 3 jenis minyak zaitun sebagai induser produksi enzim lipase menggunakan *Rhizopus sp.* Minyak zaitun sebagai induser produksi lipase juga digunakan Aliyah dkk (2016) pada fermentasi fase padat menggunakan *Aspergillus niger*.

2.2 Enzim Lipase

Lipase (EC 3.1.1.3) merupakan enzim yang berperan sebagai biokatalis untuk reaksi hidrolisis, esterifikasi, amidasi, tioesterifikasi, alkoholis, asidolisis, dan aminolisis serta reaksi interesterifikasi. Enzim lipase dapat menghidrolisis trigliserida menjadi asam lemak bebas, gliserida parsial dan gliserol. Trigliserida sebagai substrat terdiri dari asam lemak rantai panjang yang tidak larut dalam air (Murni dkk, 2011). Enzim lipase digunakan secara luas pada sektor industri sebagai katalis dalam pembuatan deterjen serta pembuatan polimer dan zat pengemulsi (Indah dkk, 2017). Adapun struktur enzim lipase dapat dilihat pada Gambar 2.

Lipase merupakan jenis enzim yang sifatnya bergantung pada substrat dan sumbernya. Aktivitas lipase juga dipengaruhi oleh beberapa faktor lain seperti pH, suhu dan waktu berlangsungnya reaksi. Kondisi dimana derajat keasaman (pH) lipase jauh dari optimum dapat mengganggu kestabilan enzim dan menyebabkan inaktivasi karena terjadi kerusakan struktur enzim. Seperti pada penelitian yang

dilakukan oleh Sumarlin dkk (2013) yang menunjukkan bahwa aktivitas lipase optimum pada pH 7 yaitu 0,54 U/mL dan pada kondisi pH 6 aktivitas enzim lipase menurun yaitu 0,13 U/mL begitupula pada kondisi pH 7,5 dan pH 8 yaitu 0,25 U/mL dan 0,13 U/mL. Optimasi aktivitas lipase juga dilakukan oleh Hutasoit dkk (2017) dengan aktivitas tertinggi diperoleh pada kondisi pH 6 yaitu 0,107 U/mL dan aktivitas lipase menurun seiring dengan kondisi pH semakin basa.



Gambar 2. Struktur Enzim Lipase (Casas-Godoy dkk, 2018)

Faktor lain yang mempengaruhi kondisi optimum enzim yaitu suhu. Laju reaksi akan meningkat sejalan dengan kenaikan suhu sampai pada batas optimalnya. Kemudian aktivitas akan menurun setelah melewati enzim tersebut dan menyebabkan enzim mengalami denaturasi. Namun, suhu yang terlalu rendah menyebabkan aktivitas enzim kurang baik (tidak optimal). Seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Supriyatna dkk (2015) tentang aktivitas enzim lipase dari ekstrak usus larva *Hermetia illucens*, dimana diperoleh kondisi optimum aktivitas enzim lipase pada suhu 40 °C yaitu 0,8248 U/mL dengan variasi

suhu dan aktivitas enzimnya masing-masing yaitu 30 °C - 0,2238 U/mL, 35 °C - 0,2438 U/mL, 45 °C-0,3198 U/mL, dan 50 °C- 0,2152 U/mL.

Tabel 1. Mikroba Penghasil Lipase (Thangaraj dkk, 2019)

Lipase	Kondisi Reaksi	Referensi
<i>Burkholderia</i> sp.	Rasio minyak:metanol 1:4; temperatur 40 °C; waktu 30 jam	Tran dkk, 2012
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Rasio minya:metanol 2:5; temperatur 44,2 °C; waktu 24 jam	Sipponen dkk, 2018
<i>Candida rugosa</i>	Rasio minyak:metanol 1:4; temperatur 35 °C; waktu 24 jam	Xie dan Wang, 2014
<i>Thermomyces lanuginosus</i> dan <i>Candida antarctica</i>	Rasio minyak:metanol 1:7,6; temperatur 30 °C; waktu 12 jam	Ngo dkk, 2013
<i>Pseudomonas fluorescens</i> dan <i>Pseudomonas cepacia</i>	Temperatur 40 °C; MeOH:minyak 8:1	Salis dkk., 2008
<i>Themomyces lanuginose</i>	Temperatur 45 °C; waktu 35 jam; MeOH:minyak 1:1	Xie dan Ma, 2010
<i>Rhizopus oryzae</i>	Rasio minyak:metanol 1:4; temperatur 35 °C; waktu 72 jam	Chen dkk, 2017
<i>Aspergillus oryzae</i>	Temperatur 35 °C; kecepatan pengadukan 150 rpm; konsentrasi minyak zaitun 3%; waktu 96 jam	Dali dkk, 2011

Enzim lipase dapat diproduksi oleh tumbuhan, hewan dan mikroorganisme. Lipase diperoleh dari ekstrak pankreas dan lambung babi, kambing, domba, sapi dan manusia. Dapat pula bersumber dari tumbuhan seperti isolasi *rape* (*Brassica napus*), *mustard* (*Sinaps alba*), *castor bean* (*Ricinnus communis*), dan minyak nabati *germinating*. Selain itu, lipase paling umum berasal dari mikroorganisme yang diperoleh dari fermentasi oleh jamur atau bakteri (Patel dkk 2018). Keanekaragaman sumber daya mikroba serta kemampuannya untuk beradaptasi dalam lingkungan yang tidak ramah, seperti laut mati, antartika, mata air panas, ventilasi vulkanik dan tanah yang terkontaminasi menjadi potensi yang luar biasa

untuk produksi enzim (Celligoi dkk, 2016). Beberapa mikroba yang dapat menjadi sumber lipase dapat dilihat pada Tabel 1.

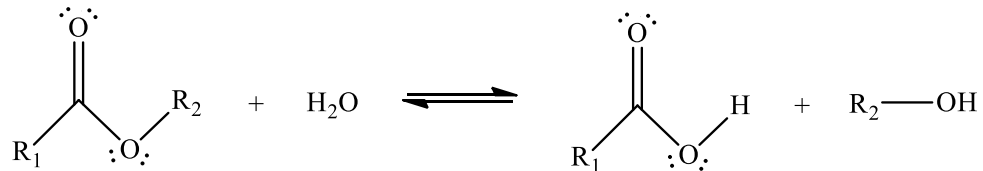
Mikroba utama yang umum digunakan sebagai sumber lipase dengan teknik fermentasi fase padat yaitu jenis jamur berfilamen. Beberapa spesies penghasil lipase yang dominan digunakan yaitu *Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.*, *Rhizomucor sp.*, *Geotrichum sp.*, dan *Penicillium sp.* Penelitian yang telah dilakukan yaitu produksi enzim lipase dari *R. oryzae* menggunakan reaktor baki dengan substrat ampas tebu berpotensi menghasilkan lipase dengan aktivitas yang tinggi yaitu 22,9 U/gram biomassa (Vaseghi dkk, 2013). Selain itu, produksi lipase dari *R. arrhizus* menggunakan modifikasi nanopartikel M β CD melalui dua tahap purifikasi (kemurnian >95%) berpotensi dimanfaatkan sebagai biokatalis produksi biodiesel dengan konversi substrat-FAME sebesar 98% (Sharma dkk, 2018). Murni dkk (2011) telah melakukan penelitian tentang produksi, karakterisasi, dan isolasi lipase dari *Aspergillus niger* dengan menggunakan induser minyak goreng sawit dan memperoleh aktivitas enzim lipase tertinggi (1,5 μ mol/mL menit) pada kondisi pH 7, suhu 30 °C selama 12 jam. Penelitian terkait juga dilakukan oleh Suyanto dkk (2019) tentang produksi dan optimasi lipase *Aspergillus niger* melalui *solid state fermentation* diperoleh aktivitas enzim yaitu 10,83 U/mL pada kondisi medium limbah dengan suhu 30 °C.

2.3 Reaksi yang Dikatalisis Enzim Lipase

Enzim lipase secara alami mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan ester tri-, di- dan monogliserida menjadi asam lemak dan gliserol. Pada kondisi tertentu enzim lipase mengkatalisis reaksi sintesis yang dapat diklasifikasikan menjadi dua jenis reaksi utama, yaitu esterifikasi dan transesterifikasi. Seperti dapat dilihat pada

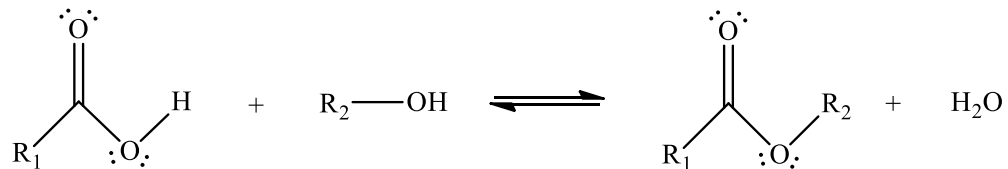
Gambar 3, esterifikasi berlangsung melalui reaksi antar asam lemak dan alkohol membentuk ikatan kovalen dengan katalis enzim lipase menghasilkan ester dan melepaskan molekul air. Tioesterifikasi dan amidasi reaksi serupa tetapi dengan tiol atau amina sebagai substrat (Casas-Godoy dkk, 2018).

Hidrolisis

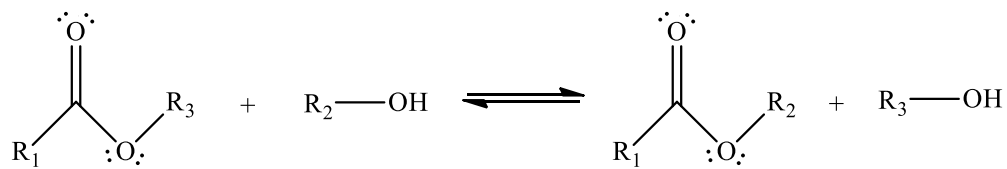


Sintesis

Esterifikasi



Transesterifikasi - Reaksi Alkoholisis



Interesterifikasi



Gambar 3. Reaksi yang Dikatalisis Enzim Lipase (Casas-Godoy dkk, 2018)

Reaksi transesterifikasi alkoholisis, asidolisis, aminolisis, dan interesterifikasi biasanya berlangsung pada kondisi medium dengan konsentrasi air yang rendah. Reaksi ini berlangsung melalui proses pertukaran radikal asil antara ester dan asam atau asidolisis, antara ester dan ester lainnya atau interesterifikasi dan antara ester

dan alkohol atau alkoholisis yang dapat dilihat pada Gambar 3. Pada reaksi interesterifikasi, alkohol sebagai sumber alkil digantikan dengan alkil asetat agar enzim lipase yang digunakan sebagai biokatalis dapat bekerja secara optimum dengan tingkat konversi metil ester yang tinggi (Amini dkk, 2016).

Berdasarkan kemampuannya dalam sintesis ikatan ester, enzim lipase diklasifikasikan menjadi tiga golongan. Lipase non-spesifik mengkatalisis reaksi hidrolisis triasilgliserol menjadi asam lemak dan gliserol secara acak. Lipase spesifik 1,3 menghidrolisis triasilgliserol pada gugus asil nomor 1 dan 3, kemungkinan produk yang dihasilkan yaitu 2-monoasilgliserol dan 1,2-diasilgliserol atau 2-3-diasil gliserol. Lipase spesifik asam lemak menghidrolisis ester asam lemak pada triasilgliserol (Sholeha dan Agustina, 2021).

2.4 Fermentasi Fase Padat

Fermentasi fase padat atau *Solid State Fermentation* (SSF) didefinisikan sebagai proses fermentasi dimana mikroorganisme tumbuh pada fase padat yang lembab (*free liquid*) dan efektif dilakukan untuk menumbuhkan mikroorganisme jenis jamur. Secara alami jamur dapat tumbuh pada substrat padat seperti kayu, biji, batang, akar dan bagian hewan yang kering seperti kulit, tulang dan kotoran. Teknik ini juga memiliki kelebihan dibandingkan dengan teknik lainnya yaitu energi yang digunakan cukup rendah, ekonomis serta potensi produktivitas volumetrik yang lebih tinggi adalah beberapa keunggulan teknik ini (Bhargav dkk, 2007).

Beberapa tahapan secara umum untuk melakukan fermentasi fase padat yaitu sebagai berikut (Gowthaman dkk, 2001):

1. Preparasi inokulum, pada tahapan ini digunakan substrat yang sesuai agar spora dapat tumbuh.

2. Persiapan substrat, tahapan ini termasuk pengurangan ukuran, penambahan nutrisi dan penyesuaian pH.
3. Autoklaf yang merupakan tahapan untuk mensterilkan media pertumbuhan.
4. Inokulasi medium
5. Inkubasi pada kondisi yang optimal.
6. Pengeringan padatan dan ekstraksi produk.
7. Penyaringan dan pemurnian

Penelitian yang dilakukan oleh Coradi dkk (2012) dalam membandingkan teknik *submerged fermentation* atau fermentasi terendam dengan *solid state fermentation* atau fermentasi fase padat memperlihatkan hasil yang signifikan. Hal ini ditunjukkan dengan tingkat produksi lipase menggunakan metode *solid state fermentation* yang memungkinkan penggunaan limbah pertanian sebagai substrat dengan penggunaan air serta energi yang rendah dan aerasi yang mudah. Evaluasi teknik kultur secara ekonomis dari *submerged fermentation* dan *solid state fermentation* dalam produksi lipase *T. harzianum* sebagai berikut:

- Aktivitas lipase yang diperoleh dengan teknik *submerged fermentation* yaitu 154 U/g dengan biaya yang dikeluarkan sebesar US\$11.11/U.
- Aktivitas lipase yang diperoleh dengan teknik *solid state fermentation* 434 U/g dengan biaya yang dikeluarkan sebesar US\$0,98/U.

Produksi lipase melalui fermentasi fase padat telah dilakukan dengan membandingkan konsentrasi enzim yang diperoleh dengan metode fermentasi fase cair. Hal ini dilakukan untuk memperoleh konsentrasi enzim yang lebih baik, pemanfaatan substrat yang lebih optimal, dan produktivitas yang baik dalam waktu singkat. Penelitian yang dilakukan oleh Kumar dan Kanwar (2012) dengan

membandingkan metode SSF dan SmF dalam produksi lipase diperoleh bahwa lipase yang dihasilkan melalui metode SSF lebih stabil terhadap perubahan suhu dan pH. Selain itu metode SSF lebih ramah lingkungan, proses produksi dapat dilakukan dengan mudah dan peralatan yang dilakukan dapat diminimalisir. Produksi lipase dengan metode fermentasi fase padat menggunakan substrat biji labu telah dilakukan oleh Tisma dkk (2019) dengan aktivitas lipase yaitu 36,2 U/mL. Beberapa penelitian terkait fermentasi fase padat telah dilakukan oleh Cavalcanti dkk (2005) dan Toscano dkk (2013) pada produksi lipase menggunakan *Penicillium simplicissimum* dan *Aspergillus flavus* dengan aktivitas enzim yang diperoleh masing-masing sebesar 26,4 U/g dan 121,35 U/gds.

2.5 Amobilisasi Enzim

Penggunaan enzim dalam bentuk terlarut relatif tidak stabil terhadap perubahan lingkungan sekitar, seperti perubahan pH dan temperatur serta tidak dapat digunakan secara berulang (*reusable*) oleh karena pemisahan enzim dari produknya cenderung sulit dilakukan. Selain itu, harga lipase komersial cukup tinggi karena proses produksinya yang sulit dan memakan waktu yang cukup lama. Kesulitan-kesulitan tersebut mampu diatasi dengan penggunaan enzim teramobilisasi (Rohmah, 2016).

Amobilisasi enzim merupakan suatu proses dimana pergerakan molekul enzim dalam ruang tempat reaksi ditahan sedemikian rupa sehingga terbentuk sistem enzim yang aktif dan tidak larut dalam air. Keadaan ini membuat enzim dapat menjadi aktif sehingga dapat digunakan secara berulang dan tidak berdifusi ke dalam campuran reaksi. sistem ini memiliki keunggulan dalam hal efisiensi dan

peningkatan kualitas produk sehingga banyak digunakan pada sektor industri (Sari, 2014).

Proses amobilisasi enzim memberikan beberapa keuntungan ekonomi, keuntungan tersebut diantaranya enzim dapat digunakan secara berulang (*reusable*), proses dapat dilakukan secara kontinyu dan dapat dikontrol, produk lebih mudah dipisahkan, pada keadaan tertentu aktivitas dan stabilitas enzim dapat diubah dengan baik, konsentrasi produk yang dihasilkan lebih tinggi dan murni, kestabilan pH dan suhu, tidak ada kontaminasi yang ditambahkan enzim, fleksibilitas pada desain reaktor (Parthu, 2012).

Metode amobilisasi enzim diklasifikasikan dalam dua golongan. Kelompok pertama yaitu *reversible enzyme immobilization* adalah metode amobilisasi reversibel dimana enzim dapat dipisahkan dari matriks dengan mudah dan reaksi yang sederhana namun tidak dapat digunakan dalam jangka waktu yang lama. Kelompok kedua yaitu *irreversible enzyme immobilization* adalah metode amobilisasi enzim yang melibatkan ikatan kimia yang cukup kuat agar dapat menjaga stabilitas enzim dalam jangka waktu yang lama. *Irreversible enzyme immobilization* banyak digunakan oleh industri sebagai metode amobilisasi enzim yang efektif, sehingga memungkinkan digunakan secara berkelanjutan (Krishnamoorthi dkk, 2015).

Metode *reversible enzyme immobilization* terdiri dari beberapa jenis sebagai berikut (Krishnamoorthi dkk, 2015):

- *Adsorption* (Gambar 4a) adalah teknik amobilisasi pertama dan paling sederhana. Metode ini, melekatkan enzim pada permukaan matriks melalui

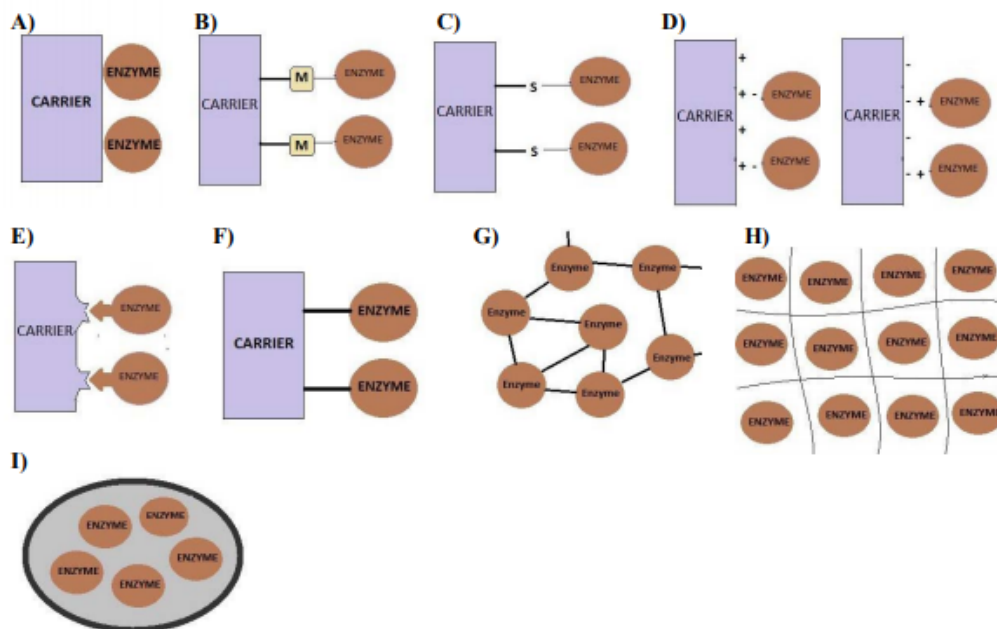
interaksi ikatan non-kovalen yang lemah seperti ikatan hidrogen, ikatan Van der Waal dan interaksi hidrofobik.

- *Chelation* atau ikatan logam (Gambar 4b) adalah metode yang didasarkan pada kemampuan asam amino polar mengikat ion logam melalui ikatan koordinasi. Molekul enzim akan menggantikan ligan yang berikatan dengan ion logam pada permukaan matriks.
- *Disulphide bonding* (Gambar 4c) adalah metode yang melibatkan pembentukan ikatan disulfida antara enzim dan matriks. Metode ini membentuk ikatan kovalen namun diklasifikasikan sebagai *reversible enzyme immobilization* karena dapat terjadi reaksi balik dengan penambahan reagen ataupun mengubah pH.
- *Ionic binding* (Gambar 4d) adalah metode amobilisasi sederhana yang melibatkan interaksi ionik antara enzim dan matriks. Matriks yang digunakan adalah matriks polar dengan enzim yang memiliki muatan yang berlawanan.
- *Affinity binding* (Gambar 4e) adalah metode yang didasarkan pada interaksi antigen dan antibodi. Interaksi antar biomolekul dengan afinitas tinggi dimana matriks disintesis secara khusus untuk satu jenis enzim.

Metode *irreversible enzyme immobilization* terdiri dari beberapa jenis sebagai berikut (Krishnamoorthi dkk, 2015):

- *Covalent binding* (Gambar 4f) adalah metode amobilisasi yang sangat stabil dimana enzim terikat kuat pada matriks. Metode ini didasarkan pada pembentukan ikatan kovalen antara matriks dan rantai samping asam amino enzim.

- *Crosslinking* (Gambar 4g) adalah metode yang tidak memerlukan matriks untuk amobilisasi. Metode ini terbagi menjadi dua yaitu *crosslinking enzyme aggregate* dan *crosslinking enzyme crystal*. Enzim imobil ditambahkan kedalam campuran reaksi kemudian dapat dihilangkan dari campuran pada proses pemurnian. Dalam beberapa penelitian, seperti Zhang dkk (2012) dan Rohmah (2016) metode ini seringkali digabungkan dengan metode adsorpsi untuk meningkatkan efek amobilisasinya.



Gambar 4. Ilustrasi Metode Amobilisasi Enzim; (a) *adsorption*, (b) *chelation*, (c) *disulphide bonding*, (d) *Ionic binding*, (e) *affinity binding*, (f) *covalent binding*, (g) *crosslinking*, (h) *entrapment*, (i) *encapsulation* (Krishnamoorthi dkk, 2015)

- *Entrapment* atau penjebakan (Gambar 4h) adalah metode amobilisasi dimana enzim dijemak didalam matriks atau serat. Matriks yang digunakan haruslah memiliki ukuran pori yang sesuai sebab apabila pori lebih kecil maka enzim yang terjebak hanya sedikit dan apabila pori lebih besar maka dapat terjadi kebocoran enzim didalam matriks.

- *Encapsulation* (Gambar 4i) adalah metode penjebakan enzim dalam bentuk bola membran *semipermeable*. Interaksi substrat dan enzim terjadi ketika molekul substrat dengan ukuran yang lebih kecil berdifusi ke dalam membran *semipermeable*.

Karakteristik matriks yang digunakan sangat penting dalam melakukan amobilisasi enzim. Beberapa faktor yang harus dipertimbangkan yaitu ketahanan fisik terhadap kompresi, hidrofilitas, kelembaman terhadap enzim, kemudahan derivatisasi, biokompatibilitas, ketahanan terhadap kontaminan, dan ketersediaan secara ekonomis. Matriks amobilisasi enzim diklasifikasikan dalam matriks organik dan anorganik, seperti polimer alami dan polimer sintetik serta mineral alami dan mineral buatan. Matriks polimer alami seperti polisakarida (selulosa, dekstran, agar, agarosa, kitin, dan alginat), protein (kolagen dan albumin dan karbon. Matriks polimer sintetik seperti polistiren dan beberapa polimer lain (poliakrilat, polimetakrilat, poliakrilamida, poliamida, vinil dan alil polimer). Matriks anorganik dari mineral alami seperti bentonit dan silika serta mineral buatan seperti kaca, logam dan logam dioksida (Brena dkk, 2013).

2.6 Penelitian Terkait Amobilisasi Enzim dan Aplikasinya

Penelitian terkait enzim amobil dan aplikasinya telah banyak dilakukan dan terus berkembang seiring dengan peningkatan kebutuhan dan perkembangan teknologi secara global. Leung dkk (2007) dan El-Kaoutit dkk (2004) menggunakan enzim amobil sebagai biosensor untuk mendeteksi makanan patogen, glukosa oksidase amobil sebagai biosensor logam berat, urease amobil sebagai biosensor indikasi merkuri, polifenol oksidase sebagai biosensor penentuan konsentrasi atzarin dan indikator pestisida. Dalam bidang medis, enzim amobil juga digunakan

sebagai biosensor pemantauan metabolit dengan indikasi penyakit biologis dan deteksi senyawa kompleks pada sample darah, plasma dan urin (Ali dkk, 2017).

Enzim amobil juga diaplikasikan dalam pembuatan antibiotik seperti β -laktumakrilase dalam hidrolisis penisilin G dan sefalosforin C pada medium cair, serta *cephalexin* yang diproduksi dari enzim amobil yaitu *cephazholinsintetase* (Giordano dkk, 2006). Selain itu, dalam industri makanan digunakan glukosa isomerase amobil untuk memproduksi sirup jagung dengan fruktosa yang tinggi, juga dalam mengatasi masalah gelatinase pati selama proses hidrolisi (Gangadharan dkk, 2009). Lipase amobil digunakan sebagai biokatalis produksi biodiesel, melalui reaksi transesterifikasi trigliserida yang menghasilkan gliserol dan asam lemak sehingga mengurangi biaya produksinya (Yagiz dkk, 2007). Penggunaan lipase amobil sebagai biokatalis produksi biodiesel telah dilakukan oleh Stepiani (2012) dengan konsentrasi metil palmitat 44% dan konsentrasi 39%. Penelitian serupa juga dilakukan oleh Susanty dkk (2013), biodiesel diproduksi menggunakan biokatalis lipase *Pseudomonas fluorescens* amobil sehingga diperoleh konsentrasi metil ester palmitat 45% dan metil ester oleat 52%.

Enzim amobil dapat pula digunakan sebagai agen bioremediasi dalam mengurangi polutan pada badan air akibat limbah pewarna industri tekstil dan percetakan. Peroksidase amobil digunakan untuk mendegradasi pewarna pada industri tekstil dan hanya kehilangan 50% aktivitasnya setelah 10 siklus penggunaan (Khan dkk, 2005). Lipase amobil dalam hidrolisis karboksilat digunakan dalam produksi kosmetik dalam membantu memecah timbunan lemak karena proses biokatalitiknya mengurangi pembentukan produk samping, tidak beracun, ekonomis, dan ramah lingkungan (Ali dkk, 2017).