

SELESAI

PAMERAN



-1 APR 2004

**LAPORAN PENELITIAN
DOSEN MUDA TAHUN ANGGARAN 2002**

**UJI AKTIVITAS LIPOLITIK BEBERAPA BAKTERI
HIDROKARBONOKLASTIK HASIL ISOLASI DARI PELABUHAN
TANJUNG PERAK DAN PRODUKSI LIPASE DARI STRAIN TERPILIH**

Oleh:

Dra. SRI SUMARSIH, M.Si.

2/04
12
LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya Manusia

DIP Nomor : 003/XXIII/1--/2002 Tanggal 1 Januari 2002

Kontrak Nomor : 023/LIT/BPPK-SDM/IV/2002

Ditjen Dikti, Depdiknas

Nomor Urut : 37

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

September, 2002



75
8
512 75
Sum
u

LAPORAN PENELITIAN
DOSEN MUDA TAHUN ANGGARAN 2002

**UJI AKTIVITAS LIPOLITIK BEBERAPA BAKTERI
HIDROKARBONOKLASTIK HASIL ISOLASI DARI PELABUHAN
TANJUNG PERAK DAN PRODUKSI LIPASE DARI STRAIN TERPILIH**

Oleh:

Dra. SRI SUMARSIH, M.Si.

SELESAI

**MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

3000104033141

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya Manusia

DIP Nomor : 003/XXIII/1/--/2002 Tanggal 1 Januari 2002

Kontrak Nomor : 023/LIT/BPPK-SDM/IV/2002

Ditjen Dikti, Depdiknas

Nomor Urut : 37

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

September, 2002

RINGKASAN

UJI AKTIVITAS LIPOLITIK BEBERAPA BAKTERI HASIL ISOLASI DARI PELABUHAN TANJUNG PERAK DAN PRODUKSI LIPASE DARI STRAIN TERPILIH (Sri Sumarsih, 2002, 34 halaman)

Awal penelitian tentang lipase mikrobial difokuskan pada pencegahan pembusukan makanan, tetapi kemudian berkembang untuk mendapatkan lipase industri yang murah dan stabil. Hampir semua lipase digunakan dalam berbagai industri misalnya : obat-obatan, makanan, bahan aditif dan detergent. Walaupun lipase dari pankreas dan mulut sapi dapat digunakan, tetapi lipase dari sumber mikroba merupakan sumber utama bagi industri tersebut. Lipase merupakan enzim yang menarik, karena kestabilannya yang tinggi di dalam medium organik maupun pada temperatur tinggi. Walaupun aktivitas alaminya mengkatalis hidrolisis trigliserida dengan asam lemak rantai panjang, lipase juga mampu mengkatalis reaksi hidrolisis berbagai ester sintetik tak larut air dengan derajat enansiospesifitas tinggi. Lipase mampu mengkatalis reaksi organik baik di dalam media berair maupun media non-air. Berbagai senyawa obat khiral enansiomer tunggal, bermacam-macam ester dan juga poliester yang *biodegradable*, dapat disintesis dengan biokatalis lipase. Ketertarikan penggunaan lipase sebagai katalis khiral pada berbagai reaksi hidrolisis dan sintesis senyawa ester mengalami peningkatan dengan pesat, sehingga dibutuhkan lipase/ esterase baru. Oleh karena itu, para peneliti dari kalangan akademik dan industri terus berusaha mencari sumber-sumber lipase/ esterase baru yang mempunyai aktivitas tinggi. Biosurfaktan merupakan suatu senyawa yang dihasilkan oleh mikroorganisme, yang mampu menurunkan tegangan permukaan dan menyebabkan emulsifikasi senyawa tak larut air. Dari hasil penelitiannya, Fatimah (2001) melaporkan bahwa bakteri yang diisolasi dari pelabuhan Tanjung Perak (yaitu : *Arthrobacter* sp. dan *Pseudomonas* sp.) yang ditumbuhkan dalam substrat heksadekana, berpotensi memproduksi biosurfaktan. Di dalam laboratorium, beberapa senyawa yang bersifat sebagai surfaktan, *emulsifier*, *stabilizer* dan *conditioner*

dapat disintesis dengan biokatalis lipase. Produksi biosurfaktan oleh mikroorganisme kemungkinan juga melibatkan lipase yang dihasilkannya. Bakteri yang diisolasi dari pelabuhan Tanjung Perak yang berpotensi sebagai penghasil biosurfaktan, kemungkinan juga penghasil lipase.

Penelitian ini bertujuan skrining bakteri lipolitik dari sumber air laut pelabuhan Tanjung Perak dan mengetahui aktivitas lipase yang dihasilkan oleh salah satu isolat bakteri.

Pembiakan dan isolasi kultur murni dilakukan dengan metode cawan gores (*streak plate method*) pada medium yang mengandung gliserol dan minyak kelapa. Analisis mikroorganisme dilakukan oleh Laboratorium Biologi Lingkungan FMIPA Unair. Skrining bakteri lipolitik dilakukan dengan metode *rhodamine B agar plate*. Kultur bakteri yang akan diuji diinokulasikan sebagai spot kecil pada medium uji dan diinkubasi pada 37⁰ C selama 3 hari, Sebagai pembanding, digunakan lipase *Candida rugosa*. Aktivitas lipolitik diidentifikasi dengan terbentuknya warna orange berpendar (fluorescent) pada permukaan koloni bakteri. Berdasarkan diameter koloni bakteri yang terbentuk, dipilih satu strain bakteri yang mempunyai aktivitas lipolitik tertinggi sebagai sumber enzim untuk produksi lipase. Kultivasi dilakukan dengan pengocokan pada *shaker* 125 rpm dan temperatur kamar ($\pm 30^0$ C). Aktivitas lipolitik ditentukan dengan metode titrimetrik terhadap substrat minyak kelapa. Asam lemak bebas yang dihasilkan dititrasi dengan larutan NaOH 0,05 N. Aktivitas lipolitik 1 (satu) unit (U) didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang menghidrolisis minyak menghasilkan 1 μ mol produk selama 1 jam, di bawah kondisi percobaan.

Berdasarkan diameter koloni/ warna orange yang terbentuk pada medium agar-rhodamine B, dapat dikatakan bahwa dari 14 isolat bakteri yang diuji dapat diperoleh 5 bakteri (yaitu : genus *Pseudomonas*, *Flavobacterium* dan *Micrococcus*) yang berpotensi menghasilkan lipase. Diperoleh 1 bakteri penghasil lipase dengan kategori kuat (diameter koloni >10 mm) dan 4 bakteri kategori sedang (diameter koloni 7 – 10 mm). Selanjutnya bakteri 2

(*Pseudomonas* sp.) dengan diameter koloni 13 mm, dipilih sebagai sumber enzim untuk produksi lipase. Lipase yang dihasilkan oleh strain tersebut mempunyai aktivitas lipolitik 11,67 U/ ml dan aktivitas spesifik 7,5769 U/ mg protein.

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada penelitian ini, dapat diajukan saran perlunya dilakukan optimasi kondisi produksi lipase dari bakteri 2 (*Pseudomonas* sp.) untuk mendapatkan enzim dengan aktivitas yang lebih tinggi

(Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga : DP3M- Litmud Tahun 2002, nomor kontrak : 023/LIT/BPPK - SDM/ 2002)

SUMMARY

THE LIPOLYTIC ACTIVITY ASSAY OF ISOLATED BACTERIA FROM THE TANJUNG PERAK HARBOR AND LIPASE PRODUCTION FROM SELECTED STRAIN

Sri Sumarsih

Departement of Chemistry

Faculty of Mathematic and Natural Sciences, Airlangga University

Early research on microbial lipases focused on prevention of food spoilage, but recent work attempts to provide stable industrial lipases. Currently, most lipases are used in the medical, food, food additive and detergent industries. Although pancreatic lipase and oral bovine lipase can be used for these purposes, less expensive microbial lipase is currently the main source for these industries. Lipases are attractive enzyme, because of their high stability in organic media and high temperatures. Although their natural activity is hidrolisis of long-chain fatty acid triacylglycerols, they also can catalyze the hydrolysis of wide range of artificial water-insoluble esters with a high degree of enantiospecificity and capable of catalyzing organic reactions in non-aqueous media. Various single enantiomer of chiral drugs, various ester and also biodegradable polyester, can be synthesized by lipase-catalyzed reactions. The interest in the use of enzymes as hydrolytic or synthetic chiral catalysts has risen rapidly, the need for novel lipases/ esterases is obvious, the academic and industry researchers continue to look for lipase sources with high activity.

Fatimah (2001) reported that bacteria from Tanjung Perak harbor (*Arthrobacter* sp. dan *Pseudomonas* sp.) were potential biosurfactan producers when they were grown in the hexadecana substrate. Some researchers reported that some surfactan, emulsifier, stabilizer dan conditioner could be synthesized by lipase-catalyzed. Biosurfactan production by microorganisms probably involve a lipase-catalyzed reaction.

The aim of this research was to screen the lipolytic bacteria from the sea water of Tanjung Perak Harbor and to find out the activity of lipase from isolated bacteria.

Cultivation and isolation of lipolytic bacteria was performed according to streak plate method and lipolytic bacteria screening was performed using modified rhodamine B agar plate method. Cultures were inoculated as a small spot on the screening agar plate and incubated at 37⁰ C for 3 days. Lipolytic activity was identified as orange fluorescent on the bacterial colony, against *Candida rugosa* lipase as a positive control. Based on the diameter of bacterial colony, it was selected strain with highest lipolytic activity as an enzyme production source. Cultivation was performed on a shaker at 125 rpm and 30⁰ C for 26 hours. Lipase activity was assayed using titrimetric method toward coconut oil as a substrat. The free fatty acid produced was titrated with 0,05 N NaOH. One unit (U) of lipolytic activity was defined as the amount of enzyme that produces 1 µmol of product per hour under the assay conditions.

Based on the diameter of bacterial colony formed on the medium assay (rhodamine B agar plate), could be isolated 5 strains lipolytic bacteria from genus *Pseudomonas*, *Flavobacterium* and *Micrococcus*. One strain bacteria showed as a good lipase producer (colony diameter was > 10 mm) and 4 strains bacteria showed as moderate lipase producers (colony diameter was 7 – 10 mm). The second bacteria (colony diameter was 13 mm) which identified as *Pseudomonas* sp., was selected as a lipase source. The lipase produced by the bacteria had lipolytic activity of 11.67 U/ ml and specific activity of 7.5769 U/ mg protein.

Based on the results of this research, is needed be performed the optimization of lipase production to get lipase with higher activity.

(Chemistry Departement, Faculty of Mathematic and Natural Sciences Airlangga University : DP3M – Litmud 2002, No. Contract : 023/LIT/BPPK – SDM/ 2002)

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah Penulis panjatkan ke hadirat Allah Subhanahu Wa Ta'ala yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penelitian dan penyusunan laporan penelitian ini dapat terselesaikan. Penelitian ini bertujuan skrining bakteri lipolitik dari sumber air laut pelabuhan Tanjung Perak mengetahui aktivitas lipase yang dihasilkan oleh salah satu isolat bakteri.

Melalui kesempatan ini, Penulis mengucapkan terima kasih atas kesempatan, fasilitas dan semua bantuan yang telah diberikan kepada Penulis, terutama kepada :

1. Ditbinlitabmas - Ditjen Dikti
2. Pimpinan Lembaga Penelitian Universitas Airlangga
3. Pimpinan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
4. Pimpinan Jurusan Kimia FMIPA Unair dan Kepala Laboratorium Kimia Organik/ biokimia
5. Kepala Laboratorium Biologi Lingkungan FMIPA Unair
6. Rekan-rekan sejawat, laboran dan analis di Lab. Kimia Organik serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu.

Penulis menyadari bahwa laporan ini belum sempurna, meskipun demikian Penulis berharap semoga penelitian ini berguna dan bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Surabaya, Oktober 2002

Penulis

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|---------|
| LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN | ii |
| RINGKASAN DAN SUMMARY | iii |
| KATA PENGANTAR | viii |
| DAFTAR ISI | ix |
| DAFTAR TABEL | xi |
| DAFTAR GAMBAR | xii |
| DAFTAR LAMPIRAN | xiii |
| | |
| I. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1. Latar Belakang Permasalahan | 1 |
| 1.2. Rumusan Masalah | 2 |
| II. TINJAUAN PUSTAKA | 4 |
| 2.1. Metabolisme Mikroorganisme | 4 |
| 2.2. Enzim Sebagai Biokatalis | 5 |
| 2.3. Lipase (Triasilgliserol hidrolase, EC 3.1.1.3.) | 7 |
| III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN | 13 |
| 3.1. Tujuan Penelitian | 13 |
| 3.2. Manfaat Penelitian | 13 |
| IV. METODE PENELITIAN | 14 |
| 4.1. Sampel Penelitian | 14 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| 4.2. Bahan dan Alat Penelitian | 14 |
| 4.3. Cara Kerja | 15 |
| V. HASIL DAN PEMBAHASAN | 23 |
| VI. KESIMPULAN DAN SARAN | 32 |
| DAFTAR PUSTAKA | 33 |
| LAMPIRAN | |

DAFTAR TABEL

| | halaman |
|---|----------------|
| Tabel 2.1 Spesifisitas lipase pemecah lemak | 9 |
| Tabel 5.1 Hasil skrining bakteri lipolitik dengan metode rhodamine B agar plate | 26 |

DAFTAR GAMBAR

| | | halaman |
|------------|---|---------|
| Gambar 2.1 | Mekanisme hidrolisis serin hidrolase | 12 |
| Gambar 2.3 | Biakan mikroba dari sumber air laut pelabuhan Tanjung Perak | 24 |
| Gambar 2.4 | Skrining bakteri penghasil lipase dengan metode Rhodamine B agar plate | 27 |
| Gambar 5.3 | Kurva pertumbuhan bakteri 2. | 29 |
| Gambar 5.4 | Profil aktivitas lipolitik enzim yang dihasilkan Selama kultivasi | 31 |

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil analisis mikroorganisme

Lampiran 2. Densitas optik medium kultur selama kultivasi bakteri 2

(Pseudomonas sp.)

Lampiran 3. Aktivitas lipolitik enzim yang dihasilkan selama kultivasi bakteri 2

(Pseudomonas sp.)

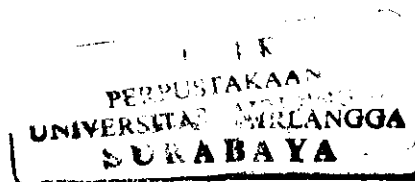
Lampiran 4. Kurva Standar BSA, kadar protein dan aktivitas spesifik enzim

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Permasalahan

Ketertarikan penggunaan biokatalis dalam sintesis organik mengalami peningkatan dengan pesat, terutama untuk produksi senyawa-senyawa aktif biologis enansiomer tunggal dan *biodegradable*. Keadaan fisik biokatalis yang digunakan untuk biotransformasi dapat berbeda-beda, antara lain : isolat enzim, enzim murni/ sedikit murni atau mikroorganisme utuh (sel yang sedang tumbuh atau sel istirahat), baik bentuk bebas atau bentuk amobil.

Lipase merupakan enzim yang secara alami mengkatalis hidrolisis triasilgliserol menjadi asam lemak, yang telah banyak dimanfaatkan dalam berbagai industri, antara lain : obat-obatan, kosmetika, pestisida, biosurfaktan, flavor, senyawa aditif makanan dan detergen. Walaupun substrat alami lipase adalah asilgliserol, lipase juga dapat mengkatalis hidrolisis berbagai ester sintetik dengan derajat enansiospesifitas tinggi. Lipase mempunyai peran sangat penting dalam bidang bioteknologi karena kestabilannya yang tinggi pada media organik dan pada temperatur tinggi, serta mampu mengkatalis reaksi hidrolisis dan sintesis dengan berbagai substrat sintetik. Oleh karena itu lipase banyak digunakan sebagai katalis khiral untuk hidrolisis dan sintesis berbagai senyawa optis aktif dan intermedietnya (Marek & Bednarski, 1996; Bagi *et al.*, 1997). Telah dilaporkan bahwa banyak sekali reaksi sintesis ester yang menggunakan biokatalis lipase, antara lain : sintesis obat



khiral enansiomer tunggal (Margolin, 1993) dan berbagai senyawa ester (Yahya *et al.*, 1998).

Linko *et al.* (1998) juga telah memanfaatkan lipase sebagai biokatalis pada sintesis senyawa-senyawa *biodegradable*, misalnya policster alifatik dan aromatik. Penemuan ini memungkinkan senyawa-senyawa *biocompatibility*, *biodegradability* dan *environmental acceptability* dapat diproduksi secara bioteknologi, yang merupakan senyawa yang dikehendaki dalam aplikasinya diberbagai bidang.

Dengan semakin meningkatnya ketertarikan penggunaan lipase sebagai katalis khiral pada berbagai reaksi hidrolisis dan sintesis senyawa ester, maka banyak penelitian dilakukan untuk mendapatkan sumber-sumber lipase/ esterase baru sehingga dapat diperoleh enzim dengan aktivitas tinggi dan lebih murah.

Biosurfaktan merupakan suatu senyawa yang dihasilkan oleh mikroorganisme, yang mampu menurunkan tegangan permukaan dan menyebabkan emulsifikasi senyawa tak larut air. Mikroorganisme dapat memproduksi biosurfaktan bila ditumbuhkan di dalam media dengan substrat yang tidak larut air (misalnya : hidrokarbon, minyak dan lilin) atau substrat yang terlarut (misalnya karbohidrat). Fatimah (2001) telah mempelajari kemampuan produksi biosurfaktan oleh bakteri dari pelabuhan Tanjung Perak Surabaya. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa bakteri dari pelabuhan Tanjung Perak (yaitu : *Arthrobacter* sp. dan *Pseudomonas* sp.) yang ditumbuhkan dalam substrat heksadekana berpotensi memproduksi biosurfaktan (yang dinyatakan sebagai nilai aktivitas emulsifikasi dan nilai tegangan permukaan dari supernatan kultur).

Hasil penelitian telah membuktikan bahwa beberapa senyawa surfaktan, *emulsifier*, *stabilizer* dan *conditioner* dapat disintesis secara enzimatik dengan biokatalis lipase (Faber, 1992; Edmundo *et al.*, 1998). Oleh karena itu, produksi biosurfaktan oleh mikroorganisme kemungkinan juga melibatkan biokatalis lipase yang dihasilkan oleh mikroorganisme tersebut. Bakteri hasil diisolasi dari pelabuhan Tanjung Perak yang berpotensi sebagai penghasil biosurfaktan, kemungkinan juga penghasil lipase. Dalam rangka mencari sumber lipase/ esterase baru maka penelitian bertujuan melakukan skrining bakteri lipolitik dari sumber air laut pelabuhan Tanjung Perak dan mempelajari aktivitas lipase yang dihasilkan oleh salah satu strain bakteri lipolitik.

1.2. Rumusan Masalah

Dari uraian latar belakang permasalahan di atas, permasalahan yang akan dijawab pada penelitian ini adalah :

1. Apakah bakteri lipolitik dapat diperoleh dari air laut pelabuhan Tanjung Perak ?
2. Berapa besar aktivitas lipase yang dihasilkan oleh bakteri hasil isolasi dari pelabuhan Tanjung Perak ?

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Metabolisme Mikroorganisme

Dalam upaya untuk tetap dapat hidup, mikroorganisme harus melaksanakan sejumlah reaksi yang melibatkan katalis enzim. Enzim adalah substansi yang ada di dalam sel dalam jumlah amat kecil, yang mampu menyebabkan perubahan-perubahan berkaitan dengan proses selular dan kehidupan. Di dalam sebuah sel terdapat ribuan jenis enzim yang berbeda-beda. Semua enzim dan aktivitasnya harus terkoordinasi sedemikian rupa sehingga produk-produk yang sesuai dapat terbentuk dan tersedia pada tempat, jumlah dan waktu yang tepat, dengan menggunakan energi seminimum mungkin. Koordinasi ini dimungkinkan oleh adanya pengendalian enzim. Pengendalian metabolisme selular yang menyangkut pengendalian aktivitas enzim, dapat dilakukan dengan dua cara yaitu pengendalian katalitik secara langsung dan pengendalian genetik melalui induksi dan represi.

Walaupun semua enzim pada mulanya dihasilkan di dalam sel, beberapa dieksekresikan melalui dinding sel dan dapat berfungsi di luar sel. Oleh karena itu dikenal adanya dua enzim : enzim ekstraselular/ eksoenzim (berfungsi di luar sel) dan enzim intraselular/ endoenzim (berfungsi di dalam sel). Fungsi utama eksoenzim adalah melangsungkan perubahan-perubahan seperlunya pada nutrien di sekitarnya sehingga nutrien tersebut dapat memasuki sel, misalnya amilase menguraikan pati menjadi unit-unit gula yang lebih kecil. Sedangkan enzim intraselular mensintesis

bahan selular dan menguraikan nutrien untuk menyediakan energi yang dibutuhkan oleh sel, misalnya heksokinase mengkatalis fosforilasi glukosa dan heksosa di dalam sel.

Berdasarkan ada tidaknya substrat pada pembentukan enzim, enzim dibagi menjadi dua kelompok yaitu enzim konstitutif dan enzim adaptif (terinduksi). Enzim konstitutif selalu dihasilkan oleh sel. Berapapun besarnya konsentrasi substrat di dalam medium, enzim tersebut dijumpai dalam jumlah kurang lebih sama. Sedangkan enzim adaptif dihasilkan oleh sel sebagai tanggapan terhadap adanya substrat tertentu. Perbedaan-perbedaan yang diungkapkan oleh definisi tersebut lebih bersifat operasional daripada harfiah. Enzim adaptif diduga juga terdapat di dalam sel-sel yang tidak diinduksi tetapi dalam jumlah relatif rendah. Demikian pula, produksi enzim konstitutif seringkali dapat ditingkatkan oleh adanya substrat spesifik (Pelczar & Chan, 1986).

2.2. Enzim Sebagai Biokatalis

Enzim adalah protein (lipoprotein atau glikoprotein) yang mempunyai fungsi spesifik sebagai katalis yang efektif, mempunyai spesifisitas terhadap substratnya dan hanya akan mengkatalis reaksi tertentu. Sebagaimana katalis anorganik, enzim dapat mempercepat reaksi kimia tetapi tidak mempengaruhi kesetimbangan akhir dan hanya sejumlah kecil enzim dibutuhkan untuk transformasi sejumlah besar molekul substrat. Enzim hanya dapat berfungsi dengan baik di bawah kondisi : pH, temperatur, konsentrasi substrat dan kofaktor tertentu.

Di dalam reaksi enzimatik, substrat berikatan dengan konfigurasi tertentu pada lokasi spesifik pada permukaan enzim (disebut sisi aktif enzim). Pengikatan ini merupakan ikatan ionik atau kovalen atau interaksi hidrofobik antara gugus fungsi substrat dan gugus fungsi satuan aminoasil dari enzim (Cunningham, 1978).

Enzim telah diproduksi secara komersial dari sumber tanaman, hewan dan mikroorganisme. Dibandingkan dengan enzim dari tanaman dan hewan, enzim mikroba mempunyai keuntungan yang sangat besar karena dapat diproduksi dalam jumlah besar dengan tehnik fermentasi. Sel atau enzim dari sumber mikroorganisme telah banyak dimanfaatkan sebagai katalis pada biotransformasi senyawa menjadi senyawa yang lebih berharga, misalnya untuk produksi steroid, antibiotik dan prostaglandin. Reaksi yang dikatalis enzim meliputi : reaksi dehidrogenasi, oksidasi, hidrosilasi, dehidrasi dan kondensasi, dekarboksilasi, aminasi, deaminasi dan isomerisasi. Berdasarkan tipe reaksi yang dikatalis, enzim diberi nama dan diklasifikasikan menjadi 6 kelompok enzim, yaitu : oksidoreduktase, transferase, hidrolase, liase, isomerase dan ligase (Stanbury & Whitaker, 1986).

Penggunaan enzim sebagai biokatalis mempunyai beberapa keuntungan, antara lain (Faber, 1992; Champe & Harvey, 1994) :

- a. enzim adalah katalis yang sangat efisien
- b. ramah lingkungan, dapat didegradasi secara sempurna oleh lingkungan.
- c. bereaksi di bawah kondisi lunak.
- d. memperlihatkan toleransi yang tinggi terhadap substrat senyawa sintetik.
- e. memperlihatkan sifat khemoselektif, regioselektif dan enansioselektif

serta dapat mengkatalis proses yang sama dengan hampir setiap tipe reaksi organik, misalnya : sintesis-hidrolisis, reduksi-oksidasi, adisi-eliminasi, halogenasi-dehalogenasi, alkilasi-dealkilasi dan isomerisasi

Namun demikian ada beberapa kekurangan yang perlu diperhatikan oleh ahli kimia yang menggunakan biokatalis, antara lain :

- a. kondisi reaksi lunak kadang-kadang menyebabkan reaksi hanya dapat berjalan dengan lambat, sedangkan perubahan temperatur dan pH yang ekstrim dapat menyebabkan deaktivasi protein enzim
- b. enzim larut dalam air dan memperlihatkan aktivitas katalitik paling tinggi di dalam larutan berair, sehingga perlu dicari kondisi reaksi yang tepat untuk substrat senyawa organik yang sukar larut di dalam air
- c. beberapa reaksi enzimatik cenderung mengalami inhibisi substrat atau produk, yang menyebabkan enzim berhenti bekerja pada konsentrasi substrat dan atau produk yang lebih tinggi, sehingga mengurangi efisiensi proses reaksi.

2.3. Lipase (Triasilgliserol hidrolase, EC 3.1.1.3)

Lipase merupakan enzim yang mengkatalis hidrolisis trigliserida dan ester karboksilat lain di dalam larutan berair. Lipase memperlihatkan aktivitas enzimatik optimum pada antar muka (*interface*) air/ minyak. Aktivitas lipase ditemukan dalam susu, minyak biji-bijian (kacang kedelai dan kacang), sereal, buah-buahan dan sayuran serta di dalam sistem pencernaan mamalia. Berbagai macam

lipase diproduksi oleh bakteri atau jamur sebagai enzim ekstraseluler, sehingga proses produksinya relatif mudah, sedangkan lipase dari sumber mamalia hanya sedikit yang bisa diisolasi. Oleh karena itu, hampir semua lipase komersial yang tersedia diperoleh dari sumber mikroba (bakteri, fungi dan yeast). Lipase yang dapat diperoleh secara komersial antara lain : lipase *porcine pancreas*, lipase *Candida* sp. (*C. antarctica*, *C. rugosa* dan *C. cylindraceae*), lipase *Pseudomonas* sp. dan lipase *Mucor* sp. (*M. miehei*, *M. javanicus*) (Faber, 1992).

Awal penelitian tentang lipase mikrobial difokuskan pada pencegahan pembusukan makanan, kemudian dikembangkan untuk mendapatkan lipase industri yang stabil dan murah. Sekarang ini hampir semua jenis lipase digunakan dalam berbagai industri antara lain : industri obat, makanan dan detergen. Lipase mikroba merupakan sumber utama bagi industri tersebut, karena banyak tersedia secara komersial dan harganya relatif murah. Penggunaan enzim lipase sebagai katalis khiral pada berbagai reaksi sintesis senyawa aktif biologis penting, juga mengalami peningkatan (Hou & Johnston, 1992).

Terlepas dari arti biologisnya, lipase memainkan peran penting dalam bioteknologi. Sebanyak 15 % dari biotransformasi yang dilaporkan, dilakukan dengan biokatalis lipase. Lipase merupakan enzim yang sangat menarik bagi kalangan industri kimia dan farmasi, karena aktivitasnya sebagai biokatalis pada berbagai reaksi hidrolisis dan sintesis ester. Walaupun lipase mengkatalis reaksi hidrolisis trigliserida atau asil dan aril ester di dalam sistem air, lipase juga mengkatalis reaksi organik di dalam media non-air. Lipase mampu mengkatalis

hidrolisis dan sintesis triasilgliserol dengan spesifisitas posisi dan jenis asam lemak. Berdasarkan spesifisitas posisi katalitik terhadap substrat triasilgliserol, lipase dapat dibedakan menjadi 2 (dua), yaitu : lipase- α yang menghidrolisis dan membentuk residu asil pada posisi 1 dan 3, dan lipase $\alpha\beta$ yang menghidrolisis dan membentuk residu asil pada ketiga posisi. Tabel 2.1 memperlihatkan beberapa contoh spesifisitas lipase pemecah lemak (Belitz & Grosch, 1987; Hou & Johnston, 1992).

Tabel 2.1. Spesifisitas lipase pemecah lemak

| Triasilgliserol yang dihidrolisis | Sumber Lipase |
|--|--|
| Residu asil posisi 1 dan 3 | Pankreas, susu, <i>Pseudomonas fragi</i> <i>Penicillium roqueforti</i> <i>A. niger</i> , <i>R. delemar</i> , |
| Residu asil posisi 1, 2 dan 3 | Gandum, biji jarak, <i>A. flavus</i> |
| Asam oleat dan linoleat Posisi 1, 2 dan 3 | <i>Geotrichum candidum</i> |

Lipase beraksi pada *interface* (antar muka) antara daerah hidrofobik dan daerah hidrofilik, suatu sifat khas yang membedakan lipase dari esterase. Namun demikian, lipase juga berfungsi sebagai esterase. Sebagai contohnya, lipase *A. niger* mensintesis gliserida dari asam DL-maleat, asam suksinat dan asam-asam aromatik seperti asam benzoat dan asam fenil asetat. Sebaliknya lipase *C. candidum* dan *P. cyclopium* hanya mensintesis gliserida dari asam lemak rantai panjang (Tsujiisaka *et al.*, 1977 dalam Hou & Johnston, 1992).

Spesifisitas lipase terhadap alkohol juga telah dilaporkan, lipase *A. niger*, *G. candidum* dan *P. cyclopium* mengkatalis sintesis berbagai ester dari asam oleat dan banyak alkohol primer, hanya lipase *G. candidum* yang mengkatalis sintesis ester

dari asam oleat dan alkohol sekunder. Keempat jenis lipase tersebut tidak mengkatalis sintesis ester dari alkohol tersier, fenol atau gula (Okumura *et al.*, 1979 dalam Hou & Johnston, 1992).

Kelebihan lipase yang lain adalah kestabilannya yang tinggi di dalam pelarut organik dan temperatur tinggi, serta mempunyai kemampuan mengkatalis reaksi dengan berbagai substrat yang berbeda dan substrat sintetik serta reaksi stereoselektif (Marek & Bednarski, 1996).

Aktivitas hidrolitik dari lipase telah dilaporkan berhubungan secara langsung dengan aktivitas sintetiknya. Walaupun lipase dari sumber yang berbeda dapat mengkatalis reaksi yang sama, mungkin berbeda aktivitasnya di bawah kondisi reaksi yang sama. Lipase telah digunakan secara sukses pada hidrolisis trigliserida untuk produksi asam lemak bebas. Bagaimanapun, dalam lingkungan rendah air, reaksi esterifikasi dan transesterifikasi juga dapat berlangsung. Lipase merupakan biokatalis yang efektif bila beraksi pada *interface* (antar muka) antara substrat tak larut (trigliserida) dan fasa air di mana enzim terlarut. Hal ini menyebabkan lipase sangat cocok untuk aplikasi biokonversi di dalam media non-konvensional (Cabral *et al.*, 1997).

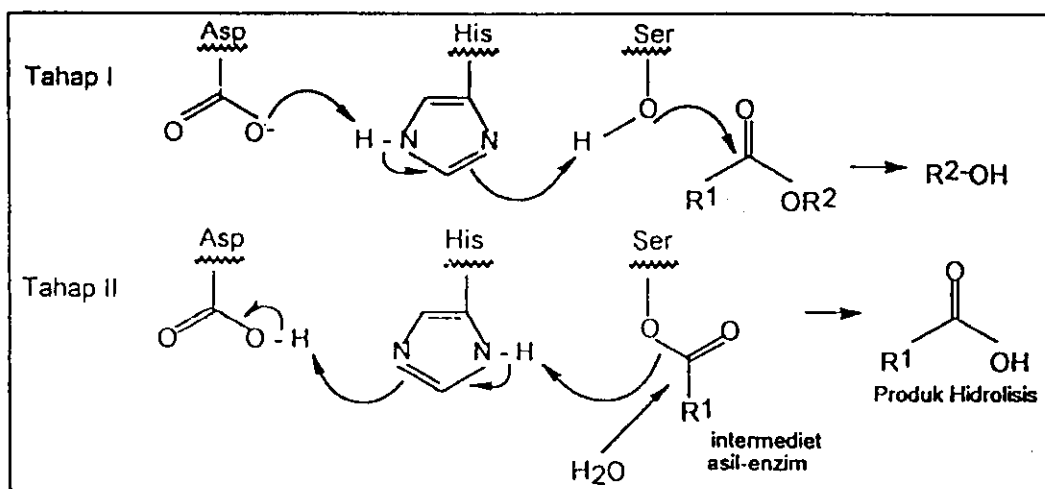
Ketertarikan penggunaan biokatalisis dalam sintesis organik meningkat dengan cepat. Lipase telah digunakan dalam modifikasi lemak/ minyak melalui reaksi transesterifikasi, untuk menemukan senyawa-senyawa baru dengan sifat-sifat yang lebih baik dan untuk meningkatkan bahan baku murah menjadi produk-produk yang lebih berharga. Linko *et al.* (1998) telah melaporkan bahwa lipase dapat

digunakan sebagai biokatalis di dalam produksi senyawa-senyawa *biodegradable* yang bermanfaat, antara lain : esterifikasi langsung antara butanol dan asam oleat untuk produksi 1-butil oleat, transesterifikasi asam-asam lemak dari *rapeseed oil* yang menghasilkan campuran 2-etil-1-heksil ester. Penemuan bahwa lipase juga dapat mengkatalis sintesis ester, membuka peluang untuk produksi poliester *biodegradable* secara enzimatik. Poliesterifikasi 1,4-butanadiol dan sebacic acid menghasilkan poliester dengan massa > 56000 g/ mol, dan poliester dengan massa 130000 g/ mol diperoleh bila menggunakan lipase dari *Rhizomucor miehei* sebagai biokatalis. Poliester aromatik poli (1,6-heksanadiil isoftalat) dengan massa > 50000 g/ mol dapat diperoleh dari poliesterifikasi dengan biokatalis lipase (Linko *et al.*, 1998).

Lipase dari beberapa mikroba dan pankreas kuda, sapi serta pankreas manusia telah diketahui strukturnya. Berat molekul dari enzim-enzim tersebut berkisar antara 20.000 – 60.000. Mirip dengan serin hidrolase, enzim-enzim tersebut bersama-sama dengan residu nukleofilik – histidin - asam menyebabkan *catalytic triad* (tiga serangkai katalitik), yang diwujudkan sebagai Ser-His-Asp *triad* atau Ser-His-Glu *triad* (Faber, 1992; Yahya *et al.*, 1998).

Mekanisme enzim-enzim penghidrolisis amida dan ester mirip dengan yang digambarkan oleh hidrolisis kimia dengan basa. Suatu gugus nukleofilik dari sisi aktif enzim menyerang gugus karbonil dari substrat ester atau amida. Nukleofil yang bertindak sebagai “*chemical operator*” dapat berupa gugus hidroksi dari residu serin, gugus karboksil dari residu aspartat atau gugus thiol dari residu sistein. Mekanisme

hidrolisis oleh lipase yang telah dieludaskan secara detail adalah mekanisme dari serin hidrolase, yang pada sisi aktifnya terdapat residu serin dan dua gugus lain (yaitu residu aspartat dan histidin) yang terdapat bersama-sama residu serin tersebut, membentuk *catalytic triad*. Pengaturan tertentu dari ketiga gugus ini menyebabkan penurunan harga pK dari gugus OH serin yang menyebabkan serangan nukleofilik pada gugus karbonil dari substrat. Akibatnya gugus asil dari substrat berikatan secara kovalen dengan atom O dari gugus OH serin membentuk intermediet asil-enzim dengan membebaskan R²OH. Kemudian suatu nukleofil lain misalnya air akan menyerang intermediet asil-enzim dan membebaskan enzim dan asam karboksilat. Bila enzim dioperasikan di dalam lingkungan dengan kandungan air rendah, maka nukleofil lain (misalnya : R-OH, R-NH₂, H₂O₂) dapat bersaing dengan air untuk bereaksi dengan intermediet asil-enzim menghasilkan sejumlah transformasi yang berguna yaitu : transfer asil, aminolisis ester dan pembentukan perasam (Faber, 1992).



Gambar 2.1. Mekanisme Hidrolisis Serin Hidrolase (Faber, 1992)

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk menjawab permasalahan di atas, dengan tujuan sebagai berikut :

1. Mengetahui apakah bakteri lipolitik dapat diperoleh dari air laut pelabuhan Tanjung Perak
2. Mengetahui aktivitas lipase yang dihasilkan oleh bakteri lipolitik hasil isolasi dari pelabuhan Tanjung Perak

3.2. Manfaat Penelitian

Dari penelitian ini diharapkan dapat diperoleh satu bakteri sebagai sumber lipase. Selanjutnya enzim lipase yang dihasilkan dapat dimanfaatkan sebagai biokatalis dalam sintesis organik yang menghasilkan senyawa optis aktif dan senyawa *biodegradable* yang bermanfaat.

IV. METODE PENELITIAN

4.1. Sampel Penelitian

Sampel air laut yang digunakan sebagai sumber mikroba (bakteri) merupakan air laut permukaan yang banyak cemarannya. Sampel diambil dari dermaga dekat kapal-kapal barang berlabuh di pelabuhan kapal barang Tanjung Perak. Sampel diambil pada hari Sabtu, 29 Juni 2002 ± jam 10.00 kemudian disimpan di dalam lemari es sampai perlakuan selanjutnya.

4.2. Bahan dan Alat Penelitian

a. Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi :

1. Air laut dari perairan Sidoarjo yang digunakan sebagai medium untuk pembiakan dan isolasi mikroba.
2. Air laut sintetis digunakan untuk menggantikan air laut asli (1), sebagai medium untuk produksi enzim lipase. Air laut sintetis dibuat dengan cara sebagai berikut (Gilewicz, 1997 dalam Fatimah, 2001) :
NaCl (11,7 gram/ L), Mg SO₄ .7 H₂O (7,85 gram/ L), KCl (0,75 gram/ L), Tris (4,0 gram/ L) dan NH₄Cl (3, 0 gram/ L) dilarutkan dalam akuades. Kemudian ditambahkan CaCl₂ .2 H₂O (1,47 gram/ L) yang terlebih dahulu dilarutkan dengan sedikit akuades serta ditambahkan FeSO₄ (0,10 mM dan Na₂HPO₄ (0,32 mM). Larutan dihomogenkan dengan pengaduk magnet dan diukur pH nya. Untuk

memperoleh larutan dengan pH 7,5 ditambahkan HCl pekat atau NaOH ke dalam larutan.

3. Bahan kimia lain yang diperlukan antara lain : bacto pepton (Oxoid), yeast extract (Oxoid), gliserol, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , rhodamin B, NaOH, indikator pp., aseton, etanol absolut, etanol 96%, enzim lipase komersial (dari *Candida rugosa* : Sigma), agar-agar (teknis) dan minyak kelapa.
- c. Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi : autoklaf, laminar flow, spektrofotometer UV-Vis, sentrifuga, *shaker* serta alat-alat gelas yang lazim digunakan pada laboratorium mikrobiologi dan biokimia.

4.2. Cara Kerja

4.2.1 Sterilisasi

- a. Sterilisasi alat-alat gelas (misalnya cawan petri dan pipet), dilakukan dengan metode sterilisasi kering menggunakan oven pada temperatur 170°C selama 2 jam.
- b. Sterilisasi medium dilakukan dengan metode sterilisasi basah menggunakan autoklaf pada 121°C , tekanan 1 kg f/ Cm^2 selama 20 menit.

4.2.2 Pembiakan dan Isolasi Kultur Murni

- a. Pembuatan medium padat

Medium padat yang digunakan untuk pembiakan dan isolasi mikroba mempunyai pH 7,5 dengan komposisi nutrisi sebagai berikut

(untuk 100 ml medium) : bacto pepton 0,50 gram. yeast extract 0,10 gram, gliserol 0,30 gram, air laut (asli) 75 ml, akuades 25 ml dan agar-agar 2 gram. Semua bahan dicampur dan dididihkan sampai larutan menjadi bening dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi.

1. Untuk pembuatan agar miring, sebanyak 5 ml larutan medium dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditutup dengan kapas dan disterilisasi dengan autoklaf. Selanjutnya tabung reaksi yang berisi medium agar steril tersebut diletakkan miring dan dibiarkan hingga menjadi padat. Medium agar miring digunakan untuk pemeliharaan kultur.
2. Untuk pembuatan medium agar pada cawan petri (*agar plate*), sebanyak 20 ml larutan medium dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup dan ditambahkan 1 % (v/v) minyak kelapa kemudian disterilisasi dengan autoklaf. Setelah medium agak dingin (temperatur $\pm 60^{\circ}$ C), larutan dikocok kuat-kuat sehingga terbentuk emulsi dan dituang secara aseptis ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan menjadi padat. Medium agar dalam cawan petri ini selanjutnya digunakan untuk pembiakan dan isolasi kultur murni.

b. **Pembiakan dan isolasi kultur murni**

Dengan metode cawan gores (*streak plate method*), sampel air laut sebanyak 1 ose digoreskan pada permukaan medium agar pada cawan petri, selanjutnya diinkubasi pada 37° C selama 24 jam. Setelah inkubasi, diperoleh campuran biakan pada permukaan agar.

Koloni-koloni yang terpisah dimurnikan dengan menggoreskannya pada permukaan agar steril di dalam cawan petri. Pemurnian dilakukan beberapa kali hingga diperoleh koloni tunggal (kultur murni). Kemudian dilakukan pemindahan kultur secara berturut-turut dalam medium yang mengandung minyak, dengan menggoreskannya pada permukaan medium agar pada cawan petri. Koloni-koloni tunggal yang terbentuk dipindahkan secara aseptis ke dalam medium agar miring dan biakan diinkubasi pada temperatur kamar $\pm 30^{\circ}$ C untuk keperluan penelitian selanjutnya.

4.2.3 Identifikasi Mikroba

Beberapa kultur murni hasil pemurnian isolat dari air laut pelabuhan Tanjung Perak, selanjutnya diidentifikasi untuk mengetahui genus dari mikroba tersebut. Analisis mikrobiologi dilakukan oleh Staf Laboratorium Biologi Lingkungan FMIPA Unair.

4.2.4 Skrining Bakteri Penghasil Lipase

Dari beberapa isolat murni yang diperoleh dari cara kerja 4.2.2, dilakukan uji aktivitas lipolitiknya dengan metode *rhodamine B agar plate* (metode Hou & Johnston, 1992) yang dimodifikasi.

a. Pembuatan medium uji

Medium uji mempunyai pH 7,5 dengan komposisi nutrisi sebagai berikut (untuk 100 ml) : bacto pepton 0,50 gram, yeast extract 0,10 gram, gliserol 0,30 gram, agar-agar 2,0 gram, air laut 75 ml dan akuades 25 ml.

Semua bahan dicampur dan dididihkan sampai larutan menjadi bening. Sebanyak 20 ml larutan medium di atas dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup, kemudian ditambahkan 0,60 ml minyak kelapa dan 40 μ L larutan rhodamin B 0,1% dalam H₂O. Larutan dikocok kuat-kuat kemudian disterilisasi dengan autoklaf. Setelah medium agak dingin (temperatur $\pm 60^{\circ}$ C), larutan dikocok kuat-kuat sehingga terbentuk emulsi selanjutnya dituang secara aseptis ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan menjadi padat.

b. Uji aktivitas lipolitik

Kultur bakteri yang akan diuji diinokulasikan sebagai spot kecil pada medium uji (*rhodamine B agar plate*) dan diinkubasi pada 37^o C selama 3 hari. Aktivitas lipolitik diidentifikasi dengan terbentuknya warna orange berpendar (fluorescent) pada permukaan koloni bakteri. Sebagai pembanding digunakan lipase komersial (dari *Candida rugosa* yang produksi Sigma).

4.2.5 Produksi Lipase dari Strain Bakteri Terpilih

Berdasarkan diameter koloni bakteri yang terbentuk, dipilih satu strain bakteri yang mempunyai aktivitas lipolitik tertinggi sebagai sumber enzim untuk produksi lipase.

a. Pembuatan medium cair

Medium pertumbuhan yang digunakan mempunyai pH 7,5 dengan komposisi nutrisi sebagai berikut (untuk 100 ml medium) : bacto pepton

0,50 gram, yeast extract 0,10 gram, gliserol 0,30 gram dan air laut sintesis 100 ml.

b. Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri

Untuk mengetahui pertumbuhan bakteri selama kultivasi, disiapkan beberapa labu Erlenmeyer 100 ml yang berisi 18 ml medium cair, kemudian ditambahkan 10% suspensi sel (inokulum). Inokulum yang digunakan dibuat dengan menginokulasikan 2 ose bakteri ke dalam medium cair dan diinkubasi dengan pengocokan 125 rpm pada temperatur kamar ($\pm 30^{\circ}\text{C}$) selama 7 jam.

Kultivasi dilakukan dengan pengocokan pada *shaker* 125 rpm dan temperatur kamar selama 24 jam. Pertumbuhan bakteri dapat diamati dengan mengukur densitas optiknya setiap jam. Suspensi sel (medium kultur) dari 1 (satu) labu Erlenmeyer diukur densitas optiknya (*optical density*, OD) dengan spektrofotometer pada $\lambda = 600\text{ nm}$. Dari data yang diperoleh, kemudian dibuat kurva pertumbuhan bakteri antara densitas optik dan waktu kultivasi.

c. Pembuatan inokulum

Sebanyak 2 ose bakteri terpilih diinokulasikan ke dalam 50 ml medium pertumbuhan steril (dalam labu Erlenmeyer 250 ml) kemudian diinkubasi pada temperatur kamar dengan pengocokan 125 rpm selama 7 jam, sehingga diperoleh suspensi sel.

Ke dalam labu Erlenmeyer 500 ml yang berisi 100 ml medium cair dimasukkan 10% suspensi sel yang diperoleh dan diinkubasi pada temperatur kamar dengan pengocokan 125 rpm selama 9 jam. Suspensi

sel yang diperoleh digunakan sebagai inokulum pada percobaan selanjutnya. Sebelumnya inokulum tersebut diukur densitas optiknya dan dihitung jumlah selnya dengan metode hitungan cawan (TPC : Total Plate Count)

d. Produksi enzim

Disiapkan beberapa labu Erlenmeyer 100 ml yang berisi 18 ml medium cair, kemudian ditambahkan 1% minyak sebagai inducer dan 10% suspensi sel (inokulum). Kultivasi dilakukan dengan pengocokan pada *shaker* 125 rpm dan temperatur kamar ($\pm 30^{\circ}$ C) selama 26 jam. Untuk mengetahui aktivitas lipolitik enzim yang dihasilkan selama kultivasi, setiap 2 jam dilakukan pengukuran aktivitas lipolitik terhadap medium kultur dari 1 (satu) labu Erlenmeyer. Setelah kultivasi, medium kultur (supernatan) dipisahkan dari biomassa selnya dengan sentrifugasi 6000 rpm dan temperatur 20° C selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan enzim ekstraseluler, selanjutnya ditentukan aktivitas lipolitiknya terhadap substrat minyak dengan metode titrimetrik. Waktu kultivasi yang diperlukan oleh bakteri untuk menghasilkan enzim dengan aktivitas lipolitik tertinggi merupakan waktu panen enzim.

4.2.6 Penentuan Aktivitas Lipolitik Enzim

Aktivitas lipolitik ditentukan dengan metode titrimetrik terhadap substrat minyak sebagai berikut :

Supernatan (enzim ekstraseluler) sebanyak 3 ml dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 100 ml yang berisi 7 ml buffer fosfat pH 7,0. Reaksi

dilakukan pada *shaker* dengan pengocokan 125 rpm pada temperatur kamar ($\pm 30^{\circ}$ C) selama 3 jam dan dihentikan dengan penambahan campuran aseton-etanol (1 : 1 v/v). Asam lemak bebas yang dihasilkan dititrasi dengan larutan NaOH 0,05 N dan indikator pp. Sebagai blanko digunakan larutan enzim yang telah dipanaskan di dalam air mendidih selama 20 menit.

Volume NaOH 0,05 N untuk netralisasi produk reaksi = volume NaOH
 .untuk titrasi sampel – volume NaOH untuk titrasi blanko

$$\text{Aktivitas lipolitik} = \frac{\text{Vol. NaOH (ml)} \times N_{\text{NaOH}} \times 1000}{\text{Waktu inkubasi (jam)}} \quad \mu\text{mol/ jam}$$

Aktivitas lipolitik 1 (satu) unit (U) didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang menghidrolisis minyak menghasilkan 1 μmol produk selama 1 jam, di bawah kondisi percobaan.

4.2.7 Penentuan Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik

Penentuan kadar protein enzim dilakukan dengan metode Folin-Lowry (Plummer, 1978).

a. Pembuatan reagen :

1. Larutan Na_2CO_3 20 gram/ L dalam larutan NaOH 0,1 mol/ L
2. Larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 5 gram/ L dalam NaK tartarat 10 gram/ L (Larutan dibuat dengan mencampur larutan stok pada saat akan digunakan).

Larutan alkali dibuat dengan mencampur 50 ml larutan (1) dan 1 ml larutan (2) pada saat akan digunakan (harus baru).

3. Reagen Folin-Ciocalteu dibuat dengan pengenceran 1 : 1 dari reagen komersial.
4. Larutan standar BSA (Bovine Serum Albumin) dengan berbagai konsentrasi : 100, 200, 300, 400 dan 500 $\mu\text{l/ ml}$.

b. Metode penentuan kadar protein

Ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml larutan alkali, dimasukkan 1 ml larutan sampel. Segera dikocok dan didiamkan selama 10 menit atau lebih. Kemudian ditambahkan 0,5 ml reagen Folin-Ciocalteu dan segera dikocok kuat-kuat. Setelah didiamkan selama 30 menit, selanjutnya dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada $\lambda = 750 \text{ nm}$. Konsentrasi protein dalam larutan sampel enzim dapat diketahui dengan mem-plotkan pada kurva standar BSA.

c. Penentuan aktivitas spesifik

Aktivitas spesifik (U/ mg protein) enzim dapat diketahui dengan menentukan aktivitas lipolitik per miligram protein berdasarkan data aktivitas lipolitik (U/ ml) dan kadar protein enzim (mg/ ml).

V. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1. Pemiakan dan Isolasi Kultur Murni

Semua bentuk kehidupan, dari mikroorganisme sampai manusia, mempunyai persamaan dalam hal persyaratan nutrisi tertentu dalam bentuk zat-zat kimia yang diperlukan untuk pertumbuhan dan fungsinya yang normal. Semua organisme hidup membutuhkan sumber energi, karbon, nitrogen, sulfur, mineral (misalnya : Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn), vitamin dan air. Bakteri amat beragam baik dalam persyaratan nutrisi maupun fisiknya, masing-masing membutuhkan kondisi optimum untuk pertumbuhannya. Bahan yang diinokulasikan pada medium yang cocok sedemikian rupa sehingga sel-sel mikroba tumbuh terpisah-pisah. Setelah inkubasi, sel-sel mikroba akan memperbanyak diri sedemikian cepatnya sehingga dalam waktu 18 sampai 24 jam akan terbentuk massa sel yang dapat dilihat dengan mata bugil. Untuk meningkatkan peluang terisolasinya suatu organisme yang mempunyai beberapa fisiologi atau biokimiawi yang unik, dapat dilakukan pemindahan kultur secara berturut-turut (dengan metode gores, sebar atau tuang) dalam medium berisikan nutrien yang dikehendaki (Pelczar & Chan, 1986).

Pada penelitian ini, dilakukan pemiakan dan isolasi kultur murni dari sumber bakteri air laut Pelabuhan Tanjung Perak. Pemiakan dan pemindahan kultur secara berturut-turut dalam medium yang mengandung gliserol dan minyak, dimaksudkan untuk meningkatkan peluang terisolasinya suatu mikroorganisme lipolitik. Pemiakan mikroba dari sumber air laut menghasilkan



koloni-koloni dengan warna dan bentuk berbeda, yang menunjukkan adanya beberapa jenis bakteri yang mampu tumbuh pada medium yang digunakan, seperti terlihat pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1. Biakan mikroba dari sumber air laut pelabuhan Tanjung Perak (umur 24 jam pada medium dengan nutrisi : bacto pepton, yeast extract, gliserol dan minyak kelapa)

Dari hasil pemurnian campuran mikroba tersebut, dapat diperoleh 14 kultur murni dengan berbagai warna : putih, kuning, kecoklatan dan kemerahan. Hasil analisis mikrobiologi/ identifikasi mikroba terhadap 9 kultur murni yang dilakukan oleh Laboratorium Biologi Lingkungan FMIPA Unair, menunjukkan terisolasinya 5 genus bakteri, yaitu : *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* dan *Xanthomonas* (Lampiran 1).

5.2. Skrining Bakteri Penghasil Lipase

Skrining bakteri penghasil lipase dimaksudkan untuk mencari bakteri lipolitik (penghasil lipase) dengan metode *rhodamine B agar plate*. Aktivitas

lipolitik ditandai dengan terbentuknya warna orange berpendar disekitar koloni bakteri. Mekanisme pembentukan ikatan antara zat warna rhodamine B dengan asam lemak, mono- atau digliserida tidak diketahui secara pasti, diduga bahwa rhodamine membentuk kompleks dimer dengan asam lemak, mono- atau digliserida (Hou & Johnston, 1992).

Lipase komersial (dari *Candida rugosa*) yang digunakan sebagai pembanding pada penelitian ini, membentuk warna orange berpendar jika diujikan pada medium agar-rhodamine B. Terbentuknya warna orange berpendar tersebut digunakan sebagai kontrol/ pembanding untuk skrining bakteri lipolitik. Berdasarkan terbentuknya warna orange disekitar/ pada permukaan koloni dan diameter koloni, dapat diketahui apakah suatu bakteri menghasilkan lipase atau tidak.

Hou & Johnston (1992) mengelompokkan bakteri penghasil lipase menjadi 3 kategori berdasarkan diameter zona berwarna orange yang terbentuk, yaitu : kategori baik (diameter >10 mm), kategori sedang (diameter 7 – 10 mm) dan bakteri penghasil lipase kategori lemah (diameter 5 - 7 mm)

Dengan metode *rhodamine B agar plate* dapat diketahui bahwa dari 14 isolat bakteri yang diperoleh, ada 5 isolat bakteri yang berpotensi sebagai penghasil lipase yang ditandai dengan terbentuknya warna orange pada koloni bakteri dengan diameter > 5 mm. Bakteri 2 membentuk koloni berwarna orange dengan diameter yang paling besar yaitu 13 mm. Bakteri 1, 3, 5 dan 7 membentuk koloni dengan diameter 7 – 10 mm. Sedangkan isolat bakteri yang lain dikatakan tidak menghasilkan lipase atau tidak tumbuh pada medium uji, sebagaimana terlihat pada Tabel 5.1 dan Gambar 5.2.

Tabel 5.1. Hasil skrining bakteri lipolitik dengan metode *rhodamine B* agar plate

| Nomor Bakteri | Warna Bakteri | Genus | Diameter koloni (mm) |
|---------------|---------------|-----------------------|----------------------|
| 1. | Putih | <i>Micrococcus</i> | 7 |
| 2. | Putih | <i>Pseudomonas</i> | 13 |
| 3. | Kecoklatan | <i>Flavobacterium</i> | 8 |
| 4. | Putih | <i>Pseudomonas</i> | 3 |
| 5. | Putih | <i>Micrococcus</i> | 7 |
| 6. | Kecoklatan | <i>Flavobacterium</i> | 4 |
| 7. | Putih | <i>Pseudomonas</i> | 10 |
| 8. | Kuning | <i>Staphylococcus</i> | 4 |
| 9. | Kemerahan | <i>Xanthomonas</i> | 3 |
| 10. | Putih | t.i | 4 |
| 11. | Putih | t.i | 1 |
| 12. | Putih | t.i | 3 |
| 13. | Putih | t.i | 2 |
| 14. | Putih | t.i | 1 |

Catatan : t.i = tidak diidentifikasi

Berdasarkan pengelompokan bakteri penghasil lipase yang dibuat oleh Hou & Jonhston (1992) tersebut maka dapat disimpulkan bahwa pada penelitian ini dapat diisolasi 5 strain bakteri lipolitik dari genus *Pseudomonas*, *Flavobacterium* dan *Micrococcus*. Kelima isolat bakteri dikelompokkan sebagai bakteri penghasil lipase kategori kuat (yaitu bakteri 2 dengan diameter koloni 13 mm) dan kategori sedang (yaitu bakteri 1, 3, 5 dan 7 dengan diameter koloni 7 – 10 mm). Dari data yang diperoleh (Tabel 5.1.) maka pada penelitian ini dipilih bakteri 2 (*Pseudomonas* sp.) sebagai sumber enzim untuk produksi lipase.



Gambar 5.1. Skrining bakteri penghasil lipase dengan metode *rhodamine B agar plate*

5.3. Produksi Lipase dari Strain Terpilih

Berdasarkan hasil skrining bakteri penghasil lipase maka pada penelitian ini dipilih bakteri 2 (*Pseudomonas* sp.) sebagai sumber enzim untuk produksi lipase.

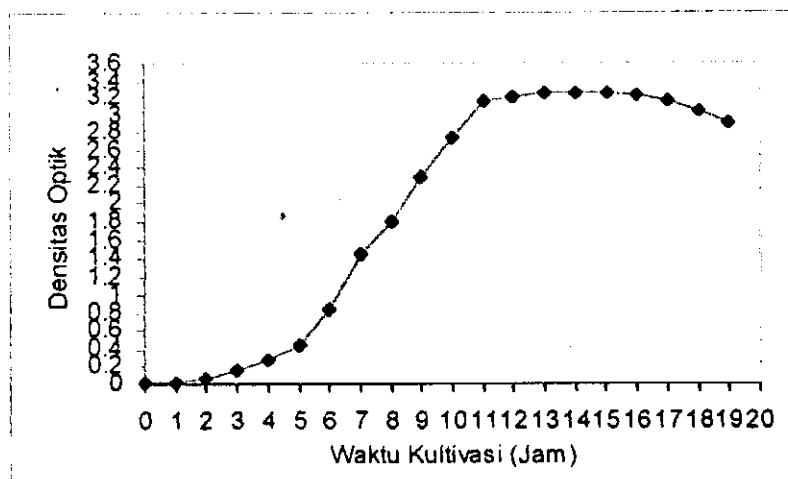
5.3.1 Kurva pertumbuhan bakteri 2

Pertumbuhan yang dicirikan oleh peningkatan massa sel dan atau jumlah sel, hanya terjadi bilamana kondisi-kondisi kimiawi dan fisika tertentu terpenuhi, misalnya temperatur dan pH yang dapat diterima dan tersedianya nutrisi yang dibutuhkan. Selama fase pertumbuhan seimbang, penambahan massa bakteri berbanding lurus (proporsional) dengan penambahan komponen selular yang lain seperti DNA, RNA dan protein. Pada fase pertumbuhan seimbang ini, populasi bertambah secara teratur, menjadi dua kali lipat pada interval waktu tertentu (waktu generasi) selama inkubasi. Bila dilakukan pemetaan antara logaritma massa/ jumlah sel terhadap waktu, akan diperoleh suatu kurva yang menunjukkan adanya suatu periode awal yang tampaknya tanpa pertumbuhan (fase adaptasi atau *lag phase*) diikuti oleh suatu periode pertumbuhan yang cepat (fase eksponensial atau *log phase*), kemudian mendatar (fase statis atau *stationary phase*) dan akhirnya diikuti oleh suatu penurunan populasi sel- hidup (fase kematian). Diantara setiap fase tersebut ada suatu periode peralihan sebelum semua sel memasuki fase yang baru (Pelczar & Chan, 1986).

Densitas/ kerapatan optik atau kekeruhan suatu medium kultur sebanding dengan massa sel. Pengukuran pertumbuhan dengan mengukur kerapatan optik

merupakan cara yang dianggap sederhana, cepat dan murah dalam upaya menentukan massa sel untuk pekerjaan rutin (Said, 1987).

Pertumbuhan bakteri 2 dapat diketahui dengan mengamati perubahan kekeruhannya (densitas optik) menggunakan spektrofotometer UV/ Vis pada $\lambda = 600$ nm. Dari data pengamatan yang diperoleh (Lampiran 2) dapat dibuat kurva pertumbuhan dari bakteri 2 seperti terlihat pada Gambar 5.3.



Gambar 5.3. Kurva Pertumbuhan Bakteri 2

Gambar 5.3 memperlihatkan bahwa bakteri 2 mengalami fase adaptasi yang tampak adanya pertumbuhan lambat hingga 5 jam kultivasi, diikuti dengan pertumbuhan yang cepat hingga jam ke 11 kultivasi. Selanjutnya mengalami fase statis hingga jam ke 15, dan akhirnya diikuti dengan penurunan populasi sel-sel hidup (fase kematian) yang ditandai dengan menurunnya densitas optik kultur sel.

Fase statis terjadi bila seluruh sel berhenti membelah diri atau bila sel-sel hidup telah mencapai keseimbangan dengan sel-sel mati. Meskipun pertumbuhan telah terhenti, metabolisme dan akumulasi produk masih terjadi di dalam sel atau

cairan. Massa sel total dapat tetap konstan tetapi jumlah sel hidup cenderung menurun dan pada saat ketahanan hidup menurun, lisis sel mungkin terjadi dan massa sel akan menurun (Said, 1987).

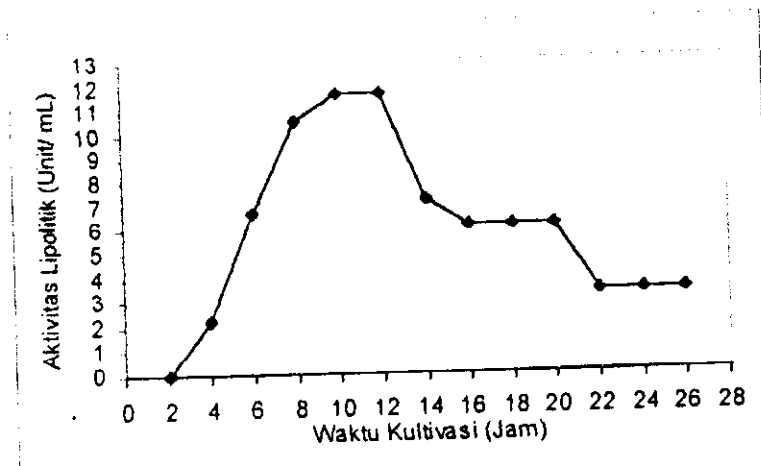
5.3.2 Produksi Lipase dari Bakteri 2

Pada produksi enzim digunakan inokulum dengan densitas optik 1,800 dan jumlah sel = $1,54 \times 10^6$ koloni/ ml. Untuk mengetahui waktu panen enzim, selama kultivasi diamati aktivitas lipolitik enzim yang dihasilkan. Supernatan medium kultur ditentukan aktivitas lipolitiknya terhadap substrat minyak dengan metode titrimetrik. Asam lemak bebas yang terbentuk dititrasi dengan larutan NaOH.

Aktivitas lipolitik 1 (satu) unit (U) didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang menghidrolisis minyak menghasilkan 1 μ mol produk selama 1 jam, di bawah kondisi percobaan.

Data aktivitas lipolitik enzim selama kultivasi tercantum pada Lampiran 3, sedangkan profil aktivitas enzim selama kultivasi dapat dilihat pada Gambar 5.4.

Dari Gambar 5.4 dapat disimpulkan bahwa kultivasi bakteri 2 selama 10-12 jam pada temperatur kamar ($\pm 30^\circ$ C) menghasilkan enzim dengan aktivitas lipolitik tertinggi yaitu 11,67 U/ ml. Sedangkan mulai jam ke 13 kultivasi, aktivitas lipolitik enzim yang dihasilkan mengalami penurunan cukup drastis. Kemungkinan hal ini disebabkan karena hidrolisis enzim lipase oleh protease yang diproduksi pada fase pertumbuhan yang sama (Ohnishi *et al.*, 1994).



Gambar 5.4. Profil aktivitas lipolitik lipase yang dihasilkan oleh isolat bakteri *Pseudomonas* sp.

Dengan demikian dapat dikatakan bahwa kultivasi selama 10-12 jam merupakan waktu panen enzim.

Untuk menentukan aktivitas spesifik enzim, dilakukan pengukuran protein enzim dengan metode Folin Lowry. Dengan memplotkan adsorbansi protein enzim pada kurva standar BSA maka dapat ditentukan kadar protein enzim (Lampiran 4). Larutan enzim yang dihasilkan setelah kultivasi selama 10 jam mempunyai aktivitas lipolitik 11,67 U/ ml dengan kadar protein 1,5402 mg/ml, sehingga aktivitas spesifiknya sebesar 7,5769 U/ mg protein. Sedangkan enzim yang dihasilkan setelah kultivasi 12 jam mempunyai aktivitas lipolitik 11,67 U/ ml dengan kadar protein 1,6224 mg/ ml, sehingga aktivitas spesifiknya sebesar 7,1930 U/ mg protein.

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada penelitian ini, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Lima strain bakteri lipolitik dari genus *Pseudomonas*, *Flavobacterium* dan *Micrococcus* dapat diisolasi dari air laut pelabuhan Tanjung Perak
2. Lipase yang dihasilkan oleh strain bakteri 2 (*Pseudomonas sp.*) mempunyai aktivitas lipolitik 11,67 U/ ml dan aktivitas spesifik 7,5769 U/ mg protein.

6.2. Saran

Bakteri 2 (*Pseudomonas sp.*) hasil isolasi dari air laut pelabuhan Tanjung Perak menghasilkan lipase dengan aktivitas lipolitik 11,67 U/ ml dan aktivitas spesifik 7,5769 U/ mg protein. Untuk mendapatkan enzim lipase dengan aktivitas yang lebih tinggi, disarankan dilakukan optimasi kondisi produksi lipase oleh strain bakteri tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Bagi, K.; Simon, L.M. and Szajani, B. (1997) Immobilization and Characterization of Porcine Pancreas Lipase, *Enzyme Microb. technol.*, **20**, 531-535.
- Belitz, H.D. and Grosch, W. (1987) *Food Chemistry*, Springer Verlag, Berlin
- Cabral, J.M.S.; Aries-Barros, M.R.; Pinheiro, H. and Prazeres, D.M.F. (1997) Biotransformation in Organic Media by Enzymes and Whole Cells, *J. Biotechnol.*, **59**, 133-143.
- Cunningham, E.B. (1978) *Biochemistry : Mechanism of Metabolism*, McGraw-Hill Book Company, New York.
- Edmundo, C.; Valerie, D.; Didier, C. and Alain, M.(1998) Efficient Lipase-Catalyzed Production of Tailor-Made Emulsifiers Using Solvent Engineering Coupled to Extractive processing, *J. Am.Oil Chem. Soc.*, **75**, 309-313.
- Faber, K. (1992) *Biotransformation in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin
- Fatimah (2001) Uji Kemampuan Bakteri Hidrokarbonoklastik Yang Diisolasi dari Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya dalam Produksi Biosurfaktan, Tesis, Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
- Hou, C.T. and Johnston, T.M. (1992) Screening of Lipase Activities with Culture from the Agricultural Research Culture Collection, *J. Am.Oil Chem. Soc.*, **69**, 1088-1097.

- Linko, Y.; Lamsa, M.; Wu, X.; Uosukainen, E.; Seppala, J. and Linko, P. (1998) Biodegradable Products by Lipase Biocatalysis, *J. Biotechnol.*, **66**, 41-50.
- Marek, A. and Bednarski, K. (1996) Some Factors Affecting Lipase Production by Yeasts and Filamentous Fungi, *Biotechnol. Lett.*, **18**, 1155-1160.
- Margolin, A.L. (1993) Enzymes in The Synthesis of Chiral Drugs, *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 266-280
- Ohnishi, K.; Yoshida, Y. and Seikiguchi, J. (1994) Lipase Production of *Aspergillus oryzae*, *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 490-495
- Pelczar, M.J. & Chan, E.C.S. (1981) *Elements of Microbiology*, International Student edition, McGraw-Hill International Book Company, Tokyo.
- Plummer, D.T. (1978) *An Introduction to Practical Biochemistry*, Second edition, Tata McGraw-Hill Publishing Company LTD., New Delhi.
- Said, E.G. (1987) *Bioindustri, Penerapan Teknologi Fermentasi*, Edisi I, PT. Mediyatama Sarana Perkasa, Jakarta.
- Stanbury, P.F. and Whitaker, A. (1986) *Principles of Fermentation Technology*, First ed., Pergamon Press Ltd.
- Yahya, A.R.M., Anderson, W.A. and Moo-Young, M. (1998) Ester Synthesis in Lipase-Catalyzed Reaction, *Enzyme Microb. Technol.*, **23**, 438-450.

LAMPIRAN



LABORATORIUM BIOLOGI LINGKUNGAN
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Kampus C, Jl. Mulyorejo, Surabaya 60115, Indonesia
 Tel. (031) 5936501, Fax. (031) 5936502

Lampiran 1.

HASIL ANALISIS MIKROBIOLOGI SAMPEL

- (a) Jenis sampel : 5 biakan bakteri di tabung reaksi
 (b) Asal sampel : Dra. Sri Sumarsih M.Si.
 (Lab.Kimia Organik F.MIPA - UNAIR)
 (c) Pemeriksaan yang dikehendaki : Identifikasi bakteri
 (d) Pemeriksa : Drs. Agus Supriyanto, M.Kes.
 (e) Hasil pemeriksaan :

| No. | Genus bakteri yang teridentifikasi |
|-----|------------------------------------|
| 1. | <i>Flavobacterium</i> |
| 2. | <i>Micrococcus</i> |
| 3. | <i>Pseudomonas</i> |
| 4. | <i>Staphylococcus</i> |
| 5. | <i>Xanthomonas</i> |

Surabaya, 12 Agustus 2002

Mengetahui,
 Kepala Lab. Biologi Lingkungan

Bagian Analisis

(Dr. Ir. Agoes Socgianto, DEA)

(Drs. Agus Supriyanto, M.Kes.)

Lampiran 2. Densitas optik medium kultur selama kultivasi bakteri 2

(Pseudomonas sp.)

Tabel 1. Densitas optik medium kultur selama kultivasi bakteri 2

| Kultivasi jam ke- | Faktor Pengenceran | Absorbansi | Densitas optik OD $\lambda= 600$ nm |
|-------------------|--------------------|------------|-------------------------------------|
| 0 | - | 0,025 | 0,025 |
| 1 | - | 0,027 | 0,027 |
| 2 | - | 0,080 | 0,080 |
| 3 | - | 0,156 | 0,156 |
| 4 | - | 0,270 | 0,270 |
| 5 | - | 0,451 | 0,451 |
| 6 | - | 0,844 | 0,844 |
| 7 | 4 | 0,363 | 1,452 |
| 8 | 4 | 0,451 | 1,804 |
| 9 | 4 | 0,572 | 2,288 |
| 10 | 4 | 0,682 | 2,728 |
| 11 | 4 | 0,788 | 3,152 |
| 12 | 4 | 0,799 | 3,196 |
| 13 | 4 | 0,812 | 3,248 |
| 14 | 4 | 0,813 | 3,252 |
| 15 | 4 | 0,813 | 3,252 |
| 16 | 4 | 0,804 | 3,216 |
| 17 | 4 | 0,787 | 3,148 |
| 18 | 4 | 0,757 | 3,028 |
| 19 | 4 | 0,726 | 2,904 |
| 20 | 4 | 0,667 | 2,668 |

Lampiran 3. Aktivitas lipolitik enzim yang dihasilkan selama kultivasi bakteri 2 (*Pseudomonas* sp.)

Tabel 2. Aktivitas lipolitik enzim yang dihasilkan selama kultivasi bakteri 2

| Waktu inkubasi (jam) | Vol NaOH 0,05 N (ml) | Volume Enzim (ml) | Aktivitas Lipolitik | |
|----------------------|----------------------|-------------------|---------------------|----------|
| | | | Unit | Unit/ ml |
| 2 | 5,6 | 3 | 0 | 0 |
| 4 | 6,0 | 3 | 6,67 | 2,22 |
| 6 | 6,8 | 3 | 20,0 | 6,67 |
| 8 | 7,5 | 3 | 31,67 | 10,56 |
| 10 | 7,7 | 3 | 35,0 | 11,67 |
| 12 | 7,7 | 3 | 35,0 | 11,67 |
| 14 | 6,9 | 3 | 21,67 | 7,22 |
| 16 | 6,7 | 3 | 18,33 | 6,11 |
| 18 | 6,7 | 3 | 18,33 | 6,11 |
| 20 | 6,7 | 3 | 18,33 | 6,11 |
| 22 | 6,2 | 3 | 10,0 | 3,33 |
| 24 | 6,2 | 3 | 10,0 | 3,33 |
| 26 | 6,2 | 3 | 10,0 | 3,33 |

Perhitungan :

Volume NaOH untuk titrasi blanko = 5,6 ml

Volume NaOH untuk netralisasi produk hidrolisis = (volume NaOH – 5,6) ml

$$\begin{aligned}
 \text{Aktivitas lipolitik} &= \frac{\text{Vol. NaOH} \times N_{\text{NaOH}} \times 1000}{\text{Waktu inkubasi (jam)}} \\
 &= \frac{(6,0 - 5,6) \times 0,05 \times 1000}{3} = 6,67 \text{ Unit}
 \end{aligned}$$

Volume enzim yang digunakan = 3 ml

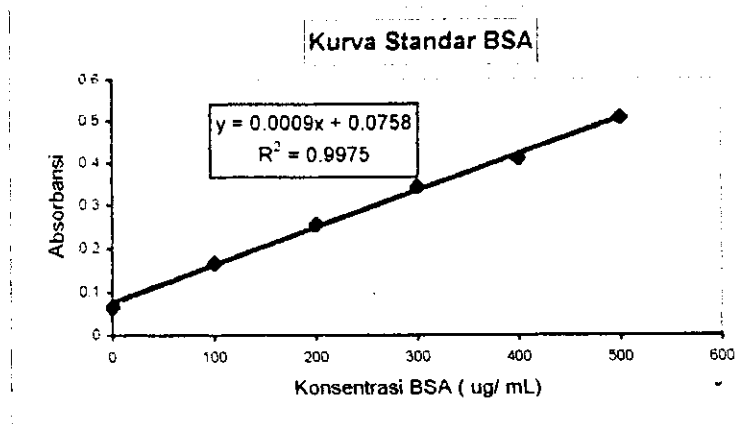
Jadi aktivitas lipolitik = 2,22 Unit/ ml

Lampiran 4. Kurva standar BSA, kadar protein dan aktivitas spesifik enzim

a. Kurva standar BSA

Tabel 3. Absorbansi BSA pada berbagai konsentrasi

| No. | Konsentrasi BSA (μ gram/ ml) | Absorbansi $\lambda = 750$ nm |
|-----|--------------------------------------|----------------------------------|
| 1. | 0 | 0,067 |
| 2. | 100 | 0,166 |
| 3. | 200 | 0,255 |
| 4. | 300 | 0,342 |
| 5. | 400 | 0,409 |
| 6. | 500 | 0,506 |



b. Penentuan aktivitas spesifik

Aktivitas lipolitik enzim = 11,67 U/ ml

Persamaan kurva standar : $Y = 0,0009 X + 0,0758$

1. Untuk enzim hasil kultivasi 10 jam : absorbansi = 1,462

Kadar protein = 1540,22 μ gram/ ml = 1,5402 mg/ ml

Aktivitas spesifik = 7,5769 U/ mg protein

2. Untuk enzim hasil kultivasi 12 jam : absorbansi = 1,536

Kadar protein = 1622,44 μ gram/ ml = 1,6224 mg/ ml

Aktivitas spesifik = 7,1930 U/ mg protein

1 JUN 2004

REVISI

