

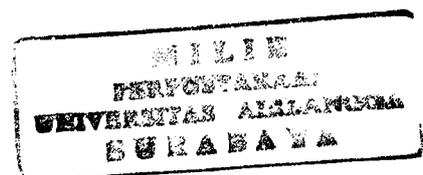
**PENGARUH SUMBER KARBON TERHADAP PRODUKSI LIPASE
OLEH ISOLAT TERMOFILIK DARI REAKTOR
PABRIK MINYAK GORENG**

SKRIPSI

DIA RATNA AJIZAH



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2006**



**PENGARUH SUMBER KARBON TERHADAP PRODUKSI LIPASE
OLEH ISOLAT TERMOFILIK DARI REAKTOR
PABRIK MINYAK GORENG**

SKRIPSI

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Sains Bidang Kimia pada
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Airlangga**

Oleh :

DIA RATNA AJIZAH

NIM. 080212569

Tanggal Lulus : 20 Juli 2006

Disetujui Oleh :

Pembimbing I,



Dra. Sri Sumarsih, M.Si.
NIP. 131 802 890

Pembimbing II,



Purkan, S.Si., M.Si.
NIP. 132 161 176

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Judul : **PENGARUH SUMBER KARBON TERHADAP PRODUKSI LIPASE OLEH ISOLAT TERMOFILIK DARI REAKTOR PABRIK MINYAK GORENG**

Penyusun : **Dia Ratna Ajizah**

NIM : **080212569**

Pembimbing I : **Dra. Sri Sumarsih, M.Si.**

Pembimbing II : **Purkan, S.Si., M.Si.**

Tanggal Seminar : **20 Juli 2006**

Disetujui Oleh

Pembimbing I,

Pembimbing II,

Dra. Sri Sumarsih, M.Si.
NIP. 131 802 890

Purkan, S.Si., M.Si.
NIP. 132 161 176

Mengetahui :

Ketua Jurusan Kimia

FMIPA Universitas Airlangga



Dra. Tjitjik Srie Tjahjandarie, Ph.D
NIP. 131 801 627

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan, namun tersedia di perpustakaan dalam lingkungan Universitas Airlangga, diperkenankan dipakai sebagai referensi kepustakaan, tetapi pengutipan harus seizin penyusun, dan harus menyebutkan sumbernya sesuai dengan kebiasaan ilmiah.

Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga.



*Bila anda ingin senantiasa bahagia, tuntutlah ilmu, galilah pengetahuan, dan
raihlah pelbagai manfaat,
niscaya semua kesedihan, kepedihan, dan kecemasan akan sirna.*

*Kemuliaan ilmu dan kebudayaan akan kekal abadi, terutama bagi orang yang
berprofesi mengajar dan menulis.*
(La Tanzan - Aidh al-Qarni)

*Kebahagiaan datang jika kita berhenti mengeluh tentang kesulitan-kesulitan
yang kita hadapi, dan mengucapkan terima kasih atas kesulitan-kesulitan yang
tidak menimpa kita.*
(Anonim)

*Jenius adalah 1 % inspirasi dan 99 % keringat. Tidak ada yang dapat
menggantikan kerja keras. Keberuntungan adalah sesuatu yang terjadi ketika
kesempatan bertemu dengan kesiapan.*
(Thomas A. Edison)

*Skripsi ini kupersembahkan untuk keluargaku tercinta
Ayah, Bunda, Adikku (Najib & Fifit), guru-guruku dan
juga sahabat-sahabatku tercinta.*

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah rabbil'alam, segala puji dan syukur kehadiran Allah SWT atas segala limpahan nikmat, taufiq dan hidayah-Nya sehingga penyusun dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul "**Pengaruh Sumber Karbon terhadap Produksi Lipase oleh Isolat Termofilik dari Reaktor Pabrik Minyak Goreng**". Skripsi ini dibuat dalam rangka memenuhi persyaratan akademis pendidikan sarjana sains dalam bidang kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga.

Pada kesempatan ini penyusun ingin menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dra. Tjitjik Srie Tj, Ph.D sebagai Ketua Jurusan Kimia Universitas Airlangga dan seluruh staf jurusan kimia.
2. Ibu Dra. Sri Sumarsih, M.Si dan Bapak Purkan, S.Si, M.Si selaku dosen pembimbing yang telah begitu banyak memberikan bimbingan, saran, nasehat dan bantuan dalam penyusunan skripsi ini.
3. Bapak Drs. Imam Siswanto M.Si selaku dosen wali yang telah memberikan saran dan nasehat di setiap semester hingga akhir semester dalam kemajuan studi penulis dan kelancaran penulisan skripsi ini.
4. Bapak, Ibu, adik dan seluruh keluargaku tercinta yang telah memberikan kasih sayang, kepercayaan dan dukungan baik moral maupun material.
5. Bapak Drs. Hamami, M.Si dan Bapak Abdullah S.Si, M.Si. selaku dosen penguji yang banyak memberi masukan yang sangat membangun.

6. Buat sahabatku Amelia_oke, Mafulah, Mpok Hindun (Nuri_Imoet), Mpok Romlah (Cilpi), Nia imut, Ratnil, Rohma, Hani, Ana, Ratih A dan semua mahasiswa kimia angkatan 2002 khususnya, adik angkatan 2003–2005, terima kasih atas segala perhatian dan dukungannya.
7. Buat keluarga Bapak Jhonatan, Dek Angga, Nanda, dan Vei terima kasih atas nasihat, semangat, dukungan dan doanya dari jauh.
8. Buat sahabat- sahabatku: Maks_Kharis, Mas Agung, Anjas, Eko, Dahlia dan semua sahabatku, terima kasih atas semangat, dukungan dan doanya dari jauh
9. Mas Fendy, Pak Damam, Pak Kamto, Pak Gimam, Mas Rohadi, Mbak Yuli, Mbak Rizki, Mbak Ambar, dan semua penghuni laboratorium organik, biokimia, fisik dan staf-staf fakultas MIPA yang begitu banyak membantu dalam pelaksanaan pengerjaan skripsi ini.
10. Dan semua pihak yang telah membantu kelancaran penyusunan skripsi ini.

Penyusun memahami dan menyadari bahwa skripsi ini jauh dari sempurna, untuk itu penyusun membutuhkan saran dan kritik dari para pembaca demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat sebagai informasi dan tambahan pengetahuan yang berguna bagi kemajuan IPTEK. Semoga Allah SWT meridhoi sehingga hasil penelitian ini bermanfaat bagi semua.

Surabaya, Juli 2006
Penyusun

Dia Ratna Ajizah

Dia Ratna Ajizah. 2006. Pengaruh Sumber Karbon terhadap Produksi Lipase oleh Isolat Termofilik dari Reaktor Pabrik Minyak Goreng. Skripsi ini di bawah bimbingan Dra. Sri Sumarsih, M.Si. dan Purkan, S.Si., M.Si. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang pengaruh sumber karbon terhadap produksi lipase oleh isolat termofilik dari reaktor pabrik minyak goreng. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil pertumbuhan isolat dalam media dengan sumber karbon berbeda dan sumber karbon terbaik untuk produksi lipase oleh isolat termofilik dari pabrik minyak goreng. Sumber karbon yang digunakan dalam penelitian ini adalah: asam oleat, gliserol, minyak goreng, dan glukosa. Uji pendahuluan dengan metode *Rhodamin B agar plate* menunjukkan bahwa terdapat 14 isolat yang memiliki aktivitas lipolitik. Dari 14 isolat tersebut dipilih satu isolat yang memiliki aktivitas lipolitik terbesar sebagai sumber lipase untuk penelitian selanjutnya dan diberi nama isolat L-08. Aktivitas lipolitik ditentukan dengan metode spektrofotometri menggunakan substrat p-nitrofenil palmitat (pNPP), p-nitrofenol yang terbentuk diukur pada λ 410 nm. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa asam oleat merupakan sumber karbon terbaik untuk produksi lipase oleh isolate L-08. Kultivasi isolat L-08 dalam media dengan sumber karbon 1% asam oleat menghasilkan lipase dengan aktivitas tertinggi sebesar 0,1140 U/mL pada fase stasioner yakni setelah kultivasi 12 jam. Produksi lipase oleh isolat L-08 dalam media yang berisi asam oleat dengan berbagai konsentrasi pada waktu optimum menunjukkan bahwa konsentrasi terbaik untuk produksi lipase adalah 2 % sehingga dihasilkan aktivitas lipolitik sebesar 0,1154 U/mL.

Kata kunci : *Sumber karbon, produksi lipase, isolat termofilik, p-nitrofenil palmitat*

Dia Ratna Ajizah. 2006. The Influence of Carbon Source on Lipase Production by Thermophilic Isolate from Reactor of Oil Industry. This research was under guidance by Dra. Sri Sumarsih, M.Si. and Purkan, S.Si., M.Si. Chemistry Departement, Faculty of Mathematics and Science, Airlangga University.

ABSTRACT

It has been done a research about the influence of carbon source on lipase production by thermophilic isolate from reactor of oil industry. The goal of this research are to know the growth profile of isolate and the best carbon source on lipase production by thermophilic isolate from reactor of oil industry. The carbon sources that was used in this research are: oleic acid, glycerol, palm oil, and glucose each 1%. The first lipolytic activity assay that was determined by Rhodamin B agar plate methode, showed that there were 14 positive isolate. From 14 isolate have chossed one isolate which has the highest activity for next research. Then that isolate was named L-08. Lipolytic activity of crude enzyme was determined by spectrophotometric method using *p*-nitrophenyl palmitate (pNPP) and the *p*-nitrophenol as the product was measured at λ 410 nm. This research showed that oleic acid as the best carbon source for lipase production by isolate L-08. Cultivation of isolate L-08 in medium contained oleic acid 1% produced lipolytic activity 0,1140 U/mL at the stationary phase after 12 hours cultivation. Lipase production by isolate L-08 in the medium contained oleic acid as carbon source in various concentration showed that 2% oleic acid was the best concentration which produced 0,1154 U/mL.

Key words: *Carbon source, lipase production, thermophilic isolate, p-nitrophenyl palmitate*

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul	
Pedoman penggunaan skripsi	
Lembar Pengesahan	
Kata Pengantar	i
Abstrak	iii
Abstract	iv
Daftar Isi	v
Daftar Tabel.....	vii
Daftar Gambar	viii
Daftar Lampiran	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Tinjauan Umum Enzim	6
2.1.1 Sifat-sifat kimiawi dan fisik enzim	7
2.1.2 Pengendalian sintesis enzim.....	12
2.2 Enzim Termotabil.....	15
2.3 Tinjauan Tentang Lipase.....	17
2.4 Aplikasi Lipase Dalam Industri	19
2.5 Uji Aktivitas Lipase.....	21
2.6 Kurva Pertumbuhan Bakteri	22
2.7 Nutrisi dalam Pertumbuhan Bakteri	25
BAB III METODE PENELITIAN	27
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	27
3.2 Sampel Penelitian.....	27
3.3 Bahan dan Alat Penelitian	27
3.3.1 Bahan penelitian.....	27
3.3.2 Alat-alat penelitian	27
3.4 Prosedur Penelitian	28
3.4.1 Pemiakan dan isolasi mikroba termofilik	28
3.4.1.1 Pembuatan media untuk isolasi mikroba termofilik	28

3.4.1.2	Pembiakan dan isolasi kultur murni mikroba termofilik.....	28
3.4.2	Skrining mikroba lipolitik termofilik	29
3.4.2.1	Pembuatan media untuk skrining	29
3.4.2.2	Pembuatan larutan rhodamin B 0.1 % (b/v)..	29
3.4.2.3	Pembuatan media uji pendahuluan aktivitas lipolitik.....	29
3.4.2.4	Skrining bakteri lipolitik termofilik	30
3.4.3	Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri pada beberapa sumber karbon	30
3.4.4	Pembuatan larutan buffer Fosfat pH 7,0	31
3.4.5	Pembuatan larutan NaOH 0,1 N.....	31
3.4.6	Pembuatan larutan p-nitrofenil palmitat 0,504 mM	31
3.4.7	Pembuatan larutan p-nitrofenol	31
3.4.8	Pembuatan inokulum	32
3.4.9	Produksi ekstrak kasar lipase termostabil dari beberapa sumber karbon.....	32
3.4.10	Penentuan aktivitas lipolitik ekstrak kasar lipase.	32
3.4.11	Penentuan konsentrasi sumber karbon optimum pada produksi lipase.....	33
3.5	Diagram Alir Penelitian	34
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....		35
4.1	Isolasi Bakteri Termofilik Penghasil Lipase	35
4.2	Uji Pendahuluan Aktivitas Lipolitik.....	35
4.3	Pembuatan Kurva Pertumbuhan Isolat Lipolitik Termofilik	36
4.4	Penentuan Aktivitas Lipolitik Ekstrak Kasar Lipase .	41
4.5	Pembuatan Kurva Produksi	42
4.6	Penentuan Konsentrasi Asam Oleat Optimum Untuk Produksi Lipase.....	46
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....		48
5.1	Kesimpulan	48
5.2	Saran	48
 DAFTAR PUSTAKA.....		49
 LAMPIRAN		

DAFTAR TABEL

No.	Judul Tabel	Halaman
2.1	Aplikasi mikrobial lipase dalam beberapa industri.....	17



DAFTAR GAMBAR

No.	Judul Gambar	Halaman
2.1	Pengaruh konsentrasi enzim terhadap laju aktivitas enzim.....	9
2.2	Pengaruh konsentrasi substrat terhadap laju aktivitas enzim.....	9
2.3	Pengaruh pH terhadap laju aktivitas enzim.....	10
2.4	Pengaruh suhu terhadap laju aktivitas enzim	11
2.5	Pemecahan lemak menjadi asam lemak dan gliserol dengan lipase	14
2.6	Kurva pertumbuhan mikroba.....	22
4.1	Mikroorganisme termofilik hasil isolasi dari sekitar reaktor pabrik minyak goreng	36
4.2	Aktivitas lipase dari isolat pabrik minyak goreng pada <i>rhodamine B agar plate</i>	37
4.3	Profil pertumbuhan isolat L-08 dalam media dengan beberapa sumber karbon berbeda.....	38
4.4	Reaksi hidrolisis p-nitrofenil palmitat oleh lipase.....	42
4.5	Profil produksi lipase oleh isolat L-08 pada beberapa media dengan sumber karbon berbeda.....	43
4.6	Pengaruh konsentrasi asam oleat terhadap produksi lipase oleh isolat L-08.....	47

DAFTAR LAMPIRAN

- | No. | Judul Lampiran |
|------------|--|
| 1. | Komposisi media untuk pembuatan kurva pertumbuhan dan kurva produksi lipase |
| 2. | Pembuatan kurva pertumbuhan isolat mikroba termofilik dari pabrik minyak goreng pada beberapa media dengan sumber karbon berbeda |
| 3. | Pembuatan kurva standart larutan p-nitrofenol |
| 4. | Penentuan Aktivitas Lipolitik terhadap Substrat p-Nitrofenil Palmitat |
| 5. | Hasil penentuan aktivitas lipase terhadap substrat p-NPP |
| 6. | Pengaruh konsentrasi asam oleat terhadap produksi lipase oleh isolate termofilik dari pabrik minyak goreng |

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Mikroorganisme yang ada di bumi tak terhitung jumlah, jenis dan macamnya. Beberapa dari mikroorganisme tersebut ada yang merugikan karena dapat menyebabkan penyakit tetapi banyak juga yang berguna bagi kehidupan manusia, misalnya sebagai sumber enzim. Peran enzim sebagai katalisator hayati dalam berbagai industri saat ini meningkat pesat. Hal ini disebabkan oleh sifatnya yang efisien, selektif, mengkatalisis reaksi tanpa produk samping dan ramah lingkungan. Industri yang memanfaatkan enzim meliputi: industri pangan (45%), deterjen (34%), tekstil (11%), kulit (3%), pulp dan kertas (1,5%) serta bidang diagnostik dan medis (5,5%) (Thenawidjaja, 2000).

Enzim termostabil adalah enzim yang toleran terhadap suhu operasional yang tinggi sehingga sangat bermanfaat dalam dunia industri. Pemanfaatan enzim termostabil di bidang industri dapat mengurangi tingkat kebutuhan biaya. Secara umum, reaksi pada suhu tinggi dapat meningkatkan kecepatan reaksi, menurunkan viskositas, meminimalkan resiko kontaminasi dan dalam beberapa hal dapat meningkatkan kesetimbangan reaksi ke arah pembentukan produk. Enzim termostabil dapat diperoleh dari organisme mesofil dan termofil, namun organisme termofil merupakan sumber enzim termostabil yang lebih tepat karena proteinnya termostabil. Secara umum enzim dari organisme termofil stabil pada temperatur 20°C lebih tinggi dari temperatur pertumbuhannya. Enzim dari

organisme mesofil juga memperlihatkan pola yang sama. Enzim termostabil yang tersedia di pasaran dan digunakan oleh industri masih diproduksi dari organisme mesofil, sedangkan enzim komersial dari organisme termofil masih jarang (Illianes,1999).

Lipase (Triasilgliserol hidrolase, EC 3.1.1.3) adalah enzim yang secara alami mengkatalis hidrolisis triasilgliserol (lemak/minyak) menjadi asam-asam lemak, monoasilgliserol, diasilgliserol dan gliserol. Lipase termostabil dapat diperoleh dari mikroorganisme termofil. Lipase termostabil mempunyai peran yang sangat penting dalam bidang bioteknologi dan industri. Lipase mempunyai kestabilan yang tinggi dalam media organik dan temperatur tinggi serta mampu mengkatalis reaksi berbagai ester sintetik dan senyawa organik lain.

Lipase dapat dimanfaatkan sebagai biokatalis dalam produksi senyawa-senyawa biodegradable yang bermanfaat, misalnya 2-etil-1-heksil ester yang diperoleh dengan transesterifikasi enzimatik dari asam lemak *rapeseed oil*. 1-butil oleat yang digunakan untuk menurunkan viskositas biodiesel diperoleh dari esterifikasi langsung butanol dan asam oleat (Linko *et al.*,1998). Lipase termostabil berperan dalam sintesis biopolimer, biodiesel, dan juga digunakan dalam proses produksi industri farmasi, agrokimia, kosmetik, *flavour*, aditif makanan, pestisida, biosurfaktan, dan deterjen (Rhee *et al.*, 2004)

Salah satu aspek yang harus diperhatikan dalam memproduksi enzim dari mikroorganisme adalah sumber nutrisi yang sesuai bagi pertumbuhannya. Dalam pertumbuhan, karbon merupakan salah satu nutrisi penting yang dibutuhkan oleh mikroorganisme. Peran karbon adalah sebagai sumber energi melalui proses

oksidasi dan menyediakan komponen struktural bagi dinding sel (Schlegel dan Schmidt,1996).

Lee, *et al*, (1999) telah berhasil memproduksi lipase termostabil dari *Bacillus thermoleovorans* ID-1 yang diisolasi dari beberapa gunung berapi di Indonesia. Sumber karbon yang digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme penghasil lipase adalah berbagai senyawa lipid seperti *olive oil*, *soybean oil*, *mineral oil*, *triolein*, *trybutyrin* dan pengemulsi (*Tween* 20 dan 40). Aktivitas lipolitik tertinggi sebesar 520 UL⁻¹ dihasilkan dengan *olive oil* (1,5 %,w/v) sebagai sumber karbon.

Gupta, *et al*, (2004) telah memproduksi lipase termostabil dari *Bacillus sp* pada beberapa medium pertumbuhan yang mengandung induser yang berbeda-beda yaitu: gula, gula alkohol, galaktosa, gliserol dan manitol. Hasil dari penelitian tersebut adalah komposisi dari medium pertumbuhan yang optimal adalah dengan gliserol 1 % yang menghasilkan enzim lipase sebesar 62 UmL⁻¹

Dengan semakin meningkatnya ketertarikan penggunaan lipase termostabil, maka perlu dilakukan penelitian untuk mendapatkan sumber-sumber lipase termostabil baru yang mempunyai aktivitas tinggi. Pada penelitian ini akan dilakukan isolasi mikroba termofilik penghasil lipase dari lokasi yang panas yaitu di sekitar reaktor pabrik minyak goreng. Setelah didapatkan isolat termofilik lipolitik, dipilih satu isolat untuk penelitian selanjutnya. Sumber karbon yang digunakan dalam penelitian ini adalah asam oleat, minyak goreng, gliserol, dan glukosa. Pemilihan asam oleat, minyak goreng dan gliserol sebagai sumber karbon didasarkan pada fungsinya selain sebagai sumber karbon juga berfungsi

sebagai induser, sedangkan glukosa merupakan sumber karbon yang umumnya sangat baik untuk pertumbuhan mikroorganisme. Dengan mengetahui profil pertumbuhan dan aktivitas lipolitik ekstrak kasar lipase yang dihasilkan oleh isolat dalam media dengan sumber karbon berbeda, dapat diketahui sumber karbon yang sesuai untuk memproduksi lipase.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan di atas, maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. bagaimana profil pertumbuhan isolat lipolitik termofilik dari lokasi sekitar reaktor pabrik minyak goreng pada beberapa media dengan sumber karbon yang berbeda?
2. bagaimana pengaruh sumber karbon terhadap aktivitas lipase yang diproduksi oleh isolat lipolitik termofilik dari lokasi sekitar reaktor pabrik minyak goreng?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

1. mengetahui profil pertumbuhan isolat lipolitik termofilik dari lokasi sekitar pabrik minyak goreng pada beberapa media dengan sumber karbon yang berbeda.

2. mengetahui pengaruh sumber karbon terhadap aktivitas lipase yang diproduksi oleh isolat lipolitik termofilik dari lokasi sekitar reaktor pabrik minyak goreng.

1.4 Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian ini, diharapkan dapat memberikan informasi tentang sumber karbon yang sesuai untuk produksi lipase oleh isolat termofilik dari sekitar reaktor pabrik minyak goreng.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Enzim

Di dalam setiap sel terdapat ribuan enzim yang berbeda-beda yang secara khusus mengkatalis semua kegiatan kimiawi suatu sel. Enzim adalah protein dan terkadang perlu bergabung dengan koenzim atau kofaktor untuk menjadi aktif. Enzim merupakan katalisator hayati karena enzim merupakan senyawa organik yang dihasilkan oleh sel-sel hidup. Walaupun dalam jumlah yang sangat sedikit, enzim mempunyai kemampuan unik untuk mempercepat berlangsungnya reaksi kimiawi dan setelah reaksi selesai enzim itu sendiri tidak berubah. Katalisator juga menunjukkan kespesifikan (kekhususan), artinya suatu enzim akan berfungsi hanya pada jenis reaksi tertentu saja.

Semua enzim dihasilkan dalam sel, beberapa dieksresikan melalui dinding sel dan berfungsi di luar sel. Berdasarkan lokasi eksresi enzim, maka terdapat dua tipe enzim yaitu enzim ekstraseluler (berfungsi di luar sel) dan enzim intraseluler (berfungsi di dalam sel). Fungsi utama enzim ekstraseluler adalah untuk mendegradasi nutrien di sekitarnya sehingga memungkinkan nutrien tersebut memasuki sel. Enzim intraseluler berperan mensintesis bahan seluler dan juga menguraikan nutrien untuk menyediakan energi yang dibutuhkan oleh sel. Satu molekul enzim dapat mengkatalisis perubahan 10 sampai 1000 molekul substrat per detik. Reaksi-reaksi yang dikatalisis oleh enzim sering kali berlangsung beberapa ribu sampai lebih dari satu juta kali lebih cepat dibandingkan dengan

reaksi-reaksi yang sama tetapi tidak dikatalisis oleh enzim (Pelczar dan Chan, 1986).

2.1.1 Sifat-sifat kimiawi dan fisik enzim.

Enzim dapat berupa protein murni atau gabungan antara protein dengan gugus-gugus kimia lain. Seperti halnya protein, enzim akan terdenaturasi oleh panas, terpresipitasi oleh etanol atau garam-garaman anorganik berkonsentrasi tinggi seperti amonium sulfat, dan tidak dapat melewati membran semipermeabel atau membran selektif atau dengan kata lain terdialisis. Protein enzim adalah molekul yang amat besar, berat molekulnya berkisar antara 10.000-1.000.000 Dalton (Da).

Enzim tersusun dari bagian protein yang disebut apoenzim dan molekul organik dengan berat molekul rendah dan terikat dengan ikatan kovalen pada protein enzim yang disebut koenzim. Bila kedua bagian tersebut bergabung akan membentuk enzim yang lengkap yang disebut haloenzim.

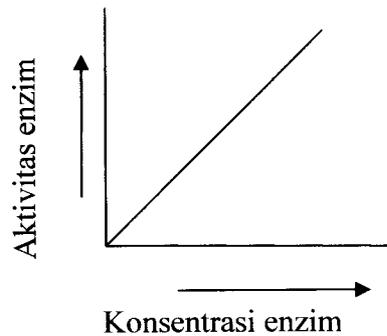
Molekul-molekul enzim sangat efisien dalam mempercepat perubahan substrat menjadi produk akhir. Sebagaimana telah dikemukakan sebelumnya, satu molekul enzim tunggal dapat melangsungkan perubahan sebanyak 1.000 molekul substrat per detik. Kemampuan ini, serta kenyataan bahwa enzim tidak mengalami perubahan, menerangkan mengapa enzim dalam jumlah amat sedikit sudah cukup bagi proses-proses selular. Namun enzim bersifat tidak stabil. Aktivasnya dapat berkurang atau hancur oleh berbagai kondisi fisik atau kimiawi.

Aktivitas enzim dapat ditentukan melalui berbagai teknik yang didasarkan pada beberapa prinsip sederhana. Untuk menguji aktivitas enzim secara kuantitatif perlu diketahui beberapa hal yang mempengaruhinya yaitu sifat reaksi yang dikatalisisnya, kofaktor atau koenzim yang dibutuhkan, konsentrasi substrat baik kofaktor atau koenzim, pH optimum, suhu optimum, dan metode analitik sederhana untuk menentukan hilangnya substrat atau munculnya produk-produk hasil reaksi (Pelczar dan Chan, 1986)

Keadaan-keadaan yang mempengaruhi aktivitas enzim antara lain: konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, pH, dan suhu (Pelczar dan Chan, 1986)

a. Konsentrasi enzim

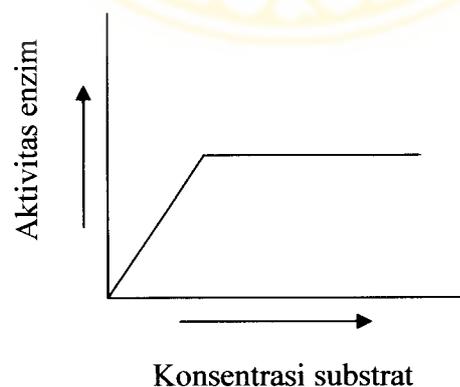
Kecepatan reaksi enzimatik secara langsung dapat dipengaruhi oleh konsentrasi enzim. Jika konsentrasi enzim lebih banyak, maka reaksi akan berlangsung lebih cepat. Jika konsentrasi enzim 2 kali lipat, maka kecepatan reaksi menjadi 2 kali lipat. Jadi banyaknya substrat yang diubah menjadi produk sesuai dengan tingginya konsentrasi enzim yang digunakan. Pada enzim yang derajat kemurniannya tinggi, terdapat hubungan linier antara konsentrasi enzim dengan aktivitas enzim. Semakin tinggi konsentrasi enzim maka aktivitas enzim semakin tinggi pula (Pelczar dan Chan 1986). Pengaruh konsentrasi enzim pada laju aktivitas enzim ditunjukkan pada gambar 2.1



Gambar 2.1 Pengaruh konsentrasi enzim terhadap laju aktivitas enzim

b. Konsentrasi substrat

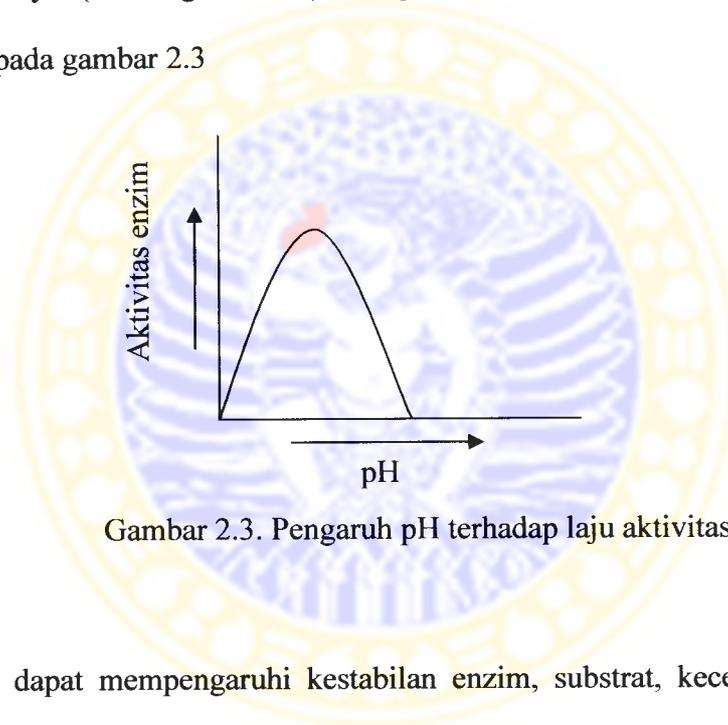
Konsentrasi substrat dapat mempengaruhi kecepatan reaksi suatu enzim. Dengan konsentrasi enzim yang tetap sedangkan konsentrasi substrat ditingkatkan pada penambahan pertama substrat, maka kecepatan reaksi akan naik dengan cepat. Akan tetapi jika konsentrasi dinaikkan terus menerus, maka tidak ada lagi penambahan kecepatan reaksi (Lehninger, 1997). Kenaikan konsentrasi substrat tidak akan berpengaruh lagi pada laju aktivitas setelah melewati konsentrasi substrat optimum (Pelczar dan Chan, 1986). Pengaruh konsentrasi substrat pada aktivitas enzim ditunjukkan pada gambar 2.2



Gambar 2.2. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap laju aktivitas enzim

c. pH

Reaksi-reaksi enzim sangat dipengaruhi oleh pH. pH optimum yaitu kondisi pH yang menyebabkan suatu reaksi mempunyai laju reaksi yang maksimum. pH yang optimum tidak selalu sama dengan pH lingkungan normalnya, dapat berada pada pH sedikit diatas atau dibawah pH optimumnya. Aktivitas katalitik didalam sel mungkin dapat diatur sebagian oleh perubahan pH pada mediumnya (Lehninger, 1997). Pengaruh pH pada laju aktivitas enzim ditunjukkan pada gambar 2.3

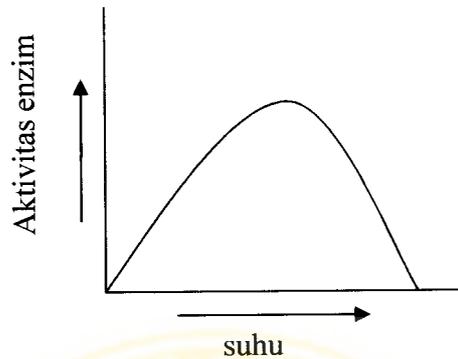


Gambar 2.3. Pengaruh pH terhadap laju aktivitas enzim

d. Suhu

Suhu dapat mempengaruhi kestabilan enzim, substrat, kecepatan reaksi dan fungsi pH. Kenaikan suhu akan menghasilkan reaksi yang lebih cepat. Pada umumnya untuk setiap kenaikan suhu 10°C menghasilkan peningkatan kecepatan 2-3 kali. Suhu optimum yaitu kondisi suhu yang menyebabkan suatu reaksi mempunyai laju reaksi yang maksimum. Sebagian besar enzim stabil pada suhu dibawah 45°C , tetapi pada suhu diatas 50°C dapat mempercepat ketidakaktifan enzim. Pada suhu $70-80^{\circ}\text{C}$ enzim akan mengalami denaturasi yang mengakibatkan

kecepatan reaksi menurun tajam (Tortora *et al.*, 2002). Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim ditunjukkan pada gambar 2.4.



Gambar 2.4. Pengaruh suhu terhadap laju aktivitas enzim

Hampir semua reaksi biokimia yang terjadi di dalam sel dikatalisis oleh enzim. Sebagai katalis, enzim mempunyai beberapa kelebihan bila dibandingkan dengan katalis kimia (anorganik). Kecepatan reaksi enzim lebih tinggi karena dapat mempercepat reaksi dengan faktor 10^6 sampai 10^{12} lebih tinggi daripada reaksi non-enzimatik. Setiap molekul enzim mampu mengubah 100 sampai 1000 molekul substrat menjadi produk per detik. Kondisi reaksi enzim lunak yaitu biasanya berlangsung pada pH mendekati netral. Spesifitas reaksi enzim tinggi, hanya dapat bereaksi dengan substrat yang spesifik dan produk yang dihasilkan juga sangat spesifik serta tidak ada produk samping. Enzim ramah terhadap lingkungan karena dapat terdegradasi secara sempurna di lingkungan (Faber, 2004).

2.1.2 Pengendalian sintesis enzim

Enzim adalah katalisator organik atau biokatalisator yang dihasilkan oleh sel. Oleh karena enzim merupakan bagian dari sel, maka semua faktor yang mempengaruhi sel akan berpengaruh pula pada enzim. Umumnya kehidupan mikroorganisme sangat dipengaruhi oleh lingkungannya terutama dalam penggunaan sumber energi, dimana mikroorganisme mempunyai sistem pengendalian metabolisme yang memungkinkan bekerja secara efisien. Hal tersebut yang mempengaruhi enzim terutama dalam biosintesis enzim.

Berdasarkan biosintesisnya, dikenal dua macam enzim yaitu: enzim konstitutif dan induktif. Enzim konstitutif adalah enzim yang selalu tersedia di dalam sel mikroba dalam jumlah yang relatif konstan. Sedangkan enzim induktif adalah enzim yang ada di dalam sel dengan jumlah yang relatif tidak tetap, tergantung pada induser. Jumlahnya akan bertambah sampai ribuan kali bahkan lebih apabila dalam media mengandung substrat yang menginduksi, terutama bila substrat penginduksi merupakan satu-satunya sumber karbon.

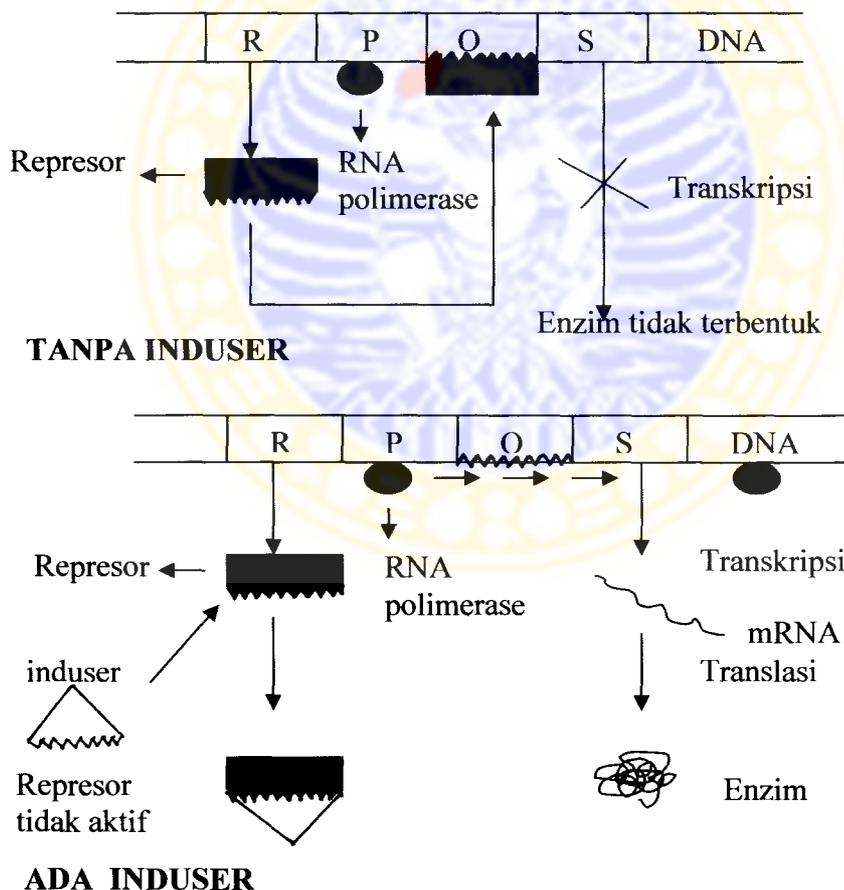
Yang berperan dalam sintesis enzim adalah DNA yang terdiri dari beberapa segmen. Tiap-tiap segmen tersebut akan membentuk beberapa struktur gen. Dikenal ada dua mekanisme dalam biosintesis enzim yaitu mekanisme induksi dan mekanisme represi. Kedua mekanisme ini dijelaskan oleh Yacob dan Monod yang dikenal dengan teori Operon. Menurut Yacob dan Monod (1961) bekerjanya enzim ditentukan oleh beberapa gen (gambar 2.5 dan 2.6).

Gen-gen tersebut terdiri dari:

- a. gen regulator(R) dapat membentuk senyawa spesifik yang bersifat represor

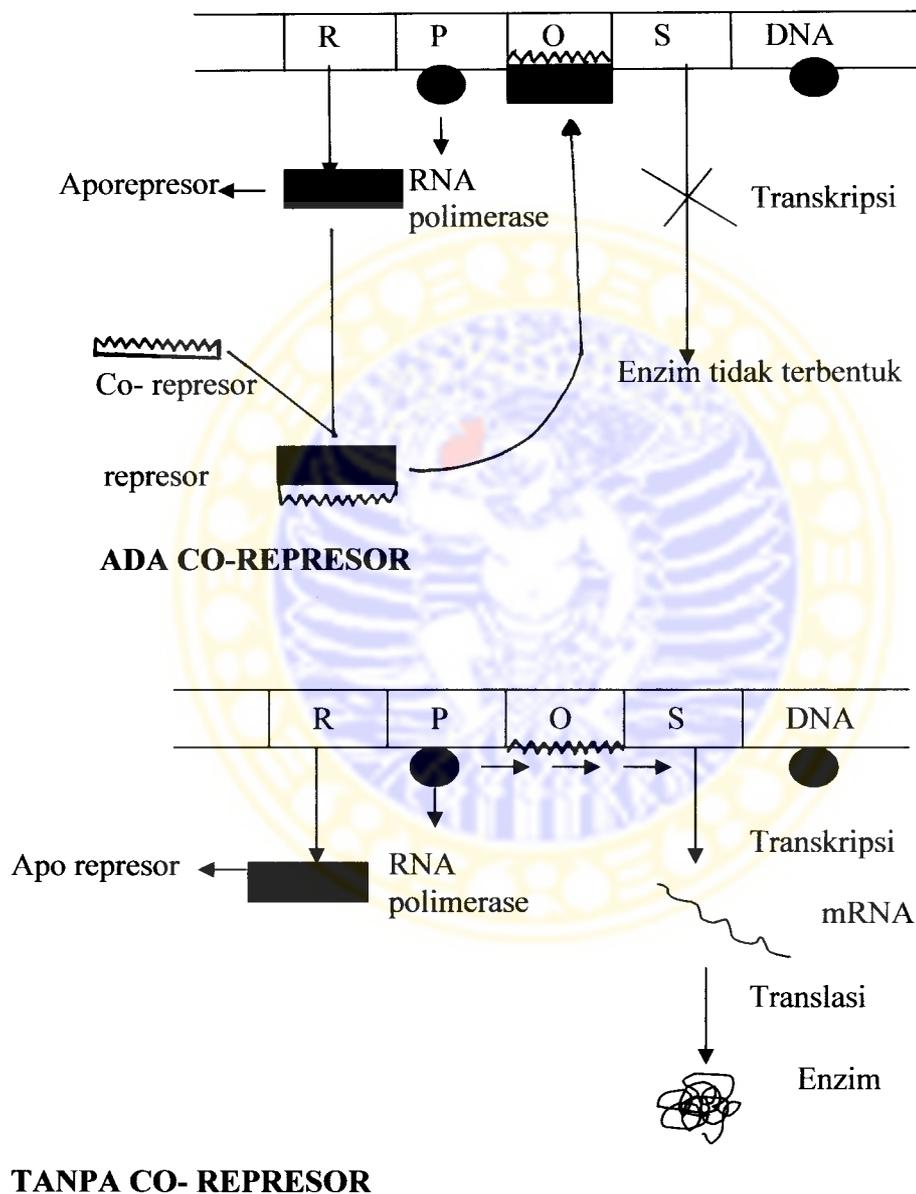
- b. gen operator (O) yang mengatur bekerja atau tidaknya gen-gen struktural
- c. gen struktural (S) yang merupakan pola untuk sintesis mRNA yang berperan dalam sintesis protein.
- d. gen promotor (P) yang merupakan tempat pengikatan RNA polimerase yaitu enzim yang mengkatalisis proses transkripsi DNA menjadi mRNA.

Mekanisme induksi terjadi apabila protein represor diikat oleh suatu induser maka mRNA polimerase dapat bergerak dari gen P ke gen S melalui gen O, sehingga terjadi transkripsi dan translasi yang menghasilkan enzim untuk metabolisme produk tertentu (gambar 2.5)



Gambar 2.5 Mekanisme induksi (Stryer, 1996)

Mekanisme represi terjadi apabila aporepresor (protein yang tidak aktif) tidak berikatan dengan gen represor, sehingga gen operator dapat memberikan sinyalnya pada gen struktural (gambar 2.6).



Gambar 2.6 Mekanisme represi (Stryer, 1996)

2.2 Enzim Termostabil

Sebagian besar definisi dari termostabil dihubungkan dengan sifat alami dari enzim dan sumber penghasil enzim. Ada yang mendefinisikan enzim termostabil sebagai enzim yang memiliki suhu aktivitas maksimum diatas suhu pertumbuhan organisme penghasilnya. Namun definisi ini tidak berlaku jika dilihat dari kenyataan ada enzim-enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang hidup pada suhu 90°C , tetapi mempunyai suhu aktivitas optimum di bawah atau di atas suhu pertumbuhannya.

Definisi lain dari enzim termostabil adalah berhubungan dengan aktivitas enzim yang masih terukur setelah enzim diinkubasi pada suhu 60°C atau lebih selama waktu tertentu. Definisi tersebut ternyata dapat berlaku untuk enzim yang bersifat termotoleran yang masih memiliki aktivitas enzim setelah pemanasan dan terukur pada kondisi suhu mesofilik.

Kestabilan enzim biasanya diukur berdasarkan waktu paruh aktivitas enzim. Waktu paruh adalah waktu reaksi aktivitas enzim yang turun hingga separuh aktivitas semula pada kondisi suhu tertentu. Nilai waktu paruh masih suatu ukuran yang relatif. Namun pada umumnya enzim termostabil sejati memiliki waktu paruh pada suhu 50°C yang jauh lebih lama dibanding enzim termolabil (tidak tahan panas) (Ng dan Kenealy,1986).

Enzim termostabil dapat diperoleh dari organisme mesofil dan termofil. Organisme termofil merupakan sumber enzim termostabil, karena proteinnya termostabil. Pada kenyataannya, enzim dari organisme termofil stabil pada

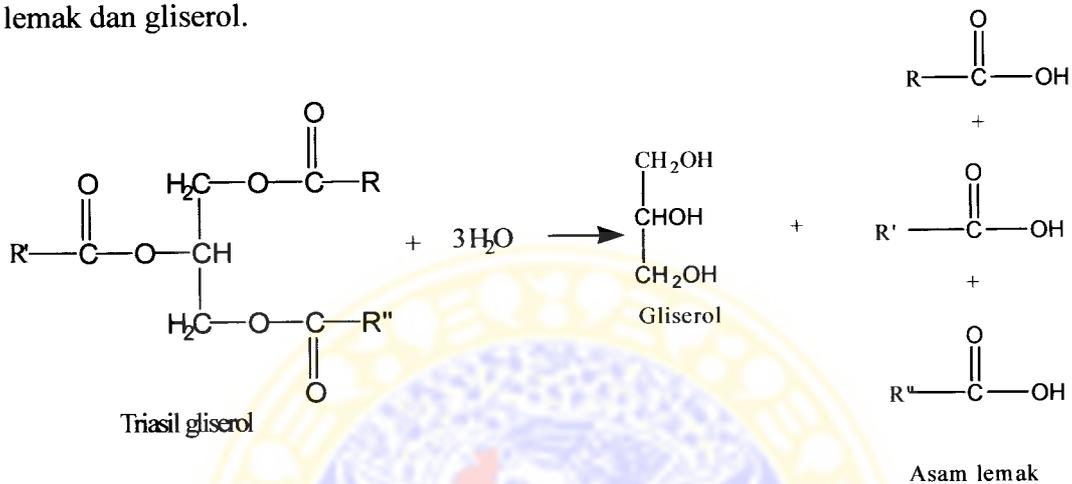
temperatur 20°C lebih tinggi dari temperatur pertumbuhannya. Enzim dari organisme mesofil juga memperlihatkan pola yang sama.

Banyak enzim termostabil dari organisme termofil yang sudah dilaporkan. Namun, enzim termostabil yang digunakan oleh industri diproduksi dari organisme mesofil, dan enzim komersial dari organisme termofil masih jarang. Beberapa enzim industri termostabil yang tersedia secara komersial berasal dari sumber organisme mesofil, organisme termofil dan gen termofil yang diklon pada inang mesofil (Ilianes, 1999)

Enzim termostabil memiliki beberapa nilai ekonomis antara lain : stabil selama penyimpanan yang akan mengurangi biaya produksi, reaksi berlangsung pada suhu tinggi sehingga akan mengurangi kontaminasi oleh bakteri mesofilik, lebih tahan terhadap pelarut, deterjen, dan senyawa denaturan, pada suhu tinggi proses fermentasi akan lebih cepat, karena reaksi enzim akan meningkat, dan pemisahan produk yang mudah menguap akan lebih cepat (Steel dan Walker, 1991)

2.3 Tinjauan Tentang Enzim Lipase

Lipase (triasilgliserol hidrolase), E.C.3.1.1.3, termasuk golongan enzim hidrolase yang secara alami mengkatalisis hidrolisis trigliserida menjadi asam lemak dan gliserol.



Gambar 2.5 Pemecahan lemak menjadi asam lemak dan gliserol dengan lipase .

Lipase merupakan enzim ekstraseluler. Lipase dapat diperoleh dari tanaman, hewan maupun mikroorganisme. Sumber enzim lipase banyak ditemukan berasal dari mikroorganisme yaitu jamur, bakteri dan yeast. Fungi penghasil lipase antara lain : *Aspergillus sp.*, *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.*, *Penicillium sp.*, *Geotrichum sp.*, *Candida sp.*, *Humicola lanuginosa*. Dari golongan bakteri yang menghasilkan lipase adalah *Pseudomonas sp.*, *Streptococcus sp.*, *Achromobacter*, *Staphylococcus*. Lipase yang berasal dari bakteri adalah glikoprotein, namun beberapa ekstraselular dari lipase adalah lipoprotein. Lipase yang dihasilkan dari beberapa jenis mikroorganisme tersebut hanya beberapa saja yang dikomersialkan yaitu *Mucor*, *Rhizopus* dan *Candida* (Crueger dan Crueger, 1984).

Menurut spesifitasnya, lipase dikategorikan menjadi tiga golongan. Golongan pertama adalah lipase tidak spesifik. Lipase ini memecah molekul asilgliserol pada posisi acak dan menghasilkan asam lemak bebas serta gliserol dengan monoasilgliserol dan diasilgliserol sebagai intermedietnya. Golongan kedua adalah lipase spesifik seperti lipase 1,3 spesifik yang mengkatalisis pelepasan asam lemak pada posisi 1 dan 3 dari rantai utama gliserol. Golongan ketiga adalah asam lemak spesifik yang merupakan bagian dari asam lemak yang terlepas dari molekul asilgliserol (Yahya *et al.*, 1998)

Substrat alami dari lipase adalah triasilgliserol yang mempunyai kelarutan yang rendah dalam air. Dibawah kondisi normal, lipase mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan interfase antara fase substrat dengan fase air dimana enzim tersebut terpisah (Saxena, R.K. *et al.*, 2005). Walaupun substrat alami lipase adalah asilgliserol, lipase mampu mengkatalisis derivat enansioselektif dari senyawa kiral dan reaksi esterifikasi, transesterifikasi, interesterifikasi. Oleh karena itu lipase banyak digunakan dalam modifikasi lemak dan minyak, sintesis senyawa organik dan bahan tambahan detergen. Aktivitas hidrolisis lipase telah dilaporkan berhubungan dengan aktivitas sintesisnya tetapi tidak berhubungan dengan aktivitas interesterifikasinya. Meskipun berasal dari sumber yang berbeda, lipase mampu mengkatalisis reaksi yang sama tetapi dapat pula berbeda aktivitasnya pada kondisi reaksi yang sama (Yahya *et al.*, 1998).

2.4 Aplikasi Enzim Lipase Dalam Industri

Lipase mempunyai peran sangat penting dalam bioteknologi karena kestabilannya yang tinggi dalam pelarut organik dan pada suhu tinggi. Oleh karena itu lipase banyak digunakan sebagai katalisator khiral untuk hidrolisis dan sintesis berbagai senyawa optis aktif dan intermediatnya (Bagi *et al.*, 1997). Berbagai senyawa ester dan obat-obatan optis aktif enansiomer tunggal telah disintesis dengan biokatalisator lipase (Yahya *et al.*, 1998). Lipase juga telah dimanfaatkan dalam produksi berbagai senyawa optis aktif enansiomer tunggal dan senyawa biodegradable yang bermanfaat, antara lain: produksi biodiesel 1-butyl oleat dan transesterifikasi asam-asam lemak dari *repeseed oil* (Linko *et al.*, 1998)

Di bidang industri penggunaan enzim lipase sangat luas. Misalnya, untuk pembuatan keju. Beberapa keju dikarakterisasi dengan kekhususan flavor yang diproduksi oleh enzim lipase secara alami terjadi di dalam susu. Dalam industri keju biasanya ditambahkan lipase dalam bentuk serbuk. Pembuatan keju dari susu yang dipasteurisasi, asam lemaknya meningkat selama proses pematangan karena susu lipase umumnya inaktivasi dan dimulai dari bakteri yang mempunyai aktivitas lipase sangat rendah. Hal inilah yang menyebabkan penambahan bubuk lipase untuk beberapa jenis keju. Dalam industri detergen, lipase terdapat dalam bentuk bubuk, cairan dan tablet. Adanya enzim lipase menyebabkan substansinya menjadi lebih hidrofilik (Gogfrey dan West, 1996).

Tabel 2.1 Aplikasi mikrobial lipase dalam beberapa industri

Industri	Efek	Produk
Pabrik roti	Memperbaiki cita rasa makanan dan menjaga keawetan makanan	Roti
Pabrik minuman	Memperbaiki aroma	Minuman
Pabrik kimia	Enansioselektif	Bahan-bahan kimia kiral
Kosmetik	Sintesis	Pelembab, emulsifier
Pabrik susu	Hidrolisis lemak susu	Flavor
Lemak dan minyak	Pembuatan keju	Keju
	Modifikasi lemak	Mentega
	Transesterifikasi	Mentega, margarin, asam lemak monogliserol dan digliserol
Pelengkap makanan	Kontrol kualitas	Mayones, whip
Makanan kesehatan	Transesterifikasi	Makanan kesehatan
Pabrik kulit	Hidrolisis	Produk kulit
Daging dan ikan	Memperbaiki cita rasa	Daging dan ikan
Pabrik kertas	Hidrolisis	Produk kertas
Farmasi	Transesterifikasi	Lemak khusus membantu pencernaan
Bahan pembersih	Hidrolisis	Produk pembersih surfaktan

Sumber : Saxena, R.K *et al.*, 2005

2.5 Uji Aktivitas Enzim Lipase

Aktivitas enzim dinyatakan sebagai laju reaksi kimia berkatalis enzim dalam mengubah substrat menjadi produk. Aktivitas enzim bergantung pada konsentrasi enzim untuk mengubah substrat menjadi produk dan keadaan lain seperti pH dan suhu (Wilbraham, Matta, 1992 *dalam* Maharani, 2003)

Aktivitas enzim sering diukur dengan mengikuti munculnya produk berwarna atau menghilangnya substrat berwarna dalam beberapa waktu. Reaksi yang melibatkan pengambilan atau pelepasan proton diikuti dengan mengatur perubahan pH larutan uji menurut waktu.

Aktivitas lipolitik enzim lipase dapat ditentukan dengan beberapa cara antara lain (Pereira-Meirelles *et al.*, 1997):

1. metode spektrofotometri

Enzim lipase direaksikan dengan larutan p-nitrofenil. Setelah diinkubasi, akan terbentuk produk berupa p-nitrofenol. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 410 nm menggunakan spektrofotometer

2. metode difusi

Prinsip metode ini adalah reaksi hidrolisis "halozone" dalam medium padat berisi substrat minyak. Aktivitas lipase ditunjukkan oleh perbandingan diameter halozone dan volume supernatan setelah diinkubasi.

3. Metode titrimetri

Prinsip metode ini adalah substrat dibuat dalam bentuk emulsi dan diberi enzim yang belum diketahui aktivitasnya, diinkubasi pada suhu dan pH optimum bagi enzim dengan substrat tertentu. Reaksi dihentikan dengan penambahan aseton : etanol (1:1). Asam lemak bebas yang terbentuk selanjutnya dititrasi dengan NaOH.

Tingkat aktivitas hampir selalu di laporkan dalam Unit Internasional (IU). Nilai IU enzim menyatakan tingkat aktivitas enzim baku yang akan mengubah sejumlah substrat menjadi produk dalam waktu tertentu, sedangkan satu IU didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang mengkatalisis perubahan 1 mikromol substrat per menit pada keadaan reaksi tertentu.

2.6 Kurva Pertumbuhan

Pertumbuhan bakteri sering disamakan dengan produksi sel. Bakteri bereproduksi dengan pembelahan barrier yang menghasilkan dua kali populasi. Pertumbuhan bakteri terjadi secara eksponensial dengan laju peningkatan tergantung dari doubling time. Secara umum pertumbuhan didefinisikan sebagai kenaikan yang konstan dari semua komponen kimia mikroorganisme yang menyebabkan penambahan ukuran diikuti dengan pembelahan sel. Pertumbuhan mikroorganisme dalam suatu kultur dapat digambarkan dalam kurva pertumbuhan dengan berbagai fase. Fase-fase pertumbuhan mikroorganisme yang diamati antara lain (Fardiaz, 1992) :

a. Fase adaptasi

Apabila jasad renik dipindahkan dalam suatu medium, mula-mula akan mengalami fase adaptasi untuk menyesuaikan substrat dan kondisi lingkungan disekitarnya. Lamanya fase ini bervariasi, dapat cepat atau lambat bergantung pada kecepatan penyesuaian dengan lingkungan sekitarnya. Lamanya faktor adaptasi bergantung pada beberapa faktor, antara lain:

1. medium dan lingkungan pertumbuhan

Sel yang ditempatkan dalam medium dan lingkungan pertumbuhan sama dengan medium dan lingkungan sebelumnya mungkin tidak perlu waktu adaptasi tetapi, jika nutrisi yang tersedia dan kondisi lingkungan yang baru sangat berbeda dengan sebelumnya, diperlukan waktu penyesuaian untuk mensintesis enzim-enzim yang dibutuhkan untuk metabolisme.

2. jumlah inokulum

Jumlah awal sel semakin tinggi akan mempercepat fase adaptasi. Fase adaptasi makin berjalan lambat karena berbagai sebab misalnya: kultur dipindahkan dari medium yang kaya akan nutrisi ke medium yang kandungan nutrisinya terbatas, mutan baru terbentuk dan menyesuaikan diri dengan lingkungan, dan kultur yang dipindahkan dari fase statis ke medium baru dengan komposisi yang sama seperti sebelumnya.

b. Fase pertumbuhan awal

Pada fase ini sel akan membelah dengan kecepatan yang masih rendah karena baru selesai tahap penyesuaian.



c. Fase pertumbuhan logaritmik

Pada fase ini jasad renik akan membelah dengan cepat dan konstan. Kecepatan pertumbuhannya sangat dipengaruhi oleh medium pertumbuhannya seperti pH dan kandungan nutrisi juga kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembaban udara. Pada fase ini sel membutuhkan energi lebih banyak dibandingkan dengan fase lainnya, selain itu sel-sel paling sensitif terhadap keadaan lingkungan .

d. Fase pertumbuhan lambat

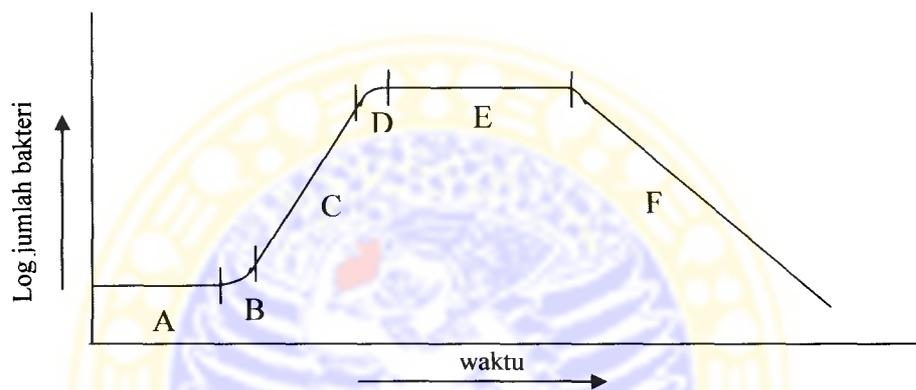
Pada fase ini pertumbuhan jasad renik diperlambat karena beberapa faktor misalnya: zat nutrisi didalam medium sudah sangat berkurang dan adanya hasil metabolisme yang makin beracun atau dapat menghambat jasad renik. Pada fase ini pertumbuhan sel tidak stabil tetapi jumlah populasi masih naik karena jumlah sel yang tumbuh masih lebih banyak daripada jumlah sel yang mati.

e. Fase pertumbuhan statis

Pada fase ini jumlah populasi sel tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Ukuran sel pada fase ini menjadi lebih kecil karena sel tetap membelah meskipun zat atau nutrisi mulai habis. Sel kemungkinan mempunyai komposisi berbeda dengan sel yang tumbuh pada fase logaritmik. Pada fase ini sel-sel menjadi lebih tahan terhadap keadaan ekstrim seperti panas, dingin, radiasi dan bahan kimia.

f. Fase menuju kematian dan kematian

Pada fase ini sebagian populasi jasad renik mengalami kematian karena beberapa sebab yaitu nutrisi didalam medium sudah habis dan energi cadangan didalam sel juga sudah habis. Jumlah sel semakin lama semakin sedikit dan kecepatan kematian dipengaruhi oleh kondisi nutrisi, lingkungan dan jasad renik.



Gambar 2.6 Kurva pertumbuhan (Fardiaz, 1992) :

(A) fase adaptasi, (B) fase pertumbuhan awal, (C) fase logaritmik,
(D) fase pertumbuhan lambat, (E) fase statis, (F) fase menuju kematian

2.7 Nutrisi Dalam Pertumbuhan Mikroba

Nutrisi adalah segala substansi yang jika diberikan kepada organisme hidup akan digunakan sebagai sumber energi untuk berbagai proses fisiologi dan bahan untuk mensintesis berbagai materi yang dibutuhkan. Dalam pertumbuhannya, mikroba membutuhkan zat-zat nutrisi untuk sintesa komponen sel dan menghasilkan energi (Frobisher, 1962). Mikroba bervariasi dalam kebutuhannya akan nutrisi. Komposisi kimia sel mikroba secara umum menunjukkan kebutuhan mikroba akan zat nutrisi (Fardiaz, 1998)

Unsur C, O, N, H, P, dan S menyusun 96% dari berat kering sel. Unsur C, H, O, N dalam proses metabolisme berfungsi sebagai komponen utama materi sel. Sumber karbon (C) berasal dari CO_2 dan senyawa organik. Sumber hidrogen (H) berasal dari H_2 , H_2O , dan senyawa organik. Sumber oksigen (O) berasal dari O_2 , H_2O , CO , dan senyawa organik. Sumber nitrogen (N) berasal dari NH_4^+ , NO_3^- , N_2 , dan senyawa organik (Gross, *et al.*, 1996)

Semua organisme hidup membutuhkan karbon, sedikitnya sejumlah kecil karbon dioksida, tetapi kebanyakan di antaranya juga membutuhkan beberapa senyawa karbon organik, seperti gula-gulaan dan karbohidrat lain (Pelczar dan Chan 1986). Peran karbon adalah sebagai sumber energi melalui proses oksidasi dan menyediakan komponen struktural bagi dinding sel. Sumber nitrogen dalam pertumbuhan sangat dibutuhkan untuk sintesa asam amino, asam nukleat, dan koenzim (Volk, 1992).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga Surabaya pada bulan Maret – Mei 2006.

3.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan sebagai sumber mikroba berupa tetesan minyak goreng yang memadat berwarna hitam di sekitar reaktor pengolah CPO yang bersuhu 65° C pada pabrik minyak goreng di Surabaya.

3.3 Bahan dan Alat Penelitian

3.3.1 Bahan penelitian

Bahan-bahan kimia yang digunakan mempunyai derajat kemurnian pro analisis (p.a), kecuali bila disebutkan lain. Bahan-bahan tersebut meliputi : bakto agar, ekstrak ragi, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaCl, NaOH, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$, minyak goreng, asam oleat, gliserol, glukosa, Rhodamin-B, enzim lipase komersial dari *Candida rugosa*, *p*-nitrofenil palmitat, dan *p*-nitrofenol.

3.3.2 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *autoclave* (Ogawa Seiki, CO, LTD. Osk 6508) , *laminar flow cabinet*, sentrifuge dingin (Beckman model

TJ-6), *shaker incubator* (Heidolph Unimax 1010, Inkubator 1000), *water bath* (Sanyo Rikogaku-kikai), oven (Isotemp* oven model 655F), *spektrofotometer UV-VIS* (Shimadzu UV-1700), pH meter (Metrohm 744) serta alat-alat gelas lain yang lazim digunakan pada laboratorium mikrobiologi dan biokimia.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembiakan dan isolasi mikroba termofilik

3.4.1.1 Pembuatan media untuk isolasi mikroba termofilik

Komposisi media cair (setiap 100 mL) untuk pembiakan dan isolasi mikroba adalah: ekstrak ragi 0,2 gram, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,025 gram, NaCl 0,23 gram, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 gram. Semua bahan dilarutkan dalam 100 mL aquades kemudian disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu $121^\circ C$ selama 20 menit. Medium padat dibuat dengan komposisi yang sama dengan medium cair tetapi ditambahkan 2 gram agar bakto. Setelah disterilisasi, media dituang ke dalam cawan petri secara aseptis di ruang *laminar flow cabinet*.

3.4.1.2 Pembiakan dan isolasi kultur murni mikroba termofilik

Satu mata ose sampel diinokulasikan ke dalam Erlenmeyer 100 mL yang berisi 20 mL media cair, kemudian diinkubasi dengan *shaker incubator* pada suhu $55^\circ C$, 170 rpm hingga media terlihat keruh. Selanjutnya suspensi yang terbentuk diinokulasikan pada media padat dan diinkubasi pada suhu $55^\circ C$. Mikroba yang tumbuh merupakan isolat mikroba termofilik. Selanjutnya dilakukan pemurnian dengan metode cawan gores hingga diperoleh koloni tunggal (kultur murni).

Kultur murni yang diperoleh dipindahkan secara aseptis ke media padat baru dan diinkubasi pada suhu 55° C.

3.4.2 Skrining mikroba lipolitik termofilik

3.4.2.1 Pembuatan media untuk skrining

Komposisi media cair (setiap 100 mL) untuk pembiakan kultur murni adalah sebagai berikut: ekstrak ragi 0,2 gram, MgCl₂.6H₂O 0,025 gram, NaCl 0,23 gram, Na₂HPO₄ .7H₂O 0,5 gram, minyak goreng 1% v/v. Semua bahan dilarutkan dalam 100 mL aquades kemudian disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121° C, selama 20 menit. Medium padat dibuat dengan komposisi yang sama dengan medium cair tetapi ditambahkan 2 gram agar bakto. Setelah disterilisasi, media dituang ke dalam cawan petri secara aseptis di ruang *laminar flow cabinet*.

3.4.2.2 Pembuatan larutan rhodamin B 0,1 % (b/v)

Larutan rhodamin B 0,1 % yang digunakan untuk uji kualitatif aktivitas lipolitik bakteri dibuat dengan cara menimbang rhodamin B sebanyak 0,01 gram dilarutkan dalam 10 mL aquades.

3.4.2.3 Pembuatan media uji pendahuluan aktivitas lipolitik (Hou& Johnson termodifikasi, 1992)

Komposisi media uji (*rhodamine-B agar plate*) terdiri atas komposisi media padat, minyak goreng dan rhodamin B. Ke dalam 20 mL media agar ditambahkan 0,6 mL (3%) minyak goreng dan 0,04 mL rhodamine B 0,1% dalam H₂O yang telah disteril. Campuran kemudian di sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121° C selama 20 menit, kemudian campuran didinginkan sambil dikocok kuat-kuat agar terbentuk emulsi. Setelah agak dingin campuran dituang secara aseptik ke dalam cawan petri dan dibiarkan sampai terbentuk media padat.

3.4.2.4 Skrining isolat mikroba lipolitik termofilik

Kultur isolat termofilik yang berhasil diisolasi ditumbuhkan dalam media cair dan diinkubasi dengan *shaker incubator* pada suhu 55° C dan penggoyangan 170 rpm hingga medium kultur keruh. Untuk selanjutnya ditumbuhkan pada media padat. Untuk uji aktivitas lipolitik, kultur isolat pada media padat diinokulasikan sebagai spot kecil pada medium uji (*rhodamine-B agar plate*) dan diinkubasi pada suhu 55° C. Aktivitas lipase diidentifikasi sebagai *orange fluorescent halo* setelah 48 jam inkubasi.

3.4.3 Pembuatan kurva pertumbuhan isolat termofilik pada beberapa sumber karbon.

Untuk mengetahui pertumbuhan isolat selama kultivasi, disiapkan 4 buah labu Erlenmeyer 250 mL yang masing-masing berisi 50 mL media cair dengan (1% v/v) sumber karbon yang berbeda yaitu: asam oleat, minyak goreng, gliserol, dan glukosa kemudian ditambahkan 1 % suspensi sel. Untuk mengetahui pertumbuhan bakteri, kultivasi dilakukan selama 24 jam (hingga nilai OD menurun). Pertumbuhan isolat diamati dengan mengukur densitas optiknya (OD) setiap 2 jam dengan spektrofotometer UV/Vis pada $\lambda = 600$ nm. Data yang diperoleh kemudian dibuat kurva pertumbuhan mikroba antara densitas optik dengan waktu kultivasi. Dari kurva pertumbuhan ini dapat diketahui waktu inkubasi optimal mikroba untuk mencapai akhir fase logaritmik atau fase stasioner awal yang selanjutnya digunakan sebagai acuan waktu inkubasi pada kultur perlakuan atau waktu untuk pembuatan inokulum.

3.4.4 Pembuatan larutan buffer fosfat pH 7,0

Larutan stok A (0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) dibuat dengan cara menimbang 13,4015 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kemudian dilarutkan dalam aquades hingga 250 mL. Larutan stok B (0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) dibuat dengan cara menimbang 6,8995 gram $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ kemudian dilarutkan dalam aquades hingga 250 mL. Larutan buffer fosfat pH 7,0 250 mL dibuat dengan cara mencampur 61% larutan A yaitu sebanyak 152,5 mL dan 39,0% larutan B sebanyak 97,5 mL. Selanjutnya diukur pHnya dengan pH meter. Jika pH terukur kurang dari 7 maka ditambahkan sedikit-demi sedikit larutan NaOH 0,1 N hingga pH 7,0.

3.4.5 Pembuatan larutan NaOH 0,1 N

Larutan NaOH 0,1 N dibuat dengan cara menimbang NaOH sebanyak 0,2 gram kemudian dilarutkan dalam aquades hingga volume 50 mL.

3.4.6 Pembuatan larutan p-nitrofenil palmitat 0,504 mM

Menimbang 19,026 mg p-nitrofenil palmitat kemudian dilarutkan dalam sedikit buffer fosfat pH 7,0 (suhu 60°C) dalam gelas beker kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan ditambahkan larutan buffer fosfat pH 7,0 (suhu 60°C) hingga tanda batas.

3.4.7 Pembuatan larutan p-nitrofenol

Larutan p-nitrofenol 10 mM dibuat dengan cara menimbang sebanyak 0,014 gram p-nitrofenol dilarutkan dengan sedikit buffer fosfat pH 7,0 dalam gelas beker kemudian secara kuantitatif dipindah ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan dengan buffer fosfat hingga tanda batas. Standar p-nitrofenol dibuat

pada variasi konsentrasi 0,0125; 0,025; 0,0375; 0,050 dan 0,0625 mM dari stok p-nitrofenol 10 mM diencerkan dalam pelarut buffer fosfat pH 7,0.

3.4.8 Pembuatan inokulum

Inokulum dibuat dengan cara menginokulasikan satu mata ose biakan bakteri pada masing-masing media cair 20 mL dengan sumber karbon yang berbeda, kemudian diinkubasi pada suhu 55° C dengan pengocokan 170 rpm selama waktu inkubasi optimal dari kurva pertumbuhan. Selanjutnya, suspensi sel yang merupakan inokulum aktif diukur absorbansinya untuk mendapatkan OD standart dalam produksi enzim.

3.4.9 Produksi ekstrak kasar lipase termostabil dari beberapa sumber karbon

Produksi lipase termostabil dilakukan dalam 4 Erlenmeyer 250 ml yang berisi masing-masing 50 mL media cair, 5 mL suspensi sel dengan OD 0,01 dan 1 % sumber karbon yang berbeda (asam oleat, gliserol, minyak goreng dan glukosa). Kultivasi dilakukan pada suhu 55° C dengan pengocokan 170 rpm. Setiap interval 2 jam, medium kultur dari masing-masing labu Erlenmeyer diambil 1 mL. Supernatan dipisahkan dari biomassa selnya dengan sentrifugasi pada 10.000 rpm, suhu 4°C selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan enzim ekstraseluler, selanjutnya ditentukan aktivitas lipolitiknya dengan substrat p-nitrofenil palmitat (p-NPP) (prosedur 3.4.10).

3.4.10 Penentuan aktivitas lipolitik ekstrak kasar lipase termostabil

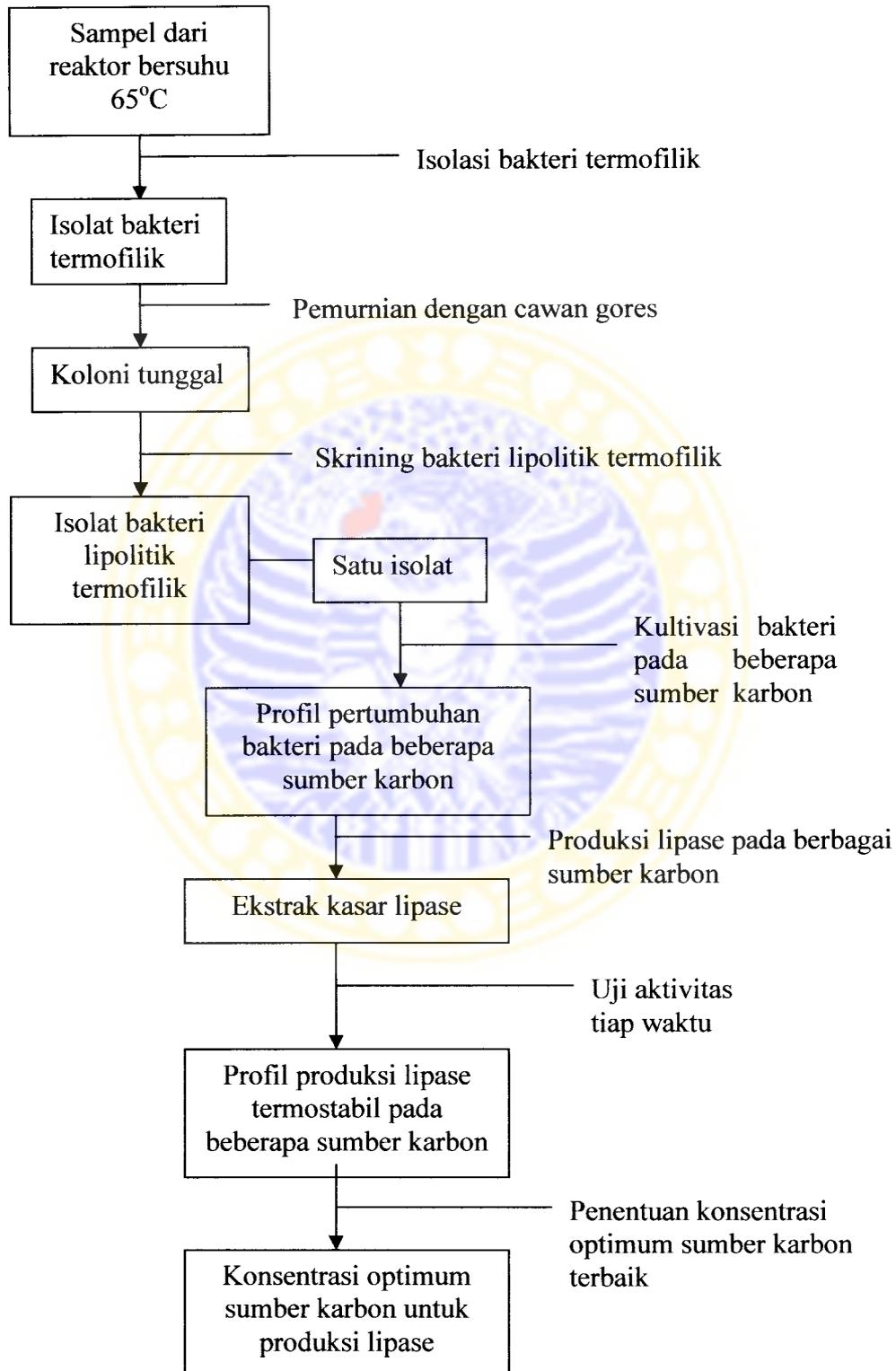
Dalam *ependorf* dimasukkan sebanyak 0,3 mL ekstrak kasar enzim (supernatan) dan 0,7 mL larutan (p-NPP). Campuran diinkubasi pada waterbat bersuhu 60°C selama 1 jam. P-nitrofenol yang terbentuk diukur dengan

spektrofotometer pada $\lambda = 410 \text{ nm}$. Sebagai kontrol digunakan 0,3 mL ekstrak kasar lipase yang telah dinonaktifkan dengan cara dipanaskan pada suhu 100°C selama 1 jam kemudian diperlakukan sama seperti sampel. Satu unit (U) aktivitas lipase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan $1 \mu\text{mol}$ produk per jam.

3.4.11 Penentuan konsentrasi sumber karbon optimum pada produksi lipase

Disediakan 5 buah Erlenmeyer 100 mL masing-masing berisi 20 mL media cair secara berurutan kedalam media tersebut ditambahkan sumber karbon terbaik dengan variasi konsentrasi 0 %, 1%, 2%, 3%, dan 4% (v/v). Setelah disterilkan dengan autoklaf, kedalam masing-masing media ditambahkan 10 % inokulum aktif lalu diinkubasi dengan penggoyangan 170 rpm pada suhu 55°C selama waktu inkubasi optimum dari sumber karbon terbaik (prosedur 3.4.9). Selanjutnya sel dipisahkan dengan sentrifugasi dingin pada 1000 rpm selama 20 menit. Selanjutnya ekstrak kasar lipase yang dihasilkan diuji aktivitas lipolitiknya (prosedur 3.4.10)

3.5. Diagram Alir Penelitian



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

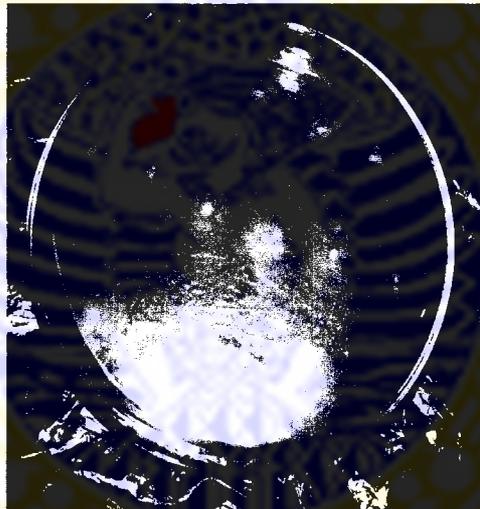
4.1 Isolasi Bakteri Termofilik Penghasil Lipase

Lipase merupakan enzim ekstraseluler artinya enzim tersebut diekspresikan melalui dinding sel dan dapat berfungsi di luar sel. Lipase termostabil dapat diperoleh dari mikroorganisme termofilik yaitu mikroorganisme yang tumbuh pada temperatur 45° - 80°C (Waluyo, 2004). Untuk mendapatkan lipase termostabil dalam penelitian ini dilakukan isolasi mikroorganisme dari lokasi sekitar reaktor pengolah CPO yang bersuhu 65°C pada pabrik minyak goreng Surabaya. Sampel awal sebagai sumber mikroorganisme berupa tetesan minyak yang memadat dan berwarna hitam. Pemilihan lokasi sumber mikroorganisme ini berdasarkan asumsi bahwa mikroorganisme yang terdapat di sekitar lokasi tersebut adalah termofilik. Selain itu, mikroorganisme tersebut juga mempunyai aktivitas lipolitik karena hidup di lingkungan yang mengandung minyak atau lipid dan memanfaatkan lipid sebagai sumber karbon bagi metabolismanya.

Sampel dalam media cair diinkubasi pada suhu 55°C dengan penggoyangan 170 rpm selama 16 - 18 jam menjadi keruh. Perubahan menjadi keruh tersebut menunjukkan bahwa terdapat mikroorganisme yang tumbuh. Hal ini terbukti setelah suspensi diinokulasikan pada media agar dan diinkubasi pada suhu 55°C terdapat mikroorganisme yang tumbuh. Mikroorganisme yang tumbuh setelah penginkubasian pada suhu 55°C tersebut merupakan mikroorganisme

termofilik. Mikroorganisme termofilik mempunyai temperatur optimum pada 55°-65°C (Waluyo, 2004)

Untuk mendapatkan biakan murni dilakukan metode cawan gores secara berulang. Metode ini didasarkan pada prinsip pengenceran mikroorganisme. Penggoresan pada media padat menghasilkan koloni-koloni yang terpisah (koloni tunggal). Selanjutnya dipilih 14 isolat (gambar 4.1) yang menunjukkan pertumbuhan yang paling baik subur untuk diuji pendahuluan aktivitas lipolitik dengan metode *rhodamine B agar plate*.

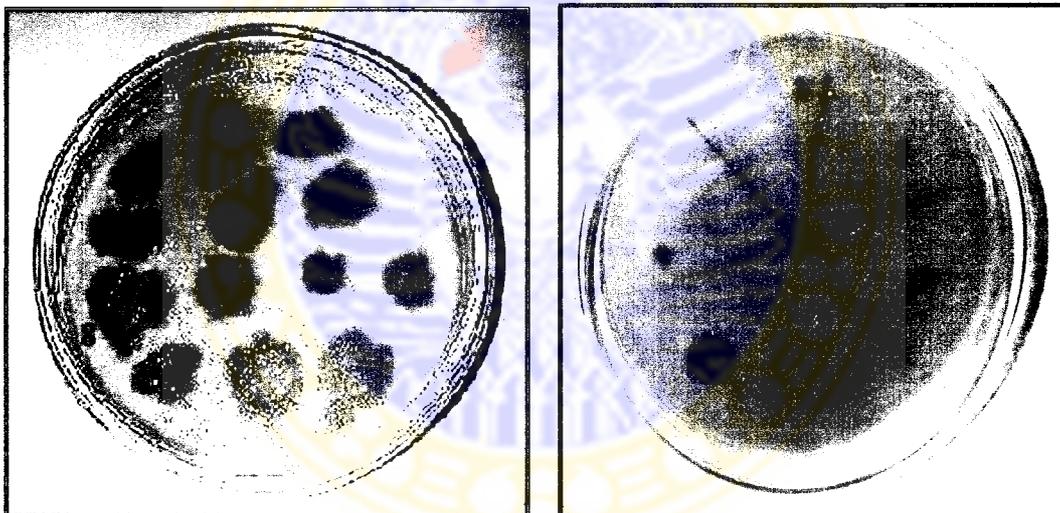


Gambar 4.1 Mikroorganisme termofilik hasil isolasi dari sekitar reaktor pabrik minyak goreng

4.2 Uji Pendahuluan Aktivitas Lipolitik

Hasil uji pendahuluan dengan metode *rhodamine B agar plate* menunjukkan bahwa ke-14 isolat termofilik mempunyai aktivitas lipolitik (gambar 4.2). Adanya aktivitas lipolitik ditandai dengan terbentuknya warna merah muda di sekitar koloni mikroba. Intensitas warna merah muda lebih kuat

pada bagian tepi dan adanya halo tidak teramati pada medium uji. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh aktivitas lipase yang dihasilkan isolat sangat kecil. Warna yang lebih bening atau lebih memudar pada koloni menunjukkan bahwa koloni tersebut mempunyai aktivitas menghidrolisis minyak atau lipid pada media *agar plate*. Dengan demikian semakin besar diameter daerah bening yang terbentuk semakin besar aktivitas lipolitiknya (Jonhston dan Hou, 1992). Kontrol dengan lipase komersial dari *Candida rugosa* pada medium menunjukkan warna yang hampir sama. Sebagai sumber enzim dalam penelitian selanjutnya, dipilih isolat nomer 8 yang menunjukkan aktivitas terbesar dan diberi nama isolat L-08.



(A) isolat dari pabrik minyak goreng

(B) Lipase dari *Candida rugosa*

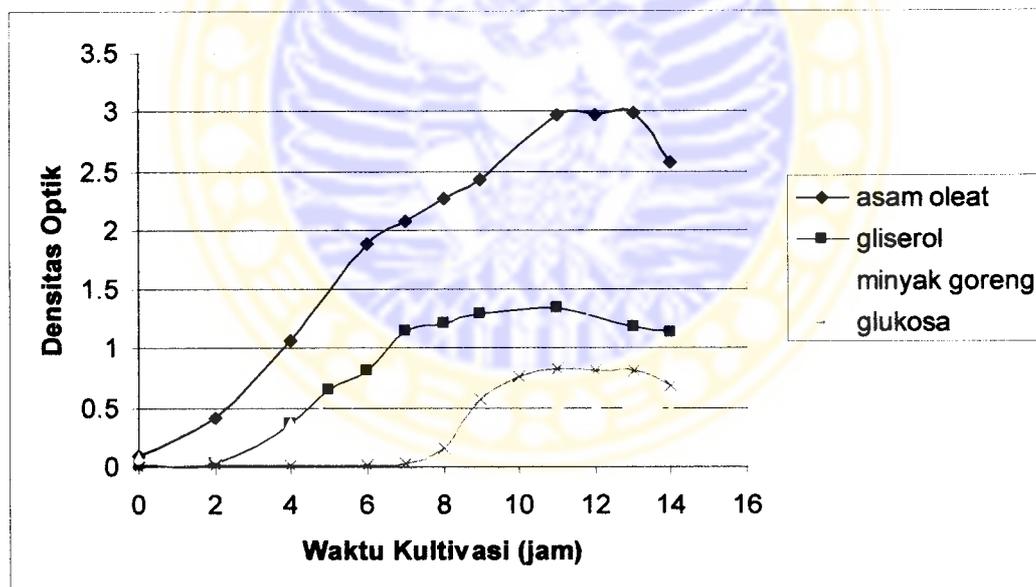
Gambar 4.2 Aktivitas lipase dari isolat pabrik minyak goreng pada *rhodamine B agar plate*

4.3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Isolat Lipolitik Termofilik

Semua mikroorganismenya membutuhkan nutrisi untuk proses metabolismenya seperti karbon, nitrogen, fosfor, mineral serta vitamin-vitamin

yang lain. Namun tiap mikroorganisme hidup mempunyai persyaratan nutrisi yang bersifat khusus. Komposisi media dengan sumber karbon yang sesuai akan dapat mengoptimalkan pertumbuhan sel mikroorganisme (Schegel dan Schmidt, 1996).

Pembuatan profil pertumbuhan isolat L-08 pada beberapa media dengan sumber karbon yang berbeda bertujuan untuk mengetahui pengaruh sumber karbon terhadap pertumbuhan isolat. Sumber karbon yang digunakan dalam masing-masing media pertumbuhan adalah asam oleat, gliserol, minyak goreng dan glukosa. Profil pertumbuhan isolat pada media dengan sumber karbon berbeda dapat dilihat pada gambar 4.3



Gambar 4.3 Profil pertumbuhan isolat L-08 dalam media dengan beberapa sumber karbon

Berdasarkan profil pertumbuhan tersebut diketahui bahwa isolat menunjukkan pola pertumbuhan yang berbeda pada media dengan sumber karbon yang berbeda. Pada media dengan sumber karbon asam oleat, fase adaptasi (*lag*

fase) terjadi dalam waktu yang sangat singkat, ini menunjukkan bahwa isolat sangat cepat menyesuaikan diri dengan substrat dan kondisi lingkungan di sekitarnya. Selanjutnya fase logaritmik yaitu fase pertumbuhan sel dengan kecepatan tinggi berlangsung pada jam ke-2 sampai jam ke-11. Kultivasi dihentikan pada saat pertumbuhan isolat telah melewati fase stasioner yaitu pada jam ke-11 sampai jam ke-13. Pada jam ke-14 sel menuju fase kematian yang ditunjukkan dengan menurunnya nilai densitas optik.

Pola pertumbuhan isolat pada media dengan sumber karbon gliserol menunjukkan bahwa fase adaptasi terjadi dalam waktu yang juga cepat yaitu pada jam ke-0 sampai jam ke-2. Fase logaritmik berlangsung setelah jam ke-2 hingga jam ke-8 dan mencapai fase stasioner hingga jam ke-11. Sel mengalami fase kematian pada jam ke-13.

Profil pertumbuhan pada media dengan sumber karbon minyak goreng, fase adaptasi terjadi hingga jam ke-2 waktu kultivasi, dilanjutkan dengan fase logaritmik sampai jam ke-6 kultivasi. Kemudian densitas optik mengalami penurunan pada jam ke-10 kultivasi.

Pertumbuhan isolat pada media dengan sumber karbon glukosa menunjukkan bahwa isolat memerlukan waktu adaptasi yang lebih lama terhadap substrat hingga jam ke-6 kultivasi. Selanjutnya isolat mengalami pertumbuhan yang sangat cepat hingga jam ke-10 kultivasi. Kemudian densitas optik menurun pada jam ke-14 menunjukkan sel mulai mengalami kematian.

Profil pertumbuhan isolat dalam media dengan sumber karbon asam oleat, gliserol, minyak goreng menunjukkan persamaan. Pada ketiga media yang

mengandung sumber karbon dari senyawa sejenis lipid tersebut menunjukkan fase adaptasi yang singkat. Hal ini kemungkinan disebabkan sumber karbon dalam media pertumbuhan sama dengan kondisi lingkungan asal mikroba sehingga sel isolat mudah beradaptasi terhadap media ini (Fardiaz, 1992). Sedangkan pada media dengan sumber karbon glukosa menunjukkan pola pertumbuhan dengan fase adaptasi yang lebih lama. Pada umumnya glukosa merupakan sumber karbon yang terbaik bagi pertumbuhan mikroorganisme, tetapi karena lingkungan asal mikroba mengandung banyak lipid, maka dengan ditumbuhkan isolat pada media yang hanya mengandung sumber karbon glukosa menyebabkan pertumbuhan isolat yang tidak baik (Budiyanto, 2002).

Secara kuantitatif, profil pertumbuhan isolat yang terbaik adalah pada media dengan sumber karbon asam oleat karena menunjukkan nilai OD yang tertinggi. Tetapi belum dapat disimpulkan bahwa nilai OD tertinggi akan menghasilkan lipase dengan aktivitas tertinggi. Oleh karena itu selanjutnya akan diproduksi lipase pada beberapa sumber karbon untuk diketahui aktivitas lipolitiknya.

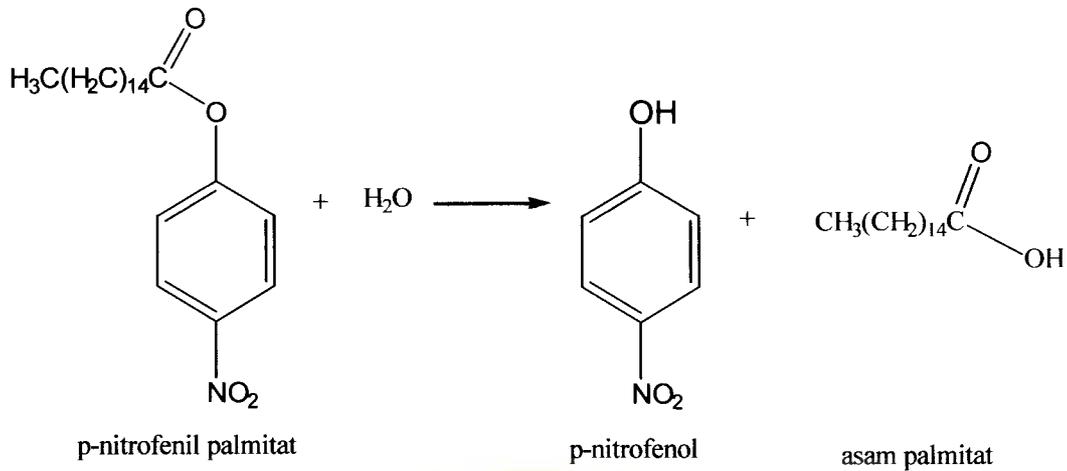
Untuk produksi enzim lipase oleh isolat L-08 dibuat inokulum dengan waktu inkubasi optimum yaitu pada akhir fase logaritmik. Pada fase ini sel membelah dengan cepat, sel membutuhkan energi lebih banyak dibandingkan dengan fase lainnya. Selain itu sel lebih sensitif terhadap keadaan lingkungannya (Waluyo, 2004). Untuk produksi lipase dalam media dengan sumber karbon asam oleat dan glukosa dibuat inokulum yang masing-masing dikultivasi selama 9 jam.

Sedangkan inokulum dengan media sumber karbon minyak goreng dan gliserol dibuat dengan waktu kultivasi selama 6 jam.

Inokulum adalah sel mikroorganisme tertentu yang diinokulasi pada media tertentu untuk tujuan tertentu. Pembuatan inokulum tersebut bertujuan untuk memendekkan waktu adaptasi atau waktu pembangkitan (*start up*) yang biasanya untuk memproduksi enzim tertentu. (Cruger dan Cruger, 1990)

4.4 Penentuan Aktivitas Lipolitik Ekstrak Kasar Lipase

Aktivitas lipase ditentukan pada kemampuannya menghidrolisis lipid. Kemampuan lipase ini disebut aktivitas lipolitik (*lipolytic activity*). Aktivitas lipolitik dapat ditentukan dengan beberapa metode antara lain: metode spektrofotometri, metode difusi dan metode titrimetri (Pereira-Meirelles *et al.*, 1997). Pada penelitian ini digunakan metode spektrofotometri. Penentuan aktivitas lipolitik didasarkan pada kemampuan lipase menghidrolisis substrat p-nitrofenil palmitat (pNPP). Setelah diinkubasi pada suhu 60°C selama satu jam p-nitrofenol yang dihasilkan diukur secara spektrofotometri pada λ 410 nm. Sebagai kontrol digunakan lipase yang telah dinonaktifkan dengan cara pemanasan pada 100°C hingga 1 jam, selanjutnya diperlakukan sama dengan sampel. Aktivitas lipolitik dinyatakan dengan Unit(U). Satu Unit(U) didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang menghasilkan 1 μ mol produk (p-nitrofenol)(lampiran 4). Reaksi dari aktivitas lipolitik terhadap substrat pNPP adalah:

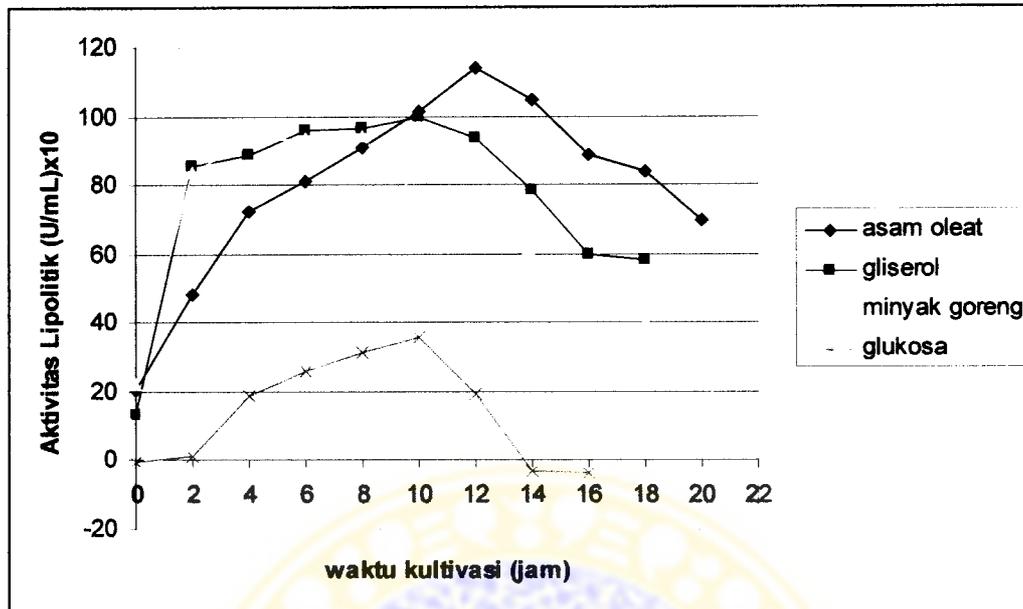


Gambar 4.4 Reaksi hidrolisis p-nitrofenil palmitat oleh lipase

4.5 Pembuatan Kurva Produksi

Produksi lipase pada beberapa media dengan sumber karbon yang berbeda, bertujuan untuk mengetahui sumber karbon yang terbaik bagi isolat L-08 untuk produksi lipase. Dengan menentukan aktivitas lipase yang dihasilkan isolat selama kultivasi dapat diketahui waktu optimum dan sumber karbon yang terbaik untuk produksi lipase.

Jumlah masing-masing inokulum yang ditambahkan pada masing-masing media produksi dibuat sama yaitu dengan cara mengencerkan inokulum yang terukur ODnya hingga diperoleh OD 0,01 dalam 50 ml media. Dengan demikian jumlah sel awal pada inokulum yang ditambahkan pada masing-masing media produksi sama. Kurva produksi isolat dalam media dengan sumber karbon berbeda ditunjukkan pada gambar 4.5 sedangkan data aktivitas lipolitiknya pada lampiran 5



Gambar 4.5 Profil produksi lipase oleh isolat L-08 dalam beberapa media dengan sumber karbon berbeda

Berdasarkan data diatas menunjukkan bahwa aktivitas lipolitik tertinggi diperoleh dari ekstrak kasar lipase hasil kultivasi dengan menggunakan asam oleat sebagai sumber karbon yaitu sebesar 0,1140 U/mL pada jam ke-12. Aktivitas lipolitik tertinggi pada media dengan sumber karbon gliserol, minyak goreng dan glukosa berturut-turut adalah 0,0997 U/mL pada jam ke-10, 0,0942 U/mL pada jam ke- 8 dan 0,0356 U/mL pada jam ke-10.

Pola produksi isolat L-08 dalam media dengan sumber karbon asam oleat, gliserol, dan minyak goreng menunjukkan bahwa setelah jam ke-0 kurva produksi lipase langsung menanjak. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh jumlah inokulum awal yang diinokulasikan terlalu banyak sehingga jika dipindahkan dalam media baru yang nutrisinya lebih banyak sel mikroorganismenya akan dengan cepat mensintesis enzim lipase untuk mencerna substrat yang ada dalam medianya (Waluyo, 2004). Sedangkan pada media dengan sumber karbon glukosa

penambahan sel inokulum yang terlalu banyak tidak menunjukkan pengaruh terhadap meningkatnya aktivitas lipolitik isolat.

Berdasarkan profil pertumbuhan, aktivitas enzim pada profil produksi meningkat pada waktu sel mulai mengalami fase logaritmik dan menunjukkan aktivitas tertinggi pada fase stasioner. Aktivitas lipolitik menurun pada akhir fase stasioner sampai fase menuju kematian.

Aktivitas lipase yang dihasilkan oleh isolat dalam media dengan sumber karbon asam oleat lebih tinggi bila dibandingkan dengan media dengan sumber karbon minyak goreng, gliserol, dan glukosa. Hal ini menunjukkan bahwa asam oleat selain berfungsi sebagai sumber energi, juga berfungsi sebagai induser untuk menghasilkan lipase (Hasanuzzaman, 2004)

Induksi enzim didefinisikan sebagai peningkatan relatif kecepatan sintesis sebuah enzim tertentu, yang dihasilkan dari eksposur sel terhadap suatu bahan kimiawi yaitu suatu penginduksi (induser). Enzim-enzim yang dapat menginduksi dibutuhkan jika mikroorganisme berada dalam medium yang terbatas nutrisinya, misalnya hanya sebuah polisakarida, sebuah oligosakarida, atau sebuah asam amino sebagai sumber karbon satu-satunya (Budiyanto, 2002).

Peirera (1997) telah memproduksi lipase pada beberapa sumber karbon yaitu triolein, *olive oil*, tributirin, asam oleat yang dimodifikasi dengan penambahan glukosa dan sukrosa pada berbagai konsentrasi. Aktivitas lipolitik terbesar yang dihasilkan oleh *Candida lipolytic* adalah sebesar 3,8 U/mL pada media dengan asam oleat 0,96 % sebagai sumber karbon yang dihasilkan pada

akhir fase stasioner. Asam oleat tersebut selain berfungsi sebagai sumber karbon juga sebagai induser. Sedangkan glukosa bersifat represi.

Profil produksi lipase oleh isolat L-08 dalam media dengan sumber karbon glukosa memperlihatkan bahwa pada jam ke-0 waktu kultivasi, isolat belum menghasilkan lipase. Selanjutnya aktivitas lipase mulai menunjukkan peningkatan hingga aktivitas tertinggi terukur pada jam ke-10 atau pada fase stasioner awal. Namun aktivitas lipolitik tersebut sangat kecil dan menurun pada jam ke-12. Kecilnya aktivitas lipase pada media ini kemungkinan disebabkan oleh sumber karbon glukosa kurang sesuai untuk memproduksi lipase. Pada media ini sel isolat pertama-tama akan memproduksi enzim yang dapat mencerna substrat yang terbaik yang ada dalam media pertumbuhannya yakni glukosa. Setelah glukosa habis isolat baru memproduksi enzim lain untuk mencerna substrat kedua. Tetapi karena dalam media tidak ada substrat yang bersifat induser maka lipase tidak akan dihasilkan (Budiyanto, 2002). Kemungkinan lain yang menyebabkan aktivitas lipase sangat kecil adalah glukosa mengalami fermentasi sehingga menghasilkan etanol. Produk samping yang berupa etanol ini dapat menghambat produksi enzim sehingga aktivitasnya menurun (Ohnishi *et al.*, 1994)

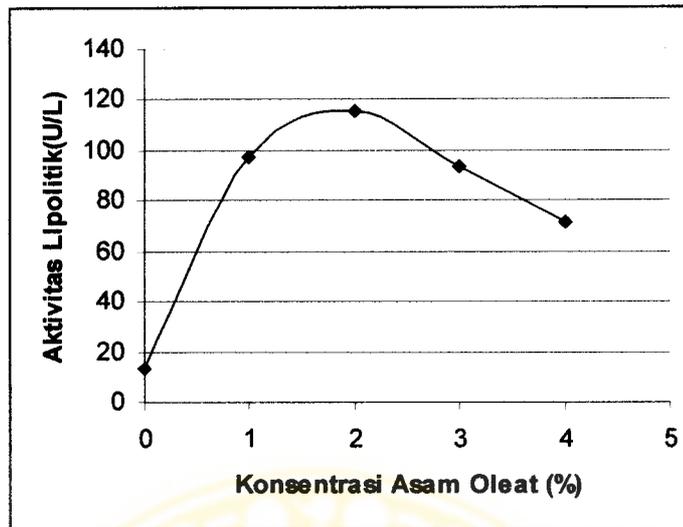
Mascena (1999) telah meneliti produksi ekstraseluler lipase oleh *Fusarium solani* dengan media pepton dan *olive oil*. Aktivitas lipase tertinggi sebesar 10,500 U/L pada jam ke-72 waktu kultivasi. Pada penelitiannya tersebut menunjukkan bahwa penambahan glukosa menyebabkan inhibitor terhadap induksi oleh *olive oil*.

Produksi lipase pada media dengan minyak goreng dan gliserol sebagai sumber karbon menunjukkan aktivitas lipolitik yang cukup tinggi. Pada kedua media tersebut aktivitas lipolitik pada jam ke-2 hingga jam-8 waktu kultivasi menunjukkan nilai aktivitas yang hampir sama. Aktivitas tertinggi pada sumber karbon minyak goreng pada waktu kultivasi yaitu pada jam-8 yang lebih cepat daripada pada media gliserol yaitu pada jam ke-10. Hal ini menunjukkan bahwa gliserol dan minyak goreng juga bersifat induser pada produksi lipase. Namun aktivitas lipolitik tertinggi pada media dengan sumber karbon asam oleat masih lebih tinggi dari keduanya.

Dari beberapa sumber karbon yang digunakan yaitu: asam oleat, gliserol, minyak goreng dan glukosa dapat disimpulkan bahwa asam oleat merupakan sumber karbon terbaik bagi isolat L-08 untuk produksi lipase.

4.6 Penentuan Konsentrasi Asam Oleat Optimum Untuk Produksi Lipase

Konsentrasi sumber karbon yang optimum sangat mempengaruhi produktifitas lipase. Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi asam oleat pada produksi lipase maka dilakukan variasi konsentrasi asam oleat. Aktivitas lipolitik lipase isolat dari sekitar reaktor pabrik minyak goreng pada berbagai konsentrasi asam oleat dapat dilihat pada lampiran 6. Berikut adalah grafik yang menunjukkan pengaruh konsentrasi asam oleat terhadap aktivitas lipolitik yang dihasilkan oleh isolat dari sekitar reaktor pabrik minyak goreng.



Gambar. 4.6 Pengaruh konsentrasi asam oleat terhadap produksi lipase oleh isolate termofilik dari pabrik minyak goreng

Dari kurva dapat diketahui bahwa aktivitas lipolitik tertinggi dihasilkan isolat dalam media dengan sumber karbon asam oleat 2 % yaitu sebesar 0,1154 U/mL. Aktivitas lipolitik menurun pada saat digunakan asam oleat lebih dari 2 %. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh fungsi asam oleat pada produksi lipase yang selain sebagai sumber karbon juga sebagai inducer. Sehingga konsentrasi yang terlalu besar dapat menghambat pertumbuhan sel karena berkaitan dengan inhibisi pada biosintesis protein, sebaliknya konsentrasi inducer yang terlalu kecil dapat mengakibatkan afinitas represor oleh inducer terlalu rendah. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa konsentrasi asam oleat yang optimum pada penelitian ini adalah 2 %.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah :

1. Pertumbuhan isolat L-08 dalam media dengan sumber karbon yang berbeda menunjukkan pola yang berbeda.
2. Sumber karbon berpengaruh terhadap peningkatan aktivitas lipase yang dihasilkan oleh isolat L-08. Asam oleat merupakan sumber karbon terbaik untuk produksi lipase oleh isolat L-08. Dalam medium dengan asam oleat 2 % isolat L-08 menghasilkan lipase dengan aktivitas 0,1154 U/mL setelah kultivasi 12 jam.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut tentang isolat yang lain (selain L-08) sebagai sumber lipase.

DAFTAR PUSTAKA

- Bagi, K., Simon, L.M., Szajani, B., 1997, **Immobilization and Characterization of Porcine Pancreas Lipase**, *Enzyme and Microbial Technology*, **20**, 531-535
- Budiyanto, Moch. Agus Krisno, 2002, *Mikrobiologi Terapan*, Universitas Muhammadiyah, Malang, hal 19-33
- Crueger, W., and Crueger, A., 1984, *Biotechnology: A text Book of Industrial Microbiology*, SinaverAssociate Inc, Sunderland, p.207
- Faber, K., 2004, *Biotransformantion in Organic Reaction*, Springer, Germany, p 1-25, 94-123
- Fardiaz, S., 1992, *Biotransformantion in Organic Reaction*, PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, hal. 52-66, 97-114
- Fardiaz, S., 1992, *Mikrobiologi Pangan I*, PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, hal.152-169
- Frobisher, M., 1962, *Fundamental of Microbiology*, 7th edition, Saunders Company, London
- Godfrey and West, 1996, *Industrial Enzymology*, 2nd Edition, Macmillan Press Ltd.
- Gross, T., J. Fewill, S. Ketteridge, dan D. Springham. 1996, *Introductory Microbiology*, Chapman and hall, London.
- Gupta, N., Mehra, G., Gupta, R., 2004, **A glicerol-Inducible Thermostable Lipase from Bacillus sp. : medium optimization by a plackett-Burman design and by response surface methodology**, *Canadian Journal of Microbiology*, Volume 50, No.5, pp.361-368.
- Hasanuzzaman, M., Umadhay-Briones, K.M., Zsiros, S.M., Morita, N., Nodasaka, Y., Yumotu I., Okuyama, H., 2004, **Isolation, Identification and Characterization of a Novel, Oil-Degrading Bacterium, Pseudomonas aeruginosa TI**, *Curent Microbiology An International Journal*, Vol.49, pp108-114
- Johnston dan Hou, T.M., 1992, **Screening of Lipase Activities with Cultures from Agricultural Research Service Culture Collection**, *J.A.O.C.S.*, **69**,1088-1097

- Illianes, A., 1999, **Stability of Biocatalist(review article)**, *Electronic Jurnal of Biotechnology*, 2, no1
- Lee, D.W., Koh, Y.S., Kim, K.J., Kim, B.C., Choi, H.C., Kim, D.S., Suhartono, M.T., Pyun, Y.R., 1999, **Isolation and Characterization of Thermophilic Lipase from *Bacillus thermoleovorans ID-1***, FEMS Microbiology letters, vol 179, issue 2, p. 393-400 [Abstract]
- Lehninger, A.L., 1997, *Dasar-dasar Biokimia* (terjemahan Maggy Thena Wijaya), Jilid I, Penerbit Erlangga
- Linko, Y., Lamsa, M., Wu, X., Uosukainen, Seppala, J., and Linko, P., 1998, **Biodegradable Products by Lipase Biocatalysis**, *J. of Biotechnology*, 66, 41-50
- Maharani, C.A., 2003, **Produksi Lipase dari Bakteri *Pseudomonas sp.* pada Berbagai Sumber Karbon**, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga
- Mascena, D.M., Morais, M.m.c., Morais Jr, M.A., Melo, E.H.M., Filho, J.L., 1999, **Production of Extracellular Lipase by the Phytopathogenic Fungus *Fusarium Solani FSI***, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
- Ng TK, Kenealy WR. 1986. **Industrial Applications of Thermostable Enzyme**, Dalam : Brock TD editor, *Thermophiles, General, Molecular, and Applied Microbiology*. John Wiley and Sons. New York. Page : 197-215.
- Ohnishi K., Yoshida Y., Sekiguchi J., 1994, **Lipase Production of *Aspergillus oryzae***, *Jurnal of Fermentation and Bioengineering*, 77, 490-495
- Pelczar, M.J. dan Chan, E.C.S., 1986, *Dasar-dasar Mikrobiologi, Jilid 1*, Penerjemah, Hadioetomo, R.S., Imas, T., Tjitrosomo, S.S., dan Angka, S.L., UI-Press, Jakarta, hal 141-118, 317-342
- Pereira-merrelies, F.V., Miguez, M.M., Leao R., Anna Jr, G.L.S., 1997, **A Stable Lipase from *Candida Lipolitica* Cultivation Condition and Crude Enzyme Characteristic**, *J. of Applied Biochemistry and Biotechnology*
- Rhee , J.K., Anh, D.G., Kim, Y.G., Oh, J.W., 2005, **Thermophilic and Thermostable Esterase with Sequence Similarity to the Hormone Sensitive Lipase Family, Cloned from a Metegenic Library**, Applied and Environmental Microbiology, p 817-825, vol 71, No 2
- Saxena, R.K., Ghosh, P.K., Gupta, R., Davidson, S.W, www.ias.ac.in/currsci/jul10/articles18.htm, 19 Desember 2005

- Schlegel, H.S., Schmidt, K., 1966, *Mikrobiologi Umum*, Edisi keenam, Gajah Mada University Press, Yogyakarta
- Steel DM, Walker JM. 1991. *Thermostable Protein*. Life Chem Report 8. Page 49-96.
- Stryer, L., 1996, *Biochemistry, Second Edition*, W.H. Freeman and Company, San Fransisco, p.257-380, 671-672
- Thenawidjaja, M., *Pemakaian Enzim Meningkatkan Pesat*, Kompas Bogor, 6 Maret 2000
- Tortora, G.J, Funke, B.R., Case, C.L., 2002, **Microbiology An Introduction, Seventh Edition**, Person Education, Inc., Publishing as Benjamin Cummings, San Fransisco, pp. 118-119.
- Volk, W.A. 1992, *Basic Microbiology, 7th edition*, Harper Collin Publishers, Inc., New York.
- Waluyo, Lud, 2004, *Mikrobiologi Umum*, Universitas Muhammadiyah, Malang, hal 95-120
- Yahya, A.R.M., Anderson, W.A., and Moo Young, M., 1998, **Ester Syntesis in Lipase Catalysed reaction, Enzyme and Microbial**, 23, 483-450

Lampiran 1. Komposisi media untuk pembuatan profil pertumbuhan dan profil produksi lipase oleh isolat L-08

No	Bahan	Media			
		I	II	III	IV
1	Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g
2	MgSO ₄	0,0125 g	0,0125 g	0,0125 g	0,0125 g
3	NaCl	0,115 g	0,115 g	0,115 g	0,115 g
4	Ekstrak ragi	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g
5	Asam oleat	0,5 mL			
6	Gliserol		0,5 mL		
7	Minyak goreng			0,5 mL	
8	Glukosa				0,5 g
9	Aquades	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL

Lampiran 2. Pembuatan profil pertumbuhan isolat L-08 dalam media dengan sumber karbon berbeda

a. Media dengan sumber karbon asam oleat

Waktu Kultivasi (jam)	OD x FP	OD (Densitas Optik)
0	0,089 x 1	0,089
2	0,205 x 2	0,410
4	0,267 x 4	1,067
5	0,470 x 4	1,880
6	0,518 x 4	2,072
7	0,566 x 4	2,264
8	0,609 x 4	2,436
9	0,743 x 4	2,972
11	0,744 x 4	2,976
13	0,749 x 4	2,996
14	0,644 x 4	2,576

b. Media dengan sumber karbon gliserol

Waktu Kultivasi (jam)	OD x FP	OD (Densitas Optik)
0	0,015 x 1	0,015
2	0,036 x 1	0,036
4	0,365 x 1	0,365
5	0,659 x 1	0,659
6	0,408 x 2	0,816
7	0,576 x 2	1,152
8	0,611 x 2	1,222
9	0,646 x 2	1,292
11	0,670 x 2	1,340
13	0,590 x 2	1,180
14	0,570 x 2	1,140

c. Media III dengan sumber karbon minyak goreng

Waktu Kultivasi (jam)	OD (Densitas Optik)
0	0,083
2	0,100
4	0,366
6	0,668
8	0,744
8,5	0,741
9	0,739
10	0,609
11	0,528
12	0,512
14	0,487

d. Media dengan sumber karbon glukosa

Waktu Kultivasi (jam)	OD x FP	OD (Densitas Optik)
0	0,006 x 1	0,006
2	0,008 x 1	0,008
4	0,010 x 1	0,010
6	0,012 x 1	0,012
7	0,034 x 1	0,034
8	0,154 x 1	0,154
9	0,575 x 1	0,575
10	0,770 x 1	0,770
11	0,412 x 2	0,824
12	0,410 x 2	0,820
13	0,409 x 2	0,818
14	0,691 x 1	0,691

Lampiran 3 Pembuatan kurva standart larutan p-nitrofenol

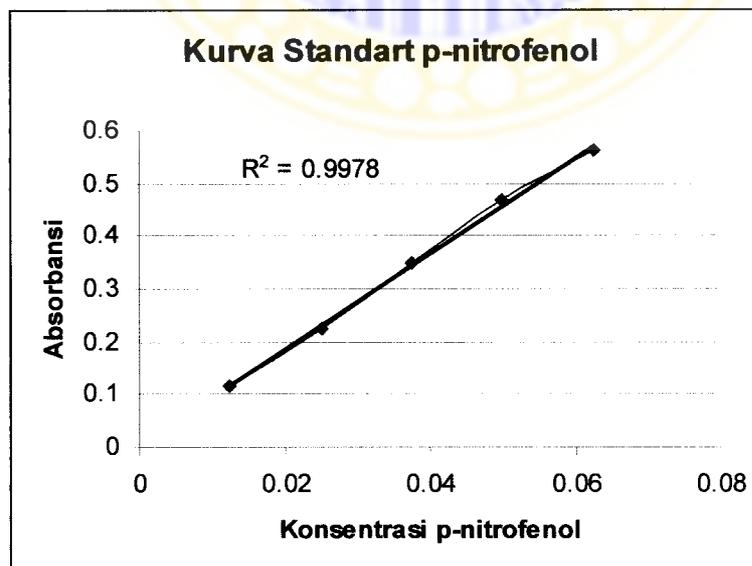
Konsentrasi p-nitrofenol ($\mu\text{mol/mL}$)	Absorbansi pada λ 410 nm		
	I	II	Rata-rata
0,0125	0,118	0,111	0,115
0,025	0,229	0,221	0,225
0,0375	0,343	0,353	0,348
0,050	0,478	0,460	0,469
0,0625	0,558	0,546	0,561

Dari data pengukuran Absorbansi larutan standar p-nitrofenol tersebut dibuat kurva standart p-nitrofenol dengan :

- Sumbu x menyatakan konsentrasi p-nitrofenol ($\mu\text{mol/mL}$)
- Sumbu y menyatakan nilai absorbansi rata-rata pada λ 410 nm

Didapatkan persamaan regresi linier dan kurva standart sebagai berikut :

$$Y = 9,092 X + 0,021$$



Lampiran 4. Penentuan Aktivitas Lipolitik terhadap Substrat p-Nitrofenil Palmitat

Definisi 1 Unit aktivitas :

Satu Unit(U) aktivitas lipase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 μmol produk per jam.

Contoh perhitungan :

Dari persamaan regresi kurva standart p-nitrofenol diperoleh

$$Y = 9,092 X + 0,021$$

Jika X = konsentrasi p-nitrofenol ($\mu\text{mol/mL}$)

$$Y = A_s - A_c \text{ (selisih Absorbansi sampel dengan kontrol)}$$

$$X = \frac{Y - 0,021}{9,092}$$

misal $Y = 0,077$ maka $X = \frac{0,077 - 0,021}{9,092} = 6,159 \times 10^{-3} \mu\text{mol/mL}$

Jika volume enzim pada percobaan 0,3 mL dan diinkubasi selama 1 jam maka

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas Lipolitik} &= \frac{[pNp]}{0,3} \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ jam}^{-1} \text{ mL}^{-1} \\ &= \frac{6,159 \times 10^{-3}}{0,3} \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ jam}^{-1} \text{ mL}^{-1} \\ &= 0,0205 \text{ U/mL} \end{aligned}$$

Lampiran 5. Hasil Penentuan Aktivitas Lipase terhadap substrat pNPP**a. Sumber Karbon Asam Oleat**

No	Jam Ke-	Abs pada λ 410 nm		As - Ac	[pNP] ($\mu\text{mol/mL}$) $\times 10^{-3}$	Aktivitas Lipolitik (U/mL)
		sampel	kontrol			
1	0	0,339	0,262	0,077	6,159	0,0205
2	2	0,375	0,222	0,153	14,518	0,0484
3	4	0,449	0,231	0,218	21,667	0,0722
4	6	0,510	0,267	0,243	24,417	0,0814
5	8	0,561	0,292	0,269	27,277	0,0909
6	10	0,565	0,267	0,298	30,466	0,1015
7	12	0,577	0,245	0,332	34,206	0,1140
8	14	0,589	0,283	0,306	31,346	0,1045
9	16	0,537	0,274	0,263	26,617	0,0887
10	18	0,623	0,373	0,250	25,187	0,0834
11	20	0,441	0,230	0,211	20,897	0,0697

b. Sumber karbon Gliserol

No	Jam Ke-	Abs pada λ 410 nm		As - Ac	[pNP] ($\mu\text{mol/mL}$) $\times 10^{-3}$	Aktivitas Lipolitik (U/mL)
		sampel	kontrol			
1	0	0,264	0,207	0,057	3,960	0,0132
2	2	0,466	0,212	0,254	25,627	0,0854
3	4	0,525	0,262	0,263	26,617	0,0887
4	6	0,534	0,251	0,283	28,816	0,0960
5	8	0,541	0,257	0,284	28,926	0,0964
6	10	0,550	0,257	0,293	29,916	0,0997
7	12	0,557	0,281	0,276	28,047	0,0935
8	14	0,571	0,336	0,235	23,537	0,0784
9	16	0,527	0,343	0,184	17,928	0,0597
10	18	0,530	0,350	0,180	17,488	0,0583

c. sumber karbon minyak goreng

No	Jam Ke-	Abs pada λ 410 nm		As - Ac	[pNP] ($\mu\text{mol/mL}$) $\times 10^{-3}$	Aktivitas Lipolitik (U/mL)
		sampel	kontrol			
1	0	0,288	0,207	0,081	6,599	0,0212
2	2	0,506	0,256	0,250	25,187	0,0839
3	4	0,520	0,258	0,262	27,816	0,0927
4	6	0,536	0,260	0,276	28,047	0,0935
5	8	0,556	0,278	0,278	28,267	0,0942
6	10	0,484	0,256	0,228	22,767	0,0759
7	12	0,468	0,274	0,194	19,028	0,0634
8	14	0,452	0,270	0,182	17,708	0,0590
9	16	0,470	0,294	0,176	17,048	0,0568
10	18	0,420	0,290	0,130	11,988	0,0340

d. sumber karbon glukosa

No	Jam Ke-	Abs pada λ 410 nm		As - Ac	[pNP] ($\mu\text{mol/mL}$) $\times 10^{-3}$	Aktivitas Lipolitik (U/mL)
		sampel	kontrol			
1	0	0,519	0,499	0,020	-0,11	0
2	2	0,582	0,557	0,025	0,439	0,0015
3	4	0,631	0,559	0,072	5,609	0,0187
4	6	0,663	0,571	0,092	7,809	0,0260
5	8	0,683	0,577	0,106	9,350	0,0312
6	10	0,682	0,564	0,118	10,670	0,0356
7	12	0,633	0,559	0,074	5,829	0,0194
8	14	0,606	0,593	0,013	-0,879	0
9	16	0,761	0,750	0,011	-1,100	0

Lampiran 6. Pengaruh konsentrasi asam oleat terhadap produksi lipase oleh isolat L-08

Konsentrasi Asam Oleat	Replikasi	Absorbansi pada pada λ 410 nm		As- Ac	Konsentrasi [pNP] ($\mu\text{mol/mL}$) $\times 10^{-3}$	Aktivitas Lipolitik (U/mL)
		Sampel	Kontrol			
0%	1	0,220	0,164	0,056	3,846	0,0128
	2	0,221	0,163	0,058	4,066	0,0135
	Rata-rata					0,0132
1%	1	0,464	0,179	0,285	29,010	0,0967
	2	0,471	0,182	0,289	29,450	0,0982
	Rata-rata					0,0974
2%	1	0,567	0,232	0,335	34,505	0,1150
	2	0,571	0,234	0,337	34,725	0,1158
	Rata-rata					0,1154
3%	1	0,589	0,310	0,279	28,352	0,0945
	2	0,585	0,311	0,274	27,802	0,0927
	Rata-rata					0,0936
4%	1	0,563	0,346	0,217	21,538	0,0712
	2	0,554	0,337	0,217	21,538	0,0712
	Rata-rata					0,0712