

# Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Lipase dari *Aspergillus oryzae* pada Kopra Berjamur

Seniwati Dali<sup>1\*)</sup>, Abdul Rauf Patong<sup>1)</sup>, Muhammad Noor Jalaluddin<sup>1)</sup> dan Pirman Andi Parenrengi<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar 90245

<sup>2)</sup>Teknik Kimia, Politeknik Negeri Ujung Pandang, Makassar 90245

Diterima 02-11-2009

Disetujui 14-04-2011

## ABSTRACT

An investigation on purification and characterization of lipase enzyme production *Aspergillus oryzae* from copra by fermentation of olive oil has been carried out. This enzyme can be produced by fermenting olive oil in a medium containing *Aspergillus oryzae*. Crude enzyme is obtained by centrifuging the medium cultures containing *Aspergillus oryzae* at 3500 rpm for 30 minutes and then adding 0.2 M borat buffer (pH 8.2). Enzyme activity was determined from paranitrophenol as product of lipase catalysis of paranitrophenylbutirat (0.2 M) as substrate measured by the Vorderwulbecke method. Prepurification process was by ammonium sulphate fractionation. Precipitation 60-80% ammonium sulphate produced maximum activity of enzyme. Purification by Q sepharosa FF and sephadex G-75 column chromatography produced four and three fractions with purifity of 12.85 and 20.25 times than crude enzyme respectively. Characterization of this enzyme showed optimum condition at pH 8.2, temperature at 35°C, the  $K_m$  value at 0.046 M, and  $V_{max}$  is 1.926  $\mu\text{mol}/\text{menit}$  and the molecular weight at 40.7 kDa.

**Keywords:** *Aspergillus oryzae*, copra, lipase

## PENDAHULUAN

Indonesia dengan keanekaragaman hayatinya berpeluang besar untuk mengembangkan produksi enzim lipase dari mikroba lokal. Eksplorasi mikroba lipolitik lokal telah dilakukan, namun hingga saat ini enzim lipase komersial lokal belum terdapat di pasaran. Kapang merupakan mikroba yang 80% kebutuhan substratnya dipenuhi oleh makromolekul yang memiliki rantai karbon (Putranto *et al.* 2006). Beberapa jenis kapang diketahui tumbuh pada habitat yang mengandung minyak dan penghasil enzim lipase antara lain *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium* (Sharma *et al.* 2001). Kelapa merupakan bahan baku pada industri pembuatan minyak nabati, dalam pengolahannya terlebih dahulu dibuat kopra. Teknik pembuatan kopra bisa secara tradisional yaitu dengan cara pengupasan tempurung kelapa kemudian penjemuran sampai kering. Pengolahan kelapa menjadi kopra biasanya didapatkan kopra yang rusak (berjamur). Survei lapangan menunjukkan bahwa ada sekitar 1-5% kelapa yang diolah menjadi kopra, dapat berjamur sehingga potensial menjadi limbah. Kopra berjamur dapat dimanfaatkan sebagai sumber mikroba penghasil lipase. Kopra dengan kadar air yang masih tinggi merupakan media yang baik untuk pertumbuhan mikroba utamanya kapang. Kapang yang tumbuh pada kopra berjamur telah teridentifikasi dari genus *Aspergillus* dan *Penicillium* (Dali & Pirman 2005).

Enzim lipase merupakan kelompok enzim yang secara umum berfungsi dalam hidrolisis triasilgliserol (trigliserida) untuk menghasilkan asam lemak rantai panjang dan gliserol (Mingrui Yu *et al.* 2007). Enzim ini juga digunakan untuk hidrolisis triasilgliserol menjadi diasilgliserol dan asam lemak bebas. Diasilgliserol adalah ester gliserol digunakan sebagai bahan pengemulsi dan penstabil produk makanan, kosmetika dan farmasetika (Ling *et al.* 2007). Lipase mikrobial telah digunakan sebagai katalis dalam menghasilkan produk-produk berbasis oleokimia antara lain lemak/minyak termodifikasi seperti trigliserida rendah kalori (McNeill & Sonnet 1995), minyak kaya EPA dan DHA (Halldorsson *et al.* 2003).

Enzim lipase dapat pula digunakan sebagai biokatalis untuk meningkatkan kualitas *Crude Palm Oil* (CPO) yang lebih baik yaitu minyak sehat (*healthy oil*). *Healthy Econa Cooking Oil* telah diproduksi massal pada tahun 2001 oleh Kao Industries of Japan bekerjasama dengan Novozymes, Co. Bahan utama yang terkandung di dalam minyak ini adalah diasilgliserol yang dibuat secara enzimatik menggunakan minyak murni. Dalam jangka panjang minyak ini mampu mencegah peningkatan lemak tubuh, terutama lemak yang terdeposit dalam organ internal (Kao Corporation 2004).

\*Telp: +628124266134

Email: mizz.kudo@gmail.com

Penelitian ini bertujuan memurnikan dan mengkarakterisasi enzim lipase. Sebagai sumber enzim digunakan kapang *Aspergillus oryzae* yang diisolasi pada kopra berjamur (Dali & Pirman 2005).

## BAHAPANMETODE

**Bahan-bahan utama yang digunakan.** Kapang dari isolat *Aspergillus oryzae* yang diisolasi pada kopra berjamur. Biakannya dipelihara serta diperbanyak pada media agar. Media agar yang digunakan adalah: pepton 0,5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,001%, bacto agar 1,5%, minyak zaitun 1%. Komposisi media produksi (fermentasi) terdiri dari: pepton 0,5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,001%, dan minyak zaitun 1%. Amonium sulfat, tris-HCl, Q sepharosa FF, sephadex G-75, bufer borat, paranitrofenol, paranitrofenilbutirat, SDS-PAGE dan BSA.

**Produksi dan isolasi enzim lipase.** Produksi enzim lipase dilakukan dengan fermentasi dalam labu kocok yang mengandung media produksi yang diinokulasi dengan larutan suspensi biakan murni *Aspergillus oryzae* yang telah diaktifkan. Pepton dan minyak zaitun divariasikan konsentrasinya masing-masing, pepton (0,5; 0,8; 1,0; 1,3 dan 1,5%) dan minyak zaitun (1, 2, 3, 4 dan 5%) serta kecepatan pengadukan (50, 100, 150, 200 dan 250 rpm) untuk memperoleh komposisi media produksi dan kecepatan pengadukan optimum dalam memproduksi enzim lipase. Proses fermentasi dilakukan pada suhu 37°C selama 8 hari. Sel *Aspergillus oryzae* hasil fermentasi dipisahkan dari medianya dengan cara sentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 3500 rpm selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh selanjutnya digunakan sebagai enzim kasar.

**Pemurnian enzim lipase.** Pemurnian awal dengan fraksinasi amonium sulfat 0-100% selanjutnya enzimnya diendapkan dengan cara sentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit dan dilarutkan dalam bufer borat 0,2 M pH 8,2. Selanjutnya larutan ini dimasukkan ke dalam kantong selofan viksing, kemudian didialisis dengan bufer borat konsentrasi 0,05 M, diaduk dengan magnetik stirer selama 1 malam pada suhu 5°C. Setiap 3 jam dilakukan penggantian bufer. Pada fraksi amonium sulfat yang memiliki aktivitas enzim lipase yang tertinggi, dimurnikan lebih lanjut dengan kromatografi kolom penukar ion berdasarkan metode Mingrui Yu *et al.* (2007), yang dimodifikasi menggunakan matriks Q sepharosa FF (panjang kolom 35 x 1 cm) dengan kecepatan alir 30 tetes/menit) dan terakhir dengan kromatografi kolom filtrasi gel dengan matriks sephadex G-75 (panjang kolom 35 x 1 cm) dengan kecepatan alir 6 tetes/menit).

**Uji kemurnian enzim.** Larutan enzim yang diperoleh pada setiap tahap pemurnian diuji kemurniannya dengan gel 10% SDS-PAGE (Bollag & Edelstein 1991).

**Pengujian aktivitas enzim.** Aktivitas enzim lipase ditentukan dengan menggunakan metode Vorderwulbecke *et al.* 1992. Sebanyak 0,1 ml larutan enzim lipase atau blanko ditambahkan ke dalam bufer 0,89 ml yang mengandung Tris-HCl 0.05 M pH 7,0. Selanjutnya ditambahkan 0,01 ml substrat *p*-nitrofenilbutirat 0,1 M (pelarut dimetilsulfoksida), dikocok kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Campuran reaksi diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 410 nm. Aktivitas enzim lipase dihitung berdasarkan *p*-nitrofenol yang terbentuk dari hasil hidrolisis enzim lipase terhadap substrat *p*-nitrofenilbutirat.

**Penentuan kadar protein.** Untuk menghitung aktivitas spesifik, kadar protein enzim ditentukan berdasarkan metode Lowry (Colowick & Kaplan 1957), menggunakan serum bovine albumin (BSA) sebagai larutan standar. Untuk mengetahui pola proteinnya, larutan enzim dibaca absorbansnya pada panjang gelombang 280 nm (Deutscher 1990).

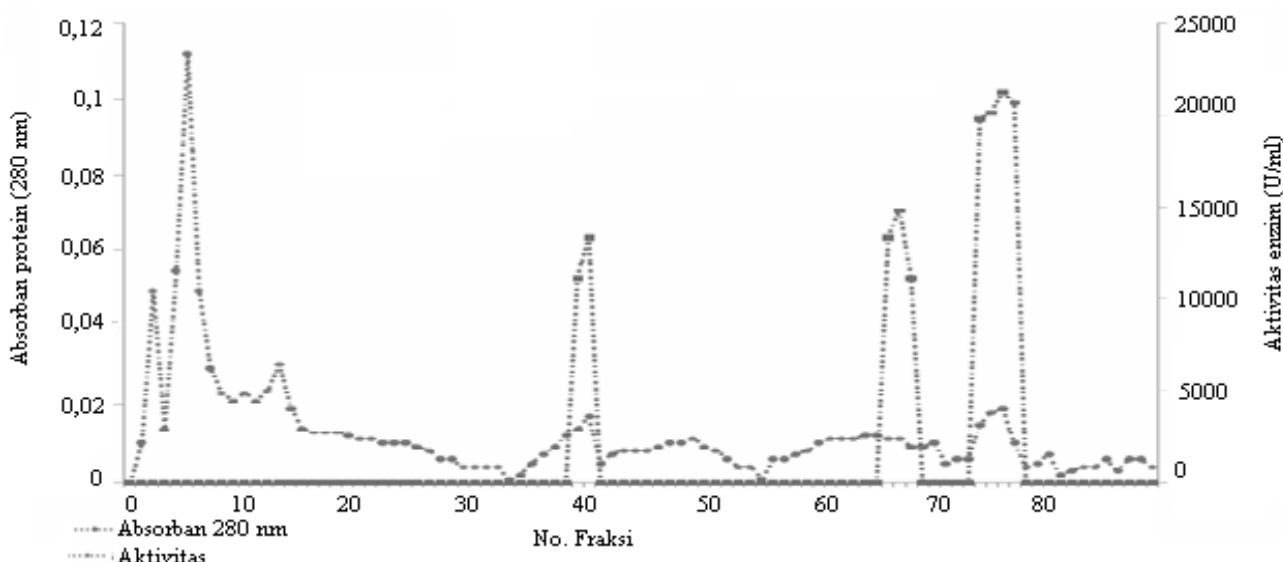
**Karakterisasi enzim.** Karakterisasi enzim meliputi: penentuan pH dan suhu optimum, penentuan berat molekul, nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  dari fraksi yang diperoleh pada hasil pemurnian dengan kromatografi kolom sephadex G-75. Suhu optimum ditentukan dengan menguji aktivitas enzim pada kisaran suhu 20-50°C. Sedangkan pH optimum ditentukan dengan menguji aktivitas enzim pada kisaran pH 7,0-9,0 menggunakan bufer borat.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

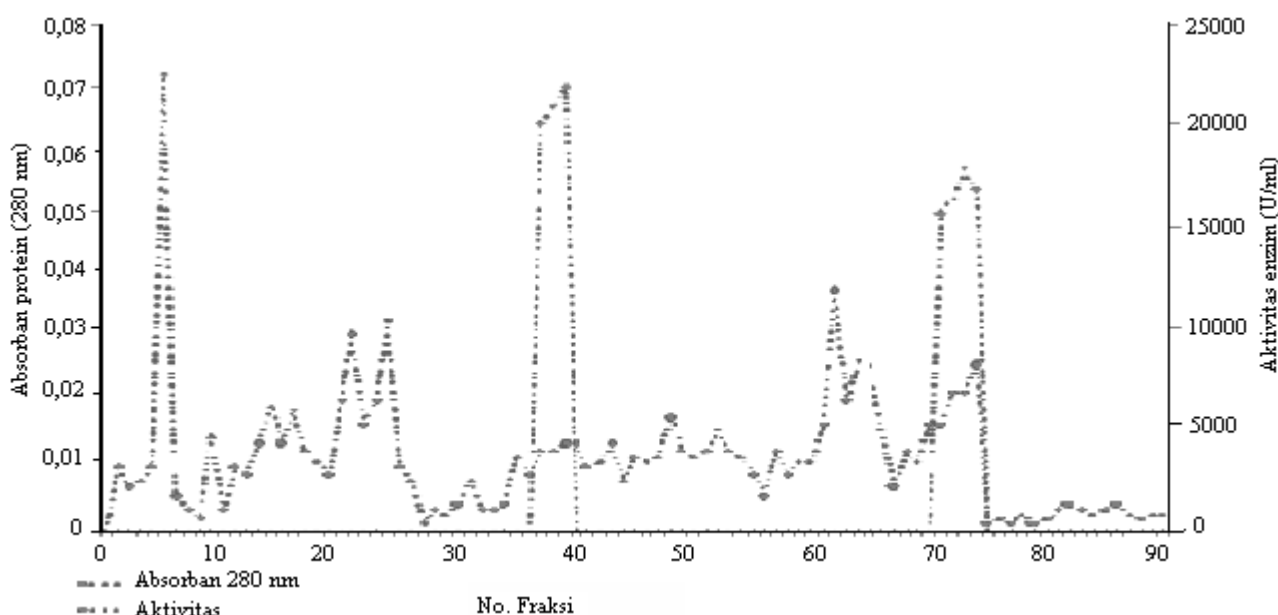
**Produksi dan isolasi enzim lipase.** Menurut Weisser (1962), enzim lipase dapat ditemukan baik sebagai enzim ekstraseluler maupun intraseluler. Namun pada umumnya enzim lipase mikrobial adalah ekstraseluler, yang dikeluarkan melalui membran eksternal ke dalam medium kultur. Dalam penelitian ini enzim lipase diproduksi dari fermentasi *Aspergillus oryzae* yang berlangsung selama 8 hari pada suhu 37°C. Induser yang digunakan adalah minyak zaitun. Pengujian aktivitas enzim pada setiap konsentrasi minyak zaitun, pepton dan kecepatan pengadukan dilakukan pada tahap percobaan pendahuluan, menunjukkan bahwa aktivitas enzim lipase yang tertinggi pada konsentrasi minyak zaitun 3%, konsentrasi pepton 1% dan kecepatan pengadukan 150 rpm dengan aktivitas enzim 18.888 unit/ml.

**Pemurnian enzim lipase.** Enzim lipase hasil fermentasi dari sel *Aspergillus oryzae* pada konsentrasi minyak zaitun 3% (v/v), setelah diperoleh enzim kasarnya selanjutnya dimurnikan dengan penambahan amonium sulfat 0-100%. Setelah ditentukan aktivitas enzim pada setiap fraksi, menunjukkan bahwa aktivitas enzim lipase yang paling tinggi ditemukan pada fraksi amonium sulfat 60-80% kejenuhan dengan aktivitas spesifik 7,87 unit/mg protein, yang kemurniannya tiga kali lebih tinggi dibandingkan dengan enzim kasarnya. Ekstrak enzim yang diperoleh pada fraksi 60-80% kejenuhan setelah dialisis, dimurnikan dengan kromatografi kolom Q sepharosa FF yang telah dijenuhkan dengan bufer yang sesuai, diperoleh pola protein dan aktivitas enzim lipase seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.

Hasil pemisahan menunjukkan lima puncak protein dan empat puncak aktivitas, tetapi yang memiliki aktivitas lipase paling tinggi adalah pada puncak antara fraksi 74-77. Fraksi ini disatukan kemudian dipekatkan dan diperoleh aktivitas spesifik sebesar 27,50 unit/mg protein, sehingga dapat disimpulkan bahwa proses pemurnian dengan kromatografi kolom Q sepharosa FF dapat meningkatkan kemurnian enzim lipase sebesar 12,85 kali dibandingkan dengan fraksi enzim kasarnya. Setelah dipekatkan, dimurnikan lebih lanjut dengan kromatografi kolom sephadex G-75 yang telah dijenuhkan dengan bufer yang sesuai, diperoleh pola protein dan aktivitas enzim lipase seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 1 Kromatogram hasil pemisahan enzim lipase menggunakan kromatografi kolom penukar ion Q sepharosa FF



Gambar 2 Kromatogram hasil pemisahan enzim lipase menggunakan kromatografi kolom filtrasi gel sephadex G-75

Tabel 1 Aktivitas enzim pada setiap tahap proses pemurnian enzim lipase

Tahap pemurnian	Volume (ml)	Protein total (mg)	Aktivitas enzim		Recovery (%)	FP (X)
			Total (unit)	Spesifik (Unit/mg protein)		
Ekstrak Kasar	1820	33,670	72,800	2,16	100	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50-80%	10	15,000	43,753	7,87	60,10	3,64
Q Sepharosa FF	6	399,75	11,022	27,50	15,4	12,85
Sephadex G-75	3	137,37	6012	43,76	8,25	20,25

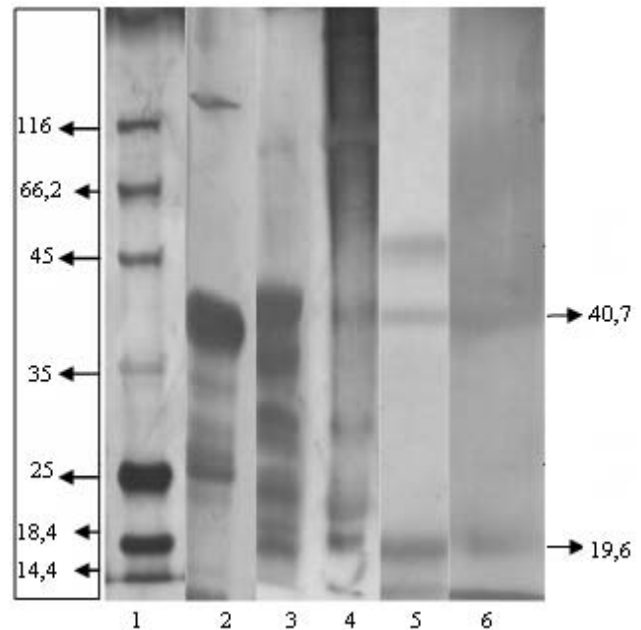
Keterangan: FP (Faktor/tingkat pemurnian)

Proses pemisahan dengan kromatografi kolom sephadex G-75 menghasilkan tiga puncak protein yang tertinggi dan juga tiga puncak aktivitas enzim lipase, namun fraksi 39 menunjukkan aktivitas enzim lipase tertinggi, selanjutnya fraksi ini diuji aktivitas spesifik, dan diperoleh sebesar 43,76 unit/mg protein. Pada tahap pemurnian ini, kemurnian enzim dapat meningkatkan sebesar 20,25 kali dibandingkan dengan fraksi enzim kasarnya. Adapun tahap-tahap proses pemurnian enzim lipase secara lengkap ditunjukkan dalam Tabel 1.

**Uji kemurnian enzim lipase.** Kemurnian enzim lipase yang diperoleh pada setiap tahap pemurnian diuji secara elektroforesis SDS-PAGE, diperoleh hasil yang ditunjukkan pada Gambar 3. Dari gambar tersebut menunjukkan bahwa pada fraksi enzim kasar dan fraksi amonium sulfat, kemurniannya relatif rendah dengan banyaknya pita yang muncul. Pada fraksi kromatografi kolom Q sepharosa FF terlihat tiga pita sedangkan fraksi kromatografi kolom sephadex G-75 hanya terlihat dua pita, sehingga dapat disimpulkan bahwa tahap pemurnian dengan kromatografi kolom sephadex G-75 menghasilkan enzim dengan kemurnian relatif tinggi dibandingkan dengan tahapan sebelumnya. Berdasarkan *marker* (protein standar) pada Gambar 3, dan hasil perhitungan penentuan berat molekul diperoleh berat molekul enzim lipase hasil isolasi sebesar 40,7 kDa. Adapun pita yang muncul pada penunjuk berat molekul 19,6 kDa, karena terjadinya denaturasi pada molekul protein.

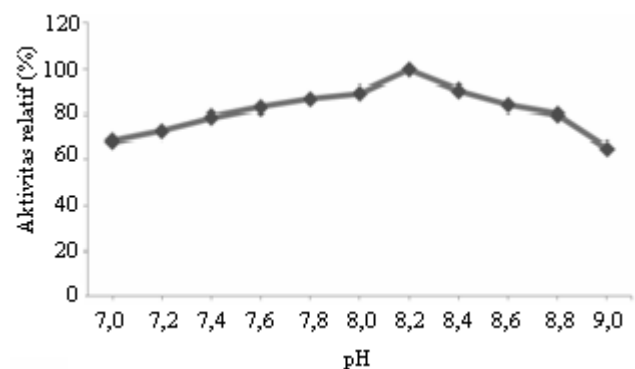
Berat molekul enzim lipase dari beberapa mikroba yaitu: *Mucor sp* 42 kDa (Abbas *et al.* 2002), *Bacillus cereus* C71 42 kDa (Shaoxin Chen *et al.* 2007) dan *Yarrowia lipolytica* 38 kDa (Mingrui Yu *et al.* 2007).

**Karakterisasi enzim lipase.** Pengamatan pengaruh pH terhadap aktivitas enzim lipase hasil pemurnian terlihat pada Gambar 4. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pH optimum enzim lipase yang diuji pada substrat *p*-nitrofenilbutirat 0,2 M adalah 8,2. Pengamatan terhadap pengaruh suhu, hasil yang diperoleh seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5, menunjukkan bahwa aktivitas



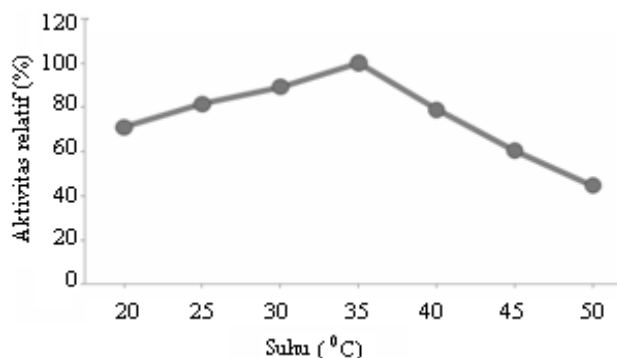
Gambar 3 Elektroforegram hasil elektroforesis gel SDS-PAGE 10% hasil pemurnian enzim lipase dari *Aspergillus oryzae*

Keterangan: Kolom 1 protein standar: Posforilase-b (116 kDa), BSA (66,2 kDa), ovalbumin (45 kDa), karbonik anhidrase (35 kDa), rease BSP 981 (25 kDa),  $\alpha$ -laktoglobulin (18,4 kDa), lisozim (14,4 kDa); kolom 2, ekstrak kasar enzim lipase; kolom 3, fraksi amonium sulfat (60-80)%; kolom 4, hasil dialisis; kolom 5, hasil pemurnian dengan matriks Q sepharosa FF; kolom 6, hasil pemurnian dengan matriks sephadex G-75.

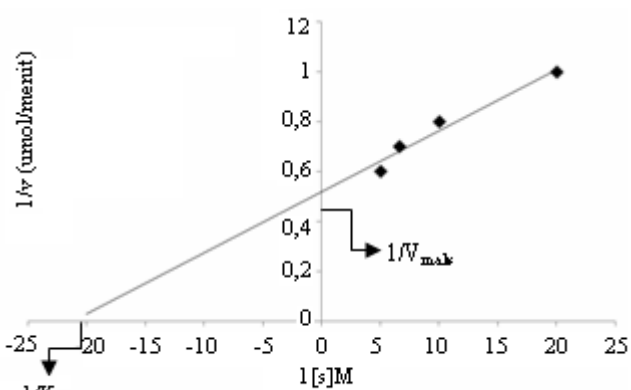


Gambar 4 Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim lipase (Kons. substrat 0,2 M; kons. enzim 45%; suhu 35°C)

enzim bertambah dengan meningkatnya suhu sampai 35°C dan setelah melewati suhu tersebut aktivitas menurun karena kemungkinan protein enzim mulai terdenaturasi. Dengan demikian suhu optimum untuk enzim lipase yang diproduksi dari sel *Aspergillus oryzae* pada kopra berjamur adalah 35°C.



Gambar 5 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Lipase (Kons.substrat 0,2 M; konsentrasi enzim 45%; pH 8,2)



$$y = 0,0244x + 0,5196$$

Gambar 6 Kurva Lineweaver-Burk hubungan antara 1/[substrat] dan 1/kecepatan katalitik

Karakter utama yang ditentukan dalam mempelajari sifat kinetik enzim adalah kecepatan katalitik maksimum ( $V_{maks}$ ) dan konsentrasi substrat pada saat kecepatan katalitik mencapai setengah maksimum ( $K_m$ ). Uji aktivitas enzim lipase menggunakan substrat *p*-nitrofenilbutirat pada interval (0-0,05) M dan menggunakan *p*-nitrofenol sebagai standar. Konstanta  $V_{maks}$  dan  $K_m$  ditentukan dengan metode Lineweaver-Burk. Grafik hubungan antara ( $1/v$ ) sebagai sumbu Y terhadap ( $1/S$ ) sebagai sumbu X diperlihatkan pada Gambar 6. Selanjutnya data-data yang diperoleh dibuat regresi liniernya dan diperoleh persamaan garis linier, yaitu:  $Y = 0,024 X + 0,519$ . Lereng regresi linier dimasukkan ke dalam persamaan Lineweaver-Burk  $1/V = (K_m/V_{maks})(1/S) + (1/V_{maks})$ , maka akan diperoleh nilai  $K_m = 0,046$  M dan  $V_{maks}$  adalah  $1,926 \mu\text{mol} \cdot \text{menit}^{-1}$ . Samsumaharto (2007), memperoleh nilai  $K_m = 0,011$  M dan nilai  $V_{maks} = 11,63 \mu\text{mol} / \text{menit}^{-1}$  terhadap substrat triolein hasil katalisis enzim lipase yang diisolasi dari *Theobroma cacao*. L. Nilai  $K_m$  yang tinggi menunjukkan afinitas terhadap substrat yang rendah. Semakin kecil nilai  $K_m$  semakin tinggi afinitasnya terhadap substrat, sehingga semakin rendah konsentrasi substrat yang dibutuhkan untuk mencapai kecepatan reaksi katalitik maksimumnya ( $V_{maks}$ ).

## SIMPULAN

Penambahan minyak zaitun sebanyak 3% (v/v), pepton 1% (v/v) sebagai media fermentasi sel *Aspergillus oryzae* dan kecepatan pengadukan 150 rpm menghasilkan aktivitas enzim lipase tertinggi dengan aktivitas sebesar 18.888 unit/ml. Pemurnian enzim lipase dengan kromatografi kolom sephadex G-75 memberikan kemurnian yang tertinggi yaitu 20,25 kali lebih besar dibandingkan dengan enzim kasarnya. Karakterisasi enzim lipase untuk menentukan kondisi optimumnya, diperoleh pH 8,2, suhu 35°C,  $K_m$  0,046 M, dan  $V_{maks}$  1,926  $\mu\text{mol}/\text{menit}^{-1}$  serta berat molekul 40,7 kDa.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih tim penulis sampaikan untuk Dr.Hj. Hasnah Natsir, M.Si dan Mahdalia, S.Si yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, H. Hiol, A. Deyris, V. & Comeau, L. 2002. Isolation and Characterization of an Extracellular Lipase from *Mucor sp* Strain Isolated from Palm Fruit. *Enzyme and Microbial Technology* **31**: 968-975.
- Bollag, D.M. & Edelstein, S.J. 1991. *Protein Methods A*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. 1957. *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press. Inc.
- Dali, S. & Pirman. 2005. Eksplorasi dan Isolasi Enzim Lipase dari Fungi Imperfeki (genus *Aspergillus* dan *Penicillium*) Indigenus. *Lembaga Penelitian UNHAS*.
- Deutscher, M.P. 1990. *Methods in Enzymology*. Vol. 128. Guide to Protein Purification. Publisher, NY, Academic Press Inc.
- Halldorsson, A., Kristinsson, B., Glynn, C. & Haraldsson, G.G. 2003. Separation of EPA and DHA in Fish Oil by Lipase-catalyzed Esterification With Glycerol. *JAOCs* **80(9)**: 915-921.
- Kao Corporation. 2004. General Properties and cooking characteristic of diacylglycerol as an edible oil in Y. Katsuragi (ed). *Diacylglycerol oil*. Chapter 19-22, AOCS Press.P 197-252.
- Ling-Zhi Cheong, Chin-Ping Tan, Long,K., Yusoff, M., S., A., Arifin, N., Seong-Koon Lo. & Oi-Ming Lai. 2007. Production of a Diacylglycerol-Enriched Palm Olein Using Lipase-Catalyzed Partial Hydrolysis: Optimization Using Response Surface Methodology. *Food Chemistry* **105**: 1614-1622.
- Mingrui Yu, Shaowei Qin, & Tanwei Tan. 2007. Purification and Characterization of the Extracellular Lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry* **42**: 384-391.
- McNeill, G.P. & Sonnet, P.E. 1995. Low-calory Synthesis by Lipase-catalyzed Esterification of monoglycerides. *JAOCs* **72(11)**: 1301-1307.
- Putranto, A.R., Santoso, D., Tri-Panji, Suharyanto & Budiani, A. 2006. Karakterisasi Gen Penyandi Lipase dari Kapang *Rhizopus oryzae* dan *Absidia corymbifera*. *Menara Perkebunan* **74(1)**: 23-32.
- Samsumaharto, R.A. 2008. Partial Characterization of Lipase From Cocoa Beans (*Theobromacacao*, L.) of Clone PBC 159. *Indo. J. Chem* **3**: 448-453.
- Shaixin Chen, Lili Qian & Bingzhao Shi. 2007. Purification and Properties of Enantioselective Lipase From a Newly Isolated *Bacillus cereus* C71. *Process Biochemistry* **42**: 988-944.

- Sharma, R., Chisti, Y. & Banerjee, U.C.** 2001. Production, purification, characterization, and application of lipase. *Biotechnology Advances* **19**: 627-662.
- Vorderwulbecke, T., Kieslich, K. & Erdmann, H.** 1992. Comparison of lipases by different assay. *Enzyme. Microb. Technol* **14**: 631-639.
- Weisser, H.M.** 1962. Practical food microbiology and technology. Avi publishing company, Westport connecticut winkler, F.K., D'Arcy, A., and Hunziker, W.1990. *Structure of Human Pancreatic Lipase Nature* **343**: 771-774.