

Produksi, Karakterisasi, dan Isolasi Lipase dari *Aspergillus niger* menggunakan Minyak Goreng Sawit sebagai Induser

Production, Characterisation, and Isolation of Lipase from *Aspergillus niger* by using Palm Oil as Inducer

Sri Wahyu Murni*, Siti Diyar Kholisoh, Tanti D.L. and Petriessia E.M.

Program Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, UPN "Veteran" Yogyakarta
Jl. SWK 104 (Lingkar Utara), Condong Catur, Yogyakarta 55283

Artikel histori :

Diterima: 2 Juni 2015
Diterima dalam revisi: 6 Juni 2015
Diterima: 8 Juli 2015
Online: 9 Juli 2015

ABSTRAK: Tujuan penelitian ini adalah memproduksi, mengisolasi, dan mengkarakterisasi lipase dengan induser minyak goreng sawit. Fermentasi submerged 1,4 L digunakan selama proses produksi pada suhu kamar, dengan pH awal 7, kecepatan pengadukan 250 rpm, kecepatan aerasi vvm, dan konsentrasi induser 3%-m/v minyak goreng sawit. Enzim **dikarakterisasi** pada variasi temperature dan pH. Lipase dihasilkan secara optimum pada pH 7 dan suhu 30 °C dengan aktivitas 1,5 u/ml. Isolasi lipase menghasilkan 4 kali peningkatan dengan menggunakan 90% amonium sulfat

Kata Kunci: *Aspergillus niger*; aktivitas enzim; lipase; minyak goreng sawit.

ABSTRACT: The objective of the research was to produce, isolate and characterise lipase from *Aspergillus niger*, and therefore inducted it by using palm oil. The lipase enzyme was produced through a batch fermentation process in a 1.4 liters-fermentor. Fermentation was carried out at room temperature, initial pH of 7, the stirring speed of 250 rpm, aeration rate of 1 vvm, and inducer concentration of 3%-m/v palm oil/ml. Enzymes was characterised at several temperature and pH variations. The lipase showed the optimum performance at pH of 7 and temperature of 30 °C with the activity of 1.5 U / ml. Isolation of lipase yielded a 4-times-increase in its activity by using 90% ammonium sulfate.

Keywords: *Aspergillus niger*; enzyme activity; lipase; palm oil

1. Pendahuluan

Enzim merupakan produk yang mempunyai nilai ekonomis tinggi dan telah menjadi alat praktis yang penting karena sangat diperlukan untuk menunjang berbagai proses dalam industri pangan maupun non pangan (Darwis dan Sukara, 1990). Contoh pemanfaatan enzim yaitu pada proses industri untuk hidrolisis lemak/minyak menjadi asam lemak dan gliserol. Asam lemak dan gliserol merupakan produk oleokimia dasar yang sangat diperlukan oleh industri kosmetik, plastik, cat, deterjen, dan sabun. Dewasa ini proses tersebut beroperasi pada suhu 240 – 250 °C dan tekanan 45 – 50 atm. Pada proses ini diperlukan energi yang cukup besar untuk mempertahankan kondisi operasinya dan juga asam lemak yang dihasilkan umumnya berwarna coklat yang akan mengakibatkan rusaknya komponen-komponen minor yang terkandung di dalam minyak, misalnya β -karoten. (Herawan dan Nuryanto, 1996). Pada kondisi operasi tersebut, campuran reaksi bersifat korosif, yang mengakibatkan kebutuhan investasi untuk peralatan relatif

besar, karena selain harus tahan terhadap suhu dan tekanan tinggi peralatan harus dibuat dari bahan yang tahan korosi. Proses hidrolisis enzimatik dengan menggunakan enzim lipase dapat memenuhi kriteria tersebut, karena proses ini beroperasi pada suhu yang relatif rendah antara 30 – 60 °C dan tekanan atmosferik, sehingga aman bagi lingkungan kerja dan tidak memerlukan energi yang cukup besar. Di samping itu, produk yang dihasilkan mempunyai kualitas yang relatif lebih baik dibandingkan produk sejenis yang dibuat dengan proses kimia/fisika, karena relatif tidak terjadi kerusakan akibat pemanasan pada suhu tinggi. Dengan melihat banyaknya kegunaan atau manfaat dari enzim lipase di atas, maka enzim lipase layak untuk diproduksi dan memiliki peluang yang cukup besar untuk digunakan dalam proses hidrolisis minyak nabati di Indonesia.

Penelitian terakhir (Sumathy dan Vijayalakshmi, 2014) menggunakan minyak kelapa sawit sebagai induser. Diperoleh hasil enzim dari *A.niger* yang lebih tinggi dibanding minyak biji bunga matahari, maupun minyak kelapa. Namun penelitian ini menggunakan metode Solid

* Corresponding Author: Telp./Fax. +62-274-486889
Email: wahyuswm@yahoo.com

State Fermentation (SSF). Sementara Colla dkk (2015) membandingkan produksi dan karakterisasi lipase dari *Aspergillus* dengan metode SSF maupun SmF diperoleh stabilitas lipase lebih baik pada metode SmF.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan produksi dan karakterisasi enzim lipase dari *Aspergillus niger* dengan induser minyak goreng sawit dengan metode submerged fermentation (SmF), serta isolasinya. Karakterisasi bertujuan untuk memperoleh kondisi optimum kinerja enzim, sedangkan isolasi enzim bertujuan untuk memperoleh enzim dengan aktivitas tinggi.

2. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui tahap-tahap: (1) penyiapan bahan dan alat, (2) penyediaan biakan murni jamur *Aspergillus niger* dalam media agar miring, (3) penyediaan biakan dalam media *starter*, (4) percobaan pendahuluan untuk memperoleh waktu optimum inokulasi jamur di dalam media *starter*, (5) fermentasi untuk memproduksi enzim lipase, karakterisasi enzim lipase dalam berbagai variasi suhu dan pH, serta (6) isolasi enzim lipase menggunakan metode *salting out* dengan garam amonium sulfat dari cairan hasil fermentasi.

2.1 Bahan

Bahan yang digunakan meliputi: (1) biakan jamur *Aspergillus niger* FNCC 0060 dalam media agar miring yang diperoleh dari PAU Bioteknologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta, (2) minyak goreng sawit, dengan merk dagang Kunci Mas, sebagai induser, (3) media agar miring, dengan komposisi per 100 ml: taoge 10 g, glukosa 6 g, agar *bacteriologica* 1,8 g, dan (4) media *starter* dan fermentasi, dengan komposisi per 100 ml: NH_4NO_3 0,1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, KH_2PO_4 0,2 g, sukrosa 1 g, minyak goreng sawit 1g, (5) bahan-bahan untuk analisis meliputi: larutan *buffer* fosfat (pH 6,5, 7, dan 7,5), larutan aseton-alkohol (1:1) teknis, larutan KOH alkoholis 0,05 N, dan indikator *phenolphthalein* (pp). Bahan-bahan untuk analisis kadar protein dengan metode Lowry meliputi: larutan protein, aquades, reagen Lowry A, reagen Lowry B, kristal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dan larutan *buffer* asetat pH 5,0.

2.2 Alat

Produksi enzim dilakukan dalam sebuah fermentor berupa tangki berpengaduk yang bervolume 2 liter. Uji karakterisasi enzim dilakukan dengan menggunakan motor pengaduk magnetik berpemanas, sedangkan *centrifuge Micro High Speed Refrigerated Centrifuge* VS-15000 CFN II digunakan untuk proses isolasi enzim.

2.3 Proses Fermentasi

Proses fermentasi atau produksi enzim lipase diawali dengan menyiapkan media fermentasi sebanyak 1,4 liter yang sudah mengandung 3% b/v induser minyak goreng sawit. Campuran ini dimasukkan ke dalam fermentor, dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama ± 15 menit. Setelah dingin, cairan fermentasi diatur pada pH

netral (pH = 7) dengan larutan NaOH 50%. Media *starter* sebanyak 10% (dari volume kerja fermentor) diinokulasikan secara aseptik ke dalam fermentor, dan saat inokulasi ini dihitung sebagai waktu ke-0 fermentasi. Fermentasi dilakukan pada suhu ruang selama 24 jam dengan laju putaran pengadukan 250 rpm dan laju aerasi 1 vvm. Pengambilan sampel dilakukan setiap interval waktu 4 jam. Selanjutnya sampel dianalisis aktivitas enzim lipase menggunakan metode Lindfield dkk (1984) dan berat kering selnya menggunakan metode gravimetri.

2.4 Karakterisasi Enzim

Aktivitas enzim lipase menyatakan jumlah enzim yang mampu menghidrolisis sejumlah lemak dan minyak dalam satu satuan waktu. Satu unit lipase per ml (U/ml) menyatakan banyaknya enzim lipase yang dapat melepaskan 1 μmol asam lemak bebas per menit.

Analisis Aktivitas Enzim Lipase menggunakan Metode Lindfield, dkk. (1984). Sebanyak 2 gram minyak goreng sawit ditimbang dalam labu Erlenmeyer 150 ml. Setelah itu tambahkan 1 ml larutan enzim encer hasil fermentasi yang telah disaring dan 4 ml larutan *buffer* fosfat 0,05 M, pH 7,5. Campuran diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 1 jam. Selanjutnya, tambahkan 10 ml aseton-alkohol (1:1) dan aduk hingga homogen. Tambahkan 2-3 tetes indikator pp (*phenolphthalein*) pada larutan yang telah diaduk. Titrasi dengan menggunakan KOH alkoholis 0,05 N. Hentikan titrasi pada saat warna larutan menjadi merah jambu dan tidak hilang, catat volume titrasinya. Larutan blanko dibuat dengan cara yang sama dengan sampel, tetapi larutan aseton-alkohol (1:1) ditambahkan pada jam ke-0, sebelum diaduk, untuk mematikan enzim. Aktivitas enzim lipase dapat dihitung dengan persamaan 1:

$$\text{aktivitas lipase (U/ml)} = \frac{(A - B) \times N \text{ KOH} \times 1000}{60} \quad (1)$$

dengan: A \equiv ml KOH untuk titrasi sampel, B \equiv ml KOH untuk titrasi blanko, 1000 \equiv konversi dari mmol ke μmol , dan 60 \equiv waktu reaksi (1 jam = 60 menit).

2.5 Isolasi Enzim

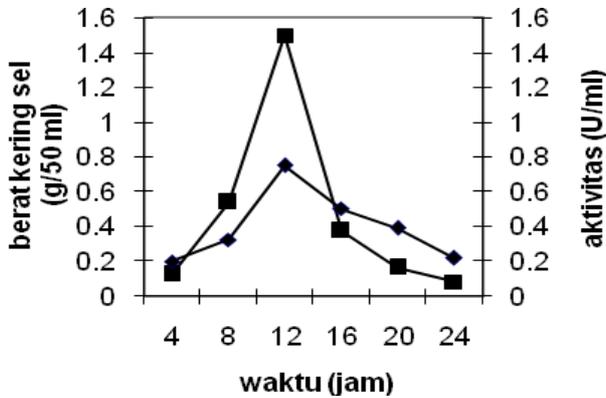
Hasil fermentasi dipisahkan antara cairan dan *cake*-nya. Cairan hasil pemisahan dipekatkan menggunakan amonium sulfat hingga kejenuhan 90%, kemudian didinginkan sampai suhu di bawah 10°C . Selanjutnya disentrifugasi dengan laju putaran 15000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C . Endapan yang diperoleh dikumpulkan, diuji aktivitas lipasnya, dan diuji kandungan proteinnya menggunakan metode Lowry (Sudarmadji, 1984).

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Pertumbuhan dan Produksi Enzim Lipase

Aspergillus niger mengalami pertumbuhan dan perkembangbiakan sel dalam memproduksi enzim lipase hingga mencapai puncaknya pada suatu waktu tertentu dan setelah itu pertumbuhannya akan mengalami penurunan. Dari Gambar 1, dapat dilihat bahwa produksi enzim lipase dari *Aspergillus niger* mengikuti pola *growth-associated*

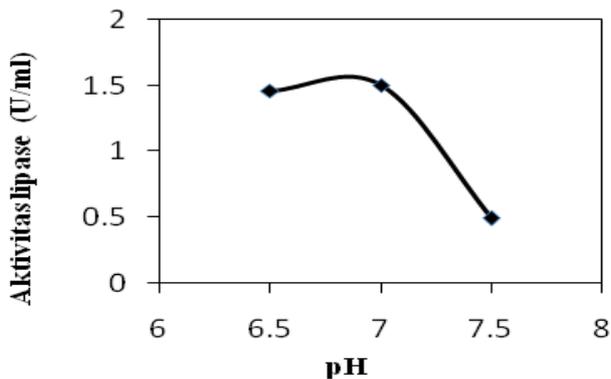
product formation. Hal ini disebabkan karena produksi enzim berfungsi mendukung pertumbuhan sel. Enzim mulai dihasilkan pada saat awal pertumbuhan sel. Penurunan pertumbuhan *Aspergillus niger* ditandai dengan turunnya berat kering sel yang diikuti dengan penurunan aktivitas enzim lipase.



Gambar 1. Profil Berat Kering Sel serta Aktivitas Enzim

3.2 Karakterisasi Kinetik Enzim Lipase Hasil Produksi

Enzim lipase hasil produksi dikarakterisasi dengan variabel pH dan suhu. Karakterisasi enzim lipase dilakukan setelah jamur *Aspergillus niger* difermentasi dalam fermentor selama 20 sampai 24 jam dengan interval waktu pengambilan sampel setiap 4 jam sekali.



Gambar 2. Pengaruh pH Pengujian terhadap Akti- vitas Enzim Lipase (Suhu 30°C, Fermentasi 12 jam)

Pengaruh pH pengujian terhadap aktivitas enzim lipase disajikan pada Tabel 1. Pada tiap run diperoleh kondisi pH optimum pada uji aktivitas enzim lipase dicapai pada pH 7 (netral). Pada pH tinggi atau rendah memungkinkan terjadinya denaturasi dan ini akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim. Karena enzim merupakan protein, perubahan pH akan menyebabkan ionisasi pada molekul protein berubah pula. Perubahan ini akan mengakibatkan struktur tiga dimensinya berubah sehingga fungsi katalitiknya terganggu. Terlihat pada Gambar 2, ada

rentang pH yang dapat menyebabkan aktivitas lipase tertinggi, dan pH inilah yang dinamakan dengan pH optimum. Besarnya pH optimum yang sama, yaitu pH = 7, dilaporkan untuk lipase dari *Calvatia gigantea* (Christakopoulos, 1992).

Tabel 1. Aktivitas Enzim pada Variasi pH (suhu ± 30°C)

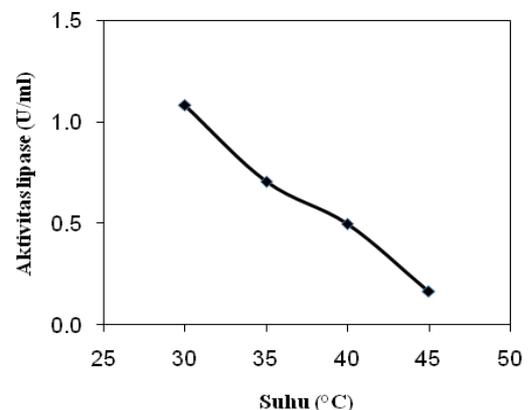
Jam ke-	Aktivitas Enzim (U/ml)		
	pH 6,5	pH 7	pH 7,5
4	0,33	0,12	0,12
8	0,58	0,54	0,25
12	1,46	1,50	0,49
16	0,46	0,37	0,17
20	-	0,17	-
24	0,17	0,08	0,08

Pengaruh suhu pengujian terhadap aktivitas enzim disajikan pada Tabel 2. Terlihat bahwa aktivitas lipase tertinggi dicapai pada suhu 30°C. Hasil ini sama dengan yang diperoleh untuk *Calvatia gigantea* (Christakopoulos, 1992) dan sedikit berbeda dari Colla dkk. (2015) pada pH 7,2 dan suhu 37°C yang menggunakan *Aspergillus flavus* pada fermentasi submerged.

Tabel 2. Nilai Aktivitas Enzim Lipase pada Berbagai Suhu Pengujian dan pH 7

Jam ke-	Aktivitas enzim (U/ml)			
	Suhu 30°C	Suhu 35°C	Suhu 40°C	Suhu 45°C
4	0,46	-	0,25	0,04
8	0,67	0,54	0,37	0,08
12	1,08	0,71	0,50	0,17
16	0,62	0,42	0,29	0,12
20	0,33	0,17	0,08	0,04

Tabel 2 menginformasikan bahwa aktivitas lipase semakin menurun seiring dengan kenaikan suhu. Pencapaian aktivitas lipase terendah berada pada suhu 45°C, yang merupakan suhu tertinggi pada percobaan ini. Hal ini dikarenakan enzim lipase mengalami kerusakan pada suhu yang lebih tinggi.



Gambar 3. Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Enzim Lipase (pH 7, Fermentasi 12 jam)

Enzim merupakan protein, maka suhu tinggi dapat menyebabkan denaturasi protein, yaitu kerusakan pada struktur sekunder protein. Struktur sekunder protein berupa ikatan hidrogen yang terbentuk dari ujung-ujung polar dari suatu rantai protein.

Kerusakan struktur sekunder menyebabkan struktur tiga dimensi protein berubah. Perubahan ini menyebabkan terganggunya fungsi protein sebagai katalis, di mana kerja suatu enzim dianalogikan sebagai gembok dan kunci. Apabila struktur tiga dimensi berubah tentunya gembok dan kunci tidak cocok lagi, atau dengan kata lain aktivitas katalitik enzim terganggu. Pengaruh suhu terhadap aktivitas lipase juga dapat dilihat pada Gambar 3. Berdasarkan percobaan yang telah dilakukan, terlihat bahwa enzim lipase mampu menunjukkan kinerjanya secara optimum pada pH 7 dan suhu 30°C.

3.3 Isolasi Enzim Lipase.

Isolasi enzim lipase dilakukan untuk memekatkan lipase dari cairan hasil fermentasi. Isolasi ini dilakukan setelah proses fermentasi *A.niger* selama 12 jam, karena pada jam ke-12 jamur *A.niger* menghasilkan lipase dengan aktivitas tertinggi, sesuai dengan hasil pada percobaan sebelumnya.

Tabel 3. Isolasi Enzim Lipase

	V	C _p	C _t	E	Et	Y
C _{E0}	100	0,52	52,4	0,92	91,67	100
C*	17	2,56	43,47	4	68	74,18

Hasil isolasi enzim lipase pada Tabel 3 menunjukkan bahwa konsentrasi protein meningkat setelah enzim encer dipekatkan dengan (NH₄)₂SO₄ hingga kejenuhan 90% (C_{E1}). Amonium sulfat merupakan garam yang sangat larut. Kenaikan konsentrasi amonium sulfat menyebabkan enzim keluar dari larutan membentuk endapan, dan proses ini disebut dengan *salting out*. Meningkatnya konsentrasi protein diikuti dengan meningkatnya aktivitas lipase dari 0,9167 U/ml menjadi 4 U/ml, atau peningkatan lebih dari 4 kali lipat. Hal ini juga sesuai dengan penelitian yang menggunakan ammonium sulfat kejenuhan 75% diperoleh peningkatan aktivitas lipase dari 219 U/ml menjadi 1389 U/ml pada bakteri *Bacillus cereus* (Ananthi dkk., 2014).

Peningkatan aktivitas tersebut disebabkan oleh konsentrasi protein tiap ml mengalami kenaikan setelah dipekatkan, namun kenaikan aktivitas enzim tidak diikuti oleh total protein yang diperoleh. Penurunan total protein ini dimungkinkan karena tidak semua protein yang terdapat dalam cairan enzim encer dapat terambil. Meskipun aktivitas lipase per ml mengalami peningkatan cukup signifikan, namun karena protein pada saat setelah dipekatkan tidak dapat terambil seluruhnya sehingga diperoleh *yield* aktivitas lipase sebesar 74,18%.

4. Kesimpulan

Enzim lipase dapat diproduksi oleh jamur *A.niger* dengan induser minyak goreng sawit melalui proses fermentasi. Karakterisasi kinetik enzim lipase yang

dihasilkan menunjukkan aktivitas enzim tertinggi dicapai pada pH 7 dan suhu 30°C. Proses isolasi enzim menggunakan garam amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 90% menghasilkan peningkatan aktivitas enzim dari 0,9167 U/ml menjadi 4 U/ml.

Daftar Notasi

C _{E0}	= enzim lipase encer
C*	= enzim lipase setelah dipekatkan (NH ₄) ₂ SO ₄ 90%
C _p	= konsentrasi protein (mg/ml)
C _{pt}	= konsentrasi total protein (mg)
E	= aktivitas lipase (U/ml)
Et	= aktivitas lipase total (U)
Y	= yield aktivitas lipase (%)
V	= volume total (ml)

Daftar Pustaka

- Ananthi S., Ramasubburayan, R., Palavesam, A., Immanuel, G., 2014, Optimization and purification of lipase through solid state fermentation by *Bacillus cereus* msu as isolated from the gut of a marine fish *Sardinella longiceps*, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 6 (5): 291-298.
- Christakopoulos, P., Constantina Tzia, Dimitris Kekos, and basil J. Macris, 1992, *Production and characterization of extracellular lipase from Calvatia gigantea*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 132:194-197.
- Colla, L.M., Aline M. M. Ficanha, Juliana Rizzardi, Telma Elita Bertolin, Christian Oliveira Reinehr, and Costa, J.A.V., 2015, Production and Characterization of Lipases by Two New Isolates of *Aspergillus* through Solid-State and Submerged Fermentation, *BioMed Research International*, 2015: 1-9.
- Darwis, A. Aziz, dan E. Sukara, 1990, *Isolasi, Purifikasi, dan Karakterisasi Enzim*, Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Herawan, Tjahjono dan Eka Nuryanto, 1996, Hidrolisis Minyak Sawit Menggunakan Lypozyme dari *Mucor meihei*, *Jurnal Penelitian Kelapa Sawit*. 4(2): 91-95.
- Lindfield, et.al., 1984, Lipid-lipase Interaction I. Fat Splitting with *Candida rugosa*, *JAOCS*, 61(6): 1067-1071.
- Sudarmadji, Slamet, dkk., 1984, *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*, 3^{ed}, Liberty, Yogyakarta.
- Sumathy, R., and Vijayalakshmi, M., 2014. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid state fermentation and its applications. *Int. J. Pharm. Bio.Sci.* 5 (3): 559-569.