

ISOLASI BAKTERI PENGHASIL ENZIM LIPASE DARI *COCO BUTTER* *SUBSTITUTE* DAN KARAKTERISASI LIPASENYA

Ivonne Telussa

Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Pattimura

Jl. Ir. M. Putuhena-Kampus Poka Ambon

ivont@ymail.com

ABSTRAK

Enzim yang digunakan untuk aplikasi industri dan bioteknologi umumnya berasal dari jamur dan bakteri. Saat ini industri-industri di Indonesia yang memanfaatkan enzim lipase, masih bergantung pada enzim produksi luar negeri. Indonesia merupakan negara yang memiliki kekayaan alam yang tinggi, termasuk keanekaragaman mikroorganisme. Beberapa jenis mikroorganisme menghasilkan lipase yang berpotensi untuk dimanfaatkan pada industri. Enzim ini dimanfaatkan secara luas dalam bidang industri, seperti pada industri makanan, susu, detergen, *pulp* kertas, dan farmasi. Beberapa jenis mikroorganisme penghasil lipase yang berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai sumber lipase. Dalam penelitian ini dilakukan isolasi bakteri penghasil lipase dari *coco butter substitute* dan karakterisasi biokimia terhadap lipase. Satu isolat bakteri penghasil lipase yang berhasil diisolasi yaitu *Staphylococcus epidermisis* yang menghasilkan lipase dan aktif terhadap lipid pada temperatur tinggi. *Staphylococcus epidermisis* tumbuh sangat cepat pada temperatur 37°C dan lipase yang dihasilkan menunjukkan aktivitas maksimum pada akhir fase eksponensial. Lipase dari *Staphylococcus epidermisis* merupakan enzim ekstraseluler yang diekskresikan ke medium pertumbuhan bakteri. Enzim ini dimurnikan secara parsial menggunakan fraksinasi ammonium sulfat hingga dihasilkan 5 fraksi, yakni fraksi 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, dan 80-100%. Uji aktifitas menggunakan substrat para-Nitrofenil palmitat menunjukkan bahwa fraksi dengan aktivitas tertinggi untuk *Staphylococcus epidermisis* adalah fraksi 20-40%. Hasil karakterisasi biokimia menunjukkan bahwa aktivitas optimum lipase dari *Staphylococcus epidermisis* terdapat pada temperatur 70°C dan pH 7. Analisis massa molekul dengan Sodium dedosil Sulfat poliakrilamid gel elektroforesis (SDS page) dari hasil pemurnian parsial menunjukkan keberadaan satu pita protein lipase dengan massa molekul 56 kDa dari *Staphylococcus epidermisis*.

Kata kunci: *Coco butter substitute*, *Lipase*, *Staphylococcus epidermisis*

PENDAHULUAN

Enzim merupakan suatu biokatalis yang mempunyai peranan penting dalam industri, pertanian dan kesehatan. Enzim yang digunakan untuk aplikasi industri dan bioteknologi umumnya berasal dari jamur dan bakteri. Sebagian besar pasar industri enzim terisi dengan enzim hidrolitik seperti protease, amilase, amidase, esterase dan lipase. Enzim lipase (triacylglycerol acylhydrolase, E.C. 3.1.1.3) belakangan ini muncul sebagai enzim kunci dalam perkembangan bioteknologi dengan cepat, karena ciri mereka yang beragam, yang penggunaannya ditemukan dalam aplikasi industri secara luas, seperti teknologi pangan, detergen, industri kimia, dan sains biomedikal. Enzim lipase banyak ditemukan dalam berbagai hewan, tanaman, bakteri, ragi dan jamur. Umumnya, banyak yang menyukai enzim yang berasal dari mikroorganisme karena mereka berpotensi secara aplikasi dalam berbagai industri. Banyak industri penting pengadaan bahan kimia dari lemak dan minyak melalui

proses kimia dapat dihasilkan oleh lipase pada kondisi sedikit dengan kecepatan yang besar dan kekhususan yang lebih baik.

Saat ini industri-industri di Indonesia yang memanfaatkan enzim lipase, masih bergantung pada enzim produksi luar negeri. Padahal Indonesia memiliki kekayaan alam yang tinggi misalnya kelapa sawit, yang dapat memproduksi olahan minyak sawit yang baik untuk pangan maupun oleokimia dengan nilai jual yang tinggi dibandingkan dengan minyak sawit mentah (CPO). Produksi olahan CPO tersebut dapat dilakukan dengan efisien menggunakan proses biokonversi enzimatik dengan menggunakan enzim lipase. Kendala pengembangan proses biokonversi enzimatik dalam skala industri ini adalah ketersediaan dan harga lipase impor yang mahal karena hanya sedikit produsen lipase di dunia. Hal ini yang menyebabkan Biaya yang dikeluarkan untuk mengimpor enzim produksi luar negeri sangat tinggi, sehingga biaya produksi juga akan lebih mahal sehingga berdampak pada naiknya harga produk-produk hasil olahannya. Indonesia merupakan negara yang memiliki kekayaan alam yang tinggi, termasuk keanekaragaman mikroorganisme. Beberapa jenis mikroorganisme menghasilkan lipase yang berpotensi untuk dimanfaatkan pada industri. Untuk itu, diperlukan penelitian untuk mengembangkan lipase dalam negeri khususnya yang bersumber dari mikroorganisme. Untuk aplikasi industri diperlukan lipase yang dapat diproduksi dalam jumlah besar dan aktivitas yang tinggi dengan biaya produksi yang ekonomis. Diharapkan nantinya Indonesia dapat memenuhi kebutuhan akan enzim dalam negeri sendiri, sehingga dapat menurunkan biaya produksi produk-produk olahan dengan enzim.

Dalam penelitian ini akan dilakukan isolasi bakteri yang dapat menghasilkan lipase dari sampel *coco buter substitute* sehingga dapat digunakan untuk memproduksi dan mengkarakterisasi lipase. Karakterisasi yang dilakukan meliputi penentuan suhu dan pH optimum lipase, serta penentuan massa molekul.

METODE PENELITIAN

Alat

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia. Peralatan yang diperlukan yaitu peralatan gelas standar laboratorium (gelas kimia, gelas ukur, tabung reaksi, labu takar, labu Erlenmeyer, batang pengaduk, dan pipet tetes), ruang 4°C, neraca analitis (Ohaus), jarum oose, botol semprot, spatula, cawan petri, shaker (Rossi), pipet mikro 100-1000 µL, 10-100 µL, dan 1-10 µL (effendorf, Jerman), spektrofotometer UV-Vis (Spectronic 20 Genesys), kuvet plastik, termometer, penangas air (Imperial), sentrifuga dingin (Beckman), sentrifuga mikro (effendorf), tabung sentrifuga, tabung mikro (effendorf), pengaduk magnetik (Fischer), batang pengaduk magnetik, pHmeter (Orion), kolom kromatografi.

Bahan

Sampel yang digunakan yaitu *bakteri lokal Staphylococcus epidermidis* dan buah bintangur pantai (*Callophylum inophyllum* L). Bahan yang diperlukan berderajat pro-analisis kecuali yang disebutkan lain. Bahan-bahan yang diperlukan yaitu media pertumbuhan (*bacto agar*, pepton, beef ekstrak, dan NaCl), media produksi (pepton, NaCl, CaCl₂, tween 20), KH₂PO₄ (merck), K₂HPO₄ (merck), p-nitrofenol (sigma), p-nitrofenilpalmitat (sigma), asetonitril (sigma), etanol (sigma), etanol 70% (teknis), BSA (sigma), tris-base (merck), HCl (merck), glisin (merck), metanol (merck), asam asetat glasial (merck), minyak zaitun (*market stock*), rhodamin B, ammonium sulfat (merck), kantung dialisis (sigma), aquades, , tip biru, tip kuning, tip putih, kapas, kassa, aluminium foil, akrilamid, bis akrilamid, ammonium persulfat (APS), Protein Marker, Coomassie Brilliant Blue R-250, TEMET, SDS (sodium dedocyl sufat), n-heksan, petroleum eter, twen 20, dan methanol.

Prosedur Kerja

1. Sreening Mikroorganisme Lipolitik

Bakteri diisolasi dari Sampel *coco buter substitute* dengan menggunakan media cair nutrient broth dan Kultur diinkubasi pada 37°C 150 rpm selama 24 jam. Bakteri dipindahkan secara aseptik pada tabung reaksi yang berisi medium cair Nutrient broth 1 mL secara kontinyu pada 5 tabung dimasukkan sebanyak 10 µL dan dengan menggunakan batang-L (*spreader*) dipindahkan pada media padat Nutrient broth kemudian diinkubasi pada 37°C. Sejumlah koloni yang diperoleh ditotolkan pada media rhodamine secara aseptik. Bakteri pada media *rhodamine B* kemudian diinkubasi pada temperatur 37°C selama 2-8 hari, kemudian diamati dibawah sinar UV. Sebagai kontrol positif digunakan bakteri *E. coli*.

2. Peremajaan Kultur Sel

Isolat Bakteri dipindahkan secara aseptik dengan menggunakan batang-L (*spreader*) pada media padat Nutrient broth yang telah disterilkan dengan alat *autoclave* selama 20 menit. Bakteri kemudian diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam. Kultur bakteri kemudian dipindahkan ke media Nutrient broth baru secara aseptik menggunakan kawat ose dan diinkubasi kembali pada 37°C selama 24 jam.

3. Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Pembuatan kurva pertumbuhan diawali dengan pembuatan *starter*. Koloni tunggal bakteri pada media padat ditanam pada 20 mL media cair Nutrient Broth (tanpa *olive oil*) kemudian diinkubasi dalam *shaking incubator* pada temperatur 37°C dan kecepatan 150 rpm selama 24 jam. 0,1 mL *starter* kemudian dipindahkan ke dalam 100 mL media NB baru, lalu kembali diinkubasi pada temperatur 37°C dan kecepatan 150 rpm untuk dilakukan pengukuran OD (*Optical Density*) pada 600 nm dengan menggunakan *Spectronic 20 Genesys*. Pengukuran OD ini dilakukan setiap selang waktu 2 jam. Hal yang sama dilakukan juga untuk bakteri *Staphylococcus aureus* dengan kecepatan 200 rpm.

4. Uji Aktivitas Lipase

Selama melakukan pembuatan kurva pertumbuhan, pada setiap pengukuran OD diambil pula 1 mL kultur pada media Nutrient Broth yang diukur tersebut untuk diuji aktivitas optimumnya. Media ini dimasukkan dalam tabung *Eppendorf* 1,5 mL dan kemudian disentrifuga pada 12000xg selama 15 menit dengan menggunakan mikrosentrifuga (*Micro 22R, Zentrifugen*) pada temperatur 4°C. Selanjutnya supernatan dipindahkan pada tabung *Eppendorf* 1,5 mL steril baru. Aktivitas enzim pada fasa supernatan kemudian diuji dengan menggunakan substrat pNP-palmitat yang dilarutkan dalam asetonitril hingga konsentrasinya 10 mM. Substrat ini kemudian ditambahkan dengan etanol dan bufer kalium fosfat (pH 7.5) sehingga komposisi akhirnya adalah asetonitril : etanol : bufer = 1 : 4 : 95 (v/v/v). 0,6 mL larutan campuran tersebut kemudian ditambahkan dengan 0,4 mL enzim (supernatan hasil sentrifuga) dan diinkubasi pada temperatur 55°C dengan menggunakan *water bath* selama 15 menit. Absorban larutan ini kemudian diukur pada panjang gelombang 405 nm dengan menggunakan *Spectronic 20 Genesys*.

5. Produksi Enzim Lipase

Koloni tunggal bakteri pada media padat diinokulasi pada 20 mL media Nutrient broth cair, kemudian diinkubasi dalam *shaking incubator* pada temperatur 37°C dan kecepatan 150 rpm selama 24 jam untuk dijadikan *starter*. 0,1 mL *starter* kemudian dipindahkan ke dalam 100 mL media Nutrient Broth cair yang telah ditambahkan *olive oil* dan *tween 80* sebagai surfaktan. Campuran pada media produksi kemudian diinkubasi dalam *shaking incubator* pada temperatur 37°C dan kecepatan 150 rpm selama 16 jam. Untuk memisahkan sel bakteri dengan enzim maka dilakukan sentrifuga pada 12000xg selama 20 menit pada temperatur

4°C. Enzim lipase yang dihasilkan akan berada pada fasa supernatan. Hal yang sama dilakukan juga untuk bakteri *Staphylococcus aureus* dengan kecepatan 200 rpm.

6. Fraksinasi Amonium Sulfat

Fraksinasi ammonium sulfat dilakukan untuk memisahkan protein dalam beberapa fraksi. Dalam percobaan yang dilakukan, protein dibagi menjadi 4 fraksi, yaitu fraksi 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60%-80% dan 100%. Untuk menghasilkan fraksi 0-20%, 5,3 gr ammonium sulfat yang sudah dihaluskan dilarutkan dalam 50 mL *crude extract* di dalam ruang dingin lalu diaduk dengan pengaduk magnetic secara perlahan. Selanjutnya campuran diendapkan dengan cara sentrifugasi pada 12000xg selama 20 menit, selanjutnya supernatan dipisahkan dengan endapannya. Endapan dilarutkan dengan tris-HCl 50 mM pH 7 dengan volume sesedikit mungkin. Larutan ini merupakan fraksi ammonium sulfat 0-20%. Supernatan kemudian ditambah dengan 5,65 gr amonium sulfat untuk memperoleh fraksi 20-40%. Hal yang sama dilakukan juga untuk memperoleh fraksi 40-60%, 60%-80% dan 100%.

7. Dialisis

Dialisis dilakukan dengan memasukkan fraksi-fraksi enzim ke dalam kantong selofan yang diikat bagian atas dan bawahnya. Lalu enzim dalam plastik selofan ini direndam dalam tris-HCl pengenceran 5x dari yang digunakan untuk mengencerkan enzim selama total 16 jam. Untuk mengetahui masih adanya garam ammonium sulfat pada enzim, dilakukan uji kualitatif ammonium sulfat yaitu dengan menambahkan larutan BaCl₂ 1% (b/v) ke dalam cuplikan tris-HCl. Dialisis dilakukan sampai ammonium sulfat dalam fraksi enzim setimbang dengan larutannya.

8. Karakterisasi Lipase

a. Penentuan Temperatur Optimum

Setelah diperoleh pH optimum maka dilakukan penentuan temperatur optimum. Cara uji aktivitas yang dilakukan sama seperti sebelumnya yakni dengan menggunakan substrat pNP-palmitat. Campuran enzim dan substrat kemudian diinkubasi pada rentang temperatur 50-90°C selama 20 menit. Selanjutnya absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer *Genesys 20* pada panjang gelombang 405 nm.

b. Penentuan pH Optimum

Fraksi enzim dengan aktivitas tertinggi kemudian dikarakterisasi pH dan temperatur optimumnya. Untuk mengetahui pH optimum, maka dilakukan pengujian aktivitas dengan menggunakan substrat pNP-palmitat pada berbagai pH. Rentang pH yang digunakan adalah 5,6,7,8, dan 9. Larutan substrat dan enzim kemudian diinkubasi pada temperatur optimum selama 15 menit. Selanjutnya larutan ditentukan absorbansinya pada panjang gelombang 405 nm.

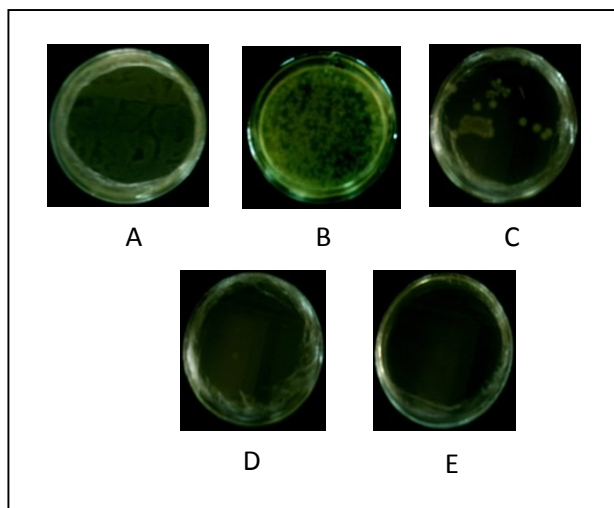
c. Perkiraan massa molekul lipase (SDS-PAGE)

Elektroforesis protein dengan SDS-PAGE dilakukan dengan menggunakan gel pemisah 12% poliakrilamida dan gel penahan 5% poliakrilamida (Laemli, 1970). Sebagai standar protein digunakan standar protein dari *Fermentas* yang diisikan ke dalam sumur sebanyak 5 µl. Kemudian sampel dan standar protein dilarikan dalam gel elektroforesis selama 70 menit pada tegangan 150 V, 400 A. Setelah elektroforesis gel diwarnai dengan CBB R-250 selama 12 jam. Gel hasil pewarnaan kemudian direndam di dalam larutan penghilang warna untuk menghilangkan kelebihan warna dan pita protein yang terpisah kemudian diukur jarak migrasinya dan dibandingkan dengan jarak protein standar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Screening Mikroorganisme Lipolitik

Isolasi bakteri dilakukan dari sampel *coco butter substitute* dilanjutkan dengan Screening mikroorganisme lipolitik dengan menggunakan media padat nutrient broth dengan uji aktifitas lipase dengan media rhodamin B. Isolasi bakteri dari sampel *coco butter substitute* yang dilakukan metode pengenceran secara kontinyu menghasilkan isolat yang dapat dilihat pada **Gambar.1**

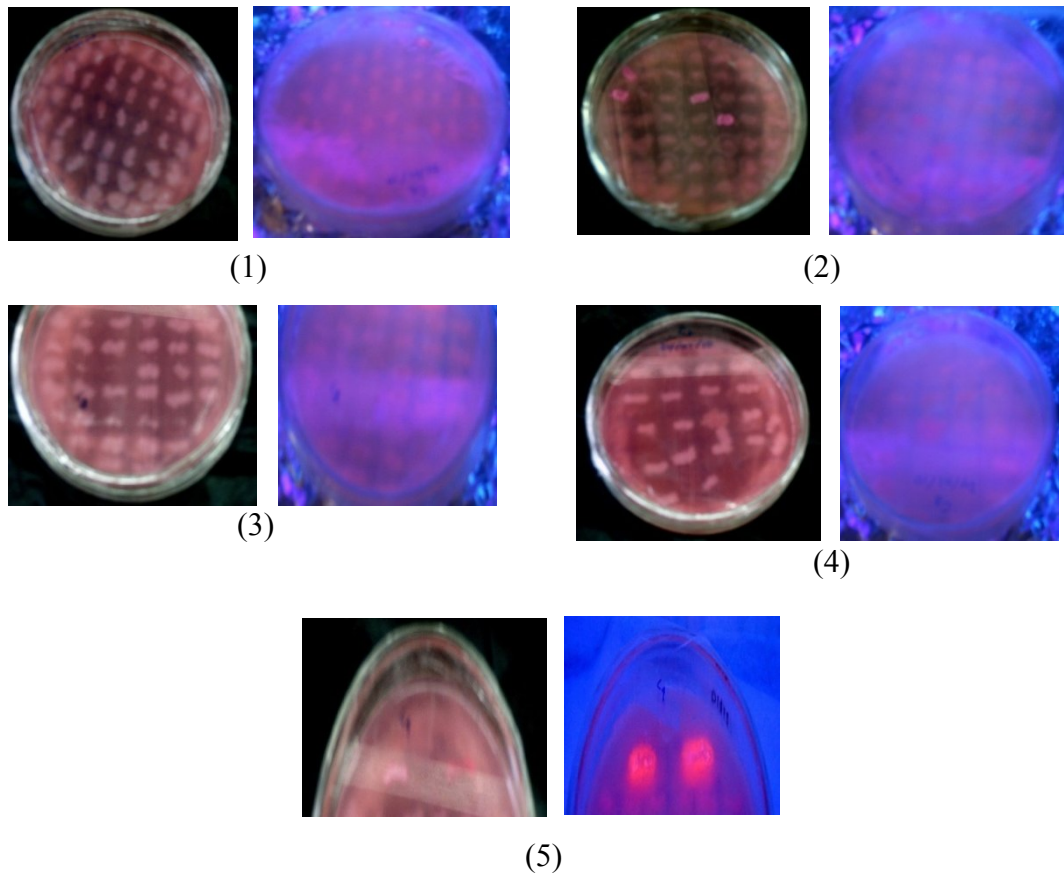


Gambar 1. Isolat bakteri yang diisolasi dari *coco butter substitute*. Isolat bakteri yang diisolasi dengan metode pengenceran secara kontinyu dalam 5 tabung dengan hasil sprit pada media padat Nutrient broth dari masing –masing tabung yaitu : (A) Tabung 1 yang menghasilkan banyak koloni. (B) Tabung 2 yang menghasilkan 143 isolat. (C) Tabung 3 yang menghasilkan 21 isolat. (D) Tabung 4 yang menghasilkan 2 isolat. (E) Tabung 5 tidak ada isolat yang tumbuh.

Isolat bakteri hasil isolasi dilanjutkan dengan Screening bakteri menggunakan media padat nutrient broth dengan uji aktivitas lipase dengan rhodamin B. Rhodamin B merupakan indikator fluoresens yang sensitif terhadap lipase. Bila terdapat aktivitas lipase, maka lipase akan menghidrolisis *olive oil* dan membentuk asam-asam lemak. Asam-asam lemak ini kemudian akan membentuk kompleks dengan rhodamin B yang akan berfluoresens di bawah sinar UV. Uji kualitatif lipase dengan rhodamin B dapat pula digunakan untuk mengetahui adanya aktivitas lipase dari kultur *E. coli* yang memiliki gen lipase dari *Rp. Delemar*. Dari penelitian ini pulalah diketahui bahwa indikator rhodamin B memiliki sensitivitas mulai pada aktivitas lipase 60 mU. Namun demikian, metode ini tidak dapat di digunakan untuk menguji kultur-kultur bakteri yang memetabolisme asam lemak karena tidak munculnya pendar fluoresens dapat diakibatkan 2 hal, yakni sel yang mengkonsumsi asam lemak dan tidak adanya aktivitas lipase. Hasil uji aktivitas lipase dengan metode rhodamin B dari isolat bakteri menghasilkan pendar kemerahan di bawah sinar UV setelah sebelumnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 hari meskipun ukuran pendar yang dihasilkan dari tiap isolat bakteri beragam yang dapat dilihat pada **Gambar 2**.

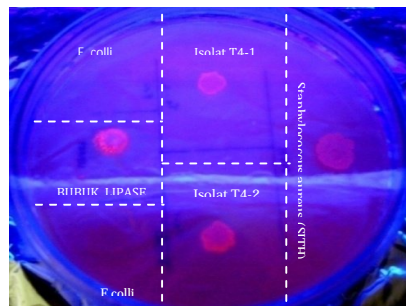
Isolat bakteri dari hasil uji aktivitas lipase dengan metode rhodamin B ini menunjukkan pada 143 isolat dari tabung 2 terdapat 1 isolat yang mengekspresikan lipase sedangkan 2 isolat pada tabung 4 keduanya mengekspresikan aktivitas lipase hal ini terlihat dengan adanya pendaran kemerahan di bawah sinar UV setelah sebelumnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 hari meskipun ukuran pendar yang dihasilkan dari tiap isolat bakteri beragam. Berdasarkan tahap pertama ini, dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri pada tabung 2 dan tabung 4 dapat mengekspresi lipase pada media Nutrien broth. Sebagai pembandingnya, pada penelitian ini dilakukan uji kualitatif terhadap isolat bakteri dari tabung 2 dan tabung 5.

Sebagai kontrol positif yaitu bubuk lipase dan *Staphylococcus aureus* dari SITH sedangkan yaitu *E.colli* dari SITH merupakan kontrol negatif.



Gambar 2. Hasil uji aktivitas lipase dengan metode rhodamin B dari isolat bakteri hasil isolasi dari *coco butter substitute* (kiri) tanpa sinar UV (kanan) dibawah sinar UV. (1) sampai (3) 143 isolat dari tabung 2 terdapat 1 isolat yang mengekspresikan aktivitas lipase. (4) 21 isolat dari tabung 3 tidak terdapat aktivitas lipase. (5) 2 isolat dari tabung 4 keduanya mengekspresikan aktivitas lipase

Bakteri *Staphylococcus epidermisis*



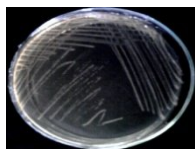
Gambar 3. Aktivitas enzim lipase pada agar padat dalam petri yang mengandung rhodamin B. Isolat bakteri T₄₋₁ dan T₄₋₂; bubuk lipase dan *Staphylococcus aureus* dari SITH (kontrol positif) muncul pendaran di bawah sinar UV sedangkan *E.colli* (kontrol negatif) tidak muncul pendaran di bawah sinar UV

Dari hasil yang dapat dilihat pada **Gambar 3** menunjukkan munculnya pendar kemerahan di bawah sinar UV pada isolat bakteri hasil isolasi serta kedua kontrol positif

setelah sebelumnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 hari sedangkan kontrol negatif tidak menunjukkan pendaran. Untuk isolat bakteri dari tabung 2 ternyata memiliki sedikit sekali aktivitas lipase, hal ini terlihat sedikit pendaran yang muncul dan hampir tidak begitu terlihat. Berdasarkan hasil analisa oleh SITH ITB isolat bakteri hasil isolasi yang menghasilkan enzim lipase yaitu 2 isolat dari tabung 4 adalah

2. Peremajaan Kultur Sel

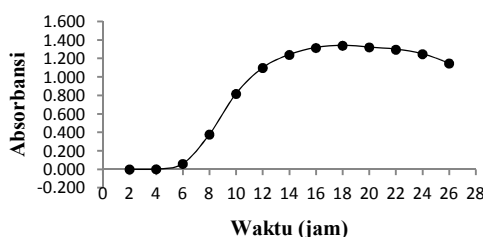
Bakteri *Staphylococcus epidermis* dilakukan peremajaan dan digunakan koloni tunggal untuk tahapan kerja selanjutnya, dapat dilihat pada **Gambar 4**.



Gambar 4 Isolat bakteri penghasil lipase yang ditumbuhkan pada media padat *Nutrien broth*

3. Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Metode yang digunakan untuk mengukur massa sel kultur *Staphylococcus epidermis* pada penelitian adalah dengan analisis optik. Setelah fasa lag maka pertumbuhan bakteri memasuki fasa pertumbuhan eksponensial atau logaritma yang dimulai saat laju pertumbuhan bakteri menunjukkan nilai maksimum yang konstan. Pertumbuhan *Staphylococcus epidermis* memasuki fasa logaritma pada jam ke-6 hingga jam ke-14, atau selama 10 jam. Setelah itu pertumbuhan bakteri memasuki fasa stasioner. Pada fasa stasioner terjadi penumpukan racun akibat metabolisme sel dan kandungan nutrisi mulai habis, Akibatnya terjadi kompetisi nutrisi sehingga beberapa sel mati dan lainnya tetap tumbuh. Pada fasa ini jumlah sel menjadi konstan. Kultur *Staphylococcus epidermis* memasuki fasa stasioner pada jam ke-16 hingga jam ke-20. Setelah fasa stasioner maka dilanjutkan dengan fasa kematian (*death*) dikarenakan sel menjadi mati akibat penumpukan racun dan habisnya nutrisi, yang menyebabkan jumlah sel yang mati lebih banyak sehingga mengalami penurunan jumlah sel secara eksponensial.

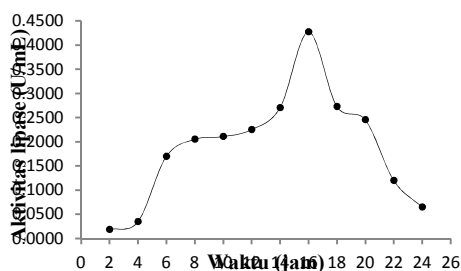


Gambar 5. Kurva pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermis*

4. Produksi Enzim Lipase

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan pada seluruh sampel enzim yang diambil pada waktu yang sama dengan pengambilan sampel untuk mengukur densitas sel (kurva pertumbuhan). Sampel-sampel protein yang diuji aktivitasnya dengan menggunakan substrat pNP-palmitat. Enzim lipase akan menghidrolisis palmitat sehingga menjadi pNP bebas yang berwarna kuning.

Berdasarkan hasil kurva produksi lipase (**Gambar 6**) diperoleh enzim lipase dengan aktivitas optimum untuk *Staphylococcus epidermis* dihasilkan pada jam ke-16. Dengan demikian, pada saat produksi enzim, enzim lebih baik dipanen pada jam aktifitas optimum enzim lipase setiap bakteri.



Gambar 6. Kurva produksi lipase

5. Fraksinasi Ammonium Sulfat Dan Aktivitas Lipase

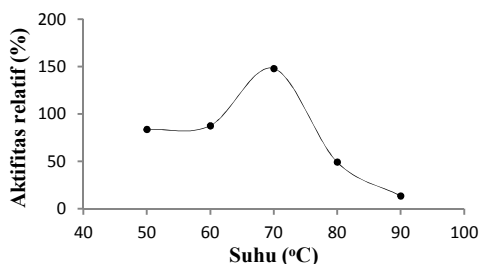
Penambahan garam amonium sulfat ke dalam larutan protein akan menarik molekul air dari sekitar permukaan molekul protein, akibatnya protein tidak lagi terlindungi molekul air, melainkan berkumpul dengan sesamanya dan kemudian mengendap (Scopes, 1987). Berdasarkan **Tabel 1** menunjukkan bahwa fraksi yang mengandung aktivitas lipase tertinggi terdapat pada fraksinasi 20-40% jenuh. Semakin tinggi kadar kejenuhan amonium sulfat semakin tinggi aktivitas lipase pada masing-masing fraksi.

Tabel 1. Hasil pengendapan amonium sulfat dari *Staphylococcus epidermisis*

Sampel Enzim	Aktivitas Lipase (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
Ekstrak kasar	6,199	0,192	32,36
Fraksi 0–20	3,279	0,03	109,448
Fraksi 20–40	4,078	0,019	215,799
Fraksi 40–60	2,953	0,055	53,809
Fraksi 60–80	7,708	0,15	51,456
Fraksi 80–100	7,667	0,07	109,102

6. Penentuan Suhu Optimum

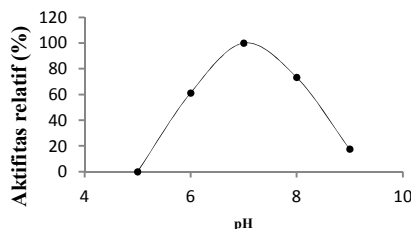
Pengaruh suhu terhadap aktivitas lipase dapat dilihat pada **Gambar 7** Berdasarkan data tersebut menunjukkan bahwa aktivitas lipase dari *Staphylococcus epidermisis* memiliki aktivitas optimum pada suhu yang cukup tinggi yaitu 70°C dan akan menurun setelah melewati temperatur tersebut.



Gambar 7. Pengaruh suhu terhadap aktivitas lipase dari *Staphylococcus epidermisis*

7. Penentuan pH Optimum

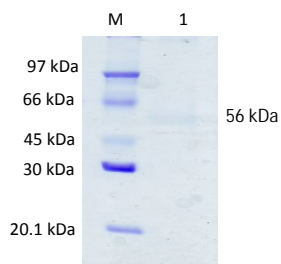
Karakteristik aktivitas pH enzim menggambarkan pH pada saat gugus pemberi atau penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada dalam tingkat ionisasi yang diinginkan. pH optimum aktivitas lipase total dapat dilihat pada **Gambar 8**. Berdasarkan data tersebut menunjukkan bahwa ekstrak lipase total mempunyai kisaran pH optimum yang cukup luas, yaitu enzim masih stabil pada kisaran pH 6,0–8,0. Aktivitas lipase total tertinggi terjadi pada pH 7,0. Penurunan pH pada kondisi asam menyebabkan penurunan aktivitas begitu juga kenaikan pH bisa dapat menyebabkan enzim menjadi rusak.



Gambar 8. Pengaruh pH terhadap aktivitas lipase dari *Staphylococcus epidermidis*.

8. Perkiraan massa molekul lipase (SDS-PAGE)

Pemurnian parsial lipase yang dilakukan menunjukkan ada hasil yang baik. Hal ini didukung oleh data hasil analisis SDS page yang dapat dilihat pada **Gambar 9**. Pada **Gambar 9**. menunjukkan terdapat satu pita protein lipase yaitu dengan massa molekul 56 kDa.



Gambar 9. SDS-PAGE: M : marker protein standar, 1 : fraksi 20 – 40 %

KESIMPULAN

Hasil isolasi enzim lipase dari bakteri *Staphylococcus epidermidis* yang diuji aktivitas menggunakan substrat para-Nitrofenil palmitat menunjukkan bahwa fraksi dengan aktivitas tertinggi pada fraksi 20-40% adalah 215,799 unit/mg protein. Sedangkan hasil karakterisasi biokimia menunjukkan bahwa aktivitas optimum lipase yang dari *Staphylococcus epidermidis* terdapat pada temperatur 70°C dan pH 7. Analisis massa molekul menggunakan Sodium dodesil Sulfat poliakrilamid gel elektroforesis (SDS PAGE) menunjukkan adanya satu pita protein lipase dengan massa molekul 56 kDa.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, M. W. W. and Kelly, R. M., (1995), Enzymes from Microorganisms in Extreme Environments, *In American Chemical Society*, Special Report.
- Brzozowski AM, Derewenda U, Derewenda ZS., (1991), A model for interfacial activation in lipases from the structure of fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* 351:491–494.
- Derewenda U, Brzozowski A. M., Lawson D. M., and Derewenda Z. S., (1992), Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase, *Biochem*, 31(5), 1532–1541.
- Faber K., (1997), Biotransformations in organic chemistry. *Springer, Berlin, Heidelberg, New York*, 402 pp.
- Gupta R, Gupta N, Rathi P., (2004), Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:763–781.

- Hasan F, Shah A.A, Hameed A., (2006), Industrial applications of lipases. *Enzyme Microb Technol* 39:235–251.
- Hill. P. D. (2002) " *Biodiesel Basics*", Dark Star VI.
- Jaeger K.E, Reetz M.T., (1998), Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *TIBTECH* 16:396–403.
- Jaeger K.E, Dijkstra BW, Reetz M.T., (1999), Bacterial biocatalysts: molecular biology, threedimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* 53:315–351.
- Jaeger K.E, Eggert T, Eipper A., (2001), Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalyst. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:519–530.
- Jodi A. Lindsay., (2008). *Staphylococcus: molecular genetics*. Caister Academic Press. [ISBN 978-1904455295](#).
- Lehninger, A. L., (1990), *Dasar-dasar Biokimia*, Erlangga, Jakarta.
- Li Z.Y, Ward O.P., (1993), Enzyme catalysed production of vegetable oils containing omega-3 polyunsaturated fatty acid. *Biotechnol Lett* 15:185–188.
- Linko Y.Y, Lamsa M, Wu X., (1998), Biodegradable products by lipase biocatalysis. *J Biotechnol* 66(1):41–50.
- Litthauer D, Ginster A, Skein EVE., (2002), *Pseudomonas luteola* lipase: a new member of the 320-residue *Pseudomonas* lipase family. *Enzyme Microb Technol* 30:209–215.
- Lowrier A, Drtina G.J, Klibanov A.M., (1996), On the issue of interfacial activation of lipase in nonaqueous media. *Biotechnol Bioeng* 50(1):1–5.
- Ma F, Hanna M.A., (1999), Biodiesel production: a review. *Biores Technol* 70:1–15.
- Madigan, M.T., Mairs, B.L., (1997), Extremophiles, *Scientific American*, 88, 66-71.
- Paynich M. (2007) *Basic Biotechnology eJournal* 20073: 57-61.
- Saxena R.K, Sheoran A, Giri B., (2003), Purification strategies for microbial lipases. *J Microbiol Meth* 52:1–18.
- Schmidt-Dannert C., (1999), Recombinant lipases for biotechnological applications. *Bioorg Med Chem* 7:2123–2130.
- Secundo F, Carrea, G, Tarabiono C., (2006) The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. *J Mol Catal B: Enzym* 39:166–170.
- Seitz EW., (1974) Industrial application of microbial lipases: a review. *JAOCS* 51(2):12–16.
- Sharma R, Chisti Y, Banerjee U.C., (2001) Production, purification, characterization and application of lipases. *Biotechnol Adv* 19:627–662.
- Sharma R, Soni SK, Vohra R.M., (2002) Production of extracellular alkaline lipase from a *Bacillus* sp. RSJ1 and its application in ester hydrolysis. *Ind J Microbiol* 42:49–54.
- Smith L.C, Faustinella F, Chan L., (1992) Lipases: three dimensional structure and mechanism of action. *Curr Opin Struct Biol* 2:490–496.
- Straathof A.J.J, Panke S, Schmid A., (2002) The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol* 13:548–556.
- Tombs M.P, Blake G.G., (1982), Stability and inhibition of *Aspergillus* and *Rhizopus* lipases. *Biochim Biophys Acta* 700:81–89.