

karakterisase lipase amobil

by Zus Zufahair

Submission date: 01-Apr-2023 01:47AM (UTC+0700)

Submission ID: 2052303115

File name: artikel.pdf (1.22M)

Word count: 3019

Character count: 15985



KARAKTERISASI LIPASE AMOBIL HASIL FRAKSINASI DARI *Azospirillum* sp. PRD1 MENGGUNAKAN MATRIK NATRIUM ALGINAT

Oleh

Zusfahair, Dian Riana Ningsih, Santi Nur Handayani, Puji Lestari

Program Studi Kimia Jurusan MIPA Fakultas Sains dan Teknik
Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto
Jl. Soeparno 62, Karangwangkal, Purwokerto Jawa Tengah 53123
zusfahair@gmail.com

ABSTRAK

Lipase merupakan biokatalis yang berharga karena bekerja pada kondisi yang lembut, memperlihatkan spesifisitas substrat yang luas dalam mengkatalisis. Penggunaan lipase dalam bentuk amobil lebih menguntungkan karena bisa digunakan berulang kali. Tujuan penelitian adalah karakterisasi lipase amobil hasil fraksinasi dari *Azospirillum* sp. PRD1 meliputi penentuan aktivitas optimum pada suhu, pH, konsentrasi substrat, dan waktu inkubasi serta penentuan stabilitasnya. Langkah langkah yang dilakukan dalam penelitian adalah peremajaan bakteri, pembuatan inokulum dengan lama inkubasi 10 jam, produksi lipase dari bakteri *Azospirillum* sp. PRD1 selama 14 jam dan selanjutnya diekstraksi menggunakan sentrifus. Ekstrak kasar yang diperoleh difraksinasi menggunakan ammonium sulfat 60% (F60%). F60% selanjutnya diamobilisasi dan dikarakterisasi.. Aktivitas lipase ditentukan dengan metode titrasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas lipase amobil hasil fraksinasi dari bakteri *Azospirillum* sp. PRD1 menggunakan bahan pendukung natrium alginat optimum pada suhu 40 °C, pH 7, konsentrasi substrat 25%, waktu inkubasi 45 menit dan stabil sampai enam kali pemakaian dengan sisa aktivitas 80%.

Kata kunci: Amobilisasi, *Azospirillum* sp. PRD1, karakterisasi, lipase.

ABSTRACT

Lipase is a biocatalyst on soft conditions, that showed broad substrate specificity in catalyzing. The use of immobilized lipase more profitable because it can be used repeatedly. The purpose of the study is to characterize the immobilized lipase fractionation results of *Azospirillum* sp. PRD1 involves determination of the optimum activity at a temperature, pH, substrate concentration, the incubation time and its stability. Steps performed in the research is the rejuvenation of the bacteria, the manufacture of inoculum with a long incubation of 10 hours, the production of lipase from bacteria *Azospirillum* sp. PRD1 for 14 hours and subsequently extracted using a centrifuge. Crude extract obtained was fractionated using ammonium sulfate 60% (F60%). The F60% fraction was immobilized and was characterized. The lipase activity was tested by titimetric method. The results showed that the activity of the immobilized lipase fractionation results from bacteria *Azospirillum* sp. PRD1 using sodium alginate could be achieved at 40 ° C, pH 7, 25% substrate concentration, incubation time of 45 minutes and stable up to six times usage and with residual activity of 80%.

Key word: Immobilized, *Azospirillum* sp. PRD1, characterization, lipase

PENDAHULUAN

Penggunaan enzim sebagai biokatalis mempunyai beberapa kelemahan, antara lain yaitu harga enzim yang sangat mahal, ketidak-stabilan enzim, ketersediaan enzim yang sangat sedikit, dan mahalnya biaya untuk *recovery* enzim yang digunakan pada reaksi dalam media cair karena sifat enzim yang larut dalam media cair. Amobilisasi enzim dilakukan untuk mempermudah pemisahan antara enzim dan produk yang dihasilkan. Keuntungan penggunaan enzim teramobil adalah meningkatnya stabilitas enzim, enzim dapat digunakan secara berkesinambungan, reaksi dapat dikendalikan serta nilai ekonomis yang dapat diperoleh. Metode amobilisasi lipase yang digunakan dalam penelitian ini adalah penjebakan. metode penjebakan didasarkan pada penempatan enzim dalam kisi atau suatu ruang dalam suatu polimer atau dalam membran *semi permeable*. Bahan yang digunakan sebagai penjebak antara lain K-karagenan, Natrium alginat, dan poliakrilamida. Natrium alginat merupakan bahan pendukung yang paling baik karena tidak beracun, mekanisme kestabilannya tinggi, porositasnya tinggi, dan harganya murah.

Alginat yang tersedia secara komersial adalah dalam bentuk garamnya yaitu natrium alginat. Keunikan dari natrium alginat yaitu perubahannya menjadi hidrogel dengan 95% molekul air di dalamnya, yang merupakan syarat penting untuk penggunaan dalam menjebak senyawa (Wang *et al.*, 2006). Alginat mempunyai kemampuan untuk membentuk gel jika bereaksi dengan kation divalen seperti Ca^{2+} . Gel terbentuk melalui reaksi kimia dimana kalsium menggantikan natrium dalam mengikat molekul-molekul alginat yang panjang sehingga membentuk gel. Kalsium akan memberikan asosiasi permanen dan meningkatkan viskositas larutan, sehingga menyebabkan pengendapan. Gel yang lebih homogen dan stabil dapat diperoleh melalui pendinginan yang lambat larutan alginat dengan adanya ion kalsium.

Pada penelitian ini dilakukan isolasi lipase dari bakteri *Azospirillum* sp. PRD1 dan selanjutnya dilakukan fraksinasi menggunakan ammonium sulfat 60% (F60%). Lipase F60% selanjutnya diamobilisasi menggunakan natrium alginat dan dikarakterisasi. Karakterisasi lipase amobil meliputi penentuan suhu, pH, konsentrasi substrat, dan waktu inkubasi optimum serta penentuan stabilitasnya.

METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat murni *Azospirillum* sp. PRD1 koleksi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi Unsoed, Natrium alginat,

minyak kedelai, medium NA (*Nutrient Agar*), medium NB (*Nutrient Broth*), akuades, larutan buffer asam asetat, buffer Tris-HCl pH 9, gum arab, buffer fosfat pH 7 dan pH 8, aseton, etanol, alkohol, NaOH, indikator fenolftalein, dan CaCl₂. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, botol-botol reagen, beaker glass, labu ukur, labu erlenmeyer, jarum ose, pH meter "*Hanna Instrumen*", mikro buret, tabung ependorf, statif, pipet mikro otomatis sentrifuge "T 120", shaker *incubator* merek Memmert, *autoclave*, *hot plate stirrer*, corong pisah.

Prosedur penelitian:

1. Produksi lipase

Produksi lipase dilakukan dengan merujuk pada hasil penelitian terdahulu yang telah dilakukan (Handayani, dkk, 2010). Stok isolat murni *Azospirillum* sp. PRD1 dalam gliserol diremajakan pada medium NA miring dan diinkubasi selama 2 x 24 jam pada suhu ruang. Bakteri *Azospirillum* sp. PRD1 hasil peremajaan kemudian diinokulasikan ke dalam medium NB (*Nutrient Broth*) dan diinkubasi pada *shaker incubator* Kottermann dengan skala kecepatan 7 pada suhu ruang selama 10 jam. Inokulum sebanyak 20% dipindahkan ke dalam medium produksi enzim (medium NB dengan induser minyak kedelai 1%) dan diinkubasi pada *shaker incubator* Kottermann dengan skala kecepatan 7 pada suhu ruang selama 14 jam. Medium cair kemudian disentrifugasi menggunakan sentrifus dingin (3500 rpm, 4°C, 10 menit), untuk memisahkan debris sel dan supernatan. Supernatan yang diperoleh masih berupa ekstrak kasar lipase. Ekstrak kasar lipase diukur volume, aktivitas, kadar protein dan ditentukan aktivitas spesifiknya. Aktivitas lipase diukur menggunakan metode titrimetri yang diadaptasi dari Prazeres *et al.* (2006). Substrat yang digunakan adalah emulsi minyak kedelai 25% dalam larutan gum arab 7% yang dicampur hingga homogen. Campuran reaksi enzim terdiri dari: 5 ml emulsi minyak kedelai, 4 ml buffer fosfat 50 mM pH 7 yang diinkubasi selama 5 menit pada suhu 40° C, kemudian ditambahkan 1 ml enzim. Aktivitas lipase ditentukan dari volume NaOH yang dibutuhkan untuk titrasi sampel dikurangi volume NaOH yang dibutuhkan untuk titrasi kontrol. Setiap 1 ml NaOH 50 mM setara dengan 100 unit aktivitas lipase.

Ekstrak kasar lipase dipekatkan dengan menambahkan garam ammonium sulfat dengan kejenuhan 60% lalu diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 4°C hingga larut, kemudian disentrifugasi dengan sentrifus dingin (3500 rpm, 4°C, 10 menit) Endapan yang diperoleh dilarutkan dengan 5 mL larutan NaCl 1% lalu didialisis menggunakan

kantong selofan. Dialisis dilakukan pada suhu 4°C sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Dialisis yang digunakan adalah aquades. Dialisis dilakukan dengan penggantian dialisis setiap 30 menit. Setiap dialisis yang dikeluarkan diuji dengan larutan Ba(OH)₂ untuk mengetahui apakah masih ada garam. Dialisis dihentikan bila dialisis sudah tidak mengandung garam yang ditandai dengan tidak adanya endapan ketika diuji dengan larutan Ba(OH)₂. Hasil dialisis disebut dengan F60% dilarutkan dengan NaCl 1% hingga 30 mL, selanjutnya diamobilisasi.

2. Amobilisasi lipase F60% menggunakan natrium alginat (Anwar, *et al.*, 2009)

Enzim lipase F60% ditambahkan ke dalam larutan kalsium alginat 4% dengan perbandingan 1:3 dan diaduk merata. Untuk membuat beads, larutan (campuran enzim-alginat) diambil dengan menggunakan jarum suntik (*syringe*) lalu diteteskan pelan-pelan ke dalam larutan 250 mL CaCl₂ 0,2 M. Setelah selesai, pengadukan selama 5 menit dan selanjutnya diinkubasi tanpa goyangan selama 25 menit. Beads yang terbentuk kemudian disaring dan disimpan dengan larutan CaCl₂ 0,03 M diletakkan di lemari pendingin, dan siap digunakan untuk uji aktivitas hidrolisis minyak kedelai menjadi asam lemak esensial. Lipase F60% teramobil yang diperoleh selanjutnya dikarakterisasi.

3. Karakterisasi lipase amobil F60%

a. Penentuan suhu optimum aktivitas lipase amobil

Penentuan suhu optimum aktivitas lipase amobil dalam menghidrolisis minyak kedelai dilakukan pada variasi suhu hidrolisis 30 °C, 35 °C, 40 °C 45 °C dan 50 °C . Campuran reaksi enzim diatur pada pH 7 dan diinkubasi sesuai variasi suhu yang ditentukan.

b. Penentuan pH optimum aktivitas lipase amobil

Penentuan pH optimum aktivitas lipase amobil dalam menghidrolisis minyak kedelai dilakukan pada variasi pH 5,6, 7, 8 dan 9. Campuran reaksi enzim diinkubasi pada suhu optimumnya.

c. Penentuan konsentrasi substrat optimum terhadap aktivitas lipase amobil

Penentuan konsentrasi substrat terhadap aktivitas lipase amobil dalam menghidrolisis minyak kedelai dilakukan pada variasi substrat 15, 20, 25, 30, dan 35%. Campuran reaksi enzim diinkubasi pada suhu dan pH optimumnya.

d. Penentuan waktu inkubasi optimum terhadap aktivitas lipase amobil

Pengaruh waktu inkubasi optimum terhadap aktivitas lipase amobil dalam menghidrolisis minyak kedelai dilakukan pada variasi waktu 15, 30, 45, 60, dan 75 menit. Campuran reaksi enzim diinkubasi pada suhu, pH dan substrat optimumnya.

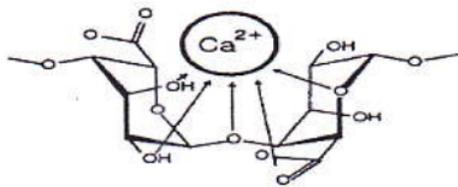
e. Uji stabilitas

Enzim amobil diselidiki tingkat kestabilan aktivitasnya terhadap pemakaian berulang. Substrat yang digunakan yaitu emulsi minyak kedelai 25%, larutan gum arab 10% dan buffer phospat pH 7 dengan perbandingan 1:2:1 yang dicampur hingga homogen (sekitar 3 jam). Campuran reaksi enzim terdiri dari 2,5 mL emulsi minyak kedelai, yang diprainskubasi selama 5 menit pada suhu 35 °C, kemudian ditambahkan 0,1 gram enzim pada tabung sampel. Kemudian diinkubasi selama 30 menit. Selanjutnya enzim disaring dan pada larutan ditambahkan aseton etanol. Untuk control substrat diprainskubasi lalu diinkubasi dan ditambah aseton etanol dan enzim selanjutnya enzim langsung disaring. Sampel dan kontrol kemudian dititrasi menggunakan NaOH 0,05 M. Aktivitas lipase ditentukan dari volume NaOH yang dibutuhkan untuk titrasi sampel dikurangi volume NaOH yang dibutuhkan untuk titrasi kontrol. Setiap 1 mL NaOH 0,05 M setara dengan 100 unit aktivitas lipase. Enzim amobil dilakukan uji aktivitas dengan prosedur yang sama. Pemakaian berulang dilakukan sampai terlihat penurunan aktivitas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amobilisasi Lipase F60% dengan Matriks Natrium alginate

Metode amobilisasi yang digunakan terhadap enzim lipase F60% adalah penjebakan dalam gel menggunakan matrik kalsium alginat. Amobilisasi dilakukan dengan cara meneteskan larutan natrium alginat yang dicampur enzim lipase menggunakan jarum suntik ke dalam larutan kalsium klorida, sehingga membentuk *beads* dan enzim terjebak di dalam *beads*. Lipase amobil yang diperoleh disimpan dalam larutan CaCl₂ 0,03 M untuk ditentukan aktivitasnya. Pembentukan *beads* ini disebabkan oleh kation Ca bivalen bereaksi dengan monovalen anion karboksilat dari alginat membentuk matrik kalsium alginate. Struktur dan reaksi Na-alginat dengan CaCl₂ dapat dilihat pada Gambar 1

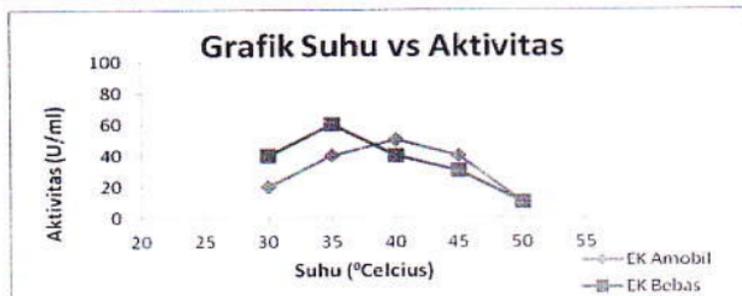


Gambar 1 Struktur dan reaksi antara Na-alginat dengan CaCl_2 (Gulay, 2009)

Karakterisasi Lipase Amobil F60% dengan Matriks Natrium alginat.

Penentuan suhu optimum lipase amobil F60% dengan matriks natrium alginat

Penentuan suhu optimum enzim lipase amobil dilakukan pada pH 7 dengan variasi suhu 30, 35, 40, 45 dan 50 °C dengan lipase bebas sebagai pembanding. Pengaruh suhu terhadap aktivitas lipase dapat dilihat pada Gambar 2

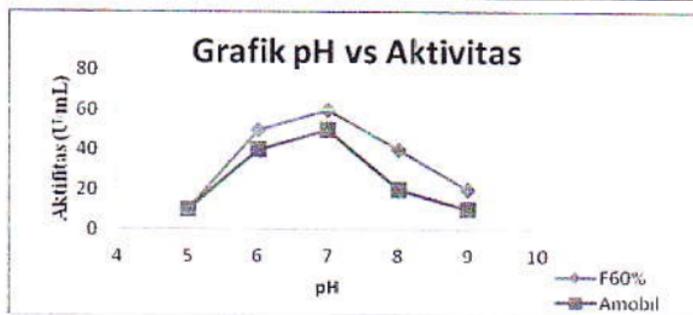


Gambar 2. Grafik pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim lipase amobil F60% dari *Azospirillum* sp PRD1.

Berdasarkan data hasil penelitian pada Gambar 2 menunjukkan bahwa suhu optimum enzim lipase amobil berbeda dengan enzim lipase bebas. Suhu optimum enzim lipase amobil dan bebas berturut-turut adalah pada suhu 40 °C dan 35 °C dengan aktivitas enzim sebesar 60 U/mL dan 50 U/mL berturut-turut. Enzim lipase amobil membutuhkan suhu yang lebih tinggi untuk mencapai optimum. Hal ini disebabkan halangan ruang yang ditimbulkan bahan pendukung pada molekul enzim dapat meningkatkan ketahanan enzim terhadap pengaruh suhu yang cukup besar.

Penentuan pH optimum lipase amobil F60% dengan matriks natrium alginat

Penentuan pH optimum enzim lipase amobil dan bebas dilakukan pada suhu optimum dengan variasi pH 5 – 9. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim lipase dapat dilihat pada Gambar 3.



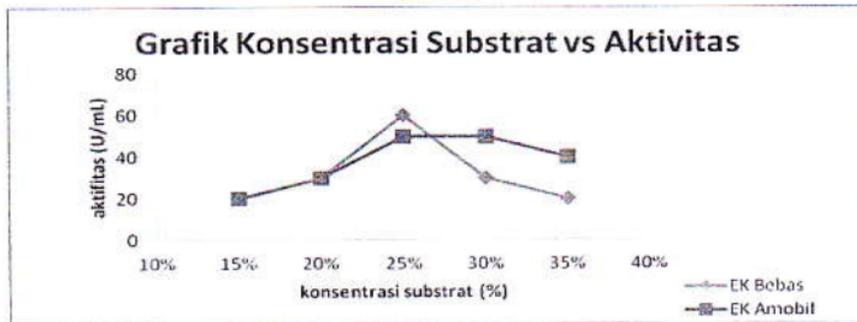
Gambar 3. Grafik pengaruh pH terhadap aktivitas enzim lipase amobil F60% dari *Azospirillum* sp PRD1.

Berdasarkan data hasil penelitian pada Gambar 3 menunjukkan bahwa suhu optimum enzim lipase amobil sama dengan enzim lipase bebas yaitu pada pH 7 tetapi dengan nilai aktivitas enzim berbeda. Aktivitas optimum enzim lipase amobil dan bebas berturut-turut yaitu 60 U/mL dan 50 U/mL. Menurut Smith (1990) dalam Su'i (2007), hal ini disebabkan karena lipase amobil dilindungi oleh matriks kalsium alginat sehingga lipase harus melalui matriks kalsium alginat untuk berinteraksi dengan substrat.

Penurunan pH menjadi kondisi asam menyebabkan penurunan aktivitas, begitu juga kenaikan pH menjadi basa dapat menyebabkan struktur enzim menjadi rusak. Kondisi pH yang terlalu rendah mengakibatkan ion H^+ akan berikatan dengan $-NH_3^+$ pada struktur asam amino protein membentuk $-NH_4$. Proses pengikatan tersebut menyebabkan ikatan antara atom nitrogen dengan atom hidrogen lainnya terputus, sehingga enzim terdenaturasi. Kondisi pH tinggi mengakibatkan ion $-OH$ berikatan dengan atom hidrogen dari gugus COO^- enzim, membentuk H_2O . Hal tersebut mengakibatkan rusaknya ikatan antara atom hidrogen dengan nitrogen atau oksigen, sehingga struktur enzim mengalami kerusakan.

Penentuan konsentrasi optimum lipase amobil F60% dengan matriks natrium alginat

Penentuan pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas lipase amobil dilakukan pada kondisi suhu $40^\circ C$ dan pH7 dengan lipase bebas sebagai kontrol. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim lipase dapat dilihat pada Gambar 4.

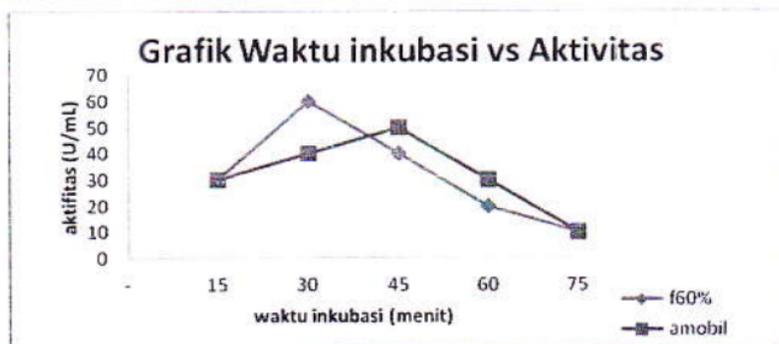


Gambar 4. Grafik pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim lipase amobil F60% dari *Azospirillum* sp PRD1

Berdasarkan data hasil penelitian pada Gambar 4 menunjukkan bahwa aktivitas enzim lipase amobil dan bebas optimum pada konsentrasi substrat 25% dengan nilai aktivitas berturut-turut sebesar 50 U/mL dan 60 U mL. Aktivitas lipase bebas setelah mencapai konsentrasi optimum turun dibandingkan dengan aktivitas lipase amobil. Hal ini disebabkan diduga adanya inhibisi produk terhadap aktivitas enzim. Pada enzim amobil inhibisi produk dapat terhalang oleh matrik pendukung kalsium alginat yang menjebak enzim.

Penentuan waktu inkubasi optimum lipase amobil F60% dengan matriks natrium alginat

Penentuan pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas lipase amobil dilakukan pada kondisi suhu 40 °C, pH 7 dan konsentrasi substrat 25% dengan lipase bebas sebagai kontrol. Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim lipase dapat dilihat pada Gambar 5.

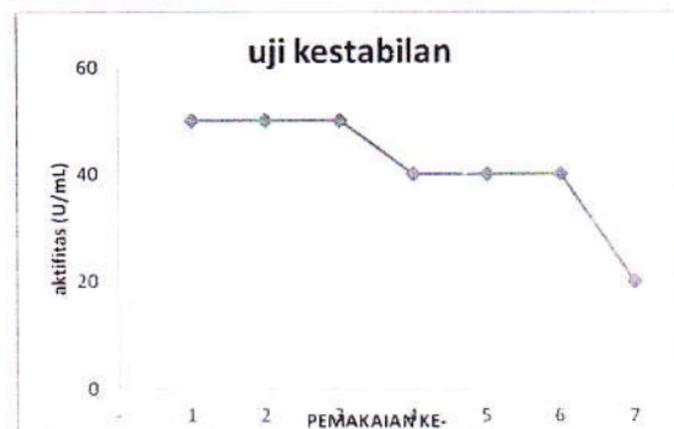


Gambar 5. Grafik pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim lipase amobil F60% dari *Azospirillum* sp PRD1

Berdasarkan data hasil penelitian pada Gambar 5 menunjukkan bahwa waktu inkubasi optimum enzim lipase amobil dan bebas adalah 45 menit dan 30 menit dengan aktivitas berturut-turut adalah 50 U/mL dan 60 U/mL. Enzim lipase amobil membutuhkan waktu inkubasi yang lebih lama untuk mencapai aktivitas optimumnya dibanding enzim bebasnya, karena enzim amobil terjebak dalam pori matrik pendukung alginat sehingga bertemunya substrat dengan enzim memerlukan waktu yang lebih lama, karena substrat terlebih dahulu harus berdifusi masuk ke bagian dalam partikel enzim amobil, untuk kemudian membentuk produk.

a. Uji Stabilitas

Uji kestabilan lipase amobil dilakukan dengan kondisi suhu, pH, konsentrasi substrat dan waktu inkubasi optimum. Hasil uji kestabilan lipase amobil dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Grafik pemakaian berulang enzim lipase amobil dengan kalsium alginat

Kelebihan dari enzim teramobilisasi adalah pemakaian secara berulang kali. Hal ini disebabkan enzim amobil dapat dipisahkan kembali dari produknya, sehingga dapat digunakan kembali. Berdasarkan data hasil penelitian pada Gambar 6 menunjukkan bahwa enzim lipase amobil dengan matrik pendukung kalsium alginat dapat digunakan sampai enam kali pemakaian dengan sisa aktivitas 80%. Penurunan aktivitas atau daya katalis enzim setelah pemakaian berulang dapat terjadi karena ada pelepasan enzim dari matrik pada waktu pencucian *beads* yang dilakukan pada akhir masing-masing siklus pemakaian ulang. Penurunan aktivitas juga dapat disebabkan *beads* kalsium alginat yang rapuh

sehingga enzim keluar dan mengakibatkan jumlah enzim yang aktif berkurang. Perubahan sifat fisik ini menyebabkan berkurangnya aktivitas gugus fungsi pada sisi aktif enzim tanpa merubah konformasi enzim (Mubarik, 2001).

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas lipase amobil hasil fraksinasi dari bakteri *Azospirillum* sp. PRD1 menggunakan bahan pendukung natrium alginat optimum pada suhu 40 °C, pH 7, konsentrasi substrat 25%, waktu inkubasi 45 menit dan stabil sampai enam kali pemakaian dengan sisa aktivitas 80%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Dirjen Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan yang telah mendanai penelitian ini melalui dana Hibah Bersaing 2013, Dana Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Grant UNSOED 2014 Nomer: Kept. 2779/UN23.10/PN.01.00/2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar,A., Shah Ali Ul Qader, S. A., Raiz, A., Iqbal, S., and Azhar, A. 2009. Calcium Alginate: A Support Material For Immobilization Of Proteases From Newly Isolated Strain Of *Bacillus Subtilis* KIBGE-HAS. *World Applied Sciences Journal* . 7 (10): 1281-1286
- Gulay, S., 2009, Immobilization Of Thermophilic Recombinant Esterase Enzyme By Entrapment In Coated Ca-Alginate Beads. *Thesis*, Izmir Institute Of Technology
- Handayani S.N., P. Lestari, Oedjijono, T.J. Raharjo dan S. Matsjeh, 2010, Fraksinasi Dan Karakterisasi Biokimiawi Lipase Ekstraseluler Bakteri *Azospirillum* Sp PRD 1., *Proceeding Seminar Nasional Kimia Dan Pendidikan Kimia*, UNDIP. Semarang
- Mubarik, N. R.. (2001). Imobilisasi protease *Bacillus subtilis* ATCC 6633 menggunakan Matriks Gel Poliakrilamida. Artikel Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Prazeres, J.N., Cruz, J.A., and Pastore, G.M. 2006. Characterization Of Alkaline Lipase From *Fusarium Oxysporum* And The Effect Of Different Surfactants And Detergents On The Enzyme Activity. *Brazilian Journal Of Microbiology* 37:505-509
- Su'i, M, Harijono, Yunianta, Aulani'am. (2007). Perubahan Aktivitas Enzim Amobil Lipase dari Kentos Kelapa. *Laporan Penelitian Dosen*. Malang: Universitas Brawijaya
- Wang, D.I.C., Cooney. C.L., Demain. A.L., Dunhill. P. Humprey. A.E., and Lily. M.D. (2006). *Fermentation and Enzyme Technology*. John Willey and Sons. New York.

karakterisase lipase amobil

ORIGINALITY REPORT

0%

SIMILARITY INDEX

0%

INTERNET SOURCES

0%

PUBLICATIONS

0%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography Off