

ISOLASI BAKTERI PENGHASIL ENZIM LIPASE ALKALI DARI KULIT HEWAN

V. S. Pertiwi Rumiya¹ dan Retno Indrati²

ABSTRACT

Twenty seven bacterial strains isolated on a medium containing 0.50% palm oil as substrate and 0.015% spirit blue as an indicator from several raw hides of chicken, goat and cow showed an extracellular lipase activity. Of these strains, 10 were higher lipase producers. Lipases produced from five of these 10 isolates were stable on alkaline conditions, ranging from pH 8.0 to 11.0. Furthermore, activity of these enzymes was not inhibited by the presence of non-ionic, cationic nor ionic surfactants at concentration of 0.05% or 0.10%. Conversely, some of these surfactants could even activate the enzyme.

Kata-kata kunci : bakteri kulit ayam, kulit sapi dan kulit kambing, lipase alkali, aktivitas, surfaktant.

PENDAHULUAN

Enzyme lipase (EC 3.1.1.3) adalah enzim yang menghidrolisa ester trigliserida menghasilkan asam lemak, monogliserida, digliserida, atau gliserol. Enzim ini banyak diproduksi dari bermacam mikrobia seperti jamur *Geotricum candidum*, *Rhizopus arrizus*, *Mucor pusillus*, *Aspergillus niger*, dan *Candida parapolityca* (Brockerhoff dan Jensen 1974), *Aspergillus oryzae* (Ohnishi dkk., 1994), *Penicillium cyclopium* (Xia dkk., 1996), dll., atau bakteri *Pseudomonas*, *Achromobacter* dan *Staphylococcus* (Crueger dan Crueger, 1989, Lin dkk., 1996).

Lipase alkali dapat digunakan secara efektif untuk menghilangkan kotoran yang berminyak dan untuk menaikkan efek pembersihan pada pencucian pakaian (Kawase dkk., 1985, Mozaffar dkk., 1994), untuk membantu penghilangan lemak (degreasing) pada proses penyamakan kulit (Christner, 1992), atau sebagai obat pencernaan untuk pengganti enzim lipase pankreas (Yamane, 1988). Pada tahun-tahun terakhir ini, perhatian dipusatkan pada penggunaan lipase alkali untuk detergent. Lipase alkali biasanya diproduksi oleh bakteri seperti *Bacillus* sp. (Lesuisse dkk., 1993), *Alcaligenes* sp. (Kokusho dkk., 1982), *Pseudomonas* (Kojima dkk., 1994; Lin dkk., 1996), dll.

Enzim lipase bekerja pada fase antara minyak-air dari substrat yang teremulsi. Stabilitas emulsi ini tergantung pada jenis surfaktan yang digunakan. Respon terhadap surfaktan berbeda tergantung sumber enzim yang digunakan, misalnya enzim lipase dari *Candida* (Mozaffar dkk., 1994) aktivitasnya tidak dipengaruhi oleh adanya sodium dodecyl

sulfate (SDS) tetapi berkurang aktivitasnya dengan cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), sebaliknya lipase dari *Chromobacterium viscosum* (Mozaffar 1994) secara kompetitif dihambat oleh SDS dan CTAB. Diketahui surfaktan dapat menyebabkan perubahan bentuk konformasi dan sifat permukaan enzim (Kawase dkk., 1985).

Mikrobia penghasil enzim lipase dilaporkan dapat diisolasi dari berbagai jenis sampel, seperti tanah, limbah cair pabrik minyak, dsb. (Budiatman dkk., 1993, Razak dkk., 1995). Minyak merupakan faktor pendorong (inducer) pada produksi lipase oleh mikrobia (Indrati dkk., 1998), sehingga bahan-bahan yang banyak mengandung minyak, seperti misalnya kulit hewan, dimungkinkan banyak mengandung mikrobia lipolitik. Dalam penelitian ini akan dicari dan selanjutnya diisolasi bakteri penghasil lipase dari beberapa sampel kulit hewan dan diseleksi isolat yang menghasilkan lipase alkali yang tahan beberapa macam surfaktan.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Sumber mikrobia

Mikrobia yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari kulit ayam, kulit sapi dan kulit kambing.

Isolasi bakteri

Isolasi dikerjakan dalam medium nutrisi agar, yang mengandung 0,5% minyak sawit dan 0.015% spirit blue (diphenyl rosanilin chloride dan triphenyl p-rosanilin chloride, Merck) sebagai indikator. Medium diatur pada pH 7,4. Inkubasi dikerjakan pada suhu 37°C selama 48 jam. Isolat yang menunjukkan warna biru disekeliling koloninya dan menunjukkan kenampakan berminyak diduga mampu memproduksi enzim lipase. Terhadap isolat tersebut dilakukan pemurnian dan digunakan untuk penelitian lebih lanjut.

Produksi enzim lipase

Komposisi medium cair yang digunakan untuk produksi enzim lipase mengacu pada medium Samad (1990) dengan modifikasi : 0,50% pepton; 0,05 MgSO₄; 0,10% KH₂PO₄; 0,10% NaNO₃; 0,50% sorbitol; dan 1,00% (v/v) minyak sawit. Inkubasi dikerjakan pada suhu 37°C selama 48 jam.

¹ Balai Besar Litbang Kulit, Karet, dan Plastik (BBKKP), Yogyakarta

² Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Ekstraksi enzim

Sel dipisahkan dari supernatannya dengan sentrifugasi (OTD-COMBI, USA) pada kecepatan 20.000 g selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh digunakan dalam penelitian sebagai larutan enzim (ekstraseluler)

Analisa aktivitas enzim lipase

Aktivitas enzim dianalisa dengan metoda Razak dkk. (1995) dan Kohno dkk. (1994) dengan sedikit modifikasi. Campuran analisa mengandung : 4 ml emulsi minyak zaitun yang sudah dipreinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit; 40 µl CaCl₂.2H₂O 0.02 M; dan 2 ml larutan enzim. Reaksi dikerjakan pada suhu 37°C pada inkubator bergoyang, dan dihentikan setelah 30 menit dengan penambahan 6 ml etanol. Asam lemak yang terbentuk dititrasi dengan NaOH 0.01 N menggunakan indikator phenolphthalin sampai pH 9,0. Emulsi minyak olive dibuat dengan mencampur 1 bagian volume minyak olive dan 2 bagian volume polivinil alkohol (PVA) 2% dalam bufer fosfat pH 7,5.

Satu unit aktivitas didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang membebaskan 1 µmol ekuivalen asam lemak bebas dari minyak zaitun dalam 1 menit pada kondisi analisa. Ekuivalen asam lemak bebas dihitung dari volume NaOH yang digunakan untuk titrasi dikurangi dengan volume blanko dikalikan dengan µmol NaOH dan faktor pengencerannya (Xia dkk., 1996).

Aktivitas relatif dinyatakan dalam persen dan dihitung dengan membagi aktivitas enzim yang diperoleh dengan aktivitas enzim tertinggi pada perlakuan tersebut.

Uji stabilitas pH

Larutan enzim (1 ml) ditambahkan pada bufer (4 ml) dengan berbagai pH (7,5 - 11,0), diinkubasi selama 2 jam pada suhu 4°C, kemudian campuran dinetralkan pada pH pengukuran aktivitas (pH 7,5) dan aktivitasnya diukur dengan standard pengujian. Bufer yang digunakan adalah bufer fosfat untuk kisaran pH 7,5 - 8,0 dan bufer tris untuk kisaran pH 8,0 - 11,0.

Uji aktivitas lipase dalam surfaktan

Aktivitas enzim lipase diukur dengan standard pengujian yang dalam campuran reaksinya telah ditambahkan surfaktan dengan konsentrasi akhir 0,05% atau 0,10%. Surfaktan yang diuji adalah :

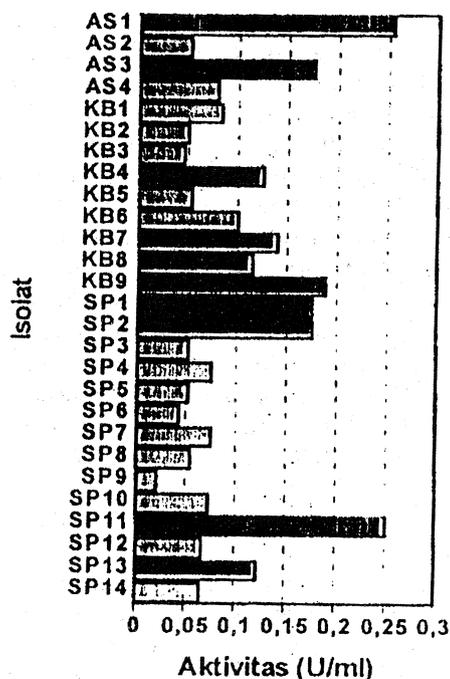
- surfaktan anionik : SDS (sodium dodecyl sulfate), niaproof, NLS (n-lauroyl sarcosine), DCA (dehydrocholic acid);
- surfaktan kationik: CPC (cetyl pyridinium chloride); CDAB (cetyl dimethyl ammonium bromide), CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide)
- surfaktan non-ionik : Triton X-100, tergitol, nonidet P-40).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri

Dari ketiga macam sampel kulit yang diuji-cobakan tumbuh bermacam-macam koloni bakteri dan 27 koloni diantaranya memperlihatkan kenampakan kebiruan pada medium spirit blue, yaitu : 4 koloni dari kulit ayam, 9 koloni dari kulit kambing dan 14 koloni dari kulit sapi. Ke 27 koloni ini diisolasi dan dimurnikan karena diduga mampu menghasilkan enzim lipase, kemudian ditumbuhkan dalam medium cair dan diukur aktivitasnya untuk membuktikan kemampuannya menghasilkan lipase.

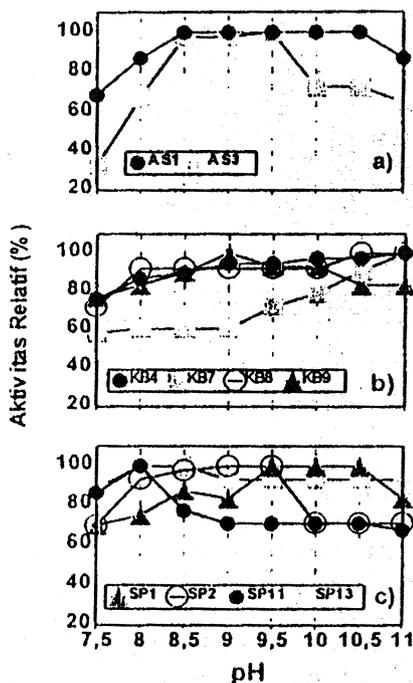
Pada Gambar 1 terlihat bahwa ke 27 isolat mampu menghasilkan enzim lipase. Beberapa isolat memperlihatkan produksi lipase yang rendah di bawah 0,1 U/ml, sedangkan isolat AS1 yang diisolasi dari kulit ayam dan isolat SP11 yang diisolasi dari kulit sapi menunjukkan kemampuan produksi lipase yang tinggi (0,25 U/ml). Dua isolat yang disebutkan terakhir ini juga mempunyai aktivitas spesifik yang paling tinggi diantara yang lain, yaitu masing-masing 0,18 U/mg dan 0,16 U/mg. Untuk kepentingan seleksi lebih lanjut dipilih 10 isolat yang produksi lipasennya > 0,1 U/ml, yaitu : AS1 dan AS3 dari kulit ayam; KB4, KB7, KB8 dan KB9 dari kulit kambing; dan SP1, SP2, SP11, dan SP13 dari kulit sapi.



Gambar 1. Aktivitas enzim lipase dari berbagai isolat. AS, isolat dari kulit ayam; KB, isolat dari kulit kambing; SP, isolat dari kulit sapi.

Pengaruh pH terhadap stabilitas enzim lipase

Enzim lipase dari kesepuluh isolat diuji stabilitasnya pada pH alkali dengan kisaran pH 7,5 - pH 11,0. Sisa aktivitasnya diukur dan dibandingkan dengan aktivitas yang tertinggi pada pengujian tersebut dan dinyatakan sebagai aktivitas relatif. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Pengaruh pH terhadap stabilitas enzim lipase dari beberapa isolat. a. isolat dari kulit ayam; b. isolat dari kulit kambing; c. isolat dari kulit sapi.

Diantara enzim lipase dari kesepuluh isolat tersebut, enzim yang berasal dari isolat SP13 yang diambil dari kulit sapi adalah yang paling stabil pada semua kisaran pH alkali. Aktivitas enzim tersebut masih sebesar > 90% pada kisaran pH alkali tersebut. Kemudian diikuti oleh enzim lipase dari isolat yang berasal dari kulit ayam AS1 yang stabil pada semua pH alkali kecuali pH 7,5. Enzim dari AS3 hanya stabil pada kisaran pH 8,5 - 9,5 (Gambar 2a).

Semua enzim dari isolat kulit kambing (Gambar 2b) menunjukkan pola yang hampir sama yaitu stabil diantara pH 8,0 - 11,0, kecuali yang berasal dari KB7 yang kestabilannya naik pada pH > 10,5. Pada umumnya semakin alkali semakin stabil, kecuali yang berasal dari KB 9 yang kestabilannya menurun dengan semakin tinggi pH-nya.

Enzim dari isolat yang berasal dari kulit sapi (gambar 2c) sifat kestabilannya bermacam-macam. Enzim lipase SP1 stabil pada kisaran pH 8,5 - 11,0. Sedangkan yang berasal dari SP2 hanya stabil pada pH 8,0 - 9,5. Sebaliknya enzim dari SP11 stabil pada pH < 8,0, sehingga isolat SP11 ini walaupun produksi enzimnya sangat tinggi (Gambar 1) tetapi tidak dipilih karena bukan enzim lipase alkali.

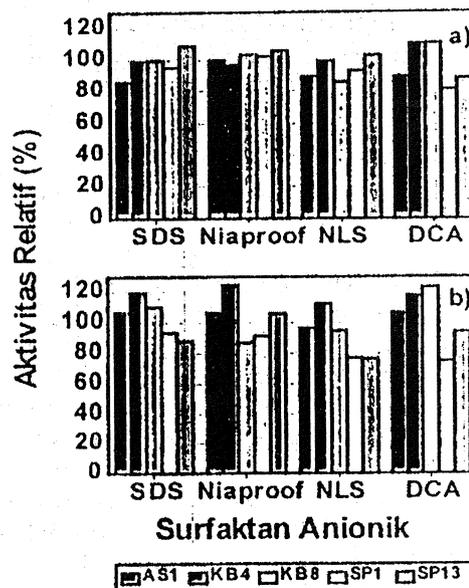
Perubahan pH dapat menyebabkan terjadinya perubahan ion pada protein enzim sehingga struktur enzim berubah (Xia dkk., 1996). Akibatnya aktivitas enzim akan

ikut berubah. Menurut Mesentsev dkk. (1997) pada studi dengan enzim format dehidrogenase, ionisasi tersebut menyebabkan perubahan pada sisi yang berikatan dengan substrat. Perubahan ini ditentukan oleh macam asam amino yang berperan pada sisi pengikatan substrat tersebut, sedangkan asam amino pada pusat aktivitasnya (sisi aktif) akan berpengaruh pada terjadinya ionisasi pada kisaran pH tertentu.

Pengaruh surfaktan terhadap aktivitas enzim lipase

Aktivitas enzim lipase diukur dengan standard pengukuran yang mengandung surfaktan dengan konsentrasi akhir 0,05% atau 0,10%. Kemudian dihitung besarnya aktivitas yang dinyatakan dalam aktivitas relatif dengan membandingkannya dengan aktivitas kontrol (tanpa penambahan surfaktan).

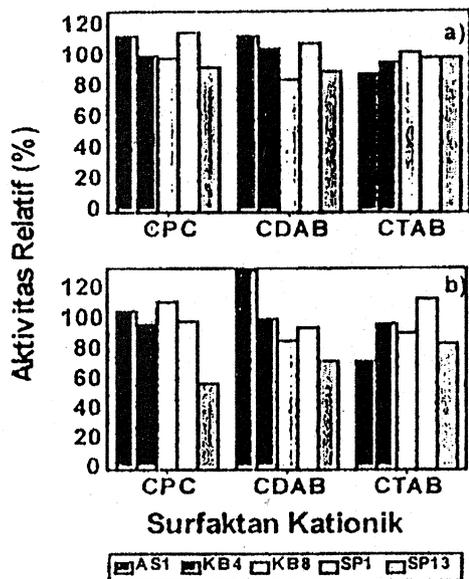
Gambar 3 memperlihatkan pengaruh surfaktan anionik pada aktivitas enzim lipase. Aktivitas lipase dari semua isolat tidak terpengaruh oleh surfaktan jenis ini kecuali lipase yang berasal dari isolat SP1 dan SP13 yang sedikit mengalami penurunan aktivitas dengan adanya dehydrocholic acid 0,05% atau 0,10% atau N-lauroyl sarcosine 0,10%. Enzim yang berasal dari KB4 tidak terhambat dengan adanya surfaktan anionik, bahkan pada konsentrasi 0,10% justru akan menaikkan aktivitasnya. Pola yang sama juga ditunjukkan oleh enzim yang berasal dari kulit kambing yang lain, yaitu KB8, yang relatif stabil pada surfaktan anionik, kecuali dengan N-lauroyl sarcosine 0,05% dan Niaproof 0,10%.



Gambar 3. Pengaruh surfaktan anionik 0,05% (a) dan 0,10% (b) terhadap aktivitas enzim lipase dari beberapa isolat.

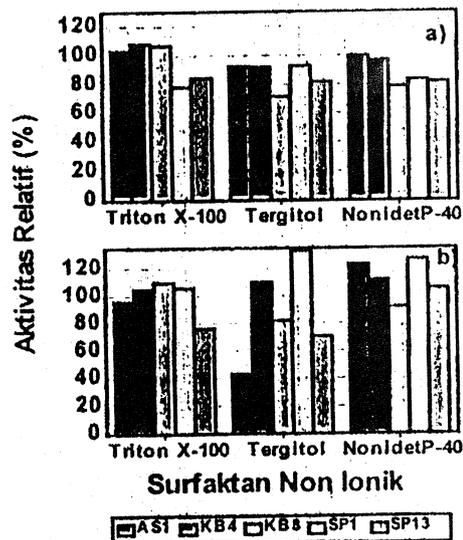
Surfaktan kationik pada Gambar 4 secara umum juga menunjukkan hal yang sama yaitu tidak menghambat aktivitas enzim yang berasal dari semua isolat, kecuali dari

isolat SP13 yang aktivitas enzimnya terhambat dengan adanya cetyl pyridium chloride (CPC) dan cetyl dimethyl ammonium bromide (CDAB) pada konsentrasi 0,10%. Sedangkan enzim yang berasal dari isolat AS1 terhambat dengan adanya cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) 0,10%, walaupun sebaliknya dengan CDAB 0,10% justru mendorong aktivitasnya. Dengan kata lain jumlah metil yang terikat pada surfaktan jenis ini berpengaruh terhadap pengaktifan dan penghambatan enzim lipase. Pada Gambar 4 juga terlihat bahwa aktivitas lipase dari isolat KB4 tidak berpengaruh oleh semua jenis surfaktan kationik yang digunakan dalam penelitian ini, baik pada konsentrasi 0,05% maupun 0,10%.



Gambar 4. Pengaruh surfaktan kationik 0,05% (a) dan 0,10% (b) terhadap aktivitas enzim lipase dari beberapa isolat.

Surfaktan jenis non-ionik secara umum tidak begitu menghambat, kecuali Tergitol dapat menghambat aktivitas lipase dari isolat AS1 dan SP13 sebesar masing-masing 57% dan 29% pada konsentrasi 0,10% (Gambar 5). Demikian juga pada konsentrasi 0,05% dapat menghambat enzim lipase dari isolat KB8. Tetapi untuk enzim yang berasal dari isolat KB4 dan SP1 justru keberadaan surfaktan ini dapat memacu aktivitas enzim terutama pada konsentrasi 0,10%. Demikian juga Nonidet P-40 pada konsentrasi 0,10% dapat memacu aktivitas hampir semua macam lipase. Pada Gambar 5 ini juga terlihat bahwa aktivitas enzim dari semua isolat tidak terpengaruh oleh adanya Triton X-100, kecuali yang berasal dari isolat SP1 dan SP13 yang sedikit terhambat aktivitasnya pada konsentrasi masing-masing 0,05% dan 10%. Diantara enzim-enzim tersebut, enzim yang berasal dari KB4 relatif tahan terhadap semua jenis surfaktan non-ionik pada semua konsentrasi.



Gambar 5. Pengaruh surfaktan non-ionik 0,05% (a) dan 0,10% (b) terhadap aktivitas enzim lipase dari beberapa isolat.

Surfaktan anionik karena sifatnya dapat memecah protein menjadi subunitnya, maka pengaruhnya dapat menghilangkan aktivitas enzim terutama pada enzim yang berbentuk polimerik. Pada penelitian ini hampir semua enzim tahan pada semua jenis surfaktan anionik yang dicoba. Hal ini menunjukkan kemungkinan enzim tersebut berbentuk monomerik, sehingga tidak mengalami perubahan bentuk, walaupun hal ini perlu dibuktikan lebih lanjut. Hasil penelitian ini berbeda dengan yang dilaporkan oleh Andree dkk. (1980) yang menyebutkan bahwa enzim lipase sangat terhambat aktivitasnya dengan adanya surfaktan anionik. Sedangkan menurut Kawase dkk. (1985) pengaruh surfaktan anionik bervariasi tergantung macam enzim lipasena, walaupun pada umumnya mempunyai efek menghambat.

Kecenderungan surfaktan anionik yang mengaktifkan pada konsentrasi rendah, tetapi menghambat pada konsentrasi tinggi diduga oleh Kawase dkk. (1985) sebagai akibat terbentuknya kompleks lipase-surfaktan yang mempunyai permukaan lebih aktif dibanding lipase awalnya sehingga mendorong aktivitasnya. Pada konsentrasi tinggi akan merubah bentuk konformasinya atau berpengaruh pada sisi aktifnya sehingga terjadi penghambatan. Sedangkan surfaktan non-ionik akan sukar merubah bentuk konformasi protein enzim, kecuali pada konsentrasi yang tinggi (Kawase dkk. 1985). Hal ini dapat dilihat misalnya pengaruh Tergitol pada lipase SP1 atau Nonidet P-40 pada hampir semua enzim. Teori yang lain menyebutkan bahwa pengaruh surfaktan lebih pada perubahan enzim dalam fase antara minyak-air dibandingkan dengan terjadinya kenaikan luas permukaan fase tersebut (Mosaffar dkk. 1994). Sedangkan menurut Xia dkk. (1996) kemungkinan senyawa aktif dari surfaktan akan terserap pada permukaan emulsi sehingga akan mempengaruhi sisi aktif lipase. Dalam penelitian ini terlihat bahwa sifat enzim lipase terhadap surfaktan bervariasi tergantung jenis isolatnya.

KESIMPULAN

Sepuluh isolat dapat diisolasi dari beberapa macam kulit yang menghasilkan enzim lipase tinggi. Lima dari isolat-isolat ini menghasilkan lipase alkali. Enzim lipase yang berasal dari kulit ayam (AS1) produksinya paling tinggi, relatif stabil terhadap berbagai macam surfaktan kecuali dengan Trigitol (non-ionik) dan CTAB pada konsentrasi 0,10%. Enzim lipase alkali yang berasal dari kulit kambing (KB4 dan KB8) walaupun aktivitasnya tidak terlalu tinggi dibanding AS1 tetapi tahan terhadap semua jenis surfaktan. Kestabilan terhadap surfaktan pada lipase KB4 sedikit lebih tinggi dibanding lipase KB8. Sedangkan lipase alkali yang berasal dari kulit sapi walaupun paling stabil terhadap variasi pH alkali (SP13) dibanding enzim lipase yang lainnya, tetapi sedikit terhambat aktivitasnya dengan adanya surfaktan. Hampir semua enzim lipase pada penelitian ini stabil dengan adanya surfaktan anionik, baik pada konsentrasi 0,05% maupun 0,10%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi yang telah membiayai penelitian ini melalui proyek URGE-Penelitian Doktor Baru.

DAFTAR PUSTAKA

- Andree, H., Muller, W.R., dan Schmid, R.D. 1980. Lipases as detergent components. *J. Appl. Biochem.*, 2:218-229.
- Brochkerhoff, H., dan Jensen, R.G. 1974. *Lipolytic enzymes*. Academic Press, New York.
- Budiatman, S., Fardiaz, D., Nurtama, B., Robiatul, D., dan Gesang, M. 1993. Proses interesterifikasi minyak sawit dan inti sawit untuk mendapatkan produk-produk yang bernilai tinggi : I. Penelusuran teknik proses. Laporan Penelitian. Proyek Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat, PAU Pangan dan Gizi, IPB, Bogor.
- Christner, J. 1992. The use of lipases in the beamhouse processes. *J. Am. Leather Chem. Ass.*, 87:128-139.
- Crueger, W., dan Crueger, A. 1989. *Biotechnology : A textbook of industrial microbiology*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, M.A.
- Indrati, R., Rumiayati, V.S.P., dan Utami, T. 1998. Production of alkaline lipase from *Kluyvera* KB4. *Ind. Food Nutr. Prog.* (in press).
- Kawase, T., Hashimoto, T., Fujii, T., dan Minagawa, M. 1985. *Jpn. Oil Chem. Soc.* (Yukagaku), 34:22.

- Kohno, M., Kugimiya, W., Hashimoto, Y., dan Morita, Y. 1994. Purification, characterization, and crystalization of two types of lipase from *Rhizopus niveus*. *Biosci. Biochem.*, 58:1564-1568.
- Kojima, Y., Yokoe, M., dan Mase, T. 1994. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* Ak102. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58:1564-1568.
- Kokusho, Y., Machida, H., dan Iwasaki, S. 1982. Production and properties of alkaline lipase from *Alcaligenes* sp. strain no. 679. *Agric. Biol Chem.*, 6:1743-1750.
- Lesuisse, E., Schanck, K., dan Colson, C. 1993. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem.*, 216:155-160.
- Lin, S.F., Chiou, C.M., Yeh, C.M. dan Tsai, Y.C. 1996. Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Appl. Environ. Microb.*, 62:1093-1095.
- Mesentsev, A.V., Lamzin, V.S., Tishkov, V.I., Ustinnikova, T.B., dan Popov, V.O. 1997. Effect of pH on kinetic parameters of NAD-dependent formate dehydrogenase. *Biochem. J.* 321:475-480.
- Mozaffar, Z., Weete, J.D., dan Dute, R. 1994. Influence of surfactants on an extracellular lipase from *Pythium ultimum*. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71:75-79.
- Ohnisi, K., Yoshida, Y., dan Sekiguchi, J. 1994. Lipase production of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Bioeng.*, 77:490-495.
- Razak, C.N.A., Salleh, A.B., Basri, M., dan Yunus, W.M.Z. 1995. Screening, isolation and characterization of lipolytic microbes. *Indonesian Food Nutr. Prog.*, 2:9-11.
- Samad, M.Y.A., Salleh, A.B., Razak, C.N.A., Ampon, K., Yunus, W.M.Z.W., dan Basri, M. 1990. A lipase from newly isolated thermophilic *Rhizopus rhizopodiformis*. *World J. Microb. Biotech.*, 6:390-394.
- Xia, J., Chen, X., dan Nnanna, I.A. 1996. Activity and stability of *Penicillium cyclopium* lipase in surfactant and detergent solutions. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73:115-120.
- Yamane, T. 1988. Enzyme technology for the lipid industry : An engineering overview. Dalam *Proceedings world conference on biotechnology for the fats and oils industry*. Applewhite, T.H. (Ed.). *Am. Oil Chem. Soc.*, p. 17-22.