

OPTIMASI ISOLASI LIPASE INDIGENOUS BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.)

The Optimizing of Isolation of Cocoa Bean Indogenous Lipase (*Theobroma cacao* L.)

I D. G. Mayun Permana¹, Retno Indrati², Pudji Hastuti²

¹Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana, Gedung GA, Kampus Bukit Jimbaran, Bali; ²Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora Bulaksumur 55281

Email: mayun_dev@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi isolasi lipase indigenous biji kakao. Optimasi diawali dengan menentukan keberadaan lipase kemudian optimasi medium ekstraksi dan proses ekstraksi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa lipase berada dalam sitosol. Penghilangan lemak tidak meningkatkan aktivitas lipase. Senyawa polifenol menghambat aktivitas lipase dan penghilangan polifenol dapat meningkatkan aktivitas lipase. Polyvinilpyrrolidone (PVPP) dapat menghambat polifenol sehingga dapat meningkatkan aktivitas lipase. Konsentrasi PVPP optimum adalah 8 % dari berat biji kakao. Proses homogenisasi optimum diperoleh dalam waktu 10 menit pada kecepatan 10.000 rpm. Medium ekstraksi untuk isolasi lipase biji kakao terbaik adalah bufer fosfat 0,15 M dan pH 7,5 yang mengandung sukrosa 0,6 M dan 1,0 mM CaCl₂.

Kata kunci : Isolasi, lipase, biji kakao, optimasi

ABSTRACT

The aim of the research is to optimize the isolation method of cocoa bean lipase. The research is held by determining the position of lipase on cocoa bean, varying extraction medium and isolation process. The result shows that the lipase of cocoa bean is cytosolic enzyme. The defatting process do not increase the lipase activity. Polyphenols inhibit the lipase activity, so that removal of the polyphenol will increase the activity. Blocking the polyphenol with polyvinilpyrrolidone (PVPP) will also increase the activity. The optimum concentration of PVPP is 8 %. The lipase activity will reach the highest when homogenized for 10 menit at 10,000 rpm. The best medium extraction for lipase isolation is 0.15 M phosphate buffer pH 7.5 containing sucrose 0.6 M and CaCl₂ 1.0 mM.

Keywords : Isolation, lipase, cocoa bean, optimation

PENDAHULUAN

Lipase adalah enzim yang larut dalam air dan menghidrolisis ikatan ester pada substrat yang tidak larut dalam air, tetapi pada kadar air yang rendah mampu mengkatalis reaksi esterifikasi (Willis dan Marangoni, 2002). Masing-masing lipase memerlukan kadar air minimal yang berbeda untuk mempertahankan aktivitas dan konformasinya (Dordick, 1989). *Enzyme Commission* menggolongkan lipase dalam kelompok hidrolase dengan kode EC 3.1.1.3. Lipase mengkatalisis substrat non polar atau aktif pada interfase (*interfacial activated*) maka lipase juga disebut enzim interfase (*interface enzyme*). Hal ini yang membedakan lipase dengan esterase dan thioesterase (Wong dan Schotz, 2002).

Kebutuhan lipase setiap tahun meningkat yang digunakan untuk industri oleokimia, industri makanan fungsional, biodisel dan temuan-temuan baru dibidang iptek. Sekitar 4 % dari kebutuhan enzim dunia berupa lipase. Hal ini merupakan salah satu peluang pasar untuk produksi lipase terutama lipase yang mempunyai karakter yang spesifik.

Ada tiga sumber utama untuk mendapatkan lipase yaitu hewan, mikrobia dan tumbuhan. Lipase pada tanaman yang sudah banyak diteliti diambil dari biji. Biji-bijian yang mengandung lemak tinggi merupakan sumber lipase (Lotti dan Alberghina, 2007). Pada umumnya lipase pada biji memiliki afinitas yang tinggi terhadap asam lemak yang dominan pada biji tersebut. Sifat ini tidak dimiliki oleh lipase dari mikrobia (Lin dkk., 1983; Huang dkk., 1988). Lipase dari biji juga

mempunyai kemampuan yang efektif untuk menghidrolisis trigliserida pada posisi sn-1,3 (Enujiugha dkk, 2004). Sifat seperti ini yang banyak dibutuhkan oleh berbagai industri.

Tahap awal untuk mendapatkan lipase adalah isolasi dan merupakan tahap yang sangat penting untuk mendapatkan aktivitas dan jumlah lipase yang maksimal. Faktor yang mempengaruhi keberhasilan isolasi adalah sifat sumber lipasena dan kondisi ekstraksi. Sifat dari sumber lipasena yang berpengaruh adalah keberadaan lipase dalam biji dan komposisi biji. Lipase pada biji ada yang terikat dalam membrane (*lipid body*, *oleosome*) dan ada dalam subseluler atau cairan sel. Lipase pada *lipid body* ditemukan pada biji rami (Linseed) (Sammour, 2005), biji jagung (Lin dkk., 1983). Sedangkan lipase pada sitosol didapat pada biji *Jatropha curcas* L (Abigor dkk., 2002), biji kacang *African* (Enujiugha dkk., 2004), biji bunga matahari (Sagiroglu dan Arabaci, 2005), *Pachira aquatica* (Polizelli dkk., 2008) dan *Laurus nobilis* L (Isbilir dkk., 2008). Sedangkan komponen biji yang banyak berpengaruh adalah kandungan lemak dan senyawa polifenol. Doonan (1996) menyatakan bahwa biji yang mengandung lemak tinggi perlu dilakukan defatting untuk mengurangi hambatan difusi lipase dari sel. He dkk. (2006) dan Kusano dkk. (2008) melaporkan adanya penghambatan aktivitas lipase dengan penambahan polifenol yang diekstrak dari teh.

Kondisi ekstraksi yang berpengaruh adalah komposisi medium ekstraksi (pelarut) dan kondisi proses ekstraksi seperti perlakuan homogenisasi. Medium ekstraksi yang banyak digunakan pada biji adalah 0,6 M sukrosa, 2 mM EDTA, 10 mM KCl dan 1 mM $MgCl_2$ dalam buffer pH 7,5 (Lin dkk., 1983, Abigor dkk., 2002). Medium baffle biasanya digunakan pada biji yang dilakukan defatting seperti ekstraksi lipase biji bunga matahari dan biji *Pachira aquatica*. Proses ekstraksi yang berpengaruh terhadap kerusakan struktur lipase adalah kecepatan dan lamanya waktu homogenisasi.

Biji kakao mengandung lemak yang sangat tinggi yaitu 30-32 % pada biji basah atau lebih dari 50 % pada biji kering. Lemak kakao mempunyai komposisi utama trigliserida yang terdistribusi berupa POS_t , S_tOS_t dan POP (P = asam palmitat, O = asam oleat dan S_t = asam stearat) sebesar 70-88 % (Smith, 2001). Komposisi lemak kakao yang demikian menyebabkan lemak kakao berbentuk padat pada suhu ruang. Biji kakao lindak mengandung senyawa polifenol yang tinggi sekitar 8-12 %.

Tujuan penelitian ini adalah optimasi isolasi lipase biji kakao sehingga diperoleh aktivitas dan jumlah lipase yang maksimal.

METODE PENELITIAN

Bahan

Biji kakao yang digunakan klon RCC 70 yang diperoleh dari perkebunan PT. Pagilaran di Samigaluh, Kabupaten Kulon Progo, DIY. Minyak zaitun, Asam Oleat, Isooktan, Polyvinilpyrrolidone (PVPP), EDTA, Bufer Fosfat 0,15 M, Cu-asetat, Pyridin, Aseton, Petroleum Eter.

Optimasi Isolasi Lipase Biji Kakao

Penentuan keberadaan lipase. Isolasi lipase dilakukan menggunakan metode Abigor dkk. (2002). Lima gram biji kakao yang telah dihilangkan kulitnya ditambah polyvinilpyrrolidone 0,4 g kemudian digerus. Bubuk ditambahkan 15 ml bufer fosfat pH 7,5 kemudian dihomogenisasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Homogenat kemudian disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 5000 g sehingga diperoleh supernatan, pelet dan lapisan lemak. Pelet diekstraksi kembali dengan medium ekstraksi yang sama dan disentrifugasi sehingga diperoleh supernatan. Lapisan lemak diekstrak lagi dengan ditambahkan Tween 20 sebanyak 1,5 % sehingga didapat supernatan. Masing-masing supernatan yang diperoleh diuji aktivitasnya, apabila aktivitas tertinggi pada supernatan hasil ekstraksi pertama berarti lipase berada pada sitosol dan bila aktivitas tertinggi pada supernatan hasil ekstraksi lapisan lemak berarti lipase berada dalam *lipid body*.

Ekstraksi lemak dan senyawa polifenol pada biji. Untuk mengetahui pengaruh lemak dan senyawa polifenol maka sebelum biji kakao diisolasi lipasena dilakukan perlakuan: a). biji kakao diekstraksi lemak (defatting) tanpa ekstraksi polifenol, b). diekstraksi lemak yang dilanjutkan dengan ekstraksi polifenol dan c). penghambatan senyawa polifenol dengan PVPP tanpa diekstrak lemak dan polifenolnya. Konsentrasi PVPP yang digunakan divariasi: 0, 4, 8 dan 12 %.

Ekstraksi lemak (Defatting): biji yang telah digerus ditambahkan petroleum eter dengan perbandingan 1:6 (b/V), didiamkan selama 1 jam kemudian disaring. Kedalam residu ditambahkan lagi petroleum eter dalam jumlah yang sama dan ekstraksi lemak diulang sebanyak tiga kali.

Ekstraksi senyawa polifenol: biji yang sudah digerus atau sudah defatting ditambahkan aseton 100 % suhu -20 °C dengan perbandingan 1:6 (b/V) kemudian dibiarkan pada suhu -20 °C selama 1 jam sambil digojog setiap 20 menit. Selanjutnya disentrifugasi 5.000 g pada suhu 4 °C selama 15 menit. Supernatan dipisahkan dan residu ditambah lagi dengan aseton 80 % suhu -20 °C dalam jumlah yang sama dan dengan perlakuan yang sama. Ekstraksi dengan aseton 80

% dilakukan sebanyak 3 kali dan terakhir kembali digunakan aseton 100 %.

Optimasi Homogenisasi

Optimasi homogenisasi dilakukan terhadap kecepatan dan lamanya waktu homogenisasi. Kecepatan homogenisasi dilakukan dengan variasi 5.000, 10.000 dan 15.000 rpm dengan waktu homogenisasi 10 menit. Sedangkan lamanya waktu homogenisasi dilakukan dengan variasi 5, 10 dan 15 menit pada kecepatan 10.000 rpm.

Optimasi Komponen Medium Ekstraksi

Optimasi medium ekstraksi dilakukan dengan menambahkan komponen yang mempengaruhi ekstraksi seperti sukrosa untuk meningkatkan gaya osmose dan stabilitas lipase, EDTA 1 mM untuk menghambat protease, CaCl₂ 1 mM dan MgCl₂ 1 mM sebagai aktivator. Masing-masing secara individu ditambahkan dalam bufer fosfat pH 7,5 dan komponen yang berpengaruh dilanjutkan dengan optimasi konsentrasinya. Hasil optimasi masing-masing komponen dikombinasikan untuk mendapatkan campuran medium ekstraksi yang optimal.

Pengujian Aktivitas Lipase

Aktivitas lipase diuji menggunakan metode Marseno dkk (1998). Lima mililiter minyak zaitun 60 % dalam isooktan ditambahkan 0,25 ml lipase kemudian divortex. Diinkubasikan dalam shaker waterbath selama 1 jam pada suhu 35 °C. Lapisan minyak diambil 4 ml dan ditambahkan 1 ml larutan 5 % Cu-asetat piridin pH 6 kemudian digojog selama 90 detik. Campuran disentrifugasi selama 5 menit pada 2.000 rpm selanjutnya ditera absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 715 nm. Satu unit aktivitas (U) lipase adalah banyaknya lipase untuk melepas 1 µmol asam lemak tiap menit

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keberadaan Lipase dalam Biji

Berdasarkan aktivitas dari masing-masing bagian atau lapisan hasil sentrifugasi menunjukkan bahwa aktivitas lipase tertinggi diperoleh pada supernatan (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa lipase pada biji kakao keberadaannya pada cairan sel (sitosol). Dugaan tersebut juga diperkuat dengan tidak adanya aktivitas lipase pada lapisan lemak atau berarti lipase biji kakao tidak terikat pada lapisan lemak. Keberadaan lipase dalam sitosol juga diperoleh pada biji *Jatropha curcas* L (Abigor dkk., 2002), biji kacang *African* (Enujiugha dkk., 2004), biji bunga matahari (Sagiroglu dan

Arabaci, 2005), *Pachira aquatica* (Polizelli dkk., 2008) dan *Laurus nobilis* L (Isbilir dkk., 2008). Sedangkan pada pelet masih ada aktivitas tetapi sangat rendah, ini kemungkinan belum sepenuhnya lipase dalam sel biji terekstrak sehingga perlu perlakuan yang dapat mengekstrak lipase lebih sempurna.

Tabel 1. Aktivitas lipase pada masing masing komponen biji kakao

Komponen	Aktivitas	
	(U/ml)	(%)
Supernatan	0,037 ± 0,0087	75,51
Lemak	0,000 ± 0,0000	0,00
Pelet	0,012 ± 0,0039	24,49

Pengaruh Lemak dan Senyawa Polifenol dalam Biji Kakao

Biji tanpa perlakuan (tanpa defatting, tanpa ekstraksi senyawa polifenol dan tanpa penghambatan polifenol) menghasilkan aktivitas lipase terendah. Biji yang diekstraksi polifenolnya tetapi tanpa defatting diperoleh aktivitas lebih besar dibandingkan dengan tanpa perlakuan. Aktivitas tertinggi diperoleh pada biji dengan perlakuan defatting dilanjutkan dengan ekstraksi senyawa polifenol tetapi tidak berbeda nyata dengan biji tanpa perlakuan (tanpa defatting dan tanpa diekstraksi polifenol) yang ditambahkan PVPP (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa lemak tidak besar penghambatannya pada ekstraksi lipase biji kakao, sedangkan peranan senyawa polifenol sangat besar terhadap penghambatan aktivitas lipase. Senyawa polifenol dapat menghambat aktivitas enzim karena mampu berikatan dengan protein dan bahkan dalam konsentrasi yang tinggi dapat mengakibatkan protein mengalami presipitasi. Seperti pendapat He dkk. (2006) bahwa penambahan 0,05 mg/ml polifenol yang diekstrak dari teh mengakibatkan penurunan aktivitas lipase sebesar 54 %. Kusano dkk. (2008) melaporkan adanya penghambatan sampai 80,3 % aktivitas lipase yang ditambahkan ekstrak polifenol dari teh hitam.

Tabel 2. Pengaruh defatting dan ekstraksi polifenol terhadap aktivitas lipase

Perlakuan	Aktivitas (U/ml)
Biji defatting tanpa ekstraksi polifenol	0,019 ± 0,0044
Biji tanpa defatting dan diekstrak polifenol	0,040 ± 0,0020
Biji defatting dan diekstrak Polifenol	0,051 ± 0,0022
Biji tanpa perlakuan + 8%PVPP	0,049 ± 0,0020

Polyvinilpolipirrolidone (PVPP) sangat berpengaruh terhadap aktivitas lipase biji kakao. Pada konsentasi

PVPP 0 % aktivitasnya paling rendah dan semakin tinggi konsentrasinya semakin tinggi aktivitas sampai pada konsentrasi 8 %, sedangkan pada konsentrasi 12 % terjadi penurunan aktivitas lipase (Tabel 3). Lipase dapat dihambat oleh senyawa polifenol terutama yang telah mengalami oksidasi. Biji kakao mengandung senyawa polifenol sangat tinggi sehingga senyawa polifenolnya harus dihambat atau dihilangkan. Doonan (1996) menyebutkan bahwa PVPP dapat mengabsorpsi dan menghambat oksidasi senyawa polifenol. Konsentrasi optimum PVPP pada ekstraksi enzim dari tanaman berkisar 4-8 gram tiap 100 gram bahan (4-8 %) tergantung dari kadar polifenol bahan. Pada konsentrasi PVPP 0 % aktivitas sangat rendah, hal tersebut disebabkan karena tidak terjadi penghambatan senyawa polifenol sehingga polifenol akan menghambat aktivitas lipase biji kakao. Aktivitas lipase semakin meningkat dengan meningkatnya konsentrasi dan konsentrasi optimum PVPP 8 %. Konsentrasi PVPP yang terlalu tinggi dapat menyebabkan enzim atau protein juga diabsorpsi oleh PVPP sehingga dapat menurunkan aktivitas lipase (Doonan,1996).

Tabel 3. Aktivitas Lipase pada Variasi Konsentrasi PVPP

Konsentrasi PVPP	Aktivitas (U/ml)
0%	0,019 ± 0,0044
4%	0,040 ± 0,0044
8%	0,068 ± 0,0087
12%	0,012 ± 0,0044

Optimasi Proses Homogenisasi

Homogenisasi dapat menyebabkan kerusakan pada struktur protein oleh gaya yang ditimbulkan. Lama dan kecepatan sentrifugasi sangat berpengaruh terhadap kerusakan struktur protein. Homogenisasi yang singkat maka pelarutan lipase lebih rendah sehingga lipase yang terekstrak sedikit. Sedangkan homogenisasi yang terlalu lama dapat menyebabkan struktur lipase akan rusak sehingga aktivitas lipase menjadi rendah. Hasil dari variasi lamanya waktu homogenisasi diperoleh bahwa aktivitas tertinggi pada lama homogenisasi 10 menit. (Tabel 4).

Tabel 4. Aktivitas lipase dengan variasi waktu homogenisasi

Waktu Homogenisasi	Aktivitas (U/ml)
10 menit	0,028 ± 0,0044
20 menit	0,015 ± 0,0565
30 menit	0,009 ± 0,0009

Homogenisasi dengan kecepatan yang semakin tinggi akan meningkatkan hasil ekstraksi lipase, tetapi kecepatan yang terlalu tinggi dapat merusak struktur protein. Ho-

mogenisasi dengan kecepatan 5.000 rpm lebih kecil aktivitasnya hal ini kemungkinan karena gaya yang dihasilkan belum mencukupi untuk mengekstrak seluruh lipase dalam biji. Sedangkan kecepatan homogenisasi 15.000 rpm menghasilkan aktivitas yang rendah yang kemungkinan disebabkan karena gaya yang ditimbulkan terlalu besar sehingga merusak struktur lipase. Aktivitas tertinggi diperoleh pada perlakuan kecepatan homogenisasi 10.000 rpm (Tabel 5)

Tabel 5. Aktivitas lipase pada variasi kecepatan homogenisasi

Kecepatan Homogenisasi	Aktivitas (U/ml)
5000 rpm	0,046 ± 0,0065
10.000 rpm	0,083 ± 0,0131
15.000 rpm	0,046 ± 0,0085

Optimasi Medium Ekstraksi

Penambahan sukrosa 0,6 M pada medium ekstraksi menyebabkan aktivitas lipase meningkat cukup tinggi dibandingkan dengan kontrol. Jika dibandingkan dengan penambahan komponen-komponen lain, penambahan sukrosa 0,6 M dalam bufer fosfat menghasilkan aktivitas paling tinggi (Tabel 6). Sukrosa dapat meningkatkan tekanan osmose sehingga dapat memperbesar komponen sel biji terekstraksi termasuk lipasena. Lipase merupakan glikoprotein dan gula dalam lipase sangat berperan dalam pembukaan tutup (lid) sisi aktif pada saat kondisi enzim aktif. Lotti dan Alberghina (2007) menyatakan bahwa rantai oligosakarida berkontribusi untuk stabilitas membuka dan menutup lid melalui berinteraksi dengan bagian dalam dari sisi lid. Aktivitas lipase pankreas manusia dan babi akan menurun apabila oligosakaridanya dihilangkan. Hilangnya oligosakarida pada lipase pankreas juga menyebabkan lipase dapat diserang dan dihidrolisis oleh pepsin dalam kondisi asam. Sukrosa kemungkinan dapat menstabilkan oligosakarida lipase selama ekstraksi. Seperti pendapat Doonan (1996) bahwa sukrosa berperan dalam ekstraksi dan menjaga stabilitas lipase.

Aktivitas lipase pada medium yang ditambahkan EDTA tidak berbeda dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa lipase biji kakao tidak mengandung *impurities metalloprotease*. EDTA berfungsi sebagai pengkelat logam untuk menghambat aktivitas metalloprotease. Hasil ini berbeda dengan yang dilaporkan Sammour (2005) pada lipase linseed dan Lin dkk. (1983) pada lipase *scutela* jagung yaitu EDTA 1 mM dapat meningkatkan aktivitas lipase.

MgCl₂ dan CaCl₂ diketahui sebagai aktivator lipase, hasil yang diperoleh ternyata hanya CaCl₂ yang meningkatkan aktivitas lipase, sedangkan MgCl₂ aktivitasnya justru lebih rendah dari kontrol. MgCl₂ biasanya dibutuhkan pada enzim intraseluler, sedangkan CaCl₂ umumnya cocok untuk enzim

ekstraseluler. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Hills dan Beever (1987) pada lipase biji jarak yaitu jika menggunakan $MgCl_2$ pengaruhnya hanya sebesar 6 % dibandingkan dengan menggunakan $CaCl_2$ pada konsentrasi 2 mM.

Tabel 6. Aktivitas lipase pada masing-masing komponen medium ekstraksi

Komponen	Aktivitas (U/ml)
Sukrosa 0,6 M	0,102 ± 0,0087
EDTA 1,0 mM	0,037 ± 0,0017
$MgCl_2$ 1,0 mM	0,034 ± 0,0037
$CaCl_2$ 1,0 mM	0,041 ± 0,0022
Bufer (kontrol)	0,037 ± 0,0010

Pada penelitian pengaruh variasi konsentrasi sukrosa menunjukkan bahwa konsentrasi tertinggi diperoleh pada konsentrasi sukrosa 0,4 M dan tidak jauh perbedaannya dengan konsentrasi sukrosa 0,6 M, sedangkan konsentrasi sukrosa 0,2 M jauh lebih rendah (Tabel 7). Konsentrasi sukrosa sangat berpengaruh terhadap hasil ekstraksi lipase, pada konsentrasi yang rendah gaya osmosenya rendah dan pada konsentrasi tinggi gaya osmose tinggi tetapi dapat juga menyebabkan kerusakan struktur protein. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian Abigor dkk. (2002) yang mengekstraksi lipase biji jarak menggunakan sukrosa 0,6 M, dan Sammour (2005) yang menggunakan konsentrasi sukrosa 0,4 M untuk mengekstraksi lipase linseed.

Tabel 7. Pengaruh konsentrasi sukrosa terhadap aktivitas lipase

Konsentrasi	Aktivitas (U/ml)
Sukrosa 0,2 M	0,042 ± 0,0022
Sukrosa 0,4 M	0,107 ± 0,0048
Sukrosa 0,6 M	0,103 ± 0,0023

Hasil optimasi konsentrasi $CaCl_2$ dapat dilihat pada Tabel 8. Ion Ca^{+2} dapat membantu aktivitas dalam pengikatan substrat ataupun pembentukan kompleks enzim substrat. Jumlah ion Ca^{+2} yang dibutuhkan tergantung dari jumlah molekul enzim, sedangkan jumlah ion Ca^{+2} yang berlebihan tidak akan bermanfaat dan bahkan dapat mengikat asam lemak. Aktivitas tertinggi diperoleh pada konsentrasi $CaCl_2$ 1,0 mM sedangkan Sagiroglu dan Arabaci (2005) mendapatkan konsentrasi optimum $CaCl_2$ 0,5 mM pada ekstraksi lipase biji bunga matahari dan Hills dan Beever (1987) pada ekstraksi lipase biji jarak diperoleh konsentrasi $CaCl_2$ 1,2 mM.

Tabel 8. Aktivitas Lipase pada Variasi $CaCl_2$ dalam Bufer

Konsentrasi	Aktivitas (U/ml)
$CaCl_2$ 0,5 mM	0,013 ± 0,0015
$CaCl_2$ 1,0 mM	0,041 ± 0,0046
$CaCl_2$ 1,5 mM	0,030 ± 0,0020
$CaCl_2$ 2,0 mM	0,029 ± 0,0013

Hasil percobaan dengan mengkombinasikan $CaCl_2$ dengan sukrosa disajikan dalam Tabel 9 dan sebagai kontrol digunakan buffer fosfat. Aktivitas lipase biji kakao tertinggi diperoleh dari kombinasi sukrosa 0,6 M dengan $CaCl_2$ 1,0 mM sebesar 0,159 U/ml supernatan. Antara sukrosa 0,4 M dan sukrosa 0,6 M secara individu diperoleh aktivitas lebih tinggi pada sukrosa 0,4 M, namun setelah dikombinasikan dengan $CaCl_2$ ternyata hasilnya lebih tinggi pada sukrosa 0,6 M. Hasil ini lebih tinggi dari perlakuan sukrosa dan $CaCl_2$ secara individu. Hal ini menunjukkan adanya sinergisme yang kuat antara sukrosa dengan $CaCl_2$ sebagai medium ekstraksi. Adanya sinergisme disebabkan oleh kemampuan dan kesesuaian ion Ca^{+2} membantu pengikatan substrat ataupun pembentukan kompleks enzim substrat dan dikombinasikan dengan peran sukrosa dalam menjaga stabilitas lipase maupun memberikan gaya osmosa saat ekstraksi lipase (Doonan, 1996).

Tabel 9. Pengaruh aktivator $CaCl_2$ 1,0 mM dalam sukrosa terhadap aktivitas lipase

Komponen	Aktivitas (U/ml)
Buffer + $CaCl_2$ 1 mM	0,034 ± 0,0046
Sukrosa 0,4M + $CaCl_2$ 1 mM	0,094 ± 0,0026
Sukrosa 0,6M + $CaCl_2$ 1 mM	0,159 ± 0,0022

KESIMPULAN

1. Lipase biji kakao keberadaannya pada bagian sitosol sel biji.
2. Lemak pada biji kakao tidak besar penghambatannya pada isolasi lipase, sedangkan penghilangan senyawa polifenol meningkatkan aktivitas lipase.
3. Penghambatan polifenol oleh Polyphenylpyrrolidone (PVPP) dapat meningkatkan aktivitas lipase dan konsentrasi optimumnya 8 %.
4. Proses homogenisasi optimum pada isolasi lipase biji kakao diperoleh pada kecepatan 10.000 rpm dengan waktu 10 menit.

5. Medium ekstraksi yang baik digunakan untuk isolasi lipase biji kakao adalah 0,15 M buffer fosfat pH 7,5 yang mengandung sukrosa 0,6 M dan CaCl_2 1 %.

DAFTAR PUSTAKA

- Abigor, R.D., Uadia P.O., Foglia T.A., Hass, M.J. Scott K. dan Savary. B.J.(2002). Partial purification and properties of lipase from germinating seeds of *Jatropha curcas* L. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **79**: 11.
- Doonan, S. (1996). *Protein Purification Protocols*. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.
- Dordick, J. (1989). Enzymatic catalysis in monophasic organic solvent. *Enzyme Microbiology Technology* **11**: 194-211.
- Enujiugha, V.N., Thani, F.A. Sanni T.M. dan Abigor. R.D.(2004). Lipase activity in dorman seeda of the african oil bean (*Pentaclethra macrophylla* Benth). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **88**: 405-410.
- He, Q., Yuanping dan Yao, K., (2006). Effect of Tea poyphenols on activiies of a-amilase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chemistry* **101**: 1178-1182.
- Hills, M.J. dan Beevers, H. (1987). Ca^{2+} stimulated neutral lipase activity in castor bean lipid bodies. *Plant Physiology* **84**: 272-276.
- Huang, A.H.C., Lin Y. dan Wang. S. (1988). Characteristic and biosynthesis of seed lipases in maize and other plant species. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **5**: 897-899.
- Isbilir, S.S., Ozcan, H.M. dan Yagar, H. (2008). Some biochemical properties of lipase from bay laurel (*Laurus nobilis* L) Seeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **85**: 227-233.
- Kusano, R., Amdou, H. Fujieda, M., Tanaka, T Matsuo Y. dan Kouno I. (2008). Polymer-like polyphenols of black tea and their lipase and amylase inhibitory activities. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **56**: 266-272.
- Lin, Y-H, Wimer, L.T. dan Huang, A.H.C. (1983). Lipase in the lipid bodies of corn scutella during seedling growth. *Journal of Plant Physiology* **73**: 460-463.
- Lotti, M. dan Alberghina, L. (2007). Lipases : Molekular Structure and Function. Dalam : Polaina, J dan MacCabe, (ed). *Industrial Enzym : Structure, Function and Application*. Springer, Netherland.
- Marseno, D.W., Indarti, R. dan Ohta, Y. (1998). A Simplied Method for Determination of Free Fatty Acids for Soluble and Immobilized Lipase Assay. *Indonesian Food and Nutrion Progress*. **5** : 79-83.
- Polizelli, P.P, Tiera, M.J. dan Rodriguez, G.O.B. (2008). Effects of surfactants and polyethylene glycol on the activity and stability of lipase from oilseed of *Pachira aquatic*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **85**: 749-753.
- Sammour, R.H. (2005). Purification and partial characterization of an acid lipase in germinating lipidbody linseedlings. *Journal Botany* **29**: 177-184.
- Sagiroglu, A. dan Arabaci, N. (2005). Sunflower seed lipase: extraction, purification and characterization. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* **35**: 37-51.
- Smith, K.W, (2001). Cocoa Butter and Cococa Equivalents. Dalam. Gunstone, F.D (ed), *Structured and Modified Lipids*. Marcel Dekker. New York.
- Willis, W.M. dan Marangoni, A.G., (2002). Enzymatic Interesterification, Dalam: Akoh, C.C dan Min, D.B.(ed). *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, Marcel Dekker, New York.
- Wong, H. dan Schotz, M.C. (2002). The lipase gene family. *Journal of Lipid Reseach*. **43**: 993-99.