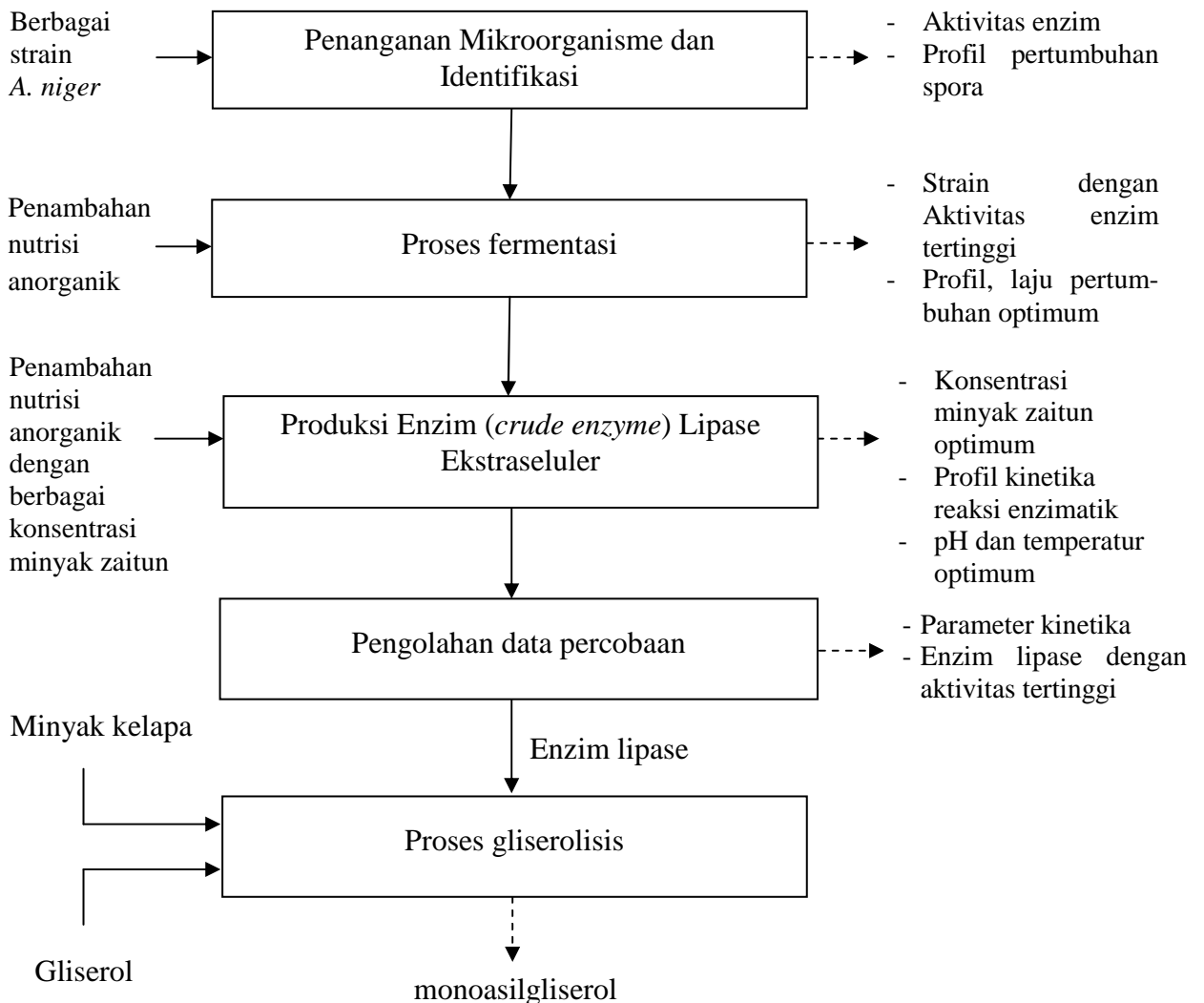


BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan melalui metoda eksperimental yang meliputi beberapa tahap berkesinambungan agar tujuan dari penelitian ini dapat tercapai. Tahap-tahap tersebut yaitu penanganan mikroorganismen dan identifikasi, proses fermentasi, produksi enzim lipase ekstraseluler, dan produksi monoasilgliserol. Kerangka percobaan dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Kerangka percobaan

3.1. Kerangka Percobaan

3.1.1 Penanganan mikroorganisme dan identifikasi

1. Penanganan mikroorganisme

Sumber kultur murni *Aspergillus niger* ITBCC L_{51} , L_{161} , L_{74} , L_{76} diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Teknologi Bioproses Jurusan Teknik Kimia Institut Teknologi Bandung. Strain *A. niger* tersebut ditumbuhkan dalam media agar miring *Potato Dextrose Agar* (PDA) pada temperatur inkubasi 30°C sebagai *stock culture* dan disimpan pada temperatur 4°C. Strain tersebut diregenerasi setiap 3 minggu (Falony dkk., 2006).

2. Identifikasi spora

Jamur *A. niger* ITBCC yang telah diremajakan, kemudian diidentifikasi menggunakan mikroskop digital *Olympus BX 41* pada pembesaran 40 x 10. Kenampakan spora kemudian dibandingkan dengan literatur.

3. Identifikasi lipase secara kualitatif

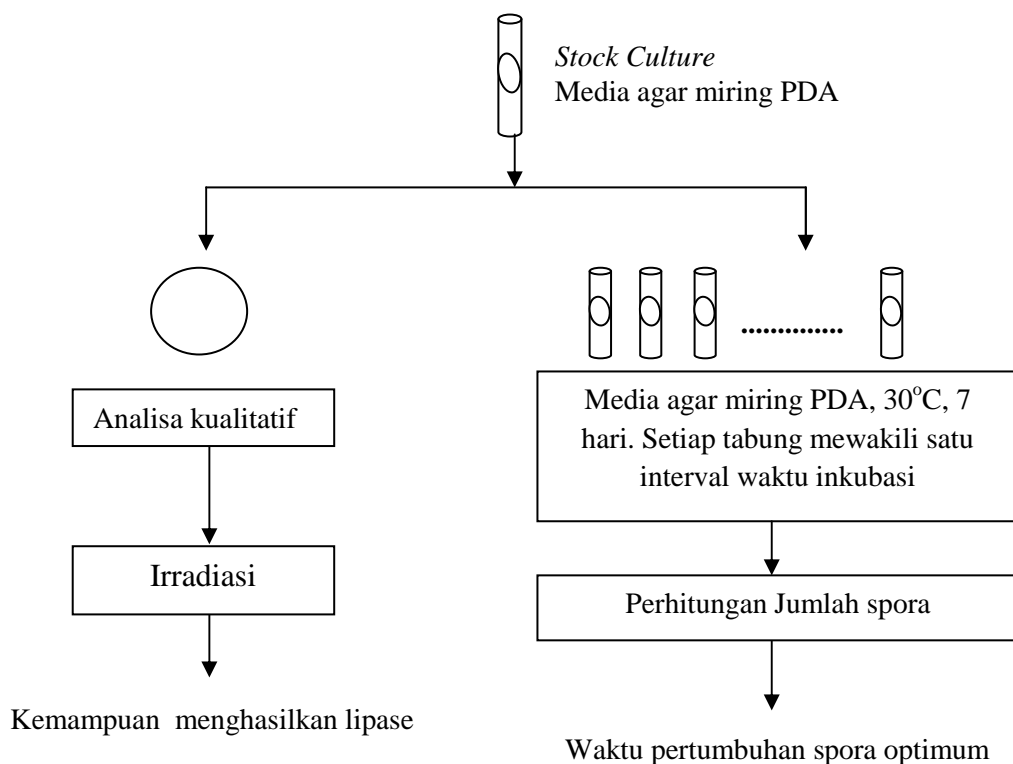
Empat strain *A. niger* diseleksi secara kualitatif untuk mengidentifikasi kemampuan strain tersebut menghasilkan lipase. Identifikasi dilakukan dengan melakukan pengamatan terhadap perubahan warna medium menggunakan rhodamin B/olive oil pada λ_{maks} 366 nm (Kouker dan Jaeger, 1987). Diagram alir identifikasi lipase dapat dilihat pada Gambar 3.2

4. Persiapan suspensi *Aspergillus niger*

Spora *A. niger* dari PDA miring hasil inkubasi diberi air steril sebanyak 3 ml kemudian dilepaskan dari permukaan agar miring dengan menggunakan jarum ose. Sebanyak 7 ml air steril ditambahkan hingga terbentuk suspensi inokulum (Kristanti, 2001) dan diaduk kencang selama 1 menit (Kamini dkk., 1998).

5. Perhitungan jumlah spora

Jumlah spora *A. niger* yang dapat digunakan untuk proses fermentasi menghasilkan lipase berkisar antara 10^5 - $4,3 \times 10^8$ /ml (Pera dkk., 2006 dan Kamini dkk., 1998). Penghitungan jumlah spora dilakukan setiap 6 jam selama 7 hari untuk mengetahui jumlah spora optimum pada fase eksponensial dengan menggunakan *counting chamber*.



Gambar 3.2 Diagram Alir Identifikasi Mikroorganisme

6. Persiapan inokulum

Suspensi *A. niger* yang mengandung jumlah spora antara 10^5 - $4,3 \times 10^8$ /ml dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi media *Potatoes Dextrose Broth* (PDB) steril dengan perbandingan 1 ml suspensi ke dalam 50 ml media PDB (August, 2000). Inokulasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 30°C secara *batch*.

7. Persiapan media pertumbuhan

Media pertumbuhan yang digunakan untuk menentukan laju pertumbuhan adalah *Potato Dextrose Broth* (PDB). Media tersebut terdiri atas kentang 200 g, dextrosa 20 g, CaCO_3 0,2 g, dan MgSO_4 0,2 g dalam aquadest sebanyak 1 liter pada pH 6. Media ini disterilisasi pada temperatur 121°C selama 30 menit.

8. Persiapan media produksi

Media yang digunakan untuk produksi enzim lipase adalah dengan mencampurkan KH_2PO_4 0,3%, NaNO_3 0,1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, pepton 4%, glukosa 2%, dan minyak zaitun 2% ke dalam labu takar dan diberi aquadest hingga volumenya mencapai 100 ml. pH media diatur pada pH 6 (Yulianti, 2001). Media ini disterilisasi pada temperatur 121°C selama 30 menit.

3.1.2 Penentuan Laju Pertumbuhan

Penentuan laju pertumbuhan dilakukan melalui kurva pertumbuhan, digunakan untuk mengetahui waktu pertumbuhan optimum dari keempat strain *A. niger*. Pada penelitian ini dilakukan dua jenis proses fermentasi, yaitu tanpa menggunakan media pra-inkubasi/inokulum dan dengan menggunakan media pra-inkubasi/inokulum PDB (*Potatoes Dextrose Broth*). Diagram alir penentuan laju pertumbuhan dapat dilihat pada Gambar 3.3

1. Proses fermentasi tanpa menggunakan media pra-inkubasi/ inokulum

Penentuan laju pertumbuhan dilakukan melalui pembuatan kurva pertumbuhan. Proses fermentasi dilakukan langsung di dalam media produksi. Sebanyak 1 ml suspensi dimasukkan ke dalam 50 ml media produksi. Fermentasi dilakukan secara *batch* menggunakan *incubator shaker* pada temperatur 30°C dan kecepatan 150 rpm. Setiap run berisi 84 erlenmeyer (21 erlenmeyer untuk setiap strain). Setiap erlenmeyer mewakili satu interval waktu fermentasi. Waktu fermentasi berlangsung selama 10 hari dengan interval pengambilan data setiap 12 jam. Biomassa dan supernatan dipisahkan dengan menggunakan kertas saring bebas abu. Biomassa tersebut kemudian ditentukan berat sel keringnya (g/ml).

2. Proses fermentasi dengan menggunakan media pra-inkubasi/ inokulum PDB

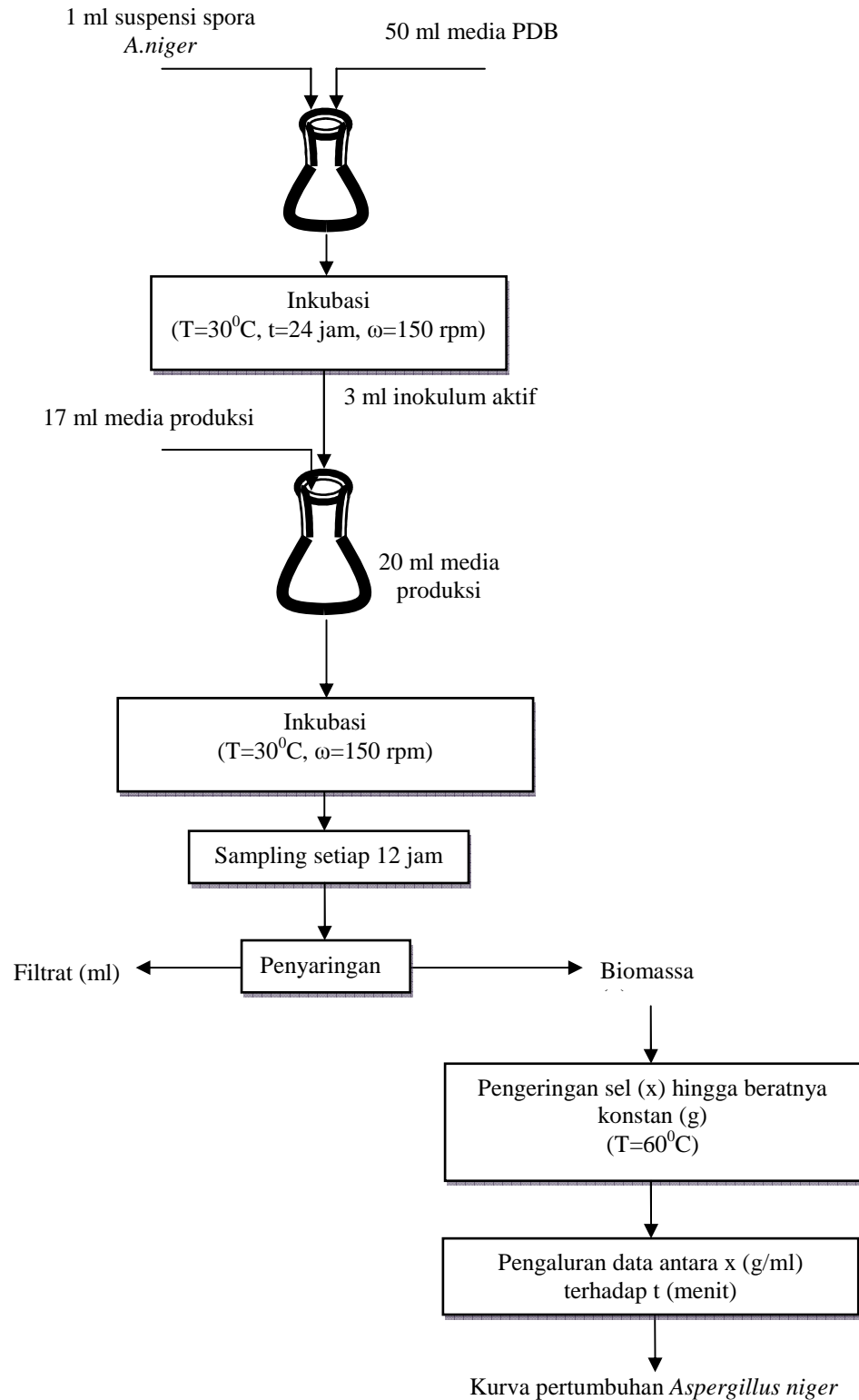
Penentuan laju pertumbuhan maksimum digunakan untuk mengetahui waktu optimum pemindahan inokulum. Laju pertumbuhan maksimum *A. niger* L_{51} , L_{161} , L_{74} , L_{76} ditentukan melalui pembuatan kurva pertumbuhan. Pembuatan

kurva pertumbuhan ini mula-mula dilakukan dengan memasukkan suspensi *A. niger* yang telah ditumbuhkan dalam agar miring PDA selama waktu optimum pertumbuhan spora setiap strain ke dalam labu erlenmeyer yang berisi media cair PDB (*Potatoes Dextrose Broth*) steril dengan perbandingan 1 ml suspensi ke dalam 50 ml media PDB (August, 2000) sebagai inokulum/media pra-inkubasi dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam, sebanyak 15% (v/v_{total}) inokulum dipindahkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi media produksi. Fermentasi dilakukan secara *batch* menggunakan *incubator shaker* pada temperatur 30°C dan kecepatan 150 rpm (August, 2000). Setiap run berisi 68 erlenmeyer (17 erlenmeyer untuk setiap strain). Setiap erlenmeyer mewakili satu interval waktu fermentasi. Waktu fermentasi berlangsung selama 8 hari dengan interval pengambilan data setiap 12 jam. Biomassa dan supernatan dipisahkan dengan menggunakan kertas saring bebas abu. Biomassa tersebut kemudian ditentukan berat sel keringnya (g/ml).

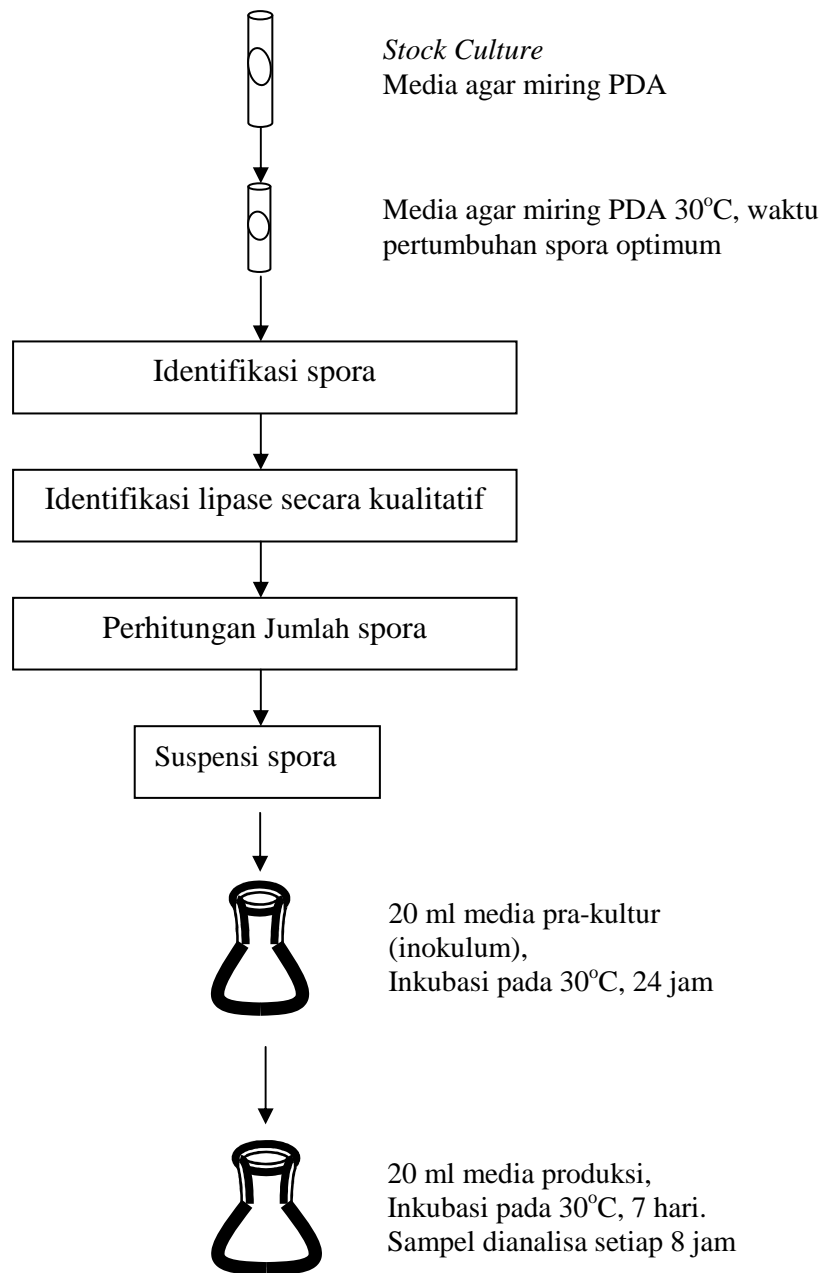
3.1.3 Penentuan Aktivitas Lipase Tertinggi

Pengujian aktivitas lipase yang dihasilkan oleh keempat strain *A. niger* pada setiap proses fermentasi dilakukan untuk mengetahui strain yang memiliki aktivitas tertinggi serta proses fermentasi terbaik yang akan digunakan pada tahap penelitian selanjutnya. Pengujian aktivitas dilakukan dengan menggunakan metode titrimetri ($\mu\text{mol/ml.menit}$) (Linfield dkk., 1984). Sebanyak 1 ml minyak zaitun ditambahkan 0,5 ml CaCl_2 dan 4,5 ml buffer asetat 0,1 M pH 5,5. Campuran kemudian divorteks selama 10 menit, kemudian ditambahkan 0,6 ml enzim. Campuran diinkubasi pada temperatur 40°C dengan kecepatan putaran 150 rpm selama 2 jam. Setelah fermentasi selesai, tambahkan 10 ml etanol dan 10 ml aseton untuk menginaktifkan enzim dan titrasi menggunakan NaOH 0,01 M (Handayani, 2005).

Diagram alir penanganan mikroorganisme, identifikasi dan penentuan laju pertumbuhan secara keseluruhan dapat dilihat pada Gambar 3.4



Gambar 3.3 Diagram Alir Penentuan Laju Pertumbuhan



Gambar 3.4 Diagram Alir Penanganan Mikroorganisme, Identifikasi dan Penentuan Laju Pertumbuhan

3.1.4 Produksi Enzim (*crude enzyme*) Lipase Ekstraseluler

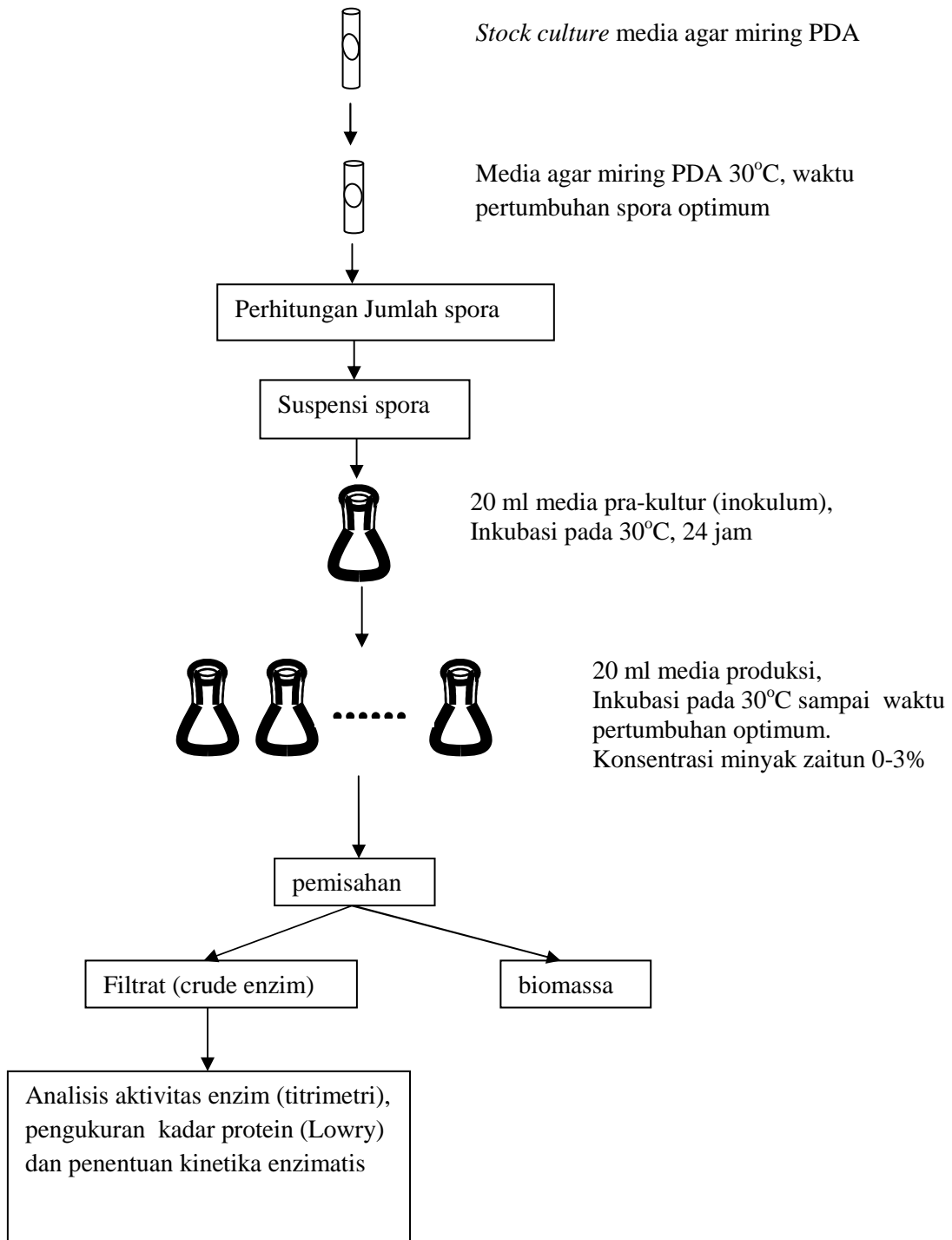
Produksi enzim lipase ekstraseluler dilakukan secara *batch* dalam erlenmeyer 100 ml dengan volume media 20 ml dengan variasi konsentrasi minyak zaitun yang digunakan adalah 0%, 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1%, 1,25%, 1,5%, 1,75%, 2%, 2,5% dan 3%. Pada tahap ini akan diperoleh profil kinetika reaksi enzimatik pada setiap strain, sehingga dapat ditentukan konsentrasi minyak zaitun optimum pada setiap strain. Proses produksi enzim dapat dilihat pada Gambar 3.5.

1. Fermentasi

Suspensi spora *A. niger* dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi media PDB secara aseptis, kemudian diinokulasikan selama 24 jam pada temperatur 30°C. Sebanyak 15% (v/v_{total}) inokulum aktif dimasukkan ke dalam media produksi yang divariasikan konsentrasi minyak zaitunnya dan diinkubasi sampai fasa eksponensial setiap strain di dalam *incubator shaker* dengan kecepatan agitasi 150 rpm pada temperatur 30°C. Setiap run berisi 44 erlenmeyer (11 erlenmeyer untuk setiap strain). Setiap erlenmeyer mewakili satu konsentrasi minyak zaitun. Waktu fermentasi berlangsung sampai waktu pertumbuhan optimum setiap strain.

2. Pemanenan enzim lipase ekstraseluler

Setelah fermentasi selesai, dilakukan pemisahan antara lipase dengan biomasanya dengan metoda penyaringan menggunakan kertas saring bebas abu. Filtrat kemudian disentrifugasi pada kecepatan 11000 rpm, temperatur 4°C selama 15 menit agar biomassa benar-benar berpisah dari enzim. Supernatan jernih digunakan sebagai sumber enzim ekstraseluler (Falony dkk., 2006).



Gambar 3.5 Diagram Alir Produksi Enzim Lipase Ekstraseluler

3. Penentuan pengaruh minyak zaitun terhadap aktivitas dan kadar protein enzim

Enzim tersebut kemudian diuji untuk menentukan aktivitas enzim dengan metode titrimetri (Linfield dkk., 1984) pada kondisi operasi temperatur 40°C, 150 rpm selama 1 jam (Handayani, 2005) dan juga ditentukan kadar protein dengan metode Lowry (Lowry dkk., 1951) menggunakan protein standar *Bovine Serum Albumine*.

4. Kinetika reaksi enzimatik

Hasil uji aktivitas digunakan untuk menentukan parameter kinetika enzimatik, yaitu nilai k_m dan v_{maks} dari setiap strain

3.1.5 Karakterisasi Enzim

Karakterisasi enzim dilakukan dengan menguji pengaruh pH terhadap aktivitas enzim pada rentang pH 2,5 sampai 10,5 menggunakan buffer asetat (pH 2,5 sampai 5,5), buffer fosfat (pH 6,5 dan 7,5) dan buffer amonia (pH 8,5 sampai 10,5) pada temperatur 30°C selama 60 menit. Pengaruh temperatur terhadap aktivitas enzim diuji pada rentang temperatur 25°C sampai 60°C menggunakan buffer asetat pada pH 5,5 selama 60 menit.

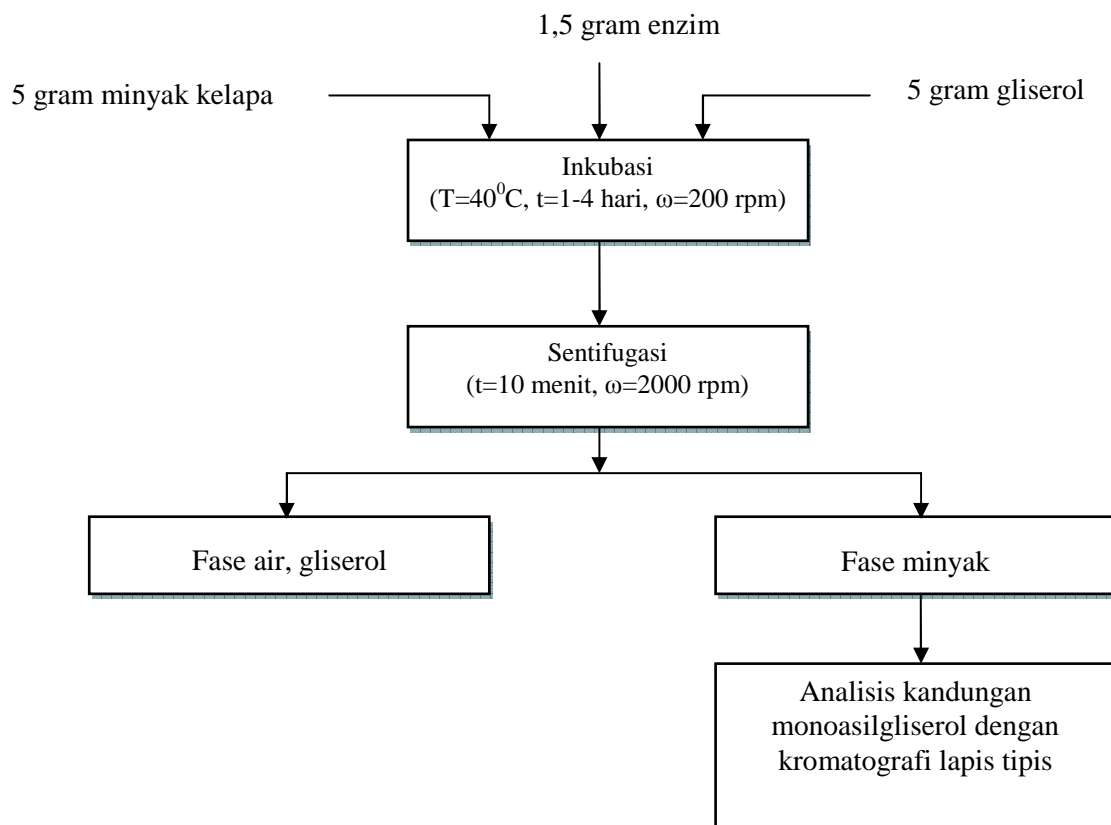
3.1.6 Produksi Monoasilgliserol

Enzim dengan aktivitas tertinggi dan konsentrasi minyak zaitun optimum digunakan untuk pengujian aktivitas gliserolisis untuk menghasilkan monoasilgliserol menggunakan minyak kelapa sebagai substrat dan gliserol sebagai kosubstrat.

Sebanyak 5 gram minyak kelapa direaksikan dengan 5 gram gliserol dan 1,5 gram enzim (15% b/b) pada temperatur 40°C, kecepatan agitasi 200 rpm selama 1-4 hari (Harnanik, 2005). Produk yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT).

Produk yang diperoleh disentrifugasi pada 2000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan lapisan minyak dengan yang lain (Harnanik, 2005). Produk cair kemudian diekstraksi dengan campuran heksan dan eter (1 : 1). Campuran

heksan dan eter diuapkan hingga tinggal seperlimanya, lalu ditotolkan pada lempeng silika gel G 60 F 254 dan dielusi dengan campuran heksan : dietil eter : asam formiat dengan perbandingan 80 : 20 : 2 (v/v). Waktu elusi yang digunakan adalah 2 jam (August, 2000). Diagram alir reaksi gliserolisis dapat dilihat pada gambar 3.6.



Gambar 3.6 Diagram alir reaksi gliserolisis

3.2. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan terdiri dari 64 run. Matriks rancangan percobaan dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Matriks rancangan percobaan

Run	Variabel			Respon	Hasil
	Jenis strain	Waktu inokulasi	Media		
	<i>A. niger</i>				
1	ITBCC L ₅₁	0-7 hari	PDA	Σ sel	μ
2	ITBCC L ₁₆₁				
3	ITBCC L ₇₄				
4	ITBCC L ₇₆				
5	ITBCC L ₅₁	t optimum sesuai μ	Media produksi	<ul style="list-style-type: none"> • Konsentrasi biomassa • Aktivitas enzim 	μ_1
6	ITBCC L ₁₆₁		dengan konsentrasi		
7	ITBCC L ₇₄		minyak zaitun 2%		
8	ITBCC L ₇₆		tanpa inokulum		
9	ITBCC L ₅₁	t optimum sesuai μ	Media produksi	<ul style="list-style-type: none"> • Konsentrasi biomassa • Aktivitas enzim 	μ_2
10	ITBCC L ₁₆₁		dengan konsentrasi		
11	ITBCC L ₇₄		minyak zaitun 2%		
12	ITBCC L ₇₆		dengan inokulum		
13	ITBCC L ₅₁	t optimum sesuai dengan μ_1 atau μ_2 yang aktivitasnya lebih tinggi	Minyak zaitun 0%	<ul style="list-style-type: none"> • Aktivitas enzim • Kadar protein 	<ul style="list-style-type: none"> • Kadar minyak zaitun optimum • Profil dan parameter kinetika
14			Minyak zaitun 0,25%		
15			Minyak zaitun 0,5%		
16			Minyak zaitun 0,75%		
17			Minyak zaitun 1%		
18			Minyak zaitun 1,25%		
19			Minyak zaitun 1,5%		
20			Minyak zaitun 1,75%		
21			Minyak zaitun 2%		
22			Minyak zaitun 2,5%		
23			Minyak zaitun 3%		

berlanjut ...

Run	Variabel			Respon	Hasil
	Jenis strain	Waktu inokulasi	Media		
24	<i>A. niger</i> ITBCC L ₁₆₁	t optimum sesuai dengan μ_1 atau μ_2 yang aktivitasnya lebih tinggi	Minyak zaitun 0%	<ul style="list-style-type: none"> • Aktivitas enzim • Kadar protein 	<ul style="list-style-type: none"> • Kadar minyak zaitun optimum • Profil dan parameter kinetika
25			Minyak zaitun 0,25%		
26			Minyak zaitun 0,5%		
27			Minyak zaitun 0,75%		
28			Minyak zaitun 1%		
29			Minyak zaitun 1,25%		
30			Minyak zaitun 1,5%		
31			Minyak zaitun 1,75%		
32			Minyak zaitun 2%		
33			Minyak zaitun 2,5%		
34			Minyak zaitun 3%		
35	<i>A. niger</i> ITBCC L ₇₄	t optimum sesuai dengan μ_1 atau μ_2 yang aktivitasnya lebih tinggi	Minyak zaitun 0%	<ul style="list-style-type: none"> • Aktivitas enzim • Kadar protein 	<ul style="list-style-type: none"> • Kadar minyak zaitun optimum • Profil dan parameter kinetika
36			Minyak zaitun 0,25%		
37			Minyak zaitun 0,5%		
38			Minyak zaitun 0,75%		
39			Minyak zaitun 1%		
40			Minyak zaitun 1,25%		
41			Minyak zaitun 1,5%		
42			Minyak zaitun 1,75%		
43			Minyak zaitun 2%		
44			Minyak zaitun 2,5%		
45			Minyak zaitun 3%		
46	<i>A. niger</i> ITBCC L ₇₆	t optimum sesuai dengan μ_1 atau μ_2 yang aktivitasnya lebih tinggi	Minyak zaitun 0%	<ul style="list-style-type: none"> • Aktivitas enzim • Kadar protein 	<ul style="list-style-type: none"> • Kadar minyak zaitun optimum • Profil dan parameter kinetika
47			Minyak zaitun 0,25%		
48			Minyak zaitun 0,5%		
49			Minyak zaitun 0,75%		
50			Minyak zaitun 1%		
51			Minyak zaitun 1,25%		
52			Minyak zaitun 1,5%		
53			Minyak zaitun 1,75%		
54			Minyak zaitun 2%		
55			Minyak zaitun 2,5%		
56			Minyak zaitun 3%		

berlanjut ...

Lanjutan tabel

Run	Variabel			Respon	Hasil
	Jenis strain <i>A. niger</i>	Waktu inokulasi	Media		
57	ITBCC L ₅₁	60 menit	Media produksi dengan konsentrasi minyak zaitun optimum	• Aktivitas enzim	<ul style="list-style-type: none"> • pH optimum • Temperatur optimum
58	ITBCC L ₁₆₁				
59	ITBCC L ₇₄				
60	ITBCC L ₇₆				
61	Enzim lipase	1 hari	Gliserol dan minyak kelapa	Kadar MAG	Perolehan MAG
62		2 hari			
63		3 hari			
64		4 hari			

Kondisi operasi pada produksi lipase yang dipertahankan tetap adalah :

pH	:	6,0
Tekanan	:	1 atm
Temperatur	:	30±1 °C
Kecepatan pengadukan	:	150 rpm
Volume inokulum	:	15% (v/v _{total})

Perbandingan volume media fermentasi terhadap volume fermentor adalah 1 : 5

Kondisi operasi pada produksi monoasilgliserol dipertahankan tetap yaitu :

Tekanan	:	1 atm
Temperatur	:	40±1 °C
Kecepatan pengadukan	:	200 rpm
Berat minyak kelapa	:	5 gram
Berat gliserol	:	5 gram
Berat enzim	:	1,5 gram (15% b/b)

3.3.Peralatan dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *incubator shaker New Brunswick Scientific Series 25, autoclave P Selecta Autester-E, micro centrifuge Mini Spin Eppendorf, laminar air flow*, neraca analitik Mettler AE 200, neraca teknik Mettler PM 4600, Lampu UV CAMAG, TLC kit CAMAG,

Mikroskop Olympus BX 41, *counting chamber*, *cover*, *hot plate IKA RCT Basic*, *Oven*, *super mixer Gemmy Industrial corp*, *dosimat Methrom*, *potensiometer BBC SE 120*, *spektrofotometer Genesys*, pH meter Methrom 632, *Spectronic Genesis*, desikator, jarum ose, pembakar spirtus, pinset, botol semprot, alat-alat gelas (tabung reaksi, labu takar, erlenmeyer, gelas kimia, spatula, buret, *magnetic stirrer*, pipet tetes, pipet ukur, cawan petri). Sedangkan bahan yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.2

Tabel 3.2 Daftar bahan penelitian

Bahan	Spesifikasi	Sumber	Fungsi
Kultur <i>A. niger</i>	murni	Lab. Mikrobiologi	<i>Stock kultur</i>
<i>ITBCC L₅₁, L₁₆₁, L₇₄, L₇₆</i>		TK ITB	
Kentang	-	Pasar Cimahi	Media PDA, PDB
Dekstrosa	Pro analisis (p.a)	Difco	Media PDA, PDB
CaCO ₃	p.a	Merck	Media PDA, PDB
<i>Bacto agar</i>	p.a	Oxoid	Media PDA
KH ₂ PO ₄	p.a	Merck	Media produksi
NaNO ₃	p.a	Merck	Media produksi
Peptone	p.a	Conda Pronadisa	Media produksi
Glukosa	p.a	Merck	Media produksi
NaCl	p.a	Merck	Media produksi
MgSO ₄ .7H ₂ O	p.a	Merck	Media
Rhodamin B	p.a	Merck	Analisa
CuSO ₄ . 5H ₂ O	p.a	Merck	Analisa
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	p.a	Merck	Analisa
Na ₂ CO ₃	p.a	Merck	Analisa
NaOH	p.a	Merck	Analisa
Folin-Ciocalteu Phenol	p.a	Merck	Analisa
Reagent			
CaCl ₂	p.a	Merck	Analisa
n-hexana	p.a	Merck	Analisa

Berlanjut....

Lanjutan tabel

Bahan	Spesifikasi	Sumber	Fungsi
Asam formiat	p.a	Merck	Analisa
I ₂	p.a	Merck	Analisa
KI	p.a	Merck	Analisa
Phenolphtalein	p.a	Merck	Analisa
Dietil ether	Teknis	PT Brataco	Analisa
Aseton	Teknis	PT Brataco	Analisa
Etanol	Teknis	PT Brataco	Analisa
TLC Silica Gel 60 F ₂₅₄	-	Merck	Analisa
Kertas saring	kasar	PT Brataco	Analisa
Minyak zaitun	<i>Extra virgin</i>	Borges	Substrat
Minyak Kelapa	-	PT Barco	Reaktan
Gliserol	p.a	Merck	Reaktan
Buffer Asetat pH 2,5	p.a	Merck	Uji karakteristik
Buffer Asetat pH 3,5	p.a	Merck	Uji karakteristik
Buffer Asetat pH 4,5	p.a	Merck	Uji karakteristik
Buffer Asetat pH 5,5	p.a	Merck	Uji karakteristik
Buffer Phospat pH 6,5	p.a	Merck	Uji karakteristik
Buffer Phospat pH 7,5	p.a	Merck	Uji karakteristik
Buffer Ammonia pH 8,5	p.a	Merck	Uji karakteristik
Buffer Ammonia pH 9,5	p.a	Merck	Uji karakteristik
Buffer Ammonia pH 10,5	p.a	Merck	Uji karakteristik
Aquadest		PT Alkin Global	Pelarut
Kapas berlemak	-	Masa Husada Indonesia	Sterilisasi
Kasa	-	-	Sterilisasi

3.4 Tahap Pengolahan Data Percobaan

Data yang diambil pada proses perhitungan spora adalah jumlah sel yang diamati dibawah mikroskop dan dihitung konsentrasi sel dalam setiap 1 ml. Data yang diambil selama proses penentuan laju pertumbuhan adalah konsentrasi

volumetrik biomassa jamur (g/ml) dengan rentang pengambilan data dilakukan setiap 12 jam selama 9 hari. Pada penentuan waktu optimum, data yang diambil adalah konsentrasi volumetrik biomassa jamur (g/ml), aktivitas enzim lipase ($\mu\text{mol/ml.menit}$) dan kadar protein (mg/ml) dengan rentang pengambilan data setiap 12 jam selama 9 hari. Penentuan laju pertumbuhan pada fase eksponensial dilakukan menggunakan persamaan diferensial orde pertama (Shuler dan Kargi, 1992), yaitu :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (3.1)$$

$X = X_0$ pada $t = 0$.

X adalah konsentrasi biomassa (g/l), t adalah waktu (jam) dan μ adalah laju pertumbuhan spesifik (jam^{-1}). Integrasi persamaan di atas menghasilkan :

$$\ln X = \mu t + \ln X_0 \quad (3.2)$$

Pada proses produksi lipase dengan variasi konsentrasi minyak zaitun, data yang diambil adalah konsentrasi volumetrik biomassa jamur (g/ml), aktivitas enzim lipase ($\mu\text{mol/ml.menit}$) dan kadar protein (mg/ml). Nilai tetapan Michaelis-Menten (K_m) dan kecepatan maksimum enzim (V_{maks}) dihitung dengan mengalurkan nilai konsentrasi substrat $[S]^{-1}$ terhadap laju reaksi v^{-1} berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{maks}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{maks}} \quad (2.4)$$

Nilai k_m dan v_{maks} dari setiap strain ditentukan dan digunakan sebagai dasar untuk menentukan konsentrasi minyak zaitun optimum dari setiap strain.

