

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses produksi enzim lipase ekstraseluler dari *Aspergillus niger* dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain jenis strain yang digunakan, proses fermentasi yang dilakukan dan konsentrasi substrat. Proses identifikasi dan pengujian strain dilakukan untuk mengetahui kemampuan strain tersebut untuk menghasilkan enzim lipase. Hasil identifikasi digunakan sebagai dasar untuk menentukan apakah strain tersebut dapat digunakan untuk menghasilkan lipase. Proses produksi lipase dilakukan menggunakan metoda fermentasi. Proses fermentasi dilakukan baik menggunakan media inokulum/pra-inkubasi maupun tanpa media inokulum/pra-inkubasi untuk mengetahui pengaruhnya terhadap nilai aktivitas enzim lipase yang dihasilkan. Konsentrasi substrat mempengaruhi pula nilai aktivitas lipase. Konsentrasi substrat optimum akan memberikan nilai aktivitas yang optimum pula. Pada bab IV ini akan dijelaskan mengenai identifikasi dan pengujian strain, pengaruh penggunaan media inokulum/pra-inkubasi dan konsentrasi substrat terhadap aktivitas lipase serta kemampuan lipase optimum yang diperoleh untuk menghasilkan monoasilgliserol.

4.1 Penanganan Mikroorganisme, Identifikasi dan Perhitungan Spora

Pemilihan jenis mikroorganisme merupakan faktor yang sangat menentukan dalam proses fermentasi untuk isolasi enzim. Fermentasi yang dilakukan dalam penelitian ini adalah untuk menghasilkan lipase yang merupakan enzim yang dapat mengkatalisis reaksi minyak atau lemak dengan kondisi reaksi yang lembut dan spesifik. Lipase dapat diperoleh dari mikroba yang secara spesifik menghasilkan enzim tersebut, dan kelas jamur merupakan penghasil lipase yang baik (Moentamaria, 2009).

Salah satu jenis jamur yang dapat menghasilkan lipase adalah *Aspergillus niger* (Mahadik dkk., 2002). Dalam penelitian ini digunakan *Aspergillus niger* ITBCC L₅₁, L₁₆₁, L₇₄, dan L₇₆. *Stock culture* keempat mikroorganisme tersebut diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Teknologi Bioproses Jurusan Teknik Kimia ITB. Peremajaan jamur dilakukan di dalam media PDA (*Potatoes*

Dextrose Agar) yang dipilih karena media PDA adalah media yang cocok sebagai *fungus media* (Wikipedia. org., 2009 diakses 24 September 2009) dan relatif mudah dalam pembuatannya, sehingga lebih efektif dan efisien (Moentamaria, 2009).

4.1.1 Identifikasi spora

Identifikasi spora dilakukan untuk membuktikan bahwa jenis jamur yang digunakan adalah *A. niger*. Jamur *A.niger* yang telah diremajakan kemudian diidentifikasi menggunakan mikroskop digital *Olympus BX 41* pada pembesaran 40 x 10. Spora jamur *Aspergillus niger* berdasarkan literatur dapat dilihat pada Gambar 4.1 (www.inspectapedia.com/mold/moldatlas.htm dan www.mycology.adelaide.edu.au/images/niger1.gif), sedangkan spora *Aspergillus niger* ITBCC *L₅₁*, *L₁₆₁*, *L₇₄*, dan *L₇₆* hasil identifikasi ditunjukkan pada Gambar 4.2, 4.3, 4.4, dan 4.5.

Berdasarkan Gambar 4.2, 4.3, 4.4, dan 4.5, dapat diketahui bahwa kenampakan spora jamur *A.niger* ITBCC *L₅₁*, *L₁₆₁*, *L₇₄*, dan *L₇₆* pada mikroskop telah sesuai dengan spora *A.niger* pada Gambar 4.1. Persamaan kenampakan fisik tersebut dapat membuktikan bahwa jamur yang telah diremajakan adalah jamur *A. niger*.

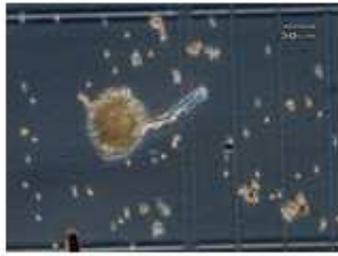
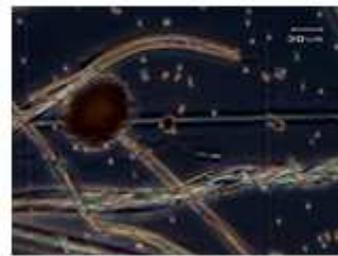


Sumber:
<http://www.inspectapedia.com/mold/moldatlas.htm>



Sumber :
www.mycology.adelaide.edu.au/images/niger1.gif

Gambar 4.1 Spora *A. niger*

Gambar 4.2 Spora *A. niger* ITBCC L₅₁Gambar 4.3 Spora *A. niger* ITBCC L₁₅₁Gambar 4.4 Spora *A. niger* ITBCC L₇₄Gambar 4.5 Spora *A. niger* ITBCC L₇₆

4.1.2 Identifikasi lipase dengan metoda irradiasi

Identifikasi dilakukan untuk mengetahui kemampuan seluruh strain *A. niger* dalam menghasilkan lipase. Identifikasi dilakukan secara kualitatif dengan cara menumbuhkan *A. niger* pada pelat agar yang berisi media produksi yang mengandung minyak zaitun di dalam cawan petri. Produktivitas *A. niger* dapat ditunjukkan dengan adanya perubahan warna media dari tidak berwarna menjadi warna oranye setelah diberi larutan uji *rhodamin B* saat dilihat di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm. Sebagai pembanding digunakan bakteri *Escherichia coli* yang diketahui tidak mampu menghasilkan lipase. Bakteri tersebut diberi perlakuan yang sama dengan jamur *A. niger* (Kouker dan Jeager, 1987).

Berdasarkan Gambar 4.6, 4.7, 4.8, dan 4.9, dapat ditunjukkan bahwa keempat strain *A. niger* yang digunakan dapat menghasilkan enzim lipase. Hal ini berbeda dengan *E. coli* yang tidak menunjukkan adanya warna oranye saat diberikan larutan uji *rhodamin B* (Gambar 4.10). Hasil reaksi hidrolisis antara lipase dengan substrat (minyak zaitun) menghasilkan produk berupa asam lemak

bebas. Adanya ikatan kompleks antara *rhodamin B* dengan asam lemak bebas tersebut menghasilkan warna oranye saat diiradiasi di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm.



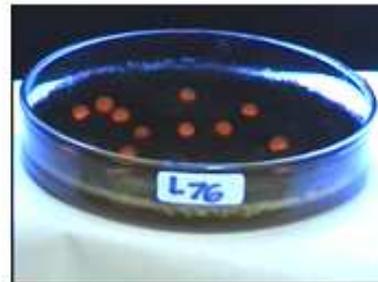
Gambar 4.6 *A. niger* ITBCC L₅₁



Gambar 4.7 *A. niger* ITBCC L₁₆₁



Gambar 4.8 *A. niger* ITBCC L₇₄



Gambar 4.9 *A. niger* ITBCC L₇₆



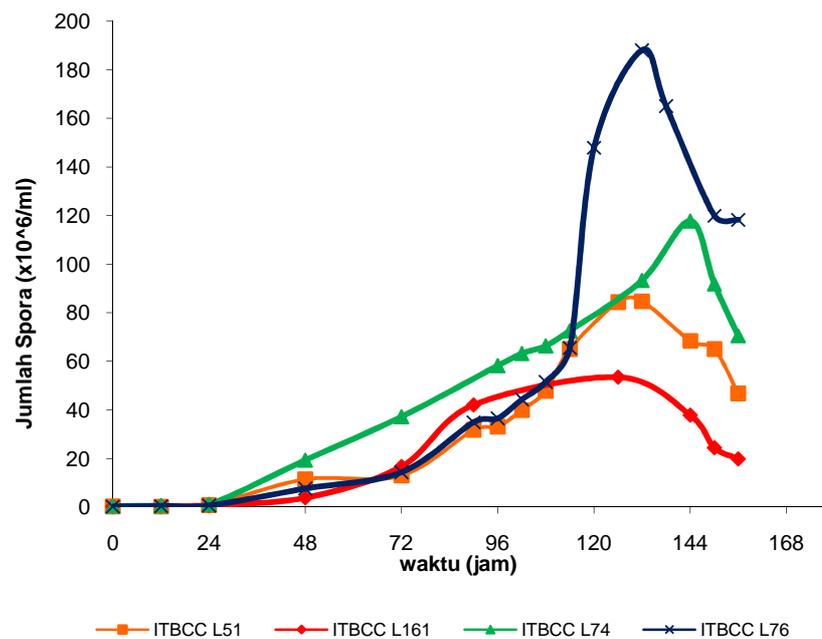
Gambar 4.10 *Escherichia coli*

4.1.3 Perhitungan jumlah spora

Perhitungan jumlah spora dilakukan untuk mengetahui jumlah spora yang akan digunakan sebagai suspensi inokulum. Perhitungan jumlah spora dari keempat strain dilakukan dengan menggunakan *counting chamber* setiap 6 jam selama 7 hari.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa keempat strain *A.niger* dapat tumbuh dengan baik yang diikuti dengan peningkatan jumlah spora terhadap waktu inkubasi dan dapat diketahui fase-fase pertumbuhan spora dari setiap strain. Jumlah spora ideal yang akan disuntikkan ke media pertumbuhan pada fase eksponensial dari *A. niger* ITBCC L₅₁, L₁₆₁, L₇₄ dan L₇₆ masing-masing adalah $13-84,3 \times 10^6/\text{ml}$, $3,85-42 \times 10^6/\text{ml}$, $19,3-117,7 \times 10^6/\text{ml}$, dan $14,3-148 \times 10^6/\text{ml}$. Jumlah spora tersebut berada pada kisaran $10^5 - 4,3 \times 10^8/\text{ml}$ yang sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Pera dkk. (2006) dan Kamini dkk. (1998), sehingga keempat strain *A. niger* dapat digunakan untuk memproduksi lipase. Nilai laju pertumbuhan spesifik spora *A. niger* (μ) yang dihitung berdasarkan persamaan (3.2) berturut-turut adalah 0,0340; 0,0571; 0,0179 dan 0,0419 jam^{-1} .

Hubungan antara jumlah spora keempat strain *Aspergillus niger* terhadap waktu dapat dilihat pada Gambar 4.11.



Gambar 4.11 Hubungan antara Jumlah Spora *A. niger* terhadap waktu

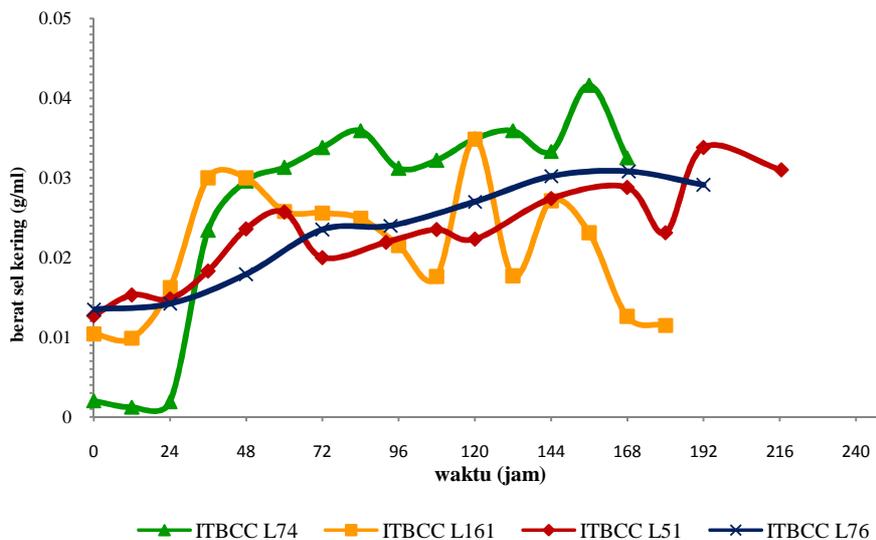
4.2. Penentuan Laju Pertumbuhan

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 dan dengan menggunakan media pra-inkubasi PDB (*Potatoes Dextrose Broth*) selama 24 jam. Hasil dan pembahasan dari setiap jenis proses dijelaskan pada paragraf berikut.

4.2.1 Proses fermentasi tanpa menggunakan media pra-inkubasi

Proses pembuatan kurva pertumbuhan 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. Pengambilan sampel dilakukan setiap 12 jam. Biomassa dan supernatan dipisahkan dengan menggunakan kertas saring bebas abu kemudian ditentukan berat sel keringnya (g/ml). Nilai laju pertumbuhan spesifik (μ) proses fermentasi tanpa menggunakan media pra-inkubasi untuk strain *A. niger* ITBCC L₅₁, L₁₆₁, L₇₄ dan L₇₆ berturut-turut adalah 0,0032; 0,0023; 0,0037 dan 0,0035 jam⁻¹.

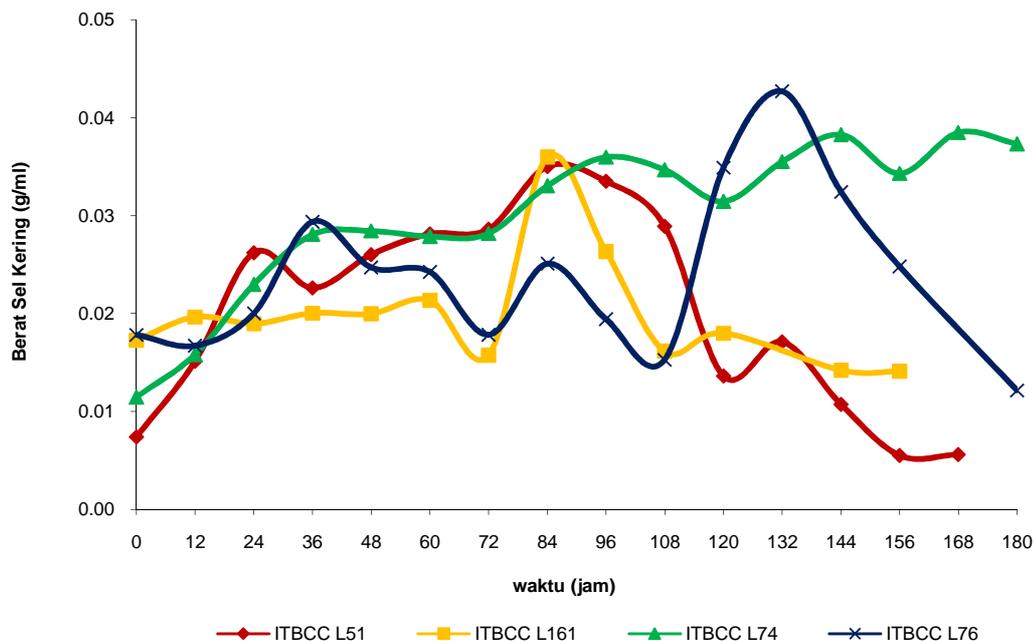
Hubungan antara waktu pertumbuhan dengan berat sel kering masing-masing strain dapat dilihat pada Gambar 4.12.



Gambar 4.12 Hubungan antara berat sel kering terhadap waktu pertumbuhan *A. niger*

4.2.2 Proses Fermentasi Menggunakan Media Pra-Inkubasi PDB

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). Pengambilan sampel dilakukan setiap 12 jam. Biomassa dan supernatan dipisahkan dengan menggunakan kertas saring bebas abu kemudian ditentukan berat sel keringnya (g/ml). Nilai laju pertumbuhan spesifik (μ) untuk produksi lipase dengan menggunakan media pra-inkubasi PDB selama 24 jam untuk strain *A. niger* ITBCC L₅₁, L₁₆₁, L₇₄ dan L₇₆ berturut-turut adalah 0,0081; 0,0078; 0,0028 dan 0,0122 jam⁻¹. Hubungan antara waktu pertumbuhan dengan berat sel kering masing-masing strain dapat dilihat pada Gambar 4.13.



Gambar 4.13 Hubungan antara berat sel kering terhadap waktu pertumbuhan *A. niger*

Berdasarkan Gambar 4.12 dan 4.13 dapat diketahui waktu pertumbuhan optimum untuk setiap proses fermentasi (Tabel 4.1). Waktu pertumbuhan optimum diperoleh pada fase eksponensial pada laju pertumbuhan spesifiknya.

Tabel 4.1 Waktu pertumbuhan optimum untuk setiap proses fermentasi

Proses Fermentasi dengan :	Waktu pertumbuhan <i>A. niger</i> Strain ITBCC (jam) :			
	L ₅₁	L ₁₆₁	L ₇₄	L ₇₆
Tanpa pra-inkubasi	72-192	72-120	96-156	96-168
Pra-inkubasi PDB 24 jam	36-84	36-84	72-144	72-132

Dari tabel 4.1 dapat diketahui bahwa waktu optimum fermentasi untuk produksi lipase dari keempat strain adalah 36 hingga 192 jam (1-8 hari).

Waktu optimum produksi yang ditunjukkan pada tabel 4.1 belum menunjukkan total waktu produksi. Penggunaan media inokulum/pra-inkubasi akan menambah total waktu produksi sesuai waktu pertumbuhan optimum setiap strain. Total waktu produksi lipase dari setiap strain untuk setiap proses fermentasi yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Total waktu produksi lipase untuk setiap proses fermentasi

Proses Fermentasi dengan :	Total Waktu Produksi <i>A. niger</i> Strain ITBCC (jam) :			
	L ₅₁	L ₁₆₁	L ₇₄	L ₇₆
Pra-inkubasi PDB 24 jam	96-216	94-144	120-180	120-192
Tanpa pra-inkubasi	60-108	60-108	96-168	96-156

Dari tabel 4.2 dapat diketahui bahwa total waktu produksi lipase dari keempat strain adalah 60 hingga 216 jami (2-9 hari). Baik waktu optimum fermentasi untuk produksi lipase (Tabel 4.1) maupun total waktu produksi lipase (Tabel 4.2) masih sesuai dengan penelitian Damaso dkk. (2008) dan Falony dkk. (2006) yang menyebutkan bahwa waktu optimum *A. niger* untuk produksi lipase adalah 2 – 8 hari.

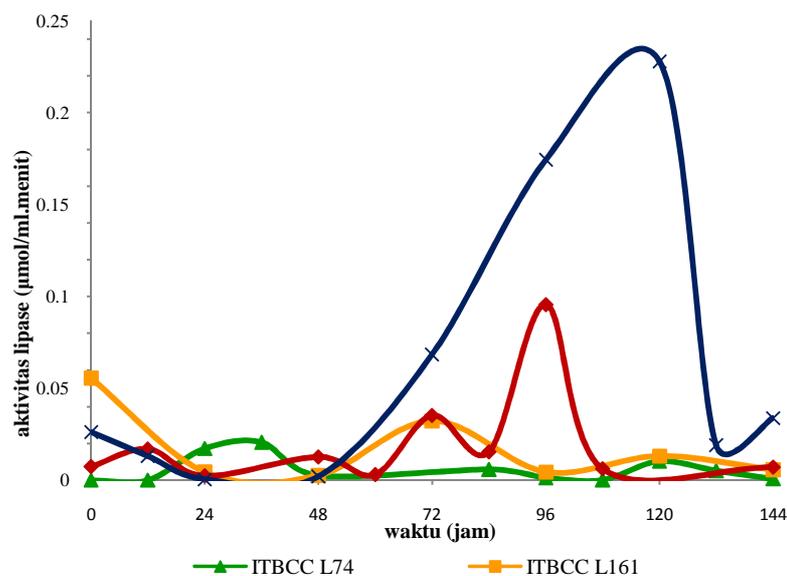
4.3. Penentuan Aktivitas Lipase Tertinggi

Pada tahap ini dilakukan pengujian aktivitas lipase yang dihasilkan oleh keempat strain *Aspergillus niger* pada setiap proses fermentasi 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) pada temperatur inkubasi 40°C , kecepatan putaran 150 rpm selama 120 menit (Handayani, 2005).

4.3.1 Penentuan Aktivitas Lipase Tertinggi pada Proses Fermentasi Tanpa Menggunakan Media Pra-Inkubasi

Pada proses fermentasi tanpa menggunakan media inokulum/pra-inkubasi, pengujian aktivitas lipase dilakukan untuk setiap strain pada setiap waktu pengambilan sampel, yaitu setiap 12 jam. Aktivitas lipase tertinggi dihasilkan oleh *Aspergillus niger* ITBCC L₇₆ dengan aktivitas sebesar $0,2278 \mu\text{mol/ml.menit}$, diikuti dengan aktivitas lipase yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* ITBCC L₅₁, L₁₆₁, dan L₇₄ berturut-turut adalah $0,0955$; $0,0323$ dan $0,0206 \mu\text{mol/ml.menit}$

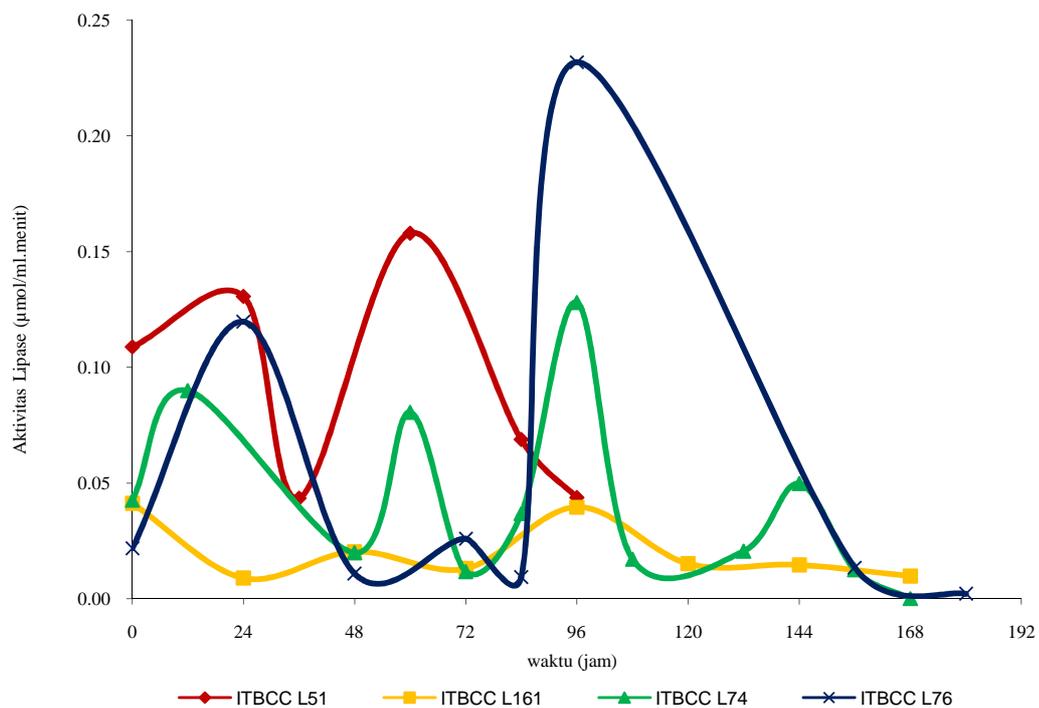
Hubungan antara aktivitas lipase dengan waktu untuk masing-masing strain tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.14.



Gambar 4.14 Hubungan antara aktivitas lipase dengan waktu

4.3.2 Penentuan Aktivitas Lipase Tertinggi pada Proses Fermentasi Menggunakan Media Pra-Inkubasi PDB Selama 24 Jam

Pada proses fermentasi menggunakan media pra-inkubasi PDB (*Potatoes Dextrose Broth*) selama 24 jam, pengujian aktivitas lipase dilakukan untuk setiap strain pada setiap waktu pengambilan sampel, yaitu setiap 12 jam. Aktivitas lipase tertinggi dihasilkan oleh *Aspergillus niger* ITBCC L₇₆ dengan aktivitas sebesar 0,2320 $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{menit}$, diikuti dengan aktivitas lipase yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* ITBCC L₅₁, L₇₄, dan L₁₆₁ berturut-turut adalah 0,1580; 0,1281 dan 0,0397 $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{menit}$. Hubungan antara aktivitas lipase dengan waktu untuk masing-masing strain tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.15.



Gambar 4.15 Hubungan antara aktivitas lipase dengan waktu

Data aktivitas lipase yang menggunakan kedua proses fermentasi dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Aktivitas lipase untuk setiap proses fermentasi

Proses Fermentasi dengan :	Aktifitas lipase ($\mu\text{mol/ml.menit}$) dari <i>A. niger</i> Strain ITBCC :			
	L ₅₁	L ₁₆₁	L ₇₄	L ₇₆
Pra-inkubasi PDB 24 jam	0,1580	0,0397	0,1281	0,2320
Tanpa pra-inkubasi	0,0955	0,0323	0,0206	0,2278

Berdasarkan data pada tabel 4.3, dapat diketahui bahwa pada penggunaan media inokulum/pra-inkubasi PDB selama 24 jam, aktivitas lipase lebih tinggi dibandingkan dengan tanpa media inokulum/pra-inkubasi, karena media cair PDB membantu proses adaptasi jamur *Aspergillus niger* dari media agar miring PDA ke media produksi. Hal ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Nuraida (2005). Nuraida (2005) melakukan proses fermentasi tanpa dan dengan menggunakan media cair PDB sebagai media pra-inkubasi. Hasil penelitian yang diperoleh adalah bahwa penggunaan media pra-inkubasi tidak dapat meningkatkan aktivitas hidrolisis enzim lipase yang dihasilkannya. Berdasarkan data yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa untuk produksi enzim lipase pada penelitian ini digunakan media fermentasi menggunakan inokulum/pra-inkubasi PDB selama 24 jam.

4.4 Produksi Enzim (*crude enzyme*) Lipase Ekstraseluler

Produksi enzim lipase ekstraseluler dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi minyak zaitun. 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% untuk memperoleh lipase yang mempunyai aktivitas tertinggi serta profil kinetika reaksi enzimatik pada setiap strain.

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 dan difermentasi di dalam *incubator shaker* dengan kecepatan agitasi 150 rpm pada temperatur 30°C sampai fase eksponensial setiap strain. 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 yang diperoleh digunakan sebagai sumber enzim ekstraseluler (Falony dkk., 2006).

Enzim tersebut kemudian diuji untuk ditentukan aktivitasnya dengan metode titrimetri (Linfield dkk., 1984) pada kondisi operasi temperatur 40°C, 150 rpm selama 1 jam (Handayani, 2005). Kadar protein ditentukan dengan metode Lowry (Lowry dkk., 1951) dan sebagai standar digunakan *Bovine Serum Albumine*. Hasil uji aktivitas digunakan untuk menentukan parameter kinetika enzimatik, yaitu k_m dan v_{maks} dari setiap strain.

4.4.1 Pengaruh Konsentrasi Minyak Zaitun Terhadap Aktivitas Lipase

Sumber *lipid carbon* merupakan hal penting untuk memacu produksi enzim lipase. Minyak zaitun merupakan sumber *lipid carbon* yang paling banyak digunakan karena menghasilkan aktivitas lipase yang lebih tinggi dibandingkan sumber *lipid carbon* lainnya. Konsentrasi optimum minyak zaitun yang dibutuhkan diperlukan agar diperoleh aktivitas enzim lipase yang tinggi.

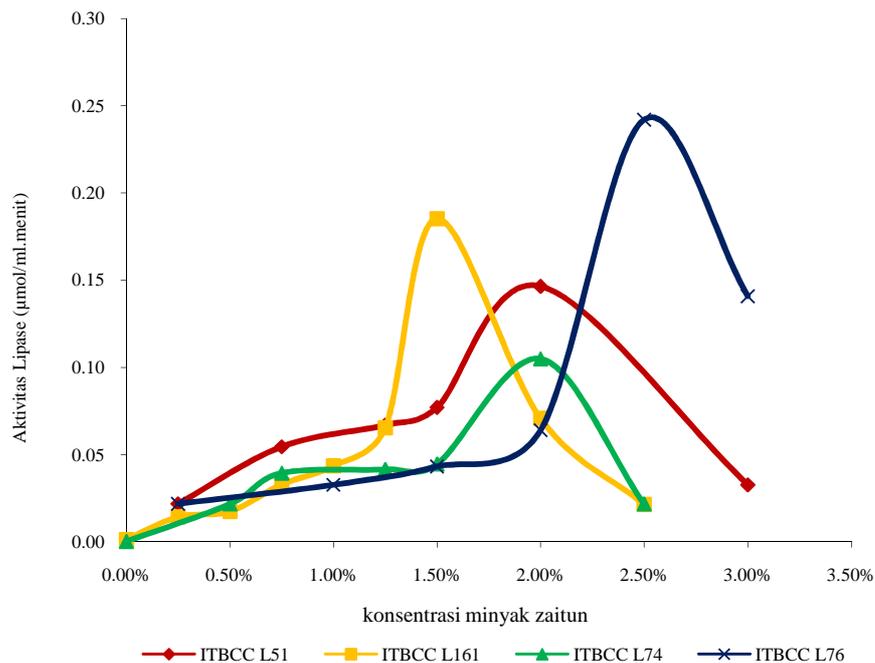
Aktivitas enzim mula-mula meningkat dengan bertambahnya konsentrasi minyak zaitun, tetapi setelah aktivitas optimum tercapai, terjadi penurunan aktivitas. Hal ini dikarenakan pada konsentrasi minyak zaitun yang optimum, enzim berada pada keadaan yang jenuh, sehingga bila konsentrasi minyak zaitun ditingkatkan, akan terjadi penurunan aktivitas yang disebabkan terjadinya inhibisi oleh minyak zaitun. Dalam hal ini minyak zaitun bersifat represor.

Seluruh strain *A. niger* juga mampu mendegradasi minyak zaitun sampai konsentrasi 3%. *A. niger* ITBCC L₅₁ dan L₇₄ mencapai aktivitas maksimumnya pada konsentrasi minyak zaitun 2% dengan aktivitas berturut-turut

0,1465 $\mu\text{mol/ml.menit}$ dan 0,1050 $\mu\text{mol/ml.menit}$, sedangkan *A. niger* ITBCC L₁₆₁ dan L₇₆ memperoleh aktivitas maksimumnya pada konsentrasi minyak zaitun berturut-turut 1,5% (0,1852 $\mu\text{mol/ml.menit}$) dan 2,5% (0,2420 $\mu\text{mol/ml.menit}$).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Falony (2006) diketahui bahwa penggunaan konsentrasi substrat minyak zaitun yang menghasilkan aktivitas tertinggi adalah 2%. Aktivitas tersebut akan mengalami penurunan aktivitas pada konsentrasi substrat diatas 2% (Damaso, 2008), namun pada penelitian ini konsentrasi substrat minyak zaitun yang menghasilkan aktivitas tertinggi berbeda-beda untuk setiap strain dan konsentrasi 2,5% mampu menghasilkan aktivitas enzim tertinggi.

Hubungan antara konsentrasi minyak zaitun terhadap aktivitas lipase ($\mu\text{mol/ml.menit}$) ditunjukkan pada Gambar 4.16.



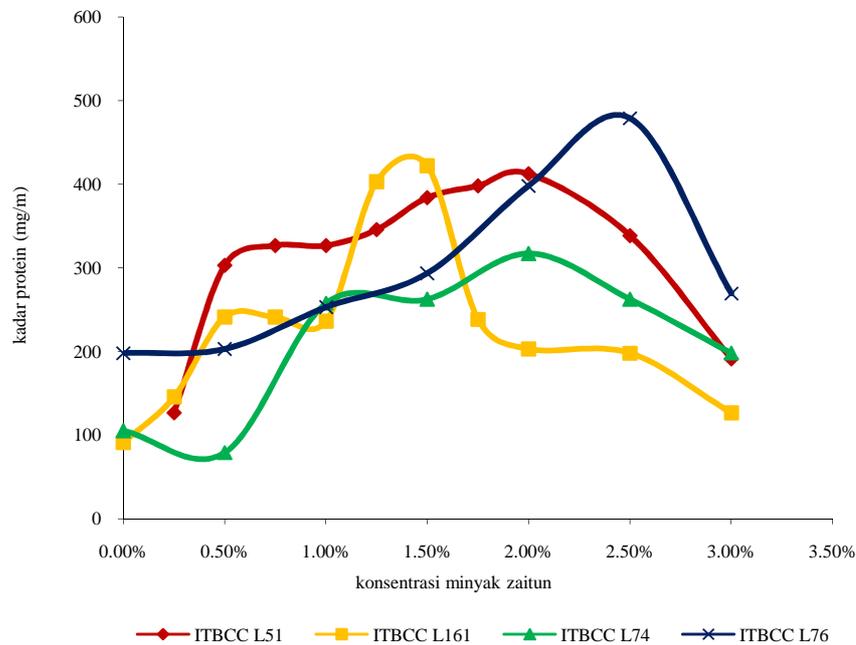
Gambar 4.16 Hubungan antara Aktivitas Lipase dengan konsentrasi minyak zaitun

4.4.2 Pengaruh Konsentrasi Minyak Zaitun Terhadap Kadar Protein Lipase

Penentuan konsentrasi minyak zaitun optimum dilakukan pula melalui pengukuran kadar protein. Kandungan protein menggambarkan jumlah protein enzim (lipase) yang disintesis dan disekresi oleh jamur *Aspergillus niger* selama masa pertumbuhannya. Penambahan minyak zaitun akan memberikan pengaruh positif pada lipase yang dihasilkan, namun bila berlebihan akan menghambat produksi enzim (lipase) tersebut akibat inhibisi yang bersifat represor.

Kadar protein optimum *Aspergillus niger* ITBCC L₅₁ dan L₇₄ dicapai pada konsentrasi minyak zaitun 2% dengan kadar protein berturut-turut 412,38 mg/ml dan 317,14 mg/ml, sedangkan *Aspergillus niger* ITBCC L₁₆₁ dan L₇₆ mempunyai kadar protein optimum pada konsentrasi minyak zaitun berturut-turut 1,5% (421,90 mg/ml) dan 2,5% (479,05 mg/ml).

Hubungan antara konsentrasi minyak zaitun terhadap kadar protein lipase dapat dilihat pada Gambar 4.17.



Gambar 4.17 Hubungan antara kadar protein dengan konsentrasi minyak zaitun

4.4.3 Kinetika Reaksi Enzimatis

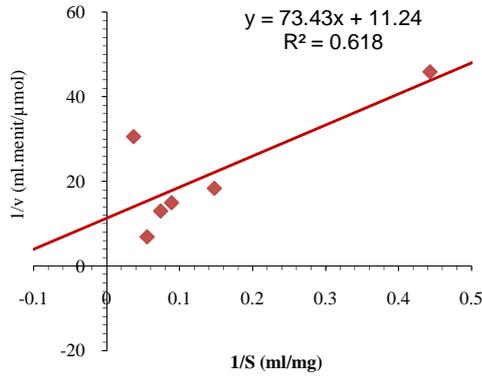
Kecepatan reaksi enzim akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat sampai pada suatu harga yang memberikan kecepatan reaksi yang tetap. Pada keadaan tersebut, kecepatan reaksi enzim mencapai maksimum karena reaksi enzim dengan substratnya menjadi jenuh dan tidak dapat bereaksi lebih cepat (Wulan dkk.)

Konsentrasi minyak zaitun dapat mempengaruhi kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim jika konsentrasi enzim dijaga konstan. Pada konsentrasi enzim yang tetap, kecepatan reaksi akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi minyak zaitun, namun hal ini akan berlangsung hingga tercapai titik batas. Setelah titik ini tercapai, kecepatan reaksi akan mendekati tetapi tidak akan pernah mencapai garis maksimum. Pada kondisi ini enzim menjadi jenuh oleh substratnya, sehingga tidak dapat berfungsi lebih cepat (Lehninger, 1995).

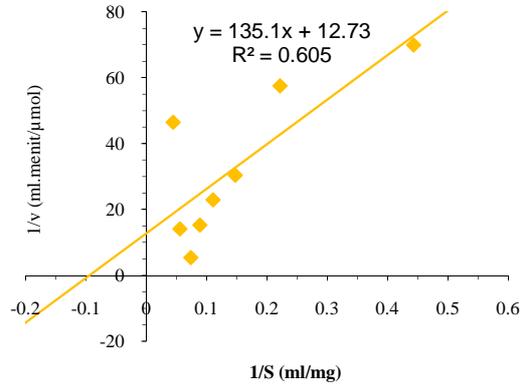
Profil kinetika reaksi enzimatis untuk setiap strain *Aspergillus niger* ditentukan dengan menggunakan persamaan Lineweaver-Burk (persamaan 2.4), yaitu dengan mengalurkan data antara nilai kebalikan kecepatan reaksi enzimatis ($1/v$) dengan nilai kebalikan konsentrasi minyak zaitun ($1/S$) sebagai berikut :

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

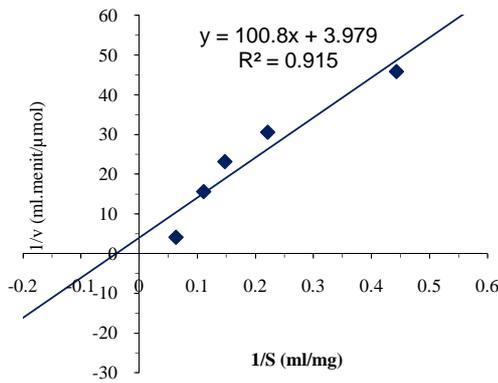
Profil kinetika enzimatis dapat dilihat pada Gambar 4.18, 4.19, 4.20, dan 4.21.



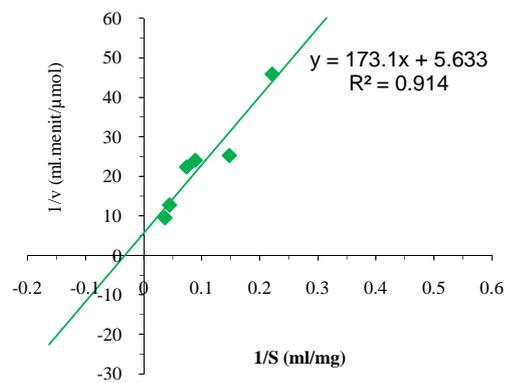
Gambar 4.18 Hubungan antara $1/S$ dan $1/v$ untuk *A. niger* ITBCC L_{51}



Gambar 4.19 Hubungan antara $1/S$ dan $1/v$ untuk *A. niger* ITBCC L_{161}



Gambar 4.20 Hubungan antara $1/S$ dan $1/v$ untuk *A. niger* ITBCC L_{76}



Gambar 4.21 Hubungan antara $1/S$ dan $1/v$ untuk *A. niger* ITBCC L_{74}

Dari hubungan antara nilai kebalikan kecepatan reaksi enzimatik ($1/v$) dengan nilai kebalikan konsentrasi minyak zaitun ($1/S$) tersebut dilakukan regresi linier sehingga diperoleh nilai k_m (tetapan Michaelis-Menten) yang diperoleh berdasarkan nilai $\text{tg } \alpha$, sudut yang dibentuk antara sumbu x dan sumbu y dan v_{maks} (kecepatan maksimum reaksi enzimatik) yang diperoleh berdasarkan titik potong dengan sumbu y ($1/v_m$). Nilai k_m dan v_{maks} untuk setiap strain dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Nilai parameter kinetika reaksi enzimatik

Nama strain	Nilai k_m (mg/ml)	Nilai v_{maks} (μ mol/ml.menit)
<i>Aspergillus niger</i>		
ITBCC L ₅₁	6,5329	0,0890
ITBCC L ₁₆₁	10,6127	0,0786
ITBCC L ₇₄	30,7296	0,1775
ITBCC L ₇₆	25,3333	0,2513

Kandungan asam lemak dalam minyak zaitun adalah asam oleat ($C_{18}H_{34}O_2$) sebesar 77%, asam palmitat ($C_{16}H_{32}O_2$) sebesar 11% dan asam linoleat ($C_{18}H_{32}O_2$) sebesar 8,9% serta beberapa asam lemak lain dalam jumlah kecil. Bila diasumsikan asam lemak lainnya adalah asam oleat, maka minyak zaitun memiliki berat molekul 279,42 mg/mmol, sehingga nilai k_m dalam satuan mM hasil percobaan untuk strain *A. niger* ITBCC L₅₁, L₁₆₁, L₇₄, L₇₆ berturut-turut adalah 23,38; 37,98; 109,98 dan 90,66 mM.

Berdasarkan nilai k_m dan v_{maks} yang diperoleh (Tabel 4.4), nampak bahwa strain yang mempunyai nilai v_{maks} tertinggi adalah *A. niger* ITBCC L₇₆, yang menandakan bahwa strain tersebut mempunyai laju pertumbuhan paling tinggi diantara strain lainnya. Hal ini sesuai dengan nilai aktivitasnya, dimana aktivitas dan kadar protein *A. niger* ITBCC L₇₆ paling tinggi diantara strain lainnya.

Nilai k_m yang diperoleh pada percobaan ini lebih tinggi dibandingkan dengan nilai k_m yang diperoleh oleh Kamini dkk (1998) yaitu sebesar 4,55 mM menggunakan minyak zaitun sebagai substrat.

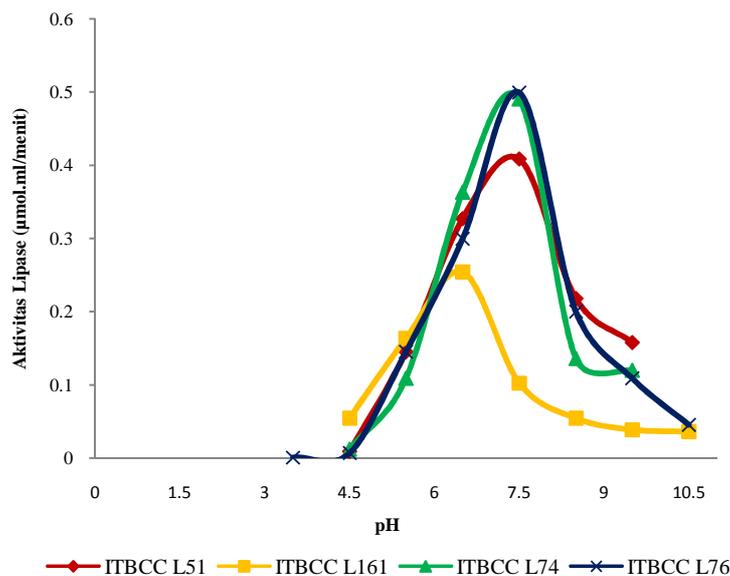
Sebagai perbandingan digunakan nilai k_m untuk lipase yang dihasilkan oleh *Pseudomonas fragi* yang berkisar antara 0,06-0,09 mg/ml dengan nilai v_{maks} 198,6–384,6 μ mol asam lemak bebas/mg protein.menit, sedangkan untuk *Geotrichum candidum* nilai k_m berkisar antara 0,01-0,04 mg/ml dengan nilai v_{maks} 304,6-665,3 μ mol asam lemak bebas/mg protein.menit. Substrat yang digunakan adalah minyak zaitun (Ngom, 2000). Hasil penelitian lain menggunakan enzim yang dihasilkan oleh bakteri yang diisolasi dari air laut pelabuhan Panjang

memberikan nilai k_m dan v_{maks} berturut-turut adalah 0,07 mg/ml dan 1,506 μmol minyak/ml enzim.menit (Nurhasanah., 2008)

4.5 Karakterisasi Enzim

Karakterisasi enzim dilakukan dengan menguji aktivitas enzim (*crude extract*) pada berbagai rentang pH dan temperatur. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim diuji pada temperatur 30°C selama 60 menit 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).

Hasil penentuan karakterisasi enzim terhadap nilai pH dapat dilihat pada Gambar 4.22.



Gambar 4.22 Hubungan antara pH dengan aktivitas lipase

Lingkungan dimana enzim akan mengkatalisis reaksi harus berada pada kondisi optimum enzim untuk bereaksi. Zona ini diberikan oleh parameter derajat keasaman (pH). Setiap enzim memiliki karakter yang berbeda dimana kondisi optimum pH lingkungan akan spesifik untuk setiap enzim. Kondisi pH yang jauh dari kondisi spesifik akan menyebabkan inaktivasi enzim karena enzim akan

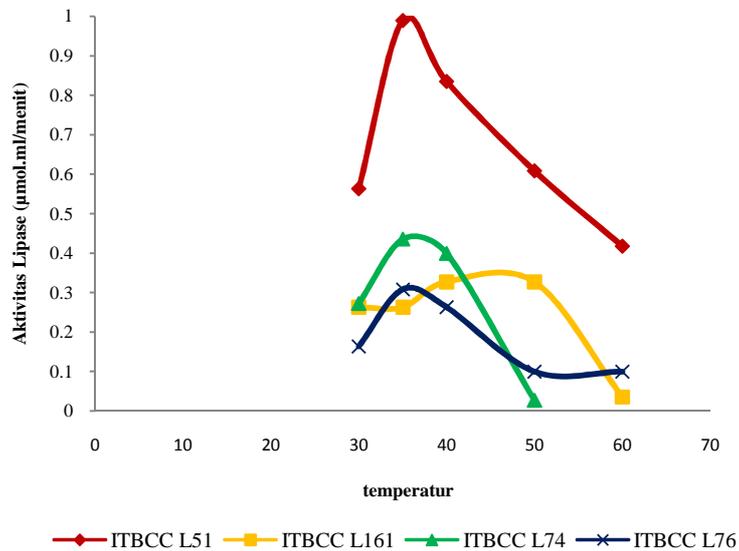
mengalami kerusakan struktur protein (Lehninger, 1995). Menurut Crueger dan Crueger (1982), pH optimum lipase dari *A. niger* adalah 5,6.

Crude extract lipase yang dihasilkan pada percobaan aktif pada pH 4,5 – 9,5 kecuali lipase dari *A. niger ITBCC L₇₆* yang aktif pada pH 3,5 – 10,5, namun aktivitas tertinggi berada pada wilayah pH netral cenderung basa dengan nilai pH optimum 6,5 untuk enzim yang berasal dari *A. niger ITBCC L₁₆₁* dan pH optimum 7,5 untuk enzim yang berasal dari *A. niger ITBCC L₅₁*, *A. niger ITBCC L₇₄* dan *A. niger ITBCC L₇₆*. Hasil ini serupa dengan aktivitas lipase yang dihasilkan oleh *A. niger MTCC* yang aktif pada pH 4-10 dengan pH optimum 7 (Kamini, 1998), *A. niger ITBCC ATCC MYA-135* yang aktif pada pH 2-8 dengan pH optimum 6,5 (Pera, 2006) dan *A. niger J-1* yang aktif pada pH 4-10 dengan pH optimum 6 (Falony, 2006) tetapi berbeda dengan yang dihasilkan oleh *A. niger NCIM 1207* yang mempunyai aktivitas maksimum pada pH 2,5 (Mhetras, 2009) (Mahadik, 2002) dan *A. niger* yang mempunyai pH optimum 3-5 (Heerden dkk., 2002).

Seperti pH, enzim juga dipengaruhi oleh temperatur, sehingga enzim memiliki temperatur optimum. Laju reaksi akan meningkat seiring dengan peningkatan temperatur sampai batas optimumnya, yang kemudian akan menurun karena enzim akan mengalami denaturasi. Selain itu suhu yang terlalu rendah juga akan menghambat aktivitas enzim.

Pengaruh temperatur terhadap aktivitas enzim diuji pada rentang temperatur 25°C sampai 60°C menggunakan buffer asetat pH 5,5 selama 60 menit. Enzim lipase yang dihasilkan dari *A. niger ITBCC L₅₁*, *A. niger ITBCC L₁₆₁* dan *A. niger ITBCC L₇₆* aktif pada rentang suhu 25°C – 60°C, sedangkan yang dihasilkan oleh *A. niger ITBCC L₇₄* aktif pada rentang suhu 25°C – 50°C. Temperatur optimum adalah 35°C- 40°C. Hasil ini serupa dengan aktivitas lipase yang dihasilkan oleh *A. niger MTCC* (Kamini, 1998) dan *A. niger ITBCC ATCC MYA-135* (Pera, 2006) dengan temperatur optimum 37°C tetapi berbeda dengan yang dihasilkan oleh *A. niger J-1* yang mempunyai aktivitas maksimum pada temperatur 40-60°C (Falony, 2006), *A. niger NCIM 1207* yang mempunyai aktivitas maksimum pada temperatur 50°C (Mhetras, 2009), (Mahadik, 2002) dan *A. niger* yang mempunyai temperatur optimum 25°C- 35°C (Heerden, dkk., 2002).

Hasil penentuan karakterisasi enzim terhadap nilai temperatur dapat dilihat pada Gambar 4.23.



Gambar 4.23 Hubungan antara temperatur dengan aktivitas lipase

Data pH dan temperatur optimum untuk keempat strain dapat dilihat pada tabel 4.5.

Tabel 4.5 pH dan temperatur optimum lipase dari setiap strain

Nama strain	pH optimum		Temperatur optimum	
	pH	Aktivitas (μmol/ml.menit)	Temperatur (°C)	Aktivitas (μmol/ml.menit)
<i>Aspergillus niger</i>				
ITBCC L ₅₁	7,5	0,4084	35	0,9893
ITBCC L ₁₆₁	6,5	0,2541	40	0,3268
ITBCC L ₇₄	7,5	0,4901	35	0,4357
ITBCC L ₇₆	7,5	0,4992	35	0,3086

4.6 Produksi Monoasilgliserol

Enzim dengan aktivitas tertinggi dan konsentrasi minyak zaitun optimum yaitu enzim yang dihasilkan oleh *A. niger ITBCC L₇₆* dengan konsentrasi minyak zaitun sebanyak 2,5% digunakan untuk pengujian aktivitas gliserolisis enzim lipase menghasilkan monoasilgliserol menggunakan minyak kelapa sebagai substrat dan gliserol sebagai kosubstrat. Produk yang dihasilkan kemudian dianalisa menggunakan metoda kromatografi lapis tipis (KLT). Hasil analisa tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.24 dan Tabel 4.6.

Berdasarkan gambar 4.24 dapat diketahui bahwa produk monoasilgliserol dan diasilgliserol tertinggi diperoleh pada hari ke-4 dengan produk monoasilgliserol yang dihasilkan adalah 16,21%, sedangkan diasilgliserol, triasilgliserol dan asam lemak bebas yang dihasilkan berturut-turut adalah 27,09%, 39,7% dan 17%, sehingga diketahui bahwa produk monodiasilgliserol yang dihasilkan adalah 43,30%. Hasil ini lebih baik jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Harnanik (2005) yang melakukan reaksi gliserolisis menggunakan *Aspergillus sp* dengan substrat minyak sawit dan minyak kelapa pada temperatur 40°C, kecepatan putaran 200 rpm selama 24 jam. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa substrat minyak sawit menghasilkan monodiasilgliserol yang lebih tinggi (14,64%) dibandingkan minyak kelapa.

Pada penelitian yang dilakukan oleh August (2000), diketahui bahwa produk monoasilgliserol tertinggi terbentuk dari perbandingan komposisi minyak kelapa, enzim dan gliserol sebesar 100 : 30 : 30 b/b dengan proses fermentasi selama 4 hari atau dengan perbandingan 100 : 40 : 40 b/b selama 3 hari. Hasil analisa KLT menunjukkan adanya pemisahan spot monoasilgliserol dan diasilgliserol namun tidak nampak spot triasilgliserol dan asam lemak bebas.



Gambar 4.24 Hasil analisa produksi monoasilgliserol menggunakan KLT

Tabel 4.6 Hasil analisa produksi monoasilgliserol menggunakan KLT

Produk	Monoasil- gliserol	Diasil- gliserol	Triasil- gliserol	Asam lemak bebas
Berat luasan (gram)	0,0365	0,0610	0,0894	0,0383
Luas area (cm ²)	0,9530	1,5927	2,3342	1
Nilai Rf	0,0306	0,1407	0,4404	0,7462