



**PRODUKSI ENZIM LIPASE DARI KAPANG
DENGAN METODE *SOLID STATE FERMENTATION*
PADA MEDIA AMPAS KELAPA**

SKRIPSI
disusun sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
Program Studi Kimia

oleh
Miftah Al Azizah
4311414003

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
2018**

HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN

Saya menyatakan bahwa skripsi ini bebas plagiat, dan apabila di kemudian hari terbukti terdapat plagiat dalam skripsi ini, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai ketentuan peraturan perundang-undangan.

Semarang, 23 Juli 2018



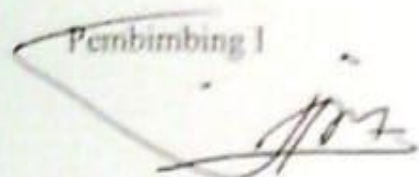
Miftah Al Azizah
4311414003

PERSETUJUAN PEMBIMBING

Skripsi ini telah disetujui oleh pembimbing untuk diajukan ke Sidang Panitia Skripsi Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang.

Semarang, 18 Juli 2018

Pembimbing I



Dr. Sri Mursiti, M.Si
NIP. 196709131999032001

Pembimbing II



Prof. Dr. Supartono, M.S
NIP. 195412281983031003

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul

Produksi Enzim Lipase dari Kapang dengan Metode *Solid State Fermentation*
pada Media Ampas Kelapa

Disusun oleh

Miftah Al Azizah

4311414003

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Skripsi FMIPA UNNES pada tanggal
23 Juli 2018.

Semarang, 23 Juli 2018



Prof. Dr. Zaenuri, S.E., M.Si., Akt
NIP. 19641223198803101

Sekretaris

Dr. Nanik Wijayati, M.Si.
NIP. 196910231996032002

Ketua Penguji

Dr. Nanik Wijayati, M.Si.
NIP. 196910231996032002

Anggota Penguji/
Pembimbing I

Dr. Sri Mursiti, M.Si
NIP. 196709131999032001

Anggota Penguji/
Pembimbing II

Prof. Dr. Supartono, M.S
NIP. 195412281983031003

HALAMAN MOTTO DAN PERSEMBAHAN

Motto:

Angin tidak berhembus untuk menggoyangkan pepohonan melainkan untuk menguji kekuatan akarnya.

(Ali bin Abi Thalib)

Tersenyumlah, bukan karena kita sudah menjadi orang paling bahagia di dunia ini, tapi simpel karena kita mensyukuri hidup ini. Tersenyumlah, bukan karena sudah bebas dari masalah, tapi karena apapun yang akan terjadi besok lusa, itu adalah sekenario terbaik yang terjadi.

(Tere Liye)

Persembahan:

Untuk Ayah, Ibu, Kakak, Adik, dan Sahabat

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Produksi Enzim Lipase dari Kapang dengan Metode *Solid State Fermentation* pada Media Ampas Kelapa”.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini tidak akan terselesaikan dengan baik tanpa adanya partisipasi dan bantuan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Dr. Nanik Wijayati, M.Si. Ketua Jurusan Kimia, dosen wali, dan dosen penguji yang telah memberikan kemudahan administrasi, membimbing dan mengarahkan selama masa studi, serta memberikan saran dan masukan yang sangat berguna untuk penyempurnaan skripsi ini.
 2. Dr. Sri Mursiti, M.Si, Dosen pembimbing I yang penuh kesabaran dalam membimbing, memberikan arahan, dan motivasi dalam penyusunan skripsi ini.
 3. Prof. Dr. Supartono, M.S, Dosen pembimbing II yang penuh kesabaran dalam membimbing, memberikan arahan, dan motivasi dalam penyusunan skripsi ini.
 4. Kepala Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan izin untuk melakukan penelitian di Laboratorium Kimia.
 5. Teknisi dan Laboran di laboratorium kimia yang telah memberikan izin dan membantu penulis dalam pelaksanaan penelitian.
 6. Seluruh dosen Jurusan Kimia UNNES yang telah membagi ilmu dan pengalaman.
 7. Seluruh pihak yang telah membantu penulis dalam penyelesaian skripsi ini
- Kritik dan saran yang membangun dari berbagai pihak penulis harapkan demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi berbagai pihak yang membutuhkan.

Semarang, 23 Juli 2016

Penulis

ABSTRAK

Azizah, Miftah A. 2018. *Produksi Enzim Lipase dari Kapang dengan Metode Solid State Fermentation pada Media Ampas Kelapa*. Skripsi, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Pembimbing Dr. Sri Mursiti, M.Si., Prof. Dr. Supartono, M.S.

Kata Kunci: kapang, lipase, *Solid State Fermentation*

Lipase merupakan enzim hidrolase yang mampu mengkatalis hidrolisis trigliserida menjadi asam lemak bebas, diasilgliserol, monoasilgliserol, dan gliserol. Lipase banyak digunakan karena memiliki spesifikasi reaksi yang tinggi, namun penggunaan secara komersial masih tergolong rendah. Hal ini dikarenakan harga enzim lipase yang tergolong mahal. Lipase dapat diproduksi oleh kapang. Telah dilakukan penelitian tentang produksi enzim lipase dari kapang dengan metode *solid state fermentation* pada media ampas kelapa. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui waktu optimum fermentasi pada produksi enzim lipase dan karakteristik dari enzim yang dihasilkan. Kapang diisolasi dari inokulum tempe dan diseleksi menggunakan media selektif yang mengandung indikator *Bromocressol Green*. Produksi enzim lipase dilakukan dengan metode *Solid state fermentation* pada media ampas kelapa. Fermentasi dilakukan selama 3, 4, dan 5 hari. Enzim yang dihasilkan dikarakterisasi dengan metode titrasi menggunakan NaOH pada suhu (30, 35, 40, 45°C), pH (6; 6,5; 7; 7,5; 8), dan waktu (20, 30, 40 menit). Uji kadar protein enzim dilakukan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 560 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu fermentasi paling optimum untuk memproduksi enzim lipase yaitu 4 hari. Enzim lipase yang dihasilkan memiliki karakteristik optimum pada waktu 30 menit, suhu 35°C, dan pH 7,5. Hal ini ditandai dengan aktivitas tertinggi yaitu 12,0 U/mL. Kadar protein tertinggi diperoleh 0,75 mg/mL. Aktivitas spesifik enzim tertinggi diperoleh 15,9 U/mg. Enzim lipase yang dihasilkan mampu menghindrolisis minyak zaitun dengan energi aktivasi 43,46 kJ/mol.

ABSTRACT

Azizah, Miftah A. 2018. Production of Lipase Enzyme from Kapang with Solid State Fermentation Method on Coconut Pulp. Skripsi, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Main Supervisor Sri Mursiti, M.Si., and Supervising Companion Prof. Dr. Supartono, M.S.

Keywords: Lipase, Mold, *Solid State Fermentation*

Lipase is a hydrolase enzyme capable to catalyze the hydrolysis of triglycerides into free fatty acids, diacylglycerols, monoacylglycerols, and glycerols. Lipase is widely used because it has high specific reaction. The commercial use of lipase enzyme is relatively low, this is because the price of lipase enzyme is quite expensive. Lipase can be produced by mold. A research on the production of lipase enzyme from mold with solid state fermentation method has been done on coconut pulp. The purpose of this study was to determine the optimum time of fermentation in the production of lipase enzymes and the characteristics of the enzyme produced. Kapang was isolated from Tempe inoculum and selected using selective media containing Bromocressol Green indicator. The production of lipase enzyme was done by solid state fermentation method on coconut pulp medium. Fermentation is carried out for 3, 4, and 5 days. The resulting enzyme was characterized by titration method using NaOH at temperature (30, 35, 40, 45 ° C), pH (6, 6.5, 7, 7.5, 8), and time (20, 30, 40 min). Tests of enzyme protein content were performed using a UV-Vis Spectrophotometer at a wavelength of 560 nm. The results showed that the most optimum fermentation time to produce the lipase enzyme was 4 days. The resulting lipase enzyme has optimum characteristics at 30 minutes, 35°C, and pH 7,5. It is characterized by the highest activity of 12.0 U / mL. The highest protein content was 0.75 mg / mL. The highest activity of the highest enzyme was obtained 15.9 U/mg. The result showed that lipase enzyme could synchronize the olive oil with activation energy of 43.46 kJ / mol.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN	ii
PERSETUJUAN PEMBIMBING.....	iii
PENGESAHAN	iv
HALAMAN MOTTO DAN PERSEMBAHAN.....	v
PRAKATA.....	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Identifikasi Masalah	3
1.3 Rumusan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Enzim	6
2.2 Enzim Lipase.....	7
2.3 Kapang	12
2.4 <i>Solid State Fermentation</i> (SFF).....	15
2.5 Spektrofotometer UV-Vis	17
METODE PENELITIAN.....	19
3.1 Diagram Alir Penelitian	19
3.2 Tempat Penelitian.....	19
3.3 Variabel Penelitian	20
3.4 Alat dan Bahan	20
3.5 Prosedur Penelitian.....	21

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	28
4.1. Hasil Penelitian	28
4.2. Pembahasan	34
BAB 5 PENUTUP	48
5.1. Simpulan.....	48
5.2. Saran.....	48
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN.....	53

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Klasifikasi Enzim secara Internasional	7
Tabel 2.3 Strain dan Media pada Produksi Enzim Lipase	16
Tabel 2.4 Daerah Spektrum Elektromagnetik	17
Tabel 3.1 Alat-alat yang Digunakan	20
Tabel 3.2 Bahan-bahan yang Digunakan	21
Tabel 4.1 Luas Koloni Kapang	28
Tabel 4.2 Luas Zona Hidrolisis Isolat Kapang	28
Tabel 4.3 Aktivitas Enzim Lipase Kapang KT-02 pada Media Ampas Kelapa ...	29
Tabel 4.4 Hasil Uji Aktivitas Enzim	31
Tabel 4.5 Kadar Protein pada Enzim	30
Tabel 4.6 Uji Aktivitas Spesifik Enzim	32
Tabel 4.7 Parameter Termodinamika	33

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur Primer, Sekunder, dan Tersier dari Suatu Enzim.....	6
Gambar 2.2 Berbagai Reaksi yang Dapat Dikatalis oleh Enzim Lipase.....	8
Gambar 2.3 Perubahan Energi Gibbs.....	8
Gambar 2.4 Pengaruh Konsentrasi Enzim Terhadap Aktivitas Enzim	10
Gambar 2.5 Zona Hidrolisis pada Kapang yang Positif Menghasilkan Lipase	14
Gambar 3. 1 Diagram Alir Penelitian	19
Gambar 4.1 Grafik Panjang Gelombang Optimum pada Uji Protein	29
Gambar 4.2 Kurva Linear Uji Protein.....	30
Gambar 4.3 Hubungan antara $\ln V$ dengan $1/T$	33
Gambar 4.4 Isolat Kapang dari Tempe	35
Gambar 4. 5 Hasil Negatif Kapang KT-01	36
Gambar 4.6 Zona Hidrolisis pada Kapang KT-02 Positif Penghasil Lipase	37
Gambar 4.7 Zona Hidrolisis pada Kapang KT-03 Positif Penghasil Lipase	37
Gambar 4.8 Hubungan pH Terhadap Aktivitas Enzim.....	41
Gambar 4.9 Hubungan pH Terhadap Aktivitas Enzim	42
Gambar 4.10 Reaksi Reagen Biuret dengan Protein.....	43

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enzim merupakan biokatalis makromolekul yang dapat meningkatkan laju suatu reaksi kimia (Liu *et al.*, 2016). Lehninger (2005) menyatakan bahwa enzim sangat penting dalam setiap proses biokimia. Enzim berperan mengurutkan reaksi agar terorganisir, sehingga tahapan reaksi terkoordinasi dan menghasilkan interaksi yang harmonis. Liu *et al.*, (2016) menyatakan bahwa selain bertindak sebagai biokatalis pada sistem metabolisme makhluk hidup, enzim juga dimanfaatkan secara luas pada berbagai bidang industri dan penelitian karena hanya membutuhkan energi yang rendah, selektif terhadap substrat tertentu, biokompatibel, biodegradabel, dan dapat diperoleh dari sumber terbarukan.

Enzim lipase merupakan biokatalis paling serbaguna dalam sintesis organik karena memiliki sifat fleksibilitas, stereoselektivitas, tersedia secara komersial, murah, dan memungkinkan penggunaan dalam berbagai macam pH dan suhu antara 20-70°C (Veccia *et al.*, 2005). Lipase juga mampu mengkatalis berbagai macam reaksi esterifikasi, termasuk transesterifikasi, aminolisis, dan thiotransesterifikasi (Ayinla *et al.*, 2017). Pada beberapa tahun terakhir lipase juga banyak dimanfaatkan dalam industri kimia dan farmasi karena kegunaannya dalam sintesis dan reaksi hidrolitik. Berbagai bidang industri yang menggunakan enzim lipase diantaranya yaitu pada industri biopolimer, biodiesel, detergen, pembuatan protein sel tunggal, pembuatan biosensor, dan pembuatan pestisida (Aybaster & Demir, 2010).

Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry, merekomendasikan lipase termasuk kelompok enzim ester hidrolase, sehingga diklasifikasikan sebagai enzim kelas 3.1 (Kurnia, 2010). Lipase diklasifikasikan dalam enzim hidrolase yang mengkatalis pemecahan lemak dan minyak dengan menghasilkan asam lemak bebas, diasilgliserol, monogliserol, dan gliserol (Veccia *et al.*, 2005). Iftikhar *et al.*, (2010) menyatakan bahwa kelebihan penggunaan enzim hidrolisis pada reaksi kimia adalah kebutuhan energi yang rendah dan kualitas produk yang baik.

Lipase banyak digunakan karena memiliki spesifikasi reaksi yang tinggi (Iftikhar *et al.*, 2010), namun penggunaan secara komersial masih tergolong rendah (Kaewthong *et al.*, 2005). Hal ini dikarenakan harga enzim lipase yang tergolong mahal. Sigma Aldrich memasarkan enzim lipase dari *Aspergillus niger* dengan harga \$ 106.58/gram atau setara dengan Rp 1.500.000,00 /g, padahal enzim lipase tersebar secara luas di alam. Lipase diproduksi oleh beberapa tanaman, hewan, dan mikroorganisme. Tumbuhan merupakan sumber awal dari berbagai produk bioaktif, namun isolasi dan produksi senyawa dari tumbuhan dalam skala besar membutuhkan banyak waktu dan biaya (Sudha *et al.*, 2016). Selain itu, eksploitasi tumbuhan secara besar-besaran juga dapat mengganggu keseimbangan lingkungan.

Iftikhar *et al.*, (2011) menyatakan bahwa enzim yang diisolasi dari mikroorganisme memiliki kegunaan yang luas dari pada enzim yang diisolasi dari hewan maupun tumbuhan. Hal ini dikarenakan enzim dari mikroorganisme memiliki variasi aktifitas katalitik, kemungkinan yang luas, mudah dimanipulasi secara genetik, mikroorganisme mudah untuk dikembangkan sehingga enzimnya mudah untuk diproduksi. Lipase dari mikroorganisme juga memiliki kestabilan yang lebih baik daripada lipase yang diperoleh dari tumbuhan maupun hewan, lebih aman, dan lebih murah (Treichel *et al.*, 2010).

Produksi enzim lipase dari mikroba dapat dilakukan dengan metode SMF (*submerged fermentation*) maupun dengan metode SSF (*solid state fermentation*) (Sanchez *et al.*, 2015). Metode SSF merupakan proses fermentasi mikroba dengan memanfaatkan zat padat sebagai media atau matriks tumbuhnya (Singhania *et al.*, 2009). Metode SSF sangat berpotensi untuk dikembangkan karena menghasilkan produk dengan efisiensi yang lebih tinggi daripada metode SmF (Kumar *et al.*, 2014). Metode SSF memiliki keunggulan dapat menghasilkan produk yang lebih stabil, oksigen yang terdistribusi pada media lebih banyak, dan lebih murah dalam pengoperasian (Sanchez *et al.*, 2015), selain itu metode SFF juga memungkinkan sedikit kontaminasi karena kadar air pada media yang lebih rendah (Singhania *et al.*, 2009).

Produksi lipase dengan menggunakan metode SSF sangat dipengaruhi oleh media yang digunakan. Hal ini dikarenakan lipase yang dihasilkan oleh mikroba

sebagian besar merupakan lipase ekstraseluler (Traechel *et al.*, 2010). Limbah agroindustri banyak digunakan dalam penelitian sebagai media fermentasi dikarenakan memiliki berbagai manfaat yang potensial. Penggunaan limbah agroindustri juga menjadi alternatif solusi mengurangi pencemaran. Limbah agroindustri efektif digunakan sebagai media fermentasi terbukti dari penelitian yang dilakukan oleh Adio *et al.*, (2015) yang menggunakan berbagai macam limbah agroindustri (bekatul, tandan kelapa sawit, dan pati). Kobiltz *et al.*, (2006) menggunakan dedak gandum sebagai media fermentasi produksi lipase dari *Rhizopus sp.*

Ampas kelapa merupakan salah satu limbah agroindustri yang sangat melimpah dan belum banyak dimanfaatkan. Berdasarkan data Kementerian Pertanian pada tahun 2015 jumlah produksi kelapa di Indonesia 2.920.665 ton. Tingginya produksi kelapa juga menunjukkan tingginya limbah agroindustri yang dihasilkan. Kurniawan *et al.*, (2016) menyatakan bahwa limbah ampas kelapa mengandung berbagai nutrisi seperti protein 5,78%, lemak 38,24%, dan serat kasar 15,07%. Kandungan nutrisi ampas kelapa yang cukup tinggi, sehingga memungkinkan untuk digunakan sebagai media fermentasi pada produksi enzim. Kandungan lemak pada ampas kelapa juga dapat berperan sebagai zat induksi pada fermentasi mikroba penghasil lipase sehingga menghasilkan enzim lipase yang lebih banyak.

1.2 Identifikasi Masalah

1. Enzim lipase memiliki banyak manfaat, namun penggunaannya masih tergolong rendah karena harganya yang mahal.
2. Sebagian besar pemenuhan kebutuhan enzim dengan cara impor padahal enzim terdapat di alam.
3. Enzim dari mikroorganisme lebih ramah lingkungan dan lebih mudah dikembangkan.
4. Ampas kelapa merupakan limbah agroindustri yang dapat mencemari lingkungan, padahal ampas kelapa dapat dimanfaatkan sebagai media fermentasi pada produksi enzim lipase.

1.3 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut diatas, maka permasalahan yang akan dibahas dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah isolat kapang mampu menghasilkan enzim lipase?
2. Bagaimanakah pengaruh lamanya waktu fermentasi terhadap aktivitas enzim lipase?
3. Bagaimanakah karakteristik *crude enzim* yang dihasilkan?

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah tersebut diatas, tujuan yang hendak dicapai pada penelitian ini adalah untuk mengetahui:

1. Kemampuan isolat kapang yang dalam menghasilkan enzim lipase.
2. Pengaruh lamanya waktu fermentasi terhadap aktivitas enzim lipase yang dihasilkan.
3. Karakteristik *crude enzyme* yang dihasilkan

1.5 Manfaat Penelitian

Kontribusi penelitian yang ingin dicapai pada penelitian ini adalah

1. Bagi pengembangan IPTEKS
 - a. Memberi informasi mengenai kemampuan isolat kapang dari inokulum tempe dalam menghasilkan enzim lipase.
 - b. Memberi informasi mengenai kondisi waktu optimum fermentasi untuk memproduksi enzim lipase dari isolat kapang tempe.
 - c. Memberi informasi mengenai karakteristik *crude enzyme* yang dihasilkan, meliputi aktivitas enzim, pH optimum, suhu optimum, waktu optimum, kadar protein, dan aktivitas spesifik enzim.
2. Bagi masyarakat
 - a. Memberi alternatif sumber enzim dari kapang tempe.
 - b. Mendorong masyarakat untuk memanfaatkan limbah ampas kelapa sebagai substrat produksi enzim lipase.

3. Bagi peneliti lain
 - a. Mendorong peneliti lain untuk meneliti kemampuan isolat kapang dalam memproduksi enzim lipase.
 - b. Mendorong peneliti lain untuk meneliti kondisi optimum pada fermentasi produksi enzim lipase pada substrat padat (*Solid State Fermentation*).
 - c. Mendorong peneliti lain untuk meneliti karakteristik enzim yang dihasilkan sehingga dapat diketahui kondisi optimum (pH, suhu, dan waktu) untuk menggunakan enzim yang dihasilkan.

BAB 2

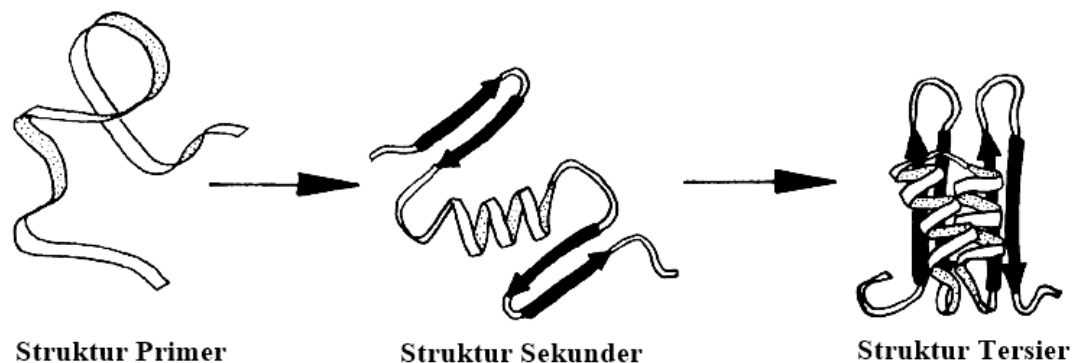
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Enzim

Enzim merupakan biokatalis makromolekul yang dapat meningkatkan laju suatu reaksi kimia (Liu *et al.*, 2016). Lehninger (2005) menyatakan bahwa enzim sangat penting dalam setiap proses biokimia. Enzim berperan mengurutkan reaksi agar terorganisir, enzim mengkatalis ratusan reaksi bertahap yang menghasilkan makromolekul biologis dari prekursor yang sederhana. Enzim yang bertindak sebagai pengatur mengakibatkan jalur metabolisme sangat terkoordinasi dan menghasilkan interaksi yang harmonis di antara banyak aktivitas yang diperlukan untuk mempertahankan sistem kehidupan.

Enzim memiliki keunggulan sifat, diantaranya yaitu aktivitas yang tinggi walaupun dalam konsentrasi yang rendah (Kurnia, 2010), selektif terhadap substrat tertentu (Liu *et al.*, 2016) sehingga tidak ditemukan reaksi-reaksi samping yang dapat mencemari produk. Penggunaan enzim juga lebih ramah lingkungan karena bersifat biodegradabel dan dapat diperoleh dari sumber daya terbarukan (Liu *et al.*, 2016). Penggunaan enzim membutuhkan energi yang lebih rendah. Hal ini dikarenakan enzim tidak bekerja pada suhu maupun tekanan yang tinggi.

Lehninger (2005) menyatakan bahwa, hampir semua enzim merupakan suatu protein. Menurut Copeland (2000) enzim memiliki struktur primer, sekunder, tersier dan kuartener seperti pada Gambar 2.1



Gambar 2.1 Struktur Primer, Sekunder, dan Tersier dari Suatu Enzim

Klasifikasi enzim secara internasional menggolongkan semua enzim dalam enam kelas utama. Penggolongan tersebut berdasarkan jenis reaksi yang dikatalis (Lehninger, 2005) seperti pada Tabel 2.1

Tabel 2.1 Klasifikasi Enzim secara Internasional

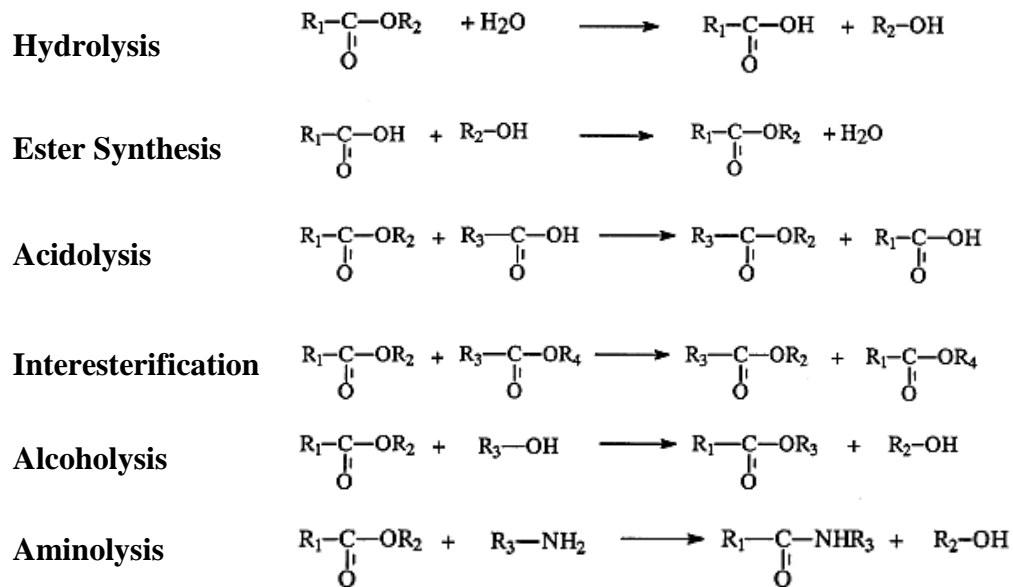
No	Kelas	Jenis reaksi yang dikatalis
1	Oksidoreduktase	Reaksi pemindahan elektron
2	Transferase	Reaksi pemindahan gugus fungsional
3	Hidrolase	Reaksi hidrolisis
4	Liase	Penambahan gugus pada ikatan rangkap maupun sebaliknya.
5	Isomerase	Pemindahan gugus dalam molekul sehingga menghasilkan bentuk isomer
6	Ligase	Pembentukan ikatan C-C, C-S, C-O, dan C-N oleh reaksi kondensasi yang berkaitan dengan penguraian ATP

2.2 Enzim Lipase

Lipase merupakan enzim hidrolase yang mampu mengkatalis hidrolisis trigliserida menjadi asam lemak bebas, diasilgliserol, monoasilgliserol, dan gliserol (Damaso *et al.*, 2008). Berdasarkan klasifikasi yang direkomendasikan oleh *Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry*, lipase termasuk kelompok enzim yang dikenal sebagai ester hidrolase sehingga diklasifikasikan sebagai enzim kelas 3.1 (Kurnia, 2010). Enzim lipase merupakan enzim *triacylglycerol acylhydrolase* sehingga diklasifikasikan sebagai enzim kelas 3.1.1.3 (Treichel *et al.*, 2010).

Lipase diklasifikasikan sebagai enzim hidrolase, namun selain reaksi hidrolisis, enzim lipase juga mampu mengkatalis berbagai reaksi. Ayinla *et al.*, (2017) menyatakan bahwa lipase mampu mengkatalis reaksi asidolisis, alkoholisis, dan aminolisis. Villeneuve *et al.*, (2000) menyatakan bahwa enzim lipase mampu mengkatalis reaksi esterifikasi, transesterifikasi, thiotransesterifikasi, dan oksimolisis. Kemampuan lipase dalam mengkatalis berbagai reaksi mengakibatkan pemanfaatannya dalam berbagai bidang industri semakin luas. Traichel *et al.*, (2010) menyatakan bahwa lipase telah dimanfaatkan secara luas pada berbagai bidang industri, seperti pada industri makanan, farmasi, kosmetik, detergen, dan sintesis senyawa-senyawa organik. Beberapa tahun terakhir, lipase juga banyak

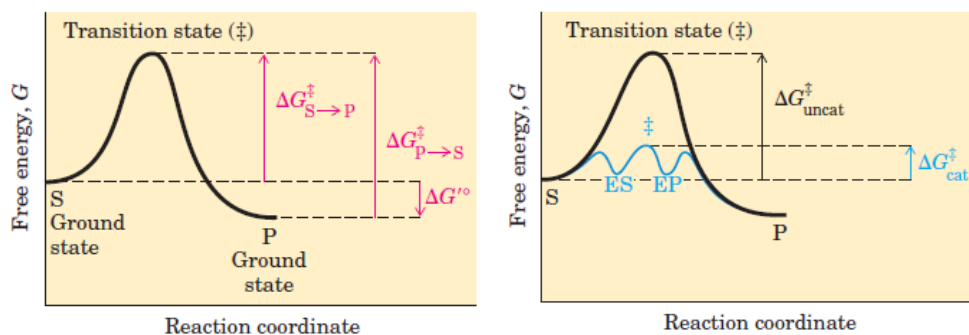
dimanfaatkan pada bidang bioteknologi, seperti pada produksi protein sel tunggal, pembuatan biosensor, dan pengolahan limbah (Ayinla *et al.*, 2017). Berbagai reaksi yang dapat dikatalis oleh enzim lipase tersaji pada Gambar 2.2



Gambar 2.2 Berbagai Reaksi yang Dapat Dikatalis oleh Enzim Lipase
Sumber: Villeneuve *et al.*, (2000)

2.2.1 Karakteristik Enzim Lipase sebagai Suatu Katalis

Katalis merupakan zat yang dapat meningkatkan laju reaksi dan dapat diperoleh kembali pada akhir reaksi. Katalis menurunkan energi gibbs dari aktivasi dengan mekanisme reaksi yang berbeda. Mekanisme ini meningkatkan laju, hal ini berlaku pada arah reaksi maju ataupun kebalikan dari reaksi tersebut (Chang, 2005). Perubahan energi Gibbs pada reaksi yang ditambah dengan katalis tersaji pada Gambar 2.3



Gambar 2.3 Perubahan Energi Gibbs

(a) reaksi kimia tanpa katalis (b) perbandingan reaksi katalis dan tanpa katalis

Katalis membentuk zat antara dengan reaktan (s) pada tahap awal mekanisme dan dilepaskan pada tahap pembentuk produk. Katalis tidak muncul dalam keseluruhan reaksi. Terlepas dari mekanisme dan energetika reaksi, katalis tidak dapat mengangkat enthalpi atau energi Gibbs dari reaktan dan produk. Dengan demikian, katalis meningkatkan laju mendekati ekuilibrium, namun tidak dapat mengubah konstanta kesetimbangan termodinamika (Copeland, 2000). Beberapa karakteristik enzim sebagai suatu katalis, diantaranya yaitu:

1. Derajat Keasaman (pH)

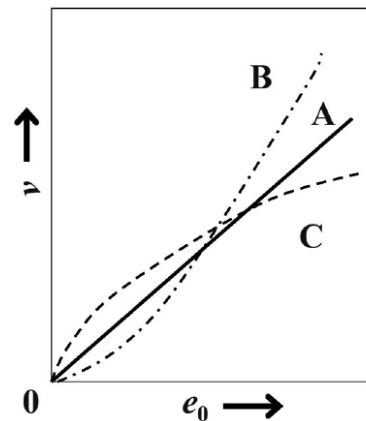
Lehninger (2005) menyatakan bahwa, enzim memiliki pH optimum. Pada saat kondisi reaksi pada pH yang optimum aktivitas enzim menunjukkan nilai yang tertinggi. Hal ini disebabkan karena enzim merupakan suatu protein yang terdiri dari asam amino. Sisi aktif pada asam amino dapat rusak atau berubah pada kondisi asam maupun basa. Kondisi keasaman yang terlalu rendah dapat mengakibatkan ion H^+ akan berikatan dengan gugus $-NH_2$ dan membentuk $-NH_3^+$. Proses tersebut dapat mengakibatkan ikatan hidrogen antara atom nitrogen dengan atom hidrogen terputus, sehingga enzim terdenaturasi. Kondisi pH yang tinggi dapat mengakibatkan ion $-OH$ berikatan dengan atom hidrogen dan gugus $-COOH$ enzim membentuk H_2O . Hal tersebut dapat mengakibatkan rusaknya ikatan antara atom hidrogen dengan nitrogen maupun oksigen, sehingga struktur enzim tersebut akan rusak.

2. Suhu

Faktor suhu juga menentukan kualitas aktivitas enzim lipase sebagai biokatalis. Kenaikan suhu dalam reaksi enzimatik akan meningkatkan laju reaksi, sehingga jumlah produk yang dihasilkan meningkat. Namun, pada suhu yang lebih tinggi, akan terjadi penurunan aktivitas secara bertahap. Penurunan laju pada suhu yang lebih tinggi disebabkan oleh perubahan struktur enzim (Kurnia, 2010). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Ayinla *et al.*, (2017) enzim lipase memiliki aktivitas optimum pada suhu 35-45°C dan akan mulai terdenaturasi pada suhu 65°C.

3. Konsentrasi enzim

Suzuki (2015) menyatakan bahwa peningkatan volume produk berbanding lurus dengan konsentrasi enzim. Berdasarkan hasil percobaan menunjukkan grafik hubungan antara volume produk dengan konsentrasi enzim yang menunjukkan garis linear seperti pada Gambar 2.4



Gambar 2.4 Pengaruh Konsentrasi Enzim Terhadap Aktivitas Enzim

Grafik tersebut hanya berlaku apabila konsentrasi substrat lebih besar daripada konsentrasi enzim. Pada hasil percobaan mungkin diperoleh hasil seperti garis B dan C. Hal tersebut dapat disebabkan karena enzim terkontaminasi oleh aktivator maupun inhibitor.

4. Kadar Air

Kadar air sangat mempengaruhi laju reaksi enzimatik terutama pada kelas enzim hidrolase. Kadar air bebas yang rendah menghambat difusi enzim atau substrat, sehingga hidrolisis hanya terjadi pada bagian substrat yang langsung berhubungan dengan air (Kurnia, 2010).

5. Kadar Garam

Kadar elektrolit yang tinggi umumnya mempengaruhi kelarutan protein. Oleh karena itu, garam tertentu sering digunakan untuk melarutkan beberapa jenis protein (*salting in*). Sebaliknya beberapa jenis garam dapat membuat beberapa protein maupun enzim menjadi tidak larut (*salting out*) yang dapat dimanfaatkan untuk mengisolasi enzim (Kurnia, 2010).

2.2.2 Aktivitas Enzim Lipase

Aktivitas lipase memiliki satuan unit. Satu unit (U) aktivitas lipase didefinisikan sebagai kemampuan enzim lipase untuk menghasilkan 1 μmol asam lemak bebas dari hidrolisis substrat oleh 1 mL enzim lipase tiap satuan menit (Adio *et al.*, 2015). Kurnia (2010) menyatakan bahwa untuk menentukan aktivitas optimum pada kondisi optimum maka perlu dilakukan pengukuran aktivitas enzimatis pada variasi suhu dan pH, sehingga diketahui aktivitas lipase disetiap rentang suhu dan pH yang ditentukan.

Uji aktivitas enzim lipase dapat dilakukan dengan metode potensiometri. Prinsip dari metode ini adalah pembuatan substrat dalam bentuk emulsi kemudian diberi enzim lipase yang belum diketahui keaktifannya dan diinkubasi pada suhu dan pH optimum. Selama inkubasi, proses reaksi terjadi sehingga asam lemak dibebaskan (Kurnia, 2010). Asam lemak yang dibebaskan dihitung berdasarkan jumlah mol NaOH yang dibutuhkan saat titrasi.

Aktivitas lipase dapat diukur dengan menggunakan persamaan sebagai berikut (Adio *et al.*, 2015):

$$\text{Aktivitas lipase} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 1000}{V_e \times t}$$

Keterangan: V_1 = Volume NaOH sampel (mL)

V_2 = Volume NaOH blangko (mL)

V_e = Volume enzim (mL)

N = Normalitas NaOH (0,01-0,05 N)

1000 = konversi dari mmol ke μmol

t = waktu inkubasi

Aktivitas optimum lipase tergantung dari senyawa pengemulsi yang digunakan karena lipase hanya bekerja pada fasa antara minyak dan air. Substrat perlu diubah terlebih dahulu menjadi emulsi minyak-air. Substrat yang sering digunakan dalam penelitian adalah minyak zaitun, lemak susu, atau senyawa murni seperti tributirin dan triolein (Kurnia, 2010).

Aktivitas spesifik enzim memiliki satuan U/mg. Aktivitas spesifik enzim didefinisikan sebagai jumlah unit enzim tiap miligram protein (Uyanik *et al.*, 2011).

Kumar *et al.*, (2011) menyatakan bahwa aktivitas spesifik enzim dapat dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas lipase} = \frac{\text{Aktivitas enzim (U/mL)}}{\text{Kadar protein (mg/mL)}}$$

2.2.3 Sumber-sumber Enzim Lipase

Lipase dapat diperoleh dari hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme. Lipase dari mikroorganisme lebih banyak diminati dalam berbagai industri karena lebih stabil dan spesifik terhadap substrat yang lebih luas (Traichel *et al.*, 2010). Iftikhar *et al.*, (2011) menyatakan bahwa enzim yang diisolasi dari mikroorganisme memiliki kegunaan yang lebih luas dari pada enzim yang diisolasi dari tumbuhan maupun hewan. Hal ini dikarenakan enzim dari mikroorganisme memiliki variasi aktivitas katalitik yang lebih luas. Selain itu, mikroorganisme juga dapat dimanipulasi secara genetik dan mudah untuk dikembangbiakkan sehingga enzimnya mudah untuk diproduksi.

Berbagai penelitian telah membuktikan mikroorganisme potensial menghasilkan lipase. Thakur *et al.*, (2012) menyatakan bahwa beberapa fungi, yeast, dan bakteri dapat menghasilkan lipase. Bakteri yang potensial menghasilkan lipase diantaranya yaitu *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus streptomocillus*, *Staphylococcus caseoliticu*, *Seratia rubidaea*, dan *Burkholderia cepacia* (Traichel, 2010). Fungi yang potensial menghasilkan lipase diantaranya yaitu *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Geotrichum sp.*, *Mucor sp.*, dan *Rhizomucor sp.* (Thakur, 2012). Sedangkan beberapa yeast yang potensial menghasilkan lipase diantaranya yaitu *Candida sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida cylindracea* dan *Candida rugosa* (Traichel, 2010).

2.3 Kapang

Fungi dapat dikelompokkan menjadi tiga kelompok berdasarkan morfologinya, yaitu khamir (*yeast*), kapang (*mold*), dan cendawan (*mushroom*) (Michelle, 2012). Kapang adalah mikroorganisme multiseluler tidak berklorofil, berbentuk hifa atau miselium, eukariotik, berdinding sel dari kitin atau selulosa, menyerap nutrisi dengan cara absorpsi. Sebagian besar tubuh kapang terdiri atas

benang-benang yang disebut hifa (Nugraha, 2012). Hifa merupakan suatu struktur dari kapang yang berbentuk seperti tabung dan menyerupai seuntai benang panjang (Michelle, 2012). Hifa terdiri dari dinding tubular yang tipis, umumnya transparan dan berisi lapisan protoplasma (Webster, 2007). Kumpulan hifa yang bercabang-cabang membentuk suatu jala yang disebut miselium. Kumpulan miselium yang semakin banyak dan menebal akan membentuk suatu koloni dan dapat dilihat dengan kasat mata (Michelle, 2012).

Kapang dapat dibedakan menjadi kapang tingkat tinggi (*higher fungi*) dan kapang tingkat rendah (*lower fungi*). Kapang tingkat tinggi memiliki satu inti (monositik), memiliki septa hingga berkompartemen, reproduksi aseksual berupa spora, dan reproduksi seksual berupa konidia. Contoh dari kapang tingkat tinggi yaitu *penicillium chrysogenum* dan *Aspergillus oryzae*. Kapang tingkat rendah memiliki ciri coenositik, tidak berseptum, tidak berkompartemen, reproduksi seksual dan aseksual berupa spora. Contoh dari kapang tingkat rendah adalah *Rhizopus oryzae* (Webster, 2007).

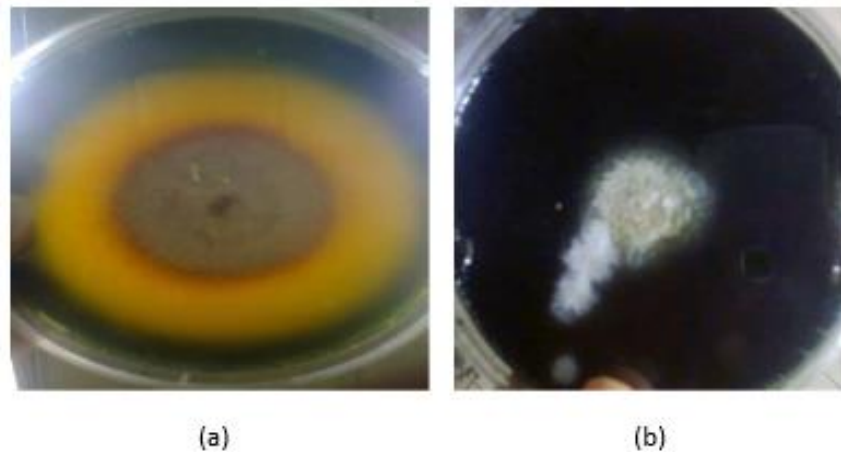
2.3.1 Kapang Penghasil Lipase

Kapang penghasil lipase komersial paling penting berasal dari genus *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Geotrichum sp.*, *Mucor sp.*, dan *Rhizomucor sp.* (Treichel *et al.*, 2010). Produksi enzim lipase oleh kapang memiliki aktivitas yang bervariasi, dipengaruhi oleh galus, komposisi media pertumbuhan, kondisi kultur, pH, suhu, jenis sumber nitrogen, dan sumber karbonnya (Nur, 2015).

Seleksi kapang penghasil lipase dapat dilakukan pada media PDA yang mengandung indikator *Bromocressol Green* dan tween 80 (Adio *et al.*, 2015). Penambahan tween 80 merupakan sumber lemak yang akan dihidrolisis oleh enzim lipase yang dihasilkan oleh kapang. Sedangkan penambahan *Bromocressol Green* digunakan sebagai indikator terjadinya hidrolisis lemak menjadi asam lemak bebas. Pada kapang yang positif menghasilkan lipase, media di sekitar kapang berubah warna dari hijau menjadi kuning. Hal ini menandakan terjadinya perubahan pH media, karena kapang memproduksi enzim lipase yang mengubah Tween 80 menjadi asam lemak bebas dan gliserol. Adio *et al.* (2015) menyatakan bahwa adanya asam lemak bebas dapat mengubah pH media yang mengakibatkan

perubahan gugus kromofor pada indikator *Bromocressol Green*, sehingga warnanya berubah dari hijau menjadi kuning.

Zona yang berada di sekitar koloni dan berwarna kuning merupakan zona hidrolisis seperti tersaji pada Gambar 2.5



Gambar 2.5 (a) Zona hidrolisis pada kapang yang positif menghasilkan lipase
(b) Hasil negatif (tidak ada zona hidrolisis)

Zona hidrolisis dihitung pada hari ke-3 setelah inokulasi. Zona diukur menggunakan kertas dan dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Luas zona hidrolisis} = \frac{\text{Massa kertas cetakan (g)}}{\text{Massa } 1 \text{ cm}^2 \text{ kertas}} \times 1 \text{ cm}^2$$

(Melliawati *et al.*, 2006).

2.3.2 Kapang Tempe

Tempe merupakan makanan fermentasi tradisional paling populer di Indonesia. Tempe terbuat dari kedelai yang telah direbus kemudian dirangkai oleh jalinan-jalinan hifa halus seperti kapas dari kapang *Rhizopus sp.* (Nur, 2015). Faktor yang mempengaruhi hasil pada pembuatan tempe yaitu kualitas bahan baku yang dipakai, mikroorganisme (kapang tempe), dan keadaan lingkungan tumbuh (suhu, pH, dan kelembaban). Pada proses fermentasi tempe, substrat yang digunakan adalah biji kedelai yang telah direbus dan mikroorganisme yang melakukan fermentasi adalah kapang.

Kualitas tempe sangat dipengaruhi oleh starter yang digunakan untuk inokulasi. Starter tempe adalah bahan yang mengandung biakan jamur tempe (Nur, 2015). Jamur pada tempe terdiri dari berbagai jenis kapang. Kapang-kapang yang

terdapat pada tempe diantaranya yaitu *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus oligosporus*, *Mucor indicus*, *Mucor circinelloides*, *Geotrichum candidum*, *Aureobasidium pullulans*, *Alternaria alternate*, dan *Cladosporium oxysporum* (Nur, 2005). Ghosh & Ray (2011) menyatakan bahwa kapang yang paling dominan pada tempe merupakan kapang *Rhizopus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus*. *Rhizopus oryzae* merupakan fungi heterotalus yang bersifat saprofit dan termasuk dalam grup *zygomycete*. Strain *Rhizopus oryzae* biasanya diisolasi dari komponen aktif pada produksi makanan fermentasi (Ghosh & Ray, 2011).

2.4 Solid State Fermentation (SSF)

Metode *Solid State Fermentation* (SSF) merupakan proses fermentasi dengan menumbuhkan mikroorganisme pada media atau matriks padat. Media yang digunakan dapat berasal dari zat alami maupun sintetis (Sanchez *et al.*, 2015). Metode SSF sangat potensial untuk dikembangkan pada industri produksi enzim karena dapat menggunakan limbah agroindustri sebagai medianya sehingga lebih murah.

Metode SSF sangat berpotensi untuk dikembangkan karena menghasilkan produk dengan efisiensi yang lebih tinggi daripada metode SmF (*Submerged Fermentation*) (Kumar *et al.*, 2014). Sanchez *et al.*, (2015) menyatakan bahwa metode SSF memiliki keunggulan dapat menghasilkan produk yang lebih stabil, oksigen yang terdistribusi pada media lebih banyak, dan lebih murah dalam pengoperasian, selain itu menurut Singhania *et al.*, (2009) metode SSF juga memungkinkan sedikit kontaminasi karena kadar air pada media yang lebih rendah.

2.4.1 Substrat Fermentasi

Produksi lipase dengan menggunakan metode SSF sangat dipengaruhi oleh substrat yang digunakan. Hal ini dikarenakan lipase yang dihasilkan oleh mikroba sebagian besar merupakan lipase ekstraseluler (Traechel *et al.*, 2010). Limbah agroindustri banyak digunakan dalam penelitian sebagai media fermentasi dikarenakan memiliki berbagai manfaat yang potensial. Penggunaan limbah agroindustri juga menjadi alternatif solusi mengurangi pencemaran. Limbah agroindustri efektif digunakan sebagai media fermentasi. Strain dan media pada

produksi enzim lipase yang telah digunakan pada berbagai penelitian tersaji pada Tabel 2.3

Tabel 2.2 Strain dan Media pada Produksi Enzim Lipase

<i>Strain</i>	Media	Aktivitas lipase
<i>Yeast</i>		
<i>Candida rugosa</i>	Ampas kelapa	88 U/g
<i>Yarrowia lipolitica</i>	Ampas kacang tanah	19 U/g
<i>Kapang</i>		
<i>Aspergillus niger</i>	Dedak gandum	650 U/g
<i>Aspergillus cameu</i>	Dedak padi	13 U/g
<i>Rhizopus oryzae</i>	Ampas tebu	215 U/g
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Ampas biji jarak	88 U/g
<i>Penicillium sp.</i>	Ampas kedelai	140 U/g
<i>Rhizomucor pusillus</i>	Ampas tebu	5 U/g
<i>Rhizomucor rhizopodiformis</i>	Ampas tebu	3 U/g

Sumber : Kumar *et al.*, (2013)

2.4.2 Ampas Kelapa

Kelapa (*Cocos nusifera* linn) termasuk dalam tumbuhan keluarga *Aracaceae*, yang banyak tumbuh pada daerah tropis dengan curah hujan yang cukup. Indonesia merupakan salah satu negara produsen kelapa dunia (Ghosh *et al.*, 2014). Berdasarkan data Kementerian Pertanian pada tahun 2015 jumlah produksi kelapa di Indonesia 2.920.665 ton. Tingginya produksi kelapa juga menunjukkan tingginya limbah agroindustri yang dihasilkan.

Ampas kelapa merupakan hasil samping dari pembuatan santan, daging kelapa yang diolah menjadi minyak kelapa dari pengolahan cara basah akan diperoleh hasil samping ampas kelapa (Angelia, 2016). Kurniawan *et al.*, (2016) menyatakan bahwa limbah ampas kelapa mengandung berbagai nutrisi seperti protein 5,78%, lemak 38,24%, dan serat kasar 15,07%. Kandungan nutrisi ampas kelapa yang cukup tinggi, sehingga memungkinkan untuk digunakan sebagai media fermentasi pada produksi enzim. Kandungan lemak pada ampas kelapa juga dapat berperan sebagai zat induksi pada fermentasi mikroba penghasil lipase sehingga menghasilkan enzim lipase yang lebih banyak.

2.5 Spektrofotometer UV-Vis

Metode spektrometri merupakan salah satu cabang sains yang berhubungan dengan studi interaksi antara radiasi elektromagnetik dan materi (Behera *et al.*, 2012). Sanda *et al.*, (2012) menyatakan bahwa pada panjang gelombang tertentu, setiap senyawa kimia menyerap, mentransmisikan, atau memantulkan cahaya (radiasi elektromagnetik). Daerah spektrum elektromagnetik ditunjukkan pada Tabel 2.4.

Tabel 2.3 Daerah Spektrum Elektromagnetik

Daerah	Panjang gelombang (nm)
Ultraviolet	185-400
Cahaya tampak	400-700
Infra merah	700-1500

Sumber : Sanda *et al.*, (2012)

Spektrofotometri UV-Vis merupakan metode yang sering digunakan dalam analisis berbagai senyawa farmasi dan organik (Mehmood *et al.*, 2015). Metode ini melibatkan pengukuran jumlah radiasi ultraviolet maupun cahaya tampak (*visible*) yang diserap oleh zat dalam larutan. Instrumen yang mengukur rasio, fungsi rasio, atau intensitas dua berkas cahaya di daerah ultraviolet dan cahaya tampak (*visible*) disebut spektrofotometer UV-Vis.

Struktur dasar spektrofotometer terdiri dari sumber cahaya, kolimator, monokromator, selektor panjang gelombang, cuvet untuk larutan sempel, detektor fotoelektrik, dan display output. Spektrometer dapat menghasilkan cahaya terang yang diinginkan. Kolimator mentransmisikan seberkas cahaya (foton) yang melewati monokromator, kemudian dibiaskan menjadi beberapa panjang gelombang komponen. Selektor panjang gelombang akan mentransmisikan panjang gelombang yang diinginkan. Cahaya yang diinginkan melewati larutan pada cuvet, lalu fotometer mendeteksi jumlah foton yang diserap, kemudian mengirim sinyal ke galvanometer atau display digital (Sanda *et al.*, 2012).

Hukum dasar yang mengatur analisis spektrofotometri kuantitatif adalah hukum Beer-Lambert. Hukum Beer menyatakan bahwa Intensitas sinar radiasi monokromatik paralel menurun secara eksponensial dibandingkan dengan jumlah

molekul yang menyerap. Dengan kata lain, absorbansi sebanding dengan konsentrasi (Mehmoooh *et al.*, (2015). Hukum Lambert menyatakan bahwa intensitas sinar radiasi monokromatik paralel menurun secara eksponensial saat melewati media ketebalan homogen (Behera *et al.*, 2012). Kombinasi kedua hukum ini menghasilkan hukum Beer-Lambert. Hukum Beer-Lambert menyatakan bahwa saat seberkas cahaya monokromatik dilewatkan melalui sel transparan yang mengandung larutan tertentu, intensitasnya akan menurun secara eksponensial (Mehmoooh *et al.*, (2015). Secara matematis, hukum Beer-Lambert dirumuskan sebagai berikut:

$$A = a b c \quad (\text{Behera } et al., 2012)$$

Dimana A = absorbansi atau densitas optik

a = koefisien absorptifitas

b = panjang jalur radiasi melalui sempel (cm) / panjang kuvet

c = konsentrasi zat terlarut dalam larutan

Metode spektrofotometri banyak digunakan untuk analisis kuantitatif di berbagai bidang (Sanda *et al.*, 2012) salah satunya adalah untuk menentukan kadar protein pada suatu sampel. Kadar protein dapat diketahui dengan penambahan suatu reagen berwarna dengan intensitas warna yang terbentuk sebanding dengan konsentrasi protein pada sampel (Maknunah, 2015). Terdapat berbagai metode penentuan kadar protein menggunakan spektrofotometer UV-Vis, diantaranya yaitu metode Biuret, Lowry, dan Bradford. Maknunah (2015) menyatakan bahwa metode Biuret merupakan metode yang cukup efisien, murah, dan lebih sederhana dibandingkan metode Lowry dan Bradford.

Analisis Biuret didasarkan pada reaksi antara ion Cu^{2+} dan ikatan peptida dalam suasana basa. Ion Cu^{2+} dari pereaksi Biuret dalam suasana basa akan bereaksi dengan gugus N pada ikatan peptida yang menyusun protein, dan membentuk senyawa kompleks. Warna kompleks ungu yang terbentuk menunjukkan adanya protein. Intensitas warna yang dihasilkan merupakan ukuran jumlah ikatan peptida yang ada dalam protein. Reaksi reagen Biuret dengan protein ini menghasilkan spektrum cahaya maksimum, yaitu pada panjang gelombang 540 nm (Maknunah, 2015).

BAB 5

PENUTUP

5.1. Simpulan

Berdasarkan penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan, didapat simpulan sebagai berikut:

1. Isolat kapang dari inokulum tempe mampu menghasilkan enzim lipase ditandai dengan terbentuknya zona hidrolisis pada media seleksi.
2. Waktu fermentasi optimum untuk memproduksi enzim lipase 96 jam, penurunan produksi waktu fermentasi yang lebih sebentar belum optimum karena kapang yang tumbuh belum maksimal, sedangkan waktu fermentasi yang terlalu lama terjadi karena nutrisi dan oksigen pada media berkurang.
3. Karakteristik *crude enzyme* yang dihasilkan optimum pada pH 7,5 suhu 35°C dan waktu inkubasi 30 menit dengan aktivitas enzim 12,0 U/mL dan aktivitas spesifik 15,9 U/mg. Energi aktivasi hidrolisis minyak zaitun oleh enzim lipase diperoleh 43,46 kJ/mol dan ΔH pada suhu 35°C 40,28 kJ/mol.

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian ini disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut sebagai berikut:

1. Dilakukan penelitian terhadap kemampuan isolat kapang dalam menghasilkan enzim lipase selain kapang tempe.
2. Dilakukan penelitian lebih lanjut untuk memurnikan enzim yang diperoleh untuk meningkatkan aktivitas atau kinerja enzim.

DAFTAR PUSTAKA

- Adak, S., & R. Banerjee. 2013. Biochemical Characterisation of a Newly Isolated Low Molecular Weight Lipase from *Rhizopus oryzae* NRRL 3562. *Enzyme Engineering*. 2(2): 1-7.
- Adio, O. Q., S. O. Kareem; M. B. Osho, & A. M. Omemu. 2015. Production Of Lipases In Solid-State Fermentation By *Aspergillus niger* F7-02 With Agricultural Residues. *Journal Microbiol Biotech Food Science*. 4 (6): 509-512.
- Aljamali, N. M. 2015. Review In (NMR and UV-VIS) Spectra. *International Journal of Medical Research and Pharmaceutical Sciences*. 2(1): 28-36.
- Angelia, I. O. 2016. Analisis Kadar Lemak Pada Tepung Ampas Kelapa. *Journal Technologies*. 4(1): 19 – 23.
- Anggraini, A. & Yulianita. 2015. Pengaruh Suhu dan Lama Hidrolisis Enzim Papain Terhadap Sifat Kimia, Fisik dan Organoleptik Sari Edamane. *Jurnal Pangan dan argoindustri*. 3(3): 1015-1025.
- Aybaster, O., & C. Demir. 2010. Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on styrene–divinylbenzene copolymer using response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 63(1): 170–178.
- Ayinla, Z. A., A. N. Ademakinwa, & F. K. Agboola. 2017. Studies on the Optimization of Lipase Production by *Rhizopus* sp. ZAC3 Isolated from the Contaminated Soil of a Palm Oil Processing Shed. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 5(2): 030-037.
- Behera, S., S. Ghanty, F. Ahmad, S. Santra, & S. Banerjee. 2012. UV-Visible Spectrophotometric Method Development and Validation of Assay of Paracetamol Tablet Formulation. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*. 3(6): 1-6.
- Chang, R. 2005. *Physical Chemistry for the Biosciences*. Sausalito: University Science Books.
- Copeland, R. A. 2000. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. New York: VCH Publishers.
- Damaso, M., C. Triches, M. A. Passianoto, S. C. de Freitas, D. M. G. Freire, R. C. A. Lago, & S. Couri. 2008. Utilization Of Agroindustrial Residues For Lipase Production By Solid-State Fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 3(9): 676-681.

- Direktorat Jendral Perkebunan. 2017. *Statistik Perkebunan Indonesia: Kelapa*. Jakarta: Sekretarian Jenderal Perkebunan.
- Ghosh, P. K., P. Bhattacharjee, S. Mitra, & M. P. Sarkar. 2014. Physicochemical and Phytochemical Analyses of Copra and Oil of *Cocos nucifera* L. *International Journal of Food Science*. 2014(11): 1-9.
- Ghosh, B., & R. R. Ray. 2011. Current Commercial Perspective of *Rhizopus oryzae*: A Review. *Journal of Applied Science*. 11(14): 2470-2486.
- Ghori, M. I., M. J. Iqbal., & A. Hameed. 2011. Characterization of A Novel Lipase from *Bacillus* sp. Isolated from Tannery Wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*. 4(2): 22-29.
- Hefnawy, M. E. E., & M. Sakran. 2014. Characteristics of Lipase in Dormant Seeds Catalyzed Hydrolysis of Olive Oil in SDS-Olive Oil Reversed Microemulsions. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. 92(1): 1335-1339.
- Iftikhar, T., M. Niaz, M. A. Zia, I. U. Haq. 2010. Production Of Extracellular Lipases By *Rhizopus Oligosporus* In A Stirred Fermentor. *Brazilian Journal of Microbiology*: 41(1). 1124-1132.
- Iftikhar, T., M. Niaz, R. Jabeen, & I. U. Haq. 2011. Purification And Characterization Of Extracellular Lipases. *Pakistan Journal of Botani*, 43(3): 1541-1545.
- Janairo, G., M. Linley., L. Yap., N. L. Lazaro., J. Robles. 2011. Determination of the Sensitivity range of Biuret Test for Undergraduate Biochemistry Experiments. *Journal of Science and Technology*. 5(6): 77-83.
- Koblitz, M. G. B., & G. M. Pastore. 2006. Purification And Biochemical Characterization Of An Extracellular Lipase Produced By A New Strain Of *Rhizopus* sp. *Lavras* 30(3): 494-502.
- Kumar, D. S., & S. Ray. 2014. Fungal Lipase Production by Solid State Fermentation-An Overview. *Analytical & Bioanalytical Techniques*. 6(1): 1-10.
- Kurnia, D. R. D. 2010. *Studi Aktivitas Enzim Lipase dari Aspergillus niger sebagai Biokatalis pada Proses Gliserolisis untuk Menghasilkan Monoasilgliserol*. Tesis. Semarang: Universitas Diponegoro.

- Kurniawan, H., R. Utomo, & L. M. Yusiati. 2015. Kualitas Nutrisi Ampas Kelapa (*Cocos nucifera* L.) Fermentasi Menggunakan *Aspergillus niger*. *Buletin Peternakan*. 40 (1): 26-33.
- Lehninger, A. L. 2005. *Principles of Biochemistry*. W H Freeman & CO.
- Liu, Y., & J. Y. Chen. 2016. Enzyme Immobilization on Cellulose Matrixes. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 31(6): 553-567.
- Lukose, R. M. 2013. The Chemical Composition of Tender Coconut (*Cocos Nucifera* L.) Water and Coconut Meat and Their Biological Effect in Human Body. *International Journal of Green and Herbal Chemistry*. 2 (3): 723-729.
- Maknunah, Z. 2015. Karakterisasi Profil Protein Gelatin Komersial Menggunakan SDS-Page (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polycrallamide Gel Electrophoresis*) dan Analisis Kadar Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Melliawati, R., R. S. Suherman, & B. Subardjo. 2006. Pengkajian Kapang Endofit dari Taman Nasional Gunung Halimun sebagai Penghasil Glukoamilase. *Berk. Penel. Hayati*. 12(1): 19-25.
- Michelle. 2012. Isolasi, Identifikasi, dan Pengujian Kemampuan Kapang Selulolitik dari Manuskrip Kuno Berbahan Dalulang Asal Perpustakaan Fakultas Ilmu Pengetahuan Budaya Universitas Indonesia. *Skripsi*. Depok: Universitas Indonesia.
- Nugraha, A. N. 2012. Isolasi dan Seleksi Biodegradasi Limbah Daduk oleh Kapang Selulolitik dari Perkebunan Tebu. *Skripsi*. Surabaya: Universitas Airlangga
- Nur, N. 2005. Telaah Aktivitas Bakteri Penghasil Lipase Yang Berasosiasi Dengan Tempe. *Tesis*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Phuah, E. T., O. M. Lai, T. S. Y. Choong, C. P. Tan, & S. K. Lo. 2012. Kinetic Study on Partial Hydrolysis of Palm Oil Catalyzed by *Rhizomucor meihei* Lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzyme*. 78(1): 91-97.
- Salihu, A., M. Bala., M. Z. Alam. 2016. Lipase Production by *Aspergillus niger* Using Sheanut Cake: An Optimization Study. *Journal of Talibah University for Science*. 10(1): 850-859.
- Sánchez, L. B. R., M. C. C. Quitio, M. C. J. Ricardo, J. Cordova; & P. Fickers. 2015. Fungal Lipase Production by Solid-State Fermentation. *Bioprocessing & Biotechniques*. 5(2): 1-9.

- Sanda, F. M., M. E. Victor, T. A. Monica, C. Alina. 2012. Spectrophotometric Measurements Techniques For Fermentation Process. *Internal report European regional defelopment func.*
- Singhania, R. R., A. K. Patel, C. R. Soccol, & A. Pandey. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*.4(4): 13-18.
- Sudha, V., R. Govindaraj, K. Baskar, N. A. A. Dhabhi; Veeramuthu Duraipandiyan. 2016. Biological properties of Endophytic Fungi. *Biological and Applied Sciences*. 5(9): 5-12.
- Suzuki, H. 2015. *How Enzymes Works: From Structure To Function*. Tokyo: CRC Press.
- Thakur, S. 2012. Lipases, its sources, Properties and Applications: A Review. *International Journal of Scientific & Engineering Research*. 3(7): 1-29.
- Treichel, H., D. D. Oliveira, M. A. Mazutti, M. D. Luccio, & J. V. Oliveira. 2010. A Review on Microbial Lipases Production. *Food Bioprocess Technology*. 3(1): 182–196.
- Uyanik, A., N. Sen., & M. Yilmaz. 2011. Improvement of Catalytic Activity of Lipase from *Candida rugosa* Via Sol-gel Encapsulation in the Presence of Calix(aza)crown. *Bioresource Technology*. 10(2): 4313-4318.
- Vecchia, R. D., D. Sebraõ, M. D. M. Nascimento, & V. Soldi. 2005. Carboxymethylcellulose and Poly(vinyl alcohol) Used as a Film Support for Lipases Immobilization. *Process Biochemistry*. 40(1): 2677-2682.
- Villeneuve, P., J. M. Muderhwa, J. Graille, & M. J. Haas. 2000. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 9(1): 133-148.
- Webster, J. 2007. *Introduction to Fungi*. Cambridge: Cambridge University Press.