

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI LIPASE TERMOSTABIL  
DARI BAKTERI TERMOFILIK (ISOLAT AL96)**

**TESIS**

**Karya tulis sebagai salah satu syarat  
untuk memperoleh gelar Magister Pengajaran Kimia dari  
Institut Teknologi Bandung**

**Oleh  
Septiani  
NIM: 90514007  
(Program Studi Magister Pengajaran Kimia)**



**INSTITUT TEKNOLOGI BANDUNG**

**Januari 2017**

**SURAT PERNYATAAN PELIMPAHAN HAK CIPTA DAN  
KEASLIAN HASIL KARYA TULIS (TESIS)**

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Septiani

NIM : 90514007

Menyatakan bahwa penulisan tesis dengan judul **Isolasi dan Karakterisasi Lipase Termostabil dari Bakteri Termofilik (Isolat A196)** di bawah bimbingan **Prof. Akhmaloka, Ph.D** adalah benar-benar hasil karya tulis asli berdasarkan data hasil eksperimen/perhitungan/pemodelan penulisan selama melakukan tugas akhir di Program Studi Magister Pengajaran Kimia, FMIPA, ITB.

Dengan ini penulis menyerahkan/melimpahkan Hak Cipta dari karya tulis tesis tersebut kepada Program Studi Pengajaran Kimia, FMIPA, ITB.

Bandung, 23 Januari 2017



Septiani

## **ABSTRAK**

### **ISOLASI DAN KARAKTERISASI LIPASE TERMOSTABIL DARI BAKTERI TERMOFILIK (ISOLAT AL96)**

Oleh  
**SEPTIANI**  
**NIM: 90514007**  
**(Program Studi Magister Pengajaran Kimia)**

Lipase termasuk golongan enzim hidrolase yaitu mengkatalisis reaksi hidrolisis ester pada lemak atau trigliserida menghasilkan asam lemak dan gliserol. Enzim ini mempunyai peran penting dalam bioteknologi antara lain dalam industri obat-obatan, industri kimia, industri pangan, detergen, dan industri biodiesel. Dalam bidang industri, seringkali digunakan kondisi dengan temperatur dan pH tinggi. Oleh sebab itu, sangat diperlukan lipase yang mempunyai sifat termostabil dan stabil pada pH tinggi. Lipase dapat disolasi dari hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme. Lipase termostabil dapat diperoleh dari mikroorganisme atau bakteri termofilik, beberapa diantaranya dapat diisolasi dari kompos atau sumber air panas. Salah satu isolat yaitu AL96 mempunyai karakter termostabil dan toleran alkohol. Lipase dari isolat AL96 belum terkarakterisasi dengan baik, oleh sebab itu dalam penelitian ini dilakukan karakterisasi lipase isolat AL96. Untuk menghasilkan lipase dalam jumlah besar dan memiliki aktivitas yang tinggi, perlu dipelajari faktor-faktor penting seperti kondisi pertumbuhan, metode isolasi dan pemurnian yang dilakukan agar diperoleh lipase dengan tingkat kemurnian tinggi. Selain itu, karakterisasi lipase meliputi optimasi suhu dan pH dilakukan agar diketahui aktivitas optimum lipase.

Pada penelitian ini telah dilakukan isolasi dan karakterisasi lipase isolat AL96. Penelitian dimulai dengan pembuatan kurva pertumbuhan bakteri dan kurva aktivitas lipase untuk mendapatkan waktu inkubasi terbaik dari isolat AL96 dapat menghasilkan lipase. Pengamatan aktivitas lipolitik enzim dilakukan bersamaan dengan pertumbuhan sel. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa lipase optimum pada inkubasi 17 jam. Isolasi lipase dilakukan dengan menumbuhkan isolat AL96 dalam 50 mL media starter, kemudian 1 mL kultur dimasukkan dalam 100 mL media baru dan diinkubasi selama  $\pm$  17 jam hingga mencapai OD sekitar 1,069. Ekstrak kasar enzim diperoleh dengan melakukan panen sel dengan cara sentrifugasi selama 45 menit pada 4000 g. Ekstrak kasar enzim terdapat pada supernatan karena enzim ini termasuk enzim ekstraseluler. Ekstrak kasar lipase yang diperoleh kemudian dimurnikan dengan metode fraksinasi menggunakan amonium sulfat. Hasil penentuan aktivitas spesifik menunjukkan adanya peningkatan aktivitas lipase setelah dilakukan fraksinasi amonium sulfat dan

dialisis. Peningkatan aktivitas spesifik tersebut menunjukkan adanya peningkatan kemurnian lipase.

Hasil pemurnian parsial dengan menggunakan amonium sulfat terhadap ekstrak kasar enzim dari isolat AL96 menunjukkan bahwa fraksi 50-70% mempunyai aktivitas paling tinggi, sebesar 0,018 U/mg protein, diikuti oleh fraksi 30-50% dengan aktivitas spesifik sebesar 0,015 U/mg protein. Hasil SDS-PAGE dan zymogram menunjukkan pita lipase dengan ukuran sekitar 85 kDa pada ketiga fraksi yakni fraksi 50-70%, fraksi 30-50%, fraksi 0-30%. Analisis lebih lanjut merupakan lipase pada fraksi 30-50% memiliki temperatur optimum pada suhu 65 °C dan fraksi 50-70% memiliki temperatur optimum pada suhu 75 °C dan lipase ini dapat dikategorikan dalam lipase termostabil. Karakterisasi terhadap pH optimum untuk fraksi 50-70% dan fraksi 30-50% menunjukkan bahwa kedua fraksi memiliki pH optimum 10.

Kata kunci: Lipase termostabil, mikroorganisme termofilik, fraksinasi amonium sulfat.

## **ABSTRACT**

### **ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THERMOSTABLE LIPASES FROM THERMOPHILIC BACTERIA (ISOLATE AL96)**

by

**SEPTIANI**

**NIM: 90514007**

**(Master of Teaching Chemistry Study Program)**

Lipase belongs to hydrolase enzyme that catalyzes hydrolysis reaction of esters in fats or triglycerides to produce fatty acids and glycerol. This enzyme plays an important role in biotechnology such as in pharmaceutical industry, chemical industry, food industry, detergents, and biodiesel industry. In industry, it often used in condition with high temperature and pH. Therefore, it is necessary lipase enzyme which has thermostable properties and stable at high pH. Lipase can be isolated from animals, plants, and microorganisms. Thermostable lipases can be obtained from thermophilic microorganisms or bacteria, some of which can be isolated from compost or hot springs. One of the isolates namely AL96 has a thermostable properties and alcohol tolerant. Lipase from isolate AL96 is not well characterized yet, therefore this study carries out the characterization of isolates lipase AL96. To produce lipase enzyme in great quantities and have high activity, it needs to examine the important factors such as growth conditions, isolation method and purification which performed in order to obtain lipase enzyme with high purity level. In addition, the characterization of enzymes includes as temperature and pH optimization in order to know the enzyme optimum activity.

In this study it has done the isolation and characterization of lipase from isolate AL96. This study was started with construction of bacterial growth curve and lipase activity curve to obtain the best incubation time for isolates AL96 in producing lipases. Observations of lipolytic enzyme activity performed in conjunction with the cell growth. The results showed that the optimum lipase enzyme produced after 17 hours incubation. Isolation of lipase was done by growing isolate AL96 in 50 mL starter media then culture 1 mL put in 100 mL of new media and incubated for  $\pm$  17 hours until the OD value reached approximately 1.069. Crude extract of enzymes obtained through harvesting cells cultured bacteria by centrifugation for 45 min at 4000 g. Crude extract of enzymes was in the supernatant because enzymes has extracellular properties. Crude extract of thermostable lipase enzyme purified by using ammonium sulfate fractionation

method. The result of determination for specific activity showed that the activity of lipase increased after ammonium sulfate fractionation and dialysis. Increasing of specific activity showed that increasing of lipase purity.

The result of partially purification by using ammonium sulfate against to crude extract of enzymes from isolate AL96 showed that the fraction 50-70% has the highest activity as much 0,018 U/mg protein, followed by the fraction of 30-50% with the specific activity as much 0,015 U/mg protein. The result of SDS-PAGE and zymogram indicated that lipase band with size 85 kDa for three fractions namely fraction 50-70%, 30-50%, 0-30%. Lipases for fraction 30-50% have the optimum temperature at 65 °C and for fraction 50-70% have an optimum temperature at 75 °C and this lipases can be categorized as thermostable lipases. Characterization of the pH optimum in fraction of 50-70% and 30-50% indicated that both fractions have optimum in pH 10.

Keywords: Lipase thermostable, thermophilic microorganisms, ammonium sulfate fractionation.

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI LIPASE TERMOSTABIL  
DARI BAKTERI TERMOFILIK (ISOLAT AL96)**

Oleh  
**Septiani**  
**NIM: 90514007**  
**(Program Studi Magister Pengajaran Kimia)**

Institut Teknologi Bandung

Menyetujui  
Pembimbing

Tanggal 23 Januari 2017



---

(Prof. Akhmaloka, Ph.D)

## PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

Tesis Magister Pengajaran yang tidak dipublikasikan terdaftar dan tersedia di Perpustakaan Institut Teknologi Bandung, dan terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada pengarang dengan mengikuti aturan HaKI yang berlaku di Institut Teknologi Bandung. Referensi kepustakaan diperkenankan dicatat, tetapi pengutipan atau peringkasan hanya dapat dilakukan seizin pengarang dan harus disertai dengan kaidah ilmiah untuk menyebutkan sumbernya.

Sitasi hasil penelitian Tesis ini dapat dituliskan dalam bahasa Indonesia sebagai berikut:

Septiani. (2017): *Isolasi dan Karakterisasi Lipase Termotabil Dari Bakteri Termofilik (Isolat AL96)*, Tesis Program Magister Pengajaran, Institut Teknologi Bandung.

dan dalam bahasa Inggris sebagai berikut:

Septiani. (2017): *Isolation and Characterization of Thermostable Lipases from Thermophilic Bacteria (Isolate AL96)*, Master Program in Chemistry Teaching, Institut Teknologi Bandung.

Memperbanyak atau menerbitkan sebagian atau seluruh tesis haruslah seizin Dekan Sekolah Pascasarjana, Institut Teknologi Bandung.



"Maka perkataan mereka janganlah menyedihkan kamu ; sesungguhnya Kami mengetahui apa yang mereka rahasiakan dan apa yang mereka nyatakan."

(Quran Surat yasin: 76)

"Apabila manusia telah meninggal dunia maka terputuslah semua amalannya, kecuali tiga amalan : shadaqah jariyah, ilmu yang bermanfaat dan anak yang shalih yang mendoakan dia."

(Hadist Riwayat Muslim)

Dipersembahkan untuk Almh. Ibunda dan Alm. Ayahanda tercinta yang dalam setiap doanya disertainya namaku.



## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT tuhan semesta alam atas rahmat dan karunia yang diberikan. Teriring salawat dan salam kepada Baginda Nabi Muhammad shallallahu'alaihi wassalam yang telah membimbing umatnya hingga dien- Nya tetap tegak hingga sekarang.

Tesis Ini Berjudul “Isolasi dan Karakterisasi Lipase Termotabil Dari Bakteri Termofilik (Isolat AL96)”, diajukan untuk memenuhi syarat-syarat guna memperoleh gelar Magister Pengajaran Kimia (M.Pkim) pada Fakultas MIPA Institut Teknologi Bandung. Dalam penyelesaian tesis ini penulis mendapat bimbingan, pengarahan dan bantuan banyak pihak. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang setinggi-tingginya kepada :

1. Kedua orang tua, Ibunda Almh. Zainabon dan Ayahanda Alm. Anwar Abd serta seluruh keluarga tercinta yang selalu mendukung dan mendoakan penulis dalam menyelesaikan studi.
2. Bapak Prof. Akhmaloka, Ph.D selaku pembimbing yang telah banyak berkenan meluangkan waktu dan pemikiran untuk membimbing penulis sehingga tesis ini dapat terselesaikan.
3. Ibu Dr. Deana Wahyuningrum selaku ketua prodi Magister Pengajaran Kimia dan Bapak/Ibu Dosen FMIPA Kimia ITB, yang telah membekali penulis dengan berbagai ilmu pengetahuan khususnya ilmu kimia, dari program Pra Magister sampai program Magister.
4. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi (Dirjen Dikti) atas bantuan Beasiswa Sains dan Teknologi (Saintek) selama pendidikan program Pra Magister dan Beasiswa Pendidikan Pascasarjana Dalam Negeri (BPP-DN) selama program Magister yang diberikan kepada penulis.
5. Kepada kak Syifa, kak Anita, bu Harti, kak Windy, Dimas, Ilma, Hasby, mbak Eni, yang telah menjadi sahabat, kakak sekaligus keluarga di laboratorium PAU lantai 5 yang sangat membantu dari awal sampai akhir penyelesaian tesis ini.

6. Kepada sahabat dan rekan-rekan seperjuangan Program Magister Pengajaran Kimia dan Magister Kimia ITB yang telah memberi semangat serta dukungan dalam menyelesaikan tesis ini.

Namun penulis menyadari tesis ini masih banyak kekurangan. Untuk itu penulis selalu mengharapkan saran dan kritikan yang sifatnya membangun untuk perbaikan pada masa yang akan datang.

Bandung, Januari 2017

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'SMAA' with a horizontal line extending from the end of the second 'A'.

Penulis

## DAFTAR ISI

ABSTRAK .....	i
ABSTRACT.....	v
PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS .....	vii
PERSEMBAHAN.....	ix
KATA PENGANTAR .....	xi
DAFTAR ISI.....	xiii
Bab I Pendahuluan .....	xvii
I.1 Latar Belakang.....	1
I.2 Rumusan Masalah.....	2
I.3 Tujuan Penelitian .....	3
I.4 Ruang lingkup .....	3
Bab II Tinjauan Pustaka .....	4
II. Mikroorganisme Termofilik.....	4
II.1 Habitat Mikroorganisme Termofilik.....	6
II.1.2 Enzim Termostabil .....	7
II.2 Lipase .....	7
II.3 Aplikasi Lipase Pada Bidang Industri .....	9
Bab III Metodologi Penelitian.....	11
III.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	11
III.2 Bahan Penelitian .....	11
III.3 Alat Penelitian.....	11
III.4 Langkah Kerja.....	11
III.4.1 Pembuatan media pertumbuhan dan media produksi .....	
III.4.2 Fraksinasi Amonium Sulfat .....	12
III.4.3 Uji Aktivitas Lipase dan Penentuan Kadar Protein .....	13
III.4.4 Elektroforesis Gel Akrilamid.....	15
III.4.5 Karakterisasi Lipase.....	17
Bab IV Hasil dan Pembahasan.....	17
IV.1 Pertumbuhan bakteri lipase.....	17
IV.2 Karakter Lipase Isolat AL96.....	18
IV.3 Penentuan Berat Molekul Lipase .....	21

IV.4 Hasil Karakterisasi .....	22
IV.4.1 Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Lipase .....	22
IV.4.2 Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Lipase .....	23
Bab V Penutup .....	25
V.1 Kesimpulan .....	25
V.2 Saran .....	26
LAMPIRAN.....	29

## DAFTAR GAMBAR

Gambar IV.1 Kurva pertumbuhan dan kurva aktivitas lipase.....	18
Gambar IV.2 Grafik perbandingan aktivitas spesifik tiap fraksi .....	21
Gambar IV.3 Elektroforegram SDS-PAGE dan zymogram .....	22
Gambar IV.4 Kurva karakterisasi temperatur terhadap aktivitas lipase .....	24
Gambar IV.5 Kurva karakterisasi pH terhadap aktivitas lipase.....	25

## DAFTAR TABEL

Tabel IV.1 Hasil fraksinasi lipase menggunakan amonium sulfat.....	20
Tabel IV.2 Hasil penentuan aktivitas spesifik Menggunakan amonium sulfat.....	21



## DAFTAR LAMPIRAN

### Lampiran A. Kurva standar

A.1 Tabel data pengukuran absorbansi standar BSA (595nm).....	32
A.2 Kurva standar BSA.....	32

### Lampiran B. Kurva standar

B.1 Tabel data pengukuran absorbansi standar PNP (405nm) .....	33
B.2 Kurva standar PNP .....	33

### Lampiran C Kurva standar

C.1 Tabel data kurva pertumbuhan dan kurva aktivitas lipase .....	34
C.2 Tabel kurva perbandingan aktivitas spesifik tiap fraksi.....	35
C.3 Tabel data kurva karakterisasi suhu fraksi 30-50% dan fraksi 50-70%	
C.3.1 Tabel data kurva karakterisasi suhu fraksi 30-50% .....	36
C.3.2 Tabel data kurva karakterisasi suhu fraksi 50-70% .....	37
C.4 Tabel data kurva karakterisasi pH fraksi 30-50% dan fraksi 50-70%	
C.4.1 Tabel data kurva karakterisasi pH fraksi 30-50% .....	38
C.4.2 Tabel data kurva karakterisasi pH fraksi 50-70% .....	38



# Bab I Pendahuluan

## I.1 Latar Belakang

Lipase merupakan enzim yang dapat larut dalam air dan berfungsi untuk mengkatalisis hidrolisis ikatan ester pada lemak dan gliserol. Enzim pada umumnya dihasilkan dari makhluk hidup, baik dari hewan, tumbuhan, maupun mikroorganisme. Lipase dari bakteri umumnya diproduksi secara ekstraselular dan dapat bekerja serta mampu bertahan pada pH dan suhu yang berbeda (Su'i, dkk, 2010). Genus yang mampu menghasilkan lipase antara lain ialah *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Geobacillus*, dan *Thermus* (Nurhanasah, 2015).

Lipase juga berperan penting dalam bidang bioteknologi khususnya lipase termostabil dari mikroba termofilik yang umumnya dapat diisolasi dari kompos dan sumber air panas. Mikroba termofilik mampu tumbuh pada suhu 42 °C - 100 °C, oleh karena itu enzim termostabil selain dimanfaatkan sebagai biokatalisator juga dibutuhkan dalam berbagai bidang industri seperti makanan, minyak dan lemak, deterjen, farmasi dan kosmetik (Sari, 2010). Untuk menghasilkan lipase dalam jumlah besar dan memiliki aktivitas yang tinggi, perlu dipelajari faktor-faktor penting seperti kondisi pertumbuhan, cara isolasi, serta cara pemurnian yang dilakukan agar diperoleh lipase dengan tingkat kemurnian tinggi. Beberapa keuntungan dilakukannya proses enzimatik pada suhu tinggi di dalam proses industri adalah berkurangnya peluang terkontaminasi dengan mikroba, peningkatan laju reaksi dari enzim termostabil serta penurunan biaya produksi (Zeikus, 2001).

Beberapa penelitian telah dilakukan melalui teknik kultivasi dalam mencari mikroorganisme termofilik penghasil lipase termostabil. Bakteri termofilik yang telah diisolasi dari beberapa sumber air panas di Indonesia, diantaranya sumber air panas Tangkuban Perahu (kawah Domas) Bandung, Jawa Barat (Baker, dkk, 2001) dan sumber air panas Cimanggu; sumber air panas kawah Papandayan,

Garut serta sumber air panas kawah Hujan, Kamojang, Garut (Akhmaloka, dkk, 2006). Dalam penelitian tersebut diketahui bahwa beberapa mikroorganisme yang teridentifikasi mampu menghasilkan lipase termostabil (Widhiastuty, dkk, 2009). Selain dari sumber air panas juga telah dilakukan isolasi mikroorganisme dari kompos dan diketahui mikroorganisme yang diperoleh mampu menghasilkan lipase termostabil (Madayanti, dkk, 2008).

Di Laboratorium Penelitian Biokimia, Institut Teknologi Bandung telah diisolasi bakteri isolat AL96, yang memiliki aktivitas lipolitik namun enzim ini belum terkarakterisasi dengan baik oleh karena itu telah dilakukan pemurnian untuk memperoleh lipase termostabil dengan karakter yang lebih spesifik. Umumnya pemurnian dilakukan dengan cara fraksinasi. Proses fraksinasi bertujuan untuk mengendapkan protein pada titik isoelektriknya, bisa dilakukan dengan menggunakan amonium sulfat.

Prinsip pengendapan dengan amonium sulfat berdasarkan pada kelarutan protein yang merupakan interaksi antara gugus polar dengan molekul air, interaksi ionik protein dengan garam dan daya tolak menolak protein yang bermuatan sama. Amonium sulfat umum digunakan karena memiliki beberapa keuntungan diantaranya : memiliki daya larut yang tinggi dalam air, tidak mengandung zat yang bersifat toksik, protein terlindungi dari denaturasi dan membatasi pertumbuhan bakteri serta relatif tidak mahal (Scopes, 1987).

## **I.2 Rumusan Masalah**

Penelitian sebelumnya di Laboratorium Biokimia sudah mendapatkan mikroorganisme termofilik yang mempunyai aktivitas lipolitik. Walaupun demikian lipase yang diperoleh belum terkarakterisasi dengan baik sehingga dalam penelitian akan dilakukan :

1. Produksi enzim dalam jumlah banyak.
2. Pemurnian dan karakterisasi enzim yang diperoleh.

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan lipase ekstraseluler dari isolat AL96, serta mengetahui karakter lipase isolat AL96.

### **1.4 Ruang lingkup**

Pada penelitian ini penentuan kandungan protein akan dilakukan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Syihab (2015). Setelah mendapatkan enzim kasar, selanjutnya enzim kasar akan dimurnikan dengan fraksinasi amonium sulfat sehingga diperoleh fraksi dengan aktivitas spesifik tertinggi, selanjutnya akan dilakukan karakterisasi meliputi suhu optimum dan pH optimum dari lipase termostabil.

## **Bab II Tinjauan Pustaka**

### **II. Mikroorganisme Termofilik**

Lipase termostabil dihasilkan oleh mikroorganisme termofilik, khususnya bakteri termofilik. Bakteri ini mampu tumbuh pada habitat dengan suhu tinggi seperti sumber air panas di sekitar gunung berapi, dan kompos juga merupakan habitat potensial bakteri termofilik penghasil enzim termostabil (Susanto, dkk, 2006). Mikroorganisme dapat dibedakan berdasarkan berbagai morfologi dan ukuran sel, metabolisme, pembelahan sel, adaptasi terhadap lingkungan yang ekstrim dan struktur organel sel (Madigan dkk., 1997).

Mikroorganisme ekstrimofil mampu tumbuh pada lingkungan ekstrim dengan suhu tinggi, kadar oksigen rendah dan mengandung pelarut organik. Mikroorganisme ekstrimofil dapat dibedakan lagi menjadi mikroorganisme yang bersifat termofilik yaitu yang mampu tumbuh pada suhu tinggi, asidofilik yaitu mikroorganisme tumbuh pada pH rendah (asam), alkalifilik yaitu mikroorganisme tumbuh pada pH tinggi (basa), psikrofilik yaitu mikroorganisme yang tumbuh pada suhu rendah, dan halofilik yaitu mikroorganisme tumbuh pada lingkungan kadar garam yang tinggi (Edward., 1990).

Berdasarkan suhu lingkungan di mana mikroorganisme hidup dibagi dalam 4 kelompok, yaitu psikrofil, mesofil, termofil serta hipertermofil. Kelompok bakteri termofil termasuk dalam kelompok Archaeobacteria yang secara umum struktur selnya memiliki beberapa kelebihan dibanding kelompok bakteri lainnya. Kelompok ini umumnya memiliki daya adaptasi yang tinggi terhadap kondisi lingkungan yang bersifat ekstrim, seperti temperatur, kadar garam, pH, tekanan dan oksigen dimana mikroorganisme lain tidak dapat mempertahankan aktivitas hidupnya. Mikroorganisme termofilik dapat bertahan hidup pada lingkungan yang ekstrim karena struktur selnya yang mendukung kehidupan mikroorganisme tersebut di lingkungan yang ekstrim (Primiadi, dkk, 2014).

Lipase atau disebut juga triasilgliserol hidrolase, merupakan enzim yang penting dalam bidang bioteknologi. Lipase banyak dihasilkan oleh bakteri berperan penting dari segi komersial. Beberapa genus bakteri penghasil lipase antara lain adalah *Bacillus*, *Pseudomonas* dan *Burkholderia*. Lipase biasanya dihasilkan pada medium yang mengandung karbon lipid, seperti minyak, asam lemak, gliserol, tween dengan adanya sumber nitrogen organik. Enzim lipase yang dihasilkan bakteri biasanya bersifat ekstraseluler dan dihasilkan fermentasi (Gupta, 2004).

Lipase yang berasal dari kelompok *Pseudomonas* termofilik memiliki kestabilan yang sangat tinggi pada temperatur 60 °C dimana setelah diinkubasi selama 24 jam masih memiliki aktivitas sebesar 96 %. Lipase yang diisolasi dari *Pseudomonas* mesofilik juga mampu menghasilkan lipase hipertermostabil alkalin dengan aktivitas maksimum pada temperatur 90 °C dan pH 11 dengan waktu paruh lebih 13 jam (Rathi, dkk., 2000).

Isolat AL96 merupakan mikroorganisme yang diisolasi dari kompos domestik bersifat termofilik toleran terhadap alkohol memiliki aktivitas lipolitik, berdasarkan analisis menggunakan gen 16S rRNA, diketahui isolat AL96 memiliki kekerabatan terdekat dengan *Pseudoxanthomonas taiwanensis*, yang merupakan bakteri Gram negatif dan berbentuk batang (Syihab dkk., 2015).

## II.I Habitat Mikroorganisme Termofilik

Mikroorganisme termofilik memiliki pertumbuhan dan ketahanan hidup yang dipengaruhi oleh temperatur tinggi, diantaranya sumber air panas disekitar gunung berapi. Telah banyak dilakukan penelitian di Indonesia mengenai bakteri termofilik, diantaranya dari sumber air panas Cimanggu, Kawah Domas Gunung Tangkuban Perahu, Kawah Gunung Papandayan Garut, Jawa Barat, (Akhmaloka dkk.,2006). Pemanfaatan enzim yang berasal dari mikroorganisme lebih menguntungkan karena lebih mudah berkembang biak dalam waktu yang relatif singkat dan tidak memerlukan tempat yang luas, termasuk enzim lipase yang banyak digunakan untuk industri (Primiadi, dkk, 2014).

Mikroorganisme termofilik juga dapat dihasilkan dari proses pengomposan dan limbah-limbah industri. Habitat mikroorganisme ini merupakan habitat non vulkanik yang terbentuk akibat aktivitas manusia (Satyanarayana *et al.*, 2005). Kompos merupakan habitat yang cocok untuk pertumbuhan mikroorganisme termofilik, karena dalam proses pengomposan terdapat fase termogenik sehingga komunitas mikroorganisme dapat tumbuh baik di fase tersebut.

Tabel II.1 Beberapa mikroorganisme penghasil lipase (Sharma, 2001).

Sumber	Genus	Spesies
Bakteri (Gram positif)	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i>
		<i>B. cereus</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus sp.</i>
	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i>
	<i>Streptococcus</i>	<i>S. lactis</i>
Bakteri (Gram negatif)	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>
		<i>P. fragi</i>
	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. pseudoalcaligenes</i>
Jamur	<i>Rhizopus</i>	<i>R. delemar</i>
		<i>R. oryzae</i>
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i>
		<i>A. niger</i>
<i>Penicillium</i>	<i>P. cyclospium</i>	
Ragi	<i>Candida</i>	<i>C. rugosa</i>
		<i>C. tropicalis</i>
	<i>Pichia</i>	<i>P. bispora</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. lipolytica</i>	



### **II.1.2 Enzim Termostabil**

Enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme termofilik disebut termozim. Enzim ini memiliki struktur yang lebih stabil untuk diaplikasikan dalam proses industri (Imamura dan Kitaura, 2001). Enzim termostabil sebagian besar bersumber dari mikroorganisme yang tumbuh pada suhu tinggi, meskipun ada beberapa enzim termostabil yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang hidup pada suhu rendah.

Lipase memiliki sifat resistensi yang tinggi terhadap denaturasi senyawa kimia (Guncheva dan Zhiryakova, 2011). Lipase dari mikroorganisme termofilik umumnya menunjukkan kestabilan yang cukup baik pada suhu tinggi dan pelarut organik, hal ini dikarenakan mikroorganisme mampu mempertahankan diri pada kondisi ekstrim (Sinhaikul, dkk., 2001).

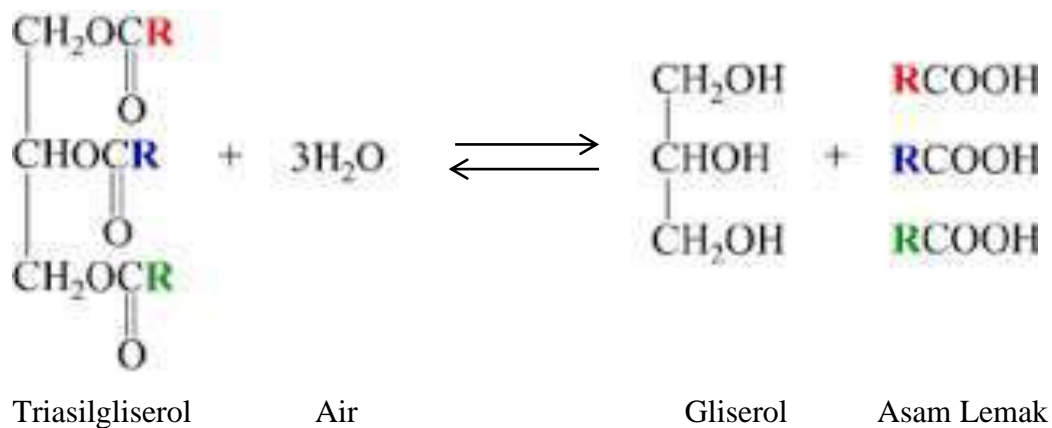
Beberapa termozim banyak dipakai karena memiliki banyak keunggulan yaitu mampu mempertahankan stabilitas dan aktivitas pH tinggi dan zat denaturasi, mudah dimurnikan dengan pelakuan panas karena enzim bekerja pada suhu tinggi, mampu tahan terhadap kontaminasi mikroorganisme serta memiliki kecepatan reaksi lebih tinggi dibanding reaksi yang dikatalis mesozim (Becker, dkk., 1997).

### **II.2 Lipase**

Lipase (*triacylglycerol acylhydrolase*; EC 3.1.1.3) merupakan enzim yang dapat mengkatalisis proses hidrolisis ikatan karboksil ester dalam lipid pada daerah antar muka minyak dan air. Enzim mempunyai gugus aktif yang bermuatan positif dan negatif. Aktivitas enzim akan optimum jika terdapat keseimbangan antara kedua muatannya. Pada keadaan asam, muatannya cenderung positif dan pada keadaan basa muatannya cenderung negatif sehingga aktivitas enzimnya menjadi berkurang dan bahkan menjadi tidak aktif (Sharma, 2001).

Lipase mampu menghidrolisis minyak (trigliserida), digliserida dan mono gliserida menjadi asam lemak bebas dan gliserol. Asam lemak ini selanjutnya

akan memasuki siklus katabolisme trigliserida dan glukoneogenesis untuk membentuk suatu heksosa yang akan digunakan dalam pembentukan selulosa (Su'i, 2010).



Sebagian besar lipase dapat aktif pada rentang pH dan temperatur yang luas, biasanya lipase dari bakteri banyak yang aktif pada pH basa. Lipase termasuk serin hidrolase dan memiliki stabilitas yang tinggi pada pelarut organik. Beberapa jenis lipase menunjukkan aktivitas chemo-, regio- dan enantioselectivity. Lipase termasuk enzim hidrolase yang bekerja pada lingkungan air pada ikatan ester karboksil yang terdapat pada triasilgliserol untuk memisahkan asam lemak dan gliserol. Substrat alami untuk lipase adalah triasilgliserol rantai panjang yang memiliki kelarutan yang rendah di dalam air, dan reaksi ini dikatalisis pada daerah yang berhubungan antara lipid dan air. Di bawah keadaan yang sedikit air, lipase memiliki kemampuan unik, yaitu melakukan reaksi yang sebaliknya, menyebabkan terjadinya esterifikasi, alkoholisis dan asidolisis. Selain lipolisis, lipase juga memiliki aktivitas esterolitik sehingga mempunyai substrat yang banyak (Gupta, 2004).

Lipase merupakan enzim yang memiliki kemampuan untuk mengkatalisis reaksi hidrolisis dan sintesis ester sehingga banyak digunakan dalam industri, serta memiliki cakupan lebih luas dalam bidang bioteknologi seperti biomedikal, pestisida, pengolahan limbah, biosensor, dan detergen (Macrae, 1983).

### II.3 Aplikasi Lipase Pada Bidang Industri

Lipase (*triacylglycerol acylhydrolase*; EC 3.1.1.3) yang berasal dari bakteri termofilik dapat digunakan dalam berbagai industri diantaranya industri obat-obatan, industri makanan dan minuman, detergen, pengolahan coklat dan jugabiodiesel. Sintesis biodiesel dengan menggunakan minyak rumput laut *Sargassum, sp*, yang memiliki kandungan minyak yang tinggi sehingga berpotensi sebagai bahan baku pembuatan biodiesel (Syihab, 2011).

Sebagian besar lipase digunakan untuk industri makanan yaitu lemak dan minyak, pembuatan deterjen, sintesis kertas dan untuk sintesis organik. Penggunaan lipase pada industri minyak meningkat seiring berjalannya pengetahuan bahwa enzim mampu mengkatalis reaksi hidrolisis serta mampu mengkatalis reaksi sintesis seperti sintesis esterifikasi, transesterifikasi serta interesterifikasi (Sharma, dkk, 2001)

Lipase banyak digunakan diberbagai industri karena memiliki potensi yang cukup besar dan banyak memberikan kontribusi (Sharma dan Kanwar, 2014). Aplikasi komersial yang utama dari lipase banyak digunakan dalam rumah tangga adalah detergen yang mampu menghidrolisis lemak (Hasan, dkk., 2006). Penggunaan enzim dalam formulasi detergen bertujuan meningkatkan kemampuan detergen dalam menghilangkan noda dan membuat detergen yang aman bagi lingkungan. (Weerasooriya dan Kumarasinghe, 2012).

Penggunaan lipase dalam industri kertas juga sudah lama digunakan, lipase yang digunakan bersama selulase dan ligninase dapat menghilangkan *pitch* dari *pulp* yang dihasilkan untuk membuat kertas. *Pitch* merupakan komponen hidrofobik dari kayu dengan komponen utama adalah trigliserida (Jaeger dan Reetz, 1998). Pada industri susu, lipase digunakan untuk menghidrolisis lemak susu menjadi produk susu seperti keju dengan cita rasa yang spesifik (Kazlauskas dan Bornscheur, 1998).

Biodiesel merupakan salah satu jenis bahan bakar alternatif yang ramah lingkungan dan tidak memiliki efek terhadap kesehatan (Sari, 2010). Lipase sebagai biokatalis mampu mengarahkan reaksi spesifik ke arah produk yang diinginkan tanpa terjadi reaksi samping yang merugikan. Biokatalis merupakan katalis heterogen, sehingga pemisahan dari produk setelah reaksi berakhir dapat dilakukan dengan mudah. Dalam pembuatan biodiesel diperlukan lipase yang toleran terhadap alkohol dan memiliki sifat termostabil.

## **Bab III Metodologi Penelitian**

### **III.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia, Program Studi Kimia, FMIPA, Institut Teknologi Bandung. Waktu penelitian dilakukan dari Januari 2016 sampai dengan selesai.

### **III.2 Bahan Penelitian**

Bahan penelitian yang digunakan adalah enzim isolat AL96 koleksi dari Laboratorium Penelitian Biokimia, Institut Teknologi Bandung yang disimpan dalam lemari dingin suhu 4°C. Untuk pembuatan media digunakan bahan-bahan kimia yaitu pepton (Merck), ekstrak ragi (Merck), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (Merck), NaCl (Merck), dan bakto agar (untuk media padat). Untuk media produksi ditambahkan minyak zaitun sebagai penginduksi, sementara untuk media uji kualitatif menggunakan media CaCl<sub>2</sub> (pepton 1,5 gram, NaCl 0,5 gram, CaCl<sub>2</sub> 0,1 gram, bakto agar 3 gram, dan 1 mL tween 20 dalam 100 mL air). Enzim hasil produksi kemudian dipekatkan melalui metode pengendapan dengan amonium sulfat (Merck).

### **III.3 Alat Penelitian**

Peralatan yang digunakan meliputi gelas kimia, labu Erlenmeyer, labu takar, cawan petri, gelas ukur, tabung reaksi, batang pengaduk, pipet tetes, botol semprot, jarum ose, tabung mikrosentrifuga, dan tabung Falcon.

### **III.4 Langkah Kerja**

#### **III.4.1 Isolasi Enzim Lipase Termotabil**

##### **III.4.1.1 Pembuatan media pertumbuhan dan media produksi**

Media Thermus digunakan untuk menumbuhkan bakteri isolat AL96 yang berasal dari stok gliserol, dan mempunyai komposisi polipepton (0,08 % b/v), ekstrak ragi (0,04 % b/v), bakto agar (0,03 % b/v), NaCl (0,05 % b/v). Media yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri terdiri dari pepton (0,5 % b/v), ekstrak ragi (0,5 %

b/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,05 % b/v), NaCl (0,05 % b/v), dan bakto agar (2-3 % b/v) untuk media pertumbuhan padat).

#### **III.4.1.2 Peremajaan Isolat AL96**

Isolat AL96 diperoleh dari koleksi laboratorium Biokimia, FMIPA, ITB. Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  stok gliserol isolat AL 96 dipindahkan secara aseptik menggunakan batang-L (*spreader*) pada media pertumbuhan padat. Bakteri kemudian diinkubasi pada suhu 55 °C selama 17 jam. Koloni tunggal bakteri kemudian dipindahkan ke media pertumbuhan padat menggunakan kawat ose secara aseptik dan diinkubasi pada suhu 55 °C selama 17 jam.

#### **III.4.1.3 Produksi Enzim Lipase Termotabil**

Produksi enzim dimulai dengan membuat media *stater* sebanyak 10 mL, kemudian satu koloni bakteri dari media padat dipindahkan ke dalam media stater, inkubasi dilakukan dalam inkubator kocok pada suhu 55 °C selama 17 jam dengan kecepatan 150 rpm. Sebanyak 0,1 % kultur pada media stater dipindahkan ke dalam 100 mL media produksi. Inkubasi pada media produksi dilakukan dalam inkubator kocok pada suhu 55 °C selama 17 jam dan kecepatan 150 rpm selama 17 jam. Untuk memisahkan sel bakteri dengan enzim maka dilakukan sentrifugasi pada 12000xg selama 20 menit pada suhu 4 °C. Enzim lipase yang dihasilkan akan berada pada fasa supernatan karena enzim lipase yang dihasilkan bersifat ekstraseluler.

#### **III.4.2 Fraksinasi Amonium Sulfat**

Fraksinasi amonium sulfat dilakukan pada empat tingkat fraksi yaitu fraksi 0-30% jenuh, fraksi 30-50% jenuh, fraksi 50-70% jenuh, dan fraksi 70-90% jenuh. Fraksinasi kemudian dilakukan pada ruang dingin, amonium sulfat ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam ekstrak kasar enzim sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* campuran didiamkan selama  $\pm 3$  jam untuk menyempurnakan pengendapan protein, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10000xg selama 20 menit pada temperatur 4 °C. Supernatan dipisahkan dari endapan dan ditampung untuk

fraksinasi selanjutnya. Sisa amonium sulfat dalam endapan dihilangkan kemudian endapan dilarutkan dalam 50 mM penyangga tris HCl pH 8.0 (Scopes, 1994).

Dialisis dilakukan dengan memasukkan enzim kedalam kantong selofan yang diikat atas dan bawahnya, lalu plastik selofan direndam dalam penyangga tris HCl 20 mM pH 8.0 dengan volume 940 mL dialisis dilakukan hingga enzim terbebas dari amonium sulfat. Fraksi yang diperoleh kemudian diuji aktivitas lipase dan kadar proteinnya.

### **III.4.3 Uji Aktivitas Lipase dan Penentuan Kadar Protein**

#### **III.4.3.1 Uji Aktivitas Lipase**

Aktivitas lipase diuji menggunakan tehnik spektrofotometri seperti dikemukakan oleh Lee dkk.,1999. Sebagai substrat digunakan p-nitrofenil laurat (pNP-L) yang dilarutkan dalam asetonitril dengan konsentrasi 10 mM. Emulsi substrat dibuat dengan mencampurkan larutan pNP-L dengan bufer fosfat (pH 7; 0,05 M). Sehingga diperoleh komposisi akhir asetonitril: etanol: bufer dengan perbandingan 1:95:4 (v/v/v). Sebanyak 900 µL Larutan tersebut kemudian ditambahkan dengan 300 µL larutan enzim dan diinkubasi pada suhu 55 °C dengan menggunakan inkubator selama 15 menit.

Aktivitas lipase diukur berdasarkan perubahan absorbansi pada panjang gelombang 405 nm yang menunjukkan pelepasan senyawa p-nitrofenol (pNP) dari substrat pNP-L. Data absorbansi kemudian dikonversi menjadi kadar pNP (µmol) dengan cara interpolasi ke kurva standar. Sebagai standar digunakan senyawa p-nitrofenol dengan seri konsentrasi 2-12 µg/mL yang diukur pada panjang gelombang 405 nm. Aktivitas lipase dinyatakan dalam satuan unit/mg yang didefinisikan sebagai µmol produk (p-nitrofenol) yang dihasilkan oleh lipase per menit per mg enzim.

### **III.4.3.2 Penentuan Kadar Protein**

Penentuan kadar protein dilakukan dengan menggunakan metode Bradford. Larutan enzim direaksikan dengan reagen Bradford dengan perbandingan 1:1 (v/v). Campuran diinkubasi selama lima menit pada suhu ruang dan absorpsi larutan diukur pada panjang gelombang 595 nm menggunakan spektrofotometer. Kurva standar dibuat dengan menggunakan BSA (*bovin serum albumin*) dengan seri konsentrasi 2-14 µg/mL, yang direaksikan dengan reagen Bradford dengan kondisi pengujian yang sama seperti pengujian sampel protein (Bradford, 1976).

### **III.4.4 Elektroforesis Gel Akrilamid**

#### **III.4.4.1 Penyiapan Gel Elektroforesis**

Gel pemisahan 10% untuk SDS-PAGE dibuat dengan mencampurkan 4760 µL aquabidest, 4260 µL acryamide 30%, 3260 µL tris-Cl 1,5M (pH8,8), 130 µL SDS 10%, 130 µL APS 10%, dan 8 µL TEMED. Campuran dituang diantara cetakan kaca gel hingga mencapai tiga per empat bagian cetakan kemudian ditambahkan aquades hingga mencapai bagian atas cetakan. Campuran didiamkan selama 30 menit hingga terjadi polimerasi (Sambrook dkk.,1989).

Selama menunggu polimerasi gel pemisahan, gel pemampat 5% dibuat dengan mencampurkan 2800 µL aquadest, 660 µL acryamide 30% b/v, 500 µL tris-Cl 1,5M (pH 6,8), 40 µL SDS 10% b/v, 40 µL APS 10% b/v, dan 6 µL TEMED. Setelah gel pemisahan memadat, campuran gel pemampat dituang diantara kaca gel hingga mencapai bagian atas kaca dan disisipkan sisir, campuran didiamkan selama 30 menit hingga terjadi polimerasi (Sambrook dkk.,1989).

#### **III.4.4.2 Penyiapan Larutan Penyangga Beban**

Stok larutan penyangga beban 5x untuk SDS-PAGE dibuat dengan mencampurkan 2 mL penyangga tris-Cl 1M pH 6,8; 0,8 g SDS (8%), 50 mg Bromophenol Blue (0,5%), 4 mL gliserol 40%, 3,6 mL aquadest dan 400 µL β-merkaptotanol (Sambrook dkk.,1989).



#### **III.4.4.3 Penyiapan Larutan Penyangga Aliran**

Larutan penyangga aliran dibuat dengan mencampurkan 14,4 g glisin 192 mM, 3,02 g tris 25 mM, dan 1 g SDS (0,1%), setelah itu campuran dilarutkan dengan H<sub>2</sub>O dan diencerkan hingga 1000 mL (Sambrook dkk.,1989).

#### **III.4.4.4 Penyiapan Larutan Pewarna**

Larutan pewarna dibuat dengan mencampurkan 1,2 g komasi biru, 225 mL metanol, 50 mL asam asetat glasial diencerkan dalam 225 mL aquadest (Sambrook dkk.,1989).

#### **III.4.4.5 Penyiapan Larutan Penghilang Warna**

Larutan penghilang warna dibuat dengan mencampurkan 250 mL metanol, 75 mL asam asetat glasial dilarutkan dalam 325 mL aquadest (Sambrook dkk.,1989).

#### **III.4.4.6 Penyiapan Larutan Substrat Untuk Zimografi**

Larutan substrat untuk zimografi disiapkan dengan mensuspensikan 23,5 mg *fast blue* dalam 1 mL etanol, kemudian ditambah penyangga fosfat 0,005 M (pH 8,0) sebanyak 48 mL. Campuran tersebut kemudian diaduk dengan pengaduk magnetik hingga *fast blue* teraduk merata dalam larutan. Sebanyak 25,8 mg substrat naftil asetat yang telah dilarutkan dalam 1 mL etanol kemudian ditambahkan kedalam larutan *fast blue* yang telah disaring. Larutan substrat dibuat segar sesaat sebelum digunakan.

#### **III.4.4.7 SDS-PAGE**

Sebanyak 20 µL larutan enzim hasil elektroelusi dicampurkan dengan 5 µL larutan penyangga beban SDS-PAGE 5x. Campuran tersebut ditempatkan dalam sumur gel elektroforesis. Ke dalam salah satu sumur elektroforesis ditambahkan 5 µL protein marker. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan tegangan 110 volt selama 100 menit. Gel hasil elektroforesis kemudian direndam dalam 20 mL larutan pewarna selama semalam (16) kemudian dilanjutkan dengan perendaman dalam 20 mL larutan warna selama 120 menit.

#### **III.4.4.8 Zymografi**

Pada zymografi, gel hasil elektroforesis tidak direndam dalam larutan pewarna melainkan dalam larutan substrat yang mengandung naftil asetat 3 mM, pewarna *fast blue* 1 mM, dan bufer fosfat 50 mM (pH 8,0). Selanjutnya gel hasil elektroforesis direndam dalam 20 mL aquabidest selama 20 menit.

#### **III.4.5 Karakterisasi Lipase**

Lipase hasil fraksinasi menggunakan amonium sulfat selanjutnya dikarakterisasi berdasarkan beberapa parameter sebagai berikut.

##### **III.4.5.1 Pengaruh pH terhadap Aktivitas Lipase**

Penentuan pengaruh pH terhadap aktivitas lipase dilakukan pada temperatur 55°C menggunakan 50 mM bufer dengan rentang pH dari 6-12. Pengukuran aktivitas lipase dilakukan sesuai prosedur yang dikemukakan oleh Lee dkk. (1999) seperti ditunjukkan pada sub bab III.4 di atas, sistem penyangga yang digunakan meliputi penyangga natrium fosfat (pH 6,0-8,0), dan penyangga glisin NaOH (pH 8,0-11).

##### **III.4.5.2 Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Lipase**

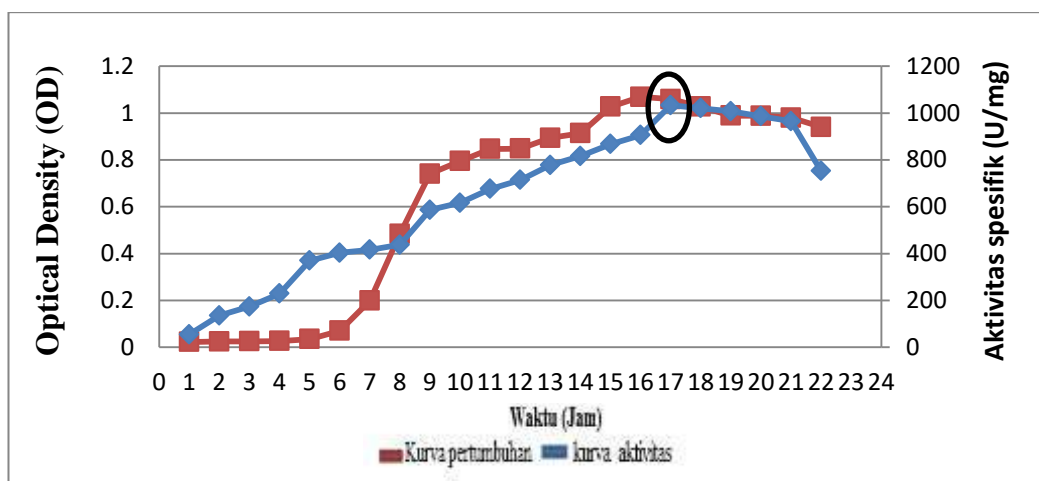
Efek temperatur terhadap aktivitas lipase ditentukan dengan mengukur aktivitas enzim pada berbagai suhu dalam rentang 35-85°C. Campuran reaksi diinkubasi pada temperatur tertentu dalam penangas air, dan aktivitas lipase diukur mengikuti prosedur yang dikemukakan oleh Lee dkk. (1999).

## Bab IV Hasil dan Pembahasan

### IV.1 Pertumbuhan bakteri lipase

Kurva pertumbuhan bakteri dan kurva aktivitas lipase berguna untuk mengetahui waktu inkubasi terbaik isolat tunggal dalam menghasilkan lipase. Pertumbuhan bakteri diamati *optical density* (OD) setiap satu jam. Kurva pertumbuhan dibuat dengan mengalurkan waktu inkubasi terhadap nilai OD pada panjang gelombang 600 nm, sedangkan kurva aktivitas dibuat dengan mengalurkan waktu inkubasi terhadap aktivitas lipase yang dihasilkan oleh isolat tunggal.

Pertumbuhan bakteri mengalami peningkatan dengan meningkatnya nilai OD, semakin keruh suspensi bakteri maka semakin banyak jumlah bakteri yang tumbuh. Meningkatnya jumlah biomassa menyebabkan jumlah bakteri yang dihasilkan akan meningkat kemudian turun setelah mencapai fase stasioner (Ougunbanwo *et al.*, 2013).



Gambar IV.1 Kurva pertumbuhan dan kurva aktivitas lipase termostabil

Berdasarkan kurva pada Gambar IV.1, pertumbuhan bakteri terdiri dari fase adaptasi, fase eksponensial, dan fase stasioner. Fase adaptasi terjadi pada jam ke-0 sampai dengan pertengahan jam ke-5, fase adaptasi merupakan periode

penyesuaian bakteri terhadap lingkungannya seperti : pH, suhu, nutrisi dan lain sebagainya, pada fase ini peningkatan jumlah sel bakteri berlangsung lambat.

Fase kedua adalah fase eksponensial, dimana fase ini berlangsung sangat cepat, dimulai jam ke-6 sampai dengan jam ke-17. Pada fase ini suatu jenis mikroba memperbanyak diri dengan cara membelah diri menjadi dua, kemudian masing-masing membelah lagi menjadi dua, sehingga pada setiap generasi jumlahnya menjadi dua kali populasi sebelumnya. Waktu yang dibutuhkan untuk terjadi proses ini disebut waktu generasi (Fardiaz, 1992).

Fase berikutnya adalah fase stasioner, terjadi mulai jam ke-17 sampai jam ke-24. Pada fase ini tidak terjadi penambahan jumlah bakteri, jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati karena cadangan makanan sudah mulai menipis dan pada fase ini bakteri akan menghasilkan metabolit sekunder sebagai pertahanan diri terhadap lingkungannya dan mikroorganisme lain. Dari Kurva diatas dapat diketahui bahwa aktivitas lipase terbaik dihasilkan pada waktu inkubasi pada jam ke-17, dimana nilai OD pada jam itu sebesar 1,069 (dapat dilihat pada Lampiran C.1).

#### **IV.2 Karakter Lipase Isolat AL96**

Lipase yang diproduksi pada penelitian ini merupakan lipase yang berada pada fase stasioner (Gambar IV.1). Lipase sebanyak 940 mL diinkubasi selama  $\pm$  17 jam sampai mencapai OD sekitar 1,069. Setelah itu dipanen sel bakteri dengan cara sentrifugasi selama 45 menit pada 4500 g. Ekstrak kasar enzim diperoleh pada fasa supernatan karena enzim bersifat ekstraselluler. Ekstrak kasar enzim lipase termotabil yang diperoleh kemudian difraksinasi menggunakan amonium sulfat. Prinsip dari fraksinasi amonium sulfat adalah bila suatu larutan protein ditambahkan garam maka daya larut protein akan berkurang akibatnya protein akan terpisah membentuk endapan, ini merupakan proses salting out.

Fraksinasi dilakukan secara bertahap sehingga diperoleh empat fraksi, yaitu fraksi 0-30% jenuh, fraksi 30-50% jenuh, fraksi 50-70% jenuh, dan fraksi 70-90% jenuh, dan menghasilkan empat fraksi enzim aktif. Dialisis digunakan untuk meningkatkan kemurnian enzim. Prinsip dialisis yaitu memisahkan molekul-molekul besar dari molekul-molekul kecil dengan bantuan membran *semipermeable*. Dialisis dilakukan untuk menghilangkan garam yang ikut mengendap bersama protein agar tidak mengganggu tahap pemurnian selanjutnya dengan menggunakan membran selofan.

Membran selofan memiliki ukuran pori-pori yang lebih kecil dari ukuran protein sehingga protein tidak dapat keluar dari membran selofan, penggunaan membran selofan memiliki beberapa keuntungan yaitu mudah digunakan, memiliki harga yang relatif murah dan mudah didapatkan. Proses dialisis dilakukan sebanyak tiga kali untuk memastikan garam benar-benar hilang dari protein. Hasil fraksinasi amonium sulfat ditunjukkan pada Tabel IV.1

Tabel IV.1 Hasil fraksinasi lipase menggunakan amonium sulfat

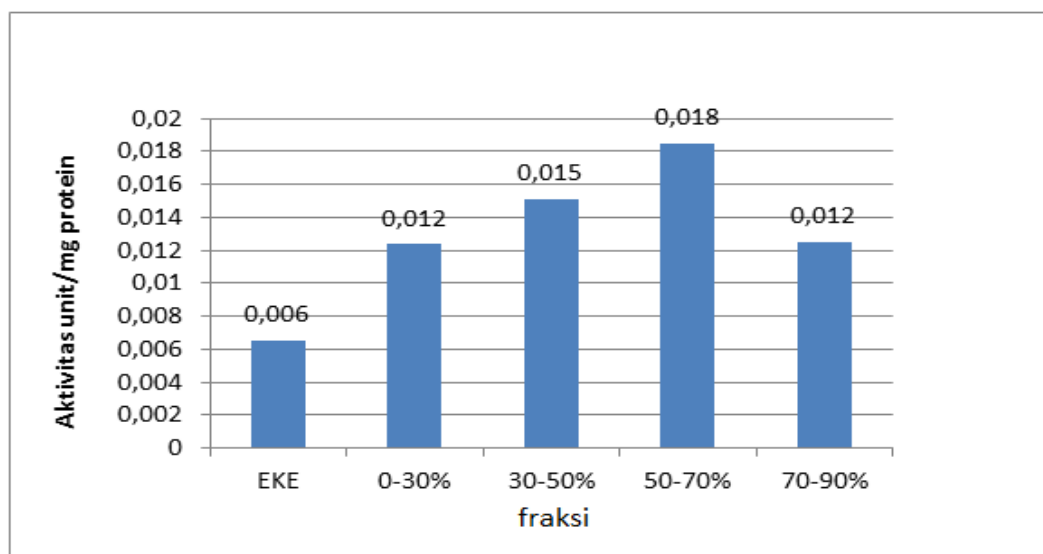
<b>fraksi (amonium sulfat jenuh)</b>	<b>Massa amonium sulfat yang ditambahkan (g)</b>	<b>Volume enzim setelah dialisis (mL)</b>
<b>fraksi 0-30%</b>	154,16	2,0
<b>fraksi 30-50%</b>	107,64	2,0
<b>fraksi 50-70%</b>	121,87	2,0
<b>fraksi 70-90%</b>	134,00	2,0

Keberadaan lipase pada keempat fraksi tersebut dilihat melalui penentuan aktivitas spesifik enzim lipase. Aktivitas spesifik dinyatakan sebagai aktivitas enzim per kadar proteinnya. Satu unit aktivitas didefinisikan sebagai satu nmol produk yang dilepaskan oleh satu mL enzim per menit pada kondisi pengukuran. Peningkatan nilai aktivitas spesifik enzim dalam tahapan-tahapan isolasi menunjukkan adanya peningkatan kemurnian lipase yang diperoleh. Hasil penentuan aktivitas spesifik menggunakan amonium sulfat ditunjukkan pada Tabel IV.2.

Tabel IV.2 Hasil penentuan aktivitas spesifik menggunakan amonium sulfat

Tahap pemurnian	Protein total (mg)	Aktivitas total (unit)	Aktivitas spesifik (unit/mg)
Ekstrak Kasar Enzim	$1,65 \times 10^2$	$1,08 \times 10^2$	$6,56 \times 10^{-3}$
fraksi 0-30%	$6,41 \times 10^{-1}$	$7,94 \times 10^{-3}$	$1,24 \times 10^{-2}$
fraksi 30-50%	$8,52 \times 10^{-1}$	$1,29 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-2}$
fraksi 50-70%	$7,91 \times 10^{-1}$	$1,46 \times 10^{-2}$	$1,85 \times 10^{-2}$
fraksi 70-90%	$6,56 \times 10^{-1}$	$8,214 \times 10^{-3}$	$1,25 \times 10^{-2}$

Hasil penentuan aktivitas spesifik (Gambar IV.2, Lampiran C.2) menunjukkan adanya peningkatan aktivitas lipase setelah dilakukan fraksinasi amonium sulfat dan dialisis. Peningkatan aktivitas spesifik tersebut menunjukkan adanya peningkatan kemurnian enzim lipase.



Gambar IV.2 Grafik perbandingan aktivitas spesifik tiap fraksi.

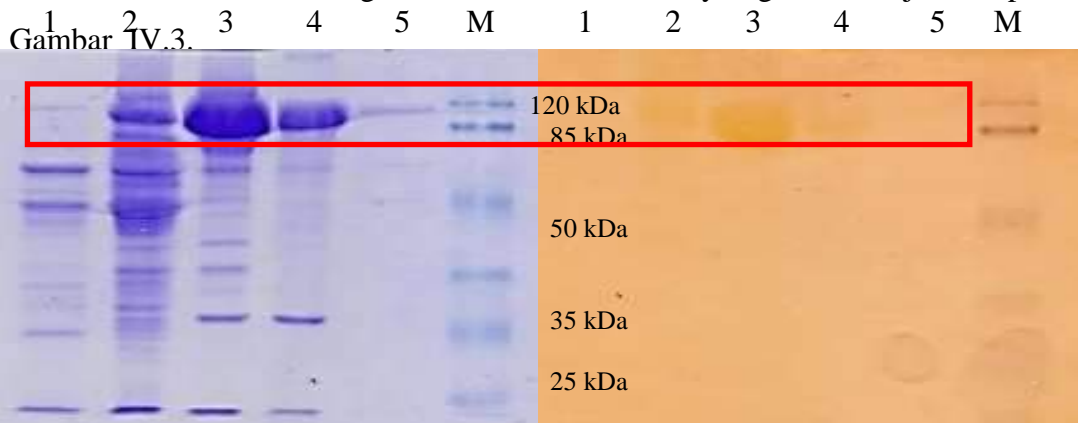
Hasil pemurnian parsial dengan menggunakan amonium sulfat terhadap ekstrak kasar enzim dari isolat AL96 Hasil menunjukkan bahwa fraksi 50-70% yang paling tinggi aktivitas spesifik sebesar 0,018 U/mg protein, diikuti oleh fraksi 30-50% dengan aktivitas spesifik sebesar 0,015 U/mg protein.

Hal ini dapat disebabkan protein yang mengendap pada fraksi 50-70% relatif lebih sedikit jika dibandingkan dengan fraksi 30-50% dan fraksi lainnya. Protein yang terendapkan dapat dipengaruhi oleh fraksinasi amonium sulfat, bila suatu larutan protein ditambahkan garam maka daya larut protein akan berkurang akibatnya protein akan terpisah membentuk endapan.

### IV.3 Penentuan Berat Molekul Lipase

Prinsip elektroforesis adalah proses Bergeraknya suatu molekul bermuatan pada suatu medan listrik, kecepatan molekul yang bergerak tergantung pada bentuk, muatan dan ukuran dari molekul tersebut sehingga protein dapat terpisahkan, Oleh karena komposisi protein akan berbeda pada berbagai fraksi, maka untuk mengetahui banyaknya komposisi dari tiap fraksi yang memiliki aktivitas lipase maka dilakukan SDS-PAGE dan zymogram.

SDS-PAGE merupakan metode pemisahan protein yang berdasarkan perbedaan ukuran protein, dimana protein yang berukuran kecil bergerak lebih cepat sedangkan protein yang besar bergerak lebih lambat karena terhambat oleh ukuran dan pori dari gel (Cutler, 2004). Zymogram merupakan cara untuk menentukan dimana letak protein target yang telah didapatkan dari hasil SDS-PAGE. Hasil Elektroforegram SDS-PAGE dan zymogram ditunjukkan pada



Ket : 1= Fraksi 70-90%, 2 = Fraksi 50-70%, 3 = Fraksi 30-50%, 4 = Fraksi 0-30%,  
5 = Ekstrak Kasar Enzim, M = Marker

### Gambar IV.3 Elektroforegram SDS-PAGE dan zymogram

Pada SDS-PAGE dan zymogram pita tebal pada 85 kDa, menunjukkan pita lipase dari fraksi yakni fraksi 50-70%, fraksi 30-50%, dan fraksi 0-30% yang ditandai dengan adanya warna kecoklatan.

Warna kecoklatan merupakan produk hasil reaksi antara fast blue dengan  $\alpha$ -naphthyl acetate. Ikatan ester pada  $\alpha$ -naphthyl acetate dihidrolisis dengan adanya lipase sehingga terbentuk 1-naphthol. Pengikatan 1-naphthol oleh fast blue akan menghasilkan produk yang berwarna kecoklatan. Hasil pengujian menunjukkan bahwa keempat fraksi dan ekstrak kasar enzim memiliki aktivitas yang tidak jauh berbeda.

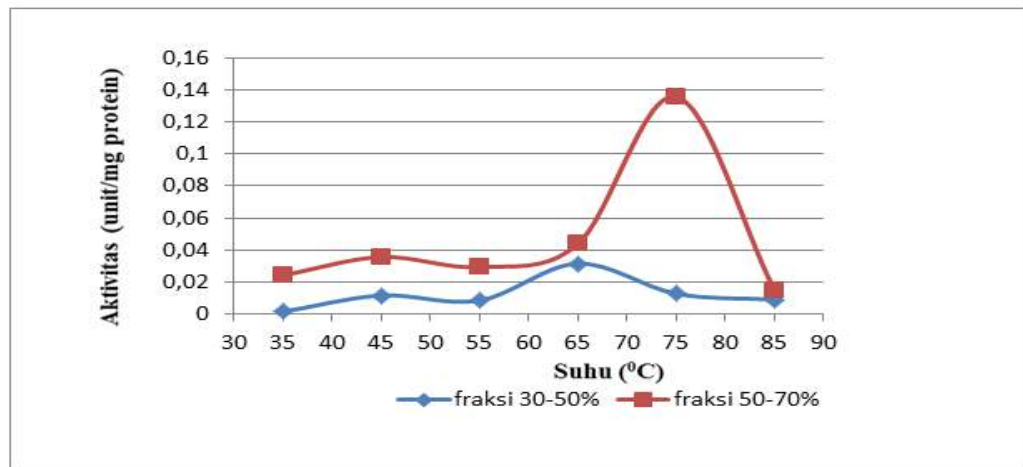
## **IV.4 Hasil Karakterisasi**

### **IV.4.1 Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Lipase**

Karakterisasi enzim dilakukan untuk memperoleh informasi mengenai sifat enzim yang diteliti. Informasi yang diperoleh akan memudahkan untuk mengetahui kondisi lingkungan dan jenis substrat yang cocok sehingga dapat diketahui potensi aplikasi untuk enzim tersebut. Faktor yang mempengaruhi struktur dan aktivitas dari enzim salah satunya adalah temperatur dan pH.

Isolat AL96 yang diujikan pada fraksi 30-50% dan 50-70% menunjukkan temperatur optimum pada fraksi 30-50% pada suhu 65 °C dan pada fraksi 50-70% pada suhu 75 °C (Gambar IV.4 dan Lampiran 3). Pada temperatur di bawah temperatur optimum lipase cukup stabil, tetapi hidrolisis substrat oleh lipase tidak berjalan maksimal, dengan meningkatnya temperatur, energi kinetik molekul – molekul yang bereaksi bertambah sehingga molekul yang bereaksi semakin banyak dan produk yang dihasilkan semakin besar.



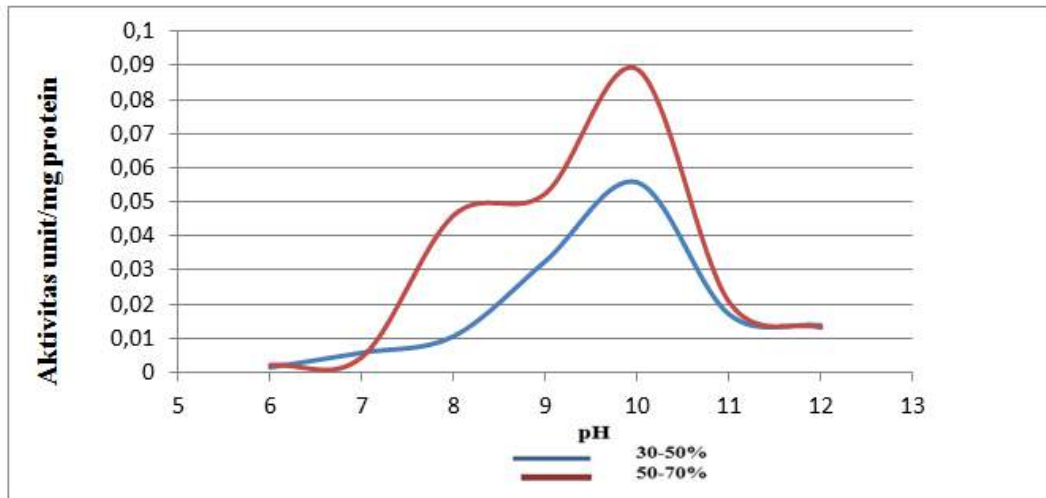


Gambar IV.4 Kurva karakterisasi temperatur terhadap aktivitas lipase.

Diatas temperatur optimum, aktivitas lipase menurun tajam hal ini terjadi karena lipase mengalami denaturasi protein yang dapat merubah konformasi struktur molekul sehingga enzim kehilangan sifat alamiahnya. Pada temperatur tinggi, substrat juga dapat mengalami perubahan konformasi sehingga gugus reaktifnya mengalami hambatan dalam memasuki sisi aktif lipase (Suhartono, 1989). Hasil tersebut menunjukkan bahwa kedua fraksi mungkin mengandung beberapa lipase atau terdapat lipase yang memiliki suhu optimum lebih dari satu, serta lipase ini dapat dikategorikan dalam lipase termostabil (Lampiran C.3).

#### IV.4.2 Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Lipase

Pada pH optimum muatan gugus samping asam amino berada pada keadaan yang sesuai sehingga enzim sangat efisien dalam mempercepat reaksi biokimia yang sangat spesifik. Isolat AL 96 yang diujikan pada fraksi 30-50% menunjukkan pH optimum yaitu pH 10,0. Hasil serupa ditunjukkan oleh lipase pada fraksi 50-70% terdapat pH optimum yaitu pH 10,0. Hal ini disebabkan karena pada kondisi pH 10,0 gugus pemberi dan penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada pada keadaan yang diinginkan sehingga aktivitas katalitiknya tinggi. Hasil Kurva karakterisasi pH terhadap aktivitas lipase ditunjukkan pada Gambar IV.5, Lampiran C.4.



Gambar IV.5 Kurva karakterisasi pH terhadap aktivitas lipase

## **Bab V Penutup**

### **V.1 Kesimpulan**

Ekstrak kasar lipase dari isolat AL96 berhasil di isolasi diperoleh dua fraksi aktif lipase dengan aktivitas paling tinggi yaitu fraksi 50-70% dan fraksi 30-50%. Lipase isolat AL96 memiliki berat molekul sekitar 85 kDa. fraksi 30-50% memiliki suhu optimum 65 °C dan fraksi 50-70% memiliki suhu optimum 75 °C serta fraksi 30-50% dan fraksi 50-70% memiliki pH optimum 10.

### **V.2 Saran**

Perlu dilakukan karakterisasi lebih lanjut pada lipase isolat AL96 untuk mengetahui lebih lanjut karakter lipase tersebut.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akhmaloka., Pramono, H., Nurbaiti, S., Moieis, M.R., Ambarsari, L., Suharto, A., Tika, I.N., Helwati, H., Madayanti, F. (2006): Exploration of thermophilic microorganism from hot spring around Bandung, *Journal of the Indian Chemical Society*, **1**, 1 – 16.
- Baker, G. C., Ga, S., Cowan, D. A., dan Suharto, A. R. (2001): Bacterial community analysis of Indonesian hot springs, *FEMS Microbiology Letters*, **200**, 103 – 9.
- Becker, P., Abu-Reesh, I., Markossian, S., Antranikian, G., dan Markl, H. (1997): Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile *Bacillus sp* IHI-91 on olive oil, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **48**, 184 – 90.
- Bradford, M., M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, **72**, 248 – 254.
- Cutler, P. (2004): Protein purification protocol. Second edition, *Method in Molecular Biology*, Human Press, **244**, 24 – 26.
- Edward, C. (1990): Thermophiles, microbiology of extreme environment McGraw-Hill, New York, 1 – 32.
- Fardiaz, S. (1992): Analisis mikrobiologi pangan, Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Guncheva, M., dan Zhiryakova, D. (2011): Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **68**, 1 – 21.
- Hasan, F., Shah, A. A., dan Hameed, A. (2006): Industrial application of microbial lipase, *Microbial research Lab., Department of Biological, Quid-i-azam University, Islamabad Pakistan*.
- Imamura, S., Kitaura, S. (2000): Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus sp.* H-257, *Journal of Biochemistry*, **127**, 419 – 425.
- I Nengah Wirajana dan Ni Nyoman Tri Puspaningsih (2011): Fraksinasi amonium sulfat pada enzim  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase termotabil, *Jurnal Kimia*, **5**, 175 – 181.
- Jaeger, K., Ransac, S., Dijkstra, B. W., dan Colson, C. (1994): Bacterial lipases, *FEMS Microbiology Reviews*, **15**, 29 – 63.
- Jaeger, K., dan Reetz, M. T. (1998): Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, *Trends Biotechnol*, **16**, 396–403.
- Kazlauskas, R.J., dan Bornscheuer, U.T. (1998): Biotransformations with lipases, editors biotechnology, New York **8**, 37 – 192.
- Lee, D., Koh, Y., Kim, K., Choi, H., Kim, D., Suhartono, M. T., dan Pyun, Y. (1999): Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1, *FEMS Microbiology Letters*, **179**, 393 – 400.
- Leblanc, Benoit. (2017): La Purification des proteines <http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/5e.html> diakses tanggal 18 Januari 2017.

- Linn, T. (2010): Characterization of polyphenol oxidase enzyme of cocoa beans *Theobroma cacao* Linn, *AGRITECH*, **30**, 152–157.
- Noviendri, D., dan Fawzya, Y. N. (2008): Karakteristik dan sifat kinetika enzim kitinase dari isolat bakteri T5a1 asal terasi, *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, **3**, 123–129.
- Nurhasanah. (2015): *Kloning, karakterisasi dan ekpresi gen pengkode lipase termostabil dari kompos melalui pendekatan metagenom*, Disertasi Program Doktor, Institut Teknologi Bandung.
- Macrae, A.R. (1983): Ekstraselular Microbial Lipases. In “Microbial enzymes and biotechnology”. *Science Publisher Ltd*, England, 225-250.
- Madayanti, F., El Vierra, B.V., Widhiatuty, M.P., dan Akhmaloka. (2008): Characterization and identification of thermophilic lipase producing bacteria from thermogenic compost, *Journal of Pure & Applied Microbiology*, **2**, 325 – 332.
- Madigan, M.T., dan Mars, B.L. (1997): Extremophiles, *Scientific American*, **276**, 66-71.
- Ogunbanwo, S.T., A.I. Sanni dan A.A. Onilude, (2003): Characterization of bacteriosin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OGI, *African Journal of Biotechnology*, **2**, 219-227.
- Pramiadi, D., Yulianti, E., Dan Rakhmawati, A. (2014): Isolation and activity test of thermo stable lipase enzyme from thermophilic bacteria post merapi eruption. *Journal Sains Dasar*, **3**, 9 – 19.
- Rathi, P., Bradoo, S., Saxena, R. K., Gupta, R., (2000): A hyper thermostable, alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. with the property of thermal activation, *Biotechnology Letters*, **22**, 495 – 498.
- R. Gupta, N. Gupta, P. Rathi., (2004): Bacterial lipases an overview of production, purification, and biochemical properties, *Applied Microbiology Biotechnology*, **64**, 763–781.
- Safika, Madayanti, F., Aditiawati, P., Akhmaloka. (2013): Succession of bacterial culture-independent during manure composting process, *Journal of Pure & Applied Microbiology* **7**, 269 - 276.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning : a laboratory manual* 3<sup>rd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press : USA, 18.47.
- Sari, D. K. (2010): *Modifikasi lipase isolat lokal pada sintesis biodiesel*, Tesis Program Magister, Institut Teknologi Bandung.
- Satyanarayana, T., Raghukumar, C., dan Shivaji, S. (2005): Extremophilic microbes : diversity and perspective, *Current Science*, **89**, 78 – 90.
- Scopes, R. K., (1994): Protein purification principles and practice, Springer-Verley Inc, New York.
- Sharma, R., Chisti, Y., dan Chand, U. (2001): Production, purification, characterization and applications of lipases, *Biotechnology Advances*, **19**, 627–662.
- Sharma, S., dan Kanwar, S. S. (2014): organic solvent tolerant lipases and applications. *Scientific World Journal*, 1 – 16.

- Sharma, R., Soni, S. Vohra, R. Gupta, L. dan Gupta, J. (2002): Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. *Process Biochemistry*, **37**, 1075–1084.
- Sinchaikul, S., Sookkheo, B., Phutrakul, S., Wu, Y.T., Pan, F. M., dan Chen, S. T. (2001): Structural modelling and characterization of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **283**, 868 – 875.
- Soliman, N. A., Knoll, M., Abdel-Fattah, Y. R., Schmid, R. D., dan Lange, S. (2007): Molecular cloning and characterization of thermostable esterase and lipase from *Geobacillus thermoleovorans* isolated from desert soil in Egypt. *Process Biochemistry*, **42**, 1090–1100.
- Suhartono, M.T. (1989): Enzim dan Bioteknologi. PAU Bioteknologi IPB. Bogor.
- Su'i, M., Harijono, Yuniarta dan Aulanni'am. (2008): Pemurnian parsial lipase dari kentos kelapa dengan ammonium sulfat. *Jurnal Tropika*, **19**, 67 – 72.
- Susanto, A. H., Amurwanto, A., Wahyono, D. J., dan Aziz, S. (2006): Amplifikasi fragmen pelacak gen lipase bakteri termofilik yang diisolasi dari kompos, *Journal Article*, **12**, 9 – 13.
- Syifa, S. F., Madayanti, F., dan Akhmaloka. (2015): Isolation, characterization and identification of lipolytic thermophiles with methanol tolerance from domestic compost. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, **9**, No. *Special Edition*.
- Syihab, F. Syifa. (2011): *Modifikasi dan penentuan berat molekul lipase isolat serta aplikasinya pada sintesis biodiesel dari minyak rumput laut (Sargassum Sp.)* Tesis Program Magister, Institut Teknologi Bandung.
- Vieille, C. dan Zeikus, G.J. (2001): Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Review*, **65**, 1 – 43.
- Wang, Y., Srivastava, K. C., Shen, G.-J., dan Wang, H. Y. (1995): Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1 (ATCC 53841). *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **79**, 433–438.
- Widhiastuty, M.P., Febriani, yohandini, H., Moeis, M.R., Madayanti, F., dan Akhmaloka. (2009): Characterization and identification of thermostable alkaline lipase producing bacteria from hot spring around west java, *Journal of pure & applied microbiology*, **3**, 27 – 40.
- Weerasooriya, M.K.B., dan Kumarasinghe, A.A.N. (2012): Isolation of alkaline lipase from rubber seed-partial purification, characterization and its potential applications as a detergent additive, *Indian Journal of Chemical Technology*, **19**, 244 – 249.
- Zeikus GJ dan Vieille C (2001): Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability, **65**, 1 – 43.
- Zhang, X., Li, X., dan Xia, L. (2015): Expression of a thermo-alkaline lipase gene from *Talaromyces thermophilus* in recombinant *Pichia pastoris*, *Biochemical Engineering Journal*, **103**, 263–269.

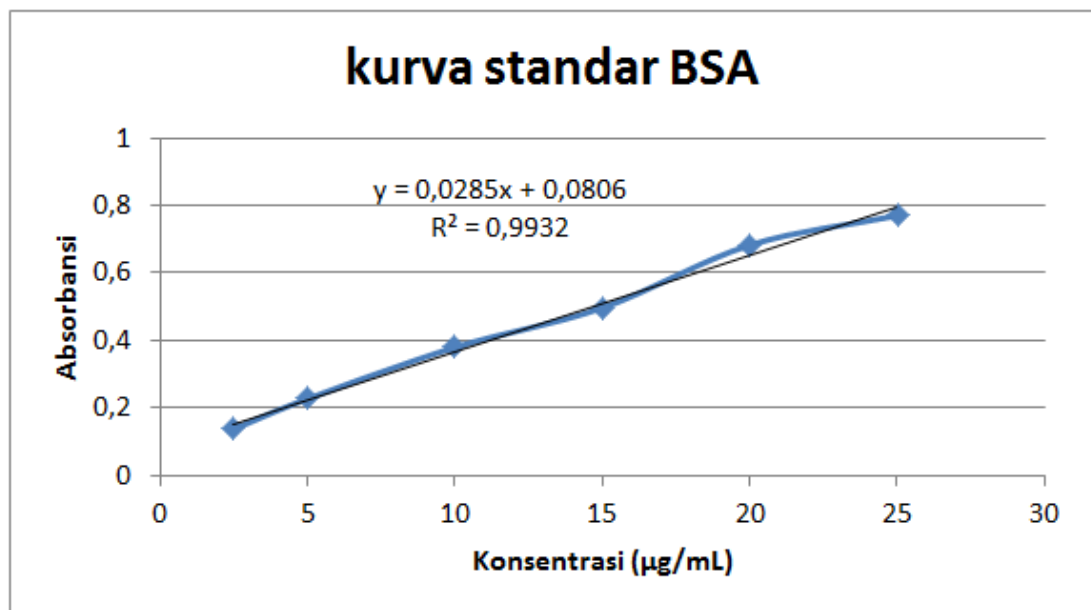
## **LAMPIRAN**

## Lampiran A. Kurva Standar

### A.1 Tabel data pengukuran absorbansi standar BSA (595nm)

[BSA] ( $\mu\text{g/mL}$ )	A1	A2	A3	A rata-rata
25	0,761	0,779	0,771	0,770
20	0,681	0,671	0,697	0,683
15	0,493	0,501	0,497	0,497
10	0,382	0,379	0,378	0,380
5	0,225	0,228	0,228	0,227
2,5	0,137	0,138	0,137	0,137

### A.2 Kurva standar BSA



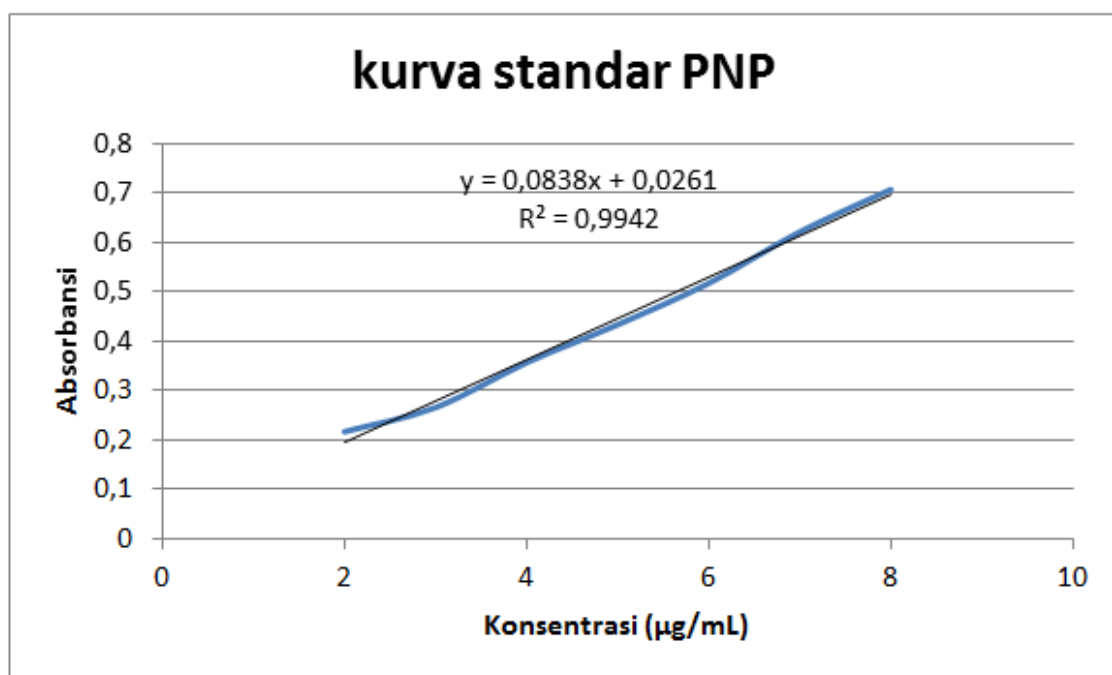


## Lampiran B. Kurva standar

### B.1 Tabel data pengukuran absorbansi standar PNP (405nm)

[PNP] ( $\mu\text{g/mL}$ )	A1	A2	A3	A rata-rata
0	0	0	0	0
2	0,216	0,221	0,211	0,216
3	0,264	0,266	0,265	0,265
4	0,355	0,334	0,379	0,356
5	0,433	0,424	0,442	0,433
6	0,517	0,499	0,535	0,517
7	0,621	0,603	0,639	0,621
8	0,707	0,692	0,722	0,707

### B.2 Kurva standar PNP



## Lampiran C Kurva Standar

### C.1 Tabel data kurva pertumbuhan dan kurva aktivitas enzim lipase

<b>Kontrol</b>	<b>Sampel</b>	<b>Abs</b>	<b>Aktivitas</b>	<b>Jam</b>	<b>Aktivitas / 10<sup>-3</sup></b>	<b>OD</b>
0,1905	0,1995	0,0090	54,4653	1	0,0544	0,0225
0,1905	0,2090	0,0185	135,3122	2	0,1353	0,0245
0,1900	0,2130	0,0230	173,6081	3	0,1736	0,0250
0,1890	0,2185	0,0295	228,9244	4	0,2289	0,0265
0,1880	0,2340	0,0460	369,3428	5	0,3693	0,0350
0,1870	0,2370	0,0500	403,3836	6	0,4033	0,0705
0,1860	0,2375	0,0515	416,1489	7	0,4161	0,1990
0,1825	0,2365	0,0540	437,4244	8	0,4374	0,4835
0,1795	0,2510	0,0715	586,3530	9	0,5863	0,7405
0,1765	0,2515	0,0750	616,1387	10	0,6161	0,7945
0,1710	0,2530	0,0820	675,7102	11	0,6757	0,8470
0,1675	0,2540	0,0865	714,0061	12	0,7140	0,8480
0,1620	0,2560	0,0940	777,8326	13	0,7778	0,8935
0,1590	0,2575	0,0985	816,1285	14	0,8161	0,9140
0,1530	0,2575	0,1045	867,1898	15	0,8671	1,0270
0,1525	0,2615	0,1090	905,4857	16	0,9054	1,0690
0,1505	0,2745	0,1240	1033,1388	17	1,0331	1,0590
0,1475	0,2700	0,1225	1020,3735	18	1,0203	1,0270
0,1440	0,2650	0,1210	1007,6082	19	1,0076	0,9890
0,1430	0,2615	0,1185	986,3326	20	0,9863	0,9880
0,139	0,2550	0,1160	965,0571	21	0,9650	0,9800
0,139	0,2300	0,0910	752,3020	22	0,7523	0,9400

C.2 Tabel kurva perbandingan aktivitas spesifik tiap fraksi

<b>Sampel</b>	<b>fraksi</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>Rata2</b>	<b>(<math>\mu\text{g/mL}</math> enzim)</b>	<b>(<math>\text{mg/mL}</math> enzim)</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>Total (mg)</b>
Blanko		0,192						
EKE		0,276	0,286	0,281	175,789	0,175	940	165,242
AL96	0-30%	0,447	0,445	0,446	320,526	0,321	2	0,64105
	30-50%	0,566	0,567	0,566	426,228	0,426	2	0,85246
	50-70%	0,530	0,534	0,532	395,964	0,396	2	0,79193
	70-90%	0,450	0,460	0,455	328,421	0,328	2	0,65684

C.3 Tabel data kurva karakterisasi suhu fraksi 30-50% dan fraksi 50-70%

C.3.1 Tabel data kurva karakterisasi suhu fraksi 30-50%

Vol sampel : 0,025 mL  
Vol total : 1,20 mL  
Waktu inkubasi : 15 menit  
Pers. Linier :  $y=0,0838x +0,0261$   
Mr PNP : 139

Suhu	Kontrol	A1	A2	Rata2	Sampel-Kontrol	(mmol/menit mg enzim)	(mmol/menit mg enzim)/ (mg/mL enzim)
35	0,0740	0,1040	0,0990	0,1015	0,0275	0,0006	0,0015
45	0,0790	0,1230	0,1090	0,1160	0,0370	0,0049	0,0117
55	0,0950	0,0950	0,1630	0,1290	0,0340	0,0036	0,0084
65	0,1510	0,2090	0,2040	0,2065	0,0555	0,0134	0,0315
75	0,2280	0,1670	0,3650	0,2660	0,0380	0,0054	0,0127
85	0,180	0,2120	0,2170	0,2145	0,0345	0,0038	0,0090

C.3.2 Tabel data kurva karakterisasi suhu fraksi 50-70%

Vol sampel : 0,025 mL  
 Vol total : 1,20 mL  
 Waktu inkubasi : 15 menit  
 Pers. Linier :  $y=0,0838x +0,0261$   
 Mr PNP : 139

Suhu	Kontrol	A1	A2	Rata2	Sampel - Kontrol	(mmol/menit mg enzim)	(mmol/menit mg enzim) / (mg/mL enzim)
35	0,0740	0,1170	0,1250	0,1210	0,0470	0,0095	0,0241
45	0,0790	0,1330	0,1390	0,1360	0,0570	0,0141	0,0357
55	0,0950	0,1510	0,1420	0,1465	0,0515	0,0116	0,0293
65	0,1510	0,2170	0,2130	0,2150	0,0640	0,0173	0,0438
75	0,2280	0,3980	0,3450	0,3715	0,1435	0,0537	0,1357
85	0,1800	0,2170	0,2210	0,2190	0,0390	0,0059	0,0149

C.4 Tabel data kurva karakterisasi pH fraksi 30-50% dan fraksi 50-70%

C.4.1 Tabel data kurva karakterisasi pH fraksi 30-50%

Vol sampel : 0,025 mL  
Vol total : 1,20 mL  
Waktu inkubasi : 15 menit  
Pers. Linier :  $y=0,0838x +0,0261$   
Mr PNP : 139

pH	Kontrol	A1	A2	Rata2	Sampel - Kontrol	(mmol/menit mg enzim)	(mmol/menit mg enzim) / (mg/mL enzim)
pH 6	0,0400	0,0650	0,0700	0,0675	0,0275	0,0006	0,0015
pH 7	0,0430	0,0750	0,0740	0,0745	0,0315	0,0024	0,0058
pH 8	0,1020	0,1390	0,1370	0,1380	0,0360	0,0045	0,0106
pH 9	0,0920	0,1480	0,1490	0,1485	0,0565	0,0139	0,0326
pH 10	0,1200	0,2490	0,1470	0,1980	0,0780	0,0237	0,0557
pH 11	0,1620	0,2010	0,2070	0,2040	0,0420	0,0072	0,0170
pH 12	0,1260	0,1680	0,1620	0,1650	0,0390	0,0059	0,0138

C.4.2 tabel data kurva karakterisasi pH fraksi 50-70%

Vol sampel : 0,025 mL  
 Vol total : 1,20 mL  
 Waktu inkubasi : 15 menit  
 Pers. Linier :  $y=0,0838x +0,0261$   
 Mr PNP : 139

<b>pH</b>	<b>Kontrol</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>Rata2</b>	<b>Sampel-Kontrol</b>	<b>(mmol/menit mg enzim)</b>	<b>(mmol/menit mg enzim) / (mg/mL enzim)</b>
pH 6	0,0400	0,0690	0,0670	0,0680	0,0280	0,0008	0,0021
pH 7	0,0430	0,0720	0,0740	0,0730	0,0300	0,0017	0,0045
pH 8	0,1020	0,1690	0,1670	0,1680	0,0660	0,0182	0,0461
pH 9	0,0920	0,1580	0,1690	0,1635	0,0715	0,0207	0,0524
pH 10	0,1200	0,2590	0,1870	0,2230	0,1030	0,0352	0,0889
pH 11	0,1620	0,2050	0,2070	0,2060	0,0440	0,0081	0,0206
pH 12	0,1260	0,1580	0,1690	0,1635	0,0375	0,0052	0,0131