

**Immobilization of *Rhizopus oryzae* Lipase on Zeolit, CaCO₃,
Silica Gel, and Cow Bone**

(Imobilisasi Lipase *Rhizopus oryzae* pada Zeolit, CaCO₃, Silika Gel, dan Tulang Sapi)

Maria Bintang¹, Tri Panji², Susy Saadah^{1*}

¹Department of Biochemistry, Bogor Agricultural University, Bogor, 16680, Indonesia

²Indonesian Research Institute for Biotechnology and Bioindustry, Bogor, 16151, Indonesia

Received: 19 May 2015; Accepted: 29 July 2015

*Corresponding author: Susy Saadah, S.Si ; Departemen Biokimia, Jl. Agatis Gd. Fapet Lt. 5, Wing 5, Bogor 16680; Telp/Fax. +62251-8423267; Email: susysaadah90@gmail.com

ABSTRACT

Food production in Indonesia is constrained by the high cost of lipase that is still imported from abroad. To overcome this problem, research of food production has been conducted using crude extract of lipase produced by indigenous species of fungi *Rhizopus oryzae*. The *R. oryzae* is edible indicating that it is safe to be used in the production of food products. Enzymes have an ability to catalyze specific chemical reactions with high efficiency and low energy cost. Enzyme immobilization is a recovery technique that has been studied in several years, using supporting materials as a medium to help enzyme dissolutions to the substrate. Several supporting materials such as zeolit, CaCO₃, silica gel, and cow bone were selected by its ability to adsorb lipase. CaCO₃ shows enzyme loading rate respectively 99.46%, giving more lipase to adsorb than zeolit (90.69%), cow bone (91.56%), and silica gel (59.63%). In this research, condition factors, such as optimum pH, optimum temperature, and storage ability of the matrix were investigated. Free lipase reacts optimally at pH 7 and temperature 30°C. Identical result showed for lipase in cow bone. Lipase in CaCO₃ reacts optimally at pH 8 and temperature 35°C. Lipase in zeolit and silica gel reacts optimally at pH 8 and temperature 30°C. Half life time estimation was one week in storage condition temperature at 4°C and each optimum pH.

Keywords: immobilization, lipase, *Rhizopus oryzae*

ABSTRAK

Produksi pangan di Indonesia terkendala dengan tingginya harga lipase yang masih diimpor dari luar negeri. Untuk mengatasi masalah tersebut, telah dilakukan penelitian produksi pangan menggunakan ekstrak kasar lipase yang dihasilkan oleh jenis fungi lokal *Rhizopus oryzae*. Jenis fungi *R. oryzae* ini bersifat aman sehingga aman untuk dimanfaatkan dalam produksi pangan. Enzim merupakan biokatalis yang potensial untuk dikembangkan karena efektivitasnya yang tinggi dan bersifat

spesifik serta mampu mengkatalisis reaksi kimia dengan efisien dan dengan kebutuhan energi yang rendah. Imobilisasi merupakan teknik perolehan kembali enzim yang menjadi perhatian dalam beberapa tahun belakangan, dilakukan dengan bantuan bahan pendukung sebagai media yang dapat mencegah terlarutnya enzim. Beberapa macam pendukung seperti zeolit, CaCO_3 , silika gel, dan tulang sapi. CaCO_3 memiliki kemampuan adsorpsi terbesar (99.46%), lebih besar dibandingkan zeolit (90.69%), tulang sapi (91.56%), dan silika gel (59.63%). Dalam penelitian ini, diselidiki faktor dari setiap bahan pendukung seperti pH optimum, suhu optimum, dan waktu penyimpanan. Lipase bebas bekerja optimal pada pH 7 dan suhu 30°C. Hasil yang sama lipase amobil tulang sapi. Pada lipase amobil CaCO_3 bekerja optimal pada pH 8 dan suhu 35°C. Lipase amobil zeolit dan silika gel bekerja optimal pada pH 8 dan suhu 30°C. Waktu paruh penyimpanan lipase sebesar 1 minggu dengan kondisi penyimpanan pada suhu 4°C dan pH optimum masing-masing.

Kata kunci: imobilisasi, lipase, *Rhizopus oryzae*

1. PENDAHULUAN

Lipase (asilhidrolase triasilgliserol, EC 3.1.1.3) merupakan enzim yang mengkatalis hidrolisis dari trigliserida rantai panjang menjadi trigliserida rantai pendek, asam lemak bebas, dan gliserol (Reda *et al.* 2007). Lipase juga terlibat dalam banyak reaksi konversi seperti esterifikasi, transesterifikasi, alkoholisis, asidolisis, dan aminolisis. Banyaknya peran lipase dalam berbagai reaksi membuat enzim ini memiliki banyak kegunaan dalam industri seperti industri makanan, farmasi, tekstil, kertas, dan kosmetik (Ibegbulam-njoku *et al.* 2014)

Lipase banyak ditemukan di alam baik pada hewan, tumbuhan, maupun mikroorganisme. Lipase komersial pada umumnya berasal dari jamur (*Rhizomur*, *Rhyomur*, dan *Candida*) dan bakteri (*Pseudomonas* dan *Chromobacterium*) (Shah *et al.* 2009). Harga lipase komersial biasanya sangat tinggi karena proses produksinya yang sulit dan memerlukan waktu yang lama (Kirk *et al.* 2002). Untuk mengatasi masalah tersebut diperlukan suatu metode dalam memproduksi lipase dengan murah. Salah satunya dapat dilakukan dengan memfermentasikan mikroba tertentu yang mampu menghasilkan li-

pase. Panji *et al.* (2008) telah melakukan fermentasi CPO (Crude Palm Oil) dengan *Neurospora sitophila* dan dilaporkan mampu memproduksi lipase spesifik 1,3-gliserida. Kapang lokal jenis ini dikenal aman (*edible*) karena biasa digunakan dalam pembuatan oncom merah. Kapang lokal lain yang juga aman adalah *Rhizopus* sp yang dikenal sebagai jamur tempe kedelai.

Lipase yang biasa digunakan dalam proses industri merupakan lipase amobil. Beberapa keuntungan dari lipase amobil adalah peningkatan aktivitas dan stabilitas enzim, dan kemudahan perolehan enzim amobil di akhir reaksi (Kharrat *et al.* 2011). Metode adsorpsi merupakan metode penjeratan enzim berdasarkan interaksi ikatan ionik, interaksi ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik antara enzim atau sel mikroba dengan bahan penyangga. Metode ini tidak menyebabkan kerusakan konformasi enzim atau destruksi pada pusat aktif enzim (Wang *et al.* 2009). Amobilisasi enzim menggunakan teknik ini dilakukan oleh Panji *et al.* (2010) dengan tulang sapi, Lee *et al.* (2006) dengan silika gel, Ghamgui *et al.* (2004) dengan CaCO_3 , dan Apriyanti (2012) dengan zeolit. Pada penelitian ini, dilakukan pengamatan tentang bahan pendukung yang akan dipakai.

2. METODOLOGI

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah enzim lipase yang diproduksi dari isolat *Rhizopus oryzae* yang diperoleh dari Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, akuades, PDA, $MgSO_4$, KH_2PO_4 , pepton, gliserol, heksana, bufer Tris-HCl, aseton, polivinil alkohol, bufer fosfat-sitrat, etanol, NaOH, fenolftalein, $CaCO_3$, silika gel, zeolit ukuran 3-10 mm, tulang sapi bagian paha, kertas saring Whatman No. 40, alkohol 70%, aluminium foil.

Produksi Enzim Kasar Lipase (Palilingan 2013)

Isolat kapang yang tumbuh dalam media agar-agar kentang (PDA) diremajakan kembali dengan diinokulasikan ke dalam media PDA baru, kemudian diinkubasi pada suhu ruang (27-30°C) selama 3-4 hari. Spora yang tumbuh dalam media PDA diambil sebanyak 1 ose lalu diinokulasikan dalam masing-masing 100 mL medium fermentasi steril yang mengandung CPO 3% dengan total volume sebanyak 500 mL dan diinkubasi pada suhu ruang (27-30°C) selama 5 hari sambil digoyang dengan kecepatan agitasi 75 rpm. Setelah dilakukan proses fermentasi, enzim yang dihasilkan dipanen. Untuk memisahkan biomassa (spora) dengan filtrat dilakukan penyaringan vakum dengan menggunakan kertas saring yang telah diketahui bobot massanya. Biomassa sel dikeringkan dalam oven dengan suhu 60°C hingga bobotnya konstan dan dihitung biomassa sel keringnya sedangkan filtrat diambil untuk dilakukan proses pengendapan dan isolasi enzim.

Pengendapan dan Isolasi Enzim Lipase

Pengendapan dan isolasi enzim lipase dari kapang *R. oryzae* dilakukan menurut metode pengendapan enzim menggunakan aseton. Semua tahap dikerjakan pada suhu 4°C. Filtrat enzim kasar lipase yang diperoleh dari tahap pemanenan enzim diendapkan proteinnya menggunakan aseton dingin dengan nisbah filtrat dan aseton 1:2 (v/v). Setelah itu campuran disentrifugasi dengan kecepatan 8.400g selama 15 menit pada suhu 4°C. Setiap endapan yang diperoleh dilarutkan ke dalam 1 ml bufer Tris HCl 0,05 M pH 7. Larutan enzim yang didapat, diambil 1-2 mL untuk diuji aktivitasnya.

Imobilisasi Enzim Lipase

Imobilisasi Enzim Lipase dengan Zeolit (Apriyanti 2012)

Butiran zeolit berukuran 3-10 mm sebelum digunakan sebagai padatan pendukung dicuci dengan air sampai air cucian tersebut jernih dan tidak keruh, kemudian zeolit direndam dalam larutan NaCl 1 M selama 12 jam dengan dua kali penggantian larutan perendam sambil digoyang perlahan. Butiran zeolit kemudian diaktivasi dengan memanaskan di dalam oven pada suhu 200°C selama 15 menit. Imobilisasi lipase dilakukan dengan cara merendam 70 gram zeolit teraktivasi ke dalam 210 mL larutan enzim larutan enzim hasil pengendapan dengan aseton dan dikocok pada kecepatan agitasi 180 rpm selama satu jam pada suhu ruang (25-30°C), kemudian cairan yang tersisa dipisahkan. Penentuan jumlah enzim amobil dilakukan berdasarkan pengukuran kadar protein cairan enzim sebelum dan setelah imobilisasi menggunakan metode Bradford dengan standar protein BSA (*Bovine Serum Albumin*), serta pengukuran lipasannya.

Imobilisasi Enzim Lipase dengan CaCO₃ (Ghamgui *et al.* 2004)

Sebanyak 70 gram CaCO₃ ditambahkan ke dalam 210 mL larutan enzim hasil pengendapan dengan aseton. Campuran diinkubasi selama 1 jam pada suhu 4°C. Setelah itu ditambahkan 100 mL aseton, lalu suspensi disaring menggunakan corong Buchner, kemudian dicuci dua kali dengan 100 mL aseton dingin, dan dikeringkan menggunakan vakum desikator pada suhu kamar (25-30°C) selama 6 jam dan disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan. Penentuan jumlah enzim amobil dilakukan berdasarkan pengurangan kadar protein cairan enzim sebelum dan setelah imobilisasi menggunakan metode Bradford dengan standar protein BSA (*Bovine Serum Albumin*), serta pengurangan lipasenya.

Imobilisasi Enzim Lipase dengan Silika gel (Lee *et al.* 2006)

Sebanyak 70 mg silika gel dicampur dengan 210 mL larutan lipase dan diinkubasi pada 20°C. Lipase amobil yang diperoleh dicuci dengan akuades dan kemudian dikeringkan pada suhu kamar (25-30°C) semalaman. Penentuan jumlah enzim amobil dilakukan berdasarkan pengurangan kadar protein cairan enzim sebelum dan setelah imobilisasi menggunakan metode Bradford dengan standar protein BSA (*Bovine Serum Albumin*), serta pengurangan lipasenya.

Imobilisasi Enzim Lipase dengan Butiran Tulang Sapi (Panji *et al.* 2010)

Tulang paha sapi dikeringkan menggunakan oven, dihancurkan dengan grinder hingga berdiameter 0,3-1,0 cm. Butiran tulang dicuci dengan heksana hingga terbebas dari lemak, dicuci dengan detergen (surfaktan) dan

dikeringkan kembali dengan oven pada suhu 105°C sampai beratnya tetap. Imobilisasi lipase dilakukan dengan cara menambahkan masing-masing 70 gram butiran tulang ke dalam 210 mL larutan lipase hasil pengendapan dengan aseton, digoyang menggunakan *shaker* pada 180 rpm selama satu jam, kemudian cairan dipisahkan. Penentuan jumlah enzim amobil dilakukan berdasarkan pengurangan kadar protein cairan enzim sebelum dan setelah imobilisasi menggunakan metode Bradford dengan standar protein BSA (*Bovine Serum Albumin*), serta pengurangan lipasenya.

Analisis Aktivitas Enzim Lipase (Ibegbulamnjoku *et al.* 2014)

Penentuan aktivitas enzim lipase dilakukan dengan melarutkan 3 gram CPO dan 1 gram polivinil alkohol dalam 40 mL bufer fosfat-kalium pH 7. Sebanyak 1 mL enzim lipase ditambahkan dalam larutan lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 20 mL campuran aseton : etanol (1:1 v/v). Kemudian sampel dititrasi menggunakan NaOH 1 N menggunakan indikator fenolftalein hingga titik akhir berwarna merah muda. Untuk blanko dilakukan prosedur yang sama tanpa perlakuan penambahan enzim. Penentuan kadar asam lemak bebas dapat dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Aktifitas enzim lipase} = \frac{\text{Vol NaOH (mL)} \times [\text{NaOH}] (\text{M})}{\text{Vol lipase (mL)} \times \text{Waktu reaksi (menit)}}$$

Satu unit aktivitas lipase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang digunakan untuk membebaskan 1 mol asam lemak bebas per menit (1 U = 1 mol FFA/menit).

Optimasi pH lipase bebas dan imobil (Yesiloglu dan Sit 2011)

Optimasi pH dilakukan dengan menggunakan bufer Tris-HCl pada pH 5, 6, 7, 8, dan 9. Aktivitas ditentukan pada suhu 37°C selama 5 menit. Aktivitas tertinggi berdasarkan uji aktivitas lipase imobil menunjukkan pH optimum lipase. Stabilitas enzim imobil terhadap pH diuji dengan menginkubasi enzim dalam larutan bufer pada berbagai pH (5-10 dengan selang 1) selama 1 jam. Setelah inkubasi, larutan enzim dengan cepat didinginkan dalam wadah berisi es dengan suhu 0°C selama 10 menit. Aktivitas enzim yang tersisa diuji dengan reaksi enzimatik lipase pada pH optimum. Nilai aktivitas enzim imobil tersisa dinyatakan dalam persentase dari aktivitas setelah perlakuan dibandingkan dengan kontrol (enzim imobil tanpa perlakuan).

Optimasi suhu lipase bebas dan imobil (Yesiloglu dan Sit 2011)

Optimasi suhu dilakukan dengan variasi suhu 25, 30, 35, dan 40°C. Aktivitas tertinggi berdasarkan uji aktivitas lipase menunjukkan suhu optimum lipase. Stabilitas enzim terhadap suhu diuji dengan menginkubasikan larutan enzim pada berbagai suhu (25-40°C dengan selang 5°C) selama 1 jam dalam buffer dengan pH optimum. Setelah inkubasi selesai larutan enzim dengan cepat didinginkan dalam penangas es. Aktivitas enzim imobil yang tersisa diuji dengan reaksi enzimatik lipase pada pH dan suhu optimum. Nilai aktivitas enzim imobil tersisa dinyatakan dalam persentase dari aktivitas setelah perlakuan dibandingkan dengan kontrol (enzim tanpa perlakuan).

Stabilitas penyimpanan lipase bebas dan imobil (Yesiloglu dan Sit 2011)

Enzim bebas dan imobil disimpan dalam suhu 4°C dalam 50 mM bufer tris-HCl berdasarkan pH optimumnya. Pengambilan dan analisis aktivitas sampel dilakukan dari minggu pertama hingga minggu keenam.

3. HASIL

Kemampuan Imobilitas Bahan Pendukung

Enzim lipase bebas (nonamobil) hasil pengendapan dengan aseton diuji aktivitas lipasenya, diperoleh hasil sebesar 4.244 mol/menit. Konsentrasi enzim imobil diperoleh dari selisih konsentrasi larutan enzim sebelum dan setelah imobilisasi. Diantara keempat bahan pendukung yang digunakan, CaCO₃ memiliki kemampuan terbesar, lebih besar dibandingkan dengan tulang sapi, zeolit, dan silika gel. Secara lengkap konsentrasi lipase imobil pada masing-masing bahan pendukung dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Persentase konsentrasi enzim imobil

Bahan Pendukung	Enzim dalam larutan yang terimobil (%)
Zeolit	90.69
CaCO ₃	99.46
Silika gel	59.63
Tulang sapi	91.56

pH Optimum Lipase Imobil

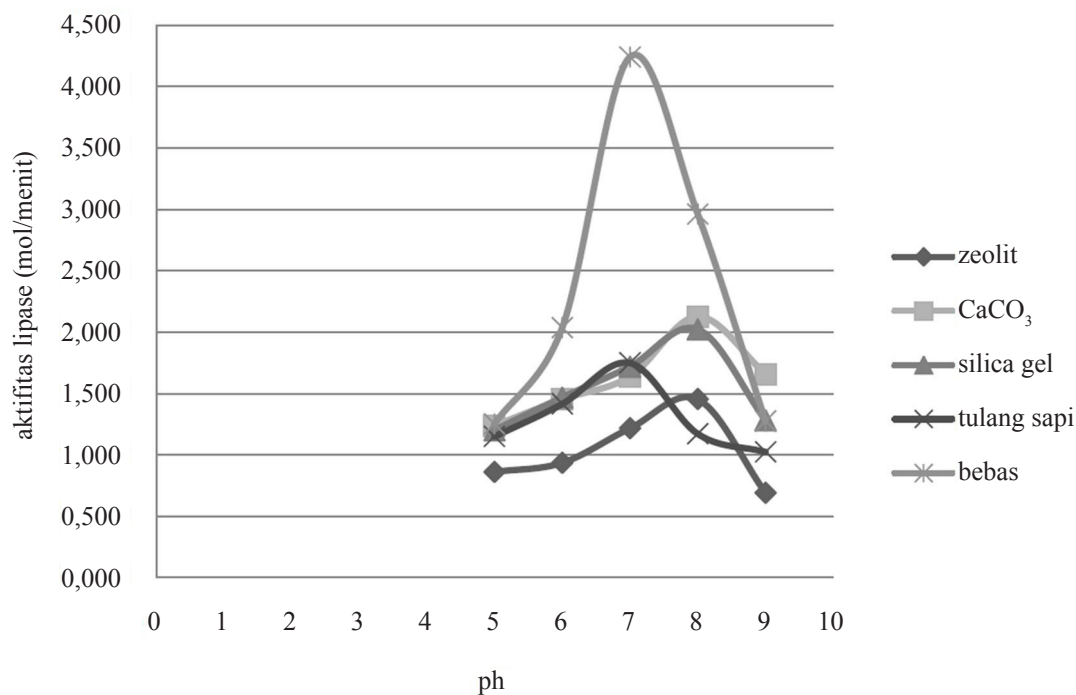
Lipase imobil pada bahan pendukung berupa zeolit, CaCO₃, silika gel, dan tulang sapi diuji aktivitasnya pada berbagai pH untuk menentukan pH optimum, kemudian dibandingkan dengan lipase bebas. Lingkungan dimana enzim akan mengkatalis reaksi secara optimal harus berada pada kondisi optimum enzim untuk bereaksi. Zona ini diberikan oleh parameter derajat keasaman (pH). Setiap enzim memiliki

karakter yang berbeda dimana kondisi optimum pH lingkungan akan spesifik untuk tiap enzim. Kondisi pH yang jauh dari kondisi spesifik ini akan menyebabkan inaktivasi enzim karena enzim mengalami kerusakan struktur. Dari hasil percobaan diperoleh pH optimum lipase bebas sebesar 7, hal yang sama juga diperoleh untuk lipase imobil tulang sapi. Namun pada lipase imobil CaCO_3 , zeolit, dan silika gel diperoleh pH optimum sebesar 8. Secara lengkap pengaruh pH terhadap stabilitas enzim imobil pada masing-masing bahan pendukung dapat dilihat pada Gambar 2.

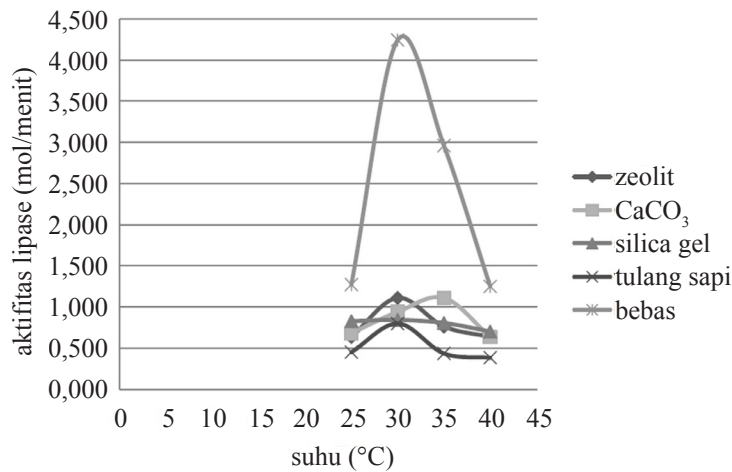
Suhu Optimum Lipase Imobil

Seperti halnya perubahan kondisi pH, enzim memiliki kondisi optimal dengan adanya perubahan suhu. Laju reaksi akan meningkat sejalan dengan kenaikan suhu sampai pada ba-

tas optimalnya, kemudian aktivitas akan menurun setelah melewati kondisi tersebut karena enzim akan mengalami denaturasi. Suhu yang terlalu rendah akan menyebabkan aktivitas enzim kurang baik. Lipase imobil pada bahan pendukung berupa zeolit, CaCO_3 , silika gel, dan tulang sapi diuji aktivitasnya pada berbagai suhu untuk menentukan suhu optimum, kemudian dibandingkan dengan lipase bebas. Dari hasil percobaan diperoleh suhu optimum lipase bebas sebesar 30°C , hal yang sama juga diperoleh untuk lipase imobil tulang sapi, silika gel, dan zeolit. Namun pada lipase imobil CaCO_3 diperoleh suhu optimum sebesar 35°C . Secara lengkap pengaruh suhu terhadap stabilitas enzim imobil pada masing-masing bahan pendukung dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 2 pH optimum lipase bebas dan imobil

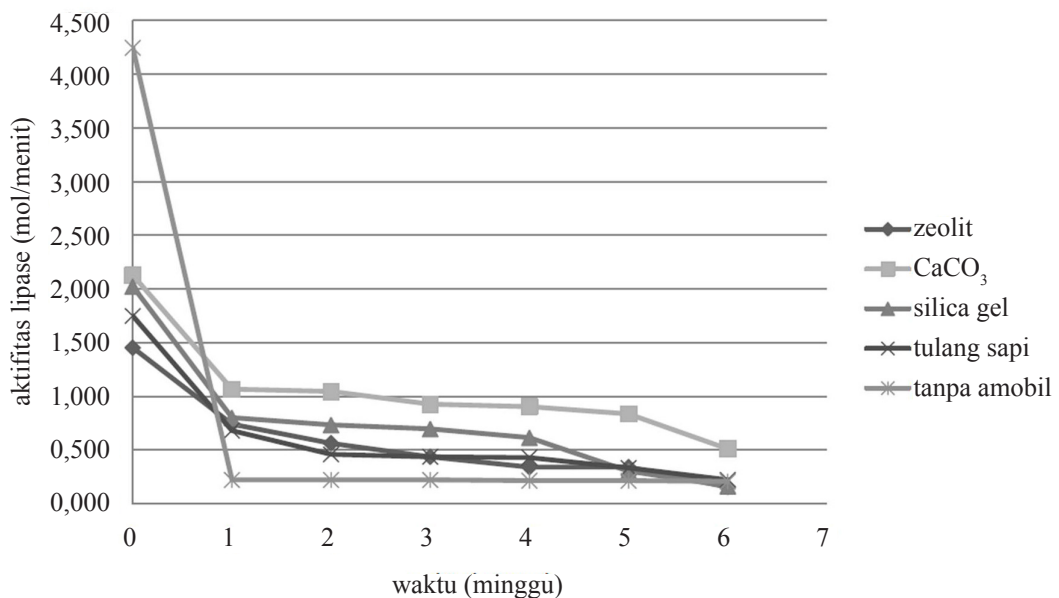


Gambar 3 Suhu optimum lipase bebas dan imobil

Kestabilan Lipase *Rhizopus oryzae* Kestabilan Lipase *Rhizopus oryzae* Imobil Selama Penyimpanan

Lipase imobil pada bahan pendukung berupa zeolit, CaCO₃, silika gel, dan tulang sapi diuji aktivitasnya pada berbagai waktu penyimpanan kemudian dibandingkan dengan lipase bebas. Penyimpanan lipase imobil pada jangka waktu dan suhu tertentu adalah salah satu faktor kunci yang cukup dipertimbangkan. Enzim

umumnya tetap aktif saat disimpan pada suhu rendah, dikarenakan enzim cenderung untuk menjaga struktur aslinya. Atas dasar tersebut lipase disimpan pada suhu 4°C. Aktivitas lipase bebas lebih tinggi dibandingkan seluruh lipase imobil pada sebelum penyimpanan. Namun, aktivitas lipase bebas menurun hingga dibawah aktivitas seluruh lipase imobil setelah penyimpanan pada minggu pertama. Secara lengkap pengaruh waktu penyimpanan terhadap stabili-



Gambar 4 Pengaruh waktu penyimpanan lipase bebas dan imobil

tas enzim imobil pada masing-masing bahan pendukung dapat dilihat pada Gambar 4.

4. PEMBAHASAN

Rhizopus oryzae merupakan fungi yang termasuk dalam jenis kapang yang banyak digunakan dalam proses pembuatan tempe kedelai. *R. oryzae* dipilih karena kapang lokal jenis ini bersifat tidak toksik, mudah diperoleh, pertumbuhan relatif cepat. Isolat *R. oryzae* diremajakan dalam media agar kentang (PDA) lalu diinkubasi selama tiga hari, dan inkubasi fermentasi dilakukan selama lima hari, dikarenakan berdasarkan penelitian Perwitasari (2008) yang menunjukkan tingginya aktivitas lipase isolat *Rhizopus oryzae* pada saat tersebut. Selanjutnya dilakukan isolasi enzim lipase untuk memekatkan lipase dari cairan hasil fermentasi (Murni *et al.* 2015). Isolasi enzim yang diperoleh menggunakan teknik pengendapan dengan pelarut organik aseton. Penambahan pelarut organik dalam cairan fermentasi mengurangi kelarutan protein dengan mengurangi konstanta dielektrik larutan. Pengendapan terjadi lebih mudah ketika pH dekat dengan pI protein (Panesar *et al.* 2010). Selanjutnya, aktivitas lipase ditentukan dengan penentuan kadar asam lemak bebas yang terbentuk melalui proses pemecahan ikatan ester oleh lipase (Ibegbulam-njoku *et al.* 2014). Diperoleh hasil sebesar 4.244 mol/menit (4.244 U), yang berarti terjadi pembebasan 4.244 mol asam lemak bebas dalam setiap satu menit oleh enzim lipase.

Seperti dapat dilihat pada Tabel 1, bahan pendukung CaCO_3 menunjukkan konsentrasi protein tertinggi sebesar 99.46%, dibandingkan tulang sapi yang sebesar 91.56% dan zeolit yang hanya sebesar 90.69%. Hal ini dikarenakan luas

permukaan struktur bubuk CaCO_3 yang lebih besar dibandingkan butiran tulang sapi dan butiran zeolit. Semakin besar luas permukaan bahan pendukung maka semakin besar konsentrasi protein yang dapat terabsorpsi (Zou *et al.* 2014). Dari sisi struktur bahan, CaCO_3 merupakan garam yang memiliki gaya antarmolekul dengan larutan lipase cukup baik (Wulan *et al.* 2007).

Tulang sapi merupakan adsorben organik yang sudah mengalami deproteinasi dan demineralisasi, meninggalkan pori yang dapat diisi oleh zat lain. Dengan pori yang besar dan luas permukaan yang besar, tulang sapi dapat menyerap lipase dengan baik dibandingkan zeolit. (Wulan *et al.* 2007). Zeolit merupakan padatan kristal yang telah digunakan secara luas dalam adsorpsi molekul. Zeolit memiliki gugus hidroksil yang dapat membentuk ikatan hidrogen yang kuat dengan enzim. Selain itu, zeolit memiliki permukaan heterogen yang cocok dengan beberapa sisi adsorpsi enzim (Datta *et al.* 2013)

Namun pada bahan pendukung silika gel menunjukkan aktivitas terendah yaitu sebesar 59.63%. Silika adalah material yang *porous* dan *amorphous*. Silika gel merupakan partikel adsorben alamiah, dimana zat ini akan menyerap air dengan batas tertentu. Kemampuan adsorpsi permukaan dan intra molekul silika gel sudah terbukti luas. Namun yang membuat kemampuan adsorpsi silika gel rendah adalah karena silika gel yang berbentuk padat memiliki kekuatan tarik antar partikel yang rendah dibandingkan CaCO_3 (Wulan *et al.* 2007). Selain itu, hal tersebut dikarenakan permukaan silika gel tidak bersifat *inert* secara fisik dengan lipase (Ghamgui *et al.* 2004). Hal ini yang diperkirakan menyebabkan lipase tidak terikat kuat dengan silika gel.

pH optimum lipase bebas sama seperti lipase imobil tulang sapi yaitu pada pH 7. Namun pH optimum diperoleh pada pH 8 untuk lipase yang imobil zeolit, CaCO₃, dan silika gel. Hal ini menunjukkan matriks bersifat polianion. Pendistribusian ion hidroksida yang berbeda antara dekat dengan permukaan di dalam matriks, dimana muatan positif dekat dengan sisi pengikatan enzim, mengakibatkan enzim imobil zeolit, CaCO₃, dan silika gel memiliki pH optimum yang lebih tinggi dibandingkan pH optimum pada lipase bebas (Pereira *et al.* 2001)

Suhu optimum pada lipase bebas sama seperti suhu optimum pada lipase imobil zeolit, silika gel, dan tulang sapi yaitu sebesar 30°C. Namun terjadi peningkatan suhu optimum pada lipase imobil CaCO₃ yaitu sebesar 35°C. Imobilisasi lipase *Rhizopus oryzae* pada CaCO₃ dapat mengakibatkan meningkatnya termostabilitas enzim dan memperluas potensi bioteknologi, karena bioproses berjalan pada suhu yang lebih tinggi dapat meningkatkan tingkat difusi, menurunkan viskositas substrat, dan meningkatkan kelarutan reaktan (Klinik *et al.* 2006). Hal ini merupakan hal yang diinginkan, karena suhu operasional yang lebih tinggi akan menyebabkan resiko yang lebih rendah dari kontaminasi mikroba (Pereira *et al.* 2001)

Pada Gambar 4 terlihat bahwa aktivitas lipase bebas lebih tinggi lipase imobil pada minggu pertama. Namun aktivitas lipase imobil lebih tinggi dari pada lipase bebas sejak minggu kedua hingga minggu keenam. Lipase imobil lebih stabil dibandingkan enzim bebas dikarenakan dukungan matriks mencegah proses antarmolekul seperti proteolisis dan agregasi, oleh karena itu menciptakan molekul enzim yang lebih kaku (Yesiloglu & Sit 2011). Kesimpulan dari penelitian ini ialah CaCO₃ merupakan

bahan pendukung terbaik untuk imobilisasi, diikuti oleh tulang sapi, zeolit, dan silika gel.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Apriyanti S. 2012. Optimasi Produksi Diasilgliserol dari CPO dengan Biokonversi Enzim Lipase Spesifik 1,3 Amobil [Skripsi]. Bogor (ID) : Universitas Pakuan.
- Datta S, Christena LR, Rajaram YRS. 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Journal Biotech.* 3:1-9. DOI:10.1007/s13205-012-0071-7
- Ghamgui H, Chaabouni MK, Gargouri Y. 2004. 1-butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent free system. *Enzyme and Microbial Technology.* 35:355-363. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2004.06.002
- Ibegbulam-njoku PN, Achi OK, Chijioke-Osuji CC. 2014. Use of palm oil mill effluent as fermentative medium by lipase producing bacteria. *International Journal of Scientific & Engineering Research.* 5(2):1631-1640. DOI: 10.1590/S1516-89132011000100015
- Kharrat N, Yassine BA, Sana M, Youssef-Talel G, Maha K. 2011. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. *Process Biochemistry.* 46:1083-1089. DOI:10.1016/j.procbio.2011.01.029
- Kilinc A, Mustafa T, Azmi T. 2006. Immobilization of pancreatic lipase on chitin and chitosan. *Prep Biochem Biotechnol.* 36:153-163. DOI: 10.1080/10826060500533976
- Kirk, O. Vedel T. Crone C. 2002. Industrial Enzyme Application. *Current opinion on biotechnology.* 13:345-351. DOI: 10.1016/S0958-1669(02)00328-2
- Lee DH, Kim JM, Kang SW, Lee JW, Kim SW. 2006. Pretreatment of lipase with soybean oil before immobilization to prevent loss of activity. *Biotechnol Lett.* 28:1965-1969. DOI: 10.1007/s10529-006-9181-9
- Nelson DL, Cox MM. 2008. *Lehninger: Principles of Biochemistry 5th Edition.* New York: WH

- Freeman and Company.
- Palilingan SC. 2013. Optimasi produksi enzimatis diasilgliserol dari CPO dengan sistem kontinu [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Panesar PS, Marwaha SS, Chopra HK. 2010. *Enzymes Food Processing: Fundamental and Potential Application*. New Delhi: International Publishing House Pvt. Ltd.
- Panji T, Suharyanto, Arini N. 2008. Lipase Spesifik 1,3-Gliserida dari Fungi Lokal Untuk Bio-konversi CPO Menjadi Diasilgliserol. *Menara Perkebunan*. 76(1):11-22.
- Panji T, Syamsu K, Suharyanto, Fathurachman I. 2010. Amobilisasi desaturase asal *Absidia corymbifera* menggunakan butiran tulang sapi dan zeolit. *J. Tek. Ind. Pert.* 11(3):101-107.
- Pereira EB, Castro HF, Moraes FF, Zanin GM. 2001. Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa* : a comparative study between free and immobilized enzyme onto porous chitosan beads. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91:739-752. DOI: 10.1007/978-1-4612-0217-2_62.
- Perwitasari U. 2008. Optimasi Produksi Enzimatik dan Isolasi DAG dari CPO [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Reda BA, El-louboudey SS, Sidley NM, Abd El-Rahman MA. 2007. Production, purification and characterization of thermoalkalophilic lipase for application in bio-detergent industry. *J. Appl. Sci Res*, 39(12):1752-1765. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.06.001
- Shah AA, Hameed A, Hasan F. 2009. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances* 27:782-796. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.06.001
- Wang K, Yang H, Zhu L, Liao J, Lu T, Xing W, Xing S, Lv Q. 2009. Direct electrochemistry and electrocatalysis of glucose oxidase immobilized on glassy carbon electrode modified by nafton and ordered mesoporous. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 58: 194-198.
- Wulan M, Rejoso MT, Hermansyah H. 2007. *Seminar Tjipto Utomo*. Bandung, 30 Agustus 2007.
- Yesiloglu Y dan Sit L. 2011. Biochemical properties of free and immobilized *Candida rugosa* lipase onto Al₂O₃: a comparative study. *Artificial cells, blood substitutes and biotechnology*. 39:247-251. DOI: 10.3109/10731199.2010.533125
- Zou B, Hu Y, Cui F, Jiang L, Yu D, Huang H. 2014. Effect of surface modification of low cost mesoporous SiO₂ carriers on the properties of immobilized lipase. *Journal of Colloid and interface science*. 417:210-216. DOI: 10.1016/j.jcis.2013.11.029