

IMOBILISASI ENZIM LIPASE PADA PADATAN PENDUKUNG ZEOLIT ALAM

Fandhi Adi Wardoyo¹⁾, Aprilia Indra Kartika²⁾

^{1), 2)}Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Semarang
email: fandhiadi@unimus.ac.id

ABSTRACT

Lipase is one kind of enzyme that widely use. Lipase has a great catalytic power, but easily influenced by environments and difficult to separate at the ends of the reaction, so it can not be re-used. Based on that, one solution to overcome that problem is through the enzyme immobilization. Pancreatic lipase was immobilized by absorption method in zeolit as solid support. The aim of this research is to determine the optimum pH of lipase solubility. The activity of immobilized lipase was tested through the hydrolysis reaction of palm oil. The optimum pH for enzyme dissolution was obtained at pH 6 . Pancreatic lipase and immobilized lipase on zeolite can produce free fatty acid as much as 17,37% and 7,35% respectively.

Keywords: lipase, immobilization, zeolit, absorption

PENDAHULUAN

Enzim merupakan unit protein fungsional yang berperan mengkatalisis reaksi-reaksi dalam metabolisme sel dan reaksi-reaksi lain dalam tubuh. Spesifikasi enzim terhadap substratnya teramat tinggi dalam mempercepat reaksi kimia tanpa produk samping (Lehninger, 1982).

Lipase (triacylglycerol acylhydrolase) adalah enzim yang menghidrolisis triasilgliserol menjadi asam lemak bebas dan gliserol serta mempunyai aktivitas maksimum pada daerah interface minyak dan air (Brockhoff dan Jensen, 1974).

Enzim sangat mudah terpengaruh oleh kondisi pH dan juga suhu. Kestabilan enzim juga mudah terkontaminasi dengan produk yang dihasilkan karena enzim sulit dipisahkan setelah digunakan dalam suatu reaksi (Krajewska, 2004). Sulitnya memisahkan enzim di akhir reaksi ini menyebabkan sebagian besar enzim hanya digunakan untuk satu kali reaksi.

Untuk memisahkan enzim di akhir reaksi, agar dapat digunakan kembali, diperlukan suatu metode dengan cara mengikat enzim pada padatan yang tidak larut dalam air. Metode ini biasa disebut sebagai immobilisasi enzim.

Immobilisasi enzim artinya melokalisasi enzim, sehingga enzim dapat digunakan secara

berkelanjutan. Keuntungan dari immobilisasi enzim adalah enzim dapat dipisahkan di akhir reaksi, tanpa mengkontaminasi hasil reaksi, sehingga enzim dapat digunakan kembali untuk reaksi selanjutnya.

Salah satu metode immobilisasi enzim yang paling sederhana adalah dengan cara adsorpsi pada suatu padatan pendukung. Menurut Cahyaningrum (2009) padatan pendukung yang dapat digunakan dalam immobilisasi enzim harus area permukaan yang luas, dapat ditembus, tidak dapat larut, memiliki stabilitas kimia, stabilitas termal, kekakuan yang tinggi, mempunyai bentuk dan ukuran pori yang cocok, tahan terhadap serangan mikrobial dan dapat diregenerasi.

Zeolit alam merupakan mineral yang terdiri dari kristal aluminosilikat terhidrasi yang mengandung kation alkali atau alkali tanah. Kation ini dapat digantikan oleh kation atau molekul lain tanpa merusak struktur zeolit. Molekul lain yang menggantikan ini dapat bergerak bebas, sehingga memungkinkan zeolit untuk digunakan sebagai padatan pendukung dalam immobilisasi enzim (Amalia, 2002).

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas (Pyrex),

botol Falcon 50 mL, *magnetic stirrer*, penyaring Buchner, corong gelas, buret, mikropipet (10-200 μ L), timbangan digital (Shimadzu Libror EB-330), oven (WTB Binder), pH meter, almari es (*freezer*), desikator, Elisa reader, mikroplate, *Shaker Inkubator* (Seiwa RikoCo, Ltd, EFM-60).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah minyak kelapa sawit (Bimoli spesial), zeolit alam, enzim lipase pankreas, kertas saring *Whatman* 41, kertas indikator pH, akuades, n-heksana, etanol. Asam klorida (HCl), natrium monohidrogen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), natrium dihidrogen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), natrium hidroksida (NaOH), tembaga II sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), kalium natrium tartrat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), indikator phenolphthalein, bovin serum albumin (BSA).

Prosedur Kerja

Aktivasi Zeolit Alam

Aktivasi zeolit alam dilakukan dengan cara mencampurkan 30 g zeolit alam dengan 100 mL HCl 3M dan diaduk pada suhu 90°C selama 2 jam, kemudian didinginkan, disaring dan dicuci dengan aquades sampai air pencucian tidak berwarna kekuningan, lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 5 jam (Septiani dan Lisma, 2011).

Pengukuran Konsentrasi protein

Larutan standar dibuat dengan cara melarutkan Bovin Serum Albumin (BSA) dengan berbagai konsentrasi. Masing-masing variasi konsentrasi larutan diambil 100 μ L dan ditambah dengan 160 μ L biuret lalu dibaca absorbansinya pada λ 550 nm menggunakan elisa reader. Sebagai blangko digunakan campuran 100 μ L akuades ditambah 160 μ L biuret. Hasil absorbansi larutan standar digunakan untuk membuat kurva baku (absorbansi vs konsentrasi).

Pengukuran konsentrasi protein dilakukan dengan cara 100 μ L larutan protein ditambah 160 μ L reagen biuret kemudian dianalisis dengan elisa reader. Konsentrasi protein sampel didapatkan dengan memasukkan data absorbansi sampel ke dalam persamaan kurva standar.

Imobilisasi Enzim Lipase pada Zeolit Alam

Prosedur imobilisasi secara umum adalah dengan cara sebanyak satu gram zeolit alam teraktivasi ditambah dengan larutan enzim lipase 1% dan didiamkan selama satu jam, kemudian disaring dan didapatkanlah enzim terimobilisasi pada zeolit alam serta sisa larutan enzim. Filtrat yang dihasilkan diukur kadar proteinnya sesuai dengan prosedur pengukuran kadar protein enzim. Jumlah enzim lipase terimobilisasi merupakan hasil pengurangan jumlah enzim awal dikurangi jumlah enzim sisa.

Reaksi Hidrolisis Enzim Lipase

Sebanyak 1 gram minyak kelapa sawit dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan 10 μ L akuades lalu ditambah n-heksan hingga tanda batas. Larutan kemudian dipindahkan ke dalam botol falcon 50 mL dan ditambahkan 150 mg enzim lipase bebas. Larutan diaduk dalam shaker inkubator selama 5 jam pada suhu 37°C. Untuk kontrol reaksi digunakan minyak kelapa sawit tanpa ditambah enzim lipase dengan prosedur yang sama. Hasil reaksi disaring lalu filtrat ditambah 10 mL etanol dan 2-3 tetes indikator pp. Aktivitas enzim lipase diukur melalui penentuan asam lemak bebas yang terbentuk menggunakan larutan NaOH 0,05 M yang telah distandarisasi. Perhitungan unit aktivitas dan aktivitas spesifik menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ FFA} = \frac{\text{BM minyak} \times \text{M NaOH} \times \text{volume NaOH}}{\text{berat minyak}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{Unit Aktivitas (U)} = \frac{\text{volume NaOH} \times \text{M NaOH}}{\text{waktu reaksi}} \quad (2)$$

$$\text{Aktivitas Spesifik (U/mg)} = \frac{\text{unit aktivitas}}{\text{berat enzim}} \quad (3)$$

Pengaruh pH terhadap Kelarutan Enzim

Enzim lipase yang akan diuji mempunyai konsentrasi 1% (150mg/15mL). Enzim lipase bebas terlebih dahulu dilarutkan dalam buffer fosfat 0,05 M dengan variasi pH antara lain 5, 6, 7, 8 dan 9. Campuran dihomogenkan dengan cara diaduk menggunakan pengaduk magnet. Penggunaan pengaduk magnet dengan tujuan agar pengadukan lebih homogen. Penetapan

pH optimum perlu dilakukan untuk mengetahui pH yang dapat melarutkan enzim lipase paling banyak. Semakin banyak enzim lipase yang terlarut, semakin banyak pula enzim lipase yang nantinya akan terimobilisasi. Larutan enzim lalu diambil sebanyak 100 μ L untuk diukur absorbansinya dan akan digunakan untuk perhitungan konsentrasi enzim awal.

Zeolit alam yang telah diaktivasi lalu ditambah dengan larutan enzim lipase 1% dan didiamkan selama satu jam, kemudian disaring dan didapatkanlah enzim terimobilisasi pada zeolit alam serta sisa larutan enzim. Sisa larutan enzim diukur absorbansinya untuk mendapatkan konsentrasi enzim akhir.

Uji Aktivitas Enzim lipase Terimobilisasi

Uji aktivitas enzim lipase yang telah terimobilisasi dilakukan melalui reaksi hidrolisis. Metode yang digunakan sama dengan metode uji aktivitas enzim lipase bebas. Namun enzim lipase bebas diganti dengan enzim lipase yang telah terimobilisasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivasi Zeolit Alam

Zeolit alam yang akan digunakan perlu diaktivasi terlebih dahulu. Dari hasil aktivasi zeolit alam didapatkan rendemen sebesar

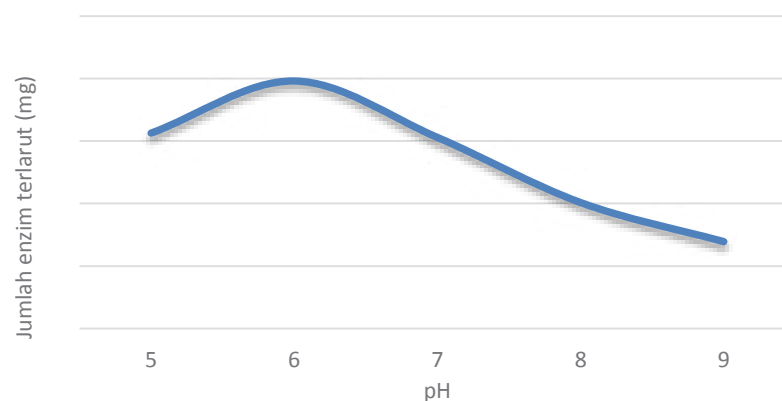
74,97%. Berkurangnya berat zeolit ini dikarenakan dengan adanya aktivasi akan membuang pengotor yang terdapat dalam zeolit alam. Dengan hilangnya pengotor, diharapkan kemampuan zeolit alam dalam mengikat enzim lipase menjadi semakin meningkat.



Gambar 1. a. Zeolit alam sebelum dihaluskan; b. Zeolit alam setelah dihaluskan; c. Zeolit alam teraktivasi

Pengaruh pH terhadap kelarutan enzim

Tahap awal dalam proses imobilisasi enzim lipase adalah pembuatan larutan enzim lipase menggunakan buffer fosfat berbagai variasi. Dalam penelitian ini, dilakukan variasi pH karena kelarutan enzim akan optimum pada pH tertentu. Pada pH yang terlalu tinggi atau terlalu rendah, enzim dapat mengalami deaktivasi. Deaktivasi ini dapat menurunkan daya kelarutan enzim. Hasil kelarutan enzim lipase dalam buffer fosfat disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Pengaruh pH terhadap kelarutan enzim

Dari Gambar 2 diatas menunjukkan bahwa jumlah enzim lipase terlarut paling banyak dalam buffer fosfat pH 6. Semakin banyak enzim lipase yang terlarut maka akan

semakin banyak pula enzim lipase yang terimobilisasi dalam zeolit.

Hal ini sesuai dengan penelitian Wardoyo (2014) yang menyebutkan bahwa enzim dapat mengalami deaktivasi pada pH yang

terlalu tinggi ataupun terlalu rendah. Menurut Maruyama (2000), pada pH optimum, sisi aktif enzim akan mudah terbuka, sehingga enzim yang terimobilisasi menjadi semakin banyak.

Uji Aktifitas Hidrolisis Enzim Lipase

Enzim lipase bebas terlebih dahulu diuji aktivitasnya melalui reaksi hidrolisis. Hal ini bertujuan untuk mengetahui apakah enzim lipase bebas yang akan dipakai masih mempunyai aktivitas hidrolisis atau tidak. Reaksi hidrolisis minyak kelapa sawit dengan enzim lipase bebas hanya menggunakan air yang sedikit, yaitu sebanyak 10 μ L. Air yang dibutuhkan dalam reaksi hidrolisis hanya dalam jumlah sedikit karena hanya berfungsi untuk mempertahankan aktivitas katalitiknya saja, jika air terlalu banyak maka akan mengganggu konformasi aktif protein dalam enzim (Kilbanov, 1986). Aktivitas enzim lipase berada pada daerah antar fase antara air dan minyak yang sangat kompleks (Svenden, 1994). Reaksi tersebut meliputi tahapan pengikatan enzim pada permukaan minyak, penetrasi enzim ke dalam fase minyak, aktivasi enzim, dan aksi katalisis. Menurut Haryadi pada tahun 1996, pelarut hidrofobik dapat meningkatkan aktivitas katalitik enzim lipase, sedangkan pelarut hidrofilik justru akan mengganggu aktivitas katalitik enzim lipase. Sehingga dalam penelitian ini digunakan pelarut organik berupa n-heksane.

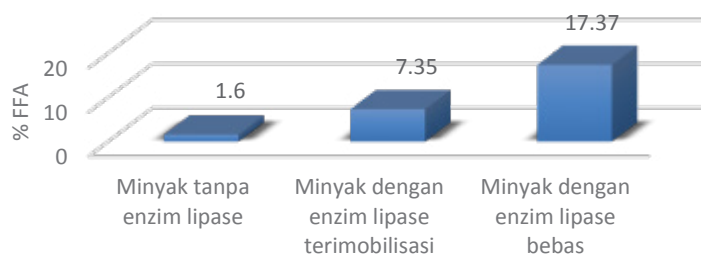
Dari hasil uji aktifitas enzim lipase bebas didapatkan enzim lipase bebas yang digunakan mempunyai Unit Aktifitas (U) sebesar 0,709 μ mol/menit dengan Aktifitas Spesifik sebesar 3,55 U/g.

Enzim lipase membebaskan asam-asam lemak dari ketiga posisi ikatan trigliserida menjadi asam lemak dan gliserol. Asam lemak yang terlepas sebagai asam lemak bebas ditentukan kadarnya dengan metode volumetri menggunakan NaOH. Titrasi dilakukan setelah penambahan etanol dan indikator phenolphthalein. Penambahan etanol berfungsi untuk melarutkan asam lemak yang telah dibebaskan dan juga untuk menghentikan reaksi hidrolisis.

Sebagai perbandingan, dilakukan juga reaksi hidrolisis menggunakan enzim lipase terimobilisasi. Imobilisasi enzim lipase dilakukan dengan cara melarutkan 0,2 gram enzim lipase dalam 20 mL buffer fosfat pH 6, sesuai dengan kondisi pH optimum pelarutan enzim. Enzim lipase yang telah dilarutkan kemudian ditambah dengan 1 gram zeolit alam yang telah teraktifasi dan distirrer selama satu jam. Setelah satu jam, larutan enzim disaring dan didapatkanlah sisa larutan enzim dan enzim lipase terimobilisasi.

Enzim lipase terimobilisasi diuji aktifitasnya dengan menggunakan reaksi hidrolisis minyak kelapa sawit dengan prosedur yang sama seperti hidrolisis dengan enzim lipase bebas. Hasil dari reaksi hidrolisis ditunjukkan pada Gambar 3 dibawah ini.

Hasil Reaksi Hidrolisis Minyak Kelapa Sawit



Gambar 3. Reaksi hidrolisis minyak kelapa sawit

Dari gambar 3 diatas, aktivitas enzim lipase terimobilisasi pada kitosan lebih kecil dibandingkan dengan aktivitas enzim lipase bebas dikarenakan adanya hambatan-hambatan apabila enzim berada dalam bentuk imobil. Hambatan-hambatan tersebut antara lain karena sifat fisika kimia enzim lipase dalam bentuk imobil fase barunya berbeda dengan fase pada saat masih enzim lipase bebas. (Ferdiansyah, 2005). Hambatan lain yang terjadi adalah adanya perubahan konformasi karena reaksi asam amino dengan senyawa pengikat silang atau padatan pendukung yang ditambahkan (Suhartono, 1989).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari hasil penelitian didapatkan bahwa pH optimum diperoleh pada pH 6. Reaksi hidrolisis tanpa enzim lipase pada minyak kelapa sawit menghasilkan asam lemak bebas sebesar 1,6%, minyak dengan enzim lipase menghasilkan asam lemak bebas sebanyak 17,37% dan minyak dengan enzim lipase terimobilisasi menghasilkan asam lemak bebas sebanyak 7,35%.

Saran

Dalam penelitian ini masih banyak hal-hal yang perlu dikembangkan, antara lain perlu dilakukan, antara lain uji stabilitas termal dan juga stabilitas penggunaan berulang enzim lipase terimobilisasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Amalia, 2002, Amobilisasi Enzim Papain dari Getah Pepaya pada Zeolit Alam yang Telah Diaktifasi, Universitas Andalas, Padang.
- Brockerhoff, I dan R.G. Jensen, 1974, *Lipolytic Enzymes*, Academic Press, London.
- Cahyaningrum Sari Edi, 2009, Peranan Jembatan Kation Logam Dalam Imobilisasi Papain Pada Kitosan,

Disertasi, Jurusan Kimia FMIPA UGM, Yogyakarta.

- Ferdiansyah, V., 2005, Pemanfaatan Kitosan dari Cangkang Udang Sebagai Matriks Penyangga pada Imobilisasi Enzim Protease, *Skripsi*, Fak. Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB, Bogor.
- Haryadi, P., 1996, Katalisis Enzimatis dalam Pelarut Organik, *J. Ilmu Kimia dan Teknologi Pangan*, 1, 1, 42-60.
- Klibanov, A.M., 1986, Enzyme That Work in Organic Solvent, *Chemtech*, 16, 354-144
- Krajewska, B., 2004, Application of Chitin and Chitosan based Materials for Enzyme Immobilizations: a Review, *Enz Microb. Technol.*, 35, 126-139
- Lehninger, A.L. 1990, *Dasar-dasar Biokimia* (diterjemahkan oleh Maggy Thenawidjaya), *Edisi 1*, Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Maruyama, T., Nakajima, M., Ichikawa, S., Nabetani, H., Furusaki, S., dan Seki, M., 2000, Oil-Water Interfacial Activation of Lipase for Interesterification of Triglyceride and Fatty Acid, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 1121-1126
- Septiani, Upita dan Lisma, Agrina. 2011. Pemanfaatan Zeolit Alam Sebagai Media Pendukung Amobilisasi Enzim α -Amilase. *J. Ris. Kim.* 5. 1978-628X.
- Suhartono, M.T., 1989, *Enzim dan Bioteknologi*, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Svenden, A., 1994, Engineered Lipase for Practical Use, *INFORM*, 5, 5.
- Wardoyo, Fandhi A., 2014, Pengaruh Derajat Deasetilasi Kitosan dan pH Pelarutan Enzim Terhadap Kemampuan Imobilisasi Lipase pada Kitosan Serbuk, *Prosiding Seminar Nasional Hasil-hasil Penelitian & Pengabdian*, 09 Agustus 2014, Semarang.