

# Produksi Lipase Kapang Lipolitik Pada Limbah Ampas Kelapa

## *Lipase production from lipolytic fungi in coconut oil cake*

Eko Suyanto<sup>1)</sup>, Endang Sutariningsih Soetarto<sup>1)</sup>, Muhammad Nur Cahyanto<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Jl. Teknika Selatan,  
Bulaksumur Yogyakarta 55281

<sup>2)</sup>Laboratorium Pengelolaan Limbah dan Lingkungan, Fakultas Teknologi Terapan, Universitas  
Gadjah Mada, Jl. Flora no. 1Bulaksumur Yogyakarta 55281

E-mail korespondensi: 01.suyanto.31@gmail.com

**Abstract** – Lipase has any important functions for industry. The research aims were to found lipolytic fungi be able growth and produce highest activity in coconut oil cake using solid state fermentation. Isolates of fungi were purified and done selection of lipolytic fungi for produce of lipase using coconut cake oil as substrate. The result showed that 8 isolates of lipolytic fungi can growth in substrate with sporulation and change of pH substrate. Isolate KLC-33 had produced highest activity is 13.33 U/ml and enzyme volume is 46 ml. Biosynthesis reaction and lipase production influenced by one of the factor is nutrients in coconut oil cake.

**Keywords:** *lipase, lipolytic fungi, hidrolisis, KLC-33*

**Abstrak** – Lipase memiliki manfaat penting di bidang industri. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan kapang lipolitik yang mampu tumbuh dan menghasilkan aktivitas lipase tinggi pada limbah ampas kelapa menggunakan metode *solid state fermentation*. Isolat kapang uji dipurifikasi kemudian dilakukan skrining dan seleksi kapang lipolitik dan dilanjutkan dengan produksi lipase menggunakan substrat ampas kelapa yang sebelumnya diukur kandungan biokimia. Hasil menunjukkan bahwa 8 isolat kapang lipolitik mampu tumbuh baik pada substrat ampas kelapa yang ditunjukkan dengan adanya sporulasi dan perubahan pH medium selama reaksi. Diantara kapang lipolitik tersebut, isolat kapang KLC-333 diketahui menghasilkan aktivitas hidrolisis lipase terbesar yaitu 13,33 U/ml dan volume produksi 46 ml. Biosintesis dan peningkatan produksi lipase dipengaruhi oleh kandungan nutrisi di dalam substrat ampas kelapa.

**Kata kunci:** *lipase, kapang lipolitik, hidrolisis, KLC-33*

## PENDAHULUAN

Lipase (*triacyl glycerol acyl hydrolases*, E.C 3.1.1.3) merupakan enzim yang melakukan katalis reaksi hidrolisis senyawa ester antara lain triasilgliserol menjadi

gliserol dan asam lemak. Lipase juga bekerja secara reversible, berperan dalam reaksi esterifikasi maupun transesterifikasi dari gliserol dan asam lemak (Sharma *et al.*, 2001; Pera *et al.*, 2006). Lipase berperan mengkatalis

reaksi hidrolisis bila berada pada medium dengan ketersediaan air tinggi sedangkan dalam kondisi ketersediaan air rendah pada medium maka lipase cenderung mengkatalis reaksi esterifikasi. Oleh karena lipase mampu melakukan berbagai jenis reaksi membuat lipase bermanfaat secara luas dalam industri aplikasi bioteknologi. Namun terkendala oleh harga lipase yang mahal dan produksi enzim didominasi oleh negara Eropa (Sharma *et al.*, 2001).

Lipase ditemukan sebagai enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh berbagai macam organisme, mulai dari tanaman, hewan serta mikrobia antara lain bakteri, aktinomisetes, *yeast*, dan kapang (Falony *et al.*, 2006). Kapang lipolitik diketahui mampu menghasilkan lipase ekstraseluler dengan aktivitas lipolitik cukup tinggi sehingga merupakan sumber utama dalam industri karena kemampuannya yang dapat digunakan dalam berbagai hal dan kemudahan dalam produksi. Salah satu kapang yang banyak menghasilkan lipase berasal dari genus *Aspergillus* (Sharma *et al.*, 2001).

Reaksi biosintesis lipase oleh mikrobia dapat dilakukan pada medium tanpa lipid sebagai inducer namun untuk meningkatkan produksi lipase dapat ditambahkan senyawa inducer yaitu lipid pada medium seperti triasilgliserol (Weete *et al.*, 2008), dan *olive oil* (Pera *et al.*, 2006). Ampas kelapa yang merupakan limbah proses produksi minyak kelapa cenderung hanya dimanfaatkan sebagai pakan ternak padahal diketahui bahwa ampas kelapa masih memiliki kandungan lipid yang cukup tinggi sekitar 10-16%, protein 4,11%, serat kasar 30,58%, karbohidrat 79,34% dan abu 0,66% (Rindengan *et al.*, 1997) sehingga berpotensi dimanfaatkan sebagai substrat pertumbuhan kapang lipolitik untuk menghasilkan lipase tinggi yang didukung dengan keberadaan lipid dalam limbah

tersebut. Tujuan penelitian adalah untuk mendapatkan kapang lipolitik yang mampu tumbuh dan menghasilkan aktivitas lipase tinggi pada substrat limbah ampas kelapa.

## **METODE PENELITIAN**

Penelitian dilakukan di laboratorium mikrobiologi Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

### **Subjek penelitian**

Kultur 21 isolat kapang yang digunakan diperoleh dari hasil isolasi yang belum murni. Limbah ampas kelapa diperoleh dari industri minyak kelapa UD Barepan, Moyudan, Sleman.

### **Desain penelitian**

#### **1. Purifikasi isolat kapang**

Kultur 21 isolat kapang dipurifikasi pada medium PDA dengan metode koloni sel tunggal secara berjenjang sampai diperoleh kultur isolat kapang murni yang selanjutnya disimpan pada *cool room* 4°C sebagai isolat uji.

#### **2. Skrining kapang lipolitik**

Skrining kapang lipolitik dideteksi secara *bioassay* menurut Singh *et al.* (2010). Medium *tributyryn agar test* mengandung *tributyryn oil* 2% digunakan untuk deteksi kapang lipolitik. Isolat yang tumbuh dan membentuk zona jernih disekitar koloni kapang merupakan kapang lipolitik (Gupta *et al.*, 2003) dan digunakan sebagai isolat uji selanjutnya. Nilai indeks lipolitik (IL) dinyatakan sebagai nisbah antara diameter zona jernih yang terbentuk dengan diameter koloni (Zusfahair *et al.*, 2010).

#### **3. Seleksi kapang lipolitik**

Seleksi dilakukan terhadap kapang lipolitik melalui inokulasi 1 ml spora kapang dari suspensi konsentrasi spora sebesar  $1 \times 10^6$  spora/ml ke dalam substrat ampas kelapa dan diinkubasi pada suhu

30°C selama 7 hari. Parameter seleksi meliputi kemampuan tumbuh isolat pada substrat berdasarkan sporulasi dan perubahan pH medium.

#### 4. Analisis proksimat limbah ampas kelapa

Analisis proksimat limbah ampas kelapa dilakukan sebelum fermentasi meliputi penentuan kadar air, kandungan protein, lipid (minyak), karbohidrat, kadar abu, rasio C/N, dan rasio C/P. Analisis proksimat substrat fermentasi menjadi hal penting dalam upaya peningkatan produksi enzim (Salihu *et al.*, 2012).

#### 5. Produksi lipase

Spora kapang lipolitik dipanen pada larutan Tween-80 0,01% lalu konsentrasi diatur hingga  $1 \times 10^6$  spora/ml. Produksi lipase dilakukan pada limbah ampas kelapa tidak segar ukuran 250  $\mu$ m menggunakan metode *solid state fermentation*. Sebanyak 1 ml spora kapang diinokulasikan ke dalam erlenmeyer berisi 5 gr ampas kelapa kadar air 60% dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari.

#### 6. Ekstraksi lipase

Ekstraksi lipase ekstraseluler dilakukan menurut metode Gutarra *et al.* (2009) menggunakan 50 ml larutan pengekstrak enzim lalu disentrifuse pada 4000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan dan pelet dipisahkan. Supernatan berisi lipase ekstraseluler yang masih kasar.

#### 7. Pengukuran kadar protein enzim dan aktivitas hidrolisis

Penentuan kadar protein terlarut menggunakan metode Bradford pada  $\lambda$  595 nm (Kristanti, 2001). Aktivitas hidrolisis lipase diukur secara titrimetri. Aktivitas hidrolisis lipase diukur dalam medium emulsi minyak kelapa (gum arab : buffer fosfat 0.2 M pH 7 : minyak

kelapa = 2 : 1 : 1). Sebanyak 0,1 ml emulsi minyak kelapa dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan 10 ml akuades, 1 ml larutan  $\text{CaCl}_2$  1 M, dan 0,01 ml enzim kasar lipase ekstraseluler. Campuran enzim substrat ini diinkubasi dalam *shaker* dengan kecepatan 150 rpm, suhu 30°C selama 1 jam. Setelah waktu inkubasi tercapai segera campuran substrat enzim di-inaktifasi dengan penambahan campuran aseton-etanol 1:1 sebanyak 5 ml dan digojog secara sempurna. Kemudian campuran ditambah indikator pp (penoftalein) 1% sebanyak 2 tetes dan dititrasi dengan larutan 0,01 N NaOH. Titrasi dihentikan jika sudah terbentuk warna merah muda. Satu unit (U) aktivitas hidrolisis didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang digunakan untuk menghasilkan satu  $\mu$ mol asam lemak dari hidrolisis lemak (minyak) per menit per ml dalam kondisi spesifik pengukuran. Untuk mengukur aktivitas lipase digunakan rumus sebagai berikut (ul-Haq *et al.*, 2002),

$$\text{Aktivitas lipase (U/ml)} = \frac{(A-B) \times N_{\text{NaOH}} \times 1000}{V \times T}$$

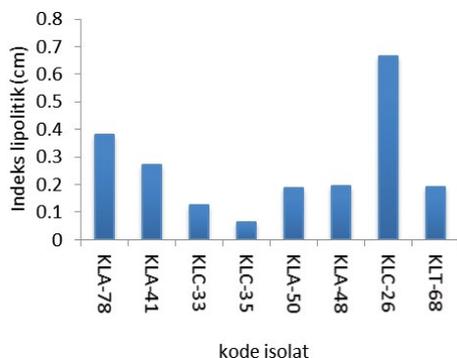
A= ml NaOH titrasi sampel; B=ml NaOH titrasi blangko; V= volume enzim yang digunakan; T=waktu inkubasi (60 menit).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### *Skrining dan Seleksi kapang lipolitik*

Skrining isolat kapang lipolitik dilakukan terhadap 21 isolat kapang yang diisolasi dari serasah di hutan Biologi, Fakultas Biologi UGM dan telah dipurifikasi. Berdasarkan hasil penelitian secara kualitatif diperoleh 8 isolat kapang yang memberikan hasil positif memiliki aktivitas lipolitik dengan adanya zona jernih disekitar koloni kapang pada medium uji trybutitn yaitu isolat kapang KLA-78, KLA-

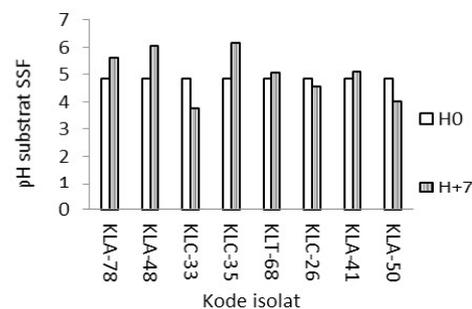
41, KLC-33, KLC-35, KLA-50, KLA-48, KLC-26, dan KLT-68.



Gambar 1. Indeks lipolitik (IL) dari 8 isolat kapang yang tumbuh dan menghasilkan lipase pada medium tributyrin agar.

Pada gambar 1 menjelaskan bahwa indeks lipolitik terbesar dihasilkan oleh kapang KLC-26 sebesar 0,67 sedangkan indeks lipolitik terkecil dihasilkan oleh kapang KLC-35 sebesar 0,0625. Isolasi kapang lipolitik mampu tumbuh pada medium dengan menggunakan sumber karbon berupa tributyrin sehingga menghasilkan eksoenzim (lipase ekstraseluler) yang menunjukkan keberadaan aktivitas lipase. Nilai indeks lipolitik secara kualitatif sangat tergantung pada jenis kapang dan ukuran koloni kapang sehingga belum tentu linear dengan aktivitas enzim secara kuantitatif.

Hasil seleksi menunjukkan bahwa 8 isolat kapang lipolitik mampu tumbuh pada substrat ampas kelapa sebagai sumber karbon terutama lemak (minyak) untuk sintesis lipase yang dicirikan dengan adanya penambahan biomassa spora (gambar 2) dan perubahan pH selama reaksi (gambar 3). ahwa isolat KLA-78 mengalami pertumbuhan dan sporulasi yang cukup cepat pada substrat ampas kelapa dibandingkan dengan isolat lain.



Gambar 3. Perubahan pH selama reaksi solid state fermentation yang diukur sebelum (pH 4,85) dan sesudah inkubasi pada suhu 30°C.

### Komposisi biokimia ampas kelapa

Kemampuan kapang lipolitik tumbuh pada substrat limbah ampas kelapa didukung dengan kandungan komposisi biokimia ampas kelapa yang berdasarkan hasil uji mengandung lemak (minyak) 23,88% sebagai sumber karbon selain senyawa lain untuk mendukung metabolisme dan pertumbuhan sel kapang. Kehadiran minyak dalam substrat fermentasi akan memberikan dukungan lingkungan yang sesuai bagi mikrobia penghasil lipase sehingga lipase akan mudah terinduksi.

Tabel 1. Kandungan senyawa dalam limbah ampas kelapa.

Analisa	Kadar (%)
Air	9,61
Abu	1,56
Total protein	5,79
Lemak (minyak)	23,88
Serat kasar	49,54
Karbohidrat	9,61
Energi (kal/100 gr)	277,90
C organik	61,34
Nitrogen	0,93
Rasio C/N	66,12
Phospor	0,09
Ratio C/P	650,02

Rasio C/N ampas kelapa sebesar 66,12% dan rasio C/P sebesar 650,02% yang menunjukkan bahwa ampas kelapa kekurangan nitrogen dan fosfor. Nitrogen

dan fosfor dibutuhkan dalam jumlah besar untuk sintesis protein dan enzim. Di industri, peningkatan produksi enzim umumnya dilakukan dengan menambah *corn steep liquor* (Stanburry *et al.*, 1995).

### **Produksi, kadar protein dan aktivitas hidrolisis**

Tabel 2 menunjukkan bahwa isolat kapang lipolitik yang mampu menghasilkan aktivitas hidrolisis terbesar adalah isolat kapang KLC-33 secara berurutan sebesar 13,33 U/ml, kadar protein terlarut yang dihasilkan sebesar 0,063 mg/ml dan volume produksi lipase kasar sebesar 46 ml. Aktivitas hidrolisis yang dihasilkan oleh kapang lipolitik pada substrat padat memiliki aktivitas hidrolisis bervariasi sebagaimana dilaporkan oleh Singh *et al.* (2012) bahwa aktivitas lipase (hidrolisis) dari kapang *Rhizopus pusilus* sebesar 10,8 U/ml yang ditumbuhkan pada substrat ampas zaitun-bagase sedangkan kapang *Aspergillus carneu* menghasilkan aktivitas lipase sebesar 12,7 U/ml pada substrat bunga matahari. Hal ini menunjukkan bahwa isolat kapang KLC-33 yang ditumbuhkan pada substrat ampas kelapa menghasilkan aktivitas hidrolisis yang lebih besar dibandingkan dengan kedua kapang tersebut. Kemampuan produksi dan aktivitas hidrolisis dipengaruhi oleh jenis kapang, kondisi lingkungan pertumbuhan kapang dan substrat pertumbuhan yang mengandung nutrisi cukup (Salihu *et al.*, 2012).

Tabel 2. Produksi, kadar protein dan aktivitas hidrolisis tiap lipase yang dihasilkan oleh masing-masing kapang lipolitik.

Kode isolat	Vol. enzim (ml)	Aktivitas hidrolisis (U/ml)	Kadar protein (mg/ml)
KLA-78	4,5	10	0,166

KLA-48	40,5	4,17	0,058
KLC-33	46	13,33	0,063
KLC-35	34	3,33	0,256
KLT-68	42	12,5	0,068
KLC-26	36	9,17	0,063
KLA-41	47	11,67	0,168
KLA-50	35,5	7,5	0,065

Aktivitas hidrolisis yang dihasilkan oleh tiap kapang lipolitik tidak berkaitan erat dengan kemampuan kapang dalam menghasilkan spora (gambar 2 dan tabel 2). Aktivitas hidrolisis terkecil dihasilkan oleh isolat KLA-48 sebesar 4,17 U/ml. Tabel 2 juga menunjukkan pola yang menarik dimana kadar protein terlarut dalam supernatan (ekstrak kasar lipase) belum tentu linear dengan aktivitas hidrolisis. Kadar protein yang terukur merupakan kadar protein terlarut dalam supernatan berdasarkan metode Bradford.

### **SIMPULAN**

Limbah ampas kelapa menjadi medium efektif pertumbuhan kapang lipolitik secara *solid state fermentation* sehingga mampu meningkatkan produksi dan aktivitas lipase. Delapan isolat kapang lipolitik mampu tumbuh dan menghasilkan lipase pada limbah tersebut. Kapang lipolitik yang menghasilkan aktivitas hidrolisis tertinggi adalah isolat KLA-33 sebesar 13,33 U/ml dengan volume produksi lipase sebanyak 46 ml.

Disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut mengenai identifikasi kapang dan perlakuan pengaruh penambahan senyawa nitrogen dan faktor lingkungan pertumbuhan untuk peningkatan produksi

### **UCAPAN TERIMA KASIH**

Penulis ucapkan terimakasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan Republik Indonesia atas bantuan dana untuk melaksanakan kegiatan penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Falony, G., Armas, J.C., Mendoza, JCD., Hernandez, JLM. 2006. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* **44**:235-240
- Gupta, R., Rathi, P., Gupta, N., Bradoo, S. 2003. Lipase assay for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **37**:63-71
- Gutarra, M.L.E., Godoy, M.G., Maugeri, F., Rodrigues, M.I., Freire, D.M.G., Castilho, L.R. 2009. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid state fermentation. *Bioresource.* **100**: 5249-5254
- Kristanti, ND. 2001. *Pemurnian parsial dan karakterisasi enzim lipase ekstraseluler dari kapang Rhizopus oryzae TR32*. Thesis. Institut Pertanian Bogor
- Pera, LM., Romero, CM., Baigori, MD., Castro, GR. 2006. Catalytic properties of lipase extracts from *Aspergillus niger*. *Food Technol. Biotechnol.* **44**: 247-252
- Rindengan, B., Kembuan, Lay, A. 1997. Pemanfaatan ampas kelapa untuk bahan makanan rendah kalori. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri.* **3**:56-63
- Salihu, A., Alam, M.Z., AbdulKarim, M.I., Salleh, H.M. 2012. Lipase production: an insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resource, Conservation and Recycling.* **58**: 36-44
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, C.U. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Advan.* **19**: 627-662
- Singh, A.K and Mukhopadhyay, M. 2012. Overview of fungal lipase : A review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **166**:486-520
- Singh, M., Saurav, K., Srivastava, N., Kannabiran, K. 2010. Lipase production by *Bacillus subtilis* OCR-4 in solid-state fermentation using groundnut oil cakes as substrate. *Cur. Res. Journal of Biological Sci.* **2**: 241-245
- Stanbury, P.F., Whittaker, A, Hall, S.J. 1995. *Principles of fermentation technology*. Elsevier science: Great Britain
- ul-Haq, I., Idrees, S., Rajoka, M.I. 2002. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid state fermentation. *Process. Biochem.* **37**:637-641
- Weete, JD., Oi-ming, L, Akoh, CC. 2008. *Microbial lipase*. In: Akoh, CC and Min, DB. *Food lipid chemistry, nutrition and biotechnology 3<sup>rd</sup> ed.* CRC Press. Taylor and Francis Group. New York
- Zusfahair, Setyaningtyas, T., Fatoni, A. 2010. Isolasi, pemurnian dan karakterisasi lipase bakteri hasil skrining dari tanah tempat pembuangan akhir (TPA) gunung Tugel Banyumas. *Jurnal Natur Indonesia.* **12**:124-129