

PENGARUH MINYAK JELANTAH DAN WAKTU INKUBASI TERHADAP AKTIVITAS LIPASE PADA TANAH HUTAN MANGROVE PANTAI TABLOLONG KUPANG

Gusti A Malelak¹, I Nengah Wirajana^{1,2*}, dan I Gede Mahardika^{1,3}

¹Program Studi Magister Kimia Terapan Universitas Udayana, Denpasar

²Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran

³Fakultas Peternakan Universitas Udayana, Bukit Jimbaran

* wirajana@yahoo.com

ABSTRAK: Penambahan minyak pada tanah umumnya dapat menginduksi ekspresi lipase mikroorganisme lipolitik dalam tanah. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan minyak jelantah dan waktu inkubasi serta interaksi antara keduanya terhadap aktivitas lipase pada tanah hutan mangrove Pantai Tablolong Kabupaten Kupang, Nusa Tenggara Timur (NTT). Penelitian ini termasuk dalam *True Experiment* dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial yang terdiri atas 2 faktor. Faktor pertama adalah waktu inkubasi (tanpa dan dengan inkubasi selama 1, 2, 3, 4, dan 5 hari); dan faktor kedua adalah pengaruh minyak jelantah (tanpa dan dengan penambahan minyak jelantah 1,96; 3,84; dan 5,65% [v/v]). Penentuan aktivitas lipase dilakukan dengan metode titrimetri dan data yang dihasilkan diolah menggunakan metode anova 2 (dua) arah. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan minyak jelantah dan waktu inkubasi dapat meningkatkan aktivitas lipase pada tanah hutan mangrove. Minyak jelantah dapat digunakan sebagai penginduksi lipase mikroorganisme lipolitik dalam tanah hutan mangrove, tetapi tidak dapat digunakan lebih tinggi dari 3,84% (v/v). Aktivitas lipase tertinggi diperoleh 1,233 U/mL pada waktu inkubasi selama lima hari. Hasil analisis data menunjukkan tidak ada interaksi antara waktu inkubasi dan penambahan minyak jelantah terhadap aktivitas lipase pada tanah hutan mangrove.

Kata kunci: minyak jelantah, lipase, mikroorganisme lipolitik, tanah hutan mangrove

ABSTRACT: Addition of oil on soil can usually induce lipase expression of lipolitic microorganism on the soil. The aim of this research was to know the effect of cooking oil waste addition and incubation period varies on the activity of lipase from mangrove forest soil of Tablolong Beach, Kupang, Nusa Tenggara Timur (NTT). This research was in *True Experiment* with completion random design of factorial model that contains 2 factors. The first factor was incubation period (0, 1, 2, 3, 4, and 5 days); and the second factor was the addition of cooking oil waste (0; 1,96; 3,84; and 5,65% [v/v]). The activities of lipase were determined by titrimetric method. Data of this study was analyzed by using anova two factors. The results of this research showed that the addition of cooking oil waste and incubation period could increase the lipase activity on the mangrove forest soil. The cooking oil waste could be used as inducer of lipase from lipolitic microorganism on mangrove forest soil, but it could not be used more than 3,84% (v/v). The highest lipase activity was 1,233 U/mL on incubation period for five days. The result of data analysis showed no interaction between incubation period and addition of cooking oil waste on lipase activity from mangrove forest soil.

Keywords: cooking oil waste, lipase, lipolitic microorganism, mangrove forest soil

1. PENDAHULUAN

Lipase merupakan enzim yang dapat larut dalam air dan secara alami mengkatalis hidrolisis ikatan ester dalam substrat lipid yang tidak larut air [1]. Lipase adalah biokatalis yang berperan besar dalam aplikasi bioteknologi, seperti produksi obat, dan produksi *flavor* [2]. Dalam industri, lipase antara lain digunakan dalam industri farmasi dan untuk menghasilkan asam lemak dari minyak yang biasanya mengandung asam lemak tidak jenuh. Lipase dari *Candida cylindracea* digunakan untuk menghidrolisis minyak dalam pembuatan sabun. Selain bidang farmasi, lipase juga digunakan dalam industri kosmetik, kulit, makanan, parfum, dan sintesis bahan organik lain [3].

Lipase dapat diproduksi dari berbagai mikroorganisme. Mikroorganisme penghasil lipase ditemukan dalam bermacam-macam habitat seperti limbah industri, pabrik pengolahan minyak sayur, perusahaan susu, tanah yang terkontaminasi dengan minyak, makanan yang membusuk dan timbunan kompos [4] serta batubara [5]. Dalam hubungannya dengan mikroorganisme penghasil lipase dari tanah, sebelumnya Kojima dan Shimizu [6] telah berhasil memurnikan lipase yang diisolasi dari mikroorganisme yang berasal dari bermacam-macam tanah seperti tanah sawah, kebun sayur dan hutan.

Untuk menggali adanya lipase dalam tanah hutan mangrove, dapat dilakukan dengan cara menginduksi dengan menggunakan substratnya. Induser tersebut dapat berupa trigliserida, ester asam lemak berantai panjang atau asam lemak bebas. Penambahan minyak pada tanah kemungkinan dapat menginduksi ekspresi gen pengkode lipase dalam mikroorganisme lipolitik yang terdapat pada tanah hutan mangrove. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan minyak jelantah dan waktu inkubasi serta interaksi antara keduanya terhadap aktivitas lipase pada tanah hutan mangrove Pantai Tablolong Kabupaten Kupang, Nusa

Tenggara Timur (NTT). Minyak yang dipilih sebagai induser dalam penelitian ini adalah minyak jelantah. Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermafaat untuk mengolah minyak jelantah yang umumnya sering ditemukan sebagai bahan buangan di tanah.

2. PERCOBAAN

Bahan dan Peralatan

Bahan-bahan yang digunakan adalah NaOH, pH indikator universal, aquades steril, fenolptalein 1%, aseton, etanol, dan asam oksalat ($H_2C_2O_4$), minyak jelantah dan minyak zaitun. Peralatan gelas yang digunakan adalah pipet tetes, gelas piala (*Beaker glass*), gelas ukur, Erlenmeyer, buret corong, dan labu ukur. Peralatan non-gelas yang digunakan yaitu: plastik polietilen, pipet volume (5 mL; 10 ml), spatula, pipet mikro, tip mikro biru, penangas air, botol semprot, *magnetic stierer*, statif, dan neraca analitik.

2.2 Metode

Pengambilan Sampel Tanah Hutan Mangrove

Pengambilan sampel tanah mangrove diambil di pantai Tablolong (Lokasi Pantai terletak pada LS $10^{\circ} 15' 18,6''$ dan BT: $123^{\circ} 36' 10,6''$). Suhu, pH, dan waktu pengambilan tanah dicatat terlebih dahulu. Sampel tanah diambil pada kedalaman 0-10 cm. Tanah mangrove diambil pada lima titik berbeda dan dicampur sampai merata. Sampel tanah diberi label dan disimpan pada suhu $4^{\circ}C$ sebelum digunakan.

Preparasi dan perlakuan tanah sebagai sumber enzim

Sebelum tanah mangrove diuji aktivitas lipase dan konsentrasi asamnya, yang pertama dilakukan adalah preparasi tanah mangrove sebagai sumber enzim secara langsung dari tanah. Sampel tanah dimasukkan ke dalam gelas Beaker yang telah berisi aquades steril dan diaduk

sampai merata dengan *magnetic stirrer* sampai diperoleh lumpur tanah cair (*slurry*) yang mudah diambil dengan volume tertentu. Sampel tanah yang sudah berbentuk *slurry* diambil menggunakan gelas ukur steril sebanyak 50 mL, lalu dimasukkan ke dalam botol steril yang sudah berisi minyak jelantah dengan konsentrasi yang berbeda yakni 0, 1,96%; 3,84%; dan 5,65 % (v/v). Selanjutnya apuran ini dikocok kuat selama 1 menit, lalu *slurry* tersebut diinkubasi selama 0, 1, 2, 3, 4, dan 5 hari pada suhu kamar. Setelah selesai diinkubasi sesuai waktu yang telah ditentukan, kemudian diambil masing-masing 25,0 mL dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 mL untuk dilakukan uji aktivitas lipase dan konsentrasi asam dengan menggunakan metode titrimetri (titrasi asam-basa atau netralisasi).

Uji aktivitas lipase

Penentuan aktivitas lipase dilakukan menggunakan metode titrimetri yang diadaptasi dari Murni *et al* [7] yang telah dimodifikasi untuk sumber enzim dari lumpur tanah. Sebanyak 0,5 mL minyak zaitun dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 mL yang sudah berisi 25 ml lumpur tanah hasil preparasi, ditambahi 25 mL aquades steril. Campuran di atas diaduk selama 60 menit menggunakan *magnetic stirrer*. Selanjutnya ditambahi 5 mL aseton- etanol (1:1) dan aduk hingga merata. Campuran tersebut ditambahi 1-2 tetes indikator pp (*phenolphthalein*) dan dikocok agar tercampur merata dan dibiarkan mengendap. Kemudian dititrasi. Titrasi dengan menggunakan NaOH 0,02 N yang sudah dibakukan dengan larutan baku primer (asam oksalat). Hentikan titrasi pada saat warna larutan menjadi merah jambu dan tidak hilang selama 1 menit, catat volume titrannya. Campuran kontrol (t = 0 menit) dibuat dengan cara yang sama seperti di atas, tetapi larutan aseton-etanol (1:1) segera ditambahkan pada menit ke-0 sebelum diaduk, untuk menon-aktifkan enzim atau menghambat reaksi enzimatik dalam

campuran tersebut. Aktivitas lipase dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut ini:

$$\text{Aktivitas lipase(U/mL)} =$$

$$\frac{(A - B) \times M \times 1000}{60}$$

Keterangan : A = volume NaOH (mL) yang dibutuhkan untuk titrasi sampel pada t = 60 menit, B = volume NaOH (mL) yang dibutuhkan untuk titrasi sampel pada t = 0 menit, M = konsentrasi NaOH yang digunakan sebagai titran, 1000 = faktor pengali dari mol/L ke $\mu\text{mol/mL}$, dan 60 = waktu reaksi enzimatik selama 60 menit. Pengulangan titrasi setiap sampel (t= 0 menit dan t = 60 menit) dilakukan sebanyak tiga kali.

Analisis Data

Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan analisis varian, yaitu untuk mengetahui pengaruh minyak jelantah dan waktu inkubasi terhadap aktivitas lipase. Selain itu analisis tersebut juga untuk mengetahui ada atau tidaknya interaksi antara waktu inkubasi dengan penambahan minyak jelantah terhadap aktivitas lipase pada tanah hutan mangrove pantai Tablolong, Kupang.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Penambahan Minyak Jelantah

Setelah hasil perhitungan aktivitas lipase diperoleh, selanjutnya dianalisis dengan analisis varian untuk mengetahui pengaruh penambahan minyak jelantah terhadap aktivitas lipase pada tanah hutan mangrove pantai Tablolong Kupang. Hasil analisis dapat dilihat pada Tabel 1.

Berdasarkan hasil pengolahan data dengan analisis varian pada Tabel 1 terlihat bahwa rerata yang diperoleh dengan tanpa minyak jelantah sebesar 0,686 U/mL; sedangkan dengan penambahan minyak

Tabel 1. Aktivitas Lipase (U/mL) Tanah Hutan Mangrove Pantai Tablolong Kupang Dengan dan Tanpa Penambahan Minyak Jelantah

Penambahan minyak Jelantah (mL)	Persentase minyak jelantah (%)	Aktivitas lipase (U/mL) pada waktu inkubasi (hari) ke-						Rerata Aktivitas lipase (U/mL)
		0	1	2	3	4	5	
0	0	0,060	0,137	0,113	0,923	1,403	1,503	0,686 ^b
1	1,96	0,799	0,493	0,592	0,563	1,004	1,351	0,800 ^a
2	3,84	0,737	0,830	1,034	1,082	0,607	1,100	0,898 ^a
3	5,65	0,762	0,560	0,525	0,670	0,589	0,950	0,686 ^b
Rerata		0,589 ^{cd}	0,505 ^d	0,565 ^{cd}	0,808 ^{bc}	0,967 ^b	1,233 ^a	

Keterangan :

1. P0 : tanpa penambahan minyak jelantah; P1, P2, dan P3 : penambahan minyak jelantah berturut-turut 1,96; 3,84, dan 5,65 % (v/v).
2. W0: tanpa inkubasi; W1, W2, W3, W4, dan W5 : waktu inkubasi berturut-turut selama 1, 2, 3,4, dan 5 hari.
3. Superskip yang berbeda pada baris / kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (a,b,c, d).

jelantah 1,96% reratanya sebesar 0,800 U/ml. Pada penambahan minyak jelantah pada konsentrasi 3,84 % rerata yang diperoleh adalah 0,898 U/mL; dan pada penambahan minyak jelantah 5,65 %, rerata yang diperoleh adalah 0,686 U/mL. Data tersebut menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara aktivitas lipase yang tanpa minyak jelantah dan dengan minyak jelantah.

Hasil penelitian Falony *et al* [8] menunjukkan produksi lipase oleh mikroorganisme memerlukan sumber karbon yang dapat berasal dari lipida atau karbohidrat. Untuk memproduksi lipase pada umumnya menggunakan induser berupa minyak untuk memacu produksinya. Induser merupakan suatu zat yang mampu memacu kerja mikroorganisme untuk menghasilkan suatu enzim tertentu. Untuk memproduksi lipase biasanya digunakan induser yang berhubungan dengan minyak, lemak, atau asam lemak, seperti minyak sawit. Represor pada produksi enzim lipase berupa sumber karbon sederhana, yaitu mono dan disakarida. Jika hanya terdapat glukosa maka lipase tidak disintesis [9]. Pada hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada taraf penambahan minyak jelantah 3,84 % diperoleh aktivitas lipase paling tinggi, yaitu 0,898 U/mL.

Pada penambahan minyak jelantah dengan konsentrasi 5,65 % terlihat adanya

penurunan aktivitas lipase. Hal ini disebabkan minyak jelantah merupakan limbah, yang kemungkinan besar mengandung inhibitor enzim yang dapat menghambat aktivitas lipase apabila ditambahkan dalam jumlah yang terlalu banyak. Molekul atau ion yang dapat menghambat reaksi dinamakan inhibitor. Hambatan terjadi karena adanya molekul yang mirip dengan substrat, yang dapat pula membentuk kompleks, yaitu kompleks enzim inhibitor (EI). Pembentukan kompleks EI ini sama dengan pembentukan kompleks Enzim Substrat (ES), yaitu melalui penggabungan inhibitor dengan enzim pada bagian aktif enzim. Dengan demikian terjadi persaingan antara inhibitor dengan substrat terhadap bagian aktif enzim, sehingga menghalangi terbentuknya kompleks Enzim substrat dengan cara membentuk enzim inhibitor. Dengan demikian adanya inhibitor bersaing dapat mengurangi peluang bagi terbentuknya kompleks enzim substrat dan hal ini menyebabkan berkurangnya aktivitas enzim. Hal ini dibuktikan pada saat tanpa dan dengan penambahan minyak jelantah sampai pada konsentrasi 3,84% aktivitas lipase masih terus meningkat. Namun pada penambahan minyak jelantah 5,65 % aktivitas lipase mengalami penurunan.

Hasil analisis varian pada Tabel 1 terlihat bahwa ada pengaruh penambahan minyak jelantah terhadap aktivitas lipase dan

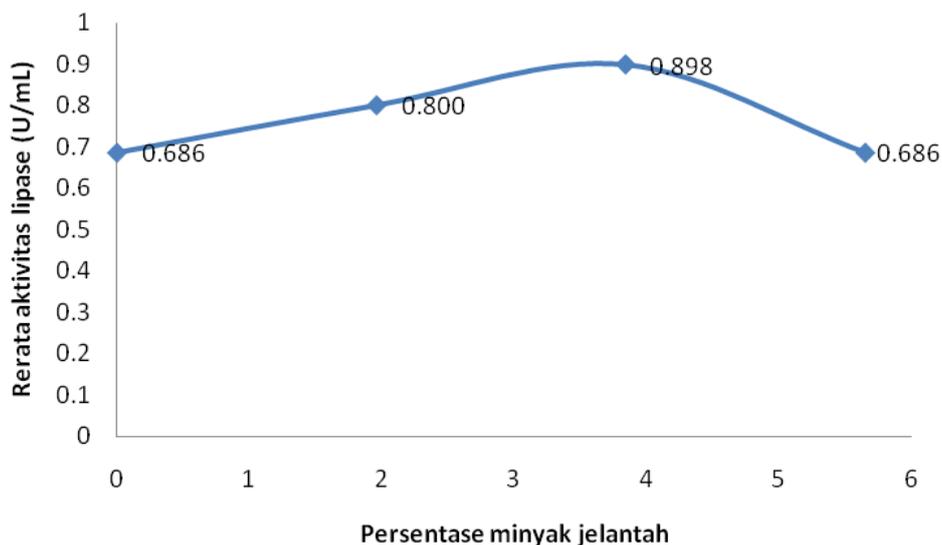
menunjukkan adanya perbedaan nyata antara aktivitas lipase pada perlakuan tanpa dan dengan penambahan minyak jelantah. Hal ini membuktikan bahwa penambahan minyak jelantah dalam penelitian ini dapat menginduksi ekspresi gen pengkode lipase dalam mikroorganisme lipolitik, sehingga produksi lipasenya meningkat pada sampel tanah hutan mangrove pantai Tablolong. Lipase yang dihasilkan dari mikroba lipolitik dalam tanah dapat mendegradasi minyak jelantah yang digunakan.

Enzim yang aktivitasnya diukur secara langsung dari tanah memiliki rentang aktivitas yang berbeda-beda pada setiap pengulangannya. Hal ini tergantung pada jenis, metode, dan tipe tanah yang digunakan (dengan variasi mikroba yang tidak konsisten) dalam pengukuran aktivitas [10]. Oleh sebab itu pada penelitian ini diperoleh besarnya variasi aktivitas lipase dalam setiap pengulangan pengukuran. Hubungan antara penambahan minyak jelantah dan aktivitas lipase dapat dilihat pada grafik dalam Gambar 1.

Berdasarkan persamaan kuadrat pada Gambar 1, diketahui bahwa puncak optimum penambahan minyak jelantah yang berpengaruh pada aktivitas lipase dari tanah hutan mangrove pantai Tablolong adalah pada taraf penambahan minyak jelantah 3,02 %.

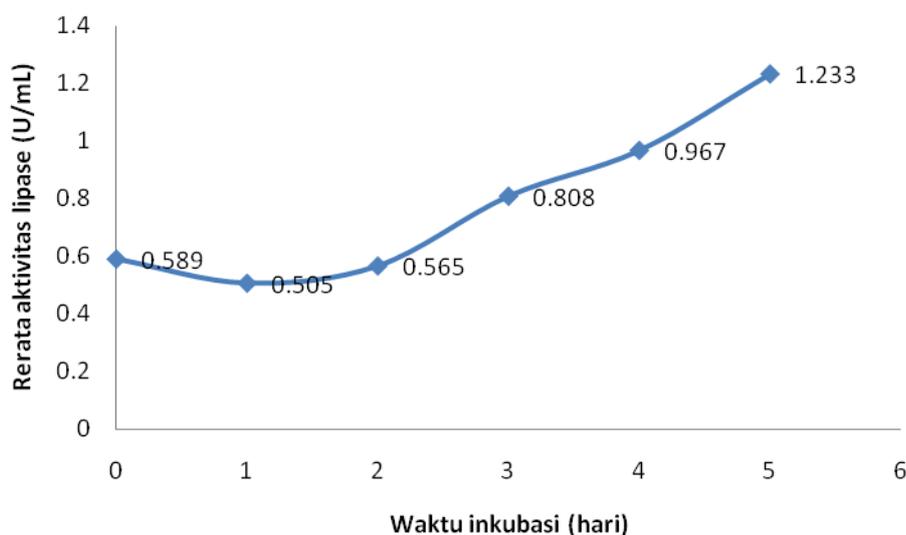
Pengaruh Waktu Inkubasi

Untuk mengetahui pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas lipase pada tanah hutan mangrove Pantai Tablolong Kupang dapat dilihat pada Gambar 2. Gambar ini menunjukkan bahwa semakin lama waktu inkubasi, maka semakin tinggi aktivitas lipase yang dihasilkan. Waktu inkubasi yang lama dapat memberikan kesempatan kepada mikroorganisme yang ada dalam tanah untuk tumbuh semakin banyak. Data penelitian ini dapat membuktikan bahwa mikroorganisme yang bersifat lipolitik dapat memproduksi lipase pada tanah hutan mangrove. Hal ini dapat dibuktikan dengan bertambahnya waktu inkubasi maka aktivitas lipase juga meningkat. Penelitian Zusfahair, *et al* [11] tentang isolasi, pemurnian dan karakterisasi lipase dari bakteri hasil skrining dari tanah tempat pembuangan akhir (TPA) gunung Tugel Banyumas mendapatkan aktivitas lipase semakin meningkat terhadap waktu dan optimum pada jam ke-18.



Gambar 1.

Grafik pengaruh penambahan minyak jelantah terhadap rerata aktivitas lipase dari tanah hutan mangrove pantai Tablolong.



Gambar 2. Grafik hubungan antara lama inkubasi dan rerata aktivitas lipase dengan dan tanpa penambahan minyak jelantah.

Pada penelitian ini belum diperoleh waktu inkubasi optimum untuk memperoleh aktivitas lipase tertinggi yang diukur secara langsung dari tanah.

Hasil pengolahan data dengan analisis varian (Tabel 1) terlihat pada 0 hari, aktivitas lipase yang dihasilkan adalah 0,589 U/ml, sedangkan pada waktu inkubasi 1 (satu) hari aktivitas lipase menurun menjadi 0,505 U/ml. Hal ini disebabkan oleh karena berbagai macam mikroorganisme dalam tanah mempunyai masa pertumbuhan yang bervariasi [12]. Waktu inkubasi dapat meningkatkan aktivitas lipase secara nyata yang ditunjukkan dengan semakin tingginya aktivitas lipase yang dihasilkan, yang mana mikroorganisme lipolitik yang ada dalam tanah dapat tumbuh semakin banyak dengan bertambahnya waktu inkubasi.

Data rerata aktivitas lipase tiap variasi waktu dan variasi penambahan minyak jelantah pada Tabel 1 terlihat pula bahwa tidak ada interaksi antara lama inkubasi dan penambahan minyak jelantah terhadap aktivitas lipase pada tanah hutan mangrove. Berdasarkan hasil pengolahan data dengan menggunakan analisis varian,

penambahan minyak jelantah dan lama waktu inkubasi hanya berpengaruh signifikan terhadap aktivitas lipase perharinya dan secara keseluruhan terjadi penurunan aktivitas lipase ketika terjadi penambahan minyak jelantah. Di sini terjadi fenomena, semakin banyak minyak jelantah ditambahkan maka aktivitas lipasena semakin menurun pada waktu hari ke-5. Hal ini membuktikan bahwa tidak ada interaksi antara lama inkubasi dan penambahan minyak jelantah terhadap aktivitas lipase.

4. KESIMPULAN

Penambahan minyak jelantah dan waktu inkubasi berpengaruh terhadap aktivitas lipase pada tanah hutan mangrove pantai Tablolong Kabupaten Kupang, Nusa Tenggara Timur (NTT). Minyak jelantah dapat digunakan sebagai inducer lipase pada tanah hutan mangrove, tetapi tidak dapat digunakan pada konsentrasi yang lebih tinggi dari 3,84% (v/v). Hasil analisis data juga menunjukkan tidak ada interaksi antara waktu inkubasi dan penambahan minyak jelantah terhadap aktivitas lipase.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini disampaikan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu penelitian ini.

6. DAFTAR PUSTAKA

- [1] Miller, F.P., Vandome, A.F., and McBrewster, J., Lipase. *Alphascript Publishing*. USA (2010).
- [2] Joseph, B., Ramteke, P.W., Thomas, G., Shrivastava, N., Standard Review Cold-Active Microbial Lipases: a Versatile tool for Industrial Applications. *Biotechnology and Molecular Biology Review* (2007), 2 (2)
- [3] Gandhi, N.G., Application of lipase, *Journal of the American Oil Chemist' Society* (1997) 74, No 6, 621
- [4] Sharma, R., Chisti, Y. & Banerjee, U.C., Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotech Adv.* (2001) 19, 627 – 662
- [5] Wang, I.C., Fermentation and Enzymes Technology, *John Wiley and Sons*, New York (1979)
- [6] Kojima, Y., Shimizu, S., Purification and Characterization of the Lipase from *Pseudomonas Fluorescens* HU 380. *Journal of Bioscience and Bioengineering* (2003) 96 (3), 219 – 226
- [7] Murni, S.R., Kholisoh, S.D., Tanti, D.L., Petrisia, E.M. Produksi, Karakterisasi, dan Isolasi Lipase dari *Aspergillus niger*. Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia “Kejuangan”, 2011: AO8.1 – 7
- [8] Falony, G., Armas, J. C., Mendoza J. C. D., and Hernández, J. L. M., Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* (2006) 44 (2), 235–240
- [9] Benjamin, S. P., Pandey A., Nigam, C.R. Soccol, N. Krieger. Realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl.* 1996, 29, 119 – 131
- [10] Nannipieri, P., Kandeler, E., and Ruggiero, P., Enzyme Activities and Microbiological and Biochemical Processes in Soil in: *Enzyme in The Enviromental*. Editor by: Burns, R.G. & Dick, R.P. Marcel Dekker Inc. (2002).
- [11] Zufahair, Setyaningtyas, T., Fatoni, A., Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi lipase Bakteri Hasil Skrining dari Tanah Tempat Pembuangan Akhir (TPA) Gunung Tugel Banyumas. *Journal Natur Indonesia* (2009) 12 (2), 124 – 129
- [12] Kar, A., Pharmaceutical Microbiology. New Delhi: *New Age International Limited Publisher*. (2008)