

OPTIMASI pH DAN SUHU PADA AKTIVITAS ENZIM LIPASE DARI BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.) BERKAPANG

Novriyanti Hutasoit⁽¹⁾, Putu Timur Ina⁽²⁾, I Dewa Gede Mayun Permana⁽²⁾

¹Mahasiswa Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Udayana

²Dosen Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Udayana

Email: novriyantih@gmail.com

ABSTRACT

This research was aimed to obtain lipase enzyme from mold of cacao beans and get optimum pH and temperature on lipase enzyme activity. The experimental design used Randomized Block Design (RBD) with different pH treatment as follows: pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, and pH 9 and temperature treatment in a row as follows: 30° C, 35° C, 40° C, 45° C, and 50° C. Each treatment was repeated three times to obtain 15 experimental units. Data were analyzed using analysis of variance, when data was effected and then continued with Duncan test. The result showed that pH treatment and temperature significantly influenced the activities of lipase enzyme. The highest lipase enzyme activity was obtained at pH 6 treatment which is 0.107 U/ml and in temperature 35° C treatment 0.102 U/ml.

Keywords : *Lipase enzyme, mold, cocoa beans*

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu tanaman perkebunan yang dikembangkan untuk peningkatan sumber devisa negara dari sektor nonmigas. Indonesia merupakan daerah tropis yang mempunyai potensi baik untuk pengembangan kakao. Sejauh ini, kualitas biji kakao masih rendah. Salah satu penyebabnya adalah kondisi biji yang berkapang.

Menurut Pawirosoemardjo (1992), kadar air biji kakao yang paling baik berkisar antara 6 – 7 %. Daya tahan biji kakao tergantung oleh nilai kadar air karena bila terlalu rendah kadar airnya maka akan membuat biji menjadi rapuh sedangkan bila kadar air terlalu tinggi maka akan

sangat rentan terhadap serangan kapang dan serangga.

Kapang pada biji kakao merupakan kontaminan mikrobiologis yang tidak disukai oleh konsumen. Selain merusak rasa dan aroma khas cokelat, kapang juga berpotensi memproduksi senyawa racun (toksin) yang berbahaya bagi kesehatan manusia. Serangan kapang dianggap serius jika perkembangan pertumbuhannya sudah masuk ke dalam keping biji. Biji kakao yang demikian akan ditolak oleh konsumen. Biji kakao yang berkapang tidak dapat dimanfaatkan dan dapat menurunkan mutu dari biji kakao tersebut. Untuk itu diperlukan usaha dalam memanfaatkan biji kakao yang berkapang agar biji tersebut memiliki nilai ekonomis yang tinggi.

Kapang adalah penghasil enzim yang diproduksi secara ekstraseluler. Penggunaan enzim dalam bioteknologi modern semakin berkembang secara cepat. Hal ini dikarenakan enzim mempunyai efisiensi dan efektifitas yang tinggi, *food grade*, dan dapat digunakan berulang kali (Lehninger, 1995).

Penyediaan produksi enzim dalam jumlah besar dan mempunyai aktivitas yang tinggi, perlu diperhatikan faktor-faktor penting seperti kondisi pertumbuhan, cara isolasi, serta jenis substrat yang digunakan. Kondisi pertumbuhan yang menunjang produksi enzim lipase secara maksimal adalah pH, suhu inkubasi, waktu inkubasi, dan komposisi media pertumbuhan harus mengandung sumber energi, sumber karbon, sumber nitrogen dan mineral (Wang, 1979).

Salah satu jenis enzim yang mempunyai peran penting dalam perkembangan bioteknologi adalah enzim lipase. Enzim ini memiliki sifat khusus yaitu memecahkan ikatan ester pada lemak dan gliserol. Selain itu, enzim lipase mempunyai kemampuan mengkatalis reaksi hidrolisis, alkoholisis, esterifikasi, dan interesterifikasi (Dosanjh dan Kaur, 2002).

Biji kakao berkapang dapat dimanfaatkan sebagai media pertumbuhan kapang yang menghasilkan enzim lipase. Aktivitas enzim lipase dipengaruhi oleh pH dan suhu. Untuk aktivitas tertinggi maka diperlukan optimalisasi kondisi pH dan suhu inkubasi pada enzim lipase dari biji kakao berkapang.

Berdasarkan hal diatas, maka perlu dilakukan ekstraksi enzim lipase pada biji kakao berkapang serta optimasi pH dan suhu untuk mendapatkan pH dan suhu yang optimum pada aktivitas enzim lipase.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Analisis Pangan dan Laboratorium Mikrobiologi Pangan Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Udayana pada bulan Maret sampai Mei 2015.

Alat dan Bahan

Bahan baku yang digunakan adalah biji kakao jenis lindak (sudah berkapang) yang diambil dari petani di Kabupaten Tabanan, Bali. Bahan kimia yang digunakan, yaitu : isooktan, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , ammonium sulfat, Cu-asetat, pyridine dari Merk Jerman dan minyak zaitun merk Borges.

Alat – alat yang digunakan adalah Waring blender (National), pH meter digital (Schott), timbangan analitik (Adventurer Dhaus dan merk Melter Toledo AB 204), vortex, *centrifuge* (Centurion Scientific K3 Series), *magnetic stirrer*, tabung reaksi (pyrex), incubator (Memmert UNB-400), lumpang porselin, spatula, corong, kertas saring, *hot plate* (HP 220), spektrofotometer (Genesys 10S UV-Vis).

Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) yang terdiri dari 2 tahapan penelitian. Tahap pertama adalah penentuan pH optimum pada aktivitas enzim lipase dari biji kakao berkapang. Tahap kedua adalah penentuan suhu optimum pada aktivitas enzim lipase dari biji kakao berkapang. Perlakuan pH yang digunakan adalah sebagai berikut : pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, dan pH 9.

Setelah mendapatkan pH optimum, dilanjutkan dengan optimasi suhu dengan perlakuan suhu yaitu : S1 = Suhu 30° C, S2 = Suhu 35° C, S3 = Suhu 40° C, S4 = Suhu 45° C, S5 = Suhu 50° C. Masing – masing perlakuan diulang sebanyak 3 (tiga) kali sehingga diperoleh 15 unit percobaan. Data yang diperoleh dari variabel yang diamati, dianalisis dengan sidik ragam, dan apabila perlakuan berpengaruh nyata terhadap variabel yang diamati maka dilanjutkan dengan Uji Duncan (Steel dan Torrie, 1995).

Pelaksanaan Penelitian

A. Optimasi Waktu Inkubasi

Pembuatan Bubuk Kakao Berkapang (Lin, dkk., 1983 dalam Abigor, dkk., 2002)

Biji kakao berkapang dikupas dari kulitnya, setelah itu dihancurkan dengan menggunakan blender hingga menjadi bubuk kakao halus dan ditimbang sebanyak 50 gram. Bubuk kakao tersebut direndam dengan menggunakan aquades (250 ml), digojog dan didiamkan selama ± 1 jam, setelah itu disaring

dengan menggunakan kertas saring. Residu yang diperoleh dibungkus dengan menggunakan kertas saring lalu diinkubasi dalam suhu ruang hingga tumbuh kapang pada bubuk kakao (sampel) tersebut kemudian setiap 7 hari dianalisis aktivitas enzim lipasanya.

Ekstraksi Enzim Lipase yang Dimodifikasi (Lin, dkk., 1983 dalam Abigor, dkk., 2002)

Bubuk kakao yang telah berkapang digunakan sebagai bahan untuk ekstraksi enzim lipase. Ditimbang sebanyak 2 gram kemudian dihaluskan kembali dengan menggunakan lumpang porcelain lalu ditambahkan dengan buffer pH 7,5 sebanyak 10 ml. Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian divortex hingga homogen. Setelah homogen, sampel disentrifugasi selama ± 30 menit dengan kecepatan 4000 rpm dan suhu 4° C kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring. Hasil filtrasi tersebut (filtrat) digunakan untuk uji aktivitas enzim lipase.

Pengujian Aktivitas Enzim Lipase (Marseno, dkk., 1998)

Sebanyak 0,5 ml lipase kasar ditambahkan dengan 5 ml minyak zaitun 50 % dalam isooktan lalu diinkubasi selama 1 jam menggunakan *hot plate* dengan suhu 27° C. Setelah itu, lapisan minyak diambil sebanyak 3 ml kemudian ditambahkan dengan 0,4 ml Cu-asetat piridin pH 6 lalu divortex hingga homogen. Setelah homogen, larutan tersebut disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 4000 rpm pada suhu 4° C. Selanjutnya dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang

gelombang 715 nm. Semakin tinggi absorbansi menunjukkan bahwa semakin tinggi aktivitas enzim lipase.

Aktivitas enzim lipase ini dihitung dalam satuan unit. Satu Unit tiap ml didefinisikan sebagai banyaknya ml enzim lipase yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 μ mol asam oleat tiap menit dengan minyak zaitun sebagai substrat.

Pembuatan Kurva Standar Asam Oleat

Asam oleat diambil sesuai dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10, kemudian ditambahkan dengan 5 ml minyak zaitun 50 % dalam isooktan lalu diinkubasi selama 1 jam menggunakan *hot plate* dengan suhu 27° C. Setelah itu, lapisan minyak diambil sebanyak 3 ml kemudian ditambahkan dengan 0,4 ml Cu-asetat piridin pH 6 lalu divortex hingga homogen. Setelah homogen, larutan tersebut disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 4000 rpm pada suhu 4° C. Selanjutnya dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 715 nm.

B. Optimasi pH Pada Aktivitas Enzim Lipase

Bubuk kakao berkapang (yang diperoleh dari optimasi waktu inkubasi dengan aktivitas enzim lipase tertinggi) ditimbang sebanyak 2 gram kemudian dihaluskan kembali dengan menggunakan lumpang porcelain lalu ditambahkan dengan buffer sesuai perlakuan (pH 5, 6, 7, 8, dan 9) sebanyak 10 ml. Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian divortex hingga homogen. Setelah homogen, sampel disentrifugasi selama \pm 30 menit dengan

kecepatan 4000 rpm dan suhu 4° C kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring. Diambil 0,5 ml lipase kasar ditambahkan dengan 5 ml minyak zaitun 50 % dalam isooktan lalu diinkubasi selama 1 jam menggunakan *hot plate* dengan suhu 27° C. Setelah itu, lapisan minyak diambil sebanyak 3 ml kemudian ditambahkan dengan 0,4 ml Cu-asetat piridin pH 6 lalu divortex hingga homogen. Setelah homogen, larutan tersebut disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 4000 rpm pada suhu 4° C. Selanjutnya dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 715 nm. Semakin tinggi absorbansi menunjukkan bahwa semakin tinggi aktivitas enzim lipase.

C. Optimasi Suhu Aktivitas Enzim Lipase

Bubuk kakao berkapang (yang diperoleh dari optimasi waktu inkubasi dengan aktivitas enzim lipase tertinggi) ditimbang sebanyak 2 gram kemudian dihaluskan kembali dengan menggunakan lumpang porcelain lalu ditambahkan dengan buffer pH yang diperoleh dari optimasi pH yang terbaik (dengan aktivitas enzim lipase tertinggi) sebanyak 10 ml. Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian divortex hingga homogen. Setelah homogen, sampel disentrifugasi selama \pm 30 menit dengan kecepatan 4000 rpm dan suhu 4° C kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring. Diambil 0,5 ml lipase kasar ditambahkan dengan 5 ml minyak zaitun 50 % dalam isooktan lalu diinkubasi selama 1 jam menggunakan *hot plate* dengan suhu sesuai perlakuan (30° C, 35° C, 40°

C, 45° C, dan 50° C). Setelah itu, lapisan minyak diambil sebanyak 3 ml kemudian ditambahkan dengan 0,4 ml Cu-asetat piridin pH 6 lalu divortex hingga homogen. Setelah homogen, larutan tersebut disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 4000 rpm pada suhu 4° C. Selanjutnya dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 715 nm. Semakin tinggi absorbansi

menunjukkan bahwa semakin tinggi aktivitas enzim lipase.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Waktu Inkubasi

Nilai rata-rata aktivitas enzim lipase pada perlakuan waktu inkubasi (hari ke-0, hari ke-7, hari ke-14, dan hari ke-21) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Enzim Lipase

Waktu Inkubasi	Nilai Rata-rata Aktivitas Enzim Lipase (U/ml)
Hari ke-0	0,056
Hari ke-7	0,056
Hari ke-14	0,100
Hari ke-21	0,032

Tabel 1 menunjukkan bahwa aktivitas enzim lipase tertinggi diperoleh pada waktu inkubasi hari ke-14 yaitu 0,100 U/ml dan terendah diperoleh pada waktu inkubasi hari ke-21 yaitu 0,032 U/ml. Kapang mempunyai masa pertumbuhan yang bervariasi dimana dalam aktivitas metabolisme tersebut kapang memiliki beberapa fase dalam pertumbuhannya. Fase pertumbuhan awal yang dilalui adalah fase pertumbuhan kemudian aktivitas metabolisme akan menurun setelah kapang melewati fase puncak pertumbuhannya, fase penurunan ini disebut fase kematian. Fase-fase pertumbuhan tersebut sangat berpengaruh terhadap enzim yang dihasilkan oleh kapang untuk membantu pencernaan makanannya (Jeffries and Thomas, 1996). Hasil penelitian yang telah dilakukan, diketahui bahwa pada hari ke-0 dan hari ke-7 kapang mengalami fase permulaan (fase lag)

sehingga tidak terjadi peningkatan aktivitas enzim lipase. Kapang mengalami fase logaritma pada hari ke-14 ditandai dengan meningkatnya aktivitas enzim lipase. Fase kematian terjadi pada saat memasuki waktu inkubasi hari ke-21, sehingga terjadi penurunan aktivitas enzim lipase.

Optimasi pH Pada Aktivitas Enzim Lipase

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan pH berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap aktivitas enzim lipase. Nilai rata-rata aktivitas enzim lipase dapat dilihat pada Tabel 2. Tabel 2 menunjukkan bahwa aktivitas enzim lipase tertinggi diperoleh pada perlakuan pH 6 (P2) yaitu 0,107 U/ml dan terendah pada perlakuan pH 9 (P5) yaitu 0,028 U/ml.

Lingkungan dimana enzim akan mengkatalis reaksi harus berada pada kondisi optimum enzim untuk bereaksi. 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 protein (Lehninger, 1995).

Penurunan pH menjadi kondisi asam menyebabkan penurunan aktivitas, begitu juga kenaikan pH menjadi basa dapat menyebabkan struktur enzim menjadi rusak. Kondisi pH yang terlalu rendah mengakibatkan ion H^+ akan

berikatan dengan $-NH_3^+$ pada struktur asam amino protein membentuk $-NH_4$. Proses pengikatan tersebut menyebabkan ikatan antara atom nitrogen dengan atom hidrogen lainnya terputus, sehingga enzim terdenaturasi. Kondisi pH tinggi mengakibatkan ion $-OH$ berikatan dengan atom hidrogen dari gugus COO^- enzim, membentuk H_2O . Hal tersebut mengakibatkan rusaknya ikatan antara atom hidrogen dengan nitrogen atau oksigen, sehingga struktur enzim mengalami kerusakan (Lehninger, 1995).

Tabel 2. Pengaruh Perlakuan pH Terhadap Aktivitas Enzim Lipase

Perlakuan pH	Nilai Rata-rata Aktivitas Enzim Lipase (U/ml)
P1 = pH 5	0,073 ^b
P2 = pH 6	0,107 ^a
P3 = pH 7	0,087 ^{ab}
P4 = pH 8	0,056 ^{bc}
P5 = pH 9	0,028 ^c

Keterangan : Nilai rata – rata yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0.01$).

Tabel 3. Pengaruh Perlakuan Suhu Inkubasi Terhadap Aktivitas Enzim Lipase

Perlakuan Suhu inkubasi (° C)	Nilai Rata-Rata Aktivitas Enzim Lipase (U/ml)
S1 = 30	0,074 ^b
S2 = 35	0,102 ^a
S3 = 40	0,072 ^b
S4 = 45	0,054 ^c
S5 = 50	0,047 ^c

Keterangan : Nilai rata – rata yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$).

Optimasi Suhu Pada Aktivitas Enzim Lipase

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan suhu inkubasi berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap aktivitas enzim lipase. Nilai rata-rata aktivitas enzim lipase dapat dilihat pada Tabel 3. Tabel 3 menunjukkan bahwa aktivitas enzim lipase tertinggi diperoleh

pada perlakuan suhu 35° C (S2) yaitu 0,102 U/ml dan aktivitas terendah diperoleh pada perlakuan suhu 50° C (S5) yaitu 0,047 U/ml.

Enzim memiliki kondisi optimal dengan adanya perubahan suhu. Laju reaksi akan meningkat sejalan dengan kenaikan suhu sampai pada batas optimalnya, kemudian aktivitas akan

menurun setelah melewati kondisi tersebut karena enzim akan mengalami denaturasi. Suhu yang terlalu rendah akan menyebabkan aktivitas enzim kurang baik (Lehninger, 1995).

Enzim lipase mengalami kerusakan pada suhu yang lebih tinggi. Enzim merupakan protein, maka suhu tinggi dapat menyebabkan denaturasi protein, yaitu kerusakan pada struktur sekunder protein. Struktur sekunder protein berupa ikatan hidrogen yang terbentuk dari ujung-ujung polar dari suatu rantai protein. Kerusakan struktur sekunder menyebabkan struktur tiga dimensi protein berubah. Perubahan ini menyebabkan terganggunya fungsi protein sebagai katalis, di mana kerja suatu enzim dianalogikan sebagai gembok dan kunci. Apabila struktur tiga dimensi berubah tentunya gembok dan kunci tidak cocok lagi, atau dengan kata lain aktivitas katalitik enzim terganggu.

Menurut Christakopoulos (1992), lipase yang dihasilkan oleh *Calvatia gigantean* dapat mencapai aktivitas tertingginya pada suhu 30°C dan pH 7. Sedangkan menurut penelitian Sharon dkk (1998), lipase dari *Pseudomonas aeruginosa* memiliki aktivitas maksimum pada pH 8,5 dan suhu 30°C. Hal tersebut memperlihatkan bahwa kondisi optimum suhu dan pH dipengaruhi oleh jenis mikroba yang digunakan.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa biji kakao berkapang dapat digunakan sebagai

sumber enzim lipase dengan waktu inkubasi optimum adalah 14 hari yaitu 0,100 U/ml. Perlakuan pH berpengaruh sangat nyata terhadap aktivitas enzim lipase. pH optimum enzim lipase dari biji kakao berkapang adalah pH 6 yaitu 0,107 U/ml. Perlakuan suhu berpengaruh sangat nyata terhadap aktivitas enzim. Suhu optimum enzim lipase dari biji kakao berkapang adalah pada suhu 35° C yaitu 0,102 U/ml.

Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disarankan beberapa hal yaitu perlu dilakukan isolasi dan identifikasi lebih lanjut untuk mengetahui jenis kapang yang tumbuh pada biji kakao dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh konsentrasi enzim dan substrat terhadap kecepatan reaksi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abigor, R.D., P.O.Uadia, T.A. Foglia, M.J. Hass, K. Scott dan B.J. Savary. 2002. Partial Purification and Properties of Lipase from Germinating Seeds of *Jatropha curcas* L. *J.Am Oil Chem Soc.* 79 .11
- Christakopoulos, P., Constantina Tzia, Dimitris Kekos, and basil J. Macris, 1992, Production and characterization of extracellular lipase from *Calvatia gigantea*, *Appl Microbiol Biotecnol*, 132:194-197
- Dosanjh, N.S., dan Kaur, J. 2002. Immobilization, Stability and esterification Studies of A Lipase From *Bacillus* sp. *Journal Biotechnology and Applied Biochemistry*. Vol. 36. Hlm 7-12. Punjab University. Chandigarh.
- Jeffries W and Thomas Ph. D. 1996. *Enzyme Technology for Bleaching and Deinking*. USDA Forest Products

- Laboratory, One Pinchot Drive
Madison
- Lee, J. M. (1992). Biochemical Engineering. Prentice Hall Inc. New Jersey.
- Lehninger.A.L, 1995. Dasar-Dasar Biokimia. Erlangga, Jakarta.
- Marseno, D.W., R.Indrati, dan Ohta.1998. A simplified Method for Determination of Free Fatty Acids for Soluble and Immobilized Lipase Assay. Indonesian Food and Nutrition Progress. 5: 79-83.
- Pawirosoemardjo, S. 1992. Laju infeksi dan intensitas serangan Phytophthora palmivora pada buah kakao dan batang pada beberapa varietas kakao. Menara Perkebunan, 60 (2), 67-72.
- Sharon, C, S. Furugoh, T. Yamakido, H.I. Ogawa dan Y. Kato, 1998, Purification and Characterization of a lipase from *Pseudomonas aeroginusa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 20, 304-307
- Steel, D.G. dan H. Torrie. 1995. Prinsip dan Prosedur Statistik. PT. Gramedia Pustaka Indonesia.
- Wang, I.C. 1979. John Wiley and Sons. Fermentation and Enzymes Technology. New York.