

**SKRINING LIPASE DARI ISOLAT BAKTERI ENDOFIT BATANG PACING
(*Costus speciosus* (J.Koenig) Sm) DAN PENENTUAN KONDISI KERJA OPTIMUMNYA**

**SCREENING LIPASE FROM ENDOPHYTIC BACTERIA FROM STEAM OF PACING
(*Costus speciosus* (J.Koenig) Sm) AND DETERMINATION OF ITS OPTIMUM WORKING
CONDITION**

Asjayani Kurnia Sari, Winni Astuti*, dan Djihan Ryn Pratiwi

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman
Jalan Barong Tongkok No. 4 Kampus Gunung Kelua, Samarinda, 75123

*E-mail: winniastuti@gmail.com

Received: 08 November 2018, Accepted: 28 January 2020

ABSTRACT

Endophytic bacteria are bacteria that live in plant tissues such as the roots, leaves, and stems of plants. This research was conducted to screen lipase-producing endophytic bacteria from Pacing stem (*Costus speciosus* (J.Koenig) Sm.) and determine the optimum working conditions. Screening of lipase-producing bacteria on nutrient agar media containing olive oil and Rhodamine B showed that one isolate was able to produce lipase. The crude lipase extract produced from endophytic bacteria worked optimally at a pH of 7, the temperature of 40°C, and a substrate concentration of 2%.

Keywords: *Costus speciosus* (J.Koenig) Sm., *Endophytic Bacteria*, *Lipase*, *Optimum Activity*.

PENDAHULUAN

Enzim merupakan molekul penyusun protein yang bekerja sebagai katalis dalam semua reaksi kimia di dalam tubuh makhluk hidup [1]. Banyak industri yang telah memanfaatkan enzim sebagai katalis. Satu diantara beberapa jenis enzim mempunyai peran penting dalam perkembangan bioteknologi yaitu enzim lipase. Lipase merupakan enzim lipolitik yang berfungsi mengkatalisis proses hidrolisis lemak serta minyak menjadi gliserol dan asam lemak dengan adanya air [2]. Dalam dunia industri lipase digunakan dalam bidang pangan, industri berbasis agrokimia, formulasi deterjen, farmasi dan obat-obatan, bahan kimia sintesis, bioremediasi serta kosmetik [3].

Salah satu sumber lipase yaitu berasal dari mikroorganisme. Sumber enzim menggunakan mikroorganisme memiliki beberapa keunggulan yakni proses kultur untuk mikroba dapat dilakukan dengan cepat di dalam ruangan yang kecil dan menghasilkan enzim dengan jumlah banyak sehingga untuk biaya produksinya lebih terjangkau dibandingkan dengan penggunaan enzim lain yang berasal dari hewan ataupun tumbuhan [3]. Mikroba endofit adalah mikroba yang hidup dalam jaringan

tumbuhan [4]. Bakteri endofit yang terdapat ataupun tinggal dalam jaringan tumbuhan jumlahnya tidak diketahui dengan pasti, tetapi dapat dideteksi dengan cara mengisolasi tanaman tersebut pada media padat [5]. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengisolasi mikroba endofit sebagai penghasil enzim lipase, diantaranya adalah bakteri endofit yang diisolasi dari buah sawit diperoleh dua spesies yang berbeda yaitu *Bacillus brevis* dan *Bacillus lacterosporus* [6]. Bakteri endofit dengan genus *Bacillus sp.* yang diisolasi dari tanaman *Plectranthus tenuiflorus* juga berpotensi sebagai penghasil lipase [7]. Selain itu bakteri endofit yang diperoleh dari daun tanaman *Jacaranda decurrens* juga berpotensi sebagai penghasil lipase [8].

Salah satu pemanfaatan tumbuhan adalah dengan mengisolasi bakteri endofit yang hidup didalam tumbuhan tersebut. Penelitian pendahuluan telah dilakukan seleksi pada beberapa isolat bakteri endofit dari batang Pacing (*Costus speciosus* (J.Koenig) Sm.) yang menunjukkan adanya aktivitas lipase. Sehingga penelitian ini dilakukan untuk memperoleh enzim lipase dari bakteri endofit yang hidup pada batang Pacing (*Costus speciosus* (J.Koenig) Sm.) serta mengetahui kondisi optimum

dan pengaruh ion logam ekstrak kasar lipase yang berasal dari bakteri endofit pada batang Pacing (*Costus speciosus* (J.Koenig) Sm.).

METODOLOGI PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu beaker glass, Erlenmeyer, pipet tetes, batang pengaduk, petri dish, jarum ose, bunsen, autoclave, lampu UV, dan laminar flow.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri endofit dari batang tumbuhan Pacing (*Costus speciosus* (J.Koenig) Sm.), gum arab, minyak zaitun, aquades, etanol 95 %, aseton, aluminium foil, tisu, kapas, kasa, media padat *Nutrient Agar* (NA) 2,5%, media cair *Luria Bertani* (*yeast extract* 0,5%, *tripton* 1%, *NaCl* 1%), Rhodamin B, CH_3COOH , CH_3COONa , KH_2PO_4 dan NaOH .

Prosedur Penelitian

Skrining isolat bakteri endofit penghasil lipase

Skrining aktivitas lipase dengan metode goresan (*streak plate*), dimana isolat bakteri terpilih di *streak* pada media agar NA yang mengandung Rhodamin B dan diinkubasi selama (16-18) jam pada suhu 37°C. Secara kualitatif aktivitas lipase ditunjukkan dengan pendaran warna merah muda di sekitar koloni bakteri di bawah lampu UV. Isolat-isolat koloni tunggal yang memperlihatkan adanya aktivitas lipase diproduksi untuk dilakukan uji selanjutnya

Pada proses ini batang pisang dicuci dengan air sumur bor untuk menghilangkan pengotor lalu dipotong kecil-kecil kemudian batang pisang dikeringkan di bawah sinar matahari ± 2 minggu.

Produksi lipase dari isolat bakteri endofit

Produksi lipase dilakukan dengan cara menginokulasi isolat bakteri terpilih dengan cara diambil satu ose lalu di *streak* pada 5 mL media cair (LB) dan diinkubasi selama (16-18) jam pada suhu 37°C. Kemudian, ditumbuhkan 100 μL isolat bakteri ke dalam 10 mL media LB dan diinkubasi selama 72 jam pada suhu 37°C diatas *water shaker* dengan kecepatan 150 rpm. Selanjutnya, isolat bakteri yang telah ditumbuhkan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit untuk memisahkan supernatan dan endapannya. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim untuk dilakukan pengujian lipase selanjutnya.

Uji aktivitas lipase secara kuantitatif

Sebanyak 4 mL larutan buffer fosfat pH 7,5 dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer. Setelah itu ditambahkan 0,05 gram gum arab dan 50 μL minyak zaitun dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer. Kemudian ditambahkan 1 mL ekstrak kasar enzim ke dalam labu Erlenmeyer lalu dihomogenkan. Diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Kemudian ditambahkan 10 mL larutan aseton-alkohol (1:1) dan dihomogenkan lalu ditambahkan 1 tetes indikator PP (*phenolphthalein*). Selanjutnya dititrasi dengan menggunakan NaOH 0,02 M hingga warna larutan menjadi merah muda yang tidak hilang, dicatat volume titrasinya. Sebagai kontrol ekstrak kasar enzim diganti dengan menggunakan aquades. Pengujian dilakukan secara triplo.

Karakterisasi lipase

Derajat keasaman (pH) optimum

Penentuan derajat keasaman (pH) optimum dari lipase dilakukan dengan menguji aktivitasnya pada berbagai variasi pH (4; 5; 6; 7; 8 dan 9).

Suhu optimum

Penentuan suhu optimum dari lipase dilakukan dengan menguji aktivitasnya pada berbagai variasi suhu (30; 40; 50; 60; 70 dan 80°C) dengan menggunakan buffer pH optimum.

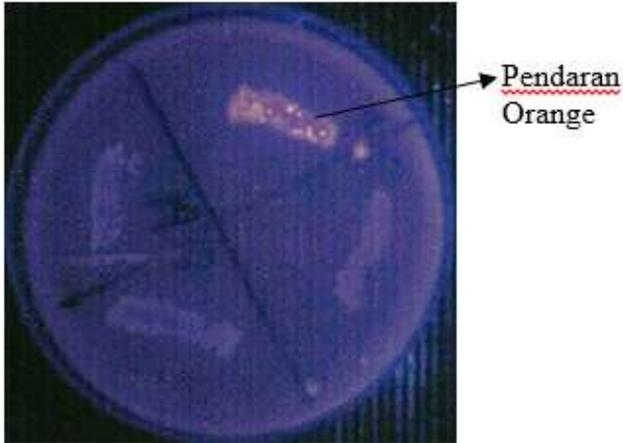
Konsentrasi substrat optimum

Penentuan konsentrasi substrat optimum dari lipase dilakukan dengan menguji aktivitas enzim di berbagai konsentrasi substrat (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3%) v/v pada pH dan suhu optimum.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Skrining Bakteri Endofit Penghasil Lipase

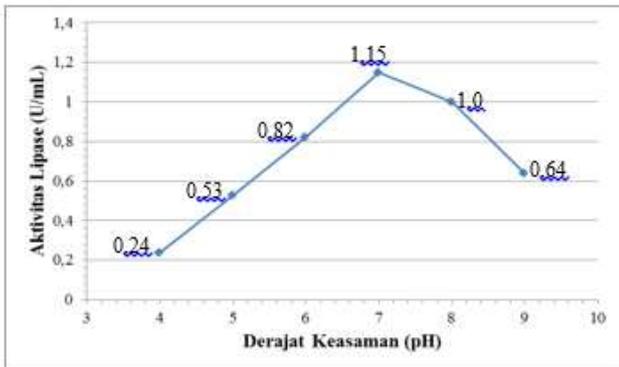
Hasil skrining menunjukkan satu isolat bakteri endofit menghasilkan pendar orange saat dilihat dibawah sinar UV (Gambar 1). Pendaran orange mengindikasikan adanya lipase yang dihasilkan oleh isolat bakteri dimana di daerah tersebut substrat berupa minyak zaitun yang terdapat pada media telah terhidrolisis menjadi asam lemak bebas yang bereaksi dengan Rhodamin B membentuk kompleks berwarna orange jika dilihat dibawah sinar UV [9].



Gambar 1. Pendaran orange dari bakteri endofit penghasil lipase.

Penentuan Derajat Keasaman (pH) Optimum

Pengaruh pH terhadap aktivitas lipase dipelajari untuk mengetahui pH optimum lipase dari isolat bakteri endofit batang Pacing (*Costus speciosus* (J. Koenig) Sm) dalam menghidrolisis substrat. Pengaruh variasi pH terhadap aktivitas lipase ditampilkan pada Gambar 2.



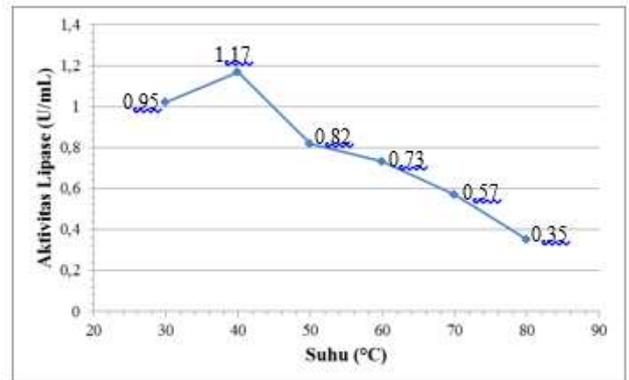
Gambar 2. Variasi pH terhadap aktivitas lipase.

Lipase dari bakteri endofit batang Pacing (*Costus speciosus* (J.Koenig) Sm.) memiliki pH optimum 7 dengan nilai aktivitas sebesar 1,15 U/mL. Pada pH yang lebih asam/basa, aktivitas lipase menurun karena struktur lipase berubah disebabkan terganggunya interaksi lemah asam-asam amino penyusun lipase[10]. Perubahan pH dapat mempengaruhi tingkat ionisasi terhadap gugus pemberi atau penerima proton pada sisi aktif lipase. Pada saat diberikan pengaruh pH, gugus pada sisi aktif lipase akan terionisasi dengan adanya penambahan H⁺ atau OH⁻ di lingkungan enzim, sehingga menyebabkan interaksi lemah pada rantai samping asam amino akan terganggu terutama ikatan hidrogen dan ikatan ionik, sehingga perubahan pH di lingkungan enzim akan berpengaruh terhadap efektivitas bagian sisi aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat [11].

Aktivitas lipase optimum saat interaksi lemah pada rantai samping asam amino tersebut berada pada tingkat ionisasi yang diinginkan sehingga bentuk *folding* dari protein tersebut baik. Hal ini menyebabkan protein dalam struktur yang benar untuk melakukan aktivitasnya, dimana sisi aktif dari rantai samping asam amino penyusun protein tersebut juga dalam keadaan yang sangat baik untuk berikatan dengan substrat membentuk kompleks enzim substrat dan menghasilkan produk secara maksimal [10]. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, bakteri endofit hasil isolasi dari buah sawit dengan spesies bakteri yang berbeda yaitu *Bacillus brevis* dan *Bacillus lacterosporus* memiliki aktivitas lipase yang masing-masing bekerja optimum pada pH 8 dan 8,5 [6]. Pada jenis bakteri selain endofit, lipase dari bakteri *Staphylococcus pasteurii* bekerja optimum pada pH 7 [12] sedangkan bakteri *Erwinia chrysantemi* penghasil lipase yang diperoleh dari air limbah tekstil bekerja optimum pada pH 9 [9]. Hal ini membuktikan bahwa lipase dari isolat bakteri yang berbeda memiliki pH optimum yang berbeda dalam mengikat substrat.

Suhu Optimum

Pengaruh suhu terhadap aktivitas lipase dipelajari untuk mengetahui suhu optimum lipase dari isolat bakteri endofit batang Pacing (*Costus speciosus* (J. Koenig) Sm.) dalam menghidrolisis substrat. Pengaruh variasi suhu terhadap aktivitas lipase ditampilkan pada Gambar 3.



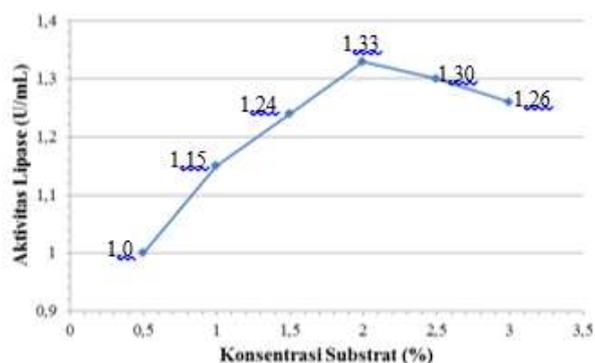
Gambar 3. Variasi suhu terhadap aktivitas lipase.

Pada suhu 30°C aktivitas lipase sebesar 0,95 U/mL. Hal ini dikarenakan setiap reaksi membutuhkan suhu untuk menambah energi yang mempercepat reaksi. Pemberian suhu yang rendah akan menyebabkan aktivitas enzim berlangsung lambat karena energi aktivasinya sulit tercapai sehingga intensitas reaksi antara substrat dengan enzim jarang terjadi. Hal inilah yang menyebabkan jumlah substrat yang terhidrolisis oleh enzim hanya sedikit [11].

Aktivitas lipase optimum pada suhu 40°C dengan nilai aktivitas sebesar 1,17 U/mL. Hal ini dikarenakan penambahan suhu dapat meningkatkan laju reaksi katalitik enzim karena meningkatkan energi kinetik molekul-molekul yang bereaksi sehingga reaksi akan lebih sering terjadi antara substrat dengan enzim. Reaksi yang sering terjadi pada enzim dan substrat akan mempermudah terbentuknya kompleks enzim substrat sehingga produk yang terbentuk juga semakin banyak [12]. Namun peningkatan suhu yang terlalu tinggi (melewati suhu optimumnya) akan menyebabkan penurunan aktivitas enzim. Hal ini disebabkan penambahan suhu dapat meningkatkan energi kinetik. Bertambahnya energi kinetik akan mempercepat gerak vibrasi (getaran) molekul dari enzim [13]. Getaran yang cepat menyebabkan rusaknya interaksi lemah antar rantai samping asam amino, hal inilah yang menyebabkan protein dapat terdenaturasi sehingga menyebabkan menurunnya fungsi katalitik enzim karena struktur enzim tidak sesuai lagi dengan molekul substrat [14].

Konsentrasi Substrat

Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas lipase dipelajari untuk mengetahui konsentrasi substrat optimum lipase dari isolat bakteri endofit batang Pacing (*Costus speciosus* (J. Koenig) Sm) dalam menghidrolisis substrat. Konsentrasi substrat optimum dari ekstrak kasar lipase dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Variasi konsentrasi substrat terhadap aktivitas lipase.

Lipase dari bakteri endofit batang Pacing (*Costus speciosus* (J.Koenig) Sm.) memiliki konsentrasi optimum 2% dengan nilai aktivitas sebesar 1,33 U/mL. Pada konsentrasi yang lebih rendah dari konsentrasi optimum, aktivitas lipase lebih kecil dari konsentrasi optimumnya. Hal ini dikarenakan pada konsentrasi substrat yang rendah, bagian sisi aktif enzim hanya sedikit mengikat substrat, sehingga produk yang dihasilkan juga

sedikit. Jika konsentrasi substrat semakin tinggi, maka sisi aktif enzim akan semakin banyak mengikat substrat, sehingga produk yang dihasilkan pun akan semakin banyak. Namun peningkatan konsentrasi substrat diatas konsentrasi optimumnya tidak meningkatkan aktivitas enzim. Hal ini dikarenakan semua sisi aktif enzim telah berikatan dengan substrat membentuk kompleks enzim-substrat, sehingga tidak terdapat lagi sisi aktif enzim yang bebas [1].

Berdasarkan Gambar 4, peningkatan konsentrasi diatas 2% yaitu pada konsentrasi 2,5% dan 3% aktivitas lipase sedikit mengalami penurunan. Hal ini dikarenakan semakin banyak konsentrasi substrat maka sisi aktif enzim yang berikatan dengan substrat juga bertambah banyak, akibatnya semakin banyak produk yang terbentuk. Akan tetapi produk yang berlebih menyebabkan inhibisi produk dimana produk yang berlebih akan menempel pada sisi regulator enzim sehingga menyebabkan sisi aktif enzim berubah. Hal ini menyebabkan substrat tidak dapat berikatan dengan enzim membentuk kompleks enzim-substrat sehingga aktivitas enzim menurun [15].

KESIMPULAN

Lipase dari isolat bakteri endofit batang Pacing (*Costus speciosus* (J.Koenig) Sm.) bekerja optimum pada pH 7, suhu 40°C dan konsentrasi substrat 2%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh staf dan dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Mulawarman, Laboratorium Biokimia, Laboratorium Lingkungan, Laboratorium Analitik dan Laboratorium Balai Riset Standarisasi.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Poedjadi A. dan Supriyanti F. M. 2006. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI-Press.
- [2] Layly I. R. and Wiguna N. O. 2016. Studi potensi lipase *alcaligenes faecalis* untuk aplikasi biodeterjen stuy of lipase of *alcaligenes faecalis* potential for the application of biodetergent", *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*. 3(2):66–71.
- [3] Verma N., Thakur S. and Bhatt A. 2012. Microbial lipases: Industrial applications and properties (a review). *Int Res J Biological Sci*. 1:88–92.
- [4] Hasegawa S., Meguro A., Shimizu M., Nishimura T. and Kunoh H. 2006. Endophytic

- actinomycetes and their interaction with host plant. *Actinomycetologica*. 20:72-80.
- [5] Desriani, Ukhradia M. S. P., Maria B., Akhmad R. P. L. 2014. Artikel penelitian isolasi dan karakterisasi bakteri endofit dari tanaman binahong dan katepeng China. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 3(2):89–93.
- [6] Djafar F., Purwandaria T., Sinurat A. P. 2010. Isolation of endophytic bacteria from palm oil fruit and characterization of their lipases. *Microbiol*. 4(2):1-6.
- [7] El-Deeb B., Fayez K. and Gherbawy Y. 2013. Isolation and characterization of endophytic bacteria from *Plectranthus tenuiflorus* medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities. *Journal of Plant Interactions*. 8(1):56–64.
- [8] Ivonilde C. A. J., Cândida B. E., and Gonçalves V. J. D. 2006. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 49(3):353–359.
- [9] Kasipah C., Rismayani S. and Nurachman Z. 2013. Isolasi dan karakterisasi bakteri penghasil enzim lipase ekstraseluler lumpur aktif instalasi pengolahan air limbah industri tekstil. *Jurnal Ilmiah Arena Tekstil*. 28(1):1–7.
- [10] Habibie F. M., Wardani A. K. dan Nurcholis M. 2014. Isolasi dan identifikasi molekuler mikroorganisme termofilik penghasil xilanase dari lumpur panas Lapindo. 2(4):21-238.
- [11] Mulyani N. S. 2010. Penentuan temperatur dan pH optimum pada uji aktivitas xilanase hasil isolasi dari *Aspergillus niger* dengan menggunakan media pertumbuhan sekam padi. *Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia*. Semarang: UNDIP.
- [12] Dukhande M. S. dan Pawar A. C. 2014. Effect of various physio-chemical parameters on production of lipase by *Staphylococcus pasteurii*. *Biosci Biotechnol Res Asia*. 11(3):1521-1524.
- [13] Setyawati I. 2006. Produksi dan karakterisasi xilanase mikroba yang diisolasi dari tongkol jagung. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- [14] Fitrianti R. 2014. Pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas enzim selulase dari kultur campuran *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp. dan *Botrytis* sp. yang ditumbuhkan pada media kulit pisang. *Skripsi*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- [15] Simanjuntak M. T., Silalahi J. 2003. Biokimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Jurusan Farmasi Universitas Sumatera Utara.