LIPASE ISOLAT LOKAL PADA SINTESIS BIODIESEL

Diah Kartika Sari
Pendidikan Kimia,Universitas Sriwijaya,
Jl. Palembang-Prabumulih Km. 32 Inderalaya, Ogan Ilir

e-mail : ks_dee@yahoo.co.id

ABSTRAK

Lipase (*Triacylglicerol acylhydrolase*, E.C. 3.1.1.3) yang berasal dari bakteri termofilik dapat dimanfaatkan dalam berbagai bidang industri. Penggunaan lipase termozim yang berasal dari bakteri termofilik diduga dapat mengatasi kendala yang ada dalam industri seperti suhu yang tinggi dan waktu yang lebih lama. Lipase banyak digunakan dalam pengolahan lemak dan minyak, detergen, pengolahan makanan, sintesis bahan kimia, farmasi, sintesis kertas, produksi kosmetik dan juga industri biodiesel. Biodiesel adalah salah satu bahan bakar alternatif yang dapat diperbaruhi, ramah terhadap lingkungan, tidak mempunyai efek terhadap kesehatan dan dapat dipakai sebagai bahan bakar kendaraan bermotor. Lipase dapat mengkatalisis reaksi transesterifikasi pada sintesis biodiesel dengan reagent yang sesuai dan kehadiran air yang terbatas.

Dalam penelitian ini, enzim lipase yang digunakan adalah enzim termostabil yang berasal dari mikroorganisme sumber air panas KHA-P12. Uji kualitatif dilakukan dengan menggunakan media $CaCl_2$. Enzim lipase ekstraseluler yang diekspresikan oleh kultur KHA-P12 pada suhu 70°C selama 18 jam, diisolasi dan terhadap ekstrak kasar yang diperoleh dilakukan pengendapan dengan dua cara yaitu pengendapan aseton dan fraksinasi ammonium sulfat. Hasil endapan diliofilisasi untuk memperoleh bubuk lipase. Sedangkan uji aktivitas dilakukan dengan menggunakan substrat para-nitrofenol palmitat (pNPP). Sintesis biodiesel dilakukan dengan dikatalisis oleh enzim lipase. Sebagai kontrol dilakukan juga sintesis biodiesel dengan enzim yang telah dinonaktifkan terlebih dahulu. Reaksi transesterifikasi pada penelitian ini menggunakan minyak kelapa dan dengan menggunakan etanol. Hasil transesterifikasi dianalisis dengan menggunakan spektrometri massa.

Uji kualitatif menunjukkan hasil positif adanya lipase yang disekresikan secara ekstraseluler oleh KHA-P12 dengan terbentuknya endapan kalsium monolaurat. Aktivitas spesifik lipase yang diendapkan dengan aseton adalah 1,52 unit/mg protein dengan jumlah endapan 2,7 gram dan fraksi 40-60% ammonium sulfat adalah 0,82 unit/mg protein dengan jumlah endapan 30 mg. Enzim lipase yang diendapkan dengan aseton memiliki aktivitas spesifik lebih tinggi dan endapan yang lebih banyak sehingga digunakan lebih lanjut pada reaksi transesterifikasi. Hasil spektrometri massa menunjukkan reaksi transesterifikasi tidak dapat berlangsung dengan enzim yang telah dinonaktifkan. Tetapi reaksi transestrifikasi dapat berlangsung dengan dikatalisis oleh enzim lipase.

Kata kunci : Biodiesel, Lipase, Lipase termostabil

PENDAHULUAN

Beberapa bakteri termofilik telah diisolasi dari sumber air panas di Indonesia. Bakteri tersebut menghasilkan enzim yang dikenal dengan istilah enzim termozim. Salah satu enzim termozim adalah lipase. Lipase yang berasal dari bakteri termofilik dapat dimanfaatkan dalam berbagai bidang industri. Penggunaan lipase termozim yang berasal dari bakteri termofilik diduga dapat mengatasi kendala yang ada dalam industri seperti suhu yang tinggi dan waktu yang lebih lama. Lipase dapat mengkatalisis reaksi transesterifikasi untuk mensintesis biodiesel yang sedang digalakkan oleh berbagai negara.

Biodiesel adalah salah satu bahan bakar alternatif yang dapat diperbaruhi, ramah terhadap lingkungan, dan tidak mempunyai efek terhadap kesehatan. Biodiesel dapat disintesis melalui reaksi kimia yang disebut transesterifikasi dimana reaksi antara senyawa trigliserida (komponen utama minyak nabati) dengan senyawa alkohol (biasanya metanol). Reaksi ini menghasilkan dua produk yaitu metil ester asam lemak (biodiesel) dan gliserin. Biodiesel terbuat dari minyak nabati berasal dari sumberdaya yang dapat diperbaruhi. Beberapa bahan baku untuk pembuatan biodiesel antara lain kelapa sawit, kedelai, bunga matahari, dan jarak pagar.

Indonesia adalah salah satu negara penghasil minyak nabati terbesar didunia. Ini merupakan potensi bahan baku yang besar untuk tujuan pengembangan bahan bakar alternatif. Banyaknya perkebunan kelapa di Indonesia (pada tahun 2003 kelapa menempati areal seluas 3,70 juta ha, Supadi dan Nurmanaf, 2006) merupakan jawaban mengapa kelapa masih dijadikan bahan baku yang sering digunakan pada pembuatan biodiesel. Reaksi transesterifikasi yang dikatalisis dengan menggunakan bantuan enzim lipase memiliki beberapa kelebihan dalam peningkatan kuantitas dan kualitas konversi minyak nabati ke biodiesel, yakni tanpa busa, hasil konversi tinggi, produk yang dihasilkan mudah dimurnikan, bahkan dapat dilakukan tanpa pemurnian, gliserol mudah dipisahkan (Fukuda dkk., 2001; Hasan dkk., 2006).

Berangkat dari permasalahan yang ada, maka menarik dilakukan penelitian tentang sintesis biodiesel dengan dikatalisis oleh enzim lipase dari isolat lokal KHA-P12 (EU784082) yang telah diisolasi sebelumnya. KHAP-12 mikroorganisme sumber air panas mampu mengekspresikan enzim lipase secara ekstraseluler (Widhiastuty dkk., 2009). Belum ada penelitian lebih lanjut mengenai kemampuan mengkatalisis reaksi transesterifikasi oleh enzim lipase KHA-P12 pada sintesis bodiesel.

BAHAN DAN METODE

Bahan penelitian yang digunakan adalah kultur KHAP-12 yang berasal dari sumber mata air panas Kawah hujan Jawa Barat (Widhiastuty dkk. ,2009). Untuk pembuatan media digunakan bahan-bahan kimia yaitu pepton (Merck), ekstrak ragi (Merck), $CaCl_2.2H_2O$ (Merck), NaCl (Merck), dan bakto agar (untuk media padat). Untuk media produksi ditambahkan minyak zaitun sebagai penginduksi, sementara untuk media uji kualitatif menggunakan media $CaCl_2$ (pepton 1,5gram, NaCl 0,5 gram, $CaCl_2$ 0,1gram, bakto agar 3gram, dan 1 ml tween 20 1ml dalam 100 ml air).

Enzim hasil produksi kemudian dipekatkan melalui metode pengendapan dengan aseton (Merck). Selain itu sebagai pembanding pemekatannya juga dilakukan melalui fraksinasi amonium sulfat (Merck) yang diikuti dialisis menggunakan kantong selofan (Sigma). Untuk melarutkan enzim digunakan buffer tris-HCl pH 8 0,05M yang dibuat menggunakan basa tris (Merck) dan HCl (Merck). Uji aktivitas enzim dilakukan dengan menggunakan substrat pNP-palmitat (Sigma) yang telah dilarutkan dalam asetonitril, kemudian ditambahkan etanol (Sigma) dan buffer kalium fosfat (pH 8 50 mM) sehingga komposisi akhirnya adalah asetonitril (Sigma) : etanol (Sigma) : buffer = 1 : 4 : 95 (v/v/v).

Penentuan kadar protein dengan Metode Lowry. Bahan yang digunakan pada metode lowry adalah reagen biuret yaitu 2 % Na_2CO_3 (Merck) dalam 0,1 N NaOH (Merck), 2,7 % Natrium Kalium Tartrat (Merck), 1 % $CuSO_4$(Merck) dalam H_2O dan 1 N Reagen Folin – Ciocalteu (Merck). Semua zat yang digunakan untuk pengendapan protein dan uji aktivitas merupakan zat yang berderajat proanalis (pa).

Elektroforesis *NATIVE-PAGE* menggunakan bahan-bahan sebagai berikut tris-base (merck), HCl (merck), amonium persulfat (Merck), TEMED (merck), gliserol (merck), bromfenol biru (merck), glisin (merck), metanol (merck), asam asetat glasial (merck), komasi biru (merck). Biodiesel disintesis melalui reaksi transesterifikasi antara minyak kelapa yang diperoleh dari pasaran (merk “B”) dengan etanol (Sigma). Sedangkan Hexane (Merck) digunakan sebagai pengemulsi.

HASIL DAN DISKUSI

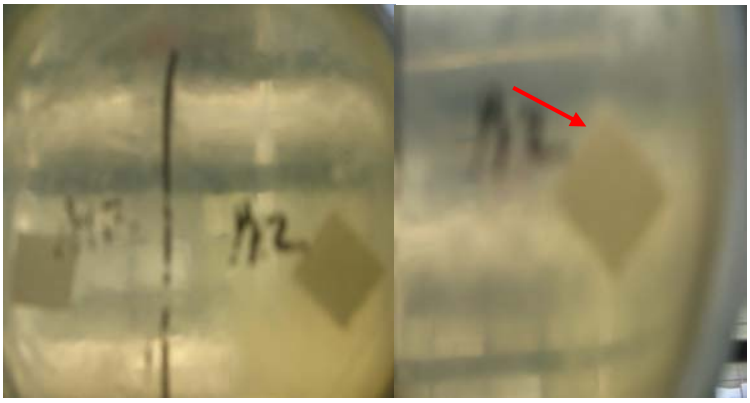
Lipase dapat mengkatalisis reaksi transesterifikasi untuk mensintesis biodiesel yang sedang digalakkan oleh berbagai negara. Salah satu mikroorganisme termofilik isolat lokal yang telah diisolasi sebelumnya dan mampu mengekspresi lipase yaitu KHAP-12 yang memiliki kekerabatan terdekat dengan *Thermus aquaticus* (Widhiastuty dkk., 2009). Sebagai langkah awal untuk mengaplikasikan lipase termostabil pada sintesis biodiesel dilakukan tahap isolasi enzim lipase dari mikroorganisme KHAP-12 terlebih dahulu.

Isolasi Enzim Lipase Termostabil

Sebelum melakukan isolasi enzim lipase termostabil dari KHAP-12 maka dilakukan beberapa tahap persiapan. Setelah dilakukan penumbuhan kultur KHAP-12 dari stok gliserol pada media ½T (Widhiastuty dkk., 2009), tahap persiapan yang pertama adalah peremajaan kultur KHAP-12 dimana peremajaan dilakukan minimal sekali dalam sebulan. KHAP-12 adalah termasuk ke dalam golongan mikroorganisme termofilik maka inkubasi dilakukan pada suhu tinggi, yakni 70ºC selama 18 jam. Setelah kultur yang baru tumbuh, lalu disimpan ke dalam kulkas 4ºC untuk menghambat pertumbuhan bakteri.

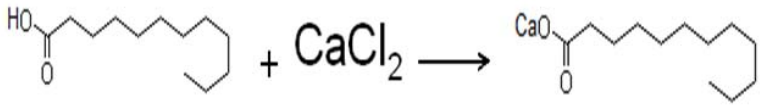
Uji Kualitatif Lipase CaCl2

Sebelum melangkah ke tahap selanjutnya, dilakukan uji kualitatif untuk memastikan bahwa kultur KHAP-12 yang ditumbuhkan benar-benar mensekresikan enzim lipase atau tidak.



Gambar 1. Uji kualitatif dengan media $CaCl_2$

Uji kualitatif dilakukan dengan menggunakan media uji lipase yang mengandung tween 20 dan $CaCl_2$. Hasil uji kualitatif menunjukkan hasil positif ini dapat dilihat dengan keberadaan lipase yang ditandai dengan adanya zona bening pada gambar 1 yang diikuti oleh adanya endapan putih kalsium-monolaurat di sekitar koloni. Pada uji dengan metode ini, lipase akan disekresikan secara ekstraselular oleh bakteri sehingga terdapat pada media uji. Keberadaan lipase pada media uji akan mengkatalisis reaksi hidrolisis tween 20 (polioksietilen (20) sorbitan monolaurat) menjadi asam monolaurat. Terhidrolisisnya tween 20 menyebabkan perubahan warna media uji yang awalnya agak keruh menjadi bening. Selanjutnya, asam monolaurat hasil hidrolisis tween 20 akan bereaksi dengan $CaCl_2$ yang terdapat pada media uji. Reaksi antara asam monolaurat dengan $CaCl_2$ menghasilkan Ca-monolaurat (berupa endapan putih) Gambar 2.



Asam monolaurat(aq) Ca-monolaurat(s)

Gambar 2. Reaksi asam monolaurat dengan $CaCl_2$
(Hankin, L., dan Anagnostakis, S. L. (1975)

Produksi Enzim Lipase Termostabil

Produksi lipase dilakukan sesuai dengan data-data yang telah diperoleh dari penelitian sebelumnya (Widhiastuty dkk., 2009). Lipase diproduksi pada suhu 70ºC, dan dipanen pada jam ke-18 setelah inokulasi dari media sebelumnya. Sebelumnya, bakteri yang telah dikulturkan dalam media padat, ditumbuhkan dalam media aktivasi (*starter*) semalaman pada suhu inkubasi 70ºC. Pada penelitian ini, bakteri termofilik ditumbuhkan dengan kecepatan pengocokan tinggi (150 rpm), ini

dilakukan karena organisme membutuhkan oksigen dan pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh ada atau tidaknya oksigen yang terlarut. Semua komposisi dan faktor-faktor fisika kimia mengikuti penelitian sebelumnya (Widhiastuty dkk., 2009).

Pengendapan Protein

Pengendapan dengan Aseton

Pengendapan aseton dilakukan untuk mengendapkan larutan protein. Pelarut organik (misalnya aseton) akan mengurangi tetapan dielektrik air, dengan demikian dapat mengurangi kelarutan protein karena interaksi antar molekul protein lebih disukai dibandingkan antara molekul protein dengan air. Protein dapat diendapkan dengan pelarut organik tanpa merusak struktur protein bila diendapkan pada suhu di bawah 4^oC.

Fraksinasi dengan Amonium Sulfat dan Dialisis

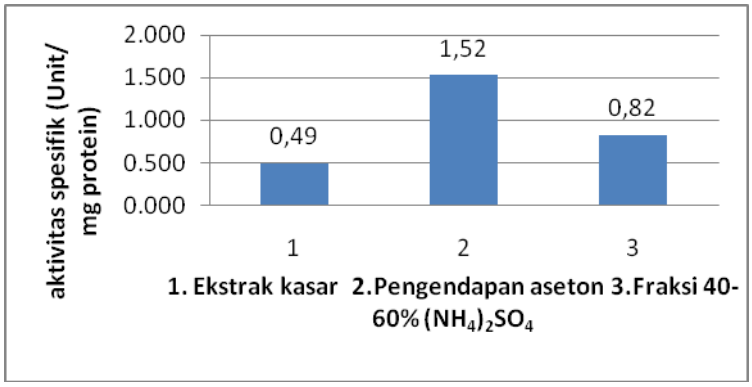
Bila dalam suatu larutan protein ditambahkan garam, daya larut protein akan berkurang, akibatnya protein akan terpisah sebagai endapan. Peristiwa pemisahan protein ini disebut *salting out*. Efek salting out disebabkan garam dengan konsentrasi tinggi dapat menghidrasi air dari permukaan molekul protein sehingga protein terendapkan. Proses fraksinasi bertujuan untuk memekatkan atau menjenuhkan larutan sehingga diperoleh larutan pekat yang mengandung endapan protein. Penambahan amonium sulfat dalam proses fraksinasi dilakukan sedikit demi sedikit sambil diaduk di atas *magnetic stirrer* dengan kecepatan konstan. Hal ini bertujuan untuk mencegah terjadinya denaturasi protein.

Endapan masang-masing fraksi amonium sulfat yang diperoleh dari sentrifugasi kemudian diresuspensi dalam larutan buffer tris HCl 50 mM pH 8,0 dengan volume seminimal mungkin untuk kemudian dilakukan dialisis. Proses dialisis berguna untuk membebaskan protein dalam larutan dari partikel-partikel penggangu lainnya. Dalam proses ini digunakan membran semipermeabel untuk menahan molekul-molekul protein, sedangkan molekul yang lebih kecil seperti garam dan air dapat melewati membran tersebut. Pada penelitian, membran semipermeabel yang digunakan adalah selofan. Buffer perlu diganti pada saat mencapai kesetimbangan konsentrasi antara bagian dalam dan bagian luar. Dengan pergantian buffer, proses difusi akan terus berlanjut. Untuk mengetahui larutan protein bebas dari garam, maka larutan buffer diluar membran dianalisis dengan ditetesi larutan $BaCl_2$ 0,1 M. Apabila larutan protein masih mengandung amonium sulfat, maka di dalam larutan buffer akan terbentuk endapan barium sulfat yang berwarna putih.

Hasil pengendapan aseton dan fraksinasi dengan amnium sulfat dikeringkan dengan *freeze dryer*, ini dikarenakan untuk membuat biodiesel dengan menggunakan enzim lipase dengan bentuk serbuk atau padatan. Hasil *freeze drying* diperoleh padatan hasil pengendapan aseton sebesar 2,7 gram sedangkan padatan hasil fraksinasi dengan ammonium sulfat diperoleh 30 mg.

Uji Aktivitas Enzim Setelah Pengendapan

Enzim diuji aktivitas dengan menggunakan substrat pNP-palmitat untuk ekstrak kasar, hasil pengendapan dengan aseton maupun fraksinasi ammonium sulfat. Pengujian aktivitas ini dilakukan pada temperatur 65ºC dan pH 8,0. Dalam penelitian ini aktivitas spesifik dinyatakan sebagai unit/mg protein dimana 1 unit aktivitas lipase didefinisikan sejumlah enzim yang menghasilkan 1µmol pNP per menit.



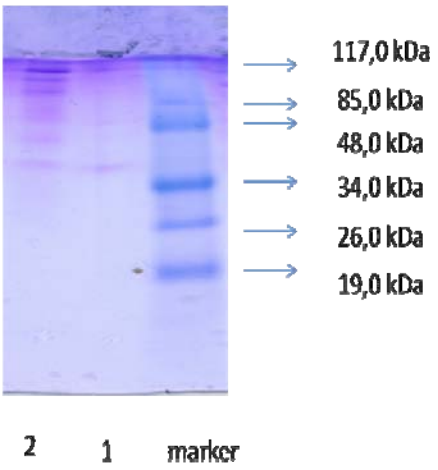
Gambar 3 Profil aktivitas spesifik ekstrak kasar dan hasil pengendapan

Gambar 3 menunjukkan aktivitas ekstrak kasar enzim, hasil pengendapan aseton dan fraksi 40-60 dari pengendapan dengan ammonium sulfat. Aktivitas spesifik dari pengendapan aseton lebih besar daripada hasil fraksinasi ammonium sulfat dan ekstrak kasar. Bila dibandingkan dengan ekstrak kasar, dapat dilihat bahwa hasil pengendapan mengalami kenaikan aktivitas yang cukup signifikan, yakni hampir 3 kali untuk pengendapan dengan aseton sedangkan untuk fraksinasi ammonium sulfat mengalami kenaikan 2 kali.

Elektroforesis *Native-PAGE*

Elektroforesis adalah proses bergeraknya suatu molekul bermuatan pada suatu medan listrik. Kecepatan molekul yang bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, bentuk dan ukuran. Karenanya elektroforesis sering digunakan untuk memisahkan protein atau dNA. Pada penelitian ini dilakukan elektroforesis *Native-PAGE* terhadap lipase hasil pengendapan dengan aseton dan fraksi 40-60% ammonium sulfat (gambar 4).

Dari hasil elektroforegram *NATIVE-PAGE* dapat dilihat bahwa hasil pengendapan aseton dan fraksinasi ammonium sulfat menunjukkan beberapa pita protein. Hasil pengendapan aseton memiliki jumlah pita protein yang lebih sedikit dengan aktivitas yang lebih tinggi (dari uji aktivitas yang telah dilakukan pada tahap sebelumnya) dibandingkan dengan fraksi 40-60% ammonium sulfat.



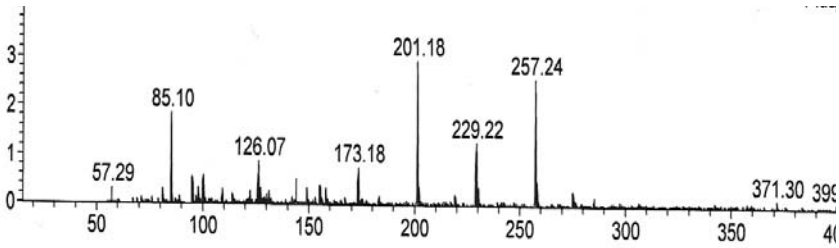
Gambar 4. Hasil elektroforesis *NATIVE-PAGE*
1. Hasil pengendapan aseton
2. Fraksi 40-60 % $(NH_4)_2SO_4$

Sintesis Biodiesel

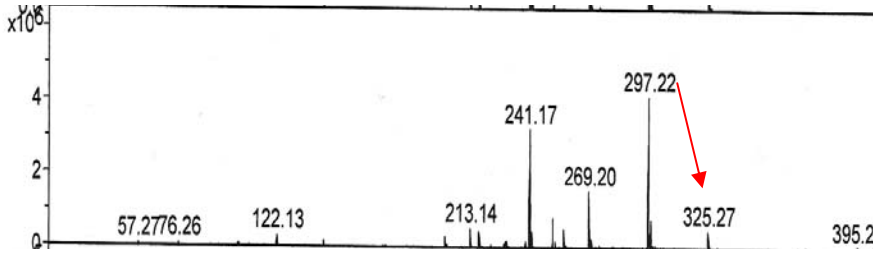
Biodiesel dapat disintesis melalui reaksi kimia yang disebut transesterifikasi dimana reaksi antara senyawa trigliserida (komponen utama minyak nabati) dengan senyawa alkohol (biasanya etanol). Pada penelitian ini biodiesel disintesis melalui reaksi transesterifikasi antara minyak kelapa dengan etanol dengan bantuan enzim lipase Hasil sintesis biodiesel dapat dilihat dari hasil spektrometri massa.

Reaksi Transesterifikasi dengan Etanol

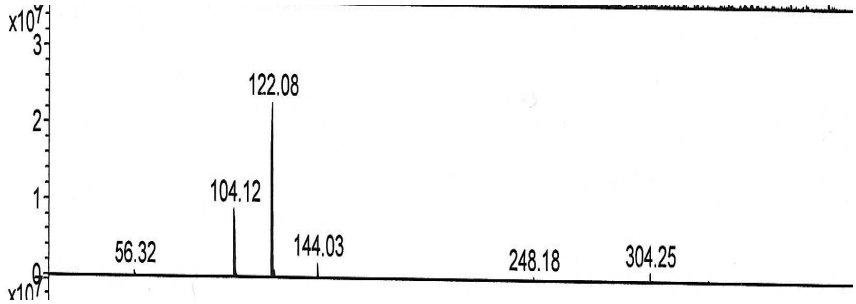
Reaksi transesterfikasi minyak kelapa dengan etanol dikatalisis oleh enzim lipase termostabil dari KHA-P12 dan sebagai kontrol dilakukan reaksi transesterfikasi dikatalisis oleh enzim lipase tersebut yang telah dinonaktifkan terlebih dahulu. Hasil reaksi transesterifikasi dianalisis dengan menggunakan spektrometri massa dan acetonitril sebagai pelarutnya. Spektrogram massa dari pelarut dapat dilihat pada gambar 5. Data ini penting sebagai panduan untuk mengetahui produk yang mungkin dihasilkan dari reaksi transestrifikasi.



Gambar. 5 Spektogram massa pelarut 0,01%
asam format dalam asetonitril:air (1:1)



a



b

Gambar 6 Spektrogram massa
a. hasil reaksi transesterikasi dengan etanol dikatalisis enzim lipase
b. kontrol

Gambar 6 memperlihatkan pada reaksi transesterikasi yang dikatalisis oleh enzim lipase terdapat puncak 325,27 yang berarti menunjukkan ada senyawa yang dihasilkan dengan berat molekul sebesar 324 yang tidak terdapat pada kontrol dan pelarut. Ini menunjukkan reaksi transesterfikasi minyak kelapa dan etanol dengan dikatalisis oleh enzim lipase dapat berlangsung dan menghasilkan etil 2-nonadesenoat yang merupakan produk biodiesel. Tidak munculnya puncak yang menggambarkan produk pada kontrol dikarenakan tidak adanya aktivitas katalisis oleh enzim yang telah dinonaktifkan terlebih dahulu.

Hasil yang diperoleh dari reaksi transesterifikasi antara minyak kelapa dengan etanol adalah etil 2-nonadesenoat. Asam 2-nonadesenoat tidak pernah ditemukan pada minyak kelapa. Asam ini merupakan salah satu komponen penyusun membran telur (Hasiak dkk., 1970b*)* dan belum ada penelitian yang melaporkan kandungan asam tersebut didalam minyak kelapa. Karenanya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut reaksi transesterifikasi dengan menggunakan etanol.

KESIMPULAN

Enzim lipase dari bakteri isolat lokal KHA-P12 (EU784082) dapat mengkatalisis reaksi transesterifikasi guna mensintesis biodiesel.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu selama penelitian ini orang tua, suami tercinta dan keluarga, rekan dosen dan pimpinan yang telah banyak membantu.

DAFTAR PUSTAKA

Fukuda, H., Kondo, A., dan Noda, H. (2001) : Biodiesel Fuel Production by Transesterification Oil, *Journal Bioscience and Bioengineering*, **92**, 405-416.

Hankin, L., dan Anagnostakis, S. L. (1975) : The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi, *Mycologia*, **67**, 597-607.

Hasan, F., Shah, A. A., dan Hameed, A. (2006) : Industrial Aplication of Microbial Lipases, *Microbial research Lab., Department of Biological, Quid-i-Azam University, Islamabad Pakistan*

Hasiak, R. J., Vadehra, D. V., dan Baker, R. C. (1970) : Fatty acid composition of the egg exterior structures of *Gallus gallus*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **35**, 751-755.

Supadi dan Nurmanaf, A. R. (2006) : Pemberdayaan Petani Kelapa Dalam Upaya Peningkatan Pendapatan Petani, *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian*, **25(1)**, 31-36.

Widhiastuty, M. P., Febriani, Yohandini, H., Moeis, M. R., Madayanti, F., dan Akhmaloka. (2009) : Characterization and Identification of Thermostable Alkaline Lipase Producing Bacteria from Hot Spring around West Java, *Journal of Pure and Applied Microbiology*, **3**, 27-40.