

Karakterisasi, Pengaruh Sumber Nitrogen dan Karbon terhadap Produktivitas Enzim Lipase *Rhizopus microsporus* var *oligosporus* UICC 550

Partial Characterization, Effect of Nitrogen and Carbon Sources on Production of Lipase of *Rhizopus microsporus* var *oligosporus* UICC 550

Wibowo Mangunwardoyo*, Yuyun Lusini, Indrawati Gandjar

Departemen Biologi, Fakultas Matematik dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok, 16424
E-mail: w_mangunwardoyo@hotmail.com *Penulis untuk korespondensi

Abstract

Effect of nitrogen and carbon source on the production of extracellular lipase by *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 was studied. The enzyme activity was also characterized in terms of temperature, pH, stability at room temperature, and effect of divalent ion. The amount of 2.5% (w/v) of olive oil as carbon sources and 5% (w/v) peptone as nitrogen sources were the optimum for production of lipase enzyme. Partial purifications using ammonium sulfate followed by dialysis showed that at pH 6.5 and temperature 35°C was the optimum condition, respectively. The stability (remaining up to 80% of the optimum enzyme) was recorded at pH 6.5 after 24 hours incubation at room temperature. The optimum activity remained 40% of the after one hour incubation at 35°C. Divalent ions concentration at 1 mM, Zn²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺ and Fe²⁺ inhibited the lipolytic activity.

Key words: amonium sulphate, olive oil, peptone, *Rhizopus microsporus* var *oligosporus* UICC 550, pH and temperature optimum

Diterima: 23 Juni 2008, disetujui: 30 April 2009

Pendahuluan

Lipase mikroba merupakan lipase ekstraselular yang diekskresikan melalui membran sel ke dalam medium. Optimasi kondisi fermentasi mikroba penghasil lipase sangat penting karena dapat mempengaruhi produksi enzim (Taipa *et al.*, 1992). Produksi lipase tergantung pada beberapa faktor lingkungan seperti suhu, waktu inkubasi, umur dan jumlah inokulum, pH medium, sumber karbon, nitrogen, dan lipid, konsentrasi garam-garam anorganik, dan ketersediaan oksigen (Yoshida *et al.*, 1968; Davranov dan Khalameizer, 1997; Sarkar *et al.*, 1998).

Pokorny *et al.*, (1994), menyatakan bahwa biosintesis lipase dapat berlangsung tanpa substrat lipid dan dapat ditingkatkan dengan penambahan *inducer* dalam medium. *Aspergillus niger* mengalami peningkatan

produksi lipase apabila dalam medium kultur ditambahkan substrat lipid (Macris *et al.*, 1996). Penambahan minyak zaitun sebagai substrat lipid pada medium kultur *Candida rugosa* juga meningkatkan produksi lipase. Peranan faktor-faktor lain seperti sumber karbon, nitrogen dan mineral tidak dapat diabaikan (Benjamin dan Pandey, 1996). Oleh karena itu, optimasi medium mikroba merupakan tahapan penting untuk mendapatkan produksi enzim maksimal (Sharma *et al.*, 2001).

Aplikasi lipase dalam bidang biomedik dan industri farmasi memerlukan lipase dengan tingkat kemurnian tinggi dan harus dikenal sifat-sifat spesifiknya seperti, kekhususan substrat, pH dan suhu optimum, pengaruh penambahan ion-ion logam dan lain-lain. Ion-ion logam umumnya dapat membantu kerja enzim. Ion-ion logam alkali (Na⁺, K⁺) dan

logam-logam transisi (Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} dan lain-lain) dapat membantu kerja enzim di antaranya dengan membentuk ikatan kovalen dengan substrat, sehingga substrat semakin mudah terikat pada sisi aktif enzim (Boyer, 2002). Karakterisasi biokimiawi lipase adalah sangat penting untuk menentukan potensi aplikasinya (Benjamin dan Pandey, 2001).

Dari penelitian ini dapat diketahui (1) kondisi fermentasi terbaik *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 untuk memproduksi enzim lipolitik; (2) karakter enzim yang telah dipurifikasi sebagian pada suhu dan pH optimum, serta kestabilan enzim pada suhu, pH, dan penambahan ion divalen.

Metode Penelitian

Mikroba

Rhizopus microsporus var. *oligosporus* UICC 550 koleksi *University of Indonesia Collection Culture* (UICC).

Medium

Medium pemeliharaan *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 pada Potato Dextro Agar (PDA). Medium basal dan fermentasi menurut (Samad *et al.*, 1990) dimodifikasi oleh (Ellibol dan Ozer, 2002). Minyak zaitun (Bertoli) diemulsifikasikan berdasarkan metode Kulkarni (2002).

Penentuan aktivitas lipolitik

Aktivitas lipolitik ditentukan dengan cara titrasi menurut (Samad *et al.*, 1990). Substrat minyak zaitun diemulsikan, dengan menambahkan 1% (g/v) PVA ke dalam minyak zaitun (50% v/v) kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit bufer fosfat pH 7,5 (50% v/v) sambil terus dikocok. Emulsi dihomogenkan dengan *shaker* 150 rpm, selama minimal satu jam. Substrat 2,5 ml yang telah diemulsikan ditambahkan 1 ml filtrat enzim dan 20 μ l $CaCl_2$ 0,02 M. Campuran tersebut diinkubasikan dalam *waterbath-shaker*, pada suhu 35°C selama 30 menit, dengan kecepatan pengocokan 120 rpm. Sebanyak 3,5 ml campuran etanol dan aseton p.a (1:1) ditambahkan pada substrat untuk menghentikan

kerja enzim. Selanjutnya ditambahkan dua tetes larutan fenoltalein 1% dan dititrasi dengan larutan NaOH 0,05 M yang telah distandarisasi. Aktivitas lipolitik dinyatakan dengan banyaknya NaOH 0,05 M yang diperlukan untuk menetralkan asam lemak yang dibebaskan (Samad *et al.*, 1990). Satu unit aktivitas lipase didefinisikan sebagai μ mol asam lemak yang dibebaskan per menit pada suhu 35°C.

Optimasi Produk Enzim Lipolitik

Pengaruh konsentrasi substrat minyak zaitun

Sebanyak 0,2 ml suspensi spora ($1,4-2,88 \times 10^6$ spora/ml) ditambahkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml, berisi 20 ml medium basal. Emulsi minyak zaitun 20% ditambahkan dalam medium basal sebagai substrat lipid sehingga konsentrasi akhir adalah 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 dan 3% (v/v). Medium diinkubasikan dalam *shaker incubator*, pada suhu ruang (27-30°C), kecepatan agitasi 110 rpm dan diinkubasikan selama 48 jam. Hasil fermentasi disaring dengan kertas Whatman nomor 1. Aktivitas lipolitik ditentukan berdasarkan metode titrasi (Samad *et al.*, 1990) dan biomassa dikeringkan dalam oven 80°C hingga konstan. Perhitungan berat kering biomassa ditentukan menurut (Nahas, 1988).

Pengaruh konsentrasi pepton

Medium basal dengan konsentrasi pepton 2, 3, 4, 5, 6, dan 7% (b/v). Sebanyak 0,2 ml suspensi spora ($1,4-2,88 \times 10^6$ spora/ml) dari inokulum umur lima hari, ditambahkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml yang berisi 20 ml medium basal dengan konsentrasi pepton yang berbeda. Substrat lipid, berupa minyak zaitun yang telah diemulsikan ditambahkan dalam medium hingga konsentrasi akhir substrat lipid dalam medium 2,5% (v/v). Selanjutnya diinkubasikan dalam *shaker incubator*, pada suhu ruang (27-30°C), kecepatan agitasi 110 rpm selama 48 jam. Setiap perlakuan dilakukan tiga ulangan. Hasil fermentasi disaring dengan kertas Whatman nomor 1. Aktivitas lipolitik ditentukan berdasarkan metode titrasi (Samad *et al.*, 1990) dan biomassa dikeringkan dalam oven 80°C hingga konstan. Perhitungan berat kering biomassa ditentukan menurut (Nahas, 1988).

Pembuatan kurva produksi enzim lipolitik dan berat biomassa

Sebanyak 0,2 ml suspensi spora ($1,4-2,88 \times 10^6$ spora/ml) diinokulasikan ke dalam Erlenmeyer 100 ml, yang berisi 20 ml medium basal. Konsentrasi pepton 5% dan konsentrasi minyak zaitun 2,5% (v/v). Erlenmeyer yang berisi biakan diinkubasikan di dalam *shaker incubator*, pada suhu ruang ($27-30^\circ\text{C}$), kecepatan agitasi 110 rpm.

Sampel diukur aktivitas lipolitiknya dan berat kering biomasanya pada jam ke: 0, 4, 8, 12, 16, 20, 40, 46, 50, 56, 62, dan 72.

Purifikasi Parsial Enzim

Presipitasi ammonium sulfat

Medium fermentasi setelah jam ke 56 inkubasi disaring dengan kertas Whatman No. 1. Selanjutnya filtrat (300 ml) diendapkan dengan menambahkan 141,6 g ammonium sulfat (70%), berdasarkan metode Scopes (1988).

Dialisis

Filtrat yang telah diendapkan selama 24 jam, disentrifugasi (4°C) dengan kecepatan 20.000 rpm selama 10 menit. Endapan hasil sentrifugasi diresuspensi dengan sesedikit mungkin bufer fosfat pH 7,5. Semua hasil resuspensi dimasukkan ke dalam kantung dialisis kemudian direndam dalam bufer fosfat pH 7,5 selama 24 jam dengan dua kali penggantian larutan bufer. Dialisis dilakukan dalam ruangan bersuhu 4°C atau dalam lemari es selama 48 jam.

Karakterisasi enzim

Penentuan karakterisasi enzim dilakukan berdasarkan cara yang dilakukan oleh Koblitz dan Pastore (2006).

Pengaruh pH dan suhu pada aktivitas dan kestabilan enzim

Pengukuran pH optimum aktivitas lipolitik menggunakan beberapa variasi pH yaitu 4,0; 4,6; 5,4; 6,5; 7,5; 8,0; 8,4 dan 9,5. pada suhu 35°C . Kestabilan enzim pada beberapa pH diuji dengan penentuan aktivitas lipolitik sisa pada pH optimum setelah larutan enzim diinkubasikan selama 24 jam pada suhu

ruang ($27-30^\circ\text{C}$) dengan variasi pH 4,6; 5,4; 6,5; 7,5; 8,4 dan 9,5. Untuk mencapai pH yang diinginkan, larutan enzim di tambahkan larutan bufer yang sesuai. Bufer yang digunakan untuk variasi pH larutan enzim, dibuat berdasarkan metode Colowick dan Kaplan (1955).

Pengukuran suhu optimum ditentukan dengan mengukur aktivitas lipolitik pada beberapa variasi suhu 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60°C , pada pH optimum (pH 6,5). Kestabilan enzim pada berbagai suhu diuji dengan menentukan sisa aktivitas lipolitik setelah larutan enzim diinkubasikan dalam tiga suhu 30, 35, dan 40°C selama 1 jam.

Pengaruh ion-ion divalen

Sebanyak 1 ml enzim ditambahkan 50 μl larutan ion-ion logam divalen Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} dan Fe^{2+} 0.02 M, sehingga konsentrasi akhir ion-ion logam dalam larutan enzim adalah 1 mmol/L, enzim diinkubasikan pada suhu ruang ($27-30^\circ\text{C}$) selama satu jam, kemudian ditentukan aktivitas lipolitik.

Hasil dan Pembahasan

Optimasi Produksi Enzim

Pengaruh konsentrasi minyak zaitun

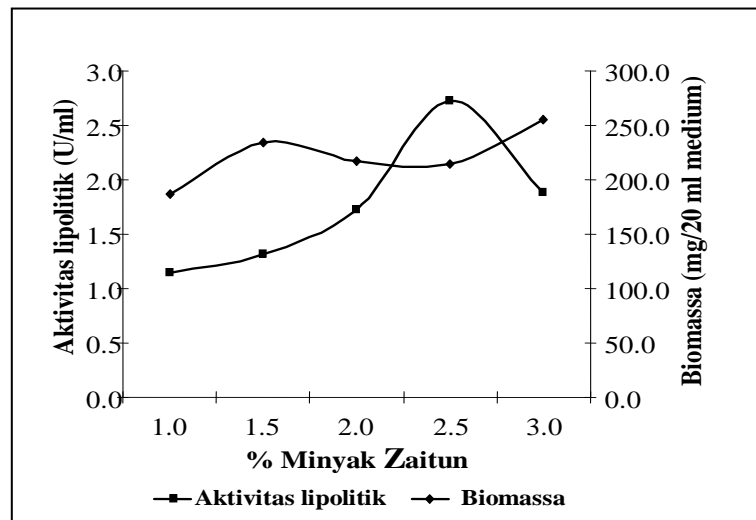
Aktivitas lipolitik *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 semakin meningkat dengan bertambahnya konsentrasi minyak zaitun hingga konsentrasi substrat lipid mencapai 2,5% v/v (2,72 U/ml). Aktivitas lipolitik kemudian menurun (1,88 U/ml) pada konsentrasi minyak zaitun yang lebih besar (3%) (Gambar 1). Pengaruh penambahan minyak zaitun terhadap penambahan biomassa berjalan seiring, dalam setiap penambahan konsentrasi minyak zaitun berat biomassa juga cenderung bertambah. Substrat lipid pada awalnya menginduksi peningkatan aktivitas lipolitik *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550, tetapi efek induksinya terbatas pada konsentrasi tertentu yaitu 2,5%. Adanya induksi ini juga dilaporkan pada aktivitas lipolitik *Candida rugosa* (Laksmi et al., 1999) meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi minyak kelapa hingga mencapai konsentrasi 10% (v/v) dan aktivitas lipolitiknya mengalami penurunan pada konsentrasi minyak

lebih tinggi. Demikian juga dengan aktivitas lipolitik pada *Mucor hiemalis* (Akhtar, 1980).

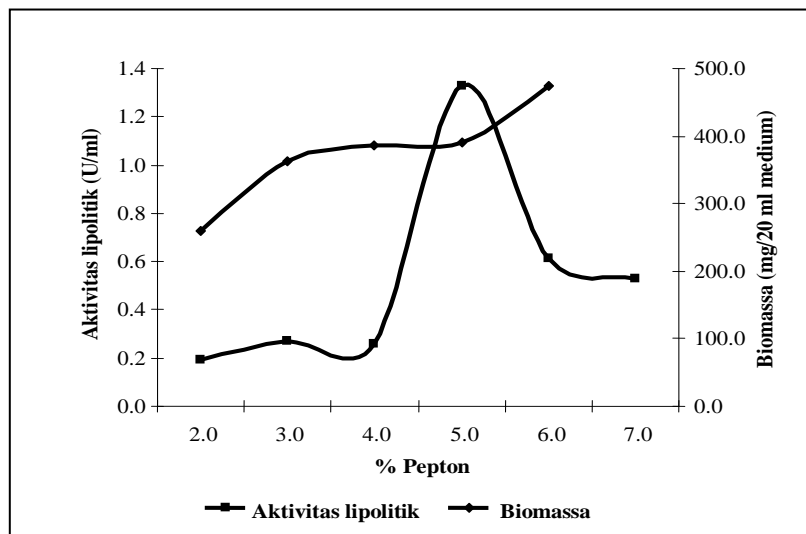
Pengaruh konsentrasi pepton

Konsentrasi pepton berpengaruh pada produksi lipase. Produksi lipase terbaik diperoleh pada konsentrasi pepton 5% (g/v) (Gambar 2). Pepton merupakan sumber nitrogen organik yang dapat langsung digunakan oleh mikroba. Pepton (5% g/v) memberikan pengaruh yang baik terhadap produksi lipase *Aspergillus niger* dibandingkan ammoniumnitrat (0,1% g/v) jika tidak ada

penambahan kalium fosfat (0,1% g/v). Akan tetapi penambahan ammonium nitrat bersama kalium fosfat berpengaruh lebih baik daripada pepton terhadap produksi lipase *A. niger* (Pokorny *et al.*, 1994). Samad *et al.*, (1990) menguji beberapa sumber nitrogen pada *R. chinensis* dan pepton 5% merupakan sumber nitrogen yang terbaik. *Aspergillus* sp. menunjukkan tingkat aktivitas lipolitik yang juga baik dalam medium pepton 1% dengan penambahan minyak zaitun 1% (Cihangir dan Sarikaya, 2004).



Gambar 1. Aktivitas lipolitik dan biomassa *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 dengan variasi konsentrasi minyak zaitun (%), pada waktu inkubasi 48 jam.



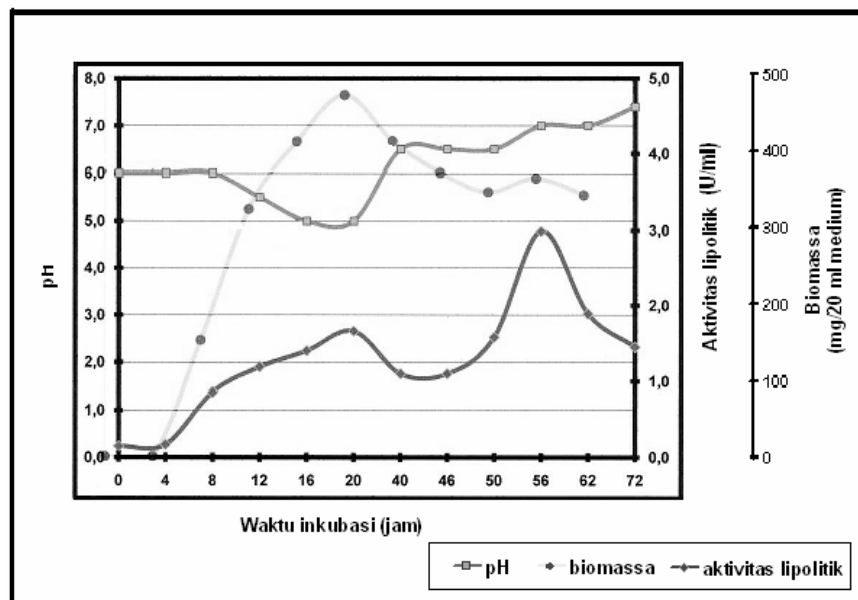
Gambar 2. Produksi lipase dan biomassa *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 dengan variasi konsentrasi pepton (%) pada waktu inkubasi 48 jam.

Kurva produksi enzim lipolitik dan biomassa

Gambar 3 menunjukkan produksi enzim lipase (biomassa dan perubahan pH). Kurva produksi lipase memiliki dua puncak, yaitu pada jam ke 20 (1.66 U/ml) dan jam ke 56 (2,99 U/ml). Terbentuknya dua puncak produksi lipase tersebut, kemungkinan disebabkan oleh dua hal. Kemungkinan pertama adalah, aktivitas lipolitik pada jam ke 20 (fase akhir eksponensial), merupakan enzim ekstraselular. Diperkirakan pada saat itu sumber C yang berasal dari glukosa sudah habis dan sel-sel mulai mensekresikan enzim lipolitik untuk memecah substrat lipid untuk sumber C lainnya. Produksi lipase pada puncak kedua, yaitu pada jam ke 56 diperkirakan merupakan gabungan enzim lipase intraselular dan ekstraselular. Lipase intraselular diduga bergabung dengan lipase ekstraselular yang dibebaskan dalam medium pada akhir fase pertumbuhan (Druet *et al.*, 1992). Hal tersebut didukung oleh pertumbuhan biomassa yang cenderung konstan. Kemungkinan kedua adalah tertundanya penggunaan asam oleat (dari minyak zaitun) karena penggunaan gliserol yang dilakukan terlebih dahulu. Gliserol yang dihasilkan dari hasil hidrolisis minyak zaitun (trigliserida) oleh lipase

konstitutif menjadi represor penggunaan asam lemak oleh mikroba. Kemungkinan tersebut berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Del Rio *et al.*, (1990) terhadap *Candida rugosa*, yang menjelaskan bahwa penggunaan minyak zaitun terjadi dalam dua tahap yaitu penggunaan gliserol tanpa memproduksi lipase (hanya lipase konstitusi). Setelah gliserol habis dikonsumsi oleh sel-sel, maka aktivitas lipase akan meningkat untuk menghidrolisis asam lemak oleat. Selama gliserol masih ada dalam medium asam-asam lemak tidak akan dikonsumsi oleh *Candida rugosa*, adanya gliserol dapat menekan (*repression*) penggunaan asam lemak.

Kemungkinan penyebab peningkatan aktivitas lipase pada fase stasioner juga dijelaskan oleh Pereira-Meirelles *et al.*, (2000) yang melaporkan bahwa produksi lipase diawal pertumbuhan adalah lipase *cell-bound*, sehingga hanya lipase dalam tingkat basal yang akan terdeteksi dalam medium. Lipase ekstraselular mulai disekresikan ke dalam medium ketika sekitar 50% dari sumber karbon (minyak zaitun atau glukosa) telah dikonsumsi dan lipase akan mencapai konsentrasi maksimum pada akhir fase stasioner.



Gambar 3. Kurva produksi enzim lipase, biomassa, dan perubahan pH *R. microsporus var. oligosporus* UICC 550 inkubasi selama 72 jam.

Purifikasi parsial enzim lipolitik

Fraksi pertama hasil fermentasi aktivitasnya 0,46 U/ml. Setelah pengendapan ammonium sulfat 0-70% yaitu fraksi kedua, aktivitas enzim lipolitik meningkat 17 kali, menjadi 6,24 U/ml. Fraksi ke tiga menunjukkan sedikit kenaikan yaitu menjadi 7,05 U/ml atau sekitar 28 kali dari aktivitas *crude enzyme*. Koblitz dan Pastore (2006) menggunakan ammonium sulfat 70% pada pemurnian enzim lipolitik *R. microsporus*. *Rhizopus niveus* memiliki aktivitas lipolitik yang tinggi ketika *crude enzyme*-nya dipresipitasi dengan ammonium sulfat 40-60% (Kemarsha *et al.*, 1998), sedangkan *crude enzyme* produksi *R. oryzae* dipresipitasi dengan penambahan ammonium sulfat 35-70% (Hiol *et al.*, 2000). Iwai dan Tsujisaka (1974) menggunakan penambahan ammonium sulfat 70% pada *crude enzyme R. delemar* sebagai tahapan awal purifikasi.

Karakterisasi Enzim

Pengaruh pH terhadap aktivitas dan stabilitas enzim

Aktivitas lipolitik maksimum dicapai pada pH 6,5 dalam bufer fosfat dan suhu 35°C. Aktivitas enzim menurun pada pH asam atau basa (Gambar 4). Lipase yang diisolasi dari *R. chinesis*, memiliki pH optimum 5,5 (Yasuda *et al.*, 1999). *Rhizopus sp.* memproduksi lipase

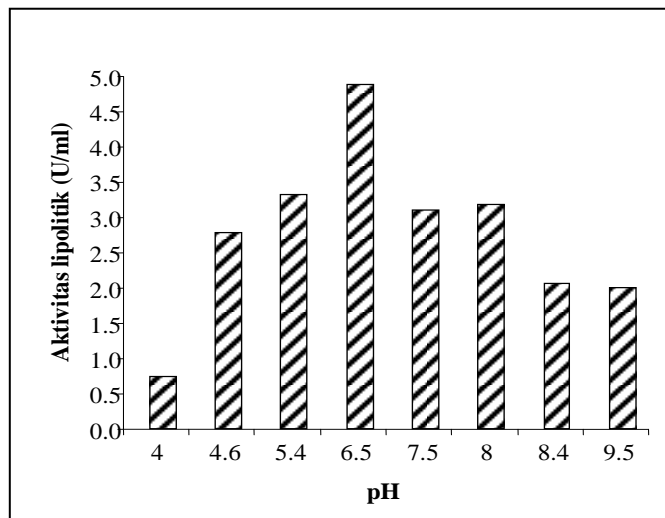
dengan dua pH optimum yaitu 5,5 dan 7,5 (Koblitz dan Pastore, 2006).

Enzim yang diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam pada pH 6,5, menunjukkan penurunan aktivitas lipolitik sekitar 20% dari aktivitas maksimum (Gambar 5), sedangkan pada pH lain penurunan aktivitas lipolitik sekitar 60%. Penurunan aktivitas enzim lipolitik dapat disebabkan oleh efek denaturasi atau dapat juga disebabkan oleh kerja enzim protease (Maia *et al.*, 1999).

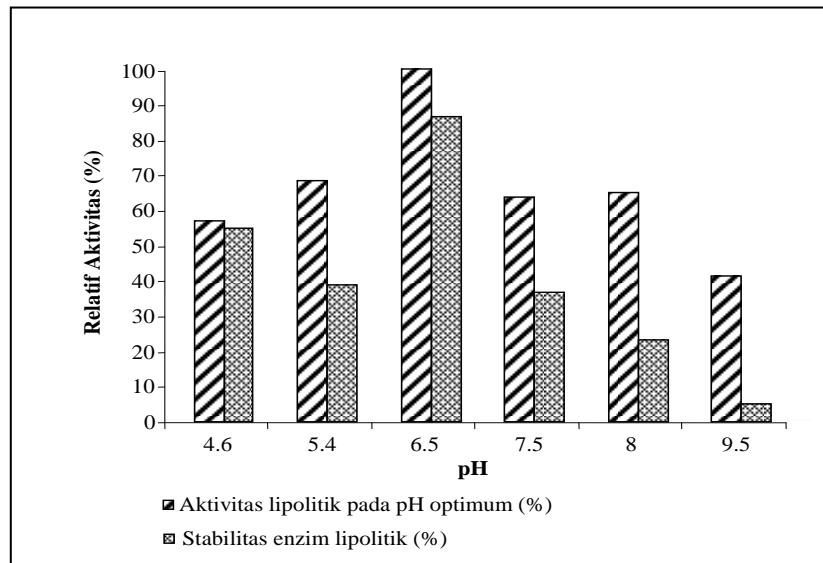
Pengaruh suhu terhadap aktivitas dan stabilitas

Kapang *R. microsporus var. oligosporus* UICC 550 memiliki suhu optimum sebesar 35°C (Gambar 6). Pengukuran aktivitas lipolitik dilakukan pada pH optimum, yaitu 6,5. Suhu optimum diperoleh pada saat enzim menunjukkan aktivitas lipolitik maksimal. Pada suhu di atas suhu optimum aktivitas enzim mengalami penurunan.

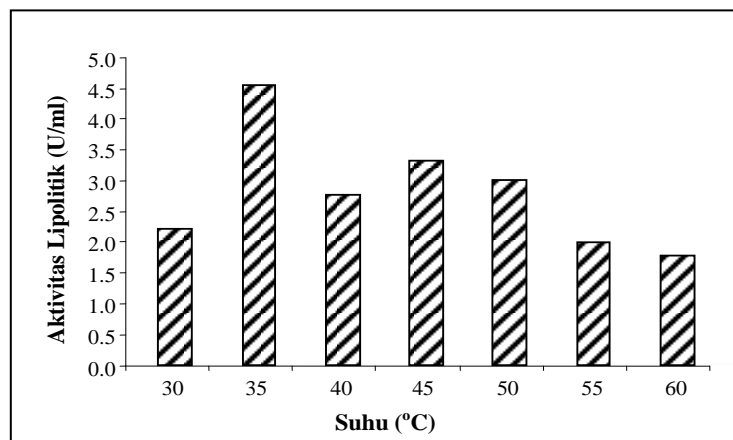
Uji kestabilan enzim pada berbagai suhu (Gambar 7). Aktivitas lipolitik menurun sekitar 60% dari aktivitas maksimum pada suhu optimum (35°C), sedangkan pada suhu di bawah suhu optimum (30°C) aktivitas lipolitik menurun sampai 90% dan pada suhu di atas suhu optimum (40°C) aktivitas lipolitik menurun hingga 70%.



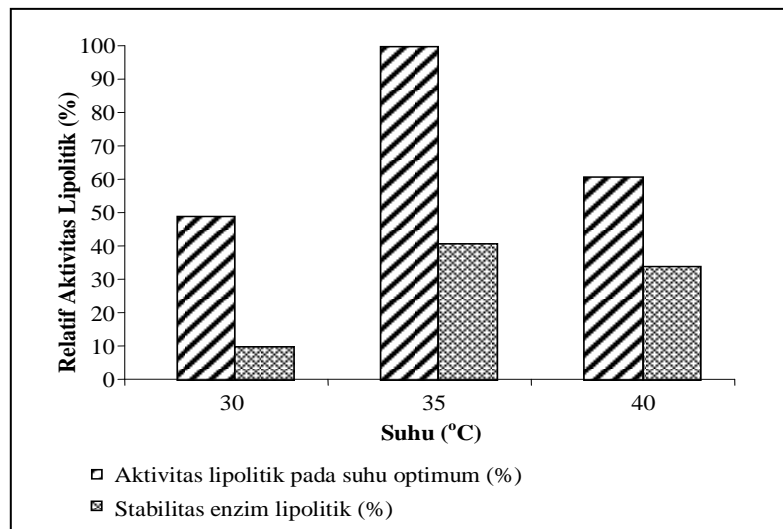
Gambar 4. Aktivitas lipolitik *R. microsporus var. oligosporus* UICC 550 dengan variasi pH.



Gambar 5. Pengaruh pH terhadap prosentase stabilitas enzim lipolitik *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550.



Gambar 6. Aktivitas lipolitik *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 dengan variasi suhu.



Gambar 7. Pengaruh suhu terhadap prosentase stabilitas enzim lipolitik dari *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550.

Mucor hiemalis f. hiemalis yang diisolasi dari minyak sawit, memproduksi lipase dengan suhu optimum 40°C dan pH optimum 7,0. Lipase *M. hiemalis* stabil ketika diinkubasikan pada skala pH 4,0-9,0 dan suhu 45°C, selama 15 menit (Hiol *et al.*, 1999), sedangkan lipase yang diproduksi oleh *R. chinensis* memiliki suhu optimum pada 37°C. Penelitian yang dilakukan oleh Samad *et al.*, (1990) menunjukkan lipase yang bersifat termofilik dari *R. rhizopodiformis*, stabil pada suhu 50°C (inkubasi 30 menit) dan 45°C (inkubasi 24 jam).

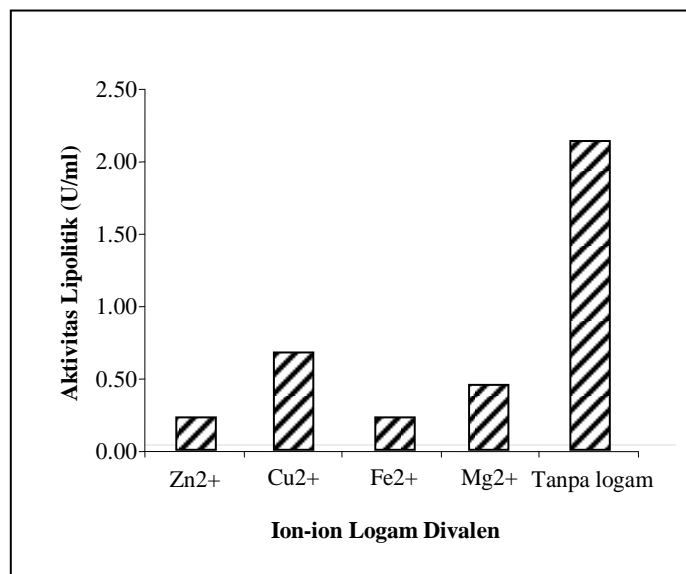
Pengaruh ion-ion divalen terhadap aktivitas enzim

Gambar 8 menunjukkan penurunan aktivitas lipolitik pada saat enzim diinkubasikan dalam 1mM/L ion-ion divalen Zn²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺ dan Fe²⁺ selama satu jam. Hal ini menunjukkan bahwa enzim lipase yang dihasilkan oleh *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 tidak memerlukan ion logam yang diuji untuk kofaktor dalam reaksi enzimatisnya.

Aktivitas lipolitik juga dihambat oleh ion Cu²⁺ dan Fe²⁺ pada konsentrasi 1 mM pada *M.*

hiemalis f. hiemalis dan 5 mM untuk *R. oryzae*. Sedangkan Mn²⁺, justru meningkatkan aktivitas lipase dari *M. hiemalis* (Sharma *et al.*, 2001). Lipase ekstraselular dari *Pseudomonas aeruginosa* sangat dihambat oleh ZnSO₄ 1 mM (94% hambatan). *P. pseudoalcaligenes* dihambat oleh Fe³⁺, tapi tidak dihambat oleh ion-ion Zn²⁺, Cu²⁺ dan Mn²⁺. Sharma *et al.*, (2001) berpendapat bahwa garam-garam logam berat (Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ dan Hg²⁺) sangat menghambat lipase karena ion-ion logam tersebut dapat mengubah konformasi enzim.

Pengaruh kekuatan ion dan konstanta dielektrik terhadap kecepatan reaksi enzim kadang-kadang sulit diramalkan, karena sifat-sifatnya yang kompleks. Penambahan berbagai jenis garam dapat merubah kekuatan ionik dan konstanta dielektrik larutan tempat enzim bekerja. Perubahan pada kekuatan ion dan konstanta dielektrik larutan enzim, akan mempengaruhi susunan keseluruhan molekul protein atau mengubah derajat ionisasi dan keaktifan substrat, selain itu juga dapat mengubah pH asam amino yang terlibat pada sisi aktif enzim (Suhartono, 1989).



Gambar 8. Pengaruh penambahan ion divalen terhadap aktivitas lipolitik *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550.

Kesimpulan

Produktivitas lipase tertinggi pada konsentrasi pepton 5% (b/v) yaitu sebesar 1,33 U/ml sebagai sumber nitrogen dan substrat lipid emulsi minyak zaitun 2,5% (v/v) sebesar 2,72 U/ml sebagai sumber karbon. Produksi enzim lipolitik maksimum pada waktu inkubasi 20 jam (1,66 U/ml) pada fase eksponensial dan 56 jam (2,99 U/ml) pada fase stasioner. Aktivitas lipolitik paling tinggi dicapai pada jam ke 56.

pH dan suhu optimum enzim lipase pada pH 6,5 dan suhu 35°C. Enzim stabil pada pH 6,5 selama 24 jam dan suhu 35°C selama satu jam. Aktivitas lipolitik dihambat oleh penambahan 1mM ion-ion logam divalen Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , dan Fe^{2+} .

Daftar Pustaka

- Akhtar, M.W., Mirza, A.Q. and Chughtai, M.I.D. 1980. Lipase induction in *Mucor hiemalis*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 40: 257-263.
- Benjamin, S. and Pandey, A. 1996. Optimization of liquid media for lipase production by *Candida rugosa*. *Bioresource Technology* 55: 167-170.
- Bilgrami, K.S. and Verma, R.N. 1981. Physiology of fungi. Vikas Publishing House, Sahibabat.
- Boyer, R. 2002. Concepts in biochemistry. Brooks/Cole. Canada.
- Cihangir, N. and Sarikaya, E. 2004. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. *World J. of Microbiology Biotechnology* 20: 193-197.
- Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. 1955. *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc., Publishers New York.
- Davranov, K. and Khalameizer, V.B. 1997. Current state of the study of microbial lipases. *Chemistry of Natural Compound* 33: 113-126.
- Del Rio, J.L., Serra, P., Valero, F. and Sola, C. 1990. Reaction scheme of lipase production by *Candida rugosa* growing on olive oil. *Biotechnolgn Letters*. 12 (11): 825-838.
- Druet, Daniele, El., abbadi, N. and Louis, C.C. 1992. Purification and characterization of the extracellular and cell-bound lipases from a *Penicillium cyclopium* variety. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 745-749.
- Ellibol, M. and Ozer, D. 2002. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochem.* 38: 367-372.
- Hiol, A.M.D., Jonzo, D. and Comeau, L. 1999. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *hiemalis*. *Enzyme and Microbial Technology* 25: 80-87.
- Iwai, M. and Tsujisaka, Y. 1974. The purification and properties of three kind of lipases from *Rhizopus delemar*. *Agr. Biol. Chem.* 38 (6): 1241-1247.
- Kemarsha, S., Safari, M. and Bisakowski, B. 1998. Characterization of purified lipase fractions from *Rhizopus niveus*. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4451-4456.
- Koblitz, M. and Pastore, M. 2006. Purification and biochemical characterization of an extracellular lipase produced by a new strain of *Rhizopus* sp. *Ciênc. agrotec., Lavras*, 30 (3): 494-502.
- Kulkarni, N. 2002. Studies on lipase enzyme from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. Thesis. University of Pune, India.
- Lakshmi, B.S., Kanguane, P., Abraham, B. and Pennathur, G. 1999. Effect of vegetable oils in the secretion of lipase from *Candida rugosa* (DSM 2013). *Lipids* 37 (7): 653-662.
- Macris, J.B., Kourentzi, E. and Hatzinikolaou, D.G. 1996. Studies on localization and regulation of lipase production by *Aspergillus niger*. *Procces Biochemistry* 31 (8): 807-812.
- Maia, M.D.M., Camargo, M.M., Antonio, M., Melo, E.H.M. and Filho, J.L.L. 1999. Production of extracelullar lipase by the phytopathogenic fungus *fusarium solani* FS1. *Revista de Microbiologia*. 30: 304-309.
- Nahas, E. 1988. Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under variuos growth conditions. *J. of General Microbiology* 134: 227-233.
- Pereira-Meirelles, F.V., Rocha-Leilo, M.H.M. and Sant-Anna Jr, G.L. 2000. Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. *Biotechnology Letters* 22: 71-75.
- Pokorny, D., Friedrich, J. and Cimerman, A. 1994. Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters* 16 (4): 363-366.
- Samad, M., Samad, Y.A., Salleh, A.B., Razak, C.N.A., Ampon, K., Yunus, W.M.Z.W. and Basri, M. 1990. Lipase from a newly isolated thermophilic *Rhizopus rhizopodiformis*. *World J. of Microbio and Biotechno* 6: 390-394.

- Sarkar, S., Sreekanth, B., Kant, S., Benerjee, R. and Bhattacharyya, B.C. 1998. Production and optimization of microbial lipase. *Bioprocess Engineering* 19: 29-32.
- Scopes, K.R. 1988. *Protein purification principles and practice*. Springer-Verlag. New York Inc.
- Sharma, R., Chisti, Y. and Banerje, U.C. 2001. Review: Production, purification, characterization and application of lipases. *Biotechnology Advances* 19: 627-662.
- Suhartono, M. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor.
- Taipa, M., Aires-Barros, A. and Cabral, J.M.S. 1992. Purification of lipases. *J. of Biotechnology* 26: 111-142.
- Yasuda, M., Ogino, H., Kiguchi, T., Kotani, T., Takakura, S., Ishibashi, T., Nakashima, T., Fukuda, H. and Ishikawa, H. 1999. Purification and characterization of lipase from *Rhizopus chinensis* Cells. *J. of Bioscience and Bioengineering* 88 (5): 571-573.
- Yoshida, F., Motai, H. and Eichishima, E. 1968. Effect of lipid materials on the production of lipase by *Torulopsis ernobii*. *Appl. Microbiology* 16 (6): 845-847.