

Studi Produksi Enzim Lipase Toleran Kadar Garam *Staphylococcus* sp. TL9

Yohanis Irenius Mandik*

Program Studi Kimia, Fakultas MIPA Universitas Cenderawasih, Jalan Kamp Wolker, Jayapura 99358

*Corresponding author: yimandik@gmail.com

Abstrak

Telah dilakukan penelitian optimasi untuk menentukan beberapa parameter optimum yang berperan dalam produksi lipase oleh *Staphylococcus* sp. TL9, strain yang diisolasi dari terasi udang fermentasi terasi. Strain ini dipilih karena memiliki aktivitas lipase yang tinggi serta sifat-sifat teknologi yang lebih baik dibandingkan dengan empat bakteri penghasil lipase lain yang telah diisolasi sebelumnya. Metode one-factor-at-time (OFAT) telah dilakukan untuk memilih parameter yang tepat yang memengaruhi produksi lipasennya. Suhu dan pH awal optimum untuk produksi lipase adalah 37 oC dan 7,0. Selain itu, konsentrasi inokulum 2,0% (b/v) minyak zaitun, 10% (b/v) NaCl, dan 1,5% (v/v) semuanya memberikan produksi lipase tertinggi serta kecepatan agitasi pada 150 rpm. Sementara itu, percobaan time course menggunakan kondisi optimum terpilih menunjukkan bahwa pada waktu inkubasi 48 jam produksi lipase paling tinggi (2,27 U/mL) yang mengindikasikan 3,34 kali lipat dari produksi awal (0,67 U/mL). Lebih jauh, lipase ini juga menunjukkan halotoleran karena aktivitas lipase stabil pada rentang konsentrasi NaCl yang lebih luas (0–20%, b/v).

Kata kunci: Kapi, lipase, *Staphylococcus* sp. TL9, optimasi.

Pendahuluan

Lipase (EC 3.1.1.3) adalah kelompok enzim hidrolitik yang memfasilitasi pemecahan ikatan ester dalam asilgliserol rantai panjang melalui reaksi hidrolisis. Lipase berkontribusi pada pasar enzim industri yang tinggi karena penting dalam proses bioteknologi (Sangeetha et al., 2011). Lipase umumnya digunakan dalam berbagai aplikasi, seperti dalam proses sintesis bahan kimia halus; lemak, minyak, dan pengolahan makanan; produksi kosmetik dan farmasi; produksi tekstil dan kertas; pengolahan air limbah; formulasi deterjen dan agen pembersih lemak; serta dalam produksi biodiesel (Bayoumi et al., 2007). Lipase dapat diperoleh dari berbagai sumber, mulai dari hewan hingga mikroorganisme. Lipase mikroba dianggap sebagai sumber lipase yang lebih bermanfaat karena hasil produksinya yang tinggi, berbagai aktivitas katalitik, tidak bergantung pada aspek musim, dan pertumbuhan yang cepat pada media yang lebih murah. Selain itu, lipase mikroba juga lebih stabil dibandingkan dengan lipase tumbuhan dan hewan (Verma et al., 2008).

Beberapa parameter memengaruhi produksi lipase termasuk kondisi nutrisi, kimia, dan fisik seperti sumber karbon dan nitrogen, suhu, pH media, jenis induser, dan agitasi. Kehadiran inhibitor, aktivator, kuantitas, dan asal inokulum tertentu juga dapat memengaruhi produksi lipase (Ebrahimpour et al., 2008). Lipase *Staphylococci* telah dikenal karena kontribusinya yang tinggi dalam mengembangkan aroma dalam produk makanan fermentasi (Talon et al., 1997). Sejumlah spesies *Staphylococcus* telah ditemukan sebagai sumber lipase untuk keperluan industri seperti lipase dari *Staph. arlettae* (Chauhan et al., 2013), *Staph. aureus* (Horchani et al., 2009; Hu et al., 2012), *Staph. epidermidis* (Chang et al., 2000), *Staph. haemolyticus* (Lee dan Kim, 2015), *Staph. lipolyticus* (Arora, 2013), *Staph. simulans* (Sayari et al., 2001); *Staph. warneri* (Yokoi et al., 2012), dan *Staph. xylosus* (Bertoldo et al., 2011; Bouaziz et al., 2011). Lipase stafilokokus sebagian besar bersifat ekstraseluler dan seperti lipase lainnya, produksinya dipengaruhi oleh beberapa faktor nutrisi, kimia, dan fisik (Gotz et al., 1998; Horchani et al., 2012).

Staphylococcus banyak digunakan sebagai kultur starter lipolitik dalam fermentasi susu dan daging seperti sosis, ham, susu, dan keju. Aktivitas lipasenya memainkan peran penting dalam proses fermentasi (Talon et al., 1996; Ghribi et al., 2009). Dalam penelitian ini, bakteri penghasil lipase yang toleran terhadap garam, *Staph. sp. TL9*, yang sebelumnya diisolasi dari terasi udang terasi telah dipelajari untuk produksi lipasenya. Galur ini dipilih bukan hanya karena memiliki aktivitas lipase tertinggi dibandingkan dengan galur lain, tetapi galur ini juga memiliki berbagai sifat teknologi dan atribut keamanan, seperti aktivitas antimikroba terhadap beberapa bakteri patogen, α -hemolisis, kemampuan lemah untuk menghasilkan biofilm, rentan terhadap beberapa antibiotik yang diuji, dan tidak membawa gen enterotoksin atau menghasilkan amina biogenik. Berbagai parameter nutrisi, kimia, dan fisik yang berkontribusi terhadap produksi lipase dioptimalkan dengan menerapkan metode "one-factor-at-a-time" (OFAT) untuk mendapatkan produksi lipase yang tinggi.

Bahan dan Metode

Strain bakteri dan persiapan inokulum

Staph. sp. TL9 dipilih untuk dioptimalkan produksi lipasenya. Satu loop penuh strain *Staph. sp. TL9* setelah tumbuh pada pelat TSA pada suhu 37°C selama 24 jam diinokulasi dalam labu yang berisi 25 mL medium kaldu kedelai tripton (TSB, Himedia, Mumbai, India) yang ditambah dengan NaCl 10% (b/v). Labu diinkubasi pada suhu 37°C dengan pengadukan pada kecepatan 150 rpm selama 24 jam. Kultur sel digunakan sebagai inokulum ketika densitas optiknya pada 600nm (OD600) adalah 1,0. Kemudian, 1% (v/v) inokulum dipindahkan ke medium produksi lipase. Media produksi lipase (LPM) terdiri dari media TSB yang ditambah dengan (% b/v): minyak zaitun 1,0, gom Arab 0,1, dan NaCl 10,0, dengan pH ditetapkan pada 7,0. Kaldu kultur *Staph. sp. TL9* dipanen dengan sentrifugasi (9800 x g) pada suhu 4°C selama 10 menit dan digunakan sebagai lipase kasar untuk penentuan aktivitas lipase.

Optimasi produksi lipase oleh *Staph. sp. TL9*

Eksperimen satu faktor pada satu waktu (OFAT) digunakan untuk menentukan kondisi optimum untuk produksi lipase. Kondisi awal adalah sebagai berikut: pH media adalah 7,0, waktu inkubasi adalah 24 jam, dan kecepatan agitasi adalah 150 rpm.

Pengaruh suhu pada produksi lipase

Suhu optimum untuk produksi lipase dipelajari dengan mengkulturkan *Staph. sp. TL9* dalam TSB yang mengandung 10% (b/v) NaCl. Inkubasi dilakukan pada berbagai suhu (25-50°C) dan pengocokan pada 150 rpm selama 24 jam. Setelah inkubasi, produksi lipase ditentukan dalam hal aktivitas lipase dengan menggunakan metode *copper-soap* (Lee and Rhee, 1988).

Pengaruh pH awal media pada produksi lipase

pH optimum awal pada produksi lipase diteliti dengan mengkulturkan strain dalam LPM pada berbagai pH: 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, dan 11,0. pH media disesuaikan menggunakan 0,1N HCl atau 0,1N NaOH. Kultur dilakukan pada suhu optimum yang dipilih dari bagian 5.2.2.1 selama 24 jam dengan kecepatan agitasi konstan pada 150 rpm. Produksi lipase ditentukan dalam hal aktivitas.

Efek substrak minyak pada produksi lipase

Efek berbagai jenis minyak pada produksi lipase diteliti dengan beberapa minyak, seperti minyak zaitun, minyak kelapa sawit, minyak bunga matahari, minyak dedak padi, minyak wijen, minyak kedelai, dan minyak jagung (dalam 1,0%, b/v). Lebih jauh, efek dari berbagai konsentrasi minyak terpilih (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, dan 2,5% b/v) juga diteliti. Kultur dilakukan dengan suhu dan pH optimum seperti yang dipilih dari bagian 5.2.2.1 dan 5.2.2.2 dengan kecepatan pengocokan 150 rpm selama 24 jam. Setelah itu, produksi lipase ditentukan dalam bentuk aktivitas.

Efek konsentrasi NaCl pada produksi lipase

Efek berbagai konsentrasi NaCl pada produksi lipase diteliti. Berbagai konsentrasi NaCl (% b/v) yang ditambahkan ke dalam LPM adalah: 0, 3, 5, 10, 15, 20, dan 25. Aktivitas lipase

ditentukan setelah inkubasi selama 24 jam pada kondisi terpilih yang diperoleh sebelumnya dengan kecepatan pengocokan pada 150 rpm.

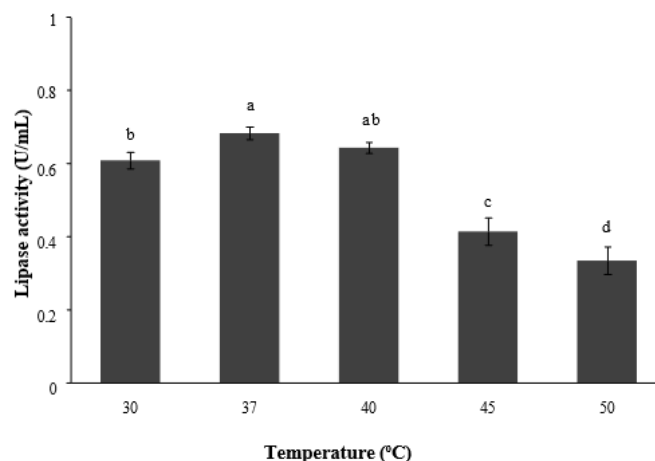
Selain itu, stabilitas lipase pada berbagai konsentrasi NaCl juga diselidiki. Lipase kasar diinkubasi terlebih dahulu dalam buffer fosfat (50 mM, pH 7,0) yang mengandung berbagai konsentrasi NaCl (% b/v) yaitu 0, 3, 5, 10, 15, 20, 25, dan 30, selama 2 jam pada suhu 37oC. Aktivitas relatif enzim kasar ditentukan dengan menggunakan aktivitas maksimum masing-masing konsentrasi NaCl sebesar 100%.

Hasil dan Pembahasan

Optimalisasi produksi lipase

Pengaruh suhu terhadap produksi lipase

Untuk menentukan suhu optimum produksi lipase oleh *Staph. sp. TL9*, percobaan dilakukan pada kisaran suhu 30-50oC (Gambar 1). Hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu inkubasi berpengaruh signifikan terhadap produksi lipase oleh *Staph. sp. TL9*. Pada suhu ruangan sekitar 30oC, aktivitas lipase adalah 0,60 U/mL. Suhu optimum adalah 37oC (0,68 U/mL) yang menunjukkan aktivitas sedikit lebih tinggi daripada suhu inkubasi pada suhu 40oC (0,64 U/mL, $p < 0,05$). Produksi lipase menurun secara signifikan pada suhu yang lebih tinggi, 45 dan 50oC (masing-masing 0,41 dan 0,33 U/mL). Hasil ini sesuai dengan Ghribi et al. (2009) yang menemukan bahwa suhu optimum untuk produksi lipase oleh *Staph. xylosus* adalah 37oC (42 U/mL), yang ditentukan secara titrimetri. Hasil yang berbeda oleh peneliti lain menemukan bahwa suhu optimum untuk produksi lipase *Staph. xylosus* adalah 45 dan 55oC (Brod et al., 2010; Bouaziz et al., 2011). Kisaran suhu optimum sebagian besar lipase bakteri dilaporkan pada 30-60oC (Gupta et al., 2002), sedangkan suhu optimum untuk lipase stafilokokus diamati sekitar 30-55oC (Horchani et al., 2012).

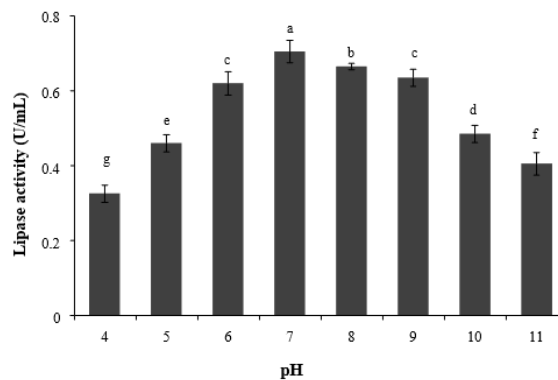


Gambar 1. Pengaruh Suhu

Seperti diketahui secara luas bahwa setiap bakteri memiliki suhu optimum yang berbeda untuk produksi lipase. Sebagian besar bakteri memiliki suhu optimum sekitar 30-37oC. Kultivasi pada suhu yang lebih rendah atau lebih tinggi dari suhu optimum dapat menyebabkan penurunan produksi lipase. Hal ini karena pada suhu yang lebih tinggi enzim dapat dinonaktifkan, sedangkan pada suhu yang lebih rendah dapat menghambat aliran nutrisi melalui membran sel yang dapat menyebabkan penurunan produksi enzim (Aiba et al., 1973; Vieille dan Zeykus, 2001).

Pengaruh pH awal terhadap produksi lipase

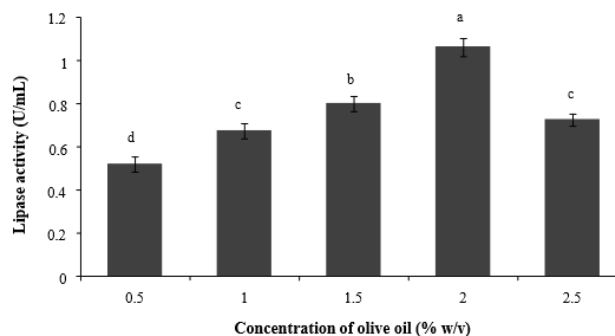
Pengaruh pH terhadap produksi lipase oleh *S. sp. TL9* diteliti. Gambar 2 menunjukkan bahwa produksi lipase meningkat secara signifikan dari pH 4 hingga 7 dan menurun tajam dari pH 8-11. Ditemukan bahwa pH awal optimum adalah 7,0 dengan aktivitas 0,69 U/mL. Laporan lain melaporkan bahwa pH optimum untuk produksi lipase oleh *Staph. xylosus* adalah 8,5 dan 9,0 (Bouaziz et al., 2011; Brod et al., 2009), sementara Horchani et al. (2012) melaporkan bahwa pH optimum untuk produksi lipase oleh stafilocokus bervariasi dari 6,0 hingga 9,5. pH diketahui memengaruhi sintesis dan sekresi enzim. pH ekstraseluler memiliki pengaruh kuat pada jalur metabolisme dan pembentukan produk oleh mikroorganisme. Perubahan pH eksternal mengubah ionisasi molekul nutrisi dan mengurangi ketersediaannya bagi mikroorganisme sehingga menurunkan aktivitas metabolisme keseluruhannya termasuk produksi enzim (Willey et al., 2008).



Gambar 2. Pengaruh pH

Efek konsentrasi NaCl pada produksi lipase

Efek berbagai konsentrasi NaCl pada produksi lipase oleh *Staph sp. TL9* diteliti. Dapat dilihat dari Gambar 3 bahwa produksi lipase meningkat dengan meningkatnya konsentrasi NaCl (0–7% NaCl, b/v) dan mencapai maksimum pada 10% NaCl. Namun, NaCl yang lebih tinggi dari 10% menyebabkan penurunan produksi lipase. Pada konsentrasi NaCl optimum (10%), produksi (1,07 U/mL) menunjukkan 1,6 kali lipat lebih tinggi dari produksi awal (0,67 U/mL). Semakin tinggi konsentrasi NaCl yang jauh dari titik optimum maka semakin rendah produksi yang diperoleh (Rao et al., 2009). Dapat dijelaskan bahwa peningkatan konsentrasi garam berarti peningkatan jumlah ion dalam larutan yang menyebabkan ketidakseimbangan ion elektrostatis keluar dari konsentrasi optimum yang dibutuhkan (Chowdhury, 2007). Ketidakseimbangan ini dapat mengganggu proses metabolisme pada bakteri untuk mensintesis protein (Willey et al., 2008).



Gambar 3. Pengaruh konsentrasi NaCl

Kesimpulan

Dalam penelitian ini, metode OFAT diterapkan untuk menyelidiki kondisi kultivasi optimum untuk produksi lipase oleh *Staphylococcus* sp. TL9. Produksi lipase tertinggi diperoleh setelah 48 jam kultivasi pada suhu 37°C dalam media produksi yang mengandung 2,0% minyak zaitun (b/v), 10% NaCl (b/v), ukuran inokulum 2,0% (v/v), dan pH 7,0, di bawah agitasi pada 150 rpm. Produksi lipase tertinggi pada kondisi optimum ini adalah 2,27 U/mL yang menunjukkan peningkatan 3,34 kali lipat dari produksi awal sebesar 0,67 U/mL. Berdasarkan percobaan time-course, produksi lipase ini merupakan model enzim yang berasosiasi dengan pertumbuhan. Selain itu, stabilitas lipase kasar *Staphylococcus* sp. TL9 terhadap berbagai konsentrasi NaCl menunjukkan bahwa ia dapat diklasifikasikan sebagai lipase halo-toleran karena stabil pada rentang konsentrasi NaCl yang luas (0-15% b/v).

DAFTAR PUSTAKA

- Abol-Fotouh, D.M., Bayoumi, R.A. and Hassan, M.A. 2016. Production of thermoalkaliphilic lipase from *Geobacillus thermoleovorans* DA2 and application in leather industry. *Enzyme Res.* 7: 1-8.
- Bertoldo, J.B., Razzera, G., Vernal, J., Brod, F.C., Arisi, A.C. and Terenzi, H. 2011. Structural stability of *Staphylococcus xylosus* lipase is modulated by Zn(2+) ions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1814: 1120-1126.
- Jaeger, K., Dijkstra, B.W. and Reetz, M.T. 1999. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 315-351.
- Jain, A. and Agarwal, A. 2009. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *J. Microbiol. Methods.* 76(1): 88- 92.
- Pongsetkul, J., Benjakul, S., Sampavapol, P., Osako, K. and Faithong, N. 2014. Chemical composition and physical properties of salted shrimp paste (Kapi) produced in Thailand. *Int. Aquat. Res.* 6: 155-166.
- Pongsetkul, J., Benjakul, S., Sampavapol, P., Osako, K. and Faithong, N. 2015. Chemical sp. nov., a novel halophilic bacterium isolated from Chigu, a previously commercial saltern located in southern Taiwan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 341-345.
- Wang, X., Xue, Y. and Ma, Y. 2010. *Virgibacillus subterraneus* sp. nov., a moderately halophilic Gram-positive bacterium isolated from subsurface saline soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 2763-2767.
- Wattanakul, U., Sujarit, C., Suwanno, J. and Yupadee, S. 2011. Chemicals and physical quality analysis of shrimp paste (Kapi) in local market. *Proceedings of the Annual Academic Conference of Khon Kaen University: Developing the Future of Thai Rural Areas – Stable Foundations for Sustainable Country Development.* Khon Khaen, Thailand. 27-29 January 2011. p. 780-783.
- Welsh, D.T. 2000. Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: From single cells to global climate. *FEMS Microbiol. Rev.* 24(3): 263-290.
- Whitaker, J.R. 1994. *Principle of Enzymology for The Food Science*, Second Edition. New York: Marcell-Decker.
- Wijnker, J.J., Koop, G. and Lipman, L.J.A. 2006. Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings. *Food Microbiology* 23: 657-662.
- Wiley M.S, Sherwood L.M. and Wolverton C.J. 2008. *Prescott, Harley and Klein's Microbiology.* McGraw Hill, New York.