

ISOLASI DAN AKTIVITAS SPESIFIK ENZIM LIPASE INDIGENOUS BIJI KENARI

Isolation and Specific Activity of Indigenous Lipase Enzyme in Canarium Nut

G.S. Suhartati Djarkasi¹⁾, Sri Raharjo²⁾, Zuheid Noor²⁾

¹⁾ Jurusan Teknologi Pertanian Fakultas Pertanian Unsrat dan ²⁾ Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian UGM

E-mail: tati_su@yahoo.com

Abstract

In general, plant oil resources has lypase enzyme which can hidrolyze oil to free fatty acids. The free fatty acid formed relatively easier to be oxidazed than that of in the form of triglycerides. The aims of this research are to investigate the specific activity of endogenous lypase enzyme and its optimum temperature. The protein was extracted by ammonium sulphate, dialysed, then fractionated through Sephadex G-100.

The research proceeds with measurement activities of endogenous enzyme extracted from canarium kernel. From the research konwn that activities of lypase endogenous from *Canarium indicum* and *Canarium vulgare* are similar. It's known that the more purification factor (PF) attained the higher specific activity (SA) achieved. Crude extract for *Canarium indicum* with FP=1 gives the SA=0.033 $\mu\text{mol/mg}$. When the PF is increased become 4.98 with saturation 70 % sodium sulphate, the SA value become 0.16 $\mu\text{mol/mg}$. Then, purification with sephadex G-100 for column chromatography cause the PF increase to 55.54 and the SA is 1.83 $\mu\text{mol/mg}$. In addition, for *Canarium vulgare* the higher PF give the more SA. Crude extract for *Canarium vulgare* with FP=1 gives the SA=0,033 $\mu\text{mol/mg}$. When the PF increase becomes 4.57 with saturation 70 % sodium sulphate, the SA value is 0.17 $\mu\text{mol/mg}$. Then, purification with sephadex G-100 for column chromatography, the PF increase to 51.13 and the SA is 1.94 $\mu\text{mol/mg}$. The optimum temperature of endogenous lipase from *Canarium indicum* is similar to lipase endogenous from *Canarium vulgare*, i.e 40°C. The free fatty acid content of *Canarium indicum* and *Canarium vulgare* kernel are 0.19 \pm 0.06% and 0.20 \pm 0.04%, respectively. After drying, free fatty acid content of *Canarium indicum* and *Canarium vulgare* kernel increase to 0.30 \pm 0.04% and 0.37 \pm 0.06%, respectively. The increase of free fatty acid has positive correlation with lipase activities.

Keywords: *kenari, lipase, enzyme activity*

PENDAHULUAN

Kenari merupakan tanaman asli Indonesia yang banyak tumbuh di daerah Indonesia bagian timur, seperti Sulawesi

Utara, Maluku, dan pulau Seram. Kenari merupakan tanaman tropik yang tergolong dalam famili Burseraceae, genus Canarium, dan memiliki sekitar 100

spesies yang kebanyakan tumbuh di hutan lembab dataran rendah di daerah Melanesia (Kennedy dan Clarke, 2004). Leenhouts (1956) mengemukakan bahwa ada 3 spesies kenari komersil yaitu *C. indicum* (di Minahasa), *C. vulgare* (di Sangihe Talaud), dan *C. ovatum* (di Philipina).

Biji kenari yang baru dipanen adalah benda biologis. Sebagai benda biologis, biji kenari akan mengalami perubahan komposisinya sebelum dilakukan pengolahan. Salah satu perubahan biokimiawi yang dapat terjadi adalah adanya aktivitas enzim lipase indigenous dalam biji kenari. Enzim tersebut dapat kontak dengan substrat yang berupa trigliserida dalam biji kenari apabila terjadi perubahan struktur biji kenari akibat pengaruh lingkungan. Akibat kontak antara substrat dan enzim, terjadi reaksi hidrolisis yang menghasilkan asam lemak bebas yang dapat menyebabkan ketengikan (DeMan, 1999).

Secara umum, lipase didefinisikan sebagai enzim yang menghidrolisis asam lemak rantai panjang pada bagian antar muka (*interface*) minyak-air. Substrat alami enzim lipase adalah trigliserida dari asam lemak rantai panjang. Trigliserida tersebut tidak larut di dalam air dan enzim lipase dikarakterisasi dengan melihat kemampuannya dalam mengkatalisa hidrolisis ikatan ester pada interfase secara cepat, yaitu antara fase substrat dan fase cair (Shahani, 1975). Jadi lipase menghidrolisis ester asam lemak yang tidak larut, meskipun secara normal gliserida merupakan substrat yang lebih disukai. Oleh sebab itu, lipase (triasilgliserol asilhidrolase, E.C. 3.1.1.3) adalah enzim yang sangat penting baik secara fisiologis maupun industri. Dalam tanaman, lipase dijumpai dalam jaringan penyimpan energi (Nus *et al.*, 2006).

Aktivitas enzim ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, terutama suhu penyimpanan. Pada umumnya suhu optimum enzim lipase berkisar antara 30 - 40 °C (Shahani, 1975). Apabila biji

mengalami perubahan struktur dan suhu penyimpanan pada kisaran suhu tersebut, reaksi pembebasan asam lemak dari sistem ester segera terjadi. Kenyataan ini merupakan indikasi bahwa minyak biji kenari telah mengalami penurunan mutu, karena asam lemak bebasnya meningkat.

Enzim lipase mempunyai suhu optimum dengan kisaran yang besar. Lipase dari *rice bran* (kulit padi) suhu optimum adalah 40°C (Bhardwaj, *et al.*, 2001), lipase dari kelapa 35°C (Ejedegba, *et al.*, 2007), lipase dari biji *sunflower* 35 - 50°C (Sagiroglu dan Arabaci, 2005), dan lipase dari biji *Caesalpinia bonducella* L 30°C (Pahoja, *et al.*, 2001).

Isolasi dan pemurnian enzim merupakan proses yang melibatkan beberapa tahap, yaitu ekstraksi, pengendapan protein, sentrifuse, dialisis, dan pemisahan dengan kromatografi kolom (Brockerhoff dan Jensen, 1974). Pada tahap ekstraksi, dinding dan membran sel dipecahkan sehingga enzim (protein) keluar ke dalam medium. Pengendapan protein didasarkan atas perbedaan kelarutan. Garam amonium sulfat adalah paling umum digunakan untuk tujuan tersebut. Keuntungan menggunakan garam ini adalah sangat mudah larut dalam air, tidak toksik, dan dapat menstabilkan enzim (Scopes, 1982). Untuk memisahkan cairan dari endapan protein, dilakukan dengan sentrifuse pada kecepatan 10.000 rpm dengan suhu 4°C selama 20 menit. Dialisa dilakukan dengan menggunakan kantong selofan yang diisi dengan filtrat enzim, kemudian direndam dalam pelarut bebas ion atau larutan bufer. Selama dialisa, pelarut disirkulasi dengan menggunakan *stirrer* dan setiap jangka waktu tertentu pelarut diganti untuk mempercepat dialisa. Tahap selanjutnya adalah pemurnian enzim menggunakan kromatografi kolom.

Tujuan penelitian ini adalah menentukan aktivitas spesifik enzim lipase indigenous biji kenari dan suhu optimumnya.

METODOLOGI PENELITIAN

A. Bahan dan Alat

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah kenari segar spesies *Canarium indicum* dan *Canarium vulgare* yang diperoleh dari Kabupaten Minahasa dan Kabupaten Sangihe-Talaud Propinsi Sulawesi Utara. Tingkat ketuaan buah kenari yaitu matang penuh dengan karakteristik kulit buah berwarna hitam. Bahan kimia yang digunakan antara lain: alkohol, dietil eter, aseton, isooktan, amonium sulfat, bufer fosfat pH 8,0, bufer Tris HCl pH 7,0 dan pH 8,0, NaCl, Sephadex G-100, asam oleat, minyak *olive*, dan bahan-bahan kimia lain untuk analisis, diperoleh dari Sigma.

Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain: timbangan, *grinder*, inkubator, pengering kabinet, unit kolom kromatografi 30 x 1,5 cm, membran dialisa (D-0655), *fraction collector* (Biorad, Model 210), *vortex*, *waterbath*, spektrofotometer ultra violet (Shimadzu, UV-1650 PC), *magnetic stirrer*, sentrifugasi (Beckman, Model J2-21), dan peralatan gelas baik untuk kebutuhan prepaasi maupun analisis.

B. Prosedur Penelitian

1). Persiapan Ekstrak Kasar Kenari

Buah kenari segar dikupas kulitnya sehingga diperoleh NIS (*nut-in-shell*). NIS dipecah tempurungnya sehingga diperoleh kernel atau biji kenari. Biji kenari dikeringkan dengan menggunakan alat pengering kabinet pada suhu 55-60°C selama 10 jam.

Sebanyak 5 gram biji kenari ditimbang kemudian dihaluskan menggunakan *grinder*. Biji kenari halus (homogenat) ditambahkan buffer fosfat pH 8,0 mengandung NaCl 0,4 M, (1:10, w/v), kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 1 jam diikuti sentrifus pada 10000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh adalah larutan ekstrak kasar.

2). Pengendapan Protein Dengan Amonium Sulfat

Amonium sulfat padat ditambahkan pada larutan ekstrak kasar dengan kejenuhan 70% diaduk selama 1 jam pada suhu 4°C dan dibiarkan selama 12 jam selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 10000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit. Endapan diambil sebagai ekstrak protein.

Protein diresuspensi dengan buffer (0,1 M Tris HCl, pH 7,0), selanjutnya didialisa dengan buffer yang sama (0,1 M Tris-HCl, pH 7,0) dengan volume sebanyak ±2 liter selama 12 jam. Proses ini untuk menghilangkan sisa amonium sulfat.

3). Fraksinasi Dengan Kromatografi Kolom

Ekstrak protein kenari dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom menggunakan matriks sephadex G-100 ukuran kolom (30x1,5cm) dan dielusi dengan buffer Tris-HCl pH 7,0. Laju aliran adalah 30 ml/jam. Sampel dikumpulkan setiap 3 ml dengan menggunakan *fraction collector*. Masing-masing fraksi dianalisa aktivitas lipolitik dan kadar protein.

4). Stabilitas Enzim Lipase Terhadap Suhu

Untuk mengetahui stabilitas terhadap suhu, enzim lipase diinkubasikan selama 30 menit pada berbagai tingkat suhu (20, 30, 40, 50, 60, 70, dan 80°C pada pH 7,0) dalam buffer Tris-HCl. Selanjutnya, enzim dianalisa aktivitasnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Aktivitas enzim lipase yang diekstrak dari biji kenari terhadap substrat minyak *olive*

Aktivitas spesifik, *recovery*, dan faktor purifikasi protein enzim lipase yang diekstrak dari biji *Canarium indicum* dapat dilihat pada Tabel 1. Dari Tabel 1 dapat diketahui bahwa aktivitas spesifik meningkat dengan makin meningkatnya faktor purifikasi (FP)nya.

Ekstrak kasar dengan FP=1, nilai aktivitas spesifiknya = 0,002 µmol/mg.

Peningkatan FP menjadi 4,98 dengan pengendapan dalam amonium sulfat kejenuhan 70 % meningkatkan aktivitas spesifik menjadi 0,011 $\mu\text{mol}/\text{mg}$. Pada penelitian ini, pengendapan protein dengan amonium sulfat kejenuhan 70 % mampu meningkatkan aktivitas spesifik enzim lipase. Selanjutnya, protein enzim difraksinasi dengan sephadex G-100 dan hasilnya menunjukkan bahwa dengan FP sebesar 55,39, aktivitas spesifik meningkat menjadi 0,122 $\mu\text{mol}/\text{mg}$. Ini berarti bahwa

makin murni protein enzim, makin tinggi aktivitasnya sebagai enzim. Hal ini sesuai yang dikemukakan oleh Lehninger (1982) aktivitas spesifik merupakan suatu ukuran kemurnian enzim dan nilainya meningkat selama pemurnian suatu enzim dan menjadi maksimum dan tetap (konstan) jika enzim sudah berada pada keadaan murni. Aktivitas spesifik enzim didefinisikan sebagai jumlah unit enzim per miligram protein.

Tabel 1. Aktivitas spesifik enzim lipase yang diekstrak dari biji kenari *Canarium indicum*

Fraksi	Volume (mL)	Protein (mg/mL)	Aktivitas Enzim ($\mu\text{mol}/\text{mL}$)	Aktivitas spesifik ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	Total Aktivitas (μmol)	Recovery (%)	Faktor Purifikasi
Ekstrak Kasar	50	148,64	0,328	0,002	16,40	100	1
Pengendapan dg amonium sulfat	5	227,67	2,501	0,011	12,51	76,26	4,98
sephadex G-100	30	0,3	0,037	0,122	1,10	6,71	55,39

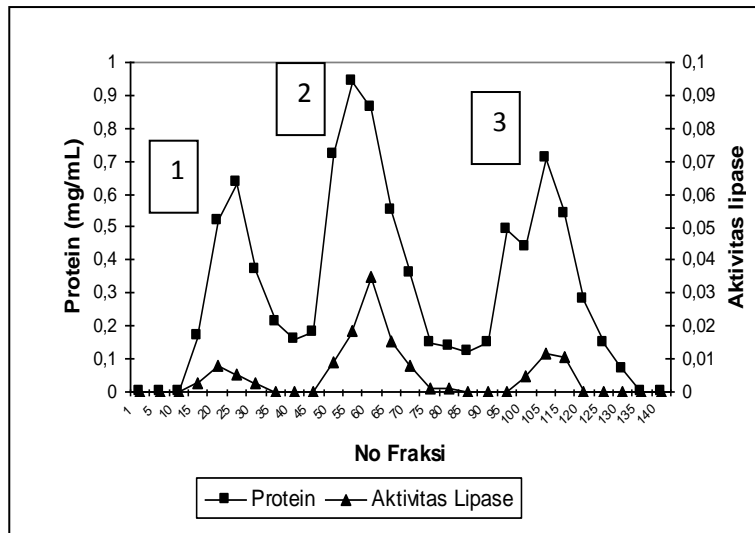
Dengan cara yang sama, telah dianalisa aktivitas spesifik dan FP protein biji kenari *Canarium vulgare*. Hasilnya adalah, dengan FP=1, aktivitas spesifiknya = 0,003 $\mu\text{mol}/\text{mg}$. Pada peningkatan FP sebesar 4,57, aktivitas spesifiknya adalah 0,012 $\mu\text{mol}/\text{mg}$. Pada FP= 51,04 aktivitas spesifiknya adalah 0,130 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ (Tabel 2).

Protein hasil pengendapan dengan amonium sulfat pada kejenuhan 70% difraksinasi menggunakan kromatografi kolom dengan jenis matrik Sephadex G-100. Fraksi yang diperoleh dianalisa protein dan aktivitas enzimnya, hasilnya dapat dilihat pada Gambar 1 untuk *Canarium indicum* dan Gambar 2 untuk *Canarium vulgare*. Dari gambar tersebut dapat diketahui bahwa ada tiga puncak protein dan aktivitas enzimnya, puncak 1,

2, dan 3, tetapi puncak yang paling dominan adalah puncak 2. Munculnya tiga puncak disebabkan karena penggunaan Sephadex G-100 meloloskan protein dengan ukuran molekul 4000-150000 dalton (Whitaker, 1994). Dengan demikian, hasil fraksinasi memungkinkan munculnya tiga puncak. Setiap puncak diuji aktivitasnya dan aktivitas yang paling tinggi dari ketiga puncak adalah pada puncak nomor 2. Berdasarkan pada data jumlah protein dan aktivitasnya dapat diduga bahwa puncak nomor 2 adalah lipase. Lipase ini ikut berperan dalam menentukan jumlah asam lemak bebas pada sistem minyak kenari baik untuk *Canarium indicum* maupun untuk *Canarium vulgare*.

Tabel 2. Aktivitas spesifik enzim lipase yang diekstrak dari biji kenari *Canarium vulgare*

Fraksi	Volume (mL)	Protein (mg/mL)	Aktivitas Enzim ($\mu\text{mol/mL}$)	Aktivitas Spesifik ($\mu\text{mol/mg}$)	Total Aktivitas (μmol)	Recovery (%)	Faktor Purifikasi
Ekstrak Kasar	50	154,22	0,391	0,003	19,57	100	1
Pengendapan dengan amonium sulfat	5	292,36	3,388	0,012	16,94	86,58	4,57
sephadex G-100	30	0,35	0,045	0,130	1,36	6,95	51,04

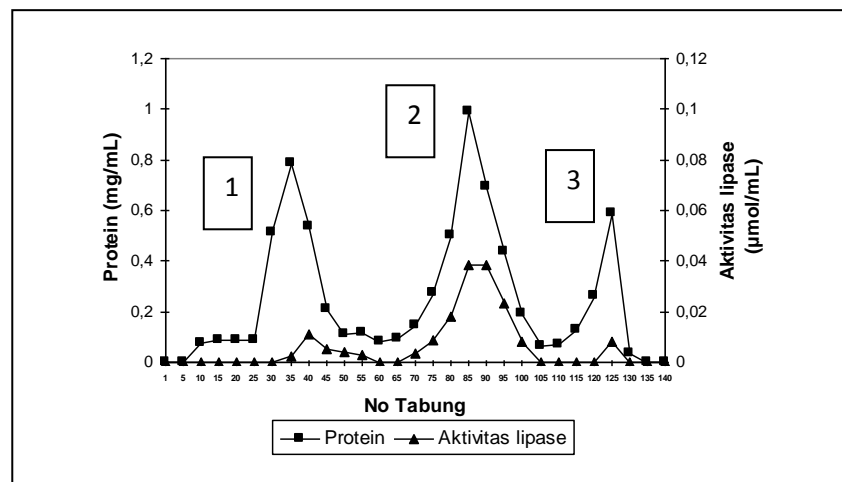


Gambar 1. Fraksinasi protein biji kenari *Canarium indicum* dengan kromatografi kolom menggunakan Sephadex G-100.

Dibanding dengan lipase *Canarium indicum* (aktivitas spesifiknya = 0,122 $\mu\text{mol/mg}$), aktivitas spesifik lipase *Canarium vulgare* lebih besar (0,130 $\mu\text{mol/mg}$). Kenyataan ini dapat dimengerti, karena kandungan protein biji kenari dari spesies *Canarium indicum* adalah $12,04 \pm 0,31$ % sedangkan *Canarium vulgare* sebesar $14,06 \pm 0,36$ %, dan teori menyatakan bahwa enzim adalah protein dan aktivitas katalitiknya bergantung kepada integritas strukturnya

sebagai protein (Belitz dan Grosch, 1987), sehingga probabilitas kandungan lipase sebagai protein enzim juga dapat lebih besar dalam *Canarium vulgare*.

Seperti halnya pada *Canarium indicum*, pada *Canarium vulgare* fraksi yang diperoleh dari hasil kromatografi kolom ada tiga puncak, dan menunjukkan adanya aktivitas enzim pada masing-masing puncak. Dari ketiga puncak yang memiliki aktivitas yang paling tinggi juga adalah pada puncak nomor 2 (Gambar 2).



Gambar 2. Fraksinasi protein biji kenari *Canarium vulgare* dengan kromatografi kolom menggunakan Sephadex G-100.

B. Suhu optimum enzim lipase biji kenari

Penentuan suhu optimum aktivitas enzim dilakukan dari suhu 20°C sampai 80°C. Hasil analisa menunjukkan bahwa aktivitas enzim yang tertinggi pada suhu 40°C baik untuk *Canarium indicum* maupun *Canarium vulgare* (Gambar 3). Aktivitas enzim lipase dari biji kenari spesies *Canarium indicum* dan *Canarium vulgare* pada suhu 40°C secara berurutan adalah 0,045 μmol/mL dan 0,046 μmol/mL. Suhu optimum enzim adalah suhu pada saat enzim mempunyai aktivitas maksimum.

Aktivitas relatif adalah hasil bagi antara aktivitas enzim pada kondisi suhu tertentu dengan aktivitas enzim pada suhu optimum. Sedangkan satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menyebabkan pengubahan (transformasi) satu mikromol substrat per menit pada suhu 25°C dalam keadaan pengukuran optimal (Reed, 1975; Lehninger, 1982).

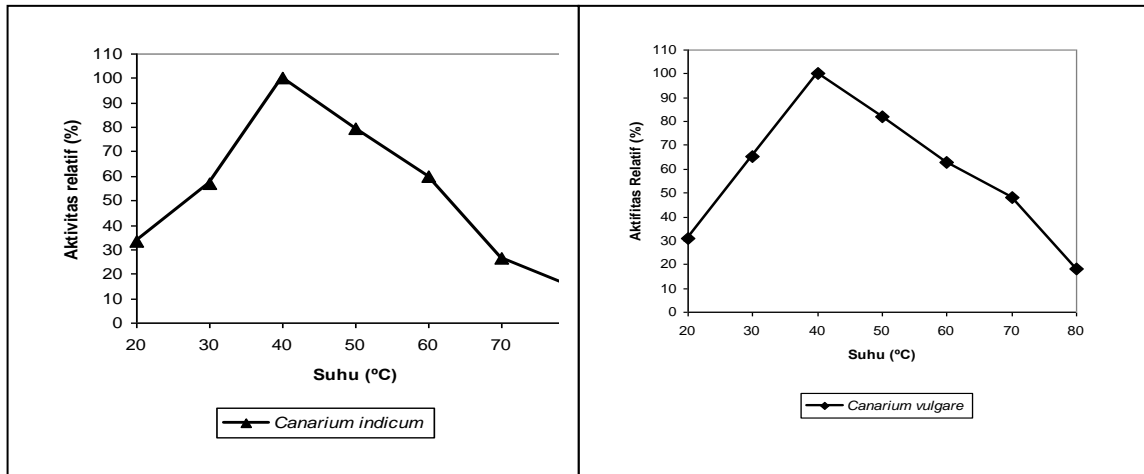
Penentuan suhu optimum aktivitas enzim sangat diperlukan dalam teknologi pangan khususnya dalam sistem minyak,

karena pada suhu yang terlalu rendah kestabilan enzim tinggi tetapi aktivitasnya rendah. Sedangkan pada suhu yang terlalu tinggi aktivitasnya tinggi tetapi kestabilannya rendah. Diketahui bahwa lipase dari berbagai jenis tanaman mempunyai suhu optimal berbeda-beda. Misalnya, lipase dari kelapa memiliki suhu optimum 35°C (Ejedegba, *et al.*, 2007), lipase dari *rice bran* (kulit padi) suhu optimumnya 40°C (Bhardwaj, *et al.*, 2001), lipase dari biji *sunflower* adalah 35 - 50°C (Sagioglu dan Arabaci, 2005), dan lipase dari biji *Caesalpinia bonducella L* memiliki suhu optimum 30°C (Pahoja, *et al.*, 2001).

KESIMPULAN

Biji kenari dari spesies *Canarium indicum* dan *Canarium vulgare* terdapat enzim lipase dengan aktivitas spesifik 0,03 – 0,04 μmol/mg. Suhu optimum lipase biji kenari *Canarium indicum* adalah 45,73 °C dan *Canarium vulgare* sebesar 47,58 °C. Aktifitas lipase pada *Canarium indicum* lebih rendah dari pada aktifitas lipase *Canarium vulgare*, hal ini ada hubungannya dengan asam lemak bebas

dalam *Canarium indicum* terdapat 1,26 % lebih rendah dari asam lemak pada *Canarium vulgare*, yakni 1,56 % pada penyimpanan 6 minggu.



Gambar 3. Aktivitas relatif enzim terhadap suhu (A) *Canarium indicum*, (B) *Canarium vulgare*

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous, 1995. Food Composition; Additivies; Natural Contaminats. Official Methods of Analysis of AOAC International Ed. 16th Vol .IV. (41):1 -52.
- Belitz, H.D. and W. Grosch, 1987. Food Chemistry. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany.
- Bhardwaj, K., A. Raju, and R. Rajasekharan, 2001. Identification, Purification, and Characterization of a Thermally Stable Lipase from Rice Bran. A New Member of the (Phospho) Lipase Family. *J. Plant Physiol.* 127: 1728-1738.
- Brockerhoff, H. and R.G. Jensen, 1974. Lipolytic Enzymes, Academic Press, New York.
- Djagal-Marseno, Retno-Indrati, dan Y. Ohta. 1998. Simplified Method for Determination of Free Fatty Acids for Soluble and Immobilized Lipase Assay. *Indonesian Food and Nutrition Progress*, 5 (2): 79-83.
- DeMan, J.M., 1999. Principles of Food Chemistry. 3rd Ed. Aspen Pub. Inc. Gaithersbury, Maryland.
- Ejedegba, B.O., E. C. Onyeneke, and P.O. Oviasogle, 2007. Characteristics of Lipase Isolated from Coconut (*Cocos nucifera* linn) seed under different nutrient treatments. *African Journal of Biotechnology*, 6(6): 723-727.
- Kennedy, J and W.Clarke, 2004. Cultivated Landscapes of the Southwest Pasific. Resource Management in Asia-Pasific, Canberra.
- Leenhouts, P.W., 1956. Burseraceae. In: Flora Malesiana. Series 1, Vol.5. pp. 256-296.
- Lehninger, A. L., 1982. Principles of Biochemistry. Worth Publishers, Inc. Maryland.

- Nus, M., F.J. Sanchez-Muniz and J.M. Sanchez-Montero. 2006. The study of vegetable oil, Fat and lipoprotein oxidation using pancreatic lipase and arylesterase. *Food Technol.Biotechnol*, 44 (1): 1 – 15.
- Pahoja, V.M., M.U. Dahot, and M. A. Sethar, 2001. Characteristic Properties of Lipase from Crude Extract of *Caesalpinia bonducella* L. Seeds. *J.Biol. Sci.* 1 (8): 775-778.
- Reed G, 1975. General Characteristics of Enzymes. In: Reed Gerald, Ed. *Enzymes in Food Processing*. Academic Press. New York, San Francisco, London. Pp. 15 – 42.
- Sagiroglu, A. and N. Arabaci, 2005. Sunflower Seed Lipase: Extraction, Purification, and Characterization. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 35 (1): 37-51.
- Scopes, R. K. 1982. *Protein Purification*. Springer-Verlag, New York
- Shahani, K. M., 1975. Lipases and Esterases. . In: Reed Gerald, Ed. *Enzymes in Food Processing*. Academic Press. New York, San Francisco, London. Pp. 181 – 217.
- Whitaker, J.R., 1994. *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. Marcel Dekker, New York, Basel, Hongkong.