

## PENAPISAN ISOLAT KAPANG ENDOFIT LIPOLITIK UNTUK PRODUKSI LIPASE PADA AMPAS KELAPA

(*Screening of Lipolytic Endophyte Isolates for Lipase Production on Coconut Dregs*)

**Ruth Melliawati, Nuryati dan Miftah Al Azizah**

Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Jl. Raya Bogor Km. 46, Cibinong 16911, Indonesia

e-mail: ruthmell2000@yahoo.com

Naskah diterima 05 Juni 2018, revisi akhir 21 September 2018 dan disetujui untuk diterbitkan 03 Oktober 2018

**ABSTRAK.** Kapang endofit merupakan mikroba yang hidup di dalam jaringan tanaman. Kapang jenis ini terus digali pemanfaatannya untuk berbagai keperluan. Tujuan penelitian ini adalah menyeleksi kapang endofit yang bersifat lipolitik untuk digunakan dalam memproduksi enzim lipase pada medium ampas kelapa. Dua puluh isolat kapang endofit diseleksi pada medium selektif (media PDA yang mengandung 0,1% bromocresolgreen dan Tween 80) untuk mendapatkan kapang lipolitik. Selanjutnya, tiga isolat kapang lipolitik potensial hasil seleksi digunakan untuk memfermentasi ampas kelapa sehingga menghasilkan enzim lipase. Tahap fermentasi ini menggunakan dua perlakuan, yakni dengan penambahan mineral dan tanpa penambahan mineral. Enzim lipase tertinggi yang diperoleh selanjutnya diendapkan menggunakan ammonium sulfat pada 80% saturasi. TLC dilakukan terhadap filtrat (crude enzyme) untuk mengetahui jenis gula yang dihasilkan. Hasil penapisan menunjukkan bahwa dari dua puluh isolat terdapat enam isolat kapang endofit yang bersifat lipolitik (membentuk zona bening). Tiga isolat memberikan zona bening yang cukup luas (HL.104F.467; JB.79F.374 ; R.6F.18); dengan aktivitas lipase tertinggi masing-masing adalah 128,39  $\mu\text{mol/mL}$ , 123,83  $\mu\text{mol/mL}$  dan 55,46  $\mu\text{mol/mL}$  (lama inkubasi 96 jam). Pengendapan crude enzyme lipase dari isolat R.6F.18 menghasilkan aktivitas 2,3 kali lebih besar, sedangkan dua isolat lainnya tidak berbeda nyata. Hasil TLC menunjukkan adanya galaktosa dalam crude enzyme (JB.79F.374 dan R.6F.18) dan senyawa atau gula lain diluar standar.

**Kata kunci:** ampas kelapa, kapang endofit, lipase, TLC

**ABSTRACT.** Endophytic fungi are microbes that live in plant tissues. This research aimed to select endophytic fungi isolates that have lipolytic function for lipase production using coconut dregs medium. Twenty endophytic fungi isolates were selected to obtain lipolytic fungi. Three potential lipolytic fungi were used to ferment coconut dregs (with and without the addition of minerals) as an internal medium to produce lipase. The highest lipase was precipitated using ammonium sulfate at 80% saturation while TLC was carried out on the filtrate. Six endophytic fungi isolates were showed to have lipolytic activity (i.e. producing clear zones) during screening. Three isolates with highest clear zones were HL.104F.467, JB.79F.374, and R.6F.18; with lipase activity 128.39  $\mu\text{mol/mL}$ , 123.83  $\mu\text{mol/mL}$  and 55.46  $\mu\text{mol/mL}$  respectively. Crude lipase precipitation from isolate R.6F.18 showed 2.3 times greater activity while the others were not significantly different. TLC results indicated presence of galactose in crude enzymes (JB.79F.374 and R.6F.18) and compound or sugar outside standard.

**Keywords:** coconut dreg, endophytic mold, lipase, TLC.

### 1. PENDAHULUAN

Enzim merupakan makromolekul yang dapat meningkatkan laju suatu reaksi kimia. Enzim mampu bertindak sebagai

pengatur yang menyebabkan berbagai fungsi metabolisme terkoordinasi secara harmonis. Selain bertindak sebagai biokatalis pada sistem metabolisme

mahluk hidup, enzim juga dapat dimanfaatkan secara luas pada berbagai bidang penelitian dan industri karena memerlukan energi yang rendah, selektif terhadap substrat tertentu, biokompatibel, *biodegradable* dan dapat diperoleh dari sumber terbarukan (Liu *et al.*, 2016).

Enzim lipase merupakan biokatalis paling serbaguna dalam sintesis organik karena memiliki sifat fleksibilitas, stereoselektivitas, tersedia secara komersial dan memungkinkan penggunaan dalam berbagai macam pH dan suhu. Enzim lipase juga mampu mengkatalis berbagai macam reaksi esterifikasi, termasuk transesterifikasi, aminolisis dan thiotransesterifikasi. Pada beberapa tahun terakhir enzim lipase juga banyak dimanfaatkan dalam industri kimia dan farmasi karena kegunaannya dalam sintesis dan reaksi hidrolitik. Enzim lipase termasuk jenis enzim hidrolase yang mengkatalis pemecahan lemak dan minyak dengan menghasilkan asam lemak bebas, diasilgliserol, monogliserol dan gliserol (Vecchia *et al.*, 2005).

Enzim lipase dapat digunakan untuk berbagai keperluan karena memiliki spesifikasi reaksi yang tinggi (Iftikhar *et al.*, 2010). Selain itu, enzim ini juga memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena berpotensi untuk digunakan pada berbagai jenis industri dan proses, seperti pada industri pembuatan kertas dan *cocoa butter* (Clausen *et al.*, 2000), sintesis biopolimer (Balaji dan Ebenezer, 2008), industri pembersih (detergen), biodegradasi plastik (Jaeger *et al.*, 1995) serta untuk pengolahan limbah cair, komestik dan oleokimia (Sharma *et al.*, 2001). Meskipun lipase diketahui sangat berpotensi namun penggunaan jenis enzim ini secara komersial masih tergolong rendah karena harganya yang relatif mahal (Kaewthong *et al.*, 2005).

Enzim lipase diproduksi oleh beberapa tanaman, hewan dan mikroorganisme. Isolasi dan produksi lipase dari tumbuhan dan hewan pada skala besar memerlukan biaya yang besar dan membutuhkan waktu yang lama (Sudha *et al.*, 2016). Selain itu, eksploitasi tumbuhan dan hewan secara besar-besaran juga

dikhawatirkan dapat mengganggu keseimbangan lingkungan. Oleh karena itu, salah satu alternatif untuk memproduksi senyawa bioaktif adalah menggunakan mikroorganisme yang diisolasi dari alam dan jaringan tanaman. Menurut Iftikhar *et al.* (2011) enzim yang diisolasi dari mikroorganisme memiliki kegunaan yang lebih luas daripada enzim yang diisolasi dari hewan maupun tumbuhan. Hal ini karena enzim dari mikroorganisme kemungkinan memiliki variasi aktifitas katalitik, mudah dimanipulasi secara genetik, serta lebih mudah untuk dikembangkan dan diproduksi massal. Enzim lipase yang berasal mikroba merupakan enzim yang paling banyak digunakan dalam aplikasi bioteknologi dan kimia organik (Treichel *et al.*, 2010).

Salah satu mikroorganisme penghasil lipase adalah kapang endofit. Kapang endofit merupakan kapang yang hidup di dalam jaringan tanaman. Beberapa penelitian melaporkan bahwa kapang endofit dapat digunakan sebagai inokulum dalam pembuatan bioetanol dari limbah pengolahan agar-agar (Aulia, 2014), sebagai agen antibakteri (Azizah, 2008), penghasil alkaloid kuinin (Winarno, 2006; Maehara *et al.*, 2011; dan Simanjuntak *et al.*, 2002), serta penghasil enzim glukamilase (Melliawati *et al.*, 2006).

Indonesia sebagai negara agraris menghasilkan limbah pertanian yang sangat berlimpah dimana salah satunya adalah ampas kelapa. Daerah Sumatera Barat diperkirakan menghasilkan ampas kelapa sebesar 4.233,18 ton/tahun (Dinas Perkebunan Provinsi Sumatera Barat, 2008). Ampas kelapa diketahui masih mengandung nutrisi yang berguna untuk pertumbuhan mikroba. Menurut Putri (2010), ampas kelapa mengandung protein 5,78%; lemak 38,24%; dan serat kasar 15,07%. Puri (2011), melaporkan bahwa kandungan ampas kelapa terdiri dari air 13,35%; protein kasar 5,09%; lemak kasar 19,44%; abu 3,92%; dan serat kasar 30,4%. Perbedaan konsentrasi nutrisi dalam ampas kelapa diketahui tergantung dari jenis kelapa dan umur kelapa itu sendiri.

Saat ini ampas kelapa sudah dimanfaatkan untuk berbagai keperluan, diantaranya adalah sebagai bahan baku tepung kelapa (Meri *et al.*, 2015), sebagai bahan mie basah, pakan ternak dan bahan baku biodiesel (Patrik, 2008). Sayangnya, penggunaan ampas kelapa untuk produksi enzim belum banyak dilakukan. Padahal enzim merupakan salah satu produk bioteknologi yang bernilai sangat tinggi. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menyeleksi kapang endofit yang bersifat lipolitik dan selanjutnya digunakan dalam proses produksi enzim lipase pada medium berbasis ampas kelapa. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui jenis gula yang terdapat didalam *crude enzyme* lipase yang dihasilkan.

## 2. METODE PENELITIAN

### Mikroorganisme dan Preparasi Media Pertumbuhan

Penelitian ini menggunakan 20 isolat kapang endofit yang merupakan koleksi Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. Media yang digunakan untuk pertumbuhan kapang adalah media PDA (*Potato Dextrose Agar*). Kapang ditumbuhkan dalam media PDA selama 5 hari pada suhu ruang (28-30 °C).

### Preparasi Medium Selektif

Pembuatan medium selektif mengacu pada metode yang dilakukan oleh Adio *et al.*, (2015) yang dimodifikasi. Media dibuat dari PDA dengan konsentrasi 3,9% ditambah dengan 0,1% *bromocresol green* yang dilarutkan dalam akuades dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* dan disterilisasi pada 121 °C selama ±15 menit. Selanjutnya Tween 80 steril ditambahkan kedalam medium selektif (sterilisasi Tween 80 menggunakan *syringe* filter 0,20 µm).

### Preparasi Media Fermentasi

Media fermentasi yang digunakan pada penelitian ini ada dua macam. Media A yang mengandung 10 gram ampas kelapa dalam 5 mL akuades dan media B yang mengandung 10 gram ampas kelapa

dalam 5 mL larutan mineral. Larutan mineral terdiri dari larutan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,24%; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,1%; glukosa 0,3%; dan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1%. Semua media disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit pada tekanan 1 atm.

### Preparasi Larutan NaOH

Larutan NaOH digunakan sebagai titrat pada titrasi penentuan aktivitas enzim lipase. Larutan NaOH dibuat dengan konsentrasi 0,05 N. Standarisasi larutan NaOH menggunakan larutan baku asam oksalat 0,01 N.

### Ekstraksi Lipase

Ekstraksi lipase dilakukan dengan menambahkan pelarut buffer *citrate-phosphate* pH 4,8 sebanyak 50 mL pada masing-masing media hasil fermentasi. Larutan tersebut diaduk sampai homogen dan disimpan dalam *cold storage* suhu 4 °C selama 2 jam. Selanjutnya campuran yang diperoleh disaring untuk memisahkan filtrat dari biomasa. Filtrat kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Filtrat yang diperoleh merupakan *crude enzyme* yang akan digunakan pada tahapan selanjutnya.

### Pengamatan Isolat Kapang pada Medium Selektif (Uji Kualitatif)

Pengamatan isolat kapang pada medium selektif dilakukan dengan mengukur zona bening. Zona bening merupakan zona yang terbentuk disekitar koloni dan berwarna kuning. Zona bening dihitung pada inkubasi hari ke-3. Zona diukur menggunakan persamaan dari Sukara *et al.* (1987):

Luas Zona Hidrolisis =

$$\frac{(\text{Massa total kertas} - \text{massa kertas koloni})}{\text{massa } 1 \text{ Cm}^2 \text{ kertas}} \times 1 \text{ cm}^2 \dots\dots(1)$$

### Uji Aktivitas Enzim

Pengujian aktivitas lipase dilakukan dengan menggunakan metode titrimetri. Sebanyak 1 mL minyak zaitun ditambahkan 0,5 mL CaCl<sub>2</sub> 0,1 M, campuran divorteks selama 10 menit agar terbentuk emulsi, kemudian ditambahkan

0,6 mL enzim. Selanjutnya campuran diinkubasi selama 2 jam pada inkubator yang dilengkapi pengocok dengan putaran 150 rpm pada suhu 40 °C. Sebanyak 5 mL etanol dan 2,5 mL aseton ditambahkan untuk menginaktivkan enzim. Campuran ditritasi menggunakan larutan NaOH 0,0547 N dan ditambah indikator *Phenoptaline* (Kurnia, 2010). Persamaan yang digunakan untuk menghitung aktivitas enzim berdasarkan penelitian Adio *et al.*, (2015):

$$\text{Aktivitas enzim } (\mu\text{mol/mL}) = \frac{(\text{mL NaOH sampel} - \text{mL NaOH blangko}) \times N \times 1000}{\text{mL enzim yang digunakan}} \dots(2)$$

**Uji Gula dan Protein**

Uji gula dilakukan menggunakan metode Nelson (1941). Ekstrak dari enzim dilakukan pengenceran hingga 10, 100, 500 dan 1000 kali. Masing-masing larutan hasil pengenceran diambil 1 mL dan ditambah dengan 1 mL campuran reagen A dan reagen B (perbandingan reagen A 25 mL dan reagen B 1 mL). Campuran dipanaskan pada air mendidih selama 20 menit. Kemudian masing-masing ditambah dengan 1 mL reagen C. Saat penambahan reagen C, campuran langsung divorteks

sampai terbentuk warna biru. Selanjutnya cairan hasil vorteks diencerkan dengan akuades sampai volumenya 25 mL lalu masing-masing larutan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 500 nm.

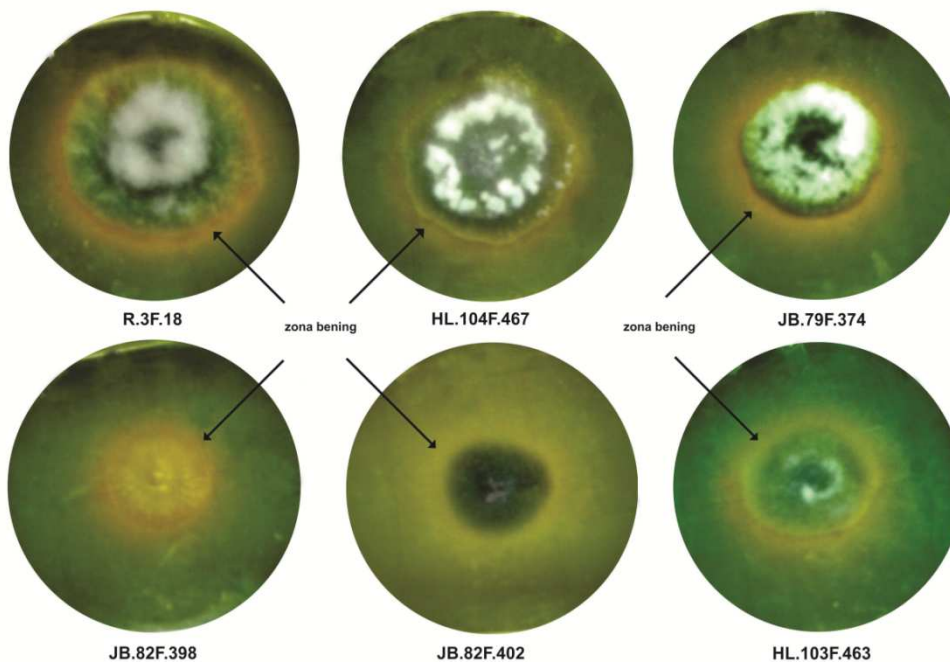
Uji protein mengikuti metode Hanson & Philips (1981). Enzim yang akan dianalisis kadar proteinnya diencerkan 10 kali menggunakan akuades. Larutan tersebut kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 280 nm. Kadar protein dapat dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Kadar protein} = \text{absorbansi} \times 1,45 \times \text{faktor pengenceran} \dots(3)$$

**3. HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Penapisan kapang endofit lipolitik**

Berdasarkan hasil seleksi secara kualitatif dari dua puluh isolat kapang endofit, terdapat enam isolat kapang positif yang menghasilkan lipase. Hal ini ditandai dengan adanya zona bening disekitar koloni (Gambar 1).



Gambar 1. Enam isolat kapang endofit yang membentuk zona bening

Terbentuknya zona bening terjadi karena di dalam media selektif mengandung Tween 80 yang merupakan sumber lemak. Tween 80 dihidrolisis oleh enzim lipase yang dikeluarkan oleh kapang tersebut. Terjadinya hidrolisis lemak menjadi asam lemak bebas ditandai dengan perubahan warna media dari hijau menjadi kuning di sekitar koloni. *Bromocresol green* yang ditambahkan dalam media digunakan sebagai indikator.

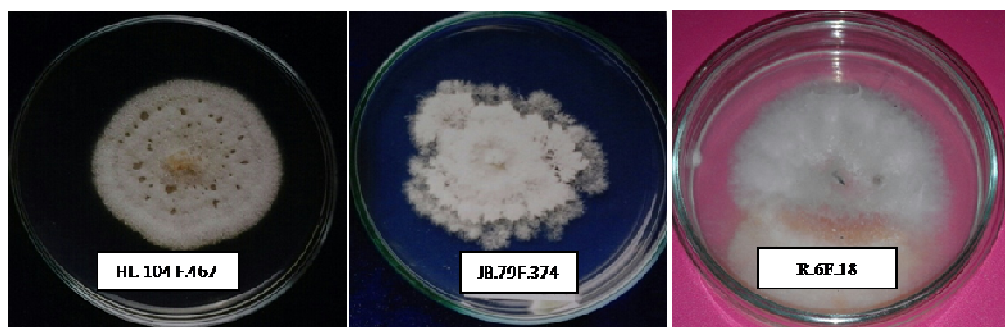
Luas zona bening yang terbentuk pada tiap isolat kapang berbeda, hal ini tergantung dari kemampuan kapang tersebut dalam mensekresikan enzim lipase ke dalam media. Terseleksinya kapang endofit lipolitik ini memberikan informasi bahwa tidak hanya kapang yang berasal dari alam (udara, tanah, air), tetapi yang berasal dari jaringan tanaman pun mampu menghasilkan enzim lipase. Selain itu, kapang *Aspergillus niger* yang diisolasi dari kopra juga diketahui mampu menghasilkan lipase (Indah *et al.*, 2007). Isolat kapang endofit yang bersifat lipolitik dari hasil penelitian dapat menjadi informasi tambahan bahwa isolat tersebut juga mampu menghasilkan lipase.

Tiga isolat kapang pada penelitian ini yaitu JB.79F.374, R.6F.18 dan HL.104F.467 dipakai sebagai inokulum dalam produksi lipase karena ketiga isolat tersebut menghasilkan zona bening yang luas (Tabel 1). Isolat kapang tersebut mengeluarkan enzim lipase secara berlebih ke dalam media. Hasil berupa enzim lipase secara berlebih diharapkan pada medium ampas kelapa dari ketiga isolat tersebut.

Meskipun ketiga isolat kapang tersebut mampu menghasilkan enzim lipase, tetapi isolat-isolat kapang endofit tersebut berbeda dalam hal morfologi (Gambar 2), asal tanaman dan daerah pengambilan sampelnya. Isolat HL.104F.467 merupakan kapang yang diisolasi dari tanaman *Knema cinerea* (Poir.) Warb asal Gunung Halimun, JB.79F.374 diisolasi dari tanaman *Chisocheton patens* Blume (Jambi) dan R.6F.18 diisolasi dari tanaman *Pimelodendron griffillin* (Riau). Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dari kapang endofit hasil isolasi dan koleksi Pusat Penelitian Bioteknologi untuk melengkapi data koleksi kapang endofit tersebut.

Tabel 1. Enam isolat endofit bersifat lipolitik (hasil seleksi dari 20 isolat endofit) yang diinkubasi selama 72 jam.

No	Kode Isolat	Tanaman (Tempat/lokasi)	Luas zona jernih (cm <sup>2</sup> )
1	R.6F.18	<i>Pimelodendron griffillin</i> ( Riau)	7,54
2	HL.103F.463	<i>Begonia robusta</i> Blume (Gunung Halimun)	4,70
3	HL.104F.467	<i>Knema cinerea</i> (Poir.) Warb. (Gunung Halimun)	6,20
4	JB.79F.374	<i>Chisocheton patens</i> Blume ( Jambi)	7,94
5	JB.82F.398	<i>Ixonanthes icosandra</i> Jack (Jambi)	4,03
6	JB.82F.402	<i>Ixonanthes icosandra</i> Jack (Jambi)	2,17



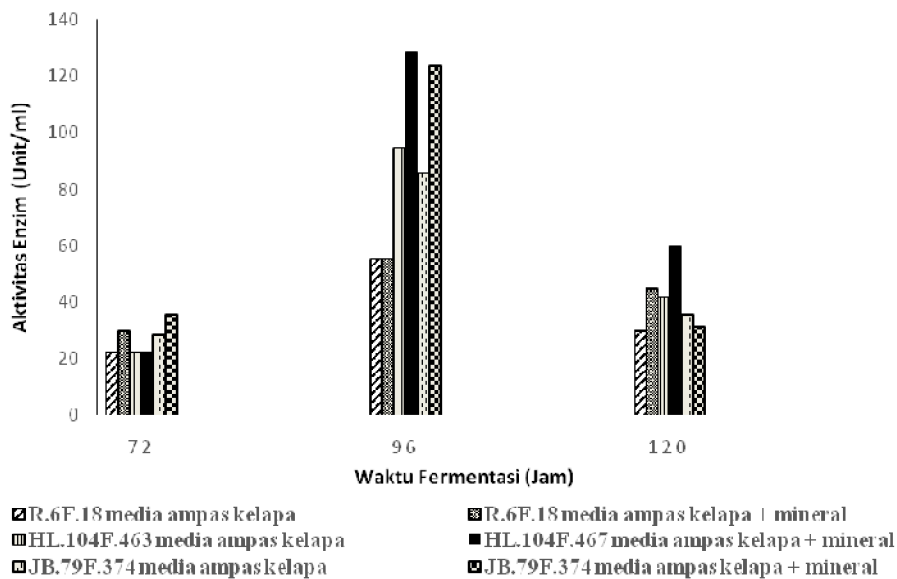
Gambar 2. Penampilan morfologi ketiga isolat kapang endofit pada media PDA

### Fermentasi Ampas Kelapa untuk Produksi Lipase

Ampas kelapa merupakan limbah pertanian yang cukup berlimpah dan masih belum banyak dimanfaatkan untuk keperluan industri. Menurut Lukose (2013), ampas kelapa mengandung gula, mineral, asam amino, vitamin dan lain sebagainya. Menurut Patrik (2018), kandungan minyak dalam ampas kelapa berkisar 12,2-15,9%. Sementara Marquez (1997) melaporkan bahwa dalam tepung ampas kelapa mengandung lemak 9,2%, protein 12,6%, serat 13%, abu 8,2%, karbohidrat 39,1% dan air 4,2%. Kandungan nutrisi pada ampas kelapa tersebut diharapkan dapat digunakan untuk pertumbuhan kapang sekaligus untuk menghasilkan enzim lipase.

Ketiga isolat kapang endofit yang diuji diketahui mampu menghasilkan enzim lipase dari ampas kelapa. Aktivitas

enzim tertinggi diperoleh pada waktu fermentasi 96 jam (Gambar 3) dengan aktivitas enzim tertinggi diperoleh pada kapang HL.104F.467 sebesar 128,39  $\mu\text{mol/mL}$  (1,069 unit/mL) pada media ampas kelapa yang ditambah mineral. Aktivitas tertinggi kedua dihasilkan oleh kapang JB.79F.374 sebesar 123,83  $\mu\text{mol/mL}$  (1,032 unit/mL); dan ketiga pada isolat kapang R.6F.18 dengan aktivitas sebesar 55,46  $\mu\text{mol/mL}$  (0,462 unit/mL) pada komposisi media yang sama (ampas kelapa ditambah mineral). Aktivitas enzim lipase yang dihasilkan ini masih lebih kecil bila dibandingkan dengan aktivitas enzim yang dihasilkan oleh kapang *Aspergillus niger* yang mampu menghasilkan aktivitas tertinggi pada 1.81 (unit/mL) pada medium dan waktu fermentasi yang sama (Kurniawan *et al.*, 2016).



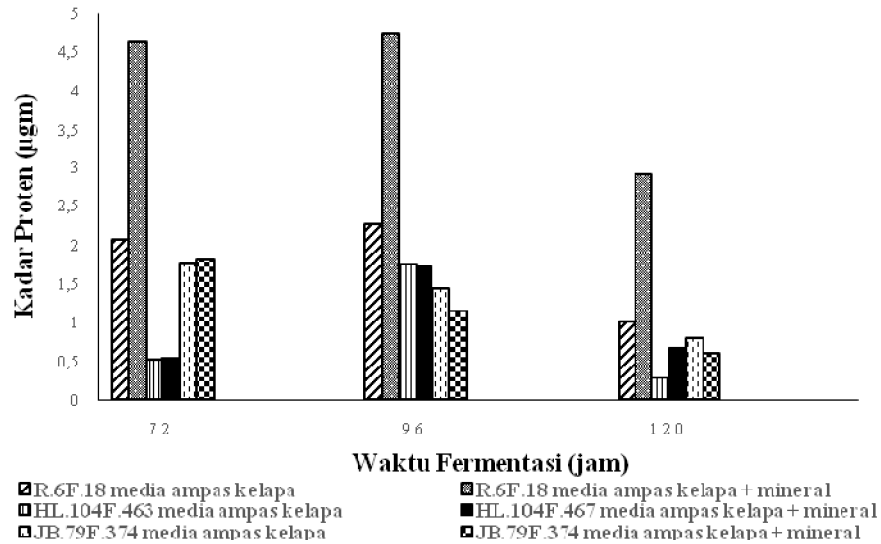
Gambar 3. Aktivitas enzim dari tiga isolat kapang endofit potensial selama fermentasi 72-120 jam

Hasil pengukuran kadar protein dari ketiga isolat kapang menunjukkan bahwa kadar protein tertinggi yang diperoleh adalah sebesar 2,26 mg/mL oleh kapang R.6F.18 pada media ampas kelapa dengan penambahan mineral dan waktu fermentasi 96 jam (Gambar 4). Kadar protein menurun saat inkubasi pada 120 jam untuk semua perlakuan. Pola ini sejalan dengan pola aktivitas enzim yang menurun pada

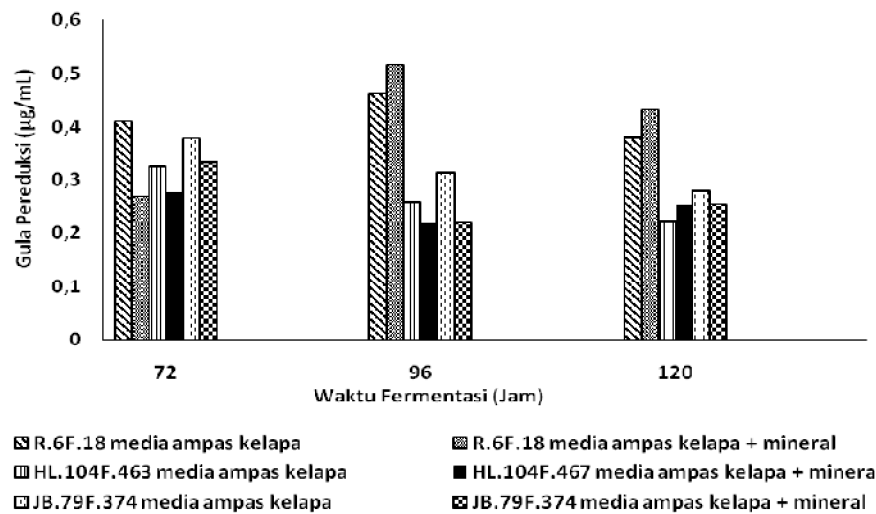
inkubasi 120 jam. Hal ini terjadi karena senyawa organik kompleks terurai menjadi senyawa yang lebih sederhana (Winarno *et al.*, 1984 dan Madigan *et al.*, 2011). Selanjutnya, hasil pengujian gula pereduksi memperlihatkan bahwa kapang R.6F.18 menghasilkan gula pereduksi tertinggi baik pada media ampas kelapa saja maupun yang di tambah mineral dengan waktu fermentasi selama 96 jam

(Gambar 5). Sementara itu pada kapang HL.104F.467 dan kapang JB.79F.374 terjadi penurunan gula pereduksi. Hal ini

diduga karena gula yang dihasilkan kembali digunakan oleh kapang tersebut untuk proses metabolismenya.



Gambar 4. Kadar protein dari tiga isolat kapang endofit potensial selama fermentasi.



Gambar 5. Gula pereduksi dari ketiga isolat kapang endofit potensial selama fermentasi.

Pengendapan enzim dilakukan dengan menggunakan ammonium sulfat teknis pada 80% saturasi terhadap aktivitas enzim tertinggi dari ketiga isolat kapang tersebut. Penggunaan amonium sulfat umumnya dipakai untuk pemurnian enzim (purifikasi enzim) (Matthews *et al.*, 1997). Hal ini karena ammonium sulfat mempunyai sifat sangat larut, murah, memiliki tingkat kemurnian tinggi dan

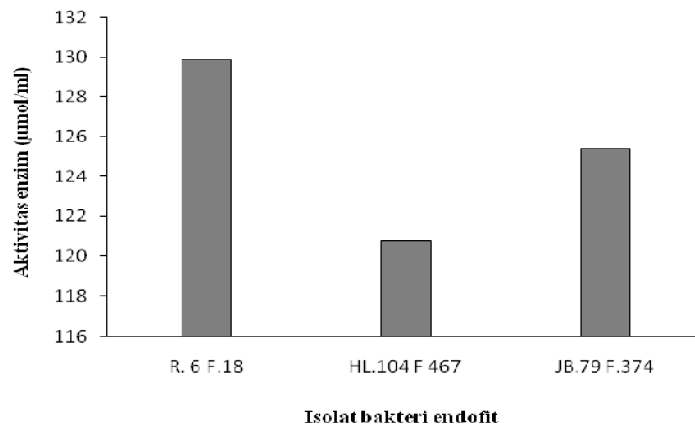
tidak merubah pH larutan protein sampel (Pelszar & Chan, 1981). Selain itu, penggunaan ammonium sulfat teknis 80% saturasi pada pengendapan enzim amilase diketahui dapat memberikan hasil aktivitas enzim tertinggi (Melliawati dan Nuryati, 2018).

Pengendapan *crude enzyme* dari isolat kapang endofit R.6F.18 dapat meningkatkan aktivitas enzim lipase

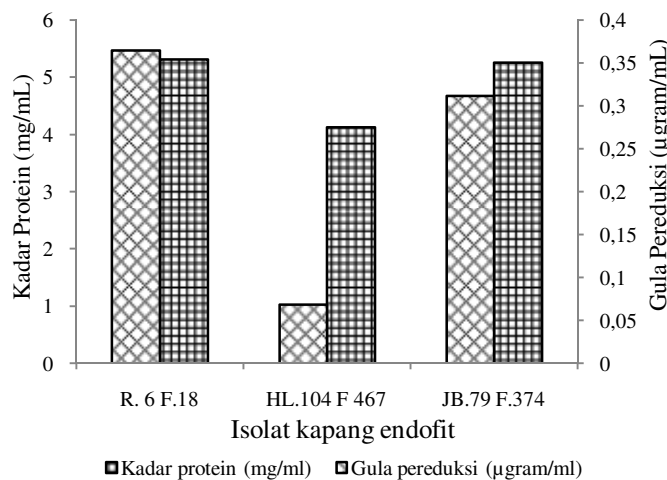
menjadi 2,3 kali lebih besar yaitu menjadi 129,91  $\mu\text{mol/mL}$  (Gambar 6). Sementara itu untuk kedua isolat (HL.104F.467 dan JB.79F.374) hasilnya tidak berbeda nyata. Hal ini kemungkinan karena enzim dari kedua isolat tersebut mengalami presipitasi oleh garam-garam anorganik konsentrasi tinggi (ammonium sulfat) (Pelczar dan Chan,1981), sehingga konsentrasi ammonium sulfat 80% yang digunakan untuk pengendapan enzim dari kedua isolat tersebut masih kurang tepat.

Hasil pengukuran kadar gula pereduksi dan kadar protein dari enzim

hasil pengendapan menunjukkan bahwa terlihat perbedaan nyata diantara ketiga isolat untuk gula pereduksi yang dihasilkan, sedangkan untuk kadar protein tidak berbeda nyata (Gambar 7). Umumnya gula pereduksi berhubungan erat dengan aktivitas enzim, yakni semakin tinggi aktivitas enzim maka semakin tinggi gula pereduksi yang dihasilkan (Lehninger, 1982). Isolat kapang R.6F.18 diketahui menghasilkan gula pereduksi tertinggi, demikian juga aktivitas enzim yang dihasilkannya (Gambar 6 dan 7).



Gambar 6. Aktivitas enzim lipase dari ketiga isolat kapang endofit potensial (hasil pemekatan dengan ammonium sulfat 80% saturasi).



Gambar 7. Gula pereduksi dan kadar protein dari ketiga isolat kapang endofit potensial (hasil pemekatan dengan ammonium sulfat 80% saturasi)



Terbentuknya gula pereduksi merupakan hasil dari proses fermentasi. Uji TLC dilakukan untuk mengetahui jenis gula yang dihasilkan oleh ketiga isolat kapang tersebut. TLC (*Thin Layer Chromatography*) merupakan suatu teknik kromatografi untuk memisahkan campuran/senyawa yang tidak volatil, TLC dapat mengidentifikasi senyawa yang terdapat dalam sampel.

Hasil TLC menunjukkan bahwa ketiga sampel memperlihatkan noda yang berbeda nilai Rf-nya. Sampel B1 (R.6F.18) dan B2 (HL.104F.467) masing-masing memperlihatkan 4 noda dan 3 noda. Satu diantaranya, nilai Rf nya sama dengan nilai Rf galaktosa dan noda yang lainnya tidak termasuk dalam gula standar. Sementara B3 (JB. F.374) terdapat 3 noda yang nilai Rf nya tidak termasuk pada nilai Rf gula standar (Tabel2). Sayangnya, noda selain galaktosa belum dapat diidentifikasi karena keterbatasan penggunaan standar gula lainnya pada TLC.

Tabel 2. Hasil TLC dari 3 sampel (*crude enzyme*) isolat kapang endofit potensial

No.	Keterangan	Nilai Rf	Dugaan senyawa
1	Manosa	0,675	
2	Arabinosa	0,637	
3	Galaktosa	0,575	
4	Laktosa	0,275	
		0,594	-
B1	Sampel R.6F.18	0,575	Galaktosa
		0,413	-
		0,325	-
		0,575	Galaktosa
B2	Sampel HL.104F.467	0,413	-
		0,325	-
		0,550	-
B3	Sampel JB.79F.374	0,425	-
		0,313	-
5	Maltosa	0,525	-
6	Sukrosa	0,563	-
7	Glukosa	0,363	-
8	Fruktosa	0,625	-

Hasil TLC dapat memberi gambaran bahwa gula hasil fermentasi dari ketiga isolat kapang tersebut menghasilkan jenis gula galaktosa dan senyawa lainnya. Galaktosa merupakan karbohidrat yang tergolong dalam monosakarida, termasuk

juga golongan heksosa. Galaktosa merupakan pecahan dari laktosa (Winarno *et al.*, 1980). Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengetahui jenis gula atau senyawa yang lain yang lebih spesifik.

#### 4. KESIMPULAN

Terdapat enam isolat dari duapuluh isolat kapang terseleksi yang diketahui mampu menghasilkan enzim lipase. Tiga isolat kapang endofit menghasilkan zona bening yang luas (HL.104F.467, JB.79F.374 dan R.6F.18) dengan aktivitas lipase masing-masing sebesar 128,39  $\mu\text{mol/mL}$ , 123,83  $\mu\text{mol/mL}$  dan 55,46  $\mu\text{mol/mL}$  pada media ampas kelapa yang ditambah mineral dan difermentasi selama 96 jam. Pengendapan dengan ammonium sulfat 80% dapat meningkatkan aktivitas enzim lipase 2,3 kali lebih besar pada isolat kapang R.6F.18. Hasil TLC menunjukkan adanya galaktosa dari hasil fermentasi kapang isolat JB.79F.374 dan R.6F.18, juga senyawa/ gula lain diluar gula standar.

#### UCAPAN TERIMA KASIH.

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dr. Yopi sebagai kepala laboratorium biokatalis dan fermentasi yang telah memberi kesempatan untuk melakukan penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Adio, O. Q., Sarafdeen. O, K., Michael. B. O., & Adebukola. M. O. (2015). Production of lipases in solid-state fermentation by *aspergillus niger* F7-02 with agricultural residues. *J Microbiol Biotech Food Sci.* 4 (6), 509-512.
- Aulia, A. (2014). Penapisan dan pemanfaatan kapang endofit dalam pembuatan bioetanol dari limbah pengolahan agar agar. Tesis. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Azizah, N. N. (2008). Isolasi dan identifikasi jamur endofit dari daun jambu biji (*psidium guajava* l.) penghasil antibakteri terhadap bakteri *escherichia coli* dan *staphylococcus aureus*. Skripsi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.

- Balaji, V., & Ebenezer, P. (2008). Optimization of extracellular lipase production in *Colletotrichum gloeosporioides* by solid state fermentation. *Indian Journal of Science and Technology*. 1,1-8.
- Clausen, K., Christensen, M.W., Budolfson, G., Spendler, T., Deussesn, H.J, Svendsen, A., Borch, K., Patkar, S.A. (2000). Lipolytic enzymes in industrial applications. *Biochem*. 42,35-47.
- Dinas Perkebunan Propinsi Sumatera Barat. (2008). *Statistik Dinas Perkebunan Propinsi Sumatera Barat*. Padang: Dinas Perkebunan Propinsi Sumatera Barat.
- Hanson, R. S, & Philips, J. A. (1981). Manual of methods for general bacteriology. *American Society for Microbiol*. pp. 359-360.
- Iftikhar, T., Mubashir, N., Muhammad, A. Z., Ikram, U. H. (2010). Production of extracellular lipases by rhizopus oligosporus in a stirred fermentor. *Brazilian Journal of Microbiology*. 1124-1132.
- Iftikhar, T., Mubashir, N., Rukhsana, J., & Ikram, U. H. (2011). Purification And Characterization Of Extracellular Lipases. *Pak. J. Bot.*, 43(3), 1541-1545.
- Indah., Mappiratu., Musafira. (2017). Produksi enzim lipase dari *Aspergillus niger* isolat kapang kopra dengan menggunakan medium kelapa parut. *Jurnal Riset Kimia. Kovalen* 3(3), 269-276.
- Jaeger, K.E., Steinbuchel, A., Jendrossek, D. (1995). Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases: bacterial lipases hydrolyze poly-(5-Hydroxyalkanoates). *Applied and Environmental Microbiology*. 61,3113-3118.
- Kaewthong, W., Sirisansaneeyakul, S., Prasertsan, P., & Aran, H. (2005). Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. *Process Biochemistry*, 40(5), 1525-1530.
- Kurniawan, H., R. Utomo & L.M. Yusiati. (2016). Kualitas nutrisi ampas kelapa (*Cocos nucifera* L.) fermentasi menggunakan *Aspergillus niger*. *Buletin Peternakan* Vol. 40 (1), 26-33.
- Kurnia, D. R. D. (2010). Studi aktivitas enzim lipase dari *Aspergillus niger* sebagai biokatalis pada proses gliserolisis untuk menghasilkan monoasilgliserol. Tesis. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Lehninger, A.L. (1982). *Dasar-dasar biokimia Jilid 1*. Jakarta: Erlangga.
- Liu, Y. & Jonathan, Y. C. (2016). Enzyme immobilization on cellulose matrixes. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 1-15.
- Lukose, R. Ml. (2013). The chemical composition of tender coconut (*cocos nucifera* l.) water and coconut meat and their biological effect in human body. *International Journal of Green and Herbal Chemistry*. 2 (3), 723-729.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Stahl D.A., Clark D.P. (2011). *Biology of microorganism*. 13th ed. San Francisco: Bunjamin Cumming.
- Maehara, S., Simanjuntak, P., Kitamura, C., Ohashik., & Shibuya, H. (2011). Cinchona alkaloids are also produced by an endophytic filamentous fungus living in cinchona plant. *Chem Pharm Bull*. 59(8), 1073-1074.
- Marquez, P.O. (1999). Nutritional advantages of Philippine coconut flour. *Coconut Farmers Buletin*. 4,1-7.
- Matthews, H.R., Freedland, R.A., & Miesfeed, R.L. (1997). *Biochemistry a short course*. Chichester: John Wiley & Son, INC.
- Melliawati, R dan Nuryati. (2018). Seleksi limbah pertanian untuk produksi enzim amylase oleh *Neurospora crassa* InaCC 226. *Prosiding Seminar Nasional Biologi (SEMABIO)*. *Biodiversitas : Penelitian, Pembelajaran dan Penerapannya dalam Pengelolaan Lingkungan*. (pp. 440-447). Bandung: Universitas Islam Negeri Sunan Gunung Djati.
- Melliawati, R., Suherman, R.S. & Bambang, S. 2006. Pengkajian kapang endofit dari taman nasional gunung halimun sebagai penghasil glukamilase. *Berkala Penelitian Hayati (Journal of Biological Researches)* 12(1), 19-25.

- Meri, Y., Widya, E., Tarsono, T., M. Alfian R. (2015). Pemanfaatan ampas kelapa sebagai bahan baku tepung kelapa tinggi serat dengan metode *freeze drying*. *Jurnal Integrasi Proses*. Vol 5(2),101-107.
- Nelson, N.(1941). A photometric adaption of the somogi method for the determination of glucose. *Jurnal Biol. Chem.* 153(2), 375-379
- Patrik, M. P. (2018). Pemanfaatan ampas kelapa (*cocos nucifera*) untuk pembuatan biodiesel. *Buletin Palma*. 35(2008). Diambil dari <http://ejurnal.litbang.pertanian.go.id/index.php/palma/article/view/8321>.
- Pelczar M. J. & Chan, Jr., E. C. S. (1981). *Elements of microbiology* [Dasar-Dasar mikrobiologi jilid I]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Puri, E. (2011). *Pengaruh penambahan ampas kelapa hasil fermentasi aspergillus oryzae dalam pakan komersil terhadap pertumbuhan ikan nila (Oreochromis niloticus)*. Skripsi. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Putri, M. F. (2010). Tepung ampas kelapa pada umur panen 11-12 bulan sebagai bahan pangan sumber kesehatan. *Jurnal Kompetensi Teknik* 1, 97- 105.
- Simanjuntak, P., Bustanussalam, Prana, T. K., Ohashi, K., & Shibuya, H. (2002). Production Of Quinine Alkaloid By Some Endophytic Microbes With Addition Of Inducer Substances [Studies on Endophytic Microbes of *Cinchona* sp. plants (2)]. *Majalah Farmasi Indonesia*,13(1), 1-6.
- Sudha, V., Ramar. G., Kathirvelu, B., Naif, A. A; Veeramuthu, D. (2016). Biological properties of Endophytic Fungi. *Braz. arch. biol. technol.* 59,1-7.
- Sukara. E. (1987). *Production of single cell protein from cassava by microfungi*. Thesis. University of Queensland, Queensland.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, C.U. (2001). Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnol. Advan.* 19, 627-662.
- Treichel, H., Debora, de. O., Marcio.A. M., Marco Di. L., Oliveira, J.V. (2010). A Review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol.* 3,182-196
- Vecchia, R. D., Damianni, S., Maria,da.G. & Valdir.S. (2005) Carboxymethylcellulose and poly (vinyl alcohol) used as a film support for lipases immobilization. *Process Biochemistry*. 2677–2682.
- Winarno, E. K. (2006). Produksi alkaloid oleh mikroba endofit yang diisolasi dari batang kina *Cinchona ledgeriana* Moens dan *Cinchona Pubescens* Vahl (*Rubiaceae*). *Jurnal Kimia Indonesia*. 1(2), 59-66.
- Winarno, F.G., Srikandi F., Dedi F. (1980). *Pengantar teknologi pangan*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Winarno, F. G. (1984). *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.