

ABSTRAK

EKSPLORASI, PEMURNIAN, DAN KARAKTERISASI LIPASE TERMOSTABIL DAN TOLERAN ALKOHOL DARI ISOLAT KOMPOS

Oleh
Syifa Fakhomah Syihab
NIM: 30512013
(Program Studi Doktor Kimia)

Lipase merupakan salah satu enzim hidrolase yang banyak digunakan sebagai biokatalis dalam industri diantaranya, sintesis senyawa ester (*flavor*), industri makanan, industri minyak dan lemak, serta sintesis biopolimer dan biodiesel. Kemampuan lipase untuk mengkatalisis reaksi transesterifikasi dapat dimanfaatkan dalam sintesis biodiesel. Penggunaan lipase sebagai katalis biodiesel membutuhkan lipase yang bersifat termostabil dan toleran terhadap alkohol. Eksplorasi lipase dari berbagai sumber di alam dilakukan untuk memperoleh lipase dengan karakteristik yang khas. Salah satu sumber lingkungan yang unik dan belum banyak dikaji adalah kompos. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan koleksi bakteri dan enzim lipase yang bersifat termostabil yang toleran terhadap alkohol.

Penelitian ini menggunakan sampel kompos yang diambil pada fase termofilik (72 °C) sebagai sumber untuk memperoleh isolat bakteri penghasil lipase yang bersifat toleran alkohol. Identifikasi jenis bakteri dilakukan menggunakan analisis morfologi dan homologinya dengan analisis filogenetik. Produksi lipase dilakukan dalam media modifikasi kompos pada suhu 55 °C. Ekstrak kasar enzim dimurnikan secara parsial menggunakan fraksinasi ammonium sulfat atau aseton. Pemurnian selanjutnya menggunakan kromatografi penukar ion dan gel filtrasi dilakukan terhadap fraksi protein yang memiliki aktivitas spesifik tertinggi. Lipase hasil pemurnian kemudian dikarakterisasi berdasarkan sifat-sifat biokimia dan toleransinya terhadap methanol.

Seleksi terhadap mikroorganisme penghasil lipase menghasilkan lima isolat bakteri yang dinamakan isolat AL17, AL59, AL64, AL89, dan AL96. Hasil seleksi menunjukkan bahwa AL17 mampu tumbuh pada media dengan konsentrasi metanol tertinggi (5%). Optimasi terhadap jenis media dan suhu pertumbuhan menunjukkan bahwa bakteri tumbuh lebih baik pada media modifikasi kompos (MK) dengan suhu 55°C. Hasil optimasi pH menunjukkan bahwa setiap isolat memiliki kesesuaian kondisi pH yang berbeda. Berdasarkan kurva pertumbuhan, diketahui bahwa AL89 memiliki laju pertumbuhan tertinggi dibandingkan isolat lainnya. Ekspresi lipase isolat AL17

hanya terjadi pada fase stasioner akhir, sedangkan keempat isolat lainnya lipase diekspresikan selama fase logaritmik dan terus berlanjut hingga akhir fase stasioner.

Identifikasi morfologi menunjukkan bahwa isolat AL59 merupakan bakteri gram positif dengan bentuk batang, sedangkan keempat isolat lainnya merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang. Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa isolat AL59 memiliki kedekatan sebesar 99% dengan *Brevibacillus thermorubber*, sedangkan keempat isolat lainnya memiliki kedekatan dengan *Pseudoxanthomonas taiwanensis* sebesar 99%.

Produksi enzim dilakukan terhadap kelima isolat bakteri menggunakan media modifikasi kompos pada suhu 55 °C. Pemurnian secara parsial dilakukan terhadap ekstrak kasar enzim dari kelima isolat bakteri menggunakan fraksinasi ammonium sulfat dan aseton. Fraksi protein aseton diketahui memiliki nilai aktivitas spesifik yang lebih tinggi dari fraksi protein ammonium sulfat. Selain itu, fraksinasi aseton mampu mengendapkan protein lipase ke dalam satu fraksi. Karakterisasi awal dilakukan terhadap lipase AL17 dan AL59 meliputi kemampuan transesterifikasi dan toleransi lipase terhadap metanol. Hasil pengujian menunjukkan bahwa lipase dari AL17 memiliki tingkat konversi sebesar 19%, sedangkan AL59 sebesar 13%. Lipase AL17 diketahui masih memiliki aktivitas sebesar 0,84 U pada konsentrasi metanol 30%. Berdasarkan hasil tersebut maka tahap pemurnian selanjutnya dilakukan dengan menggunakan enzim hasil fraksinasi aseton.

Pemurnian menggunakan kromatografi penukar anion dilakukan terhadap fraksi aseton dari AL59 dan AL17. Hasil pemurnian menunjukkan bahwa fraksi aseton dari AL59 memiliki lipase berukuran 55 kDa dengan aktivitas spesifik sebesar 21,854 U/mg, tingkat kemurnian 42,6 kali, dan perolehan sebesar 6%. Sementara itu, fraksi aseton dari AL17 yang dimurnikan dengan kromatografi penukar anion menghasilkan 2 puncak protein, yakni puncak 1 dan 2. Pemurnian lebih lanjut terhadap lipase dari puncak 1 menggunakan kromatografi filtrasi gel menghasilkan protein berukuran 50 kDa dengan aktivitas spesifik sebesar 15,6 U/mg, tingkat kemurnian 28,1 kali, dan perolehan sebesar 33%. Hasil pemurnian terhadap lipase dari puncak 2 juga berhasil memperoleh protein yang berukuran 50 kDa dengan aktivitas spesifik sebesar 26,3 U/mg, tingkat kemurnian 47,3 kali, dan perolehan sebesar 27%. Pada tahapan selanjutnya dilakukan karakterisasi terhadap puncak 1 dan 2 hasil pemurnian gel filtrasi.

Karakterisasi sifat biokimia dilakukan terhadap lipase puncak 1 dan 2. Berdasarkan hasil pengujian diketahui bahwa lipase dari puncak 1 dan puncak 2 memiliki suhu dan pH optimum yang berbeda. Kedua lipase tersebut memiliki kestabilan yang baik pada pelarut berbagai pelarut organik, kecuali pada kloroform. Lipase puncak 2 memiliki spesifitas substrat yang lebih lebar meliputi substrat asam lemak rantai pendek dan panjang (C4-C14), sedangkan lipase puncak 1 spesifitas terhadap substrat *p*-NP Miristat. Berdasarkan hasil karakterisasi dapat dikatakan bahwa lipase puncak 1 merupakan enzim yang berbeda dari lipase puncak 2 karena memiliki karakteristik

yang berbeda. Oleh karena itu, lipase puncak 1 dinamakan Lip1 dan lipase puncak 2 sebagai Lip2.

Lipase dari AL17 dan AL59 telah dimurnikan menggunakan fraksinasi aseton, kromatografi penukar anion dan kromatografi filtrasi gel. Lipase dari AL17 memiliki ukuran 50 kDa sedangkan lipase AL59 berukuran 55 kDa. Karakterisasi terhadap lipase dari AL17 menunjukkan bahwa Lip1 dan Lip2 merupakan enzim yang berbeda. Lipase AL17 diketahui bersifat termostabil, aktif pada berbagai pelarut organik, dan memiliki kemampuan transesterifikasi yang tinggi. Lipase yang diperoleh diharapkan dapat digunakan dalam berbagai bidang industri, terutama yang berkaitan dengan sintesis dalam kondisi non-polar dan berlangsung pada suhu tinggi.

Kata kunci: lipase termostabil, lipase toleran alkohol, kompos, pemurnian lipase.

ABSTRACT

EXPLORATION, PURIFICATION, AND CHARACTERIZATION OF THERMOSTABIL AND ALCOHOL TOLERANT LIPASE FROM COMPOST ISOLATE

By

Syifa Fakhomah Syihab

NIM: 30512013

(Doctoral Study Program of Chemistry)

Lipase is one of the hydrolase enzymes used as biocatalysts in industries, e.g, food, oil and fat industry, synthesis of flavor compounds, biopolymers and biodiesel. The ability of lipase to catalyze transesterification reactions may be utilized in biodiesel synthesis. The use of lipase as biodiesel catalyst requires a thermostable and alcohol tolerant lipase. To meet these criteria, exploration towards thermostable and alcohol tolerant lipase are required. Exploration of lipase from various sources in nature were carried out to obtain lipase with unique characteristics. One of the unique and unexplored environmental sources is compost. The objective of this research is to discover lipase producing bacteria and to isolate thermostable lipase enzymes that are tolerant to alcohol.

Compost samples were used as sources to obtain alcohol tolerant lipase producing bacteria. Sampling was carried out at thermophilic phase of composting (72 °C). Identification of bacteria were carried out using gram staining and ribotyping analysis. Lipase production was performed using modified compost media at 55°C. The crude extract of lipase was partially purified using ammonium sulfate and acetone fractionation. Further purification using ion-exchange chromatography and gel filtration were carried out against the protein fraction with highest specific activity. Subsequently, the result from purified acetone fractionation purification were characterized based on their biochemical properties and tolerance against methanol.

Selection of lipase-producing microorganisms was resulted five isolates, namely as AL17, AL59, AL64, AL89, and AL96 isolates. Screening of methanol tolerant bacteria showed that AL17 isolate able to grow in medium with highest methanol concentration (5%). Moreover, optimization of growth conditions shows that bacteria able to grow better on compost modified medium (MK) at 55 °C. Optimization towards pH of medium shows that each isolate has different compatibility. Growth curve from five isolates showed that AL89 has the highest growth rate among other isolates. Lipase expression from AL17 only occurred at the late of stationary phase, while other isolates express lipase during logarithmic phase and continued until the end of stationary phase.

Morphological identification revealed that AL59 isolate was gram positive bacteria with rod shape, while other isolates were gram-negative and rod-shaped bacteria. The result from phylogenetic analysis showed that AL59 has 99% similar identity with *Brevibacillus thermorubber*, while the other four isolates were identified close to *Pseudoxanthomonas taiwanensis* with similar identity of 99%.

Crude extract enzyme was produced using modified compost medium at 55 °C. Partial purification of the enzyme was carried out using ammonium sulfate and acetone fractionation. The result shows that acetone fractions have higher specific activity and able to precipitate lipase proteins in one fraction. Preliminary characterization showed that lipase from AL17 has higher transesterification activity compared to lipase AL59. Other result showed that lipase AL17 remains active under 30% methanol. Based on these results, further purification was carried out against protein from acetone fraction.

Further purification by ion exchange chromatographic were performed towards acetone fraction from AL59 and AL17. The result showed that acetone fraction from AL59 has protein with the size of 55 kDa with specific activity of 21,854 U/mg, 42,6 purification fold, and 6% yield. Meanwhile acetone fraction from AL17 showed 2 peaks from anion exchange chromatography, i.e. first and second peak. Further purification of first peak by gel filtration chromatography managed to isolate 50 kDa lipase with specific activity of 15,6 U/mg, 28,1 purification fold, and 33% yield, meanwhile lipase from second peak also has 50 kDa lipase with specific activity of 26,3 U/mg, 47,3 purification fold, and 27 % yield. The enzymes purified from gel filtration were further characterized.

Biochemical characterization was carried out against lipase from gel filtration chromatography. The result showed that lipase from the first peak have different temperature and pH optimum from second peak. Both enzymes have good stability in various organic solvents, except in chloroform. Lipase from second peak showed activity towards short and long fatty acid chain substrate (C4-C14), whereas lipase from first peak shows specificity towards *p*-NP myristate. Based on the results, we suggested that first peak is a different lipase from peak 2, since it has different characteristic. Since, the enzymes were different type of lipase, therefore first peak was namely as Lip1 and second peak as Lip2.

Acetone fractionation, anion exchange, and gel filtration chromatography were used to purify lipase from AL17 and AL59. Lipase from AL59 has the size of 55 kDa, while AL17 lipase has the size of 50 kDa. Characterization of lipase from AL17 showed that Lip1 were different enzyme from Lip2. AL17 lipase showed thermostability, solvent tolerant and has high transesterification activity. The isolated lipase was expected to be used in a various industrial field, especially those related to synthesis in non-polar environment and high temperatures.

Keywords: thermostable lipase, alcohol tolerant lipase, compost, lipase purification.