

## Skrining Bakteri-Bakteri Isolat Lokal Sebagai Penghasil Lipase Toleran Pelarut Organik

Qonitah Nurul Husna<sup>1)</sup>, Nurhasanah<sup>\*2)</sup>, Aspita Laila<sup>2)</sup>

<sup>1</sup>Grup penelitian lipase, Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, FMIPA,  
Universitas Lampung

<sup>2</sup>Staf Dosen Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Lampung

Email correspondence: [\\*nur.hasanah@fmipa.unila.ac.id](mailto:nur.hasanah@fmipa.unila.ac.id)

Dikirim: 25-03-2022, Diterima: 25-04-2022, Diterbitkan: 02-05-2022

---

### Abstrak

Lipase adalah enzim hidrolase yang mengkatalisis hidrolisis lipid (triasilgliserol) menjadi gliserol dan asam lemak bebas. Lipase juga memiliki kemampuan sebagai katalis dalam reaksi hidrolisis ester, transesterifikasi, alkoholisis dan asidolisis. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri isolat lokal penghasil lipase yang toleran terhadap pelarut organik. Metode yang digunakan meliputi skrining bakteri-bakteri isolat lokal pada media dengan penambahan pelarut organik (metanol, heksana dan benzena) dan uji kualitatif lipase dengan metode *plate-assay* menggunakan indikator metil merah. Hasil skrining terhadap 5 isolat bakteri lokal kompos mesofilik (LKM) yang diseleksi dalam pelarut organik menunjukkan adanya zona bening dengan ukuran 20 mm untuk isolat LKMA3 dan 24 mm untuk isolat LKMC2 pada pelarut benzena. Isolat LKMD1 menunjukkan zona bening 25 mm pada pelarut heksana, sedangkan isolat LKMD4 tidak menunjukkan zona bening pada ketiga pelarut. Bakteri isolat LKMG1 menunjukkan zona bening pada methanol, heksana dan benzena berturut-turut sebesar 20 mm, 20 mm dan 24 mm. Uji variasi konsentrasi tiga jenis pelarut organik pada isolat LKMG1 memperlihatkan toleransi yang relatif lebih baik pada penambahan heksana 3% dengan zona bening sekitar 26 mm. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa bakteri isolat LKMG1 merupakan isolat yang relatif lebih baik untuk menghasilkan lipase toleran dalam pelarut organik dibandingkan empat isolat lainnya.

**Kata kunci :** bakteri lokal; lipase; metode *plate-assay*; pelarut organik

---

### Abstract

Lipase is a hydrolase enzyme that catalyzes the hydrolysis of lipids (triacylglycerol) into glycerol and free fatty acids. In addition, lipase has ability as a catalyst in the reaction of ester hydrolysis, transesterification, alcoholysis and acidolysis. This study aims to obtain local isolate of lipase-producing bacteria that is tolerant of organic solvents. The methods used including screening of local mesophilic compost (LKM) isolate bacteria on media with the addition of organic solvents (methanol, hexane and benzene) and qualitative lipase test using plate-assay method with methyl red indicator. The result of screening from five local bacterial isolates selected organic solvents showed a clear zone with a size of 20 mm for LKMA3 isolate and 24 mm for LKMC2 isolate in

benzene. The LKMD1 isolate showed a clear zone with a size of 25 mm in hexane, while the LKMD4 isolate did not show a clear zone in the three solvents. Isolate LKMG1 bacterial showed clear zones in methanol, hexane and benzene of 20 mm, 20 mm and 24 mm, respectively. The concentration variation test of three types of organic solvents on LKMG1 isolates showed a relatively better tolerance for the addition of 3% hexane with a clear zone about 26 mm. Based on these results, it can be concluded that the bacterial isolate LKMG1 was a relatively better isolate to produce lipase tolerant in organic solvents than the other four isolates.

**Keywords: local bacteria; lipase; plate-assay method; organic solvent**

---

## 1. Pendahuluan

Lipase (Lipase, EC 3.1.1.3) adalah salah satu jenis khusus dari enzim trigliserida hidrolase yang tidak hanya dapat menjadi katalis pada reaksi-reaksi hidrolisis trigliserida menjadi asam lemak dan gliserol, namun juga pada reaksi hidrolisis ester, transesterifikasi dan esterifikasi[1]. Lipase banyak digunakan sebagai biokatalis dalam proses-proses industri seperti dalam sintesis senyawa ester, industri minyak dan lemak, industri makanan serta dalam sintesis biopolimer dan biodiesel[2]. Lipase banyak digunakan dalam industri, seperti pada sintesis obat-obatan, industri makanan, detergen dan kosmetik karena kemampuannya yang dapat mengatalisis secara spesifik[1].

Permasalahan yang timbul seiring dengan kebutuhan lipase toleran pelarut organik yaitu lipase dapat dengan mudah inaktif dengan adanya kehadiran pelarut organik. Untuk memperoleh enzim yang stabil terhadap pelarut organik, beberapa peneliti melakukan modifikasi terhadap struktur enzim agar dapat sesuai untuk digunakan dalam reaksi yang melibatkan pelarut organik. Meskipun begitu, melakukan skrining terhadap bakteri langsung dengan pelarut organik lebih menguntungkan, sebab biaya modifikasi jauh lebih mahal dibandingkan melakukan skrining[3].

Sampai saat ini banyak bakteri penghasil lipase yang berhasil diisolasi dari alam seperti lipase dari bakteri yang diisolasi dari tanah terkontaminasi minyak di Pasar Anyar Singaraja Bali menunjukkan stabilitas yang baik dalam pelarut organik polar (metanol dan etanol) maupun pelarut non polar (n-heksana)[4]. Bakteri dari sumber sisa minyak pada dapur diketahui memiliki aktivitas lipolitik pada berbagai pelarut organik seperti metanol, etanol, butanol dan asetonitril hingga konsentrasi 4%[5]. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat kemungkinan potensi kehadiran lipase yang toleran terhadap pelarut organik di lingkungan lain seperti dari proses pengomposan.

Studi awal telah dilakukan terhadap beberapa isolat bakteri lokal yang diperoleh dari proses pengomposan limbah domestik, diketahui bahwa isolat-isolat ini memiliki aktivitas lipolitik yaitu isolat LKMG1, LKMA3, LKMD4, LKMC2 dan LKMD1 dengan aktivitas unit masing-masing secara berturut-turut 0,1666 U/mL, 0,1666 U/mL, 0,125 U/mL, 0,0416 U/mL, dan 0,0416 U/mL[6]. Namun ketahanan isolat-isolat tersebut terhadap pelarut organik belum dilaporkan. Berdasarkan uraian di atas, pada penelitian ini dilakukan skrining bakteri-bakteri isolat lokal asal pengomposan limbah domestik terhadap pelarut organik. Selanjutnya, isolat terpilih diuji ketahanannya terhadap berbagai konsentrasi pelarut organik.

## 2. Metode Penelitian

### 2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Laminar Air Flow (LAF)*, *shaker incubator*, cawan petri, dan jarum ose. Bahan yang digunakan adalah lima isolat lokal dari pengomposan limbah domestik, metanol, benzena, n-heksana, media pertumbuhan *nutrient broth*, metil merah dan tween 80.

### 2.2 Prosedur Kerja

#### 2.2.1 Skrining

Isolat lokal ditumbuhkan pada *nutrient broth* yang ditambahkan pelarut organik metanol, benzena dan n-heksana konsentrasi 1%, diinkubasi pada suhu ruang dengan *shaker incubator* selama 48 jam dan diuji aktivitas lipolitiknya secara kualitatif dengan metode *plate assay*.

#### 2.2.2 Variasi Konsentrasi Pelarut Organik

Isolat terpilih dari hasil skrining ditumbuhkan secara aseptis dalam media NB steril yang telah ditambahkan pelarut organik (metanol, benzena, dan n-heksana) dengan variasi konsentrasi 1%, 3% dan 5%. diinkubasi pada suhu ruang dengan *shaker incubator* selama 48 jam dan diuji aktivitas lipolitiknya secara kualitatif dengan metode *plate assay*.

#### 2.2.3 Uji Kualitatif Aktivitas Lipolitik

Kultur bakteri disentrifugasi 15 menit dan supernatan yang dihasilkan diuji aktivitas lipolitiknya menggunakan media selektif dengan sumuran. Substrat yang digunakan adalah tween 80 dengan indikator metil merah. Pada media dibuat sumur dengan diameter  $\pm 1$  cm, lalu diisi dengan supernatan dan diinkubasi selama 90 jam. Uji aktivitas lipolitik terdeteksi dengan munculnya zona bening pada sekitar sumur yang menunjukkan adanya aktivitas lipase[7].

### 3. Hasil dan Pembahasan

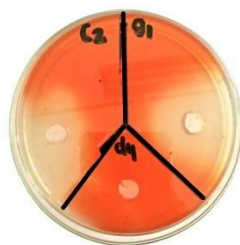
#### 3.1. Skrining

Pada penelitian ini, terdapat 5 isolat bakteri yang digunakan untuk mengetahui kemampuan toleransinya terhadap pelarut organik. Isolat bakteri ini berasal dari pengomposan limbah domestik pada fase mesofilik yaitu LKMG1, LKMA3 dan LKMD1 yang berasal dari fase mesofilik awal serta LKMC2 dan LKMD4 yang berasal dari fase mesofilik akhir[6]. Adapun kelima isolat itu dipilih karena diketahui memiliki aktivitas lipase dengan nilai aktivitas unit masing masing secara berturut-turut 0,1666 U/mL, 0,1666 U/mL, 0,0416 U/mL, 0,0416 U/mL, dan 0,125 U/mL.

Skrining dilakukan dengan menguji aktivitas lipolitik dari isolat-isolat lokal asal pengomposan limbah domestik yang ditumbuhkan pada media dengan pelarut organik konsentrasi 1% secara kualitatif menggunakan metode *plate-assay* dengan indikator metil merah dan substrat tween 80[7]. Apabila mikroorganisme memiliki aktivitas lipolitik, maka tween 80 akan terhidrolisis dan menghasilkan asam-asam lemak pada media agar, yang akan terdeteksi penurunan pH-nya dengan perubahan warna dari merah menjadi tidak berwarna oleh indikator metil merah (MM). Aktivitas lipolitik diketahui dari zona bening yang terbentuk, berikut hasil uji kualitatif yang dilakukan disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1 Hasil uji kualitatif pada skrining bakteri toleran pelarut organik

Kode Isolat	Diameter Zona Bening (mm)		
	Metanol	<i>n</i> -Heksana	Benzena
LKMA3	-	-	20
LKMC2	-	-	24
LKMD1	-	25	-
LKMD4	-	-	-
LKMG1	20	20	24



**Gambar 1. Hasil uji lipolitik metode *plate-assay* isolat dengan penambahan benzena 1%**

Pada Tabel 1 dan Gambar 1 dapat disimpulkan bahwa LKMD4 tidak *n*-heksana memiliki aktivitas lipolitik atau kehilangan aktivitas lipolitiknya dengan penambahan pelarut organik metanol, *n*-heksana dan benzena. Begitu pula pada isolat LKMA3 dan LKMC2 yang tidak memiliki aktivitas dengan penambahan metanol dan *n*-heksana serta LKMD1 yang tidak memiliki aktivitas dengan penambahan pelarut organik metanol dan benzena. Sedangkan, hasil positif yang didapatkan dari isolat LKMC2 dan LKMA3 pada , isolat LKMD1 pada benzena, dan isolat LKMG1 pada ketiga pelarut yang digunakan.

Hasil yang didapatkan dipengaruhi oleh kemampuan adaptasi sel terhadap lingkungan pertumbuhannya. Ketika suatu bakteri ditumbuhkan pada media mengandung pelarut organik maka pelarut organik tersebut akan langsung mengenai pada membran sel bakteri. Membran sitoplasma sel bakteri merupakan lapisan ganda fosfolipid dan matriks yang mengandung berbagai macam enzim dan transpor protein. Kehadiran pelarut organik dapat menyebabkan rusaknya membran plasma[8]. Isolat LKMD4 yang menunjukkan hasil negatif pada ketiga pelarut organik mungkin disebabkan oleh akumulasi pelarut organik yang besar pada membran sel sehingga enzim yang terkandung menjadi rusak dan kehilangan aktivitasnya. Begitu pula pada isolat LKMA3 dan LKMC2 yang tidak memiliki aktivitas dengan penambahan metanol dan *n*-heksana serta LKMD1 yang tidak memiliki aktivitas dengan penambahan pelarut organik metanol dan benzena. Sebaliknya, hasil positif yang didapatkan dari isolat LKMC2 dan LKMA3 pada *n*-heksana, isolat LKMD1 pada benzena, dan isolat LKMG1 pada ketiga pelarut yang digunakan mungkin dikarenakan oleh meningkatnya interaksi enzim dengan substrat non-polar sehingga jumlah enzim akan meningkat. Hal ini seperti pada isolat bakteri yang diisolasi dari tempat terkontaminasi minyak memiliki toleransi yang baik terhadap isopropil alkohol, *n*-heksana, toluena, butanol, etil asetat, benzena dan sikloheksana[9].

Berdasarkan Tabel 1 dan Lampiran 1, skrining yang dilakukan terhadap kelima isolat dari pengomposan limbah domestik menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut merupakan isolat yang berbeda-beda. Kelima isolat tersebut memiliki ketahanan yang berbeda pula pada ketiga pelarut organik yang digunakan. Karena isolat LKMG1 merupakan isolat yang menunjukkan hasil yang positif dari penambahan pelarut organik metanol, *n*-heksana dan benzena dengan diameter zona bening berturut-turut 20 mm, 24 mm dan 20 mm, maka isolat LKMG1 dipilih untuk digunakan pada tahap selanjutnya.

### 3.2. Variasi Konsentrasi Pelarut Organik

Pada variasi konsentrasi, isolat LKMG1 dipilih karena memiliki ketahanan relatif lebih baik dari isolat lainnya terhadap metanol, *n*-heksana dan benzena. Pada tahap ini, isolat terpilih yaitu LKMG1 ditumbuhkan pada media cair dengan penambahan pelarut organik metanol, *n*-heksana dan benzena dengan variasi konsentrasi 1%, 3% dan 5%. Berikut hasil variasi konsentrasi yang dilakukan.

Tabel 2 Hasil uji lipolitik isolat LKMG1 pada variasi konsentrasi pelarut organik

Konsentrasi Pelarut	Diameter Zona Bening		
	(mm)		
	Metanol	<i>n</i> -Heksana	Benzena
1%	20	20	24
3%	5	26	22
5%	-	-	-

Berdasarkan data pada Tabel 2 dapat terlihat bahwa LKMG1 yang ditumbuhkan pada metanol dan benzena mengalami pengurangan diameter zona bening. Sedangkan pada *n*-heksana terdapat kenaikan diameter zona bening pada konsentrasi 3% dan merupakan diameter zona bening yang paling besar. Hal ini dapat disebabkan oleh kepolaran pelarut yang digunakan. Pada beberapa penelitian diketahui bahwa ada kecenderungan pelarut polar dapat menginaktivasi enzim lipase lebih signifikan dibanding dengan pelarut non-polar [10]. Jika dihubungkan dengan pelarut yang digunakan, *n*-heksana merupakan pelarut yang non-polar, sedangkan metanol merupakan pelarut polar sehingga pada penambahan konsentrasi metanol 3%, diameter zona bening mengecil secara signifikan. Sedangkan benzena merupakan pelarut yang lebih polar dibandingkan *n*-heksana, namun masih tergolong pelarut non-polar sehingga pada penambahan konsentrasi benzena menjadi 3%, diameter zona bening tidak berkurang terlalu banyak.

Jika dihubungkan dengan pelarut yang digunakan, *n*-heksana merupakan pelarut yang non-polar, sedangkan metanol merupakan pelarut polar sehingga pada penambahan konsentrasi metanol 3%, diameter zona bening mengecil secara signifikan. Sedangkan benzena merupakan pelarut yang lebih polar dibandingkan *n*-heksana, namun masih tergolong pelarut non-polar sehingga pada penambahan konsentrasi benzena menjadi 3%, diameter zona bening tidak berkurang terlalu banyak. Hal ini seperti pada isolat *Bacillus sphaericus* mengalami penurunan diameter zona bening seiring dengan penambahan konsentrasi benzena [11].

Pada media yang ditambahkan *n*-heksana dengan konsentrasi 3%, diameter zona bening bertambah sedikit yang menunjukkan adanya peningkatan aktivitas lipolitik dibandingkan dengan media dengan *n*-heksana 1%. Perbedaan ini dapat disebabkan oleh kestabilan protein enzim yang berbeda untuk setiap pelarut organik yang berefek pada pada sistem reaksi dan tingkat resistensi terhadap pelarut [12]. Pada konsentrasi 5%, dari ke-3 variasi masing-masing konsentrasi pelarut organik tidak terdapat aktivitas yang ditandai dengan tidak adanya zona bening yang terbentuk. Hal ini dapat dikarenakan oleh viskositas pelarut yang relatif tinggi dan menghambat efisiensi interaksi antara enzim dengan substrat.

#### 4. Kesimpulan

Skринing kelima isolat asal pengomposan limbah domestik diperoleh isolat LKMG1 memiliki ketahanan yang relatif lebih baik terhadap metanol, *n*-heksana dan benzena dengan zona bening berturut-turut sebesar 20 mm, 20 mm dan 24 mm. Isolat LKMG1 menunjukkan aktivitas relatif lebih baik pada media dengan pelarut organik *n*-heksana 3% yang ditandai dengan terbentuknya zona bening sebesar 26 mm.

#### Daftar Pustaka:

- [1] Zheng, C. 2018. Screening and Identification of Lipase Producing Bacterium. *IOP Conference Series : Earth and Environmental Science*. **108**: 1-7.
- [2] Syihab, S. 2017. Eksplorasi, Pemurnian dan Karakterisasi Lipase Termotabil dan Toleran Alkohol dari Isolat Kompos. *Tesis*. Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- [3] Ji, Q., Xiao, S., He, B., Liu, X. 2010. Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LX1 and its application for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic*. **66(3-4)**:264-9.
- [4] Parwata, I. P., dan Sukarta, I. N. 2013. Lipase Stabil Pelarut Organik dari Bakteri Isolat Tanah Terkontaminasi Minyak di Pasar Anyar Singaraja, Bali. *Prosiding Seminar Nasional Riset Inovatif I*. 573-579.
- [5] Jaiganesh, R and Jaganathan M. K. 2018. Isolation, Purification, and Characterization of Lipase From *Bacillus* sp. From Kitchen Grease. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. **11**: 224-227.
- [6] Fransiska, L. 2019. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Lipolitik pada Proses Pengomposan Limbah Domestik. *Skripsi*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.

- [7] Samad, M.Y.A., C. Razak, C.N.A., Salleh, A. B., Yunus, W.M., Ampon, K., and Basri, M. 1989. A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of Microbiological Methods*. **9**: 51-56.
- [8] Krasowska, A., Sigler, K. 2014. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs?. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. **4**:112.
- [9] Patel, U., Chandpura, J., Chauhan, K., Gupte, S. 2018. Screening and isolation of an organic solvent tolerant lipase producing bacteria from various oil contaminated sites. *Indian Journal of Applied Microbiology*. **21**:22-36.
- [10] Rahman, R. N., Baharum, S. N., Basri, M., Salleh, A. B. 2005. High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas* sp. strain S5. *Analytical Biochemistry*. **341(2)**:267–274.
- [11] Hun, C.J., Rahman R. N. Z. A., Salleh, A. B., Basri, M. 2003. A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase. *Biochemical Engineering Journal*. **15(2)**:147–151.
- [12] Zheng, C. 2018. Screening and Identification of Lipase Producing Bacterium. *IOP Conference Series : Earth and Environmental Science*. **108**: 1-7.