

**PENGARUH PENAMBAHAN LEMAK AYAM
SEBAGAI PENGINDUKSI LIPASE TERHADAP
PRODUKSI LIPASE, AKTIVITAS LIPOLITIK DAN
JUMLAH *Mucor miehei***

SKRIPSI

Oleh:

**Mei Irkhamni
NIM. 0610540034**



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL TERNAK
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2011**

**PENGARUH PENAMBAHAN LEMAK AYAM
SEBAGAI PENGINDUKSI LIPASE TERHADAP
PRODUKSI LIPASE, AKTIVITAS LIPOLITIK DAN
JUMLAH *Mucor miehei***

Oleh:

**Mei Irkhamni
NIM. 0610540034**



Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana
pada Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL TERNAK
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2011**

**PENGARUH PENAMBAHAN LEMAK AYAM
SEBAGAI PENGINDUKSI LIPASE TERHADAP
PRODUKSI LIPASE, AKTIVITAS LIPOLITIK DAN
JUMLAH *Mucor miehei***

SKRIPSI

Oleh:
Mei Irkhamni
NIM. 0610540034

Telah dinyatakan lulus dalam ujian Sarjana
Pada Hari/Tanggal : Senin, 28 Maret 2011

Menyetujui
Susunan Tim Penguji

Pembimbing Utama

Anggota Tim Penguji

Khothibul Umam Al Awwaly, S.Pt., M.Si.
Tanggal :

Ir. Manik Eirry Sawitri, MS.
Tanggal :

Pembimbing Pendamping

drh. Masdiana C. H. Padaga, M.App. Sc.
Tanggal :

Malang,
Fakultas Peternakan
Universitas Brawijaya Malang
Dekan,

Prof. Dr. Ir. Kusmartono.
Tanggal :

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel, memiliki memiliki tenaga katalitik yang luar biasa. Spesifitas enzim sangat tinggi terhadap substratnya, enzim mempercepat reaksi kimia spesifik tanpa pembentukan produk samping. Aplikasi enzim telah digunakan secara luas di bidang pangan dan industri kimia. Enzim juga merupakan penunjang dalam berbagai proses industri, karena enzim mempunyai efisiensi dan efektifitas yang tinggi (Lehninger, 1994). Whitaker (1994), menambahkan bahwa semua enzim adalah protein, tetapi tidak semua protein merupakan enzim sehingga enzim memiliki sifat yang mirip dengan protein.

Salah satu enzim yang mempunyai peranan penting dalam pertumbuhan bioteknologi adalah lipase. Lipase adalah kelompok enzim yang secara umum berfungsi dalam hidrolisis lemak, mono-, di-, dan trigliserida untuk menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol (Suzuki, Mushiga, Yamane, and Shimizu, 1988). Lipase memiliki sifat khusus dapat memecahkan ikatan ester pada lemak dan gliserol. Selain itu lipase memiliki kemampuan mengkatalis reaksi organik baik dalam media berair maupun dalam media non-air. Beberapa reaksi yang dapat dikatalis oleh lipase adalah reaksi hidrolisis, alkoholisis (transesterifikasi), esterifikasi, dan interesterifikasi (Nurhasanah dan Herasari, 2008).

Produksi enzim lipase dari mikroorganisme merupakan solusi dari penggunaan enzim lipase dari hewani yang mahal dan dapat menurunkan penyediaan daging dan populasi sapi. Mikroorganisme penghasil lipase dari

kelompok *fungi* seperti *Mucor miehei*, *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum*, *Neurospora sitophila*, *Penicillium citrinum*, dan *Rhizopus spp.* (Panji, Suharyanto, dan Arini, 2008).

Mucor miehei merupakan jenis kapang bersifat mesofilik, yaitu tumbuh baik pada suhu 25-30 °C (Fardiaz, 1992). *Mucor miehei* memiliki produktifitas enzim lipase yang baik dan merupakan kapang yang termasuk dalam kelas Zygomycetes dengan sistem reproduksi seksual dan aseksual. Sistem reproduksi aseksual dilakukan dengan spora pada sporangium. Jumlah spora *Mucor miehei* dipengaruhi oleh nutrien pokok yang banyak dibutuhkan meliputi karbon, nitrogen, *makro* dan *mikro* nutrien yang terdapat dalam media fermentasi.

Penginduksi digunakan sebagai substrat yang dapat merangsang terbentuknya enzim lipase. Penggunaan substrat penginduksi sebagai sumber karbon yang ditambahkan pada media fermentasi di samping substrat utama lebih baik dibandingkan tanpa substrat penginduksi (Fallony, Armas, Mendoza and Hernandez, 2006). Penambahan substrat lemak nabati pada media SSF dapat meningkatkan aktivitas lipase dibandingkan tanpa penambahan lemak (Mala, Edwinouver, Kamini dan Puvanakrishan, 2007).

Lemak dan minyak merupakan senyawaan trigliserida atau triasilgliserol, yang berarti “triester dari gliserol”, sehingga lemak dan minyak juga merupakan senyawaan ester. Hasil hidrolisis lemak dan minyak adalah asam karboksilat dan gliserol. Asam karboksilat ini juga disebut asam lemak yang mempunyai rantai hidrokarbon yang panjang dan tidak bercabang (Herlina, 2002). Pemanfaatan lemak ayam selama ini adalah monoasil gliserol (MAG) dan diasil gliserol (DAG) ialah senyawa turunan lemak atau minyak yang mempunyai fungsi sebagai bahan

pengemulsi, aman digunakan untuk pangan, kosmetik, dan obat-obatan (Herdianto, 2009). Asam laurat dalam bentuk monoasil-gliserol laurat (monolaurin) dapat dimanfaatkan berperan sebagai bahan pengawet dalam *cottage cheese* (Pahrudin, 2006). Pemanfaatan lemak ayam pada berbagai konsentrasi sebagai bahan penginduksi dalam media fermentasi diharapkan menunjukkan hasil yang terbaik.

1.2. Rumusan Masalah

Penambahan lemak ayam dalam produksi lipase *Mucor miehei* akan mempengaruhi hasil akhir produk, sehingga perlu diketahui bagaimanakah pengaruh penambahan berbagai konsentrasi lemak ayam sebagai penginduksi lipase terhadap produksi lipase, aktivitas lipolitik dan jumlah *Mucor miehei* yang dihasilkan.

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan lemak ayam sebagai penginduksi lipase pada konsentrasi terbaik terhadap produksi lipase, aktivitas lipolitik dengan nilai katalitik yang tinggi dan jumlah *Mucor miehei* yang dihasilkan.

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian adalah :

1. Mengoptimalkan produksi enzim lipase *Mucor miehei* dengan penggunaan lemak ayam sebagai penginduksi pada media fermentasi dedak gandum.

2. Pemenuhan kebutuhan enzim lipase dari *Mucor miehei* dalam penerapan enzim lipase di industri pangan dengan pemanfaatan lemak ayam sebagai bahan penginduksi lipase.

1.5. Kerangka Pikir

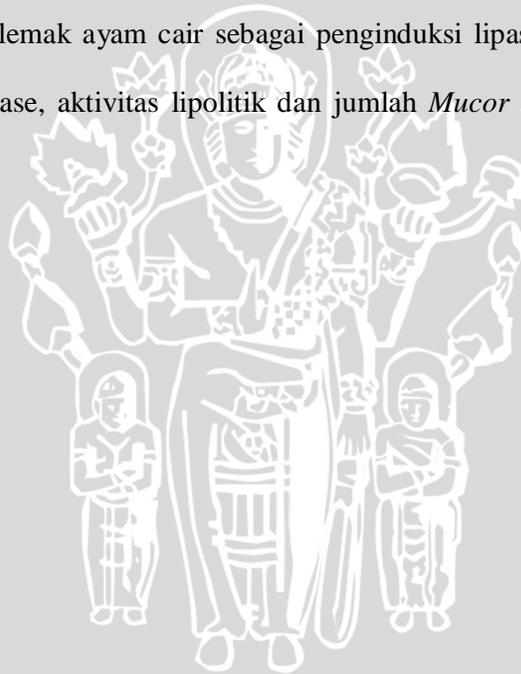
Kelas *fungi* merupakan penghasil enzim lipase antara lain *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum*, *Mucor miehei*, *Neurospora sitophila*, *Penicillium citrinum*, dan *Rhizopus spp.* *Fungi* merupakan penghasil lipase yang baik (Panji dkk., 2008). Khasmiri, Adnan and Butt, (2006) menyatakan bahwa terdapat dua metode fermentasi yaitu menggunakan metode *solid substrate fermentation* (SSF) dan metode *submerged fermentation* (SmF). Teknik SSF mempunyai beberapa kelebihan yaitu lebih ekonomis, media fermentasi lebih sederhana, hasil superior dan tidak memerlukan mesin yang rumit (Fallony *et al.*, 2006). Pada teknik SSF dapat digunakan substrat yang berasal dari limbah pertanian dan pangan yang dihasilkan dalam jumlah sangat banyak dan biasanya banyak mengandung karbohidrat, yang dapat berperan sebagai substrat untuk menghasilkan senyawa kimia dan enzim.

Penginduksi adalah suatu substrat yang dapat merangsang pembentukan enzim (Sumiarsih, 2003). Produksi lipase pada kultur media dengan penambahan lipid sebagai sumber karbon lebih baik dibandingkan dengan kultur media tanpa penambahan lipid (Fallony *et al.*, 2006). Penambahan substrat asam oleat 3 % sebagai penginduksi pada produksi lipase *Mucor miehei* menunjukkan nilai aktivitas lipase sebesar 1,034 U/ml (Paramitha, 2010). Menurut Sholichah (2010), dengan penambahan substrat asam oleat sebagai penginduksi pada produksi lipase menunjukkan nilai aktivitas lipase *Mucor miehei* sebesar 1,871 U/ml.

Penambahan minyak zaitun sebanyak 2% pada media SSF diperoleh peningkatan aktivitas lipase secara optimum yaitu sebesar 4,8 U/ml (Fallony *et al.*, 2006). Bahan penginduksi dalam media fermentasi dapat diperoleh produksi enzim lipase yang maksimal. Penggunaan lemak ayam cair sebagai penginduksi produksi lipase, diharapkan dapat meningkatkan produksi lipase, aktivitas lipolitik dan jumlah *Mucor miehei* dan yang dihasilkan.

1.6. Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah adanya pengaruh penambahan berbagai konsentrasi lemak ayam cair sebagai penginduksi lipase *Mucor miehei* terhadap produksi lipase, aktivitas lipolitik dan jumlah *Mucor miehei* dan yang dihasilkan.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Enzim

Enzim merupakan katalisator dari suatu sistem biologi yang dapat mengkatalisis suatu reaksi secara spesifik. Molekul ini akan meningkatkan dengan nyata kecepatan reaksi kimia spesifik daripada tanpa enzim yang berlangsung sangat lambat. Walaupun dalam jumlah sedikit, enzim mempunyai kemampuan untuk mempercepat suatu reaksi kimia hingga 10^{12} – 10^{20} kali (Muchtadi, dkk., 1992). Setelah reaksi berlangsung, enzim tidak mengalami perubahan jumlah, sehingga jumlah enzim sebelum dan setelah reaksi adalah tetap. Enzim mempunyai selektivitas dan spesifitas yang tinggi terhadap reaktan yang direaksikan dan jenis reaksi yang dikatalisasi (Trevor, 1991).

Faktor-faktor yang mempengaruhi reaksi enzimatik adalah substrat, suhu, keasaman (pH), penghambat enzim (inhibitor), penghambat bersaing (kompetitif), penghambat tidak bersaing (non-kompetitif), penghambat umpan balik (*feed back inhibitor*), penghambat represor, penghambat alosterik, kofaktor, dan penginduksi (Sumiarsih, 2003). Kecepatan reaksi banyak dipengaruhi oleh beberapa hal seperti konsentrasi substrat, enzim, pH optimum dan suhu seperti dilaporkan oleh Koblitz and Pastore (2006) enzim lipase dari mikroorganisme memiliki aktivitas lebih baik pada pH 5,6 – 7,5 dengan suhu berkisar antara 30°C – 50°C terhadap aktivitas dan kesetabilan enzim, serta oleh Fallony *et al.*, (2006) enzim lipase memiliki pH optimum berkisar pH 6 pada suhu 40°C . Penghambat utama pada aktivitas enzim adalah secara tidak dapat balik (*irreversible*) yaitu golongan yang bereaksi atau merusak gugus fungsional pada molekul enzim, dapat balik

(*reversible*) yaitu kompetitif yang berlomba dengan substrat untuk berikatan dengan sisi aktif enzim tetapi tidak dapat diubah oleh enzim tersebut dan nonkompetitif yang berikatan dengan sisi enzim, merubah konformasi sisi enzim mengakibatkan inaktivasi sisi katalis enzim (Lehninger, 1995).

2.2. Enzim Lipase

Berdasarkan nomenklatur dari *International Union of Biochemistry*, lipase adalah enzim yang berfungsi untuk mengkatalis lemak atau triasilgliserida (TAG) menjadi diasilgliserida (DAG) dan *free fatty acid* (FFA) (Winarno, 2004). Sisi aktif lipase mengandung 3 macam asam amino utama yang sangat berperan dalam reaksi katalisisnya yaitu asam aspartat, histidin dan serin (Wong, 1995).

Berdasarkan spesifikasinya enzim lipase dibagi menjadi dua kelompok yaitu lipase non spesifik dan lipase spesifik. Lipase non spesifik dapat melepaskan asam lemak dari tiga posisi pada gliserida, sehingga akan menghasilkan pemecahan yang sempurna dari molekul trigliserida menjadi gliserol dan tiga asam lemak. Lipase (1, 3) spesifik mampu melepaskan asam lemak hanya pada posisi 1 dan 3 dari gliserida, karena posisi 2 pada gliserida secara normal tidak stabil dan terjadi perpindahan asil menjadi bentuk 1,3 digliserida atau 1-monogliserida (Singh, Drake and Cadwallader, 2003).

Mekanisme reaksi katalisis enzim lipase ditunjukkan pada reaksi melalui dua tahap yaitu asilasi dan deasilasi pada sistem aktif enzim yaitu histidin, serin dan asam aspartat (Wong, 1995). Pada tahap asilasi aspartat yang memiliki gugus karboksilat ($-\text{COOH}$) menjadi aktif dalam lingkungan hidrofob dan akan mempolarisasi histidin yang ada di dekatnya. Gugus histidin akan berperilaku sebagai basa dan akan menyerap proton dari gugus OH^- pada serin, sehingga

oksigen menjadi nukleofilik, kuat dan menyerang gugus karbonyl yang ada pada substrat menghasilkan produk. Tahap deasilasi adalah pelepasan produk yang serupa asam lemak bebas oleh enzim melalui mekanisme yang sama dengan asilasi. Aspartat yang aktif akan mempolarisasi histidin dan memprotonasi H₂O. Hasil protonasi ini yaitu ion OH⁻ yang menyerang gugus karbonil dari asil enzim dan akan menghasilkan suatu asam lemak bebas dan enzim bebas lemak kembali (Belitz *and* Grosch, 1999).

Keberhasilan isolasi dan pengujian aktivitas enzim sangat tergantung pada kondisi sumber enzim, letak, bahan dan cara ekstraksi yang sesuai dengan sifat enzim (Rahayu, 1986). Lipase terdapat dalam bentuk terikat dalam sel dan dapat diproduksi secara ekstraseluler (Akon, 1998). Enzim lipase akan bekerja optimum pada pH 7, dengan suhu hidrolisis optimum 40 °C dengan aktivitas maksimum pada suhu 80 °C dan pH 11. Pada kondisi tersebut akan didapatkan hasil hidrolisis yang paling besar (Bhardwaj, Raju *and* Rajasekharan, 2001).

2.3. *Mucor miehei*

Mucor miehei adalah *fungi* yang tidak mempunyai *rhizoid* dan tumbuh optimal pada suhu ±37°C. *Mucor miehei* pada suatu saat akan tumbuh dengan suatu rhizoid, pada saat ini *Mucor miehei* lebih sering disebut *Rhizomucor miehei*. *Mucor miehei* adalah *thermophilic fungi*, berfilamen ditemukan pada tanah, makanan, buah-buahan, dan sayur yang busuk. *Mucor miehei* biasanya diisolasi dari fermentasi dengan bahan-bahan organik (Schipper, 1976). Klasifikasi *Mucor miehei* sebagai berikut (Solar *and* Aneja, 2007):

Kingdom : *Thallophyta*
Divisi : *Fungi*
Sub Divisi : *Eumycetes*
Kelas : *Zygomycetes*
Ordo : *Mucorales*
Famili : *Mucoraceae*
Genus : *Mucor*
Spesies : *miehei*

Penggunaan penginduksi dalam media *Mucor miehei* menghasilkan enzim yang tinggi, penambahan glukosa dapat meningkatkan produksi enzim. Pada sisi lain, preparasi enzim yang terjadi dengan media SSF menunjukkan proteolitiknya rendah dan terdapat aktifitas lipolitik (Silveira, Oliveira, Riberio, Monti and Contiero, 2005).

Enzim yang diproduksi oleh *Mucor miehei* selama proses fermentasi mendapatkan hasil tentang komposisi media, pH, konsentrasi dari suatu unsur dan parameter operasional, sebagai agitasi dan tingkat pencairannya. Enzim yang dihasilkan telah diujikan menggunakan media SSF untuk mengetahui atau menguji efek yang digunakan sebagai parameter operasional seperti temperaturnya, hubungan pada kelembaban pada media padat, serta pengaruh dari parameter nutrisi yang ditambahkan (Silveira *et al.*, 2005). Aktivitas lipase maksimal diperoleh pada fase stasioner, ketika hampir seluruh lemak pada media fermentasi telah dikonsumsi oleh mikroorganisme (Alonso, Olivera, Dellamora-Ortiz and Pereira-Meirelles, 2005).

2.4. Dedak Gandum

Beberapa jenis substrat dalam media fermentasi padat dapat digunakan untuk produksi enzim seperti enzim selulase, amilase dan pektinase serta lipase (Attiya and Ashour, 2002). Substrat yang banyak dipakai adalah limbah pertanian

seperti kulit gandum (*wheat bran*), kulit beras (*rice bran*), kulit kacang panjang (*gram bran*), *maize bran*, batang gandum, batang padi, kulit kacang kedelai (Pandey, Selvakumar, Soccol, and Nigam, 2008).

Hasil penggilingan gandum dapat dibedakan menjadi lima yaitu *wheat bran* (12,5-16,9%), *shorts* (6,6-8,9 %), *red dog* (1,4-4,7%), *germ* (0,6-1,1), *flour* (72,6-77,0%) (Pomeranz and MacMasters, 1968). Dedak gandum merupakan kulit luar gandum dan terdapat sebanyak 14,5% dari total keseluruhan gandum. Dedak gandum terdiri dari 5 lapisan yaitu epidermis (3,9%), epikarp (0,9%), endokarp (0,9%), testa (0,6%), dan aleuron (9%), dedak gandum dapat mengurangi resiko gangguan saluran pencernaan, penggunaan dalam produk pangan seperti pada industri roti dengan penggunaan yang sedikit karena kandungan serat yang tinggi (Ranhotra, Gelroth, Glaser and Reddy, 1994). Komposisi dedak gandum berdasarkan analisa proksimat yang dilakukan sebelum dilakukan penelitian ini adalah bahan kering 87,2 % dan abu 4,43 %, protein kasar 17 %, serat kasar 7 %, lemak kasar 3,04 % dari 100 % bahan kering. Komposisi dan nilai asam amino, vitamin dan mineral dalam dedak gandum pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi dan nilai asam amino, vitamin dan mineral dedak gandum

Asam amino Esensial	Vitamin (mg/100 g sampel)	Mineral (mg/100 g sampel)
Arginin (1,01 %)	Riboflavin (0,36)	Kalsium (105)
Valin (0,46 %)	Tiamin (0,5)	Tembaga (1,4)
Histidin (0,51 %)	Niasin (36,2)	Besi (9,1)
Isoleusin (0,33 %)	Biotin (0,051)	Kalium (1,896)
Leusin (0,86 %)	Kholin (179,0)	Magnesium (647)
Lisin (0,57 %)	Asam pantenat (4,54)	Seng (10,9)
Metionin (0,19 %)	Asam folat (0,102)	Mangan (12,1)
Sistin (0,18 %)	Inositol (1554,0)	Sodium (5)
Fenilalanin (0,50 %)	Asam p-aminobenzoat	Fosfor (1,493)
Tirosin (0,45 %)	(1,72)	Molibdenum (0,83 ppm)
Treonin (0,49 %)		Kobalt (0,109 ppm)

Sumber : Ranhotra *et al.*, 1994

2.5. Lemak ayam

Lemak adalah salah satu kelompok yang termasuk pada golongan lipid, yaitu senyawa organik yang terdapat di alam serta tidak larut dalam air, tetapi larut dalam pelarut organik non-polar, misalnya dietil eter ($C_2H_5OC_2H_5$), kloroform ($CHCl_3$), benzena dan hidrokarbon lainnya, lemak dan minyak dapat larut dalam pelarut yang disebutkan di atas karena lemak dan minyak mempunyai polaritas yang sama dengan pelarut tersebut (Herlina, 2002). de Man (1997) menjelaskan bahwa lemak terdiri dari gliserol yang merupakan kompleks alkohol dan asam lemak. Lemak berisi elemen-elemen seperti karbon, hidrogen dan oksigen yang merupakan ester dari gliserol dan asam lemak yang merupakan bagian kompoen yang dapat memberikan aroma. Jenis pakan yang dikonsumsi oleh ayam dapat mempengaruhi susunan asam lemak misalnya kandungan asam linolenat, komponen asam lemak dalam lemak ayam adalah laurat (1,9%), miristat (2,5%), palmitat (36,0%), stearat (2,4%), palmitoleat (8,2%), oleat (48,2%). Winarno (2004) menyatakan bahwa asam lemak dengan atom C lebih dari dua belas tidak larut dalam air dingin maupun air panas. Asam lemak dari C_4 , C_6 , C_8 dan C_{10} (asam lemak volatil) dapat menguap dan asam lemak C_{12} dan C_{14} (asam lemak non volatil) sedikit menguap, senyawa non-volatil utamanya berperan terhadap rasa, sedangkan senyawa volatil berperan dalam rasa dan aroma.

Lemak atau trigliserida dapat dipecah melalui proses hidrolisis dengan bantuan enzim lipase membentuk FFA atau secara umum disebut lemak terhidrolisa, hidrolisis lemak dan minyak secara fisiologis (Muchtadi, Palupi dan Astawan, 1992). Lemak dan minyak merupakan senyawaan trigliserida atau triasilgliserol, yang berarti "triester dari gliserol", sehingga lemak dan minyak

juga merupakan senyawaan ester. Hasil hidrolisis lemak dan minyak adalah asam karboksilat dan gliserol. Asam karboksilat ini juga disebut asam lemak yang mempunyai rantai hidrokarbon yang panjang dan tidak bercabang (Herlina, 2002).

Asam lemak disebut sebagai asam karboksilat dalam ilmu kimia organik, merupakan bagian terpenting dalam lemak dan minyak. Satu molekul lemak atau minyak terdiri dari 95% asam lemak dan 5% gliserol. Berdasarkan ikatan karbonnya, ada 2 jenis asam lemak yaitu asam lemak jenuh (tidak mempunyai ikatan rangkap) dan asam lemak tak jenuh (dengan satu ikatan rangkap). Asam lemak dengan ikatan rangkap terdiri dari dua jenis yaitu asam lemak berikatan rangkap satu (*monounsaturated fatty acid*/MUFA) dan asam lemak berikatan rangkap banyak (*polyunsaturated fatty acid*/PUFA). Asam lemak yang ada selama ini dikatakan esensial jika asam lemak tersebut dibutuhkan dalam metabolisme tubuh namun tidak dapat disintesis dalam tubuh, jadi harus dikonsumsi langsung. Jenis asam lemak esensial yang sudah dikenal luas yaitu asam linoleat dan asam linolenat (Sirrit, 2002).

2.6. Lipase *Mucor miehei*

2.6.1. Produksi lipase *Mucor miehei*

Mikroorganisme dalam hidupnya memerlukan air, sumber energi, karbon, nitrogen, mineral dan beberapa vitamin, serta oksigen bila mikroorganisme bersifat aerobik (Rahman, 1992). Produksi lipase dari mikroorganisme dapat menggunakan dua metode yaitu metode *solid substrate fermentation* (SSF) dan metode *submerged fermentation* (SmF) (Khasmiri *et al.*). Biaya produksi untuk metode SSF lebih efisien dibandingkan metode SmF (Sumantha, Larroche, and Pandey, 2006). SSF telah ditemukan dapat memproduksi

produk yang lebih stabil, dengan sedikit energi yang dibutuhkan, pada fermentasi yang jumlahnya sedikit dan kadar polusi yang lebih kecil (Balassa *and* Fanger, 1971). Penggunaan teknik SSF memiliki beberapa keunggulan yaitu harga lebih ekonomis, media fermentasi lebih sederhana, hasil superior dan peralatan yang lebih mudah penggunaannya (Fallony *et al.*, 2006).

Beberapa faktor terpenting yang dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme adalah nilai aktivitas air (Aw) (Purnomo, Indratiningsih, Sugita dan Rihastuti, 1996). Suhu lingkungan merupakan factor penting dalam pertumbuhan mikroorganisme dan sintesis produk metabolisme seperti enzim-enzim, pada suhu inkubasi yang tepat akan berpengaruh terhadap akumulasi biomassa dan produksi metabolit (Berovic *and* Kristiansen, 2003). Suhu fermentasi dan proporsi mineral menurut Aditama (2006) adalah pada suhu 32 °C dan larutan mineral 100 %.

Enzim merupakan protein yang dapat bersifat intraseluler dan ekstraseluler. Enzim ekstraseluler adalah enzim yang disekresikan melalui dinding sel dan dapat berfungsi di luar sel Waluyo (2005). Komposisi medium pada akhirnya mempengaruhi protein apa yang diproduksi oleh sel, oleh karena itu pemilihan medium untuk enzim tertentu berperan penting untuk menentukan protein yang diinginkan akan terbentuk (Fressner, 2000). Enzim induktif adalah enzim yang ada dalam sel dengan jumlah yang tidak tetap, tergantung pada adanya penginduksi. Enzim induktif ini akan bertambah sampai beberapa ribu kali bahkan lebih dalam medium yang mengandung substrat penginduksi, terutama bila substrat penginduksi merupakan satu-satunya sumber karbon (Lidya dan Djenar, 2000). Menurut Muchtadi dkk. (1992), Enzim ekstraseluler dikeluarkan ke

media selama fermentasi maka enzim ekstraseluler diisolasi dengan cara memisahkan cairan dari biomasanya. Protein dalam ekstraksi enzim yang diperoleh dari metode SSF dapat berupa biomassa enzim yang diinginkan dan enzim lain yang diperlukan untuk aktivitas metabolisme mikroorganisme yaitu enzim hidrolitik seperti amilase, selulase dan pektinase (Raimbault, 1998).

Pemisahan cairan dapat dilakukan dengan sentrifugasi media produksi yang menyangkut pemisahan sel-sel dari medium biakan, pemisahan hancuran sel dan pengumpulan presipitat (Judoamidjojo, Darwis dan Said, 1992). Aunstrup (1980) menyatakan bahwa supernatan yang diperoleh setelah sentrifugasi masih merupakan ekstrak kasar. Ekstrak kasar merupakan larutan yang masih mengandung bahan pengotor yang berasal dari komponen atau senyawa lain di media produksi.

Produksi enzim ekstraseluler didapatkan dengan penggunaan air, larutan bufer, larutan garam, larutan deterjen non-ionik seperti Triton X-100 dan Tween sebagai pelarut protein dari media fermentasinya (Sumantha *et al.*, 2006). Fallony *et al.* (2006) menambahkan bahan sumber karbon yang didapatkan dari penambahan lipid menunjukkan peningkatan enzim lipase yang diproduksi dibandingkan dengan kultur tanpa penambahan lipid. Mikroorganisme aerob mengubah substrat karbon dalam jumlah $\pm 50\%$ menjadi biomassa (Hidayat, Padaga dan Suhartini, 2006).

Penambahan sumber karbon pada media fermentasi SmF dari minyak zaitun 0% dan glukosa 2% dalam produksi enzim lipase menunjukkan nilai 7,72 mg/ml dengan peningkatan menjadi 23,2 mg/ml pada penambahan minyak zaitun 2% dan glukosa 2%. Penambahan substrat asam oleat 3% sebagai penginduksi

pada produksi lipase *Mucor miehei* menunjukkan nilai sebesar 4,210 mg/ml (Paramitha, 2010). Berdasarkan Koblitz *and* Pastore (2006), produksi lipase dari mikroorganisme dengan media dedak gandum adalah 8,342 mg/ml menunjukkan potensi yang ada pada dedak gandum sebagai media fermentasi produksi lipase ekstraseluler.

2.6.2. Aktifitas Lipolitik *Mucor miehei*

Keberadaan enzim dalam suatu ekstrak dapat ditentukan dengan mendeteksi aktivitas katalitiknya. Kecepatan reaksi substrat yang dikatalisis oleh enzim dapat ditentukan secara kuantitatif, yang dinyatakan sebagai aktivitas enzim. Aktivitas enzim ini ditentukan berdasarkan kecepatan penguraian substrat maupun kecepatan pembentukan produk (Fox *and* McSweeney, 1991). Aktivitas lipolitik dinyatakan dalam satuan unit/ml dan satu unit aktivitas lipase didefinisikan sebagai 1 μ mol asam lemak yang dibebaskan per menit (Santoso, 2002). Produksi enzim dalam jumlah besar dan mempunyai aktifitas yang tinggi, perlu diperhatikan faktor–faktor penting seperti kondisi pertumbuhan, cara isolasi, dan jenis substrat yang digunakan (Nurhasanah dan Herasari, 2008).

Pada umumnya semakin tinggi suhu, maka semakin naik laju reaksi kimia, baik yang dikatalis maupun yang tidak dikatalis oleh enzim. Perlu diingat bahwa enzim adalah protein, jadi semakin tinggi suhu proses, maka inaktivasi enzim juga akan meningkat. Pengaruh suhu sangat kompleks, misalnya suhu yang terlalu tinggi dapat mempercepat perusakan enzim. Pada suhu terlalu rendah, laju reaksi akan kecil, sedangkan pada suhu terlalu besar maka laju inaktivasi enzim akan semakin cepat dan menyebabkan reaksi praktis berhenti sama sekali. Oleh karena itu enzim mempunyai suhu yang optimal dengan laju reaksi akan berjalan

cepat, sedangkan laju inaktivasi enzim akan berjalan begitu lambat sehingga laju inaktivasi enzim bisa diabaikan (Winarno, 1995).

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim antara lain suhu, pH, konsentrasi enzim dan substrat. Kecepatan reaksi akan meningkat dengan meningkatnya suhu reaksi (Hill, Ghannouchi *and* Garcia, 2001). Aktivitas enzim sangat dipengaruhi oleh sumber (mikroorganisme) dan substrat yang digunakan, sedangkan kondisi optimumnya dipengaruhi oleh jenis media uji yang digunakan (Kombong, 2004). Menurut Winarno (1995) bahwa hampir semua enzim mempunyai aktivitas optimal pada suhu 30 sampai 40 °C dan denaturasi mulai terjadi pada suhu 45°C. Denaturasi ditandai dengan hilangnya sifat kelarutan protein. Lapisan molekul bagian dalam bersifat hidrofobik berbalik keluar dan sifat hidrofil terlipat ke dalam.

Lipase dapat dipilah ke dalam tiga golongan menurut kekhasannya yang salah satunya adalah mencakup lipase yang mempunyai kekhasan posisi, untuk posisi -1 dan -3 gliserida. Hal ini umumnya dari jenis mikroorganisme dan merupakan akibat dari ketidak mampuan ikatan ester posisi -2 untuk memasuki sisi aktif enzim karena gangguan keruangan (de Man, 1997). Enzim lipase memiliki keunikan lain yaitu sisi aktif lipase yang tertutup oleh *lid*, sisi aktif tersebut harus terbuka terlebih dahulu untuk dapat berinteraksi dengan substrat, sehingga aktifitas lipolitik dari lipase disebabkan perubahan struktur agar dapat bereaksi dengan substrat menuju sisi aktif dari enzim, sisi aktif enzim lipase ini bersifat hidrofobik yang akan bereaksi dengan lemak (Wong, 1995).

Aktivitas lipolitik maksimal diperoleh pada fase stasioner, ketika hampir seluruh lemak pada media fermentasi telah dikonsumsi oleh mikroorganisme

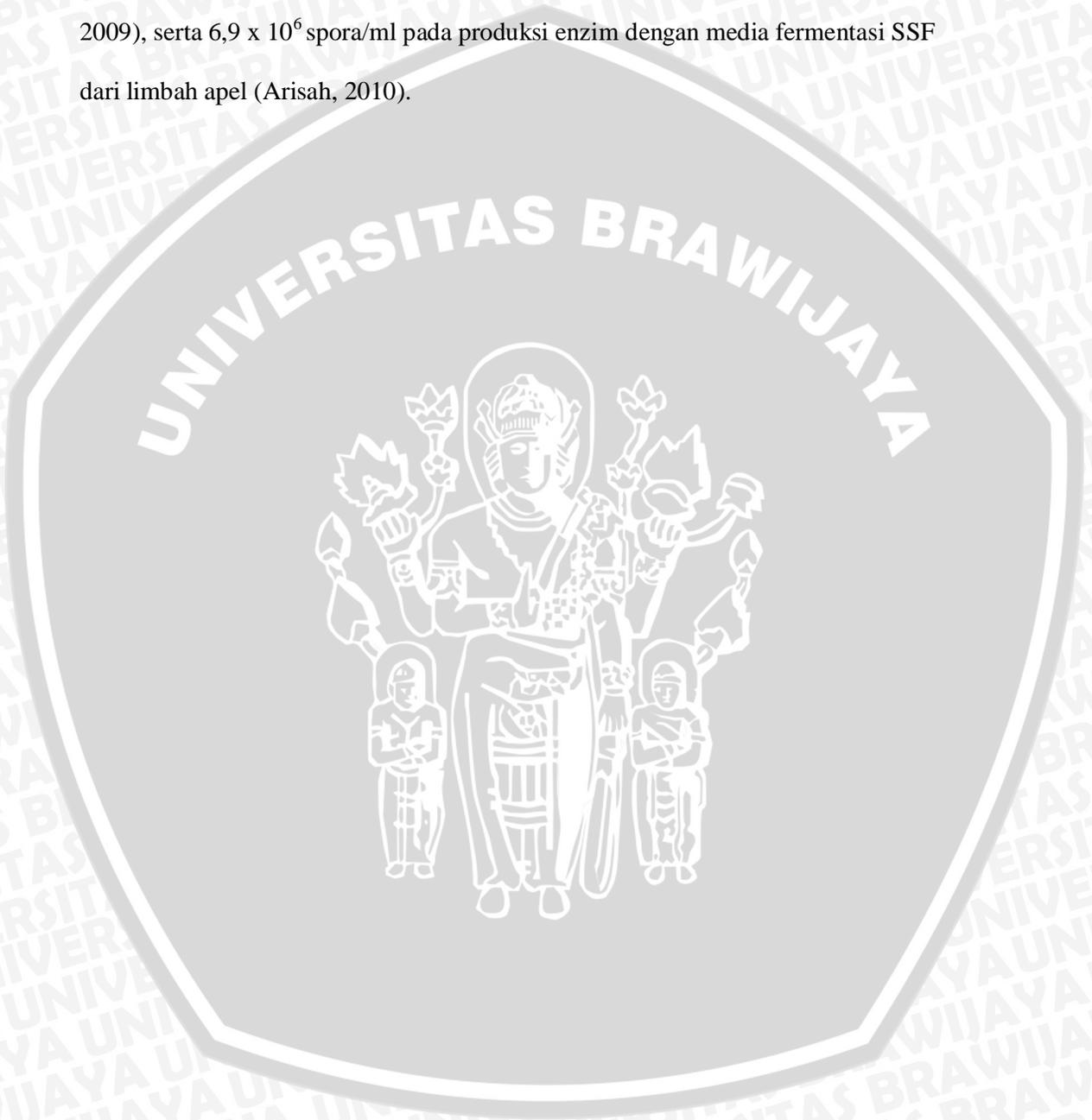
(Alonso *et al.*, 2005). Lipase mempunyai aktivitas optimal pada pH 7,0 dan suhu 37 °C, dan stabil pada kisaran pH 4,0 - 10,0 (Kamini, Mala *and* Puvanakrishnan, 1998). Penambahan minyak zaitun sebanyak 2% pada media SSF diperoleh nilai aktivitas lipase yaitu sebesar 4,8 U/ml yang lebih tinggi dari media SmF yaitu 1,46 U/ml (Fallony *et al.*, 2006). Penambahan substrat asam oleat 3% sebagai penginduksi pada produksi lipase *Mucor miehei* menunjukkan nilai aktivitas lipase sebesar 1,034 U/ml (Paramitha, 2010). Koblitz *and* Pastore (2006) menambahkan bahwa Aktivitas lipolitik lipase dari mikroorganisme dengan media dedak gandum adalah dengan nilai 1.245,71 U/ml.

2.6.3. Jumlah *Mucor miehei*

Pertumbuhan mikroorganisme dipengaruhi oleh konsentrasi dari komposisi nutrien dalam media seperti jenis substrat, kondisi lingkungan, air, suhu, udara, pH, inokulan, kontaminasi, kebutuhan energi, pengotor dan konsentrasi substrat (Raimbault, 1998). Komponen dalam media fermentasi harus memenuhi kebutuhan dasar untuk membentuk sel dan metabolit, serta mampu memberikan energi yang cukup bagi suatu proses biosintesis dan pemeliharaan sel (Stanbury *and* Whitaker, 1984).

Sistem reproduksi aseksual dilakukan dengan spora aseksual yaitu spora yang terjadi karena protoplasma dalam suatu sel tertentu berkelompok-kelompok kecil, masing-masing mempunyai membran serta inti sendiri, sel tempat terbentuknya disebut sporangium dan spora disebut sporangiospora. Sistem reproduksi seksual dilakukan dengan zigospora yaitu spora besar dan berdinding tebal yang terbentuk apabila ujung-ujung dua hifa yang secara seksual serasi dinamakan gametangia. (Waluyo, 2005).

Dari beberapa penelien sebelumnya jumlah spora dari mikroorganisme pada produksi lipase dengan penginduksi dari lemak hewani menunjukkan jumlah sebesar $1,7 \times 10^8$ cfu/gram dalam media fermentasi dedak padi (Diningtyas, 2009), serta $6,9 \times 10^6$ spora/ml pada produksi enzim dengan media fermentasi SSF dari limbah apel (Arisah, 2010).



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Hasil Ternak, Laboratorium Fisiko-Kimia Hasil Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya dan Laboratorium Kimia Fakultas MIPA Universitas Muhammadiyah Malang pada bulan April sampai dengan Juni 2010.

3.2. Materi Penelitian

3.2.1. Bahan Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah biakan *Mucor miehei* yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Brawijaya. Bahan untuk produksi enzim lipase: *Potato Dextrose Agar* (PDA) (E. Merck, Jerman), dedak gandum yang diperoleh dari pedagang pakan ternak di Kecamatan Karangploso Kabupaten Malang. NaH_2PO_4 (E. Merck, Jerman), KH_2PO_4 (E. Merck, Jerman), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (E. Merck, Jerman), CaCl_2 (E. Merck, Jerman), $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ (E. Merck, Jerman), NH_2CONH_2 , glukosa (E. Merck, Jerman) diperoleh dari Toko Sari Kimia Kota Malang dan lemak ayam bagian dada yang diperoleh dari pedagang ayam di Pasar Dinoyo Kota Malang. Bahan untuk analisa : minyak goreng (merk Filma). bufer asetat (asam asetat dan Na-asetat) (E. Merck, Jerman), CaCl_2 (E. Merck, Jerman), etanol 90 %, indikator *PhenolPhthalein*, KOH (E. Merck, Jerman) diperoleh dari Toko Sari Kimia Kota Malang. *Coomassie brilliant blue* G250 (E. Merck, Jerman), etanol 96 %, asam fosfat (E. Merck, Jerman) dan

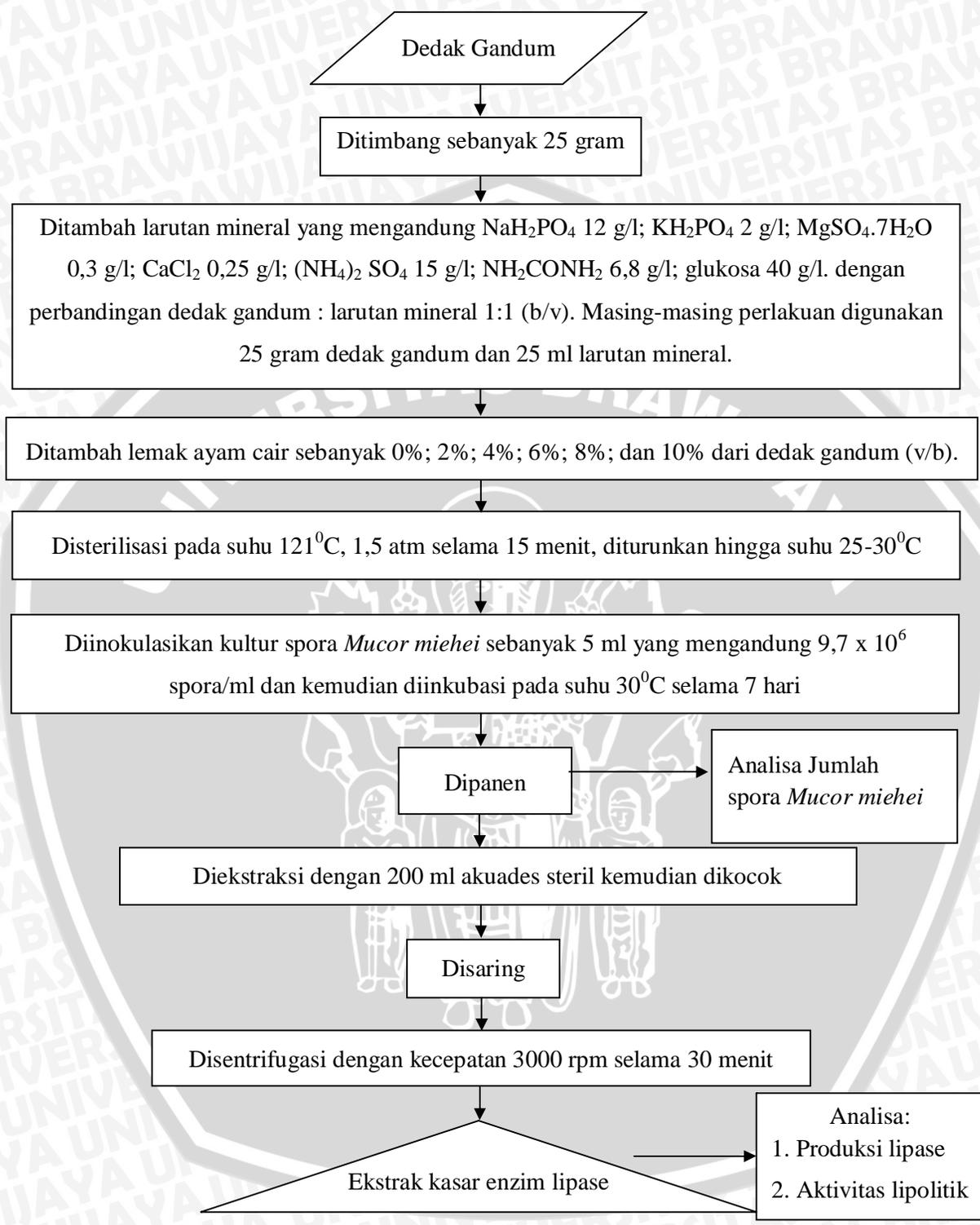
akuades, *Bovine Serum Albumin* (BSA) (E. Merck, Jerman) dari Laboratorium Kimia Fakultas MIPA Universitas Muhammadiyah Malang.

3.2.2. Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (HJ150 L, Mettler Instrument AG, Switzerland), pH meter (Schott Gerate CG-804), lemari pendingin (Model MR 173 PG, Mitsubishi Elec. Corp. Japan), *hot plate stirrer* (IKAMAG RED, Janke M. Kunkel), *autoclave* (HL 36 AE, Tokyo Hirayama Manufacturing Corp. Japan), sentrifugator (*Digisystem Laboratory Instrument Inc.*), *vortex* (VM 2000, *D.S. Instrument Inc.* Taipe-Taiwan), *haemocytometer* (Golden P. C. Medical Co. Ltd. China), *waterbath* (1003, Made in Sed Rep Germany), inkubator (WBT binder tipe 53, Jerman), spektrofotometer (*UV Visible Spectrophotometer Shimadzu*), blender (Sharp EM 11), mikroskop (Leica, Model CME, USA) dan beberapa alat gelas digunakan di laboratorium.

3.3. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah percobaan dengan rancangan percobaan berupa rancangan acak lengkap (RAL) menggunakan enam perlakuan dan empat kali ulangan. Keenam perlakuan yang dicobakan yaitu P0 (tanpa penambahan lemak ayam), P2 (penambahan 2% lemak ayam (v/b), P4 (penambahan 4% lemak ayam (v/b), P6 (penambahan 6% lemak ayam (v/b), P8 (penambahan 8% lemak ayam (v/b), P10 (penambahan 10% lemak ayam(v/b). Variabel pengamatan yang dilakukan meliputi produksi enzim lipase, aktivitas lipolitik dan analisa jumlah spora *Mucor miehei*, diagram alir dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Diagram Alir Penelitian Enzim Lipase *Mucor miehei*

3.4. Pelaksanaan Penelitian

3.4.1. Penyiapan Kultur Spora *Mucor miehei* (Purnomo dkk., 1996)

Penyiapan kultur dilakukan dengan teknik agar miring dengan menggunakan media *Potato Dextrose Agar*. Kultur *Mucor miehei* diinokulasikan pada media yang telah disterilisasi dan dipadatkan. Masa inkubasi dilakukan selama 120 jam sampai diperoleh miselia dan spora yang sudah tua dengan warna kehitam-hitaman. Kultur yang diperoleh dicuci dengan 8 ml air suling steril, dilakukan perhitungan spora dengan bantuan *haemocytometer* sehingga mengandung kurang lebih $9,7 \times 10^6$ spora/ml dan siap diinokulasikan.

3.4.2. Preparasi Lemak Ayam Cair

Preparasi untuk lemak ayam cair berasal dari lemak ayam bagian dada dengan memisahkan lemak dari daging dan kulit, dipotong kecil-kecil dimasukkan dalam wadah panci *stainless steel*, dipanaskan dengan cara memasukkan panci dalam air mendidih seperti pasteurisasi selama 5 menit pada suhu sekitar 70°C hingga keluar minyak cair, dipisahkan dari gumpalan lemak dan siap digunakan dalam keadaan cair.

3.4.3. Preparasi Tepung Dedak Gandum

Preparasi untuk tepung dedak gandum berasal dari dedak gandum dengan ukuran partikel yang berbeda-beda, sehingga terlebih dahulu dilakukan penggilingan jadi tepung dedak gandum, kemudian dilakukan pengayakan dengan kerapatan 80 mesh untuk mendapatkan ukuran yang kurang lebih sama dan disimpan dalam kantong plastik.

3.4.4. Produksi Enzim Lipase *Mucor miehei* (Fallony *et al.*, 2006) yang Dimodifikasi

Lipase *Mucor miehei* dipersiapkan dengan cara menginokulasikan spora *Mucor miehei* di dalam media fermentasi. Media fermentasi disiapkan dari dedak gandum dan larutan mineral dengan perbandingan 1:1 (b/v) serta ditambahkan lemak ayam cair sesuai dengan perlakuan 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10% (v/b dedak gandum). Larutan mineral terdiri dari NaH_2PO_4 12 g/l; KH_2PO_4 2 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g/l; CaCl_2 0,25 g/l; $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 15 g/l; NH_2CONH_2 6,8 g/l; glukosa 40 g/l. Medium disterilisasi pada suhu 121°C , 1,5 atm selama 15 menit. Setelah dingin, kultur *Mucor miehei* diinokulasikan pada media fermentasi sebanyak 5 ml sehingga mengandung kurang lebih $4,8 \times 10^7$ spora, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari. Hasil fermentasi disisihkan 5 gram untuk pengujian jumlah *Mucor miehei*. Ekstraksi dilakukan dengan penambahan akuades steril sebanyak 200 ml kemudian dikocok, hasil ekstraksi kemudian disaring, filtrat yang diperoleh kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh sebagai ekstrak kasar enzim lipase.

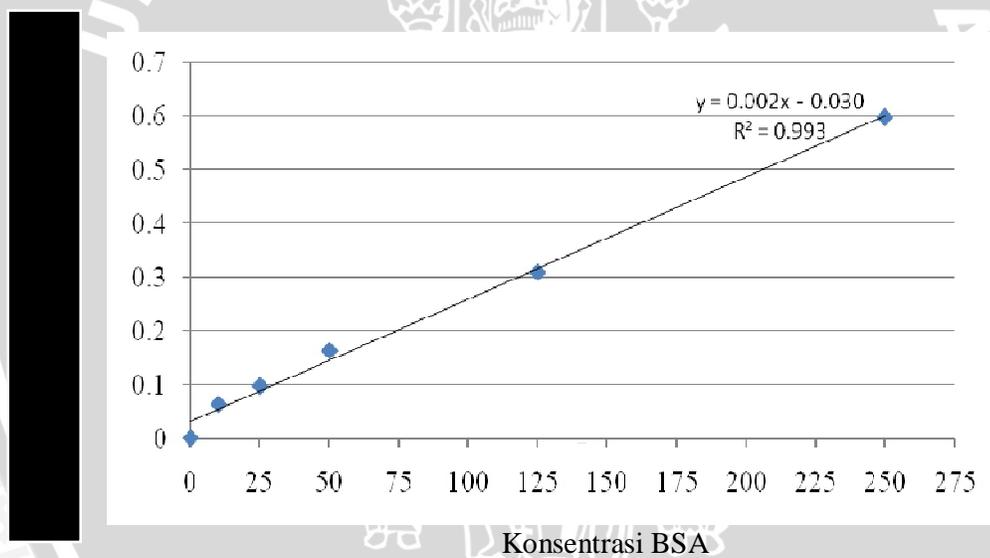
3.4.5. Analisa Produksi Lipase Menggunakan Metode Protein Terlarut (Bradford, 1976)

Pengujian protein terlarut dilakukan menggunakan pereaksi Bradford yang dibuat dari 100 mg *coomassie brilliant blue* G250 dilarutkan dalam 50 ml etanol kemudian dicampur dengan 100 ml asam fosfat 85% dan diencerkan dengan akuades 1000 ml. Setelah diencerkan, larutan tersebut disaring menggunakan kertas saring dan dimasukkan dalam botol gelap. Enzim diambil 5 ml dan ditambah dengan 5 ml pereaksi Bradford kemudian didiamkan pada suhu

ruang selama 10 menit. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum BSA (590 nm). Nilai absorbansi dimasukkan dalam persamaan kurva standar BSA yang telah dibuat sebelumnya. Data nilai absorbansi BSA pada panjang gelombang maksimum 590 nm dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Data nilai absorbansi BSA pada panjang gelombang maksimum 590 nm

Konsentrasi BSA (mg/ml)	Absorbansi
0	0
10	0,063
25	0,097
50	0,163
125	0,309
250	0,598



Gambar 2. Kurva standar BSA

3.4.6. Analisa Aktivitas Lipolitik (Anonim, 2006)

Pengujian aktivitas lipolitik dilakukan dengan dua gram minyak kelapa sawit dimasukkan dalam Erlenmeyer ditambahkan 4 ml bufer asetat 0,05 M pH 5,6 dari larutan asam asetat 0,2 M yang ditambahkan pada larutan Na-asetat 0,2 M hingga pH 5,6 kemudian diencerkan dengan akuades hingga 0,05 M, ditambah 1

ml larutan CaCl_2 1 M dan 1 ml larutan enzim hasil penyaringan kemudian diinkubasi suhu 30°C selama 60 menit. Ditambahkan etanol 96% 10 ml dan indikator *Phenolphthalein* 2-3 tetes kemudian dititrasi dengan KOH 0,01 N, hentikan jika terbentuk warna merah muda. Tentukan titrasi blangko, satu unit lipase didefinisikan sebagai pembebasan $1\ \mu\text{mol}$ asam lemak per menit pada suhu 30°C .

$$\text{Aktivitas lipolitik U/ml : } \frac{(A-B) \times N \text{ KOH} \times 1000}{W \times 60}$$

Keterangan :

A	: ml KOH titrasi sampel	1000	: konversi mmol ke μmol
B	: ml KOH titrasi blangko	W	: berat minyak (gram)
N KOH	: normalitas KOH	60	: waktu inkubasi (menit).

3.4.7. Penghitungan Jumlah Spora *Mucor miehei* (Perez, 2006)

Penghitungan jumlah spora *Mucor miehei* dengan perhitungan langsung menggunakan *haemocytometer* dengan cara membersihkan *haemocytometer* dan kaca penutup dengan sedikit etanol untuk membersihkan sisa-sisa minyak. Kaca penutup diletakkan pada permukaan hitung *haemocytometer*. Suspensi sampel yang akan dihitung dikocok, lalu diambil menggunakan pipet Pasteur. Ujung pipet diletakkan pada tepi kaca penutup, permukaan *haemocytometer* akan terpenyuh dengan cairan suspensi secara kapiler. *Haemocytometer* diletakkan pada pentas mikroskop, kemudian diamati dengan obyektif berkekuatan rendah dengan perbesaran 100 kali dan hitung jumlah spora yang terdapat pada 80 buah kotak kecil atau 5 kotak sedang dari total 25 buah kotak, yang terletak di dalam kotak bagian tengah yang berukuran $1\ \text{mm}^2$. Dalam kotak bagian tengah terdapat 25 buah kotak yang masing-masing terdiri dari 16 kotak kecil. Jumlah spora dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

Jumlah spora (sel/ml) = Jumlah spora pada 80 kotak kecil x 5 x 10 x 1000

Keterangan :

5 : 25 kotak sedang / 5 kotak yang dihitung.

10 : konversi dari 0,1 mm³ ketebalan permukaan ke 1 mm³.

1000 : konversi 1 mm³ ke 1 cm³ atau 1 ml.

3.5. Analisis Data

Data hasil pengamatan yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam dan dilanjutkan dengan uji jarak berganda duncan (UJBD) (Yitnosumarto, 1991).

3.6. Batasan Istilah

Lemak ayam : Minyak dalam keadaan cair dari lemak ayam bagian dada ayam yang didapatkan dengan cara dipanaskan pada suhu sekitar 70⁰ C selama 5 menit.

Produksi lipase : Produksi lipase ditentukan berdasarkan jumlah protein dalam suatu cairan dengan menggunakan pengujian protein terlarut.

Aktivitas lipolitik : Aktivitas lipolitik ditentukan berdasarkan kecepatan pembentukan produk, dinyatakan dalam satuan unit (U) dan satu unit aktivitas lipase didefinisikan sebagai 1 μmol asam lemak yang dibebaskan per menit.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pengaruh Penambahan Lemak Ayam terhadap Produksi Enzim Lipase

Hasil analisa ragam (Lampiran 1) menunjukkan bahwa penambahan lemak ayam sebagai penginduksi pada produksi enzim lipase *Mucor miehei* memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) pada produksi enzim lipase *Mucor miehei*. Rata-rata produksi enzim lipase dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 3. Rata-rata produksi enzim lipase dan hasil UJBD

Perlakuan	Enzim lipase (mg/ml)
P0 (tanpa penambahan lemak ayam)	10,811 ^a ± 2,704
P2 (penambahan lemak ayam 2%)	12,669 ^{ab} ± 2,082
P4 (penambahan lemak ayam 4%)	14,969 ^{ab} ± 2,505
P6 (penambahan lemak ayam 6%)	16,392 ^b ± 2,006
P8 (penambahan lemak ayam 8%)	17,833 ^b ± 1,682
P10 (penambahan lemak ayam 10%)	19,118 ^b ± 1,853

Keterangan: Superskrip a, ab, b yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$).

Berdasarkan Tabel 3 dapat diketahui bahwa penambahan lemak ayam sebagai penginduksi sebanyak 0%, 2% dan 4% antar perlakuan tidak berbeda nyata tetapi berbeda sangat nyata dengan perlakuan penambahan lemak ayam 6% sampai 10%. Penambahan 2% dan 4% tidak berbeda nyata dengan penambahan 6% sampai 10%. Seiring dengan peningkatan penambahan lemak ayam menunjukkan peningkatan produksi enzim sebanyak 8,307 mg/ml, menunjukkan penambahan lemak ayam dapat meningkatkan produksi enzim lipase *Mucor miehei* dari efek penambahan sumber karbon dari lemak ayam pada media fermentasi, dengan nilai tertinggi pada penambahan lemak ayam sebanyak 10% yaitu 19,118 mg/ml.

Lemak ayam sebagai penginduksi lipase *Mucor miehei* pada Tabel 3 menunjukkan perbedaan sangat nyata pada penambahan 6 % hingga 10 % yang diproduksi oleh *Mucor miehei* selama waktu fermentasi dalam bentuk enzim ekstraseluler yang berupa protein, enzim ekstraseluler disekresikan melalui dinding sel dan dapat berfungsi di luar sel. Lemak ayam sebagai penginduksi lipase *Mucor miehei* kerana lemak terdiri dari gliserol yang merupakan kompleks alkohol dan asam lemak. Lemak tersusun dari karbon, hidrogen dan oksigen yang merupakan ester dari gliserol dan asam lemak sebagai sumber nutrien dalam media dalam produksi enzim induktif yaitu lipase, satu molekul lemak ayam terdiri dari 95% asam lemak dan 5% gliserol sebagai sumber karbon terutama palmitat dan oleat. Sharma, Chisti and Banerjee (2001) menambahkan bahwa produksi lipase induktif dapat ditambahkan berupa karbon, nitrogen dan dipengaruhi oleh ion logam yang dapat meningkatkan produksi lipase pada mikroorganismenya.

Peningkatan nilai produksi enzim lipase pada penambahan penginduksi lemak ayam 6 % hingga 10 %. Lemak ayam dalam media fermentasi yang tidak didapatkan oleh kultur *Mucor miehei* pada media sebelumnya sebagai sumber energi menyebabkan perubahan lingkungan mikroorganismenya dapat menginduksi terbentuknya enzim lipase. Lemak ayam dalam media dimanfaatkan untuk sintesis sebagai hidup pokok dengan cara adaptasi yang dilakukan yaitu produksi enzim lipase sesuai dengan penginduksi yang ditambahkan.

Sumber karbon dari lemak ayam menyebabkan kecepatan sintesis suatu enzim dapat dirangsang sampai beberapa ribu kali yang pembentukannya dirangsang oleh adanya substrat penginduksi. Mikroorganismenya memerlukan air,

sumber energi, karbon, nitrogen, mineral dan beberapa vitamin serta oksigen bagi mikroorganisme yang bersifat aerob (Rahman, 1992).

Sumber karbon dari penambahan lemak nabati dan hewani menunjukkan peningkatan enzim lipase yang diproduksi, dibandingkan dengan kultur tanpa penambahan lipid sebagai penginduksi pada media fermentasi. Penambahan bahan penginduksi dari jenis lemak nabati menunjukkan peningkatan aktivitas lipase hingga 24 kali dari tanpa penambahan lemak (Fallony *et al.* 2006).

4.2. Pengaruh Penambahan Lemak Ayam terhadap Aktivitas Lipolitik

Hasil analisa ragam (Lampiran 2), menunjukkan bahwa penambahan lemak ayam sebagai penginduksi pada produksi enzim lipase *Mucor miehei* memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) pada aktivitas lipolitik enzim lipase *Mucor miehei*. Rata-rata aktivitas lipolitik dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 4. Rata-rata aktivitas lipolitik dan hasil UJBD

Perlakuan	Aktivitas lipolitik (U/ml)
P0 (tanpa penambahan lemak ayam)	0,998 ^a ± 0,045
P2 (penambahan lemak ayam 2%)	1,035 ^{ab} ± 0,026
P4 (penambahan lemak ayam 4%)	1,083 ^{ab} ± 0,045
P6 (penambahan lemak ayam 6%)	1,138 ^b ± 0,049
P8 (penambahan lemak ayam 8%)	1,195 ^b ± 0,032
P10 (penambahan lemak ayam 10%)	1,358 ^c ± 0,074

Keterangan: Superskrip a, ab, b, c yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$).

Berdasarkan Tabel 4 dapat diketahui bahwa dengan penambahan lemak ayam sebagai penginduksi pada aktivitas lipolitik menunjukkan penambahan sebanyak 0%, 2% dan 4% antar perlakuan tidak berbeda nyata tetapi penambahan 0% berbeda sangat nyata dengan penambahan lemak ayam 6% dan 10%. Penambahan 2% dan 4% tidak berbeda nyata dengan penambahan 6% dan 8%, tetapi berbeda nyata dengan penambahan 10%. Perlakuan terbaik didapatkan

pada penambahan lemak ayam 10% dengan nilai lipolitik dan produksi lipase tertinggi yaitu dengan proses penguraian substrat atau pembentukan produk terbanyak berupa asam lemak dan gliserol.

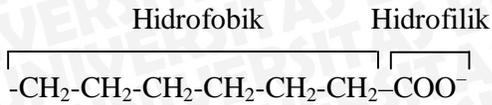
Penambahan lemak ayam dengan nilai aktivitas lipolitik tertinggi karena lemak ayam dimanfaatkan sepenuhnya oleh *Mucor miehei* sebagai sumber nutrisi yang didapatkan pada fase stasioner. Perbedaan sangat nyata pada penambahan 6% dan 10% pada aktivitas lipolitik sama dengan jumlah produksi lipase mengindikasikan peningkatan jumlah enzim lipase yang dihasilkan oleh *Mucor miehei* pada fase pertumbuhan. Lidya dan Djenar (2000) menyatakan bahwa fase pertumbuhan logaritmik merupakan fase pembelahan mikroorganisme terjadi sangat cepat secara eksponensial. Sel mikroorganisme mengalami reaksi metabolisme yang maksimum.

Penambahan lemak ayam sebagai penginduksi yang dimanfaatkan sebagai sumber karbon dengan memproduksi enzim lipase terlebih dahulu untuk dapat mensintesis sumber karbon dari lemak ayam, sehingga terjadi peningkatan aktivitas lipolitik seperti pada Tabel 4. Perubahan lingkungan dengan adanya penginduksi dapat membentuk enzim adaptif dari mikroorganisme dalam media fermentasi, pada awal fermentasi belum tampak pertumbuhan yaitu pada fase lag atau adaptasi dan baru terbentuk enzim dengan kecepatan reaksi enzimatik yang pada umumnya dipengaruhi kadar substrat. Aktivitas enzim banyak sekali dipengaruhi oleh konsentrasi substrat yang digunakan (Hill *et al.*, 2001), jenis media uji yang digunakan (Kombong, 2004), konsentrasi enzim, pH, adanya aktivator dan suhu (Hariyono, 1997).

Enzim lipase dari *Mucor miehei* mempunyai kekhasan posisi, untuk menghidrolisis lemak ayam posisi -1 dan -3 gliserida, umumnya dari jenis mikroorganisme dan merupakan akibat dari ketidak mampuan ikatan ester posisi -2 untuk memasuki sisi aktif enzim karena gangguan keruangan. Enzim lipase memiliki keunikan lain yaitu sisi aktif lipase yang tertutup oleh *lid*, sehingga belum dapat berinteraksi dengan substrat, kekhasan dari sisi aktif enzim lipase ini bersifat hidrofobik yang akan bereaksi dengan lemak. Pengaktifan sisi aktif enzim dilakukan agitasi dengan perlakuan panas untuk melepaskan lemak cair atau dengan homogenasi untuk menghancurkan membran globula lemak (Daulay, 1991).

Lemak ayam sebagai sumber energi utama dalam metabolisme dapat meningkatkan nilai aktivitas lipolitik seperti pada Tabel 4, lipase yang disintesis oleh *Mucor miehei* menunjukkan penambahan lemak ayam 10 % dengan nilai lipolitik tertinggi, selain itu jenis mikroorganisme juga sangat berpengaruh. Lemak merupakan komponen utama dalam zat makanan selain karbohidrat dan protein, yang berfungsi sebagai sumber energi utama. Penambahan asam oleat sebagai penginduksi lipase *Mucor miehei* menunjukkan nilai aktivitas lipolitik lebih rendah dari penginduksi lemak ayam yaitu sebesar 1,034 U/ml (Paramitha, 2010).

Lemak memiliki struktur yang spesifik (Gambar 2), yaitu memiliki gugus hidrokarbon hidrofobik yang lebih banyak dari gugus hidrokarbon hidrofilik, dengan satu rantai karbon terdapat dua sifat yang berbeda, yaitu sifat hidrofobik pada gugus hidrokarbonnya dan sifat hidrofilik pada karboksilnya.



Gambar 3. Sifat struktur lemak (Fessenden *and* Fessenden, 1997).

4.3. Pengaruh Penambahan Lemak Ayam terhadap Jumlah *Mucor miehei*

Hasil analisa ragam (Lampiran 3) menunjukkan bahwa penambahan lemak ayam sebagai penginduksi pada produksi enzim lipase *Mucor miehei* memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) pada jumlah *Mucor miehei*. Rata-rata jumlah spora *Mucor miehei* dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 5. Rata-rata jumlah *Mucor miehei* dan hasil UJBD

Perlakuan	Jumlah spora (log spora/ml)
P0 (tanpa penambahan lemak ayam)	6,488 ± 0,208
P2 (penambahan lemak ayam 2%)	6,587 ± 0,102
P4 (penambahan lemak ayam 4%)	6,655 ± 0,126
P6 (penambahan lemak ayam 6%)	6,791 ± 0,167
P8 (penambahan lemak ayam 8%)	6,855 ± 0,235
P10 (penambahan lemak ayam 10%)	6,738 ± 0,224

Berdasarkan Tabel 4 dapat diketahui bahwa penambahan lemak ayam sebagai penginduksi terhadap jumlah spora *Mucor miehei* dapat meningkatkan jumlah spora yang relatif kecil disebabkan oleh jumlah nutrisi yang disintesis oleh mikroorganisme dengan jumlah yang sama pada fase eksponensial. Fase eksponensial merupakan fase mikroorganisme melakukan pembelahan secara biner yang banyak dipengaruhi oleh jumlah nutrisi yang tersedia (Dhanang, 2008).

Lemak ayam yang ditambahkan menunjukkan peningkatan jumlah spora *Mucor miehei* dengan nilai tertinggi pada penambahan konsentrasi 8% dan terjadi penurunan jumlah spora pada penambahan konsentrasi lemak ayam 10%, dari 6,855 log spora/ml menjadi 6,738 log spora/ml. Penambahan lemak ayam sebagai penginduksi serta sebagai komponen nutrisi dalam proses metabolisme. Walau

(2005) menyatakan bahwa kapang dapat menggunakan berbagai komponen makanan dari yang sederhana sampai yang kompleks dengan memproduksi enzim hidrolitik seperti amilase, pektinase, proteinase dan lipase. Enzim-enzim tersebut memungkinkan kapang untuk dapat tumbuh pada bahan yang mengandung pati, pektin, protein dan lipid.

Penambahan substrat optimum dapat dimetabolisme sebaik-baiknya oleh mikroorganisme untuk memenuhi kebutuhan asam lemak dan karbon. Hasil pengamatan terhadap jumlah *Mucor miehei* menunjukkan bahwa penambahan lemak ayam sebagai substrat penginduksi optimum pada penambahan sebanyak 8% karena pada penambahan 10% menunjukkan penurunan, yang dapat disebabkan oleh adanya zat antimikroba dari lemak ayam yang terdiri dari asam lemak rantai sedang dan rantai panjang (C_{12} - C_{20}) dan penumpukan hasil akhir dapat menjadi zat penghambat pertumbuhan jumlah *Mucor miehei* pada penambahan lemak ayam 10% terjadi penurunan. Jay (1992) menyatakan bahwa asam lemak C_{12-16} dapat berfungsi sebagai bahan antimikroba.

Mucor miehei memerlukan komponen karbon organik untuk memenuhi kebutuhan karbon untuk memenuhi kebutuhan energi. Sumber karbon dapat berasal dari lemak ayam yang tersusun dari asam lemak dengan kombinasi asam lemak jenuh dan asam lemak tak jenuh yang dapat mempengaruhi terbentuknya jumlah akhir spora *Mucor miehei*. de Man (1997) menjelaskan bahwa lemak terdiri dari gliserol yang merupakan kompleks alkohol dan asam lemak. Lemak berisi elemen-elemen seperti karbon, hidrogen dan oksigen yang merupakan ester dari gliserol dan asam lemak.

Produksi enzim lipase *Mucor miehei* menunjukkan jumlah spora yang diinokulasikan pada media fermentasi, mengalami penurunan jumlah *Mucor miehei* setelah diinkubasi. Selama inkubasi terjadi fase adaptasi mikroorganisme dengan media fermentasi yang baru dengan pembentukan enzim-enzim baru. Menurut Waluyo (2005), fase-fase pertumbuhan mikroorganisme dapat dibagi menjadi fase adaptasi, fase pertumbuhan logaritmik, fase pertumbuhan statis dan fase kematian. Fase adaptasi merupakan fase penyesuaian diri dengan substrat dan kondisi lingkungan, diperlukan waktu penyesuaian untuk mensintesis enzim-enzim yang dibutuhkan selama proses metabolisme. Lidya dan Djenar (2000) menambahkan mikroorganisme yang diinokulasikan dalam bentuk spora, dengan memerlukan sedikit waktu akan berubah menjadi sel vegetatif.

Media fermentasi dedak gandum yang digunakan memenuhi kebutuhan dasar sebagai sumber energi, seperti sumber karbon dan mineral yang berasal dari lemak ayam untuk biosintesis dan pemeliharaan sel. Perlu juga zat pelengkap bagi mikroorganisme adalah asam-asam amino, asam-asam nukleat yang dibutuhkan dalam jumlah yang sesuai, serta vitamin-vitamin yang merupakan bagian dari koenzim yang mempunyai fungsi enzimatik katalitik dan digunakan dalam jumlah kecil yang didapatkan dari dedak gandum. Putranto, Santoso, Panji, Suharyanto dan Budiani, (2006) menyatakan bahwa kapang merupakan mikroorganisme yang 80% kebutuhan substratnya dipenuhi oleh makromolekul yang memiliki rantai karbon.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan lemak ayam sebagai bahan penginduksi enzim lipase *Mucor miehei* dapat meningkatkan produksi enzim lipase dan aktivitas lipolitiknya, dan tidak berbeda terhadap jumlah spora.

Perlakuan dengan penambahan lemak ayam 10% memberikan nilai tertinggi pada produksi lipase dan aktivitas lipolitik yang masing-masing sebesar 19,118 mg/ml dan 1,358 U/ml. Penambahan lemak ayam 8% menunjukkan nilai tertinggi pada jumlah spora *Mucor miehei* yaitu 6,855 log spora/ml. Penambahan lemak ayam sebagai penginduksi enzim lipase *Mucor miehei* minimum 8% hingga 10% dilihat dari nilai produksi dan aktivitas lipolitik tertinggi.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka disarankan untuk penggunaan lemak ayam sebagai bahan penginduksi enzim lipase *Mucor miehei* dengan hasil terbaik yaitu penambahan sebesar 8% dan 10% pada media fermentasi. Pemurnian ekstrak kasar enzim lipase *Mucor miehei* perlu dilakukan agar diperoleh aktivitas enzim yang lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Akon, C.C. 1998. Food Lipids, Chemistry, Nutritions and Biotechnology. Marcell Dekker Inc. New York.
- Alonso, F.O.M., E.B.L.Olivera, G.M. Dellamora-Ortiz and F.V. Pereira-Meirelles. 2005. Improvement of Lipase Production at Different Stirring Speeds and Oxygen Levels. B. J. Chem. Eng. 22 (01): 9-18.
- Anonim, 2006. Pelatihan singkat Rekayasa Bioproses dalam Bioteknologi dan Industri. Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi. Bogor.
- Arisah, D. 2010. Pengaruh Penambahan *Whey* Bubuk dalam Media Fermentasi Limbah Apel Terhadap Produksi Enzim Renin *Mucor Pusillus*. Jurusan Teknologi Hasil Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Malang.
- Attiya, S.H and S.M. Ashour. 2002. Biodegradation of Agro-industrial Orange Waste Under Solid State Fermentation and Natural Environmental Conditions. J. Egyp Bio. 4: 23-30.
- Aunstrup, K., 1980. Production of Extracellular Enzyme. Academic Press. New York
- Balassa, L.L., and G.P. Fanger. 1971. Microencapsulation in The Food Industry. CRC Crit. Rev. Food Technol. 2:245.
- Belitz, H.D and W. Grosch. 1999. Food Chemistry. Springer-Verlag Heidelberg. Berlin.
- Bhardwaj, K., A. Raju and Rajasekharan. 2001. Identification Purification and Characterization of A Thermally Stable Lipase From Rice Bran. A New Member of The (Phospo) Lipase Family. J. Plant Physiology. 127: 1728-1738.
- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochem. 72: 248-254.
- Daulay, D. 1991. Buku/Monograf Fermentasi Keju. PAU Pangan dan Gizi. IPB. Bogor.
- de Man, J.M. 1997. Kimia Makanan. Penerjemah Kosasih Padmawinata. Edisi Kedua. Penerbit ITB. Bandung.

- Dhanang, P. 2008. Pertumbuhan Sel Bakteri. http://www.Multiply.Global.curr_reply_to.id/coretan%20dan%20catatan_%20dhanang%20sel%20bakteri_files/36.htm. Diakses Tanggal 29 Juli 2010.
- Diningtyas, R.N., 2009. Pengaruh Penambahan Lemak Sapi sebagai Penginduksi Lipase terhadap Jumlah *Aspergillus niger*, Aktivitas dan Produksi Lipase. Program Studi Teknologi Hasil Ternak. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Fallony, G., J.C. Armas, J.C.D. Mendoza and J.L.M. Hernandez, 2006. Production of Extracellular lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. Food Technol. Biotech. 44 (2): 235-240.
- Fardiaz, S. 1992. Mikrobiologi Pangan 1. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Fessenden, R.J. and J.S. Fessenden. 1997. Dasar-dasar Kimia Organik. Binarupa Aksara. Jakarta
- Fox, P.F and P.L.H. McSweeney. 1991. Rennets: Their Role in Milk Coagulating and Cheese Ripening. In Law, B.A: Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk. 2nd Ed. Chapman and Hall. London.
- Fressner, W.D., 2000. Biocatalysis from Discovery to Application. Springer Verlag. Berlin.
- Hariyono, H.N. 1997. Enzimologi. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Malang.
- Herdianto, Y., 2009. Dedak padi. <http://yanherdiantotanjung.blogspot.com/2009/4/dedak-padi.html>. Diakses Tanggal 24 Nopember 2010.
- Herlina, N., M.H.S. Ginting, 2002. Lemak dan Minyak. USU digital library. Medan.
- Hidayat, M.C. Padaga, dan S. Suhartini. 2006. Mikrobiologi Industri. Penerbit ANDI. Yogyakarta.
- Hill, C.G., S. Ghannouchi and H.S. Garcia, 2001. Lypolysis of butter oil by immobilized lamb pregastric esterase: I. Uniresponse kinetics-pH and Temperature Effects. J. Dairy science. 84:1034-1043.
- Jay, J.M. 1992. Modern Food Microbiology. 4th edition. Chapman and Hall. New York.
- Judoamidjojo, M., A.A Darwis., dan E.G Said. 1992. Teknologi Fermentasi. Edisi 1. Cetakan 1. Rajawali Press. Jakarta.

- Kamini, N.R., J.G.S. Mala and R. Puvanakrishnan. 1998. Lipase Production from *Aspergillus niger* by Solid State Fermentation Using Gingelly Oil Cake. *Process Biochem.* 33(5):505-511.
- Khasmiri, M.A., A. Adnan and B.W. Butt. 2006. Production, Purification and Partial Characterization of Lipase from *Trichoderma viride*. *American J. of Biotech.* Vol 5 (10): 878-882.
- Koblitz, M.G.B. and G.M. Pastore. 2006. Purification and Biochemical Characterization of an Extracellular Lipase Produced by a New Strain of *Rhizopus sp.* *Universidade Estadual.* 30 (3): 494-502.
- Kombong, H. 2004. Evaluasi Daya Hidrolitik Enzim Glukoamilase dari Filtrat Kultur *Aspergillus niger*. *J. Ilmu Dasar.* 5 (1): 16-20.
- Lehninger, A.L. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia.* (Alih bahasa: Maggy Thenawidjaja). Penerbit Erlangga, Jakarta
- Lidya, B. dan N. S. Djenar. 2000. *Dasar Bioproses.* Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Departemen Pendidikan.
- Mala, J.G. Edwinouver, N.R. Kamini and R. Puvanakrishnan. 2007. Mixed Substrate Solid State Fermentation for Production and Extraction of Lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. *J. Gen. Appl. Mikrobiol.* 53: 247-253.
- Muchtadi, D.N., S. Palupi dan M. Astawan. 1992. *Enzim Dalam Industri Pangan.* Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Nurhasanah dan D. Herasari, 2008. Pemurnian enzim lipase dari bakteri lokal dan aplikasinya dalam reaksi esterifikasi. FMIPA Universitas Lampung. Lampung.
- Pahrudin, 2006. *Aplikasi Bahan Pengawet untuk Memperpanjang Umur Simpan Mie Basah Matang.* Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Pandey, A., P. Selvakumar, C. R. Soccol, and P. Nigam. 2008. Solid State Fermentation for The Production of Industrial Enzymes. <http://www.scitopics.com>. Diakses tanggal 15 Juli 2010.
- Panji T., Suharyanto, N. Arini, 2008. Lipase Spesifik 1,3-gliserida dari Fungi Lokal untuk Biokonversi CPO menjadi Diasilgliserol. *Menara Perkebunan.* 76 (1): 11-22.
- Paramitha, S., 2010. Amobilisasi Enzim Lipase, dari *Mucor miehei* Menggunakan Matrik Polietilen dengan Glutaraldehyde. Jurusan Kimia Fakultas

- Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.
- Perez, S. 2006. Cell Counts Using Improved Neubauer Haemocytometer. <http://people.oregonstate.edu>. Diakses tanggal 4 Mei 2010.
- Pomeranz. Y., M.M. MacMasters. 1968. Baker's Digest. 42 (4) 24.
- Purnomo, H., Indratiningsih, I.M., Sugita, K.A., Rihastuti. 1996. Rekayasa Paket Teknologi Produksi Starter dan Enzim Mikroba dan Paket Aplikasinya pada Pengolahan Susu. UMM Press. Malang.
- Putranto, R.A., D. Santoso, T. Panji, Suharyanto dan A. Budiani. 2006. Karakterisasi Gen Penyandi Lipase dari Kapang *Rhizopus oryzae* dan *Absidia corymbifera*. J. Menara Perkebunan. 74 (1): 23-32.
- Rahayu, K. 1986. Isolasi dan Pengujian Aktivitas Enzim. PAU Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Raimbault, M. 1998. General and Microbiological Aspects of Solid Substrate Fermentation. Electronic J. of Biotech. 1 (3): 174-188.
- Ranhotra, G.S., J.H. Gelroth, B.K.Glaser, and P.V. Reddy, 1994. Nutritional Profile of a Fraction from Air-Classified Bran Obtained from a Hard Red Wheat. Cereal Chem. 71 (4): 321-324.
- Rahman, A. 1992. Teknologi Fermentasi. Arcan. Jakarta.
- Santoso, I., Sitaresmi, D., Prayudi dan Kudin, 2002. Aktivitas Lipolitik *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* isolat UICC No. 6. 6 (3): 125-131.
- Schipper M.A.A., 1976. Induced azygosporeformation in *Mucor* (*Rhizomucor*) *pussilus* by *Absidia corymbifera*. Centraalbureau voor Schimmelcultures. 42: 141-144.
- Sharma, R., Y. Chisti, U.C. Banerjee. 2001. Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipase. Biotech Advances. 19: 627-662.
- Sholichah, N.A., 2010. Amobilisasi Enzim Lipase *Mucor miehei* menggunakan Matriks Silikigel. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.
- Silveira, G.G., G.M. Oliveira, E.J. Ribeiro, R. Monti, and J. Contiero. 2005. Microbial Rennet Produced by *Mucor miehei* in Solid-State and Submerged Fermentation. Brazilian Archives of Biology and Technology. 48 (6): 931-937.

- Singh, T.K., M.A.M Drake and K.R. Cadwallader. 2003. Flavour of Cheddar Cheese: a Chemical and Sensory Perspective. *Food Science and Food Safety*. 2:139-162
- Sirrit, S.D. 2002. Asam Lemak dan Asam Esensial. *Jurnal Seminar Nasional PATPI*. Malang.
- Solar, R.K., and K.R. Aneja. 2007. Thermophilic Fungi Taxonomy and Biogeography. *J. of Agri Tech*. 3 (1): 77-107.
- Stanbury, P. F. and A. Whitaker. 1984. *Principles of Fermentation Technology*. Pergamon Press Ltd. Oxford
- Sumantha, A., C. Larroche, and A. Pandey. 2006. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Protease: A Prespective. *Food Tech Biotech*. 44 (2): 211-220.
- Sumiarsih, S. 2003 *Diktat Mikrobiologi Dasar*. Jurusan Ilmu Tanah Fakultas Pertanian, UPN Veteran. Jogjakarta.
- Suzuki, T., Y. Mushiga, T. Yamane and S. Shimizu, 1988. Mass production of lipase by fedbatch culture of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Microbiol. Tech*. 27 (4): 417-422.
- Trevor, P. 1991. *Understanding Enzyme*, 3rd ed. Ellis Harwood, New York, 306–307.
- Waluyo, L. 2005. *Mikrobiologi Umum*. Universitas Muhammadiyah Malang Press. Malang.
- Winarno, F.G. 2004. *Kimia Pangan dan Gizi*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- _____, F. G. 1995. *Enzim pangan*. PT. Gramedia pustaka Utama Jakarta.
- Wong, D. W. S. 1995. *Food Enzymes Structure and Mechanism*. Chapman & Hall Inc. New York.
- Yitnosumarto, S. 1991. *Percobaan Perancangan, Analisis, dan Interpretasinya*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.