



## PRODUKSI LIPASE DARI ISOLAT KAPANG HASIL MUTASI UNTUK TRANSESTERIFIKASI

### Lipase Production by Mutant Fungal Isolates for Transesterification

Galih Cendana Nabilasani<sup>1</sup>, Trismilah<sup>2,\*</sup>, Dadang Suhendar<sup>2</sup>, Nisa Rachmania Mubarik<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

<sup>2</sup>Laboratorium Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika, BPPT, Tangerang Selatan 15314

<sup>3</sup>Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

\*Email: trismilah@bppt.go.id

#### ABSTRACT

Lipase is used amongst others in biodiesel production, namely in the transesterification reaction. Kernel B (KB) was a fungus isolated from the waste of palm kernel and seed. The fungus produced lipase that catalysed the transesterification reaction with a lower activity compared to that of AK Amano commercial lipase. The purpose of this study was to obtain mutant fungi with higher transesterification activities than the wild type (KB). The mutation process was carried out using ultraviolet (UV) light, ethyl methane sulfonate (EMS), and *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NMNG) on KB fungus. The mutations using UV light produced 11 isolates, of which isolate m4.1KB1 produced a higher transesterification activity ( $0.172 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) compared to the wild type. Mutant m5.7KB, which was generated from mutant m4.1KB1 treated using EMS, had its transesterification activity decreased to only  $0.051 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Mutant m6.0,3KB2, which was resulted through NMNG treatment, experienced an increase in transesterification activity which was 91.2% higher than that of KB.

**Keywords:** ethyl methane sulfonate, lipase, mutant fungi, *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, ultraviolet

#### ABSTRAK

Lipase dimanfaatkan salah satunya dalam produksi biodiesel, yaitu dalam reaksi transesterifikasi. Kernel B (KB) merupakan kapang yang diisolasi dari limbah inti dan biji kelapa sawit, yang menghasilkan lipase sebagai katalis dalam reaksi transesterifikasi. Namun aktivitas transesterifikasi yang dihasilkan oleh lipase dari KB lebih rendah dibandingkan dengan lipase komersial AK Amano. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan mutan kapang dengan aktivitas transesterifikasi yang lebih tinggi dibandingkan tipe liarnya (KB). Proses mutasi dilakukan dengan menggunakan sinar ultraviolet (UV), *ethyl methane sulfonate* (EMS), dan *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NMNG) terhadap kapang KB. Mutasi KB dengan menggunakan sinar UV menghasilkan 11 isolat, dimana isolat dengan kode m4.1KB1 menghasilkan aktivitas transesterifikasi yang lebih tinggi dibandingkan tipe liar, yaitu  $0,172 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Mutan m5.7KB, yang dihasilkan dari mutan m4.1KB1 dengan perlakuan EMS, mengalami penurunan aktivitas transesterifikasi hingga hanya sebesar  $0,051 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Mutan m6.0,3KB2 hasil perlakuan NMNG mengalami peningkatan aktivitas transesterifikasi sebesar 91,2% lebih tinggi dari KB.

**Kata Kunci:** ethyl methane sulfonate, kapang mutan, lipase, *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, ultraviolet

## PENDAHULUAN

Lipase memiliki kemampuan dalam mengkatalisis berbagai reaksi, yaitu hidrolisis, esterifikasi, transesterifikasi, dan aminolisis. Kemampuan lipase dalam mengkatalisis berbagai jenis reaksi disebabkan oleh stereokimia lipase yang kompleks karena adanya protein “backbone” yang fleksibel (Ozturk 2001). Lipase adalah salah satu biokatalisator yang sedang dikembangkan saat ini dan merupakan enzim yang mempunyai daya katalitik terhadap lemak dan minyak. Saat ini lipase dimanfaatkan salah satunya dalam produksi biodiesel, yaitu dalam reaksi transesterifikasi (Tran et al. 2012). Transesterifikasi merupakan reaksi antara trigliserida dan alkohol dengan bantuan katalis, serta akan menghasilkan metil ester yang memiliki kemiripan sifat fisika dengan solar diesel (Suryanto et al. 2015). Metil palmitat, metil oleat, metil elaidat, metil stearat dan metil linoleat merupakan senyawa metil ester yang dapat diperoleh melalui transesterifikasi (Aziz et al. 2016). NaOH, KOH, dan NaOCH<sub>3</sub> adalah katalis kimiawi yang umum digunakan dalam reaksi transesterifikasi (Thanh et al. 2012). Penggunaan katalis kimiawi dalam reaksi transesterifikasi memiliki kelemahan, antara lain bersifat toksik, mahal, dan produk yang dihasilkan tidak murni sehingga perlu melalui tahap purifikasi (Puspitaningati et al. 2013). Penggunaan enzim sebagai biokatalis memiliki keunggulan, yaitu lebih ramah lingkungan, hemat energi, dan produk akhir yang lebih murni (Rahmah 2012). Selain itu, enzim bersifat sangat efisien, bersifat spesifik, tidak menghasilkan produk sampingan, dan produk akhir yang dihasilkan umumnya lebih murni karena tidak terkontaminasi sehingga dapat menekan biaya produksi dan mengurangi efek kerusakan terhadap lingkungan (Susanti dan Fibriana 2017).

Lipase dapat dihasilkan oleh tumbuhan, hewan dan mikroorganisme. Menurut Pratiwi et al. (2013) mikroorganisme merupakan sumber utama penghasil lipase yang saat ini digunakan. Mikroorganisme memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam menghasilkan lipase tergantung pada jenis lipase yang dimiliki dan keadaan lingkungan serta media yang digunakan saat produksi enzim. Penggunaan lipase sebagai katalis dalam berbagai bidang industri masih terbatas

karena memiliki harga yang cukup tinggi. NaOH merupakan katalis basa yang umum digunakan dalam transesterifikasi karena memiliki harga yang lebih murah dibandingkan lipase komersil (Novozym 435). Novozym 435 di jual seharga US\$ 0,14/g sedangkan NaOH US\$ 0,006/g (Fjerbaek et al. 2009).

Peningkatan kemampuan mikroorganisme selain dengan menggunakan rekayasa genetika dan optimasi media dapat juga dilakukan dengan mutasi menggunakan sinar ultraviolet dan bahan kimia (Tapia et al. 2012). *Aspergillus* sp. dengan kode TL-12(3) mengalami peningkatan aktivitas enzim lipase setelah dilakukan mutasi. Aktivitas lipase yang dihasilkan *Aspergillus* sp. TL-12(3) mengalami peningkatan 175%, 340%, dan 575% setelah dimutasi dengan ultraviolet yang dilanjutkan dengan EMS (*Ethyl Methanesulfonate*) dan tahap akhir dimutasi dengan NMNG (*N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine*). Lipase yang dihasilkan berpotensi digunakan pada berbagai bidang industri (Tagore dan Narasu 2014).

Laboratorium Teknologi Bioindustri (LTB), PTB, LAPTIAB–BPPT, di kawasan PUSPIPTEK, Serpong, Tangerang Selatan memiliki isolat kapang *Kernel B* yang menghasilkan enzim lipase. Enzim lipase yang dihasilkan memiliki aktivitas transesterifikasi yang rendah, yaitu sebesar 0,157 U·mg<sup>-1</sup>, jika dibandingkan dengan lipase komersial AK amano yang menghasilkan aktivitas transesterifikasi 1,210 U·mg<sup>-1</sup>. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan mutasi terhadap isolat kapang kode KB dengan menggunakan sinar UV dan bahan kimia EMS dan NMNG sehingga diperoleh kapang mutan yang memiliki aktivitas transesterifikasi yang lebih tinggi dibandingkan tipe liarnya (KB).

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan lokasi penelitian

Penelitian ini telah dilakukan dari bulan September 2017 sampai Mei 2018 di LTB, LAPTIAB, BPPT, kawasan Pusat Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (PUSPIPTEK) Serpong, Tangerang Selatan.

### Bahan yang digunakan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat kapang dengan kode Kernel B (KB) koleksi Laboratorium

Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika, BPPT, PUSPIPTEK, Serpong, Tangerang Selatan, tepung kedelai (Hasil Bumiku), NaCl 0,85% (Merck), minyak zaitun (Le Riche), pNP (Sigma–Aldrich), pNPP (Sigma–Aldrich), dan n-heptane (Sigma–Aldrich).

### Peremajaan kapang *Kernel B (KB)*

Peremajaan kapang KB (Gambar 1) dilakukan dengan mengambil satu lup inokulasi isolat stok secara aseptis diinokulasikan pada media agar miring media PDA steril. Isolat KB diinkubasi pada suhu 28°C selama lima hari.

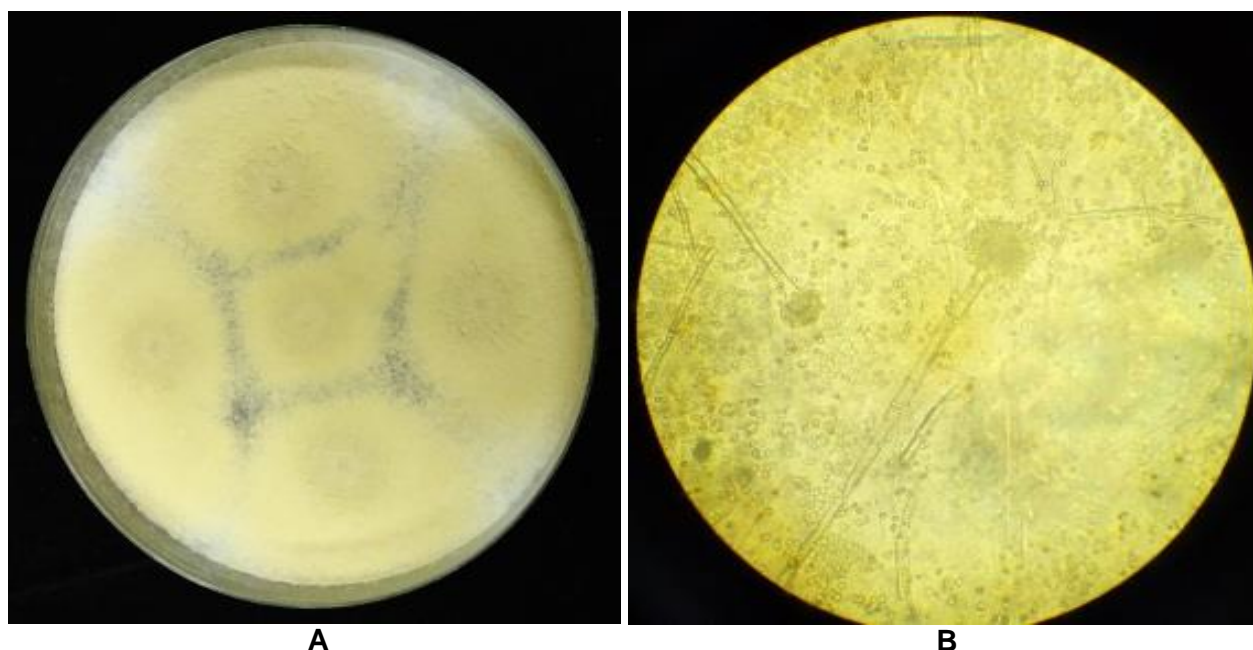
### Mutasi fisik

Mutasi fisik isolat kapang dilakukan dengan memodifikasi metode Karanam dan Medicherla (2008). Modifikasi dilakukan pada proses radiasi sinar UV *Germidical Lamp* (250 nm) selama 0, 60, 120 dan 180 detik dalam keadaan petri terbuka dengan jarak antara lampu dan cawan petri ±18 Cm. Semua cawan yang telah diinokulasikan suspensi spora hasil pengenceran  $10^{-5}$  diradiasi dan diinkubasi selama lima hari pada suhu 28°C. Pada hari ke lima dilakukan perhitungan koloni yang tumbuh. Pengujian yang menghasilkan nilai dosis letal  $\geq 99\%$  ditumbuhkan pada media miring PDA yang kemudian dilakukan produksi lipase terhadap

koloni tersebut untuk diketahui nilai aktivitas enzim dan aktivitas transesterifikasi.

### Mutasi kimia

Mutan dengan hasil terbaik dari mutasi sinar UV, dilakukan mutasi kembali dengan senyawa kimia. Mutasi lanjutan pada isolat kapang terpilih dilakukan dengan menggunakan bahan kimia *ethyl methane sulfonate* (EMS), dan *N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine* (NMNG). Proses mutasi kapang KB dengan menggunakan mutagen EMS dilakukan dengan modifikasi metode Syafriana et al. (2014), perbedaan terletak pada suspensi spora yang digunakan, konsentrasi EMS, dan lama inkubasi setelah inokulasi pada media PDA. Pada penelitian ini dilakukan pengenceran suspensi spora sampai  $10^{-5}$ , konsentrasi EMS yang digunakan yaitu 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, dan 7%, diinkubasi selama 60 menit dengan kecepatan 750 rpm dan suhu 28°C menggunakan thermomixer. Suspensi spora hasil mutasi diinokulasikan pada media PDA sebanyak 0,1 mL dengan metode sebar dan diinkubasi selama lima hari pada suhu 28°C di inkubator. Pengamatan dan perhitungan jumlah kapang yang tumbuh dilakukan pada hari kelima inkubasi. Pengujian yang dosis letalnya mencapai  $\geq 99\%$  dipilih untuk dilakukan pengujian selanjutnya. Kapang mutan EMS terpilih dilanjutkan ke tahap mutasi dengan NMNG.



**Gambar 1.** Morfologi kapang KB: A). Kapang KB pada media agar *potato dextrose agar* (PDA); B). Kapang KB di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x

**Tabel 1.** Hasil mutasi isolat KB dengan sinar UV

Waktu (menit)	Ulangan (koloni)				Dosis letal (%)
	1	2	3	Jumlah	
0	163	155	120	438	
1	9	0	0	9	97,9
2	2	0	0	2	99,5
3	0	0	0	0	100

Mutasi dengan NMNG dilakukan dengan modifikasi metode Karanam dan Medicherla (2008), perbedaan terletak pada konsentrasi NMNG dan tanpa interval waktu inkubasi. Larutan NMNG dengan konsentrasi 2, 3, 4 dan 5 mg·mL<sup>-1</sup> dalam buffer fosfat 0,2 M pH 7 dimasukkan ke dalam tabung mikro yang berisi suspensi spora (1:1) dan diinkubasi pada thermomixer dengan suhu 28°C dan kecepatan 750 rpm selama 180 menit. Suspensi spora hasil mutasi dengan tingkat pengenceran 10<sup>-5</sup> diinokulasi sebanyak 0,1 mL ke cawan petri yang berisi media PDA steril dengan metode sebar. Cawan petri tersebut diinkubasi pada suhu 28°C selama lima hari. Pada hari kelima dilakukan perhitungan koloni yang tumbuh. Seleksi kapang mutan unggul dilakukan dengan melihat jumlah dosis letal yang ≥99%.

### Pembuatan media produksi enzim

Pembuatan media produksi dilakukan dengan menggunakan media kultur cair yang terdiri atas 3% tepung kedelai komersial yang direbus sampai mendidih (±60 menit) kemudian disaring menggunakan kain kasa. Selanjutnya, ditambahkan 0,1% minyak zaitun teknis ke dalam air rebusan tepung kedelai dan disterilisasi menggunakan *autoclave* suhu 121°C tekanan 2 atm selama 15 menit.

### Produksi enzim lipase

Produksi enzim lipase dilakukan dengan memodifikasi metode Karanam dan Medicherla (2008), perbedaan metode dilakukan pada media produksi yang digunakan dan hasil penyaringan tidak dijenuhkan menggunakan ammonium sulfat. Suspensi spora isolat kapang berumur lima hari hasil pengenceran 10<sup>-5</sup> diinokulasikan 10% (v/v) pada medium produksi enzim. Inkubasi dilakukan pada *rotary shaker* dengan kecepatan 200 rpm selama lima hari di suhu 28°C.

### Uji aktivitas enzim lipase

Pengujian aktivitas lipase dilakukan dengan metode Linfield et al. (1984) dengan menggunakan *Polivinil alkohol* (PVA) dan minyak zaitun sebagai substrat. Aktivitas lipase dihitung menggunakan persamaan:

$$\text{Aktivitas unit lipase (U} \cdot \text{mL}^{-1}\text{)} =$$

$$\frac{(V_1 - V_2) \cdot n \cdot \text{NaOH} \cdot 1000}{t}$$

Keterangan:

- V<sub>1</sub> = volume NaOH untuk titrasi blanko (mL)
- V<sub>2</sub> = volume NaOH untuk titrasi sampel (mL)
- n = konsentrasi NaOH (N)
- t = waktu inkubasi (menit)

### Transesterifikasi secara enzimatis

Aktivitas transesterifikasi ekstrak kasar lipase diukur dengan menggunakan metode spektrofotometri (Kotogan et al. 2014). Sampel diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 405 nm. Larutan blanko dibuat dengan cara yang sama dengan sampel, tanpa menambahkan ekstrak kasar enzim. Aktivitas transesterifikasi dihitung menggunakan persamaan:

$$\text{Aktivitas transesterifikasi (U} \cdot \text{mg}^{-1}\text{)} =$$

$$\frac{S \cdot 1000}{m \cdot t \cdot y}$$

Keterangan:

- S = konsentrasi sampel
- M = mr pNPP (417,3)
- t = waktu inkubasi (menit)
- y = jumlah enzim dalam reaksi (mg)

## HASIL DAN PEMBAHASAN

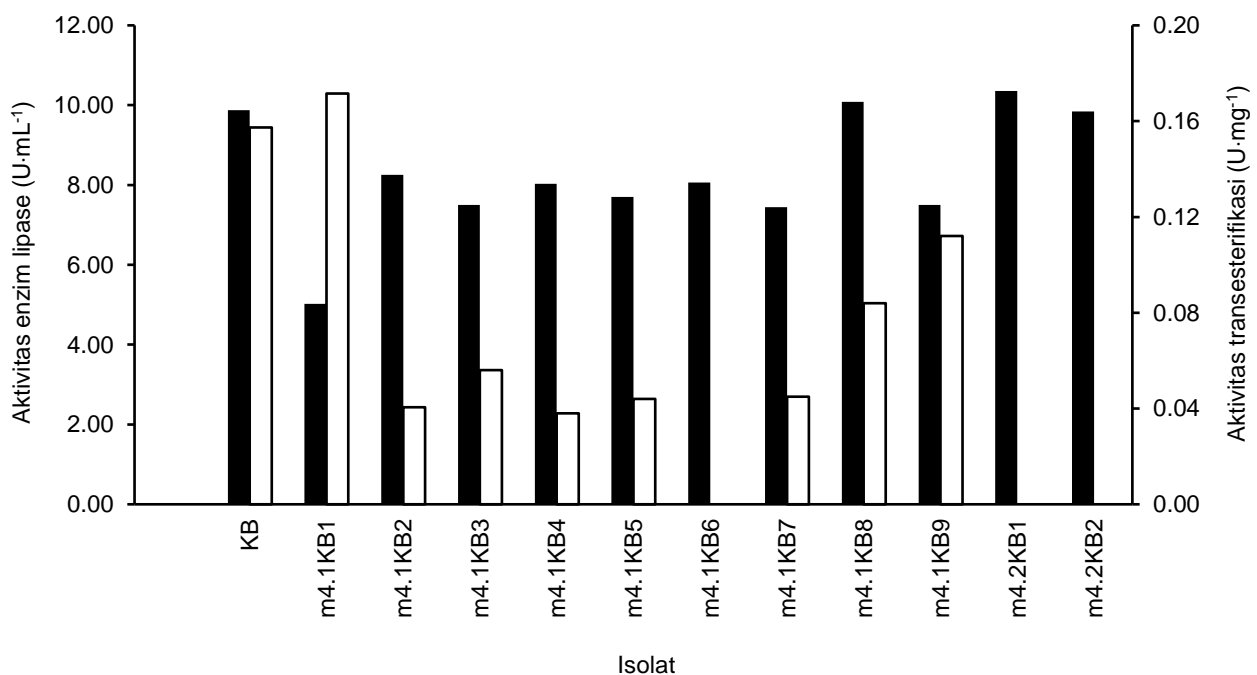
### Mutasi dengan sinar ultraviolet (UV)

Radiasi sinar UV dilakukan selama 0-3 menit terhadap kapang KB. Seleksi terhadap isolat kapang KB mutan ditentukan berdasarkan nilai dosis letal (%) setelah dilakukan radiasi dengan sinar UV. Hasil penyinaran dengan sinar UV menyebabkan 97,9 - 100% kematian spora isolat KB (Tabel 1). Angka dosis letal didapatkan dari pengamatan pertumbuhan kapang di atas medium PDA yang telah diinkubasi selama lima hari setelah radiasi UV berlangsung. Hasil dari mutasi UV didapatkan sebelas mutan dari isolat KB. Perlakuan yang

menghasilkan nilai dosis letal  $\geq 99\%$  dipilih untuk dilanjutkan dalam tahap produksi enzim lipase, sehingga pada perlakuan penyinaran UV terhadap isolat KB kapang mutan kode  $m_{4.2}KB_1$  terpilih untuk diuji aktivitas lipase dan aktivitas transesterifikasinya. Kapang kode  $m_{4.2}KB_1$  merupakan kapang mutan hasil penyinaran selama dua menit. Mikroorganisme yang diradiasi dengan sinar UV dapat mengalami mutasi sehingga dapat menyebabkan aktivitas enzim terganggu karena terjadinya pirimidin dimer. Basa nitrogen pirimidin terdiri atas timin (T) dan sitosin (C), radiasi sinar UV dapat menyebabkan terjadinya ikatan antara T-T atau C-C yang letaknya berdekatan. Ikatan pirimidin dimer dapat menghalangi proses replikasi DNA, sehingga kestabilan DNA terganggu dan dapat menyebabkan kematian pada mikroorganisme yang teradiasi sinar UV (Goto et al. 2015).

Aktivitas enzim lipase tertinggi dihasilkan oleh mutan UV KB dengan kode  $m_{4.2}KB_8$ , yaitu sebesar  $10,08 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Gambar 2). Laporan penelitian sebelumnya mutasi dengan sinar UV berpotensi untuk meningkatkan aktivitas enzim lipase. *Rhizopus oligosporus* var. *microsporus* IIB-63-10 menghasilkan enzim lipase  $158,7\%$  lebih tinggi dibandingkan tipe liarnya *R. oligosporus* var. *microsporus* IIB-63 (Iftikhar

et al. 2010). *Aspergillus fumigatus* RA204 yang dimutasi dengan sinar gamma mengalami peningkatan aktivitas transesterifikasi dari tipe liarnya sebesar  $15,85\%$ , sedangkan setelah dimutasi dengan sinar UV selama empat jam *Aspergillus fumigatus* RA204 mengalami peningkatan aktivitas transesterifikasi sebesar  $42,11\%$  dari tipe liarnya (Indriawan 2018). Mutasi dengan UV juga menyebabkan *A. japonicus* MTCC 1975 mengalami peningkatan aktivitas sebanyak  $127\%$  (Karanam dan Medicherla 2008). Peningkatan aktivitas hidrolisis lipase pada mutan dapat disebabkan terjadinya over ekspresi gen dalam mensekresikan enzim. Penamaan kapang mutan dilakukan dengan  $m_{4.x}KB_y$ ,  $m_4$  bermakna kapang mutan yang dihasilkan merupakan hasil mutasi UV.  $x$  menandakan konsentrasi EMS yang menghasilkan kapang mutan dengan dosis letal  $99\%$ , sedangkan kode KB menandakan tipe liar dari kapang mutan yang dihasilkan, dan  $y$  merupakan kode isolat ketika dalam satu proses mutasi didapatkan lebih dari satu mutan. Kesembilan koloni tersebut diberi kode dengan  $m_{4.2}KB_1 - m_{4.2}KB_9$ . Hasil uji aktivitas enzim lipase dan aktivitas transesterifikasi dari  $m_4$  menunjukkan isolat  $m_{4.2}KB_8$  memiliki aktivitas enzim lipase tertinggi, yaitu  $10,08 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , namun untuk aktivitas transesterifikasi tertinggi didapatkan



**Gambar 2.** Aktivitas lipase KB hasil mutasi UV diuji setelah lima hari inkubasi di *rotary shaker* dengan suhu  $28^\circ\text{C}$ , 200 rpm, volume 50 mL. (■: aktivitas enzim lipase; □: aktivitas transesterifikasi)

**Tabel 2.** Hasil mutasi  $m_{4.1}KB_1$  dengan EMS

Konsentrasi EMS (%)	Ulangan (koloni)				Dosis letal (%)
	1	2	3	Jumlah	
Kontrol	62	75	68	205	
0	44	27	45	164	20,0
1	8	6	9	44	78,5
2	4	4	8	18	91,2
3	4	5	5	14	93,1
4	4	5	5	14	93,1
5	4	4	5	13	93,6
6	4	2	3	11	94,6
7	0	0	1	1	99,5

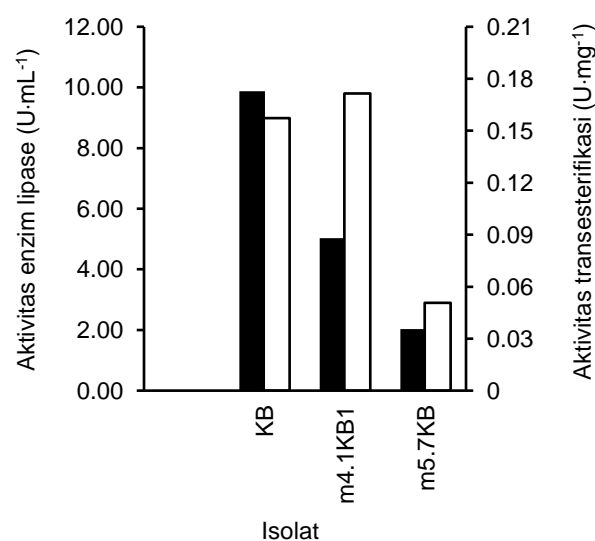
oleh isolat kapang mutan kode  $m_{4.1}KB_1$  dengan nilai  $0,165 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  (Gambar 3). Penelitian sebelumnya menggunakan *R. miehei* NRRL 5282 menghasilkan aktivitas lipase sebesar  $735,80 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , namun hanya memiliki aktivitas transesterifikasi sebesar  $4,80 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  (Kotogan et al. 2014). Hal ini diduga karena respon enzim terhadap pelarut yang digunakan saat pengujian. Setiap mikroorganisme menghasilkan enzim yang memiliki sifat berbeda sehingga respon terhadap penggunaan pelarut organik dapat menghambat kerja enzim. Menurut Kotogan et al. (2014) hal ini dapat terjadi mungkin disebabkan oleh suhu dan senyawa organik yang digunakan. Aktivitas transesterifikasi yang dihasilkan oleh kapang mutan  $m_{4.1}KB_1$  mengalami kenaikan 4,8% dari isolat tipe liarnya (KB). Berdasarkan hasil tersebut, isolat  $m_{4.1}KB_1$  terpilih sebagai mutan yang dimutasi kembali dengan senyawa kimia, yaitu *Ethyl Methanesulfonate* (EMS).

### Mutasi dengan EMS

Mutasi dengan EMS dilakukan dengan menginkubasi kapang mutan terpilih dari hasil mutasi UV, yaitu  $m_{4.1}KB_1$  di dalam larutan EMS berbagai konsentrasi (0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, dan 7%). Perlakuan dengan berbagai konsentrasi EMS dilakukan untuk mengetahui kemampuan hidup kapang pada lingkungan yang tidak sesuai. Mikroorganisme akan melakukan perubahan bahan genetik untuk mempertahankan diri agar tetap hidup, perubahan bahan genetik ini menyebabkan fenotip yang muncul berbeda dengan fenotip yang lama. Pada pengujian mutasi EMS terhadap  $m_{4.1}KB_1$  dihasilkan satu isolat mutan dengan nilai kematian sebesar 99,5% setelah diinkubasi

dengan EMS pada konsentrasi 7%, isolat tersebut selanjutnya di beri kode  $m_{5.7}KB$  (Tabel 2). Penamaan kapang mutan dilakukan dengan  $m_{5.7}KB$ ,  $m_5$  bermakna kapang mutan yang dihasilkan merupakan hasil mutasi UV dilanjutkan dengan EMS. Angka 7 setelah  $m_5$  menandakan konsentrasi EMS yang menghasilkan kapang mutan dengan dosis letal 99%, sedangkan kode KB menandakan tipe liar dari kapang mutan yang dihasilkan.

Produksi enzim lipase dilakukan dengan menginkubasi 50 mL media produksi, pH 7 selama lima hari di *rotary shaker* dengan kecepatan 200 rpm dan suhu  $28^\circ\text{C}$ . Aktivitas hidrolisis enzim lipase dan aktivitas transesterifikasi mutan lebih rendah dibandingkan aktivitas tipe liar (Gambar 3). KB menghasilkan aktivitas hidrolisis dan aktivitas transesterifikasi sebesar  $9,88 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  dan  $0,172 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  sedangkan mutan  $m_{5.7}KB$  hanya memiliki nilai aktivitas hidrolisis sebesar  $2,03 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  dan aktivitas transesterifikasi  $0,051 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ . EMS termasuk ke dalam agen alkilasi,  $O_6$ -etilguanin akan terbentuk karena terdapat ikatan antara gugus etil yang dimiliki EMS dengan guanin pada posisi 7-N dan 6-O pada DNA sehingga dapat mengakibatkan kesalahan dalam replikasi. Agen alkilasi dapat menyebabkan mutasi titik, peristiwa mutasi titik memberikan dampak terhadap fenotip suatu makhluk hidup. Hal ini dapat terjadi karena pada saat mutasi



**Gambar 3.** Aktivitas lipase  $m_{4.1}KB_1$  hasil mutasi EMS diuji setelah lima hari inkubasi di *rotary shaker* dengan suhu  $28^\circ\text{C}$ , 200 rpm, volume 50 mL. (■: aktivitas enzim lipase; □: aktivitas transesterifikasi)

**Tabel 3.** Hasil mutasi m<sub>5,7</sub>KB dengan NMNG

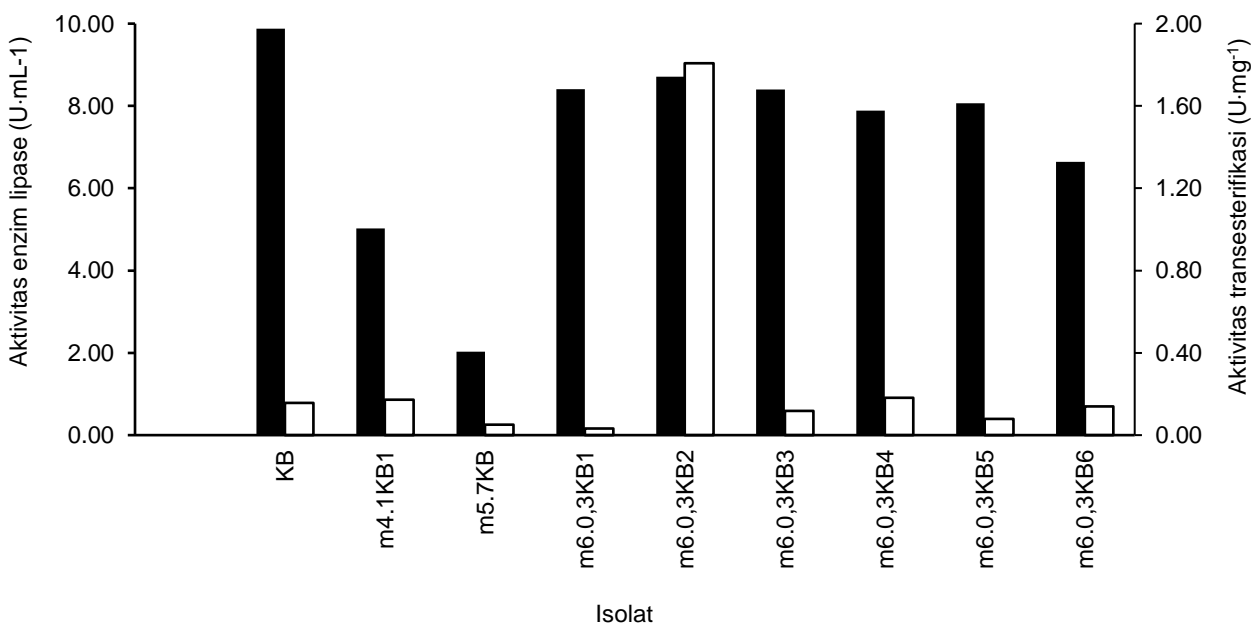
Konsentrasi NMNG (mg·mL <sup>-1</sup> )	Ulangan (koloni)				Dosis letal (%)
	1	2	3	Jumlah	
Kontrol	133	137	117	387	
2	102	101	70	273	29,4
3	2	2	2	6	99
4	0	0	0	0	100
5	0	0	0	0	100

titik DNA dapat mengalami transisi, transversi, insersi, atau delesi yang mengakibatkan terjadi perubahan kerangka baca pada urutan nukleotida sehingga mengubah susunan asam amino yang terbentuk (Sreeju et al. 2011). Makhluk hidup memiliki kemampuan dalam memperbaiki kerusakan yang terjadi di dalam dirinya, namun kemampuan tersebut memiliki keterbatasan. Pada saat DNA teralkilasi oleh EMS terdapat enzim MGMT atau enzim O6-metilguanin metil transferase yang dapat memperbaiki secara langsung DNA yang teralkilasi, namun enzim tersebut bersifat *irreversible* sehingga hanya dapat memperbaiki satu basa yang mengalami perubahan, setelah melakukan perbaikan enzim MGMT akan langsung dihancurkan oleh sel. Sel yang tidak mengalami perbaikan setelah di mutasi diperkirakan akan

menghambat proses replikasi normal, sehingga menyebabkan mutasi yang diturunkan atau kematian sel (Ifadah et al. 2016).

**Mutasi dengan NMNG**

Mutan m<sub>4,1</sub>KB<sub>1</sub> mengalami penurunan aktivitas hidrolisis dan aktivitas transesterifikasi setelah dilakukan mutasi dengan EMS (m<sub>5,7</sub>KB). Tahap selanjutnya dilakukan mutasi dengan NMNG terhadap kapang mutan m<sub>5,7</sub>KB untuk mendapatkan isolat mutan yang menghasilkan aktivitas enzim lipase dan aktivitas transesterifikasi yang lebih tinggi dari isolat KB. Hasil mutasi dengan NMNG didapatkan enam isolat dari mutan m<sub>5,7</sub>KB, yaitu pada konsentrasi NMNG 3 mg/mL. Keenam isolat ini terpilih karena memiliki nilai dosis letal ≥99%, yang selanjutnya diberi kode m<sub>6,0,3</sub>KB<sub>1</sub>, m<sub>6,0,3</sub>KB<sub>2</sub>, m<sub>6,0,3</sub>KB<sub>3</sub>, m<sub>6,0,3</sub>KB<sub>4</sub>, m<sub>6,0,3</sub>KB<sub>5</sub>, dan m<sub>6,0,3</sub>KB<sub>6</sub> (Tabel 3). Keenam isolat tersebut kemudian digunakan untuk produksi lipase yang selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas lipase dan aktivitas transesterifikasi. NMNG memberikan efek mutagenik yang tergolong kuat, sehingga perlu perhatian dalam menggunakannya. Zat ini dapat menyebabkan mutasi terhadap mikroorganisme karena dapat mengalkilasi basa pada DNA. Mutasi dengan NMNG menyebabkan perubahan terhadap glukosa



**Gambar 4.** Aktivitas lipase m<sub>5,7</sub>KB hasil mutasi NMNG diuji setelah lima hari inkubasi di *rotary shaker* dengan suhu 28°C, 200 rpm, volume 50 mL. (■: aktivitas enzim lipase; □: aktivitas transesterifikasi)

menjadi lisin yang dihasilkan oleh mutan *Corynebacterium glutamicum*. Berdasarkan hasil analisis dari 50 mutan terhadap isolat tersebut mutasi dengan NMNG menyebabkan mutasi titik, yang ditandai dengan terjadinya penambahan pada basa DNA. Perubahan yang dialami oleh *Corynebacterium glutamicum*, yaitu mutasi transisi yang bermakna terjadi pergantian antara basa pirimidin dengan pirimidin lainnya GC→AT atau AT→GC (Ohnishi et al. 2008).

Nilai aktivitas transesterifikasi yang dihasilkan kapang mutan dengan kode m<sub>6.0,3</sub>KB<sub>2</sub> dengan nilai 1,807 U·mg<sup>-1</sup> mengalami kenaikan sebesar 91,2% dibandingkan KB (Gambar 4). Mutasi yang dilakukan dengan NMNG berhasil mendapatkan mutan yang memiliki aktivitas transesterifikasi yang lebih tinggi dari KB, mutan m<sub>4.1</sub>KB<sub>1</sub> dan m<sub>5.7</sub>KB. Mutan ANT4 merupakan mutan hasil mutasi menggunakan UV, HNO<sub>2</sub>, dan NMNG dari wild type *A. japonicus* MTCC 1975 yang mengalami peningkatan aktivitas lipase sebesar 276% dari tipe liarnya (Karanam dan Medicherla 2008).

Asam nukleat yang mengandung informasi genetik dari suatu makhluk hidup disebut dengan DNA. Radiasi sinar dan bahan kimia dapat mengakibatkan DNA menjadi tidak stabil (Rastogi et al. 2010). Terganggunya kestabilan DNA dapat menyebabkan perubahan pada susunan materi genetik suatu individu atau disebut dengan mutasi. Perubahan materi genetik ini dapat terjadi secara acak (Shu et al. 2012). Menurut Loewe dan Hill (2010) keragaman genetik yang ada di alam salah satunya disebabkan oleh mutasi. Mutasi sinar UV, EMS, dan NMNG pada penelitian ini menghasilkan beberapa mutan yang mengalami peningkatan aktivitas lipase dan penurunan aktivitas lipase. Hal ini dikarenakan mutasi dengan sinar UV dan bahan kimia bersifat acak, sehingga tidak dapat dipastikan apakah proses mutasi tersebut dapat meningkatkan aktivitas lipase. Sreeju et al. (2011) menyatakan bahwa peningkatan kemampuan mikroorganisme dapat dilakukan dengan menggunakan EMS, NMNG, radiasi sinar gamma, dan radiasi sinar UV. Konsentrasi mutagen dan lama penyinaran dalam proses mutasi antara satu mikroorganisme dengan mikroorganisme

lainnya berbeda, sehingga untuk mendapatkan konsentrasi dan keadaan yang paling baik untuk melakukan mutasi terhadap suatu organisme hanya dapat ditemukan dengan melakukan percobaan.

## KESIMPULAN

Mutan yang dihasilkan dari penelitian sebanyak enam belas, terdapat jenis enzim lipase yang dihasilkan m<sub>4.1</sub>KB<sub>6</sub>, m<sub>4.2</sub>KB<sub>1</sub>, dan m<sub>4.2</sub>KB<sub>2</sub> tidak dapat digunakan dalam reaksi transesterifikasi karena memiliki nilai aktivitas transesterifikasi 0 U·mg<sup>-1</sup>. KB mengalami peningkatan dalam aktivitas transesterifikasi, yaitu sebesar 91,2% setelah dimutasi NMNG (m<sub>6.0,3</sub>KB<sub>2</sub>).

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh Pusat Teknologi Bioindustri (PTB), Laboratorium Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika (LAPTIAB), Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Kawasan PUSPIPTEK, Serpong, Tangerang Selatan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aziz R, Aisyah A, Ilyas A (2016) Sintesis metil ester dari minyak biji kemiri (*Aleurites molluccana*) menggunakan metode ultrasonokimia. Al-Kimia 4:21-30. doi: 10.24252/al-kimia.v4i1.1453
- Fjerbaek L, Christensen KV, Norddahl B (2009) A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. Biotechnol Bioeng 102:1298-1315. doi: 10.1002/bit.22256
- Goto N, Bazar G, Kovacs Z, Kunisada M, Morita H, Kizaki S, Sugiyama H, Tsenkova R, Nishigori C (2015) Detection of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by near-infrared spectroscopy and aquaphotomics. Scientific Reports 5:1-13. doi: 10.1038/srep11808
- Ifadah RA, Kusnadi J, Wijayant SD (2016) Strain improvement *Acetobacter xylinum* menggunakan ethyl methane sulfonate (EMS) sebagai upaya peningkatan produksi selulosa bakteri. J Pangan Agroindustri 4:273-282
- Iftikhar T, Niaz M, Abbas SQ, Zia MA, Ashraf I, Lee KJ, Haq IU (2010) Mutation



- induced enhanced biosynthesis of lipases by *Rhizopus oligosporus* var. *microsporus*. Pak J Bot 42:1235-1249. doi: 10.1590/S1517-838220100004000034
- Indriawan A (2018) Pemanfaatan lipase untuk transesterifikasi ester asam lemak oleh isolat kapang limbah kernel dan nut kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq). Tesis, Universitas Indonesia
- Karanam SK, Medicherla NR (2008) Enhanced lipase production by mutation induced *Aspergillus japonicus*. Afr J Biotechnol 7:2064-2067. doi: 10.5897/AJB2008.000-5054
- Kotogan A, Nemeth B, Vagvolgyi C, Papp T, Tako M (2014) Screening for extracellular lipase enzymes with transesterification capacity in *Mucoromycotina* strains. Food Technol Biotechnol 52:73-82
- Linfield WM, O'Brien DJ, Serota S, Barauskas RA (1984) Lipid-lipase interaction. I. Fat splitting with lipase from *Candida rugosa*. J Am Oil Chem Soc 61:1067-1071. doi: 10.1007/BF02636222
- Loewe L, Hill WG (2010) The population genetics of mutations: good, bad and indifferent. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 365:1153-1167. doi: 10.1098/rstb.2009.0317
- Ohnishi J, Mizoguchi H, Takeno S, Ikeda M (2008) Characterization of mutations induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in an industrial *Corynebacterium glutamicum* strain. Mutat Res 649:239-244. doi: 10.1016/j.mrgentox.2007.10.003
- Ozturk B (2001) Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on hydrophobic and hydrophilic supports. Dissertation, İzmir Institute of Technology
- Pratiwi D, Sebayang F, Jamilah I (2013) Produksi dan karakterisasi enzim lipase dari *Pseudomonas aeruginosa* dengan menggunakan induser minyak jagung serta kofaktor Na<sup>+</sup> dan Co<sup>2+</sup>. J Saintia Kimia 1:1-6
- Puspitaningati SR, Permatasari R, Gunardi I (2013) Pembuatan biodiesel dari minyak kelapa sawit dengan menggunakan katalis berpromotor ganda berpenyangga  $\gamma$ -Alumina (CaO/KI/ $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) dalam reaktor *fluidized bed*. J Teknik Pomits 2:193-197. doi: 10.12962/j23373539.v2i2.3573
- Rahmah SZ (2012) Pembentukan senyawa dimer anetol dengan biokatalis enzim lakase dari jamur tiram putih. Skripsi, Universitas Airlangga
- Rastogi RP, Richa, Kumar A, Tyagi MB, Sinha RP (2010) Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. J Nucleic Acids 592980 (ID). doi: 10.4061/2010/592980
- Shu QY, Foster BP, Nakagawa H (2012) Plant Mutation Breeding and Biotechnology. CABI, Oxfordshire, UK
- Sreeju SN, Babu MM, Mariappan C, Selvamohan T (2011) Effect of physical and chemical mutagens on biopolymer producing strains and RAPD analysis of mutated strains. Arch Appl Sci Res 3:233-246
- Suryanto A, Suprpto S, Mahfud M (2015) The production biofuels from coconut oil using microwave. Modern Applied Sci 9:93-98. doi: 10.5539/mas.v9n7p93
- Susanti R, Fibriana F (2017) Teknologi Enzim. Penerbit Andi, Yogyakarta
- Syafriana V, Nuswantara S, Mangunwardoyo W, Lisdiyanti P (2014) Enhancement of  $\beta$ -glucosidase activity in *Penicillium* sp. by random mutation with ultraviolet and ethyl methyl sulfonate. Ann Bogor 18:27-33. doi: 10.14203/ann.bogor.2014.v18.n2.27-33
- Tagore PR, Narasu LM (2014) Isolation and development of a soil fungal strain with high lipolytic activity by mutation. Int J Pharma Chem Biol Sci 4:1-8
- Tapia VE, Anschau A, Coradini AL, Franco TT, Deckmann AC (2012) Optimization of lipid production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* by random mutagenesis coupled to cerulenin screening. AMB Express 2:64 doi: 10.1186/2191-0855-2-64
- Thanh, LT, Okitsu K, Boi LV, Maeda Y (2012) Catalytic technologies for biodiesel fuel production and utilization of glycerol: A review. Catalysts 2:191-222. doi: 10.3390/catal2010191
- Tran DT, Yeh KL, Chen CL, Chang JS (2012) Enzymatic transesterification of microalgal oil from *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized Burkholderia lipase. Bioresour Technol 108:119-127 doi: 10.1016/j.biortech.2011.12.145