

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Penyakit Busuk pada Buah Kakao

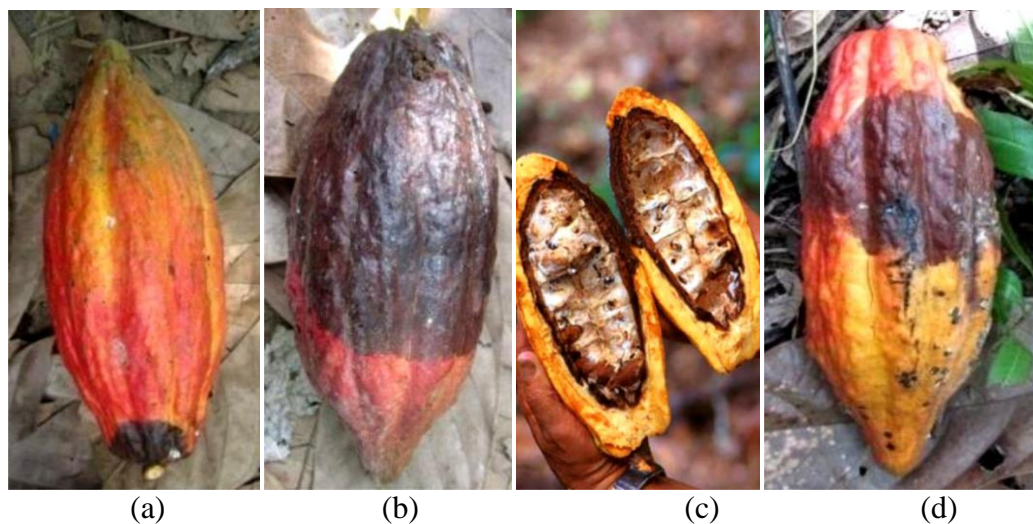
Busuk buah adalah penyakit yang dominan dalam budidaya kakao di Indonesia. Besarnya kerugian, bervariasi antara 26 % dan 50 %. Penyakit busuk buah kakao disebabkan oleh jamur *Phytophthora palmivora* (Fauzan, 2013). Besarnya kerugian akibat penyakit busuk buah kakao disebabkan oleh kompleksnya epidemi penyakit tersebut. *Phytophthora palmivora* dapat menyerang semua organ atau bagian tanaman seperti akar, daun, batang, ranting, bantalan bunga, dan buah pada semua tingkatan umur (Opeke and Gorenz, 1974).

Pada serangan buah yang belum matang *Phytophthora palmivora* dapat menginfeksi seluruh permukaan buah, namun bagian paling rentan adalah pangkal buah. Permukaan buah yang terinfeksi patogen akan berwarna coklat kehitaman, menjadi busuk basah dan selanjutnya menyebar menutupi seluruh permukaan buah. Pada bagian yang menghitam akan muncul lapisan berwarna putih bertepung yang merupakan spora jamur sekunder dan juga sporangium *Phytophthora palmivora* (Semangun, 2000).

Proses gejala infeksi pada busuk buah kakao diawali dengan bercak pada buah berukuran kecil seperti spot-spot yang kotor, tebal dan terdapat pada setiap fase

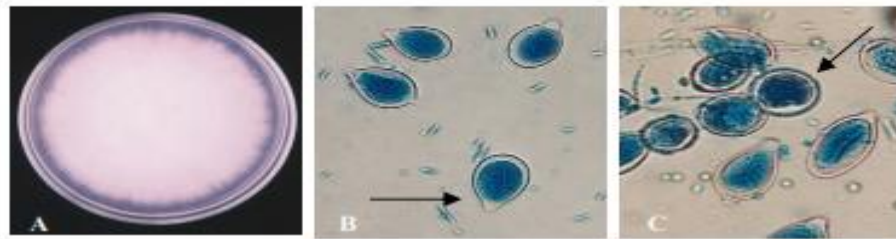
perkembangan buah, kemudian bercak berkembang dengan cepat menutupi jaringan internal dan seluruh permukaan buah termasuk biji. Patogen menyerang jaringan internal buah dan menyebabkan biji kakao berkerut serta berubah warna, buah-buah yang sakit akhirnya menjadi hitam dan mumi. Gejala busuk buah dapat ditemukan dari ujung, pangkal, tengah, buah muda, tua, buah yang berada di bawah, di tengah maupun di atas pohon. Bila buah kakao terserang dibelah maka nampak biji- biji dan daging buah busuk berwarna cokelat. Pada infeksi lanjutan, biji kakao akan berubah warna dan berkerut (Bowers *et al.*, 2001).

Penyebaran penyakit *Phytophthora palmivora* dapat melalui air, semut, tikus, tupai, dan bekicot yang dijumpai di perkebunan kakao. Selama daur hidupnya, *Phytophthora palmivora* menghasilkan beberapa inokulum yang berperan dalam perkembangan penyakit pada kakao, yaitu miselium sporangium, oospore, dan klamidospora. Seperti disampaikan pada Gambar 1 (Rubiyo, 2013).



Gambar 1. Gejala penyakit busuk buah kakao (a) Gejala penyakit busuk pangkal buah kakao (b) gejala pada buah bagian tengah (c) gejala sudah mulai meluas (d) biji menjadi mumi (Sumber: Rubiyo, 2013)

Morfologi *Phytophthora palmivora* yaitu sporangium mempunyai panjang 35-40 μm dan lebar 23-28 μm , nisbah panjang/lebar 1,4-1,6 ukuran ini bervariasi sesuai dengan medium, inang, umur biakan, lengas, dan cahaya. Panjang *pedikel* 2-10 μm . Umumnya di alam sporangium menghasilkan 15-30 spora kembara. *Sporangium* dapat pula menjadi *sporangium* sekunder atau *konidium* seperti pada Gambar 2 (Waterhouse, 1974).



Gambar 2. A. Morfologi koloni *Phytophthora* sp. pada PDA umur 12 hari. B. Sporangia mempunyai papila yang jelas dengan tangkai pendek (panah). C. Klamidospora (panah). Perbesaran B dan C: 400x (Sumber: Umayah, 2006).

B. Biopestisida

Dewasa ini telah banyak diketahui secara parsial tentang pengendalian organisme pengganggu tanaman menggunakan biopestisida berupa pestisida nabati dan agens hayati, sedangkan pemupukan menggunakan pupuk hayati antara lain pemanfaatan mikroorganisme efektif, baik berasal dari daerah subtropis maupun tropis, yang didalamnya mengandung beberapa macam mikroorganisme antara lain; bakteri selulolitik, jamur selulolitik, bakteri fotosintetik, bakteri asam laktat, bakteri pelarut fosfat, dan lain lain (Prabowo, 2008).

Petani modern lebih memilih menggunakan pestisida dan pupuk kimia, meskipun peningkatan produksi dari penggunaan bahan-bahan tersebut hanya bersifat

sementara. Disisi lain, dampak negatif yang ditimbulkan sangat besar karena dapat menyebabkan kerusakan sifat fisik, kimia, dan biologi tanah sehingga berimbas pada semakin luasnya lahan kritis di Indonesia. Hasil penelitian yang dilakukan oleh pusat penelitian tanah dan agroklimat menunjukkan bahwa akibat penggunaan pupuk anorganik yang berlebihan menyebabkan sebagian besar lahan pertanian di Indonesia kandungan C organiknya kurang dari 1%, artinya lahan tersebut meskipun nantinya di pupuk dengan pupuk anorganik berapapun besarnya, produksinya tidak akan meningkat (Prihandarini, 2000).

Trichoderma koningii merupakan jamur antagonis yang banyak terdapat di tanah dan banyak digunakan untuk mengendalikan jamur patogen tular tanah (Nuryati, 2000). Dari hasil penelitian yang dilakukan Prabowo tahun 2008, diketahui bahwa penggunaan jamur antagonis *Trichoderma koningii* efektif mengendalikan penyakit tular tanah seperti *Fusarium* sp.

C. *Trichoderma koningii*

Menurut tinjauan umum *Trichoderma koningii* diklasifikasikan sebagai berikut.

Divisi : *Amastigomycota*

Sub kelas : *Deutromycetes*

Ordo : *Monoliales*

Famili : *Monoleaceae*

Genus : *Trichoderma*

Spesies : *Trichoderma koningii*

Trichoderma koningii memiliki konidiofor bercabang – cabang teratur, tidak membentuk berkas, konidium jorong, bersel satu, kelompok konidium berwarna

hijau biru *Trichoderma koningii* juga berbentuk oval dan memiliki sterigma atau phialid tunggal dan berkelompok (Nurhaedah, 2002).

Morfologi *Trichoderma koningii*. Koloni *Trichoderma koningii* pada media agar pada awalnya terlihat berwarna putih selanjutnya miselium akan berubah menjadi kehijau-hijauan lalu terlihat sebagian besar berwarna hijau ada ditengah koloni dikeliling miselium yang masih berwarna putih dan pada akhirnya seluruh medium akan berwarna hijau (Nurhayati, 2001). Koloni mencapai diameter lebih dari 5 cm dalam waktu 9 hari, semula berwarna hialin (transparan), kemudian menjadi putih kehijauan dan selanjutnya hijau redup terutama pada bagian yang menunjukkan banyak terdapat konidia. Konidia dapat bercabang menyerupai piramida yaitu pada bagian bawah cabang lateral yang berulang-ulang, sedangkan kearah ujung percabangan menjadi bertambah pendek. Mikroorganisme antagonis terutama *Trichoderma koningii* mempunyai kemampuan berkompetisi dengan patogen terbawa tanah terutama dalam mendapatkan nitrogen dan karbon. Selain itu, cendawan *Trichoderma koningii* mempunyai kemampuan untuk menghasilkan enzim hidrolitik β 1,3glukanase, kitinase, dan selulase. Enzim-enzim inilah yang secara aktif merusak sel-sel jamur sehingga dengan mudah jamur *Trichoderma koningii* dapat melakukan penetrasi ke dalam hifa jamur inangnya (Ismail, 2008).

Trichoderma koningii merupakan jamur asli tanah yang bersifat menguntungkan karena mempunyai sifat antagonis yang tinggi terhadap jamur-jamur patogen tanaman budidaya. Mekanisme pengendalian yang bersifat spesifik pada target tertentu dan mampu meningkatkan hasil produksi tanaman, menjadi keunggulan tersendiri bagi jamur *Trichoderma koningii* ini sebagai agen pengendali hayati.

Pemanfaatan *Trichoderma koningii* sebagai agen pengendali hayati jamur patogen *Phytophthora infestans* merupakan salah satu alternatif penting untuk mengendalikan jamur patogen tersebut tanpa menimbulkan dampak negatif terhadap lingkungan (Purwantisari, 2009).

Trichoderma koningii adalah jamur saprofit tanah yang secara alami merupakan parasit yang menyerang banyak jenis jamur penyebab penyakit tanaman (spektrum pengendalian luas). Jamur *Trichoderma koningii* dapat menjadi hiper parasit pada beberapa jenis jamur penyebab penyakit tanaman. Pertumbuhannya sangat cepat dan tidak menjadi penyakit untuk tanaman tingkat tinggi. Mekanisme antagonis yang dilakukan adalah berupa persaingan hidup, parasitisme, antibiosis, dan lisis (Trianto dan Sumantri, 2003).

Aplikasi dapat dilakukan melalui tanah secara langsung, melalui perlakuan benih maupun melalui kompos. Selain itu, *Trichoderma koningii* sebagai jasad antagonis mudah dibiakkan secara massal, mudah disimpan dalam waktu lama dan dapat diaplikasikan sebagai *seed furrow* dalam bentuk tepung atau granula/butiran.

Potensi jamur *Trichoderma koningii* sebagai jamur antagonis yang bersifat preventif terhadap serangan penyakit tanaman menjadikan jamur tersebut semakin luas digunakan oleh petani dalam usaha pengendalian organisme pengganggu tumbuhan (OPT). Disamping karakternya sebagai antagonis diketahui pula bahwa *Trichoderma koningii* juga berfungsi sebagai dekomposer dalam pembuatan pupuk organik. Aplikasi jamur *Trichoderma koningii* pada pembibitan tanaman guna mengantisipasi serangan OPT sedini mungkin membuktikan bahwa tingkat

kesadaran petani akan arti penting perlindungan preventif perlahan telah tumbuh (Ismail, 2008).

D. Mekanisme Antagonis *Trichoderma koningii*

Mikroorganisme antagonis adalah mikroorganisme yang mempunyai pengaruh merugikan terhadap mikroorganisme lain yang tumbuh dan berasosiasi dengan mikroorganisme tersebut. Antagonis meliputi (a) kompetisi nutrisi atau sesuatu yang lain dalam jumlah terbatas tetapi tidak diperlukan oleh organisme pengganggu tanaman, (b) antibiosis sebagai hasil dari pelepasan antibiotika atau senyawa kimia yang lain oleh mikroorganisme dan berbahaya bagi organisme pengganggu tanaman, dan (c) predasi, hiperparasitisme, dan mikroparasitisme atau bentuk yang lain dari eksploitasi langsung terhadap organisme pengganggu tanaman oleh mikroorganisme yang lain (Gultom, 2008).

Trichoderma koningii merupakan salah satu jamur antagonis yang telah banyak diuji coba untuk mengendalikan penyakit tanaman. Sifat antagonis cendawan *Trichoderma koningii* telah diteliti. Inokulasi *Trichoderma koningii* ke dalam tanah dapat menekan serangan penyakit layu yang menyerang di persemaian, hal ini disebabkan oleh adanya pengaruh toksin yang dihasilkan cendawan ini. Selain itu, *Trichoderma koningii* mempunyai kemampuan berkompetisi dengan patogen tanah terutama dalam mendapatkan Nitrogen dan Karbon (Cook dan Baker, 1983).

Menurut Harman (1998), mekanisme utama pengendalian patogen tanaman yang bersifat tular tanah dengan menggunakan cendawan *Trichoderma koningi* dapat terjadi melalui :

- a.) Mikoparasit (memarasit miselium cendawan lain dengan menembus dinding sel dan masuk ke dalam sel untuk mengambil zat makanan dari dalam sel sehingga cendawan akan mati).
- b.) Menghasilkan antibiotik seperti alametichin, paracelsin, trichotoxin yang dapat menghancurkan sel cendawan melalui pengrusakan terhadap permeabilitas membran sel dan enzim selulase yang dapat menyebabkan lisis dinding sel.
- c.) Mempunyai kemampuan berkompetisi memperebutkan tempat hidup dari sumber makanan.
- d.) Mempunyai kemampuan melakukan interfensi hifa. Hifa *Trichoderma koningii* akan mengakibatkan perubahan permeabilitas dinding sel. *Trichoderma koningii* mempunyai sifat mikoparasitik.

Mikoparasitik adalah kemampuan untuk menjadi parasit cendawan lain. Sifat inilah yang dimanfaatkan sebagai biokontrol terhadap jenis-jenis cendawan fitopatogen.

E. Enzim

Enzim merupakan suatu protein yang terdiri dari beberapa polipeptida yang berfungsi sebagai senyawa untuk mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi dalam suatu reaksi kimia yang sering disebut dengan katalis (Wirahadikusumah, 1989). Suatu enzim dapat mempercepat laju reaksi kira-kira 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat dibandingkan dengan reaksi yang tidak dikatalisis (Poedjiadi, 1994).

1. Klasifikasi enzim

Klasifikasi enzim dapat dibedakan sebagai berikut :

- a. Berdasarkan tempat bekerjanya enzim dibedakan menjadi dua, yaitu:
 1. Endoenzim, disebut juga enzim intraseluler, yaitu enzim yang bekerja di dalam sel.
 2. Eksoenzim, disebut juga enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang bekerja di luar sel.
- b. Berdasarkan cara terbentuknya dibedakan menjadi dua, yaitu:
 1. Enzim konstitutif, yaitu enzim yang jumlahnya dipengaruhi kadar substratnya, misalnya enzim amilase.
 2. Enzim adaptif, yaitu enzim yang pembentukannya dirangsang oleh adanya substrat, contohnya enzim amilase yang dihasilkan oleh bakteri amilolitik yang ditumbuhkan di dalam medium yang mengandung amilum.
- c. Berdasarkan fungsinya enzim dapat dibedakan menjadi enam kelas dan tiap kelas mempunyai beberapa subkelas. Dalam tiap subkelas, nama resmi dan nomor klasifikasi dari tiap enzim melukiskan reaksi yang dikatalisis berdasarkan IUPAC yaitu :
 1. Oksidoreduktase, mengkatalisis reaksi oksidasi-reduksi, meliputi reaksi pemindahan elektron, hidrogen atau oksigen.
 2. Transferase, mengkatalisis perpindahan gugus molekul dari suatu molekul ke molekul yang lain, seperti gugus amino, karbonil, metil, asil, glikosil atau fosforil.

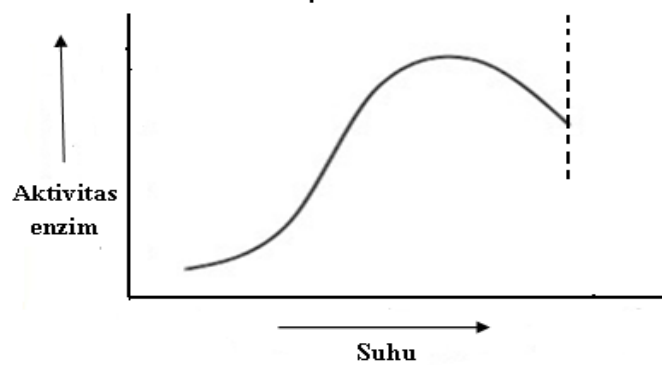
3. Hidrolase, mengkatalisis pemutusan ikatan antara karbon dengan berbagai atom lain dengan adanya penambahan air.
4. Liase, mengkatalisis penambahan gugus fungsi dari suatu molekul tanpa melalui proses hidrolisis.
5. Isomerase, mengkatalisis reaksi isomerisasi.
6. Ligase, mengkatalisis reaksi penggabungan dua molekul dengan dibebaskannya molekul pirofosfat dari nukleosida trifosfat (Lehninger, 1982).

2 Faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim

Faktor- faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim antara lain:

a. Suhu

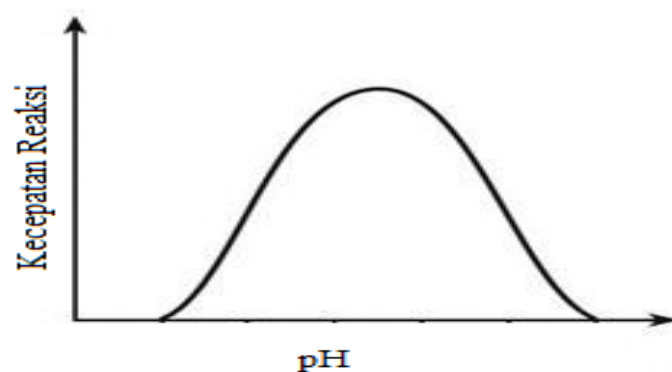
Pengaruh suhu sangat menentukan aktivitas enzim pada waktu mengkatalisis suatu reaksi. Seluruh enzim memerlukan jumlah panas tertentu untuk dapat aktif. Meningkatnya suhu akan semakin meningkatkan aktivitas enzim. Peningkatan suhu yang melebihi suhu optimumnya menyebabkan lemahnya ikatan di dalam enzim secara struktural (Pratiwi, 2008). Suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan enzim terdenaturasi. Hubungan antara aktivitas enzim dengan suhu ditunjukkan dalam Gambar 3.



Gambar 3. Hubungan antara suhu dan aktivitas enzim (Poedjiadi, 1994).

b. pH

Enzim pada umumnya bersifat amfolitik, yang berarti enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus asam maupun gugus basanya, terutama gugus terminal karboksil, dan gugus terminal amino. Perubahan kereaktifan enzim diperkirakan merupakan akibat dari perubahan pH lingkungan (Winarno, 1989). Hubungan kecepatan reaksi dengan pH ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 4. Hubungan kecepatan reaksi dengan pH (Winarno, 1989).

c. Konsentrasi Enzim

Konsentrasi enzim secara langsung mempengaruhi kecepatan laju reaksi enzimatik dimana laju reaksi meningkat dengan bertambahnya konsentrasi enzim (Poedjiadi, 1994). Hubungan antara laju reaksi enzim dengan konsentrasi enzim ditunjukkan dalam Gambar 3.



Gambar 5. Hubungan laju reaksi dengan konsentrasi enzim (Reed, 1975).

d. Konsentrasi Substrat

Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh konsentrasi substrat. Pada konsentrasi substrat rendah, enzim tidak mencapai konversi maksimum akibat sulitnya enzim menemukan substrat yang akan direaksikan. Seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat, kecepatan reaksi juga akan meningkat akibat makin cepatnya substrat terikat pada enzim. Peningkatan konsentrasi substrat pada titik jenuh tidak lagi dapat meningkatkan kecepatan laju reaksi (Pratiwi, 2008).

e. Aktivator dan Inhibitor

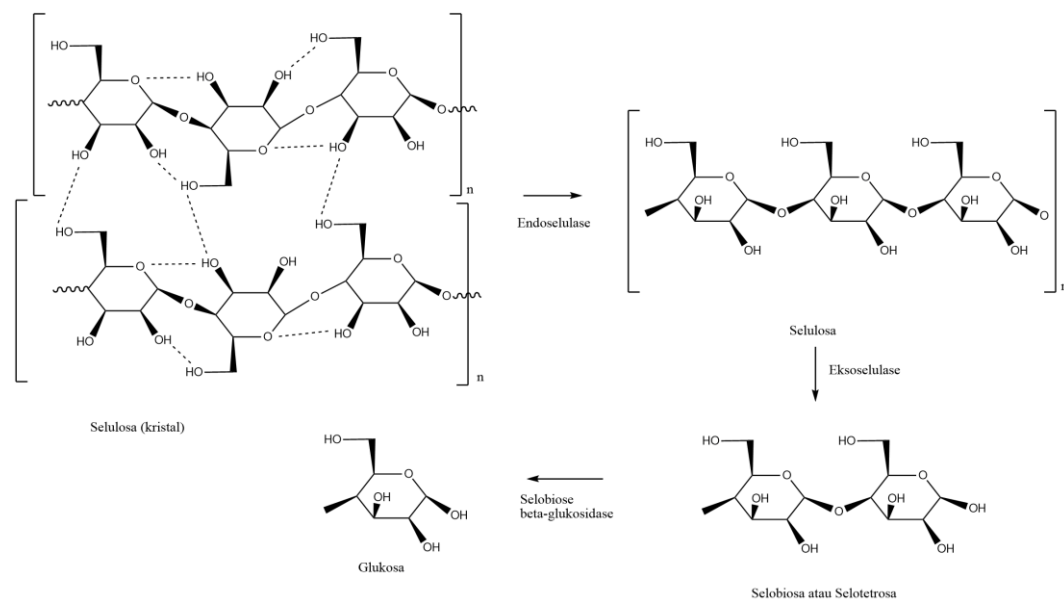
Beberapa enzim memerlukan aktivator dalam reaksi katalisnya. Aktivator adalah senyawa atau ion yang dapat meningkatkan kecepatan reaksi enzimatik. Komponen kimia yang membentuk enzim disebut juga

kofaktor. Kofaktor tersebut dapat berupa ion-ion anorganik seperti Zn, Fe, Ca, Mn, Cu, atau Mg atau dapat pula sebagai molekul organik kompleks yang disebut koenzim (Martoharsono, 1984). Menurut Wirahadikusumah (1989), inhibitor merupakan suatu zat kimia tertentu yang dapat menghambat aktivitas enzim.

F. Enzim Selulase

Enzim selulase dapat diproduksi dari mikroba selulolitik baik kapang maupun bakteri, kapang selulolitik yang biasa digunakan dari jenis *Trichoderma*, *Aspergillus*, dan *Penicillium*, sedangkan bakteri yang bisa menghasilkan selulase adalah *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Cellovibrio*, dan *Sporosphytophaga*. Diantara semua jenis kapang selulolitik, *Trichoderma reesei* adalah kapang yang paling banyak diteliti karena mampu mensekresikan selulase sekitar 80% (Lynd *et al.*, 2002). Enzim selulase dapat mengubah selulosa tak tersubstitusi menjadi selobiosa yang kemudian dihidrolisis lebih lanjut dengan β -glukosidase (Alexander dkk, 1992). Pemutusan ikatan ini akan menghasilkan oligosakarida turunan selulosa, yang akhirnya diubah menjadi monomer glukosa. Nama sistematik dari selulase adalah β -1,4-D-glukan-glukano hidrolase (Pigman dan Hirton, 1970). Hidrolisis selulosa menjadi glukosa secara konsisten melewati dua tahap penting dalam sistem enzimatik, yaitu pemecahan ikatan glukosidik pada selulosa menjadi selobiosa oleh β -1,4-glukanase dan pemecahan ikatan β -1,4-glukosidik pada selobiosa menjadi glukosa oleh β -glukosidase (Fox, 1991). Enzim selulase dikenal sebagai multienzim yang terdiri dari tiga komponen, yaitu:

1. Ekso- β -(1,4)-glukanase dikenal sebagai faktor C_1 . Faktor ini diperlukan untuk menghidrolisis selulosa dalam bentuk kristal.
2. Endo- β -(1,4)-glukanase dikenal sebagai faktor C_x . Faktor ini diperlukan untuk menghidrolisis ikatan β -(1,4)-glukosida (selulosa amorf).
3. β -(1,4)-glukosidase menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa



Gambar 6. Mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim selulase (Ikram, 2005).

Enzim selulase memiliki potensi dan aplikasi yang luas dalam bidang industri antara lain, industri makanan, pakan ternak, tekstil, bahan bakar, industri kimia, industri pulp dan kertas, pengolahan limbah, industri farmasi, produksi protoplas, dan teknik genetik. Saat ini penggunaan enzim selulase tidak hanya terbatas pada bidang industri, enzim selulase juga banyak dimanfaatkan dalam produksi bioetanol guna mengatasi kekurangan bahan bakar minyak bumi (Coughlan, 1985; Mandels, 1985).

Pada dasarnya mekanisme pemotongan rantai ikatan oleh enzim selulase sangat kompleks karena melibatkan sinergitas kerja 3 komponen besar yaitu endo-1,4- β -D-glukanase yang berfungsi memutuskan ikatan selulosa secara random dengan memulai serangan acak pada sisi internal daerah amorf dari serat selulosa sehingga sisi yang terbuka dapat diserang oleh *cellobiohydrolase*. Kemudian kerja dari ekso- β -1,4-glukanase yang memotong ujung-ujung rantai individu selulosa. Ekso- β -1,4-glukanase atau disebut *cellobiohydrolase* menyerang bagian luar *non-reducing* dari selulosa sehingga dihasilkan selobiosa sebagai struktur utamanya. Selanjutnya adalah kerja dari β -glukosidase yang berfungsi memotong selobiosa menjadi molekul-molekul glukosa (Kodri, 2013).

G. Enzim Amilase

Amilase (alfa, beta dan glucoamilase) merupakan enzim yang penting dalam bidang pangan dan bioteknologi. Amilase dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti tanaman, binatang, dan mikroorganisme. Saat ini sejumlah enzim amilase telah diproduksi secara komersial. Penggunaan mikrobial dianggap lebih prospektif karena mudah tumbuh, cepat menghasilkan dan kondisi lingkungan dapat dikendalikan. Enzim α -amilase (α -1,4-D-glukan-4-glukanohidrolase, EC 3.2.1.1) berperan dalam hidrolisis amilum dengan memecah ikatan α -1,4-glikosida dan melewati ikatan α -1,6 untuk menghasilkan glukosa, maltosa, dan maltodekstrin lainnya. Beberapa industri yang menggunakan α -amilase adalah industri pengolah pati, makanan, pemeraman, deterjen, tekstil, dan kertas.

Tiap aplikasi industri mensyaratkan sifat yang khas dari α -amilase terkait dengan spesifisitas, stabilitas, dan pengaruh suhu serta pH terhadap aktivitasnya (Ginting, 2009).

H. Enzim Protease

Protease merupakan enzim proteolitik yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein. Protease dibutuhkan secara fisiologi untuk kehidupan organisme pada tumbuhan, hewan maupun mikroorganisme. Protease tidak hanya berperan dalam proses metabolisme seluler, namun juga dapat diaplikasikan dalam bidang industri. Enzim ini merupakan salah satu enzim skala industri dengan tingkat penjualan hingga 60% dari total penjualan enzim di dunia. Aplikasi enzim protease di antaranya pada industri pembuatan detergen, industri penyamakan kulit, bahan aditif pada industri pangan, dan zat terapeutik pada bidang farmasi (Gupta dkk., 2002; Rao dkk., 1998).

Protease dapat dihasilkan oleh tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme. Penggunaan tumbuhan sebagai sumber protease terbatas oleh tersedianya lahan tanam dan kondisi pertumbuhan yang sesuai, serta memerlukan waktu produksi enzim yang lama. Produksi protease dari hewan juga dibatasi oleh ketersediaan ternak penghasil enzim (Rao dkk., 1998; Said dan Likadja, 2012).

I. Enzim Lipase

Lipase merupakan enzim yang memiliki peran penting dalam bioteknologi modern. Lipase terkenal memiliki aktivitas yang tinggi dalam reaksi hidrolisis dan dalam kimia sintesis. Lipase dapat berperan sebagai biokatalis untuk reaksi- reaksi hidrolisis, esterifikasi, alkoholisis, asidolisis, dan aminolisis (Gandhi, 1997).

Lipase menghidrolisis trigliserida menjadi asam lemak bebas, gliserida parsial, dan gliserol. Trigliserida sebagai substrat terdiri dari asam lemak rantai panjang yang tidak larut dalam air (Shahani, 1975). Lipase menghidrolisis ikatan ester pada permukaan antara fase cair, dimana enzim terlarut dan fasa substrat tidak terlarut. Lipase biasanya diproduksi oleh pankreas babi dan sapi, ragi *Candida*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, dan *Mucor sp.* Dalam industri, lipase antara lain digunakan dalam industri farmasi dan untuk menghasilkan asam lemak dari minyak tidak stabil yang biasanya mengandung asam lemak tidak jenuh. Lipase dari *Candida cylindracea* digunakan untuk menghidrolisis minyak dalam pembuatan sabun. Selain bidang farmasi, lipase juga digunakan dalam industri kosmetik, kulit, makanan, parfum, dan sintesis bahan organik lain (Ghandi, 1997).

J. Isolasi Enzim

1. Sentrifugasi

Sentrifugasi digunakan untuk memisahkan endapan dari supernatan dengan teknik sedimentasi, yaitu teknik yang membuat suatu larutan dirotasi dengan kecepatan tinggi, sehingga yang mempunyai berat molekul besar akan

mengendap pada dasar tabung. Pada proses sentrifugasi sebaiknya dilakukan pada suhu 2- 4°C untuk mencegah terjadinya denaturasi akibat panas yang ditimbulkan proses sentrifugasi (Cooper, 1997 dalam Sariningsih, 2000).

2. Fraksinasi dengan ammonium sulfat

Pemekatan protein dengan penambahan garam ke dalam larutan enzim merupakan cara yang banyak dilakukan. Garam yang dapat digunakan berupa natrium klorida, natrium sulfat atau ammonium sulfat. Ammonium sulfat lebih sering digunakan karena memiliki beberapa kelebihan dibandingkan garam- garam yang lain, yaitu mempunyai kelarutan yang tinggi, tidak mempengaruhi aktivitas enzim, mempunyai daya pengendapan yang efektif, mempunyai efek penstabil terhadap kebanyakan enzim, dapat digunakan pada berbagai pH dan harganya murah (Scopes, 1982).

Pada umumnya garam yang sering digunakan adalah amonium sulfat karena (1) kebanyakan enzim tahan terhadap garam ini, (2) memiliki kelarutan yang besar dalam air, (3) mempunyai daya pengendapan yang besar, dan(4) mempunyai efek penstabil terhadap kebanyakan enzim. Konsentrasi garam dapat mempengaruhi kelarutan enzim. Penambahan garam ini dalam larutan enzim akan mempengaruhi kelarutan enzim. Pada konsentrasi garam rendah, kelarutan enzim dalam air bertambah. Peristiwa ini disebut dengan "*salting in*". Sedangkan pada konsentrasi tinggi, dimana kandungan garam dalam jumlah banyak maka kelarutan enzim akan turun, sehingga garam yang berlebih ini menyebabkan pengendapan enzim. Peristiwa ini disebut dengan "*salting out*" (Wirahadikusumah, 1989).