

**ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS LIPOLITIK BAKTERI ASAM LAKTAT
(BAL) ASAL BEKASAM IKAN PATIN (*Pangasius hypophthalmus*)**

(Skripsi)

Oleh

BELLA RIZCIKAL LENCANA PUTRI



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2017**

ABSTRAK

ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS LIPOLITIK BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL) ASAL BEKASAM IKAN PATIN (*Pangasius hypophthalmus*)

Oleh

Bella Rizcikal Lencana Putri

Bekasam merupakan salah satu produk fermentasi ikan. Fermentasi ikan tersebut melibatkan golongan bakteri asam laktat (BAL). BAL termasuk salah satu mikroorganisme penghasil lipase. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat BAL lipolitik dari bekasam ikan Patin dan mengetahui aktivitas lipase BAL. Isolat BAL lipolitik diisolasi dari bekasam ikan Patin. Uji aktivitas lipase dilakukan dengan metode titrasi menggunakan basa kuat NaOH 0,05M. Dari hasil penelitian ini diperoleh 9 isolat BAL lipolitik (BL2, BL3, BL4, BL5, BL6 BL7, BL8, BL9, BL10). Kesembilan isolat yang ditumbuhkan pada media yang mengandung *olive oil* dan *Rhodamine B* menunjukkan pendaran warna oranye saat diamati dibawah sinar UV. Isolat yang memiliki aktivitas lipase tertinggi adalah isolat BL 7 dengan aktivitas 6,67 U/mL. Isolat yang memiliki aktivitas lipase terendah adalah isolat BL 5 dan BL 10 dengan aktivitas lipase 2 U/mL.

Kata kunci: Bekasam, BAL, Lipase.

**ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS LIPOLITIK BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL)
ASAL BEKASAM IKAN PATIN (*Pangasius hypophthalmus*)**

Oleh

Bella Rizcikal Lencana Putri

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

**Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2017**

Judul Skripsi : **ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS LIPOLITIK
BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL) ASAL
BEKASAM IKAN PATIN (*Pangasius
hypophthalmus*)**

Nama Mahasiswa : **Bella Rizcikal Lencana Putri**

No. Pokok Mahasiswa : 1317021015

Jurusan : Biologi

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI

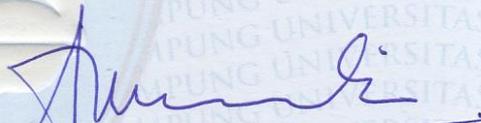
1. Komisi Pembimbing

Pembimbing I



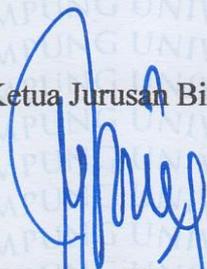
Dra. C.N. Ekowati, M.Si.
NIP 19580818 198503 2 001

Pembimbing II



Dr. Sumardi, M.Si.
NIP 19650325 199103 1 003

2. Ketua Jurusan Biologi FMIPA



Dra. Nuning Nurcahyani, M.Sc.
NIP 19660305 199103 2 001

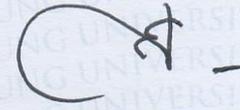
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

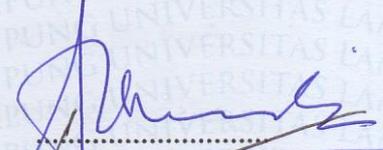
Ketua : **Dra. C.N. Ekowati, M.Si.**

Sekretaris : **Dr. Sumardi, M.Si.**

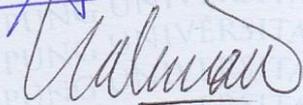
Penguji
Bukan Pembimbing : **Ir. Salman Farisi, M.Si.**



.....



.....

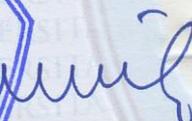


.....

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Prof. Warsito, S.Si., D.E.A., Ph.D.
NIP. 19710212 199512 1 001



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **28 Juli 2017**

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Bandar Jaya pada tanggal 20 Mei 1996 dari Ayah Agus Supranoto dan Ibu Pipih Supiyah. Penulis merupakan putri pertama dari dua bersaudara.

Penulis mengawali pendidikan formal pada tahun 2000 di TK Dharma Wanita I Bandar Sakti, Terusan Nunyai, Lampung Tengah diselesaikan pada tahun 2001. Penulis menempuh pendidikan di SD Negeri 1 Bandar Sakti, Terusan Nunyai, Lampung Tengah yang diselesaikan pada tahun 2007, dilanjutkan dengan pendidikan tingkat menengah di SMP Budi Pratama, Sungai Menang, Ogan Komering Ilir hingga tahun 2010. Penulis melanjutkan pendidikan di SMA Negeri 6 Bandar Lampung dan diselesaikan pada tahun 2013.

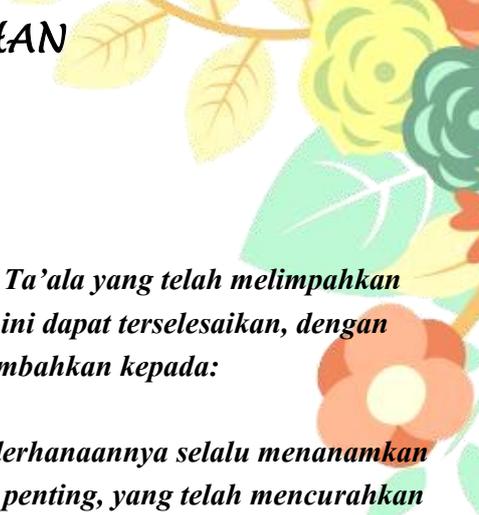
Pada tahun 2013, Penulis diterima sebagai mahasiswi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama menempuh pendidikan di kampus, Penulis pernah menjadi asisten praktikum mata kuliah Mikrobiologi Umum dan Mikrobiologi Pangan dan Industri. Selain itu, Penulis juga aktif di dunia organisasi kampus. Aktivitas

organisasi Penulis dimulai sejak menjadi Anggota Muda Biologi (AMUBA) tahun 2013 – 2014. Selanjutnya, Penulis aktif di Himpunan Mahasiswa Biologi (HIMBIO) FMIPA Unila sebagai anggota Biro Dana dan Usaha tahun kepengurusan 2014 - 2015 dan anggota bidang Bidang Sains dan Teknologi tahun kepengurusan 2015 - 2016.

Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Kabupaten Mesuji, Kecamatan Way Serdang, Desa Karang Mulya pada bulan Januari – Maret 2016. Penulis melaksanakan Kerja Praktik (KP) pada bulan Juli – Agustus 2016 di Balai Uji Standar Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan (BUSKIPM), Jakarta Timur dengan judul **“Identifikasi Bakteri Hama Penyakit Ikan (HPI) pada Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*) di Balai Uji Standar Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan (BUSKIPM), Jakarta Timur”**. Penulis melaksanakan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi pada bulan Februari sampai dengan April 2017.

PERSEMBAHAN



Segala puji hanya milik Allah Subhanahu Wa Ta'ala yang telah melimpahkan nikmat sehat sehingga atas Ridho-Nya karya ini dapat terselesaikan, dengan sepenuh hati karya ini ku persembahkan kepada:

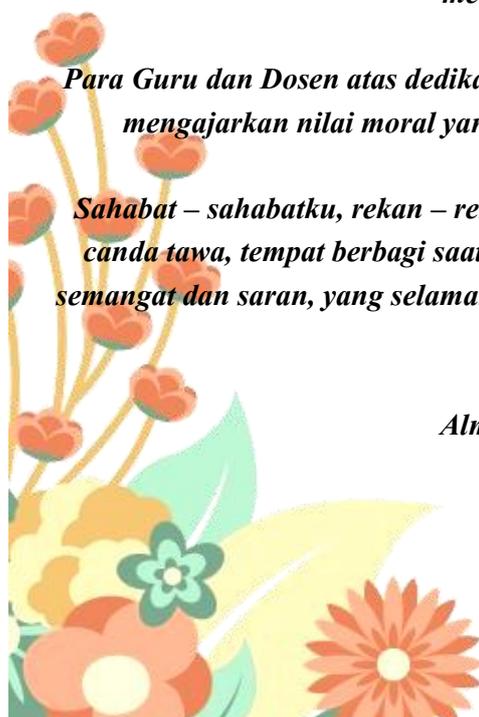
Orangtuaku, Ayah dan Ibu, dengan segala kesederhanaannya selalu menanamkan nilai – nilai kebaikan dan bahwa pendidikan itu penting, yang telah mencurahkan segala usaha dan doa untuk anaknya mendapat pendidikan yang lebih baik, yang selalu aku harapkan Ridhonya, serta tiada hentinya memberikan dukungan materil dan imateril.

Adikku yang telah menjadi teman bicaraku dan motivasiku untuk berkarya dan menuntaskan studi.

Para Guru dan Dosen atas dedikasi dan keikhlasannya yang telah mendidik dan mengajarkan nilai moral yang berperan dalam membentuk pribadi ini.

Sahabat – sahabatku, rekan – rekan seperjuanganku, yang selalu memberikan canda tawa, tempat berbagi saat susah dan bahagia, yang selalu memberikan semangat dan saran, yang selamanya akan menjadi bagian dari cerita perjalanan studiku.

Almamater tercinta.



MOTTO

ALL YOUR HARDWORK WILL BE PAID OFF.

Tujuan pendidikan dalam Islam adalah untuk menjadi manusia yang baik. Manusia yang baik adalah yang mengenal Tuhannya, tahu tujuan hidupnya untuk beribadah kepada Tuhan, dan memiliki kemampuan untuk mandiri melaksanakan kewajiban pribadi dan sosialnya.

(Dr. Adian Husaini)

Gagal setelah mencoba memperjuangkan sesuatu sedemikian rupa jauh lebih memuaskan dibandingkan menyesal karena tidak pernah mencoba sama sekali.

It's always seems impossible until It's done.

(Nelson Mandela)



SANWACANA

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah Subhanahu Wa Ta'ala berkat rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul **“ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS LIPOLITIK BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL) ASAL BEKASAM IKAN PATIN (*Pangasius hypophthalmus*)”**. Skripsi ini merupakan bagian dari proyek penelitian mandiri Bapak Dr. Sumardi, M.Si. tahun 2017. Penulisan skripsi ini juga tidak lepas dari perhatian, bimbingan, masukan, arahan, dan nasehat dari berbagai pihak yang mendukung Penulis dalam menyelesaikan studi. Oleh karena itu, Penulis menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar – besarnya. Ucapan terimakasih Penulis ucapkan kepada, terutama sebagai berikut:

1. Ibu Dra. C. N. Ekowati, M.Si. selaku Pembimbing I yang telah membimbing, mengarahkan, dan memberikan dukungan kepada Penulis mulai dari penelitian sampai dengan terselesaikannya skripsi ini.
2. Bapak Dr. Sumardi, M.Si. selaku Pembimbing II yang telah dengan sabar membimbing, memberikan solusi, memberikan pandangan, memberikan perhatian kepada Penulis selama penelitian sampai dengan terselesaikannya skripsi ini.

3. Bapak Ir. Salman Farisi, M.Si. selaku Pembahas yang telah memberikan masukan, dukungan, dan wawasan baru kepada Penulis selama penelitian sampai dengan terselesaikannya skripsi ini.
4. Bapak Dr. Sutyarso, M.Biomed. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan waktu, pendapat, dan perhatiannya kepada Penulis selama menempuh pendidikan di Jurusan Biologi.
5. Kepala Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung beserta seluruh staf teknisi, yang telah memberikan izin, fasilitas, dan bantuannya selama Penulis melakukan penelitian.
6. Ketua Jurusan Biologi, Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, dan Rektor Universitas Lampung atas semua fasilitas yang diberikan.
7. Bapak Ibu Dosen yang tidak dapat penulis sebutkan satu - persatu, yang telah memberikan dedikasinya sepenuh hati dalam mengajar dan memberi contoh, serta ilmu yang sudah diberikan selama penulis melaksanakan studi di Jurusan Biologi.
8. Sahabat seperjuangan penelitian Bella Noor Arfianty, Nurrohman, dan juga Balqis Ananda Putri yang telah menemani, membantu, memberikan canda tawa, saling menyemangati saat lelah, dan membuat perjalanan penelitian menjadi berarti.
9. Teman – teman Microholic'13 Hendra, Aini, Balqis, Nailul, Rohman, Bella, Vina, Hafiz, Fatma, Dea, Lina, Sarah, Yovita, Rizani terimakasih atas kebersamaan, kepedulian, dan canda tawa, sebagai tempat diskusi

tempat berbagi, yang telah bersama penulis sejak bergabung di Lab. Mikrobiologi.

10. Adik – adik Microholic'14 atas kebersamaan dan candatawa selama Penulis melaksanakan penelitian.
11. Kakak – kakak Microholic'12, Microholic'11, dan Mba Shofia atas saran dan masukan yang diberikan kepada Penulis.
12. Sahabat terbaik “Wanita Sholehah” Adhe, Ariska, Bella, Ferza, Firda, Ira, Nadia, Niswaton, Siska yang membuat kehidupan perkuliahan Penulis menjadi lebih berarti dan berwarna.
13. Sahabat SMA Ana Bella dan Mutiara terimakasih atas kebersamaan yang masih terjalin sampai saat ini, semoga silaturahmi kita dapat terjalin sampai kapanpun.
14. Seseorang yang pernah mendampingi Penulis selama studi hingga menyelesaikan skripsi, terimakasih atas waktu dan perhatiannya.
15. Sahabat seperjuangan angkatan 2013 yang tidak dapat disebutkan satu per satu, terimakasih atas kebersamaan, dukungan, dan doanya selama ini.
16. Seluruh keluarga HIMBIO terimakasih atas kebersamaan dan pembelajaran yang sangat berarti bagi penulis.
17. Almamater Tercinta.

Akhir kata, Penulis berharap semoga tulisan ini dapat bermanfaat dan berguna bagi semua pihak, berguna bagi Penulis dan pembaca pada umumnya.

Bandar Lampung, Agustus 2017

Penulis,

Bella Rizikal Lencana Putri

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian.....	4
C. Manfaat Penelitian.....	4
D. Kerangka Pikir.....	4
E. Hipotesis.....	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Ikan Patin (<i>Pangasius hypophthalmus</i>).....	6
B. Fermentasi	8
C. Bekasam	13
D. Bakteri Asam Laktat (BAL).....	15
E. Lipid	17
F. Lipase	21
G. Aktivitas Lipase.....	22
III. METODE PENELITIAN	25
A. Waktu dan Tempat	25
B. Alat dan Bahan	25
C. Metode Penelitian.....	26
D. Pelaksanaan	26
1. Pembuatan Bekasam.....	26
2. Pengayaan BAL Potensial Lipolitik dari Sampel Bekasam	27
3. Isolasi BAL Lipolitik.....	27
4. Uji Aktivitas Lipase.....	28
E. Analisis Data	30
F. Diagram Alir	30

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	32
A. Isolat BAL Lipolitik	32
B. Morfologi Koloni dan Sel BAL Lipolitik	34
C. Sifat Fisiologi Isolat BAL Lipolitik	36
D. Aktivitas Lipase.....	39
V. SIMPULAN DAN SARAN	
A. Simpulan	42
B. Saran	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	48

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Komposisi Kimia Ikan Patin (<i>Pangasius hypophthalmus</i>)	8
Tabel 2. Urutan Tahap Pengujian Lipase	29
Tabel 3. Morfologi Koloni dan Sel Isolat BAL Lipolitik Pada Umur 24 Jam....	34
Tabel 4. Sifat Fisiologi Isolat BAL Lipolitik	36

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Ikan Patin (<i>Pangasius hypophthalmus</i>).....	7
Gambar 2. Produksi Asam Laktat Melalui Fermentasi Glukosa.....	10
Gambar 3. Fermentasi Homolaktat	12
Gambar 4. Fermentasi Heterolaktat	13
Gambar 5. Kandungan Lipid pada 6 Spesies Ikan yang Berbeda	19
Gambar 6. Komposisi Asam Lemak Ikan Patin	20
Gambar 7. Total MUFA pada Keenam Spesies Ikan.	20
Gambar 8. Hidrolisa Lemak oleh Lipase	21
Gambar 9. Diagram Alir	30
Gambar 10. Pengamatan BAL Lipolitik Dibawah Sinar UV.....	33
Gambar 11. Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar	40

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Pengolahan ikan secara tradisional melalui fermentasi telah banyak dilakukan di Indonesia dan negara – negara Asia Tenggara lainnya, seperti Filipina dan Thailand. Salah satu produk fermentasi ikan adalah bekasam. Pada awalnya, bekasam dikenal oleh masyarakat yang bermukim di Muara Sungai Bengawan Solo dan Surabaya, kemudian menyebar ke Jawa tengah, Sumatera Selatan, dan Kalimantan Tengah (Irianto dan Giyatmi, 2009). Bekasam memiliki karakteristik bentuk ikan seperti ikan segar, namun dagingnya lebih kenyal, menghasilkan aroma yang khas, memiliki rasa yang masam dan tidak terlalu asin (Wikandari, 2012).

Bahan baku bekasam adalah ikan air tawar, garam, dan sumber karbohidrat (nasi) (Nuraini *et al.*, 2014). Proses pembuatan bekasam diawali dengan menyangi ikan kemudian ditambahkan garam sebanyak 10 % (b/b) dan ditambahkan nasi dengan perbandingan 1:1 dari berat ikan. Ikan selanjutnya disimpan dalam toples dan diperam selama 7 hari. Setelah 7 hari maka ikan sudah menjadi produk bekasam (Zummah dan Prima, 2013).

Fermentasi ikan menjadi bekasam melibatkan golongan bakteri asam laktat (BAL). Nama BAL diperoleh dari kemampuan bakteri dalam memfermentasi

gula menjadi asam laktat sebagai produk utamanya. BAL dapat tumbuh pada fermentasi bekasam karena dipicu oleh lingkungan hidupnya yang dibuat sesuai dengan pertumbuhannya. BAL mampu tumbuh pada kadar gula, alkohol, dan garam yang tinggi (Adams dan Maurice, 2008). Fermentasi oleh BAL akan menghasilkan asam laktat sehingga pH lingkungan menjadi rendah atau asam, akibatnya pertumbuhan mikroba lain akan terhambat (Amin dan Leksono, 2001) atau menyebabkan kematian terhadap bakteri pembusuk dan patogen (Harmayani *et al.*, 2001), seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, dan *Bacillus cereus* (Nithya *et al.*, 2012).

Menurut Desniar (2012) BAL yang memiliki adaptasi fisiologi baik akan mampu bertahan pada kondisi garam tinggi 2 – 7%, kondisi minim oksigen, dan pH 4.4 (asam) hingga 8.8 (basa). Penambahan sumber karbohidrat berupa nasi akan merangsang pertumbuhan BAL, nasi tersebut akan dimanfaatkan oleh BAL sebagai sumber energi. Hampir semua BAL hanya memperoleh energi dari metabolisme gula, sehingga habitat pertumbuhannya terbatas pada lingkungan yang menyediakan cukup gula atau disebut dengan lingkungan yang kaya nutrisi (Salminen *et al.*, 2004). Kebutuhan nutrisi lainnya seperti protein, lemak, dan mineral diperoleh dari ikan air tawar (Khomsan *et al.*, 2004).

BAL termasuk salah satu mikroorganisme penghasil lipase (Andersen dan Ostdal, 1995). Lipase yang dihasilkan oleh mikroba ditemukan sebagai lipase ekstraseluler. Menurut Kristanti (2001) lipase ekstraseluler mempunyai aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan lipase intraseluler.

Aktivitas lipase sangat dipengaruhi berbagai faktor, antarlain temperatur, pH, sumber dan jenis substrat, konsenterasi enzim dan substrat, air, dan pelarut organik. Selain itu, kurva pertumbuhan juga berbanding lurus dengan aktivitas lipase. Semakin tinggi pertumbuhan BAL lipolitik maka semakin besar aktivitas lipase yang dihasilkan. Bakteri akan mensekresikan lipase ekstraseluler pada saat mencapai fase log akhir (Ngom, 2000). Berdasarkan biosintesisnya, lipase tergolong enzim induktif. Enzim induktif jumlahnya tidak tetap di dalam sel, bergantung pada induser (Lidya dan Djelar, 2000). Sehingga dalam produksi lipase sangat dipengaruhi oleh adanya induser. Selain itu, produksi lipase juga dipengaruhi oleh media, kondisi aerasi, dan agitasi (August, 2000).

Thapa *et al.* (2004) melakukan penelitian mengenai BAL yang diisolasi dari Ngari, yakni produk fermentasi ikan berbahan dasar ikan Pool barb(*Puntius sophore*) khas daerah Manipur, bagian Timurlaut India dan Tungtap yang berbahan dasar ikan Zebra (*Danio spp.*) khas daerah Menghalaya, bagian Timurlaut India. Hasil penelitian ini diperoleh BAL lipolitik jenis *Lactococcus plantarum* yang diisolasi dari Ngari dan *Lactobacillus fructosus* yang diisolasi dari Tungtap. Pada penelitian Umaiya (2015) diperoleh BAL lipolitik jenis *Lactococcus lactis* dari bekasam ikan Bandeng. *Lactococcus lactis* mampu mendegradasi lipid pada substrat margarin.

Isolat BAL penghasil lipase yang diisolasi dari bekasam ikan Patin belum diketahui, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian mengenai BAL lipolitik asal bekasam ikan Patin dan aktivitas lipase yang dihasilkan.

B. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini: (1) untuk memperoleh isolat BAL lipolitik dari bekasam ikan Patin, (2) mengetahui aktivitas lipase yang dihasilkan oleh BAL dari bekasam ikan Patin.

C. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi ilmiah mengenai isolat BAL dengan potensi lipolitik yang diperoleh dari bekasam ikan Patin, sehingga dapat digunakan untuk memproduksi enzim lipase.

D. Kerangka Pikir

Fermentasi bekasam melibatkan peran mikroorganisme, yaitu golongan bakteri asam laktat (BAL). Jenis BAL yang berperan saat fermentasi bekasam berlangsung dapat dipengaruhi salah satunya oleh kadar garam. Pada tahap awal fermentasi akan didominasi oleh BAL yang tahan terhadap konsentrasi garam tinggi. Hari kelima fermentasi, BAL yang tumbuh adalah BAL yang bersifat asidofilik atau tahan terhadap kondisi asam yang tinggi.

BAL memecah komponen kimia pada ikan dalam kondisi anaerob menjadi senyawa – senyawa sederhana dan beberapa asam melalui aktivitas enzimatik. Protein akan dipecah menjadi asam amino, karbohidrat akan dipecah menghasilkan asam laktat, dan lemak akan dipecah menjadi asam lemak bebas dan gliserol. BAL yang mampu memecah lemak merupakan BAL dengan kemampuan lipolitik atau disebut BAL penghasil lipase. Pada penelitian Umaiya (2015) diperoleh BAL lipolitik jenis *Lactococcus lactis* yang diisolasi dari bekasam ikan Bandeng dengan aktivitas lipase tertinggi 29.812 unit/ mL.

Ikan Patin memiliki kandungan lemak sebesar 6.23 gr/ 100 gr, dimana lebih tinggi dibandingkan dengan ikan air tawar lainnya, yakni ikan Lele dan ikan Haruan. Kandungan lemak yang cukup tinggi pada ikan Patin diduga akan menginduksi pertumbuhan BAL potensial lipolitik pada saat fermentasi bekasam.

E. Hipotesis

Adapun hipotesis dari penelitian ini adalah didapatkan beberapa isolat BAL lipolitik dari bekasam ikan Patin dan diperoleh isolat BAL lipolitik dengan aktivitas lipase tertinggi.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Ikan Patin (*Pangasius hypophthalmus*)

Ikan Patin merupakan salah satu ikan air tawar yang bernilai ekonomi tinggi. Ikan Patin tergolong ikan asli perairan Indonesia (Kordi, 2010) yang terdapat di sungai – sungai di pulau Sumatera, Kalimantan, dan Jawa. Namun, ada beberapa jenis ikan patin yang diintroduksi dari Bangkok, Thailand. Jenis ikan patin yang umum dibudidayakan di Indonesia salah satunya adalah *Pangasius hypophthalmus* (Susanto, 2009). Menurut Khairuman dan Suhenda (2002) ikan Patin memiliki kelebihan dibandingkan ikan air tawar lainnya, yaitu rakus terhadap makanan, pertumbuhannya cepat yang bisa mencapai panjang 35 – 40 cm dalam usia 6 bulan.

Ikan Patin memiliki bentuk tubuh memanjang dengan panjang tubuh mencapai 120 cm, berwarna putih perak dan kebiruan di bagian punggung, kulit tidak bersisik. Kepala relatif kecil dengan mulut terletak di ujung kepala agak ke bawah, yang merupakan ciri khas golongan *catfish*. Pada sudut mulutnya terdapat dua pasang kumis pendek. Kumis ini berfungsi sebagai peraba. Pada sirip punggung (dorsal) terdapat jari – jari keras yang berubah menjadi patil besar dan bergerigi di belakangnya dan jari – jari lunak sebanyak 6 – 7 buah (Kordi, 2010). Pada bagian punggung juga terdapat sirip lemak berukuran kecil atau disebut *adipose fin*. Sirip ekor berbentuk cagak

dan simetris. Sirip duburnya panjang terdiri dari 30 – 33 jari – jari lunak. Sirip perutnya memiliki 8 – 9 jari – jari lunak. (Khairuman dan Suhenda 2002). Morfologi ikan Patin dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Ikan Patin (*Pangasius hypophthalmus*)
(Sumber : <http://www.fishbase.org/summary/Pangasianodon-hypophthalmus.html>)

Menurut Saanin (1984) ikan patin diklasifikasikan sebagai berikut:

- Kingdom : Animalia
- Filum : Chordata
- Kelas : Pisces
- Bangsa : Ostariophysi
- Famili : Pangasidae
- Marga : *Pangasius*
- Jenis : *Pangasius hypophthalmus*

Habitat ikan Patin adalah sungai besar, muara, dan danau. Berdasarkan bentuk mulutnya yang terletak agak ke bawah, ikan patin termasuk ikan yang hidup di dasar perairan. Sesekali ikan Patin akan muncul ke permukaan air untuk mengambil oksigen langsung dari udara. Ikan Patin memiliki toleransi

terhadap pH perairan yang agak asam (pH 5) hingga basa (pH 9) (Khairuman dan Suhenda, 2002) dan mampu hidup pada kondisi lingkungan perairan yang buruk (Kordi, 2010).

Ikan Patin merupakan ikan omnivora dan aktif di malam hari (nokturnal). Pada malam hari, ia akan keluar dari sarangnya untuk mencari makanan berupa cacing, serangga, udang sungai, siput, dan biji – bijian (Maswira, 2009). Meskipun tergolong omnivora, ikan patin cenderung pemakan daging (Djariah, 2001). Makanan utamanya adalah udang renik (*crustacea*), insekta, dan moluska (Susanto dan Amri, 2002). Selain itu, ikan patin juga sangat tanggap terhadap pakan buatan (Cholik *et al.*, 2005).

Adapun komposisi kimia ikan Patin menurut Maghfiroh (2000) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Komposisi kimia ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*)

Komposisi	Kadar (%)
Air	82,22
Abu	0,74
Protein	14,53
Lemak	1,09
Karbohidrat	1,43

B. Fermentasi

Fermentasi adalah proses terjadinya perubahan kimia suatu substrat organik secara enzimatik. Enzim yang bekerja pada proses fermentasi dihasilkan oleh mikroorganisme (Suprihatin, 2010). Mikroorganisme yang melakukan fermentasi membutuhkan substrat sebagai energi yang umumnya diperoleh dari glukosa. Fermentasi terjadi karena adanya metabolisme anaerobik,

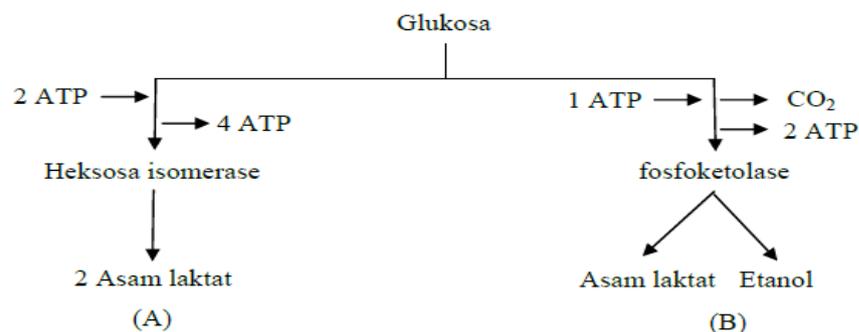
dimana mikroorganisme memecah substrat dalam kondisi tanpa oksigen. Secara teknik, fermentasi didefinisikan sebagai proses oksidasi karbohidrat secara anaerob atau parsial anaerob yang menghasilkan alkohol dan beberapa asam (Muchtadi dan Ayustaningwarno, 2010).

Berdasarkan sumber mikroorganismenya, fermentasi dibagi menjadi dua, yaitu fermentasi spontan dan fermentasi tidak spontan. Fermentasi spontan hanya menggunakan bahan – bahan; garam, asam organik, asam mineral, nasi atau pati sebagai media penyeleksi. Media penyeleksi tersebut menyediakan kondisi yang mendukung pertumbuhan bakteri yang berperan dalam fermentasi, sehingga bakteri patogen akan terseleksi. Fermentasi tidak spontan dilakukan dengan penambahan starter pada media penyeleksi, tujuannya agar proses fermentasi berlangsung lebih cepat (Suprihatin, 2010).

Fermentasi ikan merupakan cara pengawetan tradisional yang bertujuan untuk memperpanjang masa simpan ikan. Fermentasi ikan juga menciptakan substansi rasa baru dan mengubah tekstur ikan (Mouritsen dan Mouritsen, 2009). Fermentasi yang terjadi pada pengolahan ikan adalah antarlain fermentasi asam laktat, di mana mikroba yang berperan dalam proses fermentasi ini adalah golongan bakteri asam laktat (BAL). Berdasarkan produk akhir metabolisme, BAL dibagi menjadi dua kelompok, yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. Fermentasi glukosa oleh BAL homofermentatif hanya menghasilkan satu jenis komponen sebagai hasil utamanya, sebagian besar adalah asam laktat. Fermentasi glukosa oleh BAL

heterofermentatif menghasilkan asam laktat, asam asetat, etanol, dan CO₂ (Salminen *et al.*, 2004).

Fermentasi sumber karbohidrat pada proses fermentasi ikan oleh BAL dibagi menjadi tiga tahap. Tahap pertama, karbohidrat akan dihidrolisa menjadi maltosa oleh enzim α dan β amilase, yang merupakan enzim ekstraseluler pada BAL. Tahap kedua, maltosa akan dipecah menjadi glukosa oleh enzim maltase. Tahap terakhir, glukosa akan diubah menjadi asam laktat dan asam lainnya, seperti asam asetat, asam propionat, dan etanol dalam jumlah yang kecil (Fardiaz, 1989). Proses pemecahan glukosa dapat dilihat pada Gambar 2.



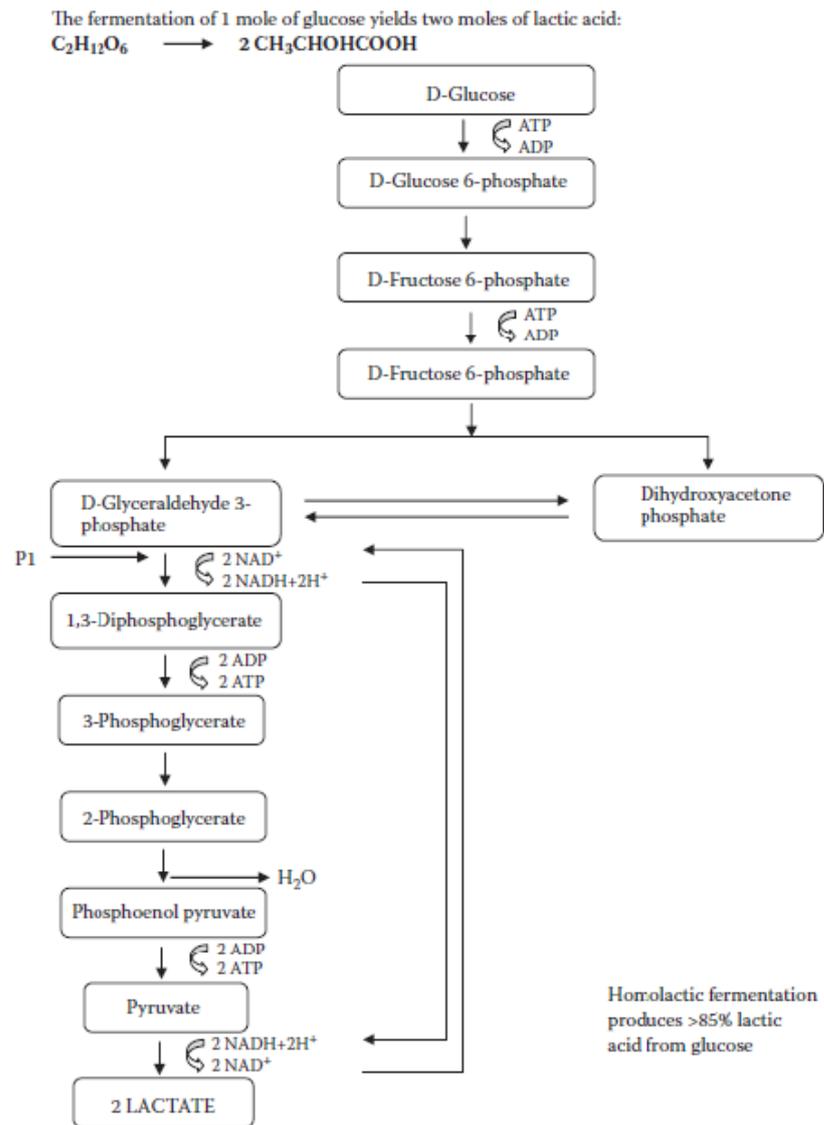
Gambar 2. Produksi Asam Laktat Melalui Fermentasi Glukosa secara Homofermentatif (A) dan Heterofermentatif (B) (Rahayu *et al.*, 1992).

BAL homofermentatif dapat mengubah 95 % dari glukosa menjadi asam laktat serta CO₂ dan asam volatil lainnya dalam jumlah yang sangat kecil. Proses pemecahan glukosa oleh BAL homofermentatif melalui jalur *Embden-Meyerhof-Parnas* (EMP) atau glikolisis (Hidayat *et al.*, 2006). Jalur EMP ditandai dengan pembentukan fruktosa difosfat, kemudian pemecahan

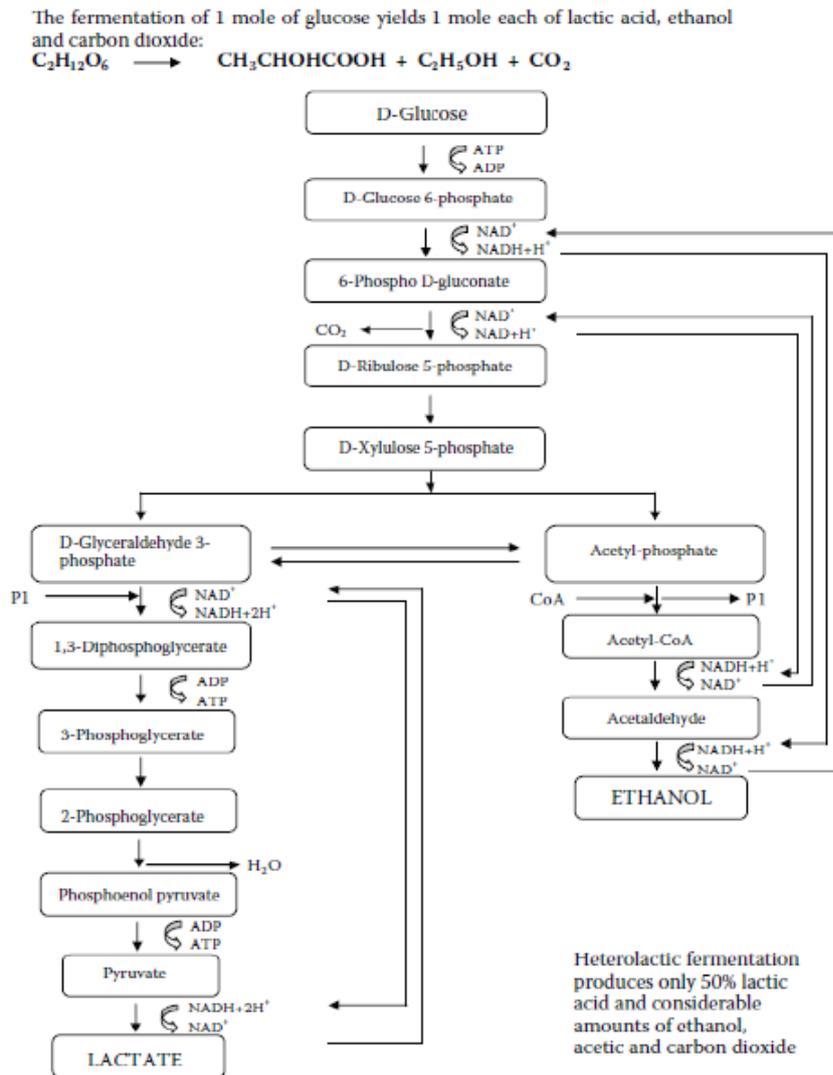
menjadi dua molekul gliseraldehid fosfat. Reaksi ini dikatalisis oleh enzim aldolase. Selanjutnya gliseraldehid fosfat dioksidasi sehingga menghasilkan ATP, melalui reaksi dehidrogenasi yang dikatalisis oleh enzim gliseraldehid fosfat dehidrogenase. Atom hidrogen yang dilepaskan pada reaksi ini akan ditangkap oleh NAD membentuk NADH_2 . NAD berperan sebagai pembawa atom hidrogen pada proses fermentasi. Fermentasi akan terus berlangsung apabila NADH_2 dioksidasi kembali pada tahap kedua fermentasi (Fardiaz, 1989).

BAL heterofermentatif memfermentasi glukosa melalui jalur fosfoketolase. Jalur ini merupakan percabangan dari jalur heksosamonofosfat. BAL heterofermentatif tidak memiliki enzim aldolase yang dapat memecah fruktosa 1,6-difosfat menjadi 2 triose-fosfat dan tidak mempunyai enzim transaldolase dan transketolase yang penting dalam jalur heksosamonofosfat (Fardiaz, 1989).

Salminen *et al.* (2004) menyatakan fermentasi 1 mol glukosa oleh BAL homofermentatif menghasilkan 2 mol asam laktat dan 2 mol ATP, sedangkan BAL heterofermentatif menghasilkan 1 mol asam laktat, 1 mol ATP, etanol, dan CO_2 . Adapun reaksi fermentasi homolaktat dan heterolaktat dapat dilihat pada Gambar 3 dan Gambar 4.



Gambar 3. Fermentasi Homolaktat (Theron dan Lues, 2011).



Gambar 4. Fermentasi Heterolaktat (Theron dan Lues, 2011).

C. Bekasam

Bekasam merupakan salah satu produk olahan ikan tradisional secara fermentasi. Bekasam banyak dikenal di daerah Jawa Tengah, Sumatera Selatan, dan Kalimantan Selatan. Ikan yang digunakan sebagai bahan baku bekasam umumnya ikan air tawar (Adawyah, 2007). Bahan baku utama pembuatan bekasam adalah ikan air tawar, garam, dan sumber karbohidrat.

Pada prinsipnya, pembuatan bekasam terdiri dari tiga tahap, yaitu penggaraman, penambahan karbohidrat, dan fermentasi. Garam berfungsi untuk mencegah pembentukan amonia dari senyawa nitrogen dan menyeleksi mikroba, serta memberikan cita rasa pada bekasam (Adawyah, 2007). Adanya penambahan garam akan menciptakan perbedaan konsentrasi antara tubuh ikan dengan lingkungannya, sehingga cairan akan keluar dari tubuh ikan. Cairan tersebut akan melarutkan kristal garam dan partikel garam akan masuk ke tubuh ikan. Partikel garam tersebut akan menyerap cairan pada tubuh ikan dan cairan sel bakteri, akibatnya sel bakteri akan mengalami dehidrasi dan kematian (Adawyah, 2007).

Penambahan karbohidrat bertujuan merangsang pertumbuhan bakteri asam laktat. Karbohidrat akan diuraikan melalui proses fermentasi menjadi gula – gula sederhana kemudian dikonversi menjadi alkohol dan asam, seperti asam laktat, asam asetat, asam propionat. Alkohol dan asam yang dihasilkan berperan sebagai pengawet dan memberikan rasa dan bau yang khas pada bekasam (Irianto, 2013). Sumber karbohidrat yang digunakan umumnya adalah nasi.

Bekasam sebagai makanan tradisional tidak hanya sebagai sumber nutrisi, juga diketahui memiliki khasiat bagi kesehatan manusia. Menurut Wikandari (2012) bekasam bisa menurunkan tekanan darah tinggi (hipertensi) dengan menghambat aktivitas enzim *Angiotensin I Converting Enzyme* (ACE).

D. Bakteri Asam Laktat (BAL)

Mikroba yang berperan dalam fermentasi bekasam adalah golongan bakteri asam laktat (BAL). BAL adalah golongan bakteri yang menguraikan karbohidrat (glukosa) menjadi asam laktat yang akan menurunkan pH serta menimbulkan rasa asam (Muchtadi dan Ayutaningwarno, 2010). BAL termasuk bakteri gram positif, bersifat katalase negatif, tidak membentuk spora, berbentuk batang dan kokus (Candra, 2006). Golongan bakteri asam laktat terdiri dari famili Micrococcaceae, Lactobacillaceae, dan Streptococcaceae. BAL yang umumnya ditemukan dalam fermentasi bekasam antaralain *Lactobacillus coryneformis*, *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* sp., dan *Pediococcus damnosus* (Irianto, 2013). Menurut penelitian Candra (2006) BAL yang ditemukan selama fermentasi bekasam ikan bandeng adalah *Staphylococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Aerococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, dan *Gemella*.

BAL digolongkan kedalam 2 kelompok berdasarkan produk akhir metabolismenya, yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. Produk akhir fermentasi karbohidrat oleh BAL homofermentatif sebagian besar adalah asam laktat. Jenis bakteri yang termasuk kedalam kelompok ini adalah *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus* dan beberapa spesies *Lactobacillus*. Sedangkan produk akhir dari fermentasi karbohidrat oleh BAL heterofermentatif adalah asam laktat, etanol, asam asetat, asam format dan CO₂ dalam jumlah yang hampir sama. Contoh bakteri asam laktat heterofermentatif adalah *Leuconostoc* dan beberapa spesies *Lactobacillus*,

Pada tahap awal fermentasi produk perikanan, mikroba yang tumbuh akan didominasi oleh jenis *Leuconostoc mesenteroides*, hal ini dikarenakan bakteri tersebut memiliki ketahanan terhadap konsentrasi garam yang tinggi (Fardiaz, 1992). Setelah 2 hari, populasi *Leuconostoc mesenteroides* akan menurun dengan cepat dan tumbuh *Streptococcus faecalis*. Setelah hari kelima, pertumbuhan *Streptococcus faecalis* terhambat oleh asam yang tinggi. Pada tahap akhir fermentasi, didominasi oleh jenis *Lactobacillus plantarum*.

Pertumbuhan BAL pada fermentasi ikan dipengaruhi oleh faktor lingkungan, antarlain suhu, nilai pH, kadar garam, dan karbohidrat.

Suhu memengaruhi pertumbuhan mikroba dikarenakan suhu memengaruhi aktivitas enzim yang mengkatalisis reaksi biokimia di dalam sel mikroba.

Mikroba memiliki suhu optimum untuk melakukan aktivitas metabolisme yang berbeda – beda. Selain berpengaruh terhadap metabolisme sel, suhu juga berpengaruh terhadap jenis mikroba yang dominan selama fermentasi (Fardiaz, 1992).

Bakteri umumnya tumbuh optimum pada pH 6,5 – 7,5. Namun, beberapa spesies dapat tumbuh pada keadaan yang sangat asam maupun basa misalnya *Thiobacillus thiooxidans* yang mampu tumbuh pada pH optimum 2,0 – 3,5 sedangkan *Staphylococcus aureus* mampu tumbuh pada pH maksimum 9,3 (Pelczar dan Chan, 1986). Nilai pH juga berpengaruh terhadap pembentukan produk selama fermentasi.

Kebutuhan garam untuk pertumbuhan optimum mikroorganisme bergantung pada sifat dinding sel dan tekanan osmotik internalnya. Garam pada

fermentasi ikan berperan mengikat air dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme pembusuk yang tidak dikehendaki (Adawyah, 2007). Garam akan menaikkan tekanan osmosis dan menyebabkan terjadinya plasmolisis pada sel mikroba. Mikroba pembusuk umumnya sensitif terhadap konsentrasi garam yang tinggi. Perbandingan antara ikan dan kadar garam harus tepat, dikarenakan jika kadar garam yang ditambahkan tidak mencukupi, bakteri pembusuk dapat tumbuh dan menyebabkan bau yang menyimpang. Jika kadar garam terlalu tinggi menyebabkan produk fermentasi yang dihasilkan memiliki rasa asin dengan konsistensi yang berbeda dari yang diharapkan (Rahayu *et al.*, 1992).

Ikan mengandung komposisi karbohidrat yang sangat sedikit. Sehingga diperlukan penambahan karbohidrat dalam fermentasi ikan. Karbohidrat berfungsi sebagai sumber energi bagi BAL. BAL akan menguraikan karbohidrat menjadi senyawa – senyawa sederhana, seperti asam laktat, asam asetat, asam propionat, dan etil alkohol. Senyawa – senyawa tersebut berperan sebagai pengawet dan memberikan rasa dan bau yang spesifik pada bekasam. Sumber karbohidrat yang ditambahkan umumnya adalah nasi (Irianto, 2013).

E. Lipid

Lipid atau lemak merupakan senyawa organik yang tidak bisa larut dalam air namun larut pada pelarut nonpolar, seperti kloroform dan eter. Lipid dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu lipid netral, fosfolipid, spingolipid, dan glikolipid. Lipid merupakan sumber energi utama bagi hampir semua organisme

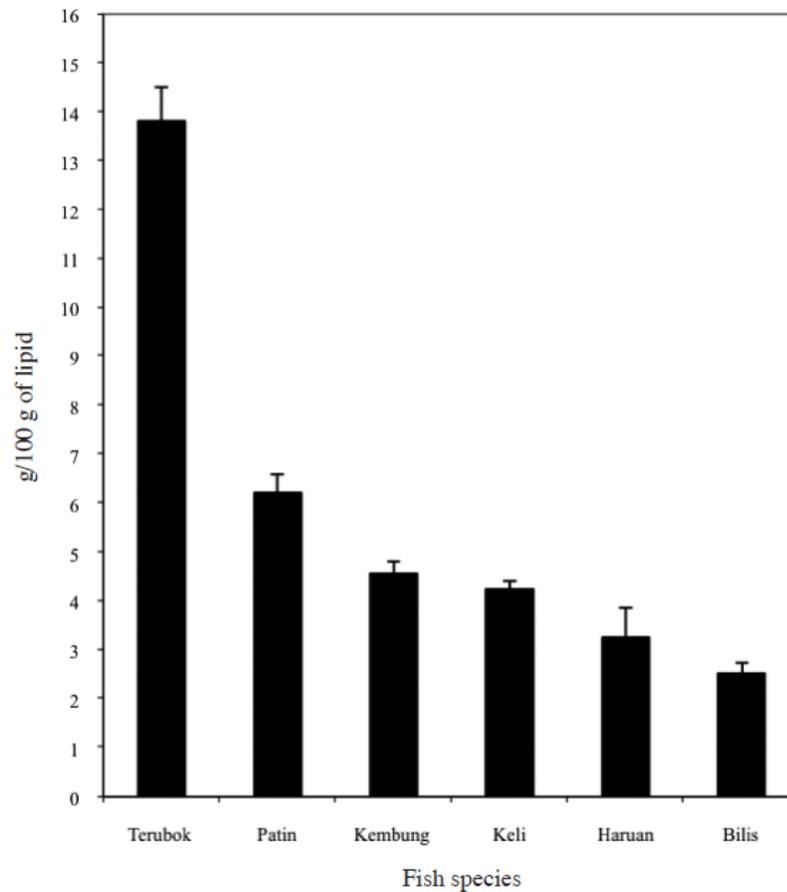
(Suhardi *et al.*, 2007), energi yang dihasilkan dari lipid adalah 9 kkal per gramnya, 2,5 kali lipat energi yang dihasilkan oleh karbohidrat dan protein dalam jumlah yang sama (Almatsier, 2000).

Satu molekul lipid tersusun dari satu hingga tiga asam lemak dan satu gliserol. Asam lemak adalah asam organik berantai panjang dengan 4 – 24 atom karbon, memiliki gugus karboksil tunggal, dan ujung hidrokarbon nonpolar yang panjang. Hal tersebut yang menyebabkan lipid bersifat tidak larut dalam air dan tampak berminyak (Davenport dan Johnson, 1971).

Sementara itu, gliserol memiliki tiga gugus hidroksil atau trihidrat (Gaman dan Sherrington, 1992). Berdasarkan jumlah asam lemak yang terdapat pada gugus karboksil gliserol, maka lipid dikelompokkan menjadi monogliserida, digliserida, dan trigliserida.

Menurut penelitian Muhamad dan Mohamad (2012) ikan Terubok (*Tenualosa toli*) memiliki kandungan lipid sebesar 13.82 gr /100 gr; ikan Patin (*Pangasius hypophthalmus*) 6.23 gr/ 100 gr; ikan Kembung (*Rastreligger kanagurta*), 4.54 gr/100 gr; dan ikan Keli atau Lele (*Clarias macrocephalus*) 4.25 gr/ 100 gr. Sementara itu, ikan Bilis (*Stolephorus baganensis*) dan ikan Haruan (*Channa striatus*) memiliki kandungan lipid yang rendah hingga sedang berkisar antara 2.42 gr/ 100 gr – 3.25 g/100g. Hal tersebut menunjukkan bahwa kandungan lipid ikan Patin cukup tinggi dibandingkan ikan air tawar lainnya, yaitu Lele (*Clarias macrocephalus*) dan Haruan (*Channa striatus*). Lipid pada ikan Patin terdapat pada jaringan otot atau

daging. Grafik kandungan lipid pada keenam spesies ikan dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Kandungan Lipid pada 6 Spesies Ikan yang Berbeda

(Sumber: Muhamad dan Mohamad, 2012)

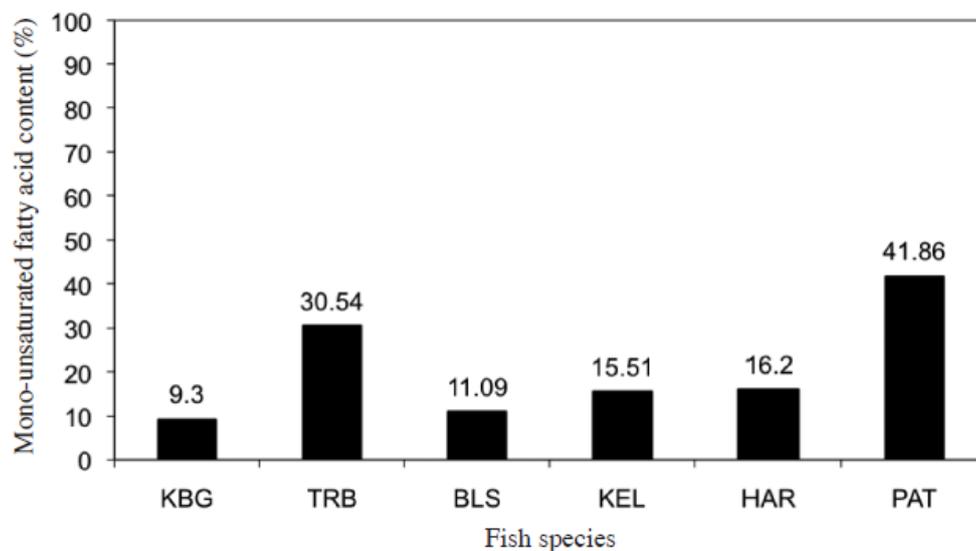
Berdasarkan hasil analisis asam lemak yang dipisahkan dengan kromatografi, ditunjukkan pada Gambar 7, ikan air tawar lokal seperti ikan Lele, Patin, dan *Snakehead* mengandung proporsi asam lemak jenuh dan C_{18} yang lebih tinggi, tetapi rendah C_{20} dan C_{22} dibandingkan ikan air laut.

Ikan Patin memiliki kandungan asam lemak tak jenuh tunggal atau MUFA (*Monounsaturated Fatty Acid*) paling tinggi, yakni 41,86 %, seperti terlihat pada Gambar 7.

TABLE 6. Fatty acid composition of *Pangasius hypothalamus* (patin) based on chromatogram Figure 7

Peak no	Compound Name	Symbol	Molecular Weight	Molecular Formula
1	Dodecanoic acid, methyl ester	12:0	214	C ₁₃ H ₂₆ O ₂
2	9-hexadecenoic acid, methyl ester	14:0	242	C ₁₅ H ₃₀ O ₂
3	Hexadecanoic acid, methyl ester (palmitic acid)	16:2 (n-6)	268	C ₁₇ H ₃₂ O ₂
4	9,12,15- octadecatrienoic acid, methyl ester (alpha-linolenic)	18:3 (n-3)	292	C ₁₉ H ₃₂ O ₂
5	Cis-9-octadecenoic acid, methyl ester (Oleic acid)	18:1	296	C ₁₉ H ₃₆ O ₂
6	Octadecanoic acid, methyl ester	18:0	298	C ₁₉ H ₃₈ O ₂
7	5,8,11,14-eicosatetraenoic acid, methyl ester (arachidonic acid)	20:4 (n-3)	318	C ₂₁ H ₃₄ O ₂
8	8,11,14-eicosatetraenoic acid, methyl ester (dihommo-gamma-linolenic)	20:3 (n-6)	306	C ₂₀ H ₃₄ O ₂
9	11,14-eicosadienoic acid, methyl ester	20:2 (n-6)	322	C ₂₁ H ₃₈ O ₂
10	Cis-13-docosenoic acid, methyl ester (erucic acid)	22:1 (n-9)	352	C ₂₃ H ₄₄ O ₂
11	4,7,10,13,16,19 - Docosahexaenoic acid (DHA)	22:6 (n-3)	419	C ₂₃ H ₃₆ O ₂

Gambar 6. Komposisi Asam Lemak Ikan Patin
(Sumber: Muhamad dan Mohamad, 2012).

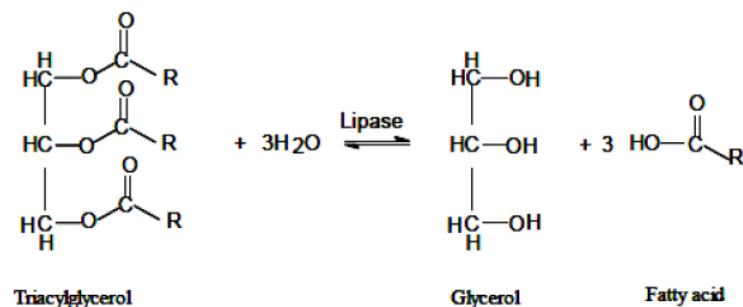


Gambar 7. Total MUFA pada Keenam Spesies Ikan.

(Sumber: Muhamad dan Mohamad, 2012).

F. Lipase

Lipase (*triacyl glycerol acylhidrolase* EC 3.1.1.3) merupakan kelompok enzim dari kelas hidrolase yang mengkatalisis reaksi hidrolisa ikatan ester pada rantai panjang asam lemak (trigliserida) menjadi gliserol dan asam lemak bebas (Helen *et al.*, 2010) (Gambar 8). Lipase memiliki keunikan yakni mampu mengkatalisis reaksi esterifikasi, trans-esterifikasi, aminolisis, dan asidolisis dalam kondisi yang sedikit air (Joseph *et al.*, 2008). Lipase dapat ditemukan secara luas di alam yang diproduksi oleh beberapa tanaman, hewan, dan mikroorganisme (Gupta *et al.*, 2003). Lipase akan mengkatalisis suatu reaksi apabila terjadi *lipid-water interface* atau bisa disebut *interfacial activation*, yaitu suatu mekanisme yang mana sisi aktif lipase akan terbuka ketika berinteraksi dengan substrat yang memiliki kelarutan rendah terhadap air (Zheng *et al.*, 2010).



Gambar 8. Hidrolisa Lemak oleh Lipase

Kemampuan suatu mikroorganisme dalam menghasilkan lipase disebut lipolitik. Mikroorganisme yang memiliki kemampuan lipolitik antarlain *Pseudomonas sp*, *Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, *Candida rugosa*. *Candida sp* dan *Rhizopus sp*. (Pandey *et al.*, 1999).

Golongan BAL yang telah diketahui memiliki kemampuan lipolitik adalah *Lactococcus plantarum* yang diisolasi dari Ngari (fermentasi ikan) dan *Lactobacillus fructosus* yang diisolasi dari Tungtap (fermentasi pasta ikan) (Thapa *et al.*, 2004), *Lactococcus lactis* dari bekasam ikan Bandeng (Umaiya, 2015).

Berdasarkan biosintesisnya, lipase tergolong enzim induktif. Enzim induktif jumlahnya tidak tetap di dalam sel, bergantung pada induser (Lidya dan Djenar, 2000). Sehingga dalam produksi lipase sangat dipengaruhi oleh adanya induser. Selain itu, produksi lipase juga dipengaruhi oleh media, kondisi aerasi, dan agitasi (August, 2000).

G. Aktivitas Lipase

Aktivitas enzim merupakan kemampuan enzim dalam mengubah suatu substrat menjadi produk. Aktivitas lipase dapat diuji dengan pengamatan terhadap pelepasan asam lemak atau gliserol dari triasilgliserol atau ester asam lemak. Asam lemak yang dilepaskan oleh lipase dapat ditentukan secara kualitatif dan kuantitatif (Gupta *et al.*, 2003).

Salah satu metode yang digunakan untuk menentukan aktivitas lipase secara kuantitatif adalah metode titrimetri. Metode titrimetri banyak digunakan karena kemudahan dan keakuratannya. Aktivitas lipase ditentukan dengan mengukur pembentukan asam lemak bebas yang dititrasi dengan larutan basa berkonsentrasi rendah dan mengasumsikan bahwa jumlah basa yang digunakan selama titrasi sama dengan jumlah asam lemak bebas yang terhidrolisis oleh lipase.

Substrat yang biasa digunakan untuk mengukur aktivitas lipase adalah minyak zaitun (Gupta *et al.*, 2003). Minyak zaitun terdiri atas trigliserida (trioleogliserol). Trioleogliserol memiliki rumus molekul $(C_{17}H_{35}COO)_3C_3H_5$ dengan berat molekul 884 g/mol. Selama inkubasi, minyak zaitun, $(C_{17}H_{35}COO)_3C_3H_5$ akan dihidrolisis oleh lipase menjadi asam lemak $C_{17}H_{34}COOH$ dan gliserol.

Metode titrimetri pada penelitian ini dilakukan berdasarkan Xu *et al.*, 2002. Substrat yang digunakan berupa emulsi substrat yang terdiri dari PVA 3% dan minyak zaitun dengan perbandingan 3 : 1. PVA berfungsi sebagai pengemulsi yang dapat membantu menstabilkan antara larutan minyak dan air. Keemudian ditambahkan 2 ml buffer natrium fosfat pH 7, 2, 5 ml aquades, 0,5 ml $CaCl_2$ dan 1 ml enzim ekstrak kasar, diinkubasi pada *shaker waterbath* selama 15 menit. Untuk menghentikan reaksi setelah inkubasi digunakan Ethanol 96% sebanyak 10 ml. Penambahan Ethanol 96% menyebabkan struktur enzim yang merupakan protein akan terdenaturasi dan rantai ikatan hidrogen antarmolekul samping akan terganggu. Akibatnya struktur sekunder dan tersier enzim rusak sehingga enzim berhenti bekerja.

Campuran selanjutnya dititrasi dengan NaOH 0.05 M, terlebih dahulu ditambahkan 4 tetes fenolftalein 1% sebagai indikator. Asam lemak yang dihidrolisis oleh lipase akan bereaksi dengan NaOH menjadi $C_{17}H_{34}COONa$ dan H_2O (Wulan *et al.*, 2007). Akhir titrasi ditandai dengan adanya perubahan warna dari tidak berwarna menjadi merah muda. Perubahan ini terjadi karena adanya perubahan pH pada larutan reaksi, yang disebabkan oleh tidak ada lagi NaOH yang dapat berikatan dengan asam lemak yang merupakan asam

lemah, sehingga pH larutan menjadi basa. Banyaknya NaOH yang dapat berikatan dengan asam lemak menunjukkan banyaknya asam lemak yang terdapat dalam larutan sebagai hasil hidrolisis minyak zaitun oleh lipase.

Perhitungan aktivitas lipase dilakukan berdasarkan rumus:

$$\text{Aktivitas lipase (U/mL)} = \frac{(A-B) \times N \text{ NaOH} \times 1000}{VE \times t}$$

Aktivitas lipase sangat dipengaruhi berbagai faktor, antarlain temperatur, pH, sumber dan jenis substrat, konsentersasi enzim dan substrat, air, dan pelarut organik. pH dan temperatur optimum reaksi hidrolisis lipase tergantung pada jenis dan sumber substrat, larutan penyangga (buffer), dan pengujian yang digunakan. Sebagai contoh, lipase pankreas mempunyai pH optimum antara 8 dan 9, namun dapat menurun menjadi sekitar 6 – 7 bila substratnya berbeda. Lipase yang berasal dari mikroorganisme memiliki pH optimum pada kondisi netral atau mendekati kisaran basa (August, 2000).

Aktivitas maksimum lipase juga tergantung pada senyawa pengemulsi yang digunakan, karena lipase hanya bekerja pada fasa antara minyak dan air. Oleh karena itu substrat perlu diubah terlebih dahulu menjadi emulsi minyak-air. Selain itu, adanya garam juga sangat mempengaruhi aktivitas lipase. Garam kalsium juga meningkatkan aktivitas lipase dan membantu meningkatkan daya tahan enzim terhadap panas (Winarno,1986).

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari – April 2017 di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah toples kaca, pisau, timbangan, sendok nasi, neraca digital, aluminium foil, rak tabung, mikropipet, mikrotip, bunsen, *vortex mixer*, pH meter, inkubator, jarum ose bulat dan runcing, oven, *hotplate magnetic stirrer*, *laminar airflow*, *autoclave*, *shaker* inkubator, *centrifuge*, *waterbath shaker*, dan alat – alat gelas meliputi; tabung reaksi, cawan petri, erlenmayer, *beaker glass*, gelas ukur, pipet tetes.

Bahan – bahan yang digunakan adalah ikan Patin, garam, nasi, air, akuades, alkohol 70 %, etanol 96%, spirtus, NaCl, *de Man Rogosa Sharpe* (MRS) Agar, *MRS-Broth*, Polivynil Alkohol (PVA), bufer natrium fosfat, CaCl₂, *olive oil*, Rhodamine-B, NaOH, phenolphtalein.

C. Metode Penelitian

Isolat BAL lipolitik diisolasi dari bekasam ikan Patin. Isolasi BAL lipolitik dilakukan dengan metode *spread plate* pada media MRSA + 1% *olive oil* + *Rhodamine B*. Isolat BAL potensial lipolitik selanjutnya diuji untuk mengetahui aktivitas lipasenyanya secara kualitatif dan kuantitatif. Uji aktivitas lipase secara kualitatif dilakukan dengan metode Kouker dan Jaeger (1987) menggunakan media MRSA yang mengandung 1% *Rhodamine B* dan substrat *olive oil* 1%. BAL yang menghasilkan lipase akan muncul pendaran warna jingga pada koloni sel bakteri. Pengukuran aktivitas lipase secara kuantitatif dilakukan menurut Xu *et al.* (2002) berdasarkan asam lemak bebas yang dilepaskan pada hidrolisis emulsi substrat kemudian dititrasi menggunakan basa kuat NaOH.

D. Pelaksanaan

1. Pembuatan Bekasam

Ikan Patin yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Pasar Tempel Raja Basa. Pembuatan bekasam ikan patin dilakukan berdasarkan Zummah dan Prima (2013). Ikan Patin segar disiangi atau dibersihkan isi perut dan insanginya, lalu dicuci bersih dan ditimbang beratnya.

Kemudian ditambahkan garam sebanyak 10 % (b/b) dan ditambahkan nasi dengan perbandingan 1:1 dari berat ikan. Ikan selanjutnya disimpan dalam toples dan diperam selama 7 hari. Setelah 7 hari maka ikan sudah menjadi produk bekasam.

2. Pengayaan BAL Potensial Lipolitik dari Sampel Bekasam

Pengayaan atau *enrichment* bertujuan untuk memicu pertumbuhan BAL potensial lipolitik. Media yang digunakan ditambahkan dengan substrat berupa lipid sehingga bakteri yang tumbuh hanya bakteri yang mampu menghasilkan lipase. Media pengayaan berupa MRSB ditambahkan substrat *olive oil* 1%. 1 gr sampel bekasam ditimbang dan diinokulasikan ke dalam 50 ml media MRSB dalam erlenmayer 250 ml, selanjutnya kultur diinkubasi selama 48 jam di inkubator bergoyang pada suhu 37°C.

3. Isolasi BAL Lipolitik

1 ml kultur pengayaan dimasukkan ke dalam 9 ml larutan pengencer garam fisiologis 0,85 % (pengenceran 10^{-1}) dalam tabung reaksi steril dan dihomogenkan menggunakan *vortex mixer*. Untuk pengenceran 10^{-2} , diambil 1 ml dari suspensi awal kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml larutan pengencer garam fisiologis dan dihomogenkan. Hal yang sama dilakukan untuk membuat pengenceran selanjutnya, tingkat pengenceran sesuai dengan yang dikehendaki (hingga 10^{-6}) (Candra, 2006). Pada pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} diambil 1 ml suspensi dan diinokulasikan secara *spread plate* ke dalam cawan petri yang berisi media MRSA + 1% *olive oil* (v/v) + 1% *rhodamine B* (Kouker dan Jaeger, 1987) diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh diamati di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 365 nm, jika dihasilkan pendaran berwarna jingga mengindikasikan bahwa koloni mampu menghasilkan lipase. Koloni

selanjutnya dimurnikan pada media yang sama menggunakan metode *streak plate*. Koloni yang sudah murni ditumbuhkan pada media yang sama, kemudian diamati di bawah sinar UV untuk memastikan koloni tersebut merupakan BAL lipolitik, lalu diidentifikasi sifat morfologi dan fisiologinya.

4. Uji Aktivitas Lipase

Menurut Gupta *et al.*, (2003), aktivitas lipase dapat diuji dengan pengamatan terhadap pelepasan asam lemak atau gliserol dari triasilgliserol atau ester asam lemak. Uji aktivitas lipase diawali dengan pembuatan starter dari isolat terpilih. Isolat terpilih diinokulasikan ke dalam 50 ml MRSB kemudian diinkubasi pada *shaker* inkubator dengan kecepatan 130 rpm pada suhu 37°C selama 24 jam (Umaiya, 2015). Selanjutnya, 1% starter diinokulasikan ke dalam media produksi, yakni 50 ml MRSB ditambah 1% (v/v) *olive oil* (Zusfahair, 2010) dan diinkubasi pada *shaker* inkubator dengan kecepatan 130 rpm selama 12 jam (Umaiya, 2015). Menurut penelitian Umaiya (2015) jumlah sel dan aktivitas unit lipase tertinggi *Lactococcus lactis* (BAL asal bekasam) terlihat pada fase log akhir, yaitu pada jam ke-12. Kultur bakteri selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan supernatan, yang merupakan enzim ekstrak kasar.

Aktivitas lipase dari enzim ekstrak kasar diukur berdasarkan asam lemak bebas yang dilepaskan pada hidrolisis emulsi substrat. Aktivitas enzim ekstrak kasar diukur menggunakan metode (Xu *et al.*, 2002) dengan membuat 4 ml campuran PVA dan minyak zaitun (3:1), kemudian ditambahkan 2 ml 0,1 M bufer natrium fosfat pH 7, 2,5 ml akuades, 0,5 ml 0.1 M CaCl₂, 1 ml enzim ekstrak kasar, lalu diinkubasi selama 15 menit pada inkubator bergoyang dengan kecepatan 200 rpm pada suhu 37°C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 10 ml etanol absolut 96%. Pada kontrol, campuran langsung ditambahkan 10 ml etanol 96% kemudian diinkubasi selama 15 menit. Campuran diberi indikator fenolftalein sebanyak 4 tetes dan dititrasi dengan 0,05 M NaOH. Satu unit aktivitas lipase didefinisikan dengan jumlah enzim yang menghasilkan 1 µmol asam lemak permenit pada kondisi pengukuran aktivitas. Secara singkat, urutan pengujian lipase ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Urutan Tahap Pengujian Lipase

Komposisi	Uji	Kontrol
Emulsi substrat	4 ml	4 ml
Buffer natrium fosfat	2ml	2 ml
Akuades	2,5 ml	2,5 ml
CaCl ₂	0,5 ml	0,5 ml
Enzim ekstrak kasar	1 ml	1 ml
Etanol 96%	-	10 ml
Inkubasi	15 menit, 37°C	15 menit, 37°C
Etanol 96%	10 ml	-
Indikator PP	4 tetes	4 tetes
Titration menggunakan NaOH 0,05 M		

Emulsi substrat terdiri dari: 3 ml PVA 3% + 1 *olive oil*

Satu unit enzim didefinisikan sebagai kemampuan enzim untuk membebaskan 1 μmol *free fatty acid* (FFA) dalam setiap menit.

Jumlah mmol NaOH = mmol FFA = V (mL) NaOH x N NaOH

Jumlah μmol FFA = mmol FFA x 1000

Unit enzim lipase = jumlah μmol FFA

Aktivitas lipase dapat dihitung dengan cara sebagai berikut (Shu, 2009):

$$\text{Aktivitas lipase (U/mL)} = \frac{(A-B) \times N \text{ NaOH} \times 1000}{VE \times t}$$

Keterangan :

A = Volume (mL) NaOH untuk titrasi sampel

B = Volume (mL) NaOH untuk titrasi blanko

1000 = Konversi dari mmol ke μmol

t = Waktu inkubasi (menit)

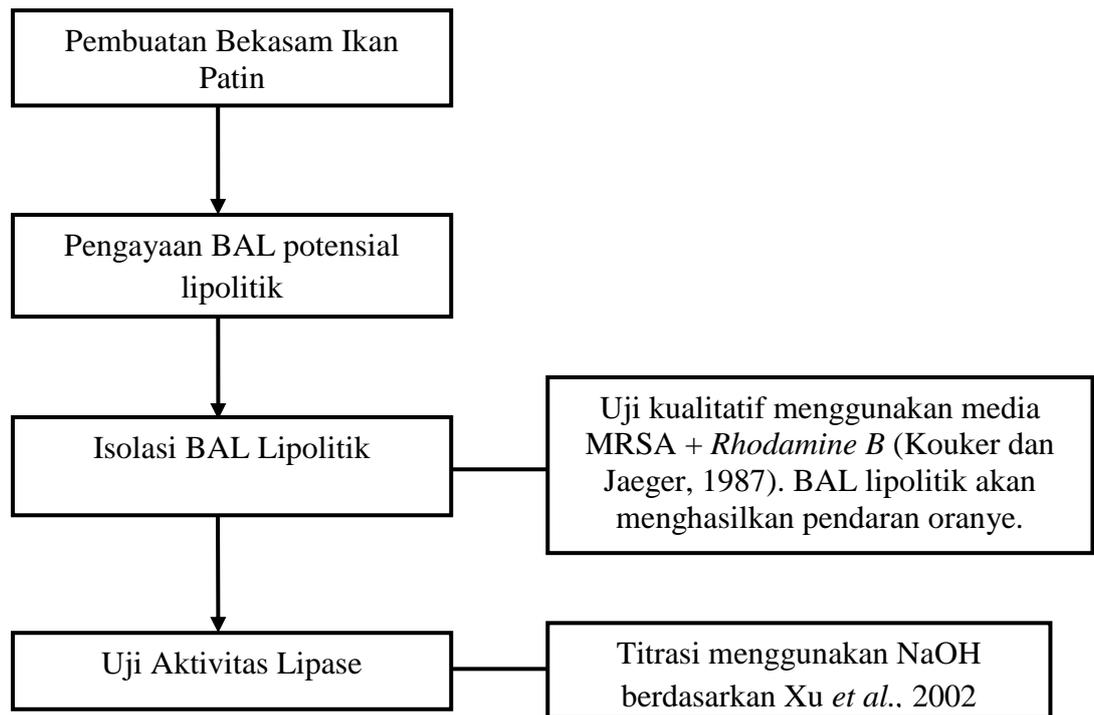
VE = Volume enzim

E. Analisis Data

Data hasil isolasi dan uji aktivitas lipase yang diperoleh disajikan dalam bentuk deskriptif dengan didukung foto.

F. Diagram Alir

Tahap – tahap penelitian mengikuti diagram alir yang ditunjukkan pada Gambar 12.



Gambar 9. Diagram Alir Penelitian

V. SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Diperoleh 9 isolat BAL lipolitik yang diisolasi dari bekasam ikan patin.
2. Isolat yang memiliki aktivitas lipase tertinggi adalah isolat BL 7 dengan aktivitas 6,67 U/ mL. Isolat yang memiliki aktivitas lipase terendah adalah isolat BL 5 dan BL 10 dengan aktivitas lipase 2 U/mL.

B. Saran

1. Diantara 9 isolat BAL lipolitik yang diisolasi dari bekasam ikan patin, isolat BL7 dapat digunakan untuk memproduksi enzim lipase.
2. Untuk meningkatkan potensi lipolitik, perlu dilakukan penelitian lanjutan, seperti karakterisasi enzim lipase pada berbagai suhu, pH, dan parameter kinetis lainnya, serta identifikasi jenis isolat BAL lipolitik.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, M. R. dan Maurice, O. Moss. 2008. *Food Microbiology Third Edition*. RSC Publishing. Guildford, UK.
- Adawyah, R. 2007. *Pengolahan dan Pengawetan Ikan*. Bumi Aksara. Jakarta.
- Almatsier, S. 2000. *Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Amin, W. dan Leksono, T. 2001. Analisis Pertumbuhan Mikroba Ikan Jambal Siam (*Pangasius sutchi*) Asap yang Telah Diawetkan Secara Ensiling. *Jurnal Natur Indonesia*. 4(1): 1-9.
- Andersen, J. H. dan Ostdal, H. 1995. Partial Purification and Characterisation of A Lipase From *Lactobacillus plantarum* MF32. *Food Chemistry*. 53: 369-373.
- August, E. 2000. *Kajian Penggunaan Lipase Amobil dari Aspergillus niger pada Pembuatan Monoasilgliserol yang bersifat Antibakteri dari Minyak Kelapa*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Campbell, N. A., Jane B. Reece, Lisa A. Urry, Michael L. Cain, Steven A. Wasserman, Peter V. Minorsky, Robert B. Jackson. 2012. *Biologi*. Edisi Kedelapan Jilid 2. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Candra, I.J. 2006. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Produk Bekasam Ikan Bandeng (*Chanos chanos*). *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Cholik, F., Jagatraya, A.G., Poernomo, R.P., dan Jauzi A. 2005. *Akuakultur Tumpuan Harapan Masa Depan Bangsa*. Masyarakat Perikanan Nusantara dan Taman Akuarium Air Tawar Taman Mini Indonesia Indah. Jakarta.
- Davenport, J.B. dan Johnson, A.R. 1971. The Nomenclature and Classification Of Lipids. *Biochemistry and Methodology of Lipids*. Wiley-Interscience. Sydney.
- Desniar. 2012. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Produk Fermentasi Ikan Bekasam. *Disertasi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Djariah, A.S. 2001. *Budidaya Ikan Patin*. Kanisius. Yogyakarta.
- Fardiaz, S. 1989. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. Petunjuk Laboratorium. Lembaga Sumberdaya Informasi. Institut Pertanian Bogor.

- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan 1*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Flores, M., dan Toldrá, F. 2011. Microbial Enzymatic Activities For Improved Fermented 440 Meats. *Trends in Food Science and Technology*. 22, 81-90.
- Gaman, P. M. dan Sherrington, K. B. 1992. *Pengantar Ilmu Pangan Nutrisi dan Mikrobiologi Edisi ke-2*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Gupta, R., Pooja Rathi, Namita Gupta, Sapna Bradoo. 2003. Bacterial Lipases: An Overview of Production, Purification and Biochemical Properties. *Appl Microbiol Biotechnol*. 64:763-781.
- Harmayani, E., Ngatirah, Rahayu, E. S., Utami, T. 2001. Ketahanan dan Validasi Probiotik Bakteri Asam Laktat Selama Proses Pembuatan Kultur Kering dengan Metode *Freeze* dan *Spray Drying*. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. XII(2): 126-132.
- Helen, T., De Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio M., Oliveira, J.V. 2010. A Review on Microbial Lipase Production. *Food Bioproc Technol*. 3:182-196.
- Hidayat, N., Padaga, M. C., dan Suhartini, S. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Penerbit Andi. Yogyakarta.
- Irianto, H. E. 2013. *Produk Fermentasi Ikan*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Irianto, H. E. dan Giyatmi, S. 2009. *Teknologi Pengolahan Hasil Perikanan*. Penerbit Universitas Terbuka. Jakarta.
- Johnson, M. E., Kapoor, R., McMahan, D. J., McCoy, D. R., & Narasimmon, R. G. 456. 2009. Reduction of Sodium and Fat Levels in Natural and Processes Cheeses. *Comprehensive Reviews in Food Science and 458 Food Safety*. 8: 252-268.
- Joseph, B., Ramteke, P.W., Thomas, G. 2008. Cold Active Microbial Lipases: Some Hot Issues and Recent Developments. *Biotechnol Adv*. 26:457-470.
- Khairuman dan Suhenda, D. 2002. *Budidaya Patin secara Intensif*. Agro Media Pustaka. Jakarta.
- Khanifah. 2012. Uji Potensi Probiotik *Lactobacillus plantarum* yang Diisolasi dari Usus Halus Itik Mojosari (*Anas platyrinchos*) Secara *In Vitro*. *Skripsi*. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang. Malang.
- Khomsan, A., Baliwati, Y. F., Dwirianai, M. C. 2004. *Pengantar Pangan dan Gizi*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Kordi, M. G. H. K. 2010. *Budidaya Ikan Patin di Kolam Terpal*. Lily Publisher. Yogyakarta.
- Kouker G. dan Jaeger K. E. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environ Microbiol*. 53: 211-213.

- Kristanti, N. D. 2001. Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Lipase Ekstraseluler dari Kapang *Rhizopus oryzae* TR 32. *Tesis*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Lehninger. 1995. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid 1*. Terjemahan: Suhartono MT. Erlangga. Jakarta.
- Lidya, B. dan N. S. Djenar. 2000. *Dasar Bioproses*. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi DEPDIKNAS. Jakarta.
- Maghfiroh, I. 2000. Pengaruh Perubahan Bahan Pengikat Terhadap Karakteristik *Nugget* dari Ikan Patin (*Pangasius hypophthalmus*). *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Maswira. 2009. [http// habitat-ikan-patin.html](http://habitat-ikan-patin.html). Diakses pada 9 Desember 2016.
- McSweeney, P. L. H., dan Sousa, M. J. 2000. Biochemical Pathways for The Production of 482 Flavour Compounds in Cheeses During Ripening. *A Review. Lait*. 80, 293-324.
- Mouritsen, O.G. dan Mouritsen, J.D. 2009. *Sushi – For Eye, Body and Soul*. Springer Science. UK.
- Muchtadi, T. R. dan Ayustaningwarno, F. 2010. *Teknologi Proses Pengolahan Pangan*. Alfabeta. Bandung.
- Muhamad, N. A. dan Mohamad, J. 2012. Fatty Acid Composition of Selected Malaysian Fishes. *Sains Malaysiana*. 41: 81 – 94.
- Ngom, M. O. 2000. Induction and Production of Specific Extracellular Lipases from Selected Microorganisms. *Thesis*. Department of Food Science and Agricultural Chemistry, McGill University. Canada.
- Nithya, K., Senbagam, D., Senthilkumar, B., Udhayashree, N., Gurusamy, R. 2012. Characterization of Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria and Its Application As A Food Preservative. *African Journal of Microbiology Research*. 6(6): 1138-1146.
- Nuraini, A., Ratna I., Laras R. 2014. Pengaruh Penambahan Konsentrasi Sumber Karbohidrat dari Nasi dan Gula Merah yang Berbeda Terhadap Mutu Bekasam Ikan Nila Merah (*Oreochromis niloticus*). *J. Saintek Perikanan*. 10(1):1-67.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V. T. 1999. The Real of Microbial Lipases in Biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem*. 29(2):119-131.
- Pelczar, MJ. Jr. dan Chan E. C. S. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. UI Press. Jakarta.
- Rahayu, W., Ma'oen, S., Suliantari, dan Fardiaz, S. 1992. *Teknologi Fermentasi Produk Perikanan*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

- Rani, S. A. B. Pitts, and P. S. Stewart. 2005. Rapid Diffusion of Fluorescent Tracers into *Staphylococcus epidermidis* Biofilms Visualized by Time Lapse Microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49 : 728–732.
- Saanin, H. 1984. *Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan*. Bina Cipta. Jakarta.
- Saktiwansyah, E. 2001. Karakterisasi Enzim Lipase Intraseluler dengan Aktivitas Esterifikasi dari Kapang *Rhizopus oryzae* TR 32. *Tesis*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Salminen, S., A.V. Wright, dan A. Ouwehand. 2004. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded*. Marcel Dekker Inc. Cimarron Road, Monticello, New York.
- Schaechter, M. 2004. *The Desk Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier Ltd. UK.
- Shu, Zhengyu, Lin R., Jiang H., Zhang Y., Wang M., Huang J. 2009. A rapid and efficient method for directed screening of lipase-producing *Burkholderia cepacia* complex strains with organic solvent tolerance from rhizosphere. *J. Bioscience Bioengineering*. (107) 6; 658-661.
- Suhardi, Haryono, B., Sudarmadji, S. 2007. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Liberti. Yogyakarta.
- Sumardi, R. S. 2006. Keragaman Mikroorganisme Selama Proses Fermentasi Bekasam Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor.
- Suprihatin. 2010. *Teknologi Fermentasi*. UNESA University Press. Surabaya.
- Susanto, H. 2009. *Pembenihan dan Pembesaran Patin*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Susanto, H. dan Amri, K. 2002. *Budidaya Ikan Patin*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Thapa N., Pal J., Tamang J. P. 2004. Microbial Diversity in Ngari, Hentak, and Tungtap, Fermented Fish Products of North-East India. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20: 599 – 607.
- Theron, M. M. dan Lues, J. F. R. 2011. *Organic Acids and Food Preservation*. Boca Raton Press. CRC.
- Umaiya, A.U. 2015. Bakteri Asam Laktat Asal Bekasam Penghasil Lipase pada Substrat Margarin. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor.
- Wikandari, P. R. 2012. Potensi Bakteri Asam Laktat Indigenous Sebagai Penghasil Angiotensin I *Converting Enzyme Inhibitor* pada Fermentasi Bekasam. (Disertasi). Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Winarno, F.G. 1986. *Pengantar Teknologi Pangan*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Xu Y, Wang D, Mu XQ, Zhao GA, Zhang KC. 2002. Biosynthesis of Ethyl Esters of Short-Chain Fatty Acids Using Whole-Cell Lipase from *Rhizopus*

- Chinensis* CCTCC M201021 in Non-Aqueous Phase. *J Mol Cat B: Enzy.* 18:29-37.
- Zheng, Y. Y., Guo, X. H., Song, N. N., Li, D. C. 2010. Thermophilic Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Gene Cloning, Expression And Characterization. *J Molec Catal B: Enzyme.* 69:127-132.
- Zummah, A. dan Prima, R.W. 2013. Pengaruh Waktu Fermentasi dan Penambahan Kultur Starter Bakteri Asam Laktat *Lactobacillus plantarum* B1765 Terhadap Mutu Bekasam Ikan Bandeng (*Chanos chanos*). *UNESA Journal of Chemistry.* Vol. 2(3).
- Zusfahair, Setyaningtyas, T., Fatoni, A. 2010. Isolasi, Pemurnian, dan Karakterisasi Lipase Bakteri Hasil Skrining dari Tanah Tempat Pembuangan Akhir (TPA) Gunung Tugel Banyumas. *Jurnal Natur Indonesia.* 124 – 129.