

Produksi dan stabilisasi desaturase dari *Absidia corymbifera*

Production and stabilization of desaturases from Absidia corymbifera

TRI-PANJI¹⁾, SUHARYANTO¹⁾, A. W. PAULUS²⁾,
K. SYAMSU²⁾ & A. M. FAUZI²⁾

¹⁾ Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor 16151, Indonesia

²⁾ Jurusan Teknologi Industri Pertanian, FATETA- IPB, Bogor

Summary

Desaturases are enzymes which catalyze desaturation process on carbon chain of fatty acids into unsaturated fatty acids useful for healthy oil. Desaturases could be produced from Absidia corymbifera and applied for increasing unsaturation level and crude palm oil (CPO) quality. Desaturases have been known as very unstable enzymes. The objective this research was to determine carbon sources and culture time for optimum desaturase production, fatty acid composition resulted from desaturase bioconversion, and methods for stabilization of desaturase from A. corymbifera. Results showed that desaturases from A. corymbifera are intracellular enzymes that reached the highest activity in Serrano-Careon medium with C sources of a mixture of sucrose and paraffin (0.14 U/mL) and C sources of molasses (0.11 U/mL) incubated for 76 and 120 hours respectively. Activity of Δ^6 and Δ^{12} desaturases have been detected in culture filtrate of A. corymbifera. Activity of Δ^{12} desaturase was confirmed by increasing of linoleic acid in CPO incubated with culture filtrate and biomass extract, while activity of Δ^6 was detected by its conversion as much as 66.48 % linoleic acid into gamma linolenic acid (GLA) that having high economic value. Precipitation of culture filtrate and lipid extraction of biomass were unable to stabilize desaturases. Desaturase degradation rate could be inhibited by isolation and washing of microsome fraction using high salt buffer. This method could stabilize desaturases 70-80% from initial activity at storage temperature 25°C and 50°C for 6 hours.

[Keywords: *Absidia corymbifera*, desaturases, enzyme stabilization, CPO bioconversion, unsaturated fatty acids]

Ringkasan

Desaturase merupakan enzim yang berperan dalam proses desaturasi rantai karbon asam lemak menjadi asam lemak tak jenuh yang banyak manfaatnya bagi kesehatan. Desaturase dapat dihasilkan dari *Absidia corymbifera* dan diamplifikasikan untuk peningkatan ketidakjenuhan dan kualitas minyak sawit mentah (CPO). Enzim desaturase dikenal sangat tidak stabil. Penelitian bertujuan menetapkan sumber karbon dan waktu kultur yang memberikan aktivitas desaturase tertinggi, komposisi asam lemak hasil konversi desaturase dan cara menstabilkan desaturase dari *A. corymbifera*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa desaturase dari *A. corymbifera* merupakan enzim intraselular yang mencapai aktivitas tertinggi pada medium Serrano-Careon dengan sumber karbon campuran sukrosa dan parafin (0,14 U/mL) dan sumber karbon molases (0,11 U/mL) masing-masing pada inkubasi selama 76 dan 120 jam. Aktivitas Δ^6 dan Δ^{12} desaturase terdeteksi pada cairan fermentasi *A. corymbifera*. Aktivitas Δ^{12} desaturase terdeteksi dari peningkatan persentase asam linoleat pada CPO yang telah diinkubasi dengan cairan fermentasi atau ekstrak biomassa, sedangkan aktivitas Δ^6 desaturase terdeteksi dari dikonversinya sebesar 66,48% asam linoleat menjadi asam gamma linolenat

(GLA) yang memiliki potensi nilai ekonomis lebih tinggi. Pengendapan filtrat kultur fermentasi dan ekstraksi lipida biomassa tidak mampu menstabilkan desaturase. Laju degradasi desaturase dapat dihambat dengan cara isolasi dan pencucian fraksi mikrosom dengan bufer garam. Cara tersebut dapat mempertahankan aktivitas desaturase 70–80% pada penyimpanan suhu 25°C dan 50°C selama enam jam.

Pendahuluan

Minyak sawit kasar atau *crude palm oil* (CPO) umumnya berbentuk padat pada suhu ruang karena tingginya kandungan asam lemak jenuh yaitu asam palmitat (45–52%) dan asam stearat (4–5%). CPO yang berbentuk padat memerlukan pemanasan untuk mencairkan agar dapat lebih mudah dipompa dari tangki satu ke tangki lainnya. Muderhwa *et al.* (1985) melaporkan bahwa asam palmitat pada posisi luar dari struktur trigliserida menyebabkan rendahnya jumlah fraksi yang dapat digunakan sebagai minyak makan atau minyak goreng. Di sisi lain kandungan asam lemak tak jenuh dalam minyak makan, khususnya asam lemak tak jenuh majemuk, berpengaruh pada parameter mutu seperti besarnya bilangan iod, titik lunak dan titik keruh (*cloud point*). Asam-asam lemak tak jenuh tunggal maupun majemuk juga merupakan nutrisi penting bagi manusia serta merupakan bahan baku industri kimia (Cahoon *et al.*, 1997)

Pesaing kuat dalam pemasaran CPO di Amerika Serikat (AS) yaitu minyak kedelai. Kampanye AS dalam persaingan tersebut memunculkan isu tentang asam lemak jenuh sebagai penyebab naiknya kolesterol *low density lipoprotein* (LDL) darah yang dapat berakibat pada penyakit jantung koroner (Bakrie, 1998). Hal tersebut ditunjang oleh berbagai penelitian tentang bahaya asam lemak jenuh rantai panjang yang mengakibatkan arterogenesis (Djojosoebagio,

1997). Meskipun pendapat tentang hal tersebut masih diperdebatkan, isu tersebut diyakini berdampak negatif terhadap daya saing ekspor CPO. Kendala mutu CPO tersebut diharapkan dapat diatasi dengan meningkatkan asam lemak tak jenuh dalam struktur gliseridanya.

Asam lemak tak jenuh memiliki peranan penting bagi kesehatan. *Palm olein* yang didominasi asam lemak tak jenuh terbukti menurunkan kadar kolesterol LDL darah. Asam linoleat atau LA (*linoleic acid*), asam α -linolenat atau ALA (α *linolenic acid*) dan asam gamma linolenat atau GLA (γ *linolenic acid*) merupakan asam-asam lemak tak jenuh majemuk esensial. GLA dapat terbentuk melalui biokonversi LA oleh enzim Δ^6 desaturase yang dihasilkan oleh fungi. Asam-asam lemak tak jenuh majemuk ini memiliki arti penting bagi dunia medis dan farmasi, antara lain untuk menurunkan kolesterol LDL bagi penderita hiperkolesterolemia (Ishikawa *et al.*, 1989), mengobati sindroma prahaid (Horrobin, 1983), eksema atopik (Biagi *et al.*, 1988), anti trombotik (Suzuki, 1991) serta kelancaran metabolisme tubuh (James & Carter, 1988). Di Jepang, GLA dipasarkan sebagai bahan baku kosmetika untuk menjaga kelembaban kulit (Suzuki, 1991). Pemanfaatan desaturase melalui pengembangan proses biokonversi akan membuka peluang peningkatan mutu dan diversifikasi produk CPO yang bernilai tambah ekonomis tinggi.

Pada penelitian sebelumnya (Tri-Panji, 1997), desaturase dalam kultur filtrat fermentasi *A. corymbifera* terbukti mampu meningkatkan bilangan iod CPO. Peningkatan bilangan iod berasal dari terdesaturasinya asam-asam lemak jenuh menjadi asam lemak tak jenuh atau asam lemak tak jenuh tunggal menjadi asam lemak tak jenuh majemuk.

Produksi dan stabilisasi desaturase dari Absidia corymbifera

Desaturase merupakan enzim yang tidak stabil (Gunstone *et al.*, 1986). Suzuki (1991) melaporkan bahwa kestabilan desaturase pada *Mucor ramanniana* var. *Angulispora* menurun dengan cepat sampai tingkat yang tak terdeteksi setelah jam ke-4. Untuk memproduksi desaturase dengan aktivitas dan stabilitas yang tinggi perlu dipelajari optimasi komposisi medium dan teknik stabilisasi enzim tersebut. Penelitian ini bertujuan menetapkan sumber karbon dan waktu pemanenan kultur yang memberikan aktivitas desaturase tertinggi, jenis produk terkonversi oleh desaturase dan cara menstabilkan desaturase dari *A. corymbifera*

Bahan dan Metode

Kultur fungi dan persiapan inokulum

Absidia corymbifera untuk produksi desaturase berasal dari koleksi kultur Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor dan dipelihara dalam medium *potato dextrosa* agar (PDA) miring. Inokulum ditumbuhkan dalam labu Erlenmeyer 500 mL berisi medium potato dextrose broth (PDB) yang diinokulasikan dengan dua loop spora dan miselium *A. corymbifera* dari kultur PDA miring umur 72 jam. Kultur diinkubasi pada suhu ruang (25–30°C) dengan inkubator bergoyang pada 100 rpm selama tiga hari.

Fermentasi A. corymbifera

Medium fermentasi yang digunakan adalah medium sintetik Serrano-Careon *et al.* (1993) dengan modifikasi sumber karbon dari sukrosa, campuran sukrosa dan parafin serta molases dengan nisbah C/N 19 (Tri-Panji, 1997). Fermentasi dilakukan dengan kultur permukaan metode Tri-Panji

(1997). Medium fermentasi (500 mL) diletakkan pada bak plastik (27 x 36 cm²) yang telah disterilisasi permukaan dengan larutan NaClO 5,25% selama 20 menit, kemudian dibilas tiga kali dengan aquades steril. Medium diinokulasi dengan 10% kultur *A. corymbifera* dalam PDB umur 72 jam. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang (28 – 30°C) dalam lemari fermentasi dengan aerasi udara steril. Pertumbuhan *A. corymbifera* dalam medium Serrano-Careon dihitung berdasarkan berat kering biomassa pada inkubasi selama 24, 48, 72, 96 dan 120 jam. Laju pertumbuhan spesifik (μ) dihitung menurut Sa'id (1986).

Isolasi desaturase

Isolasi ekstrak enzim desaturase kasar dilakukan dengan pemecahan sel fungi menggunakan blender dan penambahan salin bufer fosfat (PBS) dengan perbandingan biomassa : PBS : 1 : 2. Homogenat disentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang berisi ekstrak kasar desaturase digunakan untuk pengujian lebih lanjut.

Identifikasi hasil biokonversi desaturase

Untuk mengetahui produk hasil biokonversi desaturase, CPO diinkubasikan dengan cairan fermentasi dan ekstrak biomassa dari kultur *A. corymbifera* yang ditumbuhkan dalam medium Serrano-Careon umur 120 jam dengan perbandingan berat 1 : 2 (enzim : CPO). Biokonversi dibiarkan berlangsung pada suhu kamar (25°C) selama 30 menit. Fraksi minyak dipisahkan dan ditetapkan komposisi asam lemaknya dengan kromatografi gas. Hal yang sama juga dilakukan dengan mengganti substrat CPO dengan asam linoleat untuk membuktikan kemampuan desaturase tersebut menghasilkan GLA dari asam linoleat murni.

Stabilisasi desaturase dari cairan fermentasi melalui presipitasi

Presipitasi protein dilakukan menurut metode Deutscher (1993) yaitu dengan menambahkan aseton dingin (5°C) ke dalam sejumlah cairan fermentasi dengan perbandingan 2:1 (v/v). Presipitat didiamkan selama 15 menit kemudian disentrifugasi pada 5.000 rpm selama 15 menit. Endapan protein dilarutkan ke dalam PBS untuk pengujian aktivitas desaturase.

Stabilisasi desaturase dari biomassa melalui ekstraksi lipid

Biomassa *A. corymbifera* dikeringkan dengan penekanan sampai tidak keluar airnya dan dilanjutkan dengan pengeringan melalui oven pada suhu 50°C sampai berat konstan. Lipid dari biomassa kering diekstrak dengan heksana kemudian desaturase diisolasi dan disimpan pada berbagai perlakuan suhu penyimpanan, yaitu 4°C (lemari es), 25°C (suhu kamar) dan 50°C (oven). Pengamatan aktivitas desaturase dilakukan pada supernatan yang merupakan enzim kasar yang diperoleh pada jam ke-0, 6, 12, 18 dan 24. Pengamatan dihentikan apabila aktivitas desaturase tidak terdeteksi lagi. Blanko yang digunakan berupa biomassa kering tanpa perlakuan.

Stabilisasi desaturase dari fraksi mikrosom melalui isolasi dan pencucian

Isolasi dan pencucian berulang fraksi mikrosom dilakukan dengan bufer garam menggunakan metode Ozols (1997). Biomassa basah (300 g) ditambah dengan 1,8 l bufer Tris-asetat 10 mM pH 8,1 yang mengandung EDTA 1 mM dan sukrosa 0,25 M dihancurkan dengan blender selama

15 menit. Homogenat kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 x g selama 35 menit. Pelet dipisahkan kemudian supernatan disentrifugasi dengan kecepatan 130.000 x g selama 1,5 jam. Pelet yang diperoleh dilarutkan dengan 20 kali volume sodium pirofosfat 0,1 M pH 7,4 dan kecepatan 130.000 x g disentrifugasi kembali selama 1 jam. Pelet yang diperoleh dipisahkan dan dilarutkan dengan 20 kali volume bufer Tris-asetat 0,1 M pH 8,1 yang mengandung NaCl 0,5 M dan EDTA 10 mM. Homogenat disentrifugasi dengan kecepatan 130.000 x g dan fraksi mikrosom yang telah tercuci dengan bufer berkadar garam tinggi (*high salt washed microsomes*) digunakan untuk penelitian lebih lanjut. Endapan mikrosom yang telah dicuci dengan bufer garam dilarutkan dalam 20 mL PBS kemudian disimpan pada berbagai perlakuan suhu penyimpanan. Pengamatan aktivitas desaturase dilakukan pada jam ke- 0, 3, 6, 12, dan 18 penyimpanan.

Analisis aktivitas desaturase

Pengukuran aktivitas desaturase dilakukan berdasarkan metode Tri-Panji (1997) dengan modifikasi perbandingan banyaknya substrat dan enzim. Aktivitas desaturase (U/mL) didefinisikan sebagai besarnya peningkatan ketidakjenuhan CPO yang diakibatkan reaksi enzimatis oleh 1 mL enzim selama satu menit (g I₂/ 100 g CPO per mL enzim per menit). Sebanyak 1 mL fraksi enzim atau ekstrak protein ditambahkan pada 2 g CPO dalam tabung reaksi. Campuran enzim dan CPO tersebut diinkubasikan pada suhu 25°C selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan uji bilangan iod pada sampel yang telah mengalami reaksi enzimatis dengan metode AOAC (1995). Blanko yang digunakan adalah CPO yang tidak dicampur dengan enzim atau ekstrak protein.

Produksi dan stabilisasi desaturase dari *Absidia corymbifera*

Analisis kromatografi gas

Sampel CPO dalam bentuk metil ester asam lemak (0,5 μL) diinjeksikan pada alat kromatografi gas (Perkin Elmer) dengan dimensi kolom kapiler FFAP (25 m x 0,25 mm i.d) yang dijalankan dengan pengaturan kondisi suhu injektor 225°C dan suhu kolom isotherm 200°C. Detektor *Flame Ionization Detector* (FID) dioperasikan pada suhu 300°C. Gas pembawa yang digunakan adalah gas nitrogen (N_2) dengan kecepatan alir melewati kolom 1 mL/menit.

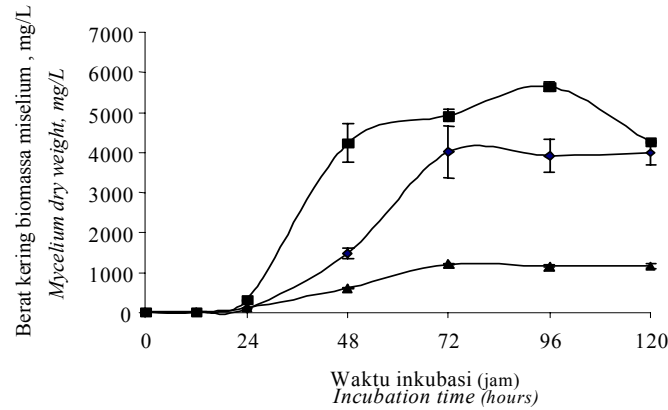
Hasil dan Pembahasan

Pertumbuhan A. corymbifera dan aktivitas desaturase

Absidia corymbifera yang ditumbuhkan dalam medium Serrano-Careon dengan sumber karbon sukrosa, campuran sukrosa dan parafin serta molases selama 0–120 jam menunjukkan kurva pertumbuhan biomassa yang khas (Gambar 1). Pertumbuhan *A. corymbifera* berada pada fase awal (*lag phase*) pada inkubasi selama 0–12 jam yang ditunjukkan oleh pertumbuhan yang lambat. Kultur mikroorganisme pada lingkungan yang baru melakukan pengenalan terhadap komponen makromolekul dan mikromolekul termasuk kegiatan untuk mendapatkan pengetahuan akan sintesis atau represi enzim-enzim tertentu (Said, 1986). Fase logaritmik atau eksponensial berlangsung pada inkubasi selama 12–72 jam untuk *A. corymbifera* yang ditumbuhkan pada medium dengan sumber karbon dari molases dan sukrosa sedangkan medium dengan sumber karbon campuran sukrosa dan parafin memiliki fase logaritmik pada inkubasi selama 12–48 jam. Fase logaritmik dicirikan dengan suatu garis lurus pada plot

antara ln berat kering terhadap waktu. Periode eksponensial merupakan periode pertumbuhan mikroorganisme yang stabil dengan laju pertumbuhan spesifik, (μ) konstan. Laju pertumbuhan spesifik maksimal (μ_{maks}) *A. corymbifera* pada medium Serrano - Careon dengan sumber karbon sukrosa, campuran sukrosa dan parafin dan molases masing-masing adalah 0,11; 0,11 dan 0,07. Inkubasi *A. corymbifera* pada periode selanjutnya yaitu selama 48–120 jam kultur memasuki fase stasioner.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas desaturase asal cairan fermentasi terdeteksi sebesar 0,06 U/mL pada kultur dalam sumber karbon molases yang diinkubasikan selama 120 jam (Tabel 1). Waktu tersebut bertepatan dengan pertumbuhan fase stasioner (Gambar 1). Terdeteksinya aktivitas desaturase yang berasal dari cairan fermentasi pada fase stasioner memperkuat dugaan bahwa desaturase merupakan enzim intraseluler. Hal tersebut disebabkan pada fase stasioner, sel sebagian mengalami lisis dan mengeluarkan berbagai protein intraselulernya. Aktivitas desaturase tertinggi pada biomassa *A. corymbifera* sebesar 0,14 U/mL diperoleh dalam biomassa yang ditumbuhkan pada sumber karbon berupa campuran sukrosa dan parafin yang dipanen pada inkubasi selama 96 jam (Tabel 1). Suzuki (1991) melaporkan bahwa penambahan parafin mampu meningkatkan aktivitas Δ^6 desaturase. Hal tersebut menunjukkan parafin berpengaruh dalam peningkatan aktivitas desaturase intraseluler *A. corymbifera*. Aktivitas desaturase dari biomassa yang ditumbuhkan pada sumber karbon molases adalah sebesar 0,11 U/mL dan pada sumber sukrosa adalah 0,07 U/mL. Walaupun laju pertumbuhan *A. corymbifera* dalam medium dengan sumber karbon molases rendah, aktivitas desaturase yang



Gambar 1. Kurva pertumbuhan *A. corymbifera* dalam medium Serrano-Careon dengan sumber karbon sukrosa (-◆-), campuran sukrosa dan parafin (-■-) dan molasses (-▲-).

Figure 1. Growth curve of *A. corymbifera* in Serrano-Careon medium with carbon sources from sucrose (-◆-), a mixture of sucrose and paraffin (-■-) and molasses (-▲-).

Tabel 1. Aktivitas desaturase dalam cairan fermentasi dan ekstrak biomassa *A. corymbifera* yang ditumbuhkan pada medium Serrano-Careon dengan beberapa sumber karbon.

Table 1. Desaturase activity from culture filtrate and biomass extract of *A. corymbifera* growth on Serrano-Careon with several carbon sources.

Sumber karbon <i>Carbon sources</i>	Waktu pemanenan (jam) <i>Harvesting time (hours)</i>	Aktivitas desaturase (U/mL) dalam <i>Desaturase activity (U/mL) in</i>	
		Cairan fermentasi <i>Fermentation liquid</i>	Ekstrak biomassa <i>Biomass extract</i>
Sukrosa <i>Sucrose</i>	72	-0,02 ± 0,03	-0,07 ± 0,03
	96	0,00 ± 0,01	-0,05 ± 0,04
	120	-0,01 ± 0,01	0,07 ± 0,03
Sukrosa + Parafin <i>Sucrose + Paraffin</i>	72	-0,13 ± 0,04	-0,07 ± 0,03
	96	-0,03 ± 0,02	0,14 ± 0,03
	120	-0,02 ± 0,02	0,05 ± 0,01
Molasses <i>Molases</i>	72	-0,07 ± 0,03	0,03 ± 0,01
	96	-0,03 ± 0,03	0,05 ± 0,02
	120	0,06 ± 0,01	0,11 ± 0,01

dihasilkan relatif cukup tinggi. Peningkatan aktivitas desaturase yang dihasilkan oleh *A. corymbifera* dalam medium dengan sumber molases sejalan dengan waktu inkubasi.

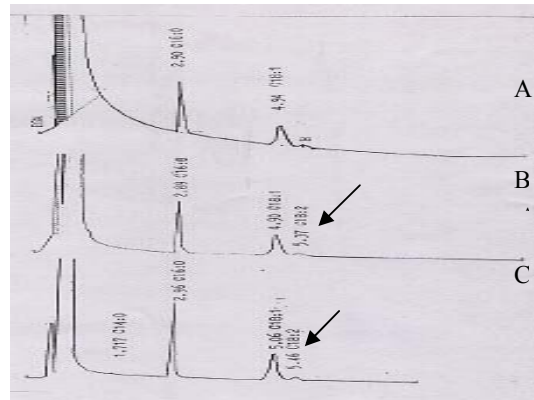
Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan (data tidak ditampilkan) baik pada biomassa maupun cairan fermentasi, aktivitas desaturase *A. corymbifera* yang ditumbuhkan pada media molases dan dipanen pada jam ke-120 memiliki aktivitas tertinggi. Desaturase dari *A. corymbifera* baik yang berasal dari cairan fermentasi maupun biomassa yang memiliki aktivitas tertinggi selanjutnya digunakan untuk percobaan stabilisasi enzim tersebut.

Sejumlah data aktivitas desaturase pada Tabel 1 terlihat nilainya negatif. Hal tersebut diduga karena adanya aktivitas oksidase. Oksidase merupakan enzim yang mengkatalis pemutusan ikatan rangkap pada rantai karbon asam lemak yang kerjanya berlawanan dengan desaturase. Enzim

oksidase terdapat pada mitokondria (Murray *et al.*, 1997). Pada saat aktivitas oksidase lebih besar dari aktivitas desaturase, jumlah ikatan rangkap CPO yang terbentuk lebih sedikit dibandingkan dengan yang terpecah sehingga aktivitas desaturase negatif.

Identifikasi produk biokonversi desaturase *A. corymbifera*

Ketidakhajenan asam lemak yang terkandung dalam organisme disebabkan oleh biosintesis asam lemak yang dikatalisis oleh beberapa jenis desaturase yang berbeda (Macherel *et al.*, 1995). Masing-masing enzim menyebabkan ikatan rangkap pada posisi tertentu dalam rantai karbon asam lemak (Murphy, 1999). Hasil analisis gas kromatografi (Gambar 2) dapat dideteksi aktivitas Δ^6 dan Δ^{12} desaturase pada cairan fermentasi *A. corymbifera*. Aktivitas Δ^{12} desaturase terdeteksi dari peningkatan per-



Gambar 2. Perbandingan kromatogram gas hasil biokonversi CPO dengan desaturase *A. corymbifera* CPO (A), CPO + cairan Fermentasi (B) dan CPO + ekstrak biomassa (C).Tanda panah menunjukkan terjadinya peningkatan fraksi asam linoleat pada CPO.

Figure 2. Comparison of gas chromatogram of bioconversion product of CPO by *A. corymbifera* desaturase. CPO (A), CPO + fermentation broth (B), CPO + biomass extract (C). Arrows indicate the increasing of linoleic acid fraction in CPO.

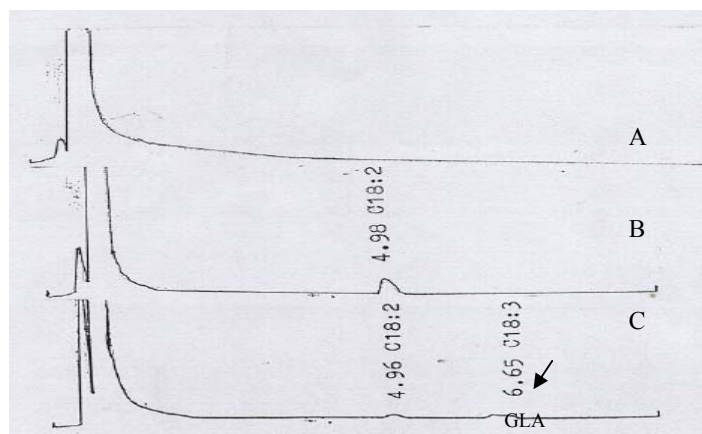
Produksi dan stabilisasi desaturase dari *Absidia corymbifera*

sentase asam linoleat pada CPO yang telah diinkubasi dengan cairan fermentasi. Hal yang sama juga terjadi pada CPO yang diinkubasikan dengan ekstrak biomassa. dan ekstrak biomassa dapat meningkatkan kadar asam linoleat dari 3,37% berturut-turut menjadi 4,19% dan 5,2%. Aktivitas Δ^6 terdeteksi dari dikonversinya sebagian asam linoleat menjadi GLA pada asam linoleat yang diinkubasikan dengan cairan fermentasi (Gambar 3). Hasil analisis menunjukkan bahwa jumlah asam linoleat yang dikonversi menjadi GLA sebesar 66,48 %.

Stabilisasi desaturase dari cairan fermentasi melalui presipitasi

Aktivitas desaturase dari cairan fermentasi terpresipitasi yang disimpan pada berbagai perlakuan suhu penyimpanan mengalami penurunan pada jam pengamatan ke-6 (Tabel 2). Penurunan ini terjadi sampai

tingkat yang tidak terdeteksi untuk penyimpanan pada suhu 4°C dan suhu 50°C. Desaturase yang disimpan pada suhu 25°C masih terdeteksi pada jam ke-6 tetapi aktivitasnya tidak terdeteksi pada enam jam berikutnya. Kestabilan desaturase dari cairan fermentasi tanpa perlakuan memiliki persamaan dengan desaturase cairan fermentasi terpresipitasi. Aktivitas desaturase mengalami penurunan pada jam pengamatan ke-6 pada berbagai suhu penyimpanan. Penurunan aktivitas desaturase terjadi sampai tingkat yang tidak terdeteksi terjadi pada cairan fermentasi yang disimpan pada suhu penyimpanan 4°C dan 25°C sedangkan cairan fermentasi yang disimpan pada suhu 50°C tak terdeteksi pada jam ke-12 (Tabel 3). Berdasarkan hasil yang diperoleh, perlakuan presipitasi pada cairan fermentasi tidak mampu menstabilkan desaturase. Ketidakstabilan desaturase pada cairan fermentasi terpresipitasi menunjukkan bahwa kerja



Gambar 3. Kromatogram gas hasil biokonversi asam linoleat oleh aktivitas desaturase *A. corymbifera* Cairan fermentasi (A), asam linoleat (B) dan asam linoleat yang diinkubasikan dalam cairan fermentasi (C). Tanda panah menunjukkan adanya pembentukan GLA (*gamma linolenic acid*).

Figure 3. Gas chromatogram of bioconversion product of linoleic acid by *A. corymbifera* desaturase. Fermentation broth (A), linoleic acid (B) and linoleic acid incubated with fermentation liquid of *A. corymbifera*. Arrow indicates the presence of GLA resulted from linoleic acid.

Tabel 2. Aktivitas desaturase *A. corymbifera* dari cairan fermentasi yang terpresipitasi.Table 2. *Absidia corymbifera* desaturase activity from precipitated fermentation broth

Waktu penyimpanan (jam) <i>Storage duration (hours)</i>	Aktivitas desaturase (U/mL) pada suhu penyimpanan <i>Desaturase activity (U/mL) stored at temperature</i>		
	4°C	25°C	50°C
0	3,05 ± 0,03	3,05 ± 0,03	3,05 ± 0,03
6	-0,06 ± 0,04	0,25 ± 0,08	-0,09 ± 0,11
12	-	-0,14 ± 0,08	-

Keterangan/Note : - tidak terdeteksi (*undetected*)Tabel 3. Aktivitas desaturase *A. corymbifera* dari cairan fermentasi tanpa presipitasi.Table 3. *Absidia corymbifera* desaturase activity from fermentation broth with no precipitation.

Waktu penyimpanan (jam) <i>Storage duration (hours)</i>	Aktivitas desaturase (U/mL) pada suhu penyimpanan <i>Desaturase activity (U/mL) at storage temperature</i>		
	4°C	25°C	50°C
0	3,00 ± 0,41	3,00 ± 0,41	3,00 ± 0,41
6	-0,05 ± 0,03	-0,07 ± 0,02	0,20 ± 0,11
12	-	-	-0,15 ± 0,18

Keterangan/Note : - tidak terdeteksi (*undetected*)Tabel 4. Aktivitas desaturase dari biomassa *A. corymbifera* yang terekstrak lipidnya.Table 4. *Absidia corymbifera* desaturase activity from biomass extracted its lipid.

Waktu penyimpanan (jam) <i>Storage duration (hours)</i>	Aktivitas desaturase (U/mL) pada suhu penyimpanan <i>Desaturase activity (U/mL) at storage temperature</i>		
	4°C	25°C	50°C
0	5,03 ± 0,17	5,03 ± 0,17	5,03 ± 0,17
6	0,00 ± 0,03	0,12 ± 0,05	-0,10 ± 0,02
12	-	-0,10 ± 0,04	-

Keterangan/Note : - tidak terdeteksi (*undetected*)Tabel 5. Aktivitas desaturase dari biomassa *A. corymbifera* kering.Table 5. *Absidia corymbifera* desaturase activity from dried biomass.

Waktu penyimpanan (jam) <i>Storage duration (hours)</i>	Aktivitas desaturase (U/mL) pada suhu penyimpanan <i>Desaturase activity (U/mL) stored at temperature</i>		
	4°C	25°C	50°C
0	5,24 ± 0,25	5,24 ± 0,25	5,24 ± 0,25
6	-0,28 ± 0,30	-0,01 ± 0,04	-0,07 ± 0,09

Produksi dan stabilisasi desaturase dari Absidia corymbifera

protease untuk mendegradasi desaturase masih terjadi. Hal tersebut kemungkinan karena agregat desaturase yang resisten terhadap kerja protease tidak terbentuk.

Stabilisasi desaturase dari biomassa melalui ekstraksi lipid

Lipid merupakan salah satu komponen esensial yang mampu meningkatkan aktivitas degradasi desaturase. Menurut Ozols (1997) penambahan lipid pada mikrosom yang telah distabilkan melalui pencucian dengan bufer garam menyebabkan degradasi desaturase. Ekstraksi senyawa ini pada biomassa kering *A. corymbifera* diharapkan mampu meningkatkan kestabilan desaturase. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas desaturase dari biomassa kering yang terekstrak lipidnya mengalami penurunan pada jam pengamatan ke-6 pada berbagai suhu penyimpanan. Penurunan ini terjadi sampai tingkat tak terdeteksi pada suhu penyimpanan 4°C dan 50°C sedangkan desaturase dari biomassa yang disimpan pada suhu 25°C tidak terdeteksi pada jam pengamatan ke-12 (Tabel 4). Ketidakstabilan desaturase juga teramati pada biomassa kering tanpa perlakuan. Pada jam pengamatan ke-6, semua aktivitas desaturase diberbagai suhu penyimpanan tidak terdeteksi (Tabel 5).

Ketidakstabilan desaturase dari biomassa kering *A. corymbifera* yang terekstrak lipidnya menunjukkan bahwa ekstraksi lipid tidak mampu menstabilkan desaturase selama penyimpanan. Hal ini diduga karena masih adanya sejumlah lipid dan komponen esensial lain yang mampu meningkatkan aktivitas katalitik sehingga desaturase tetap mengalami degradasi.

Stabilisasi desaturase dari fraksi mikrosom

Menurut Ozols (1990) waktu paruh

stearoil CoA desaturase berkisar antara 3-4 jam. Inkubasi desaturase bersama dengan substratnya pada pH dan suhu fisiologis menyebabkan hilangnya aktivitas enzim tersebut.

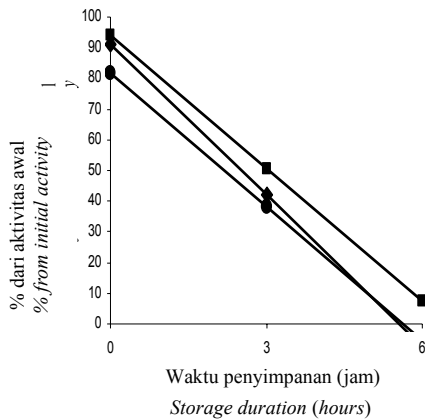
Menurut (Ozol, 1997) pencucian fraksi mikrosom, fraksi organel sel yang banyak mengandung desaturase dengan larutan bufer yang mengandung garam (KCl) mampu meningkatkan stabilitas enzim. Metode presipitasi memungkinkan untuk mengendapkan protein-protein yang terdapat dalam cairan fermentasi termasuk desaturase yang merupakan protein dalam mikrosom. Dengan metode ini diharapkan desaturase akan terpisah dari lipid yang ada pada cairan fermentasi dan desaturase dapat membentuk agregat yang resisten terhadap kerja protease. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada berbagai suhu penyimpanan, desaturase dari mikrosom yang dicuci dengan bufer garam memiliki stabilitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan desaturase dari ekstrak kasar biomassa *A. corymbifera*. Kemiringan garis regresi aktivitas desaturase dari mikrosom yang tercuci dengan bufer garam lebih besar dibandingkan dengan kemiringan garis regresi aktivitas desaturase dari ekstrak kasar biomassa (Gambar 4 dan 5). Aktivitas desaturase dari ekstrak kasar biomassa *A. corymbifera* berkisar antara 0-10 % dari nilai semula pada jam pengamatan ke-6 (Gambar 4). Aktivitas tersebut jauh lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas desaturase dari mikrosom yang telah dicuci dengan bufer garam pada jam yang sama yaitu sekitar 70-80 %.

Lambatnya laju degradasi desaturase dari mikrosom yang telah dicuci dengan bufer garam diduga disebabkan oleh resistensi formasi agregat desaturase dalam mikrosom karena pengaruh NaCl dan eliminasi beberapa protein non mikrosomal termasuk protease yang mendegradasi desaturase oleh natrium pirofosfat. Ozols

(1997) melaporkan bahwa degradasi desaturase pada retikulum endoplasma diakibatkan oleh mekanisme proteolitik yang secara spesifik mendegradasi desaturase bersama protein lainnya yang berukuran pendek. Stabilitas desaturase pada fraksi mikrosom yang telah dicuci dengan larutan bufer garam mengalami penurunan setelah ditambah dengan membran fraksi sel lainnya yang mengandung lipid dan komponen esensial yang diperlukan untuk aktivitas katalitiknya. Penambahan konsentrasi fraksi sitosol pada fraksi mikrosom ini tidak menurunkan stabilitas desaturase. Hal ini menunjukkan bahwa protease yang mendegradasi desaturase tidak terdapat pada fraksi ini.

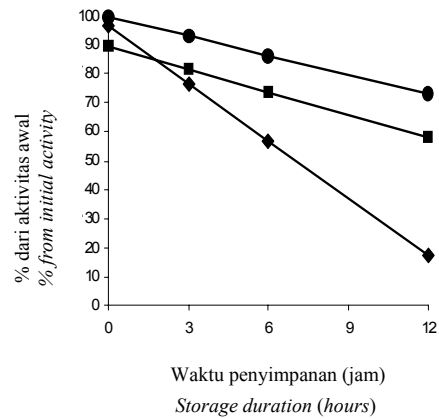
Beberapa inhibitor protease seperti pepstatin dan leupeptin lisosomotropik tidak efektif dalam melakukan inhibisi degradasi desaturase. Inhibitor kalpain, N-asetil-leusil-

leusil-metional atau inhibitor proteosom, metabolit *Streptomyces* juga tidak menghambat laju degradasi desaturase. Tidak efektifnya berbagai inhibitor protease tersebut menunjukkan bahwa degradasi desaturase tidak tergantung pada sistem lisosomal dan proteosom. Menurut Ozols (1977) terdegradasinya desaturase secara sempurna setelah penambahan komponen esensial untuk aktivitas katalitiknya menunjukkan bahwa degradasi desaturase bergantung pada orientasi spesifik desaturase dan interaksi intra membran antara desaturase dan protease pendegradasinya. Heinemann & Ozols (1998) melaporkan bahwa protease pendegradasi desaturase terletak pada retikulum endoplasma kasar. Klausner & Sitia (1990) telah mengidentifikasi bahwa retikulum endoplasma merupakan tempat yang penting dalam pemecahan protein intraselular. Heinemann



Gambar 4. Stabilitas desaturase dari ekstrak kasar *A. corymbifera* pada berbagai suhu penyimpanan pada 4 °C (-♦-), 25°C (-■-), dan 50°C (-●-).

Figure 4. Desaturase stability from crude extract of *A. corymbifera* biomass and stored at 4°C (-♦-), 25°C (-■-), and 50°C(-●-).



Gambar 5. Stabilitas desaturase dari mikrosom *A. corymbifera* yang telah dicuci dengan bufer garam pada suhu penyimpanan 4°C (-♦-), 25°C (-■-), dan 50°C (-●-).

Figure 5. Desaturase stability from high salt washed microsomes of *A. corymbifera* and stored at 4°C (-♦-), 25°C (-■-), and 50°C (-●-).

Produksi dan stabilisasi desaturase dari Absidia corymbifera

& Ozols (1998) menemukan bahwa desaturase didegradasi secara selektif oleh protease dan reaksinya berlangsung pada mikrosom yang terikat pada retikulum endoplasma.

Pengaruh suhu penyimpanan terhadap stabilitas desaturase dari homogenat atau ekstrak enzim *A. corymbifera* tidak nampak. Hal tersebut disebabkan oleh dominannya faktor lain yang dapat mendegradasi desaturase seperti komponen esensial berupa lipid dan protein pendukung aktivitas desaturase. Suhu penyimpanan berpengaruh terhadap stabilitas desaturase dari mikrosom yang telah dicuci dengan bufer garam. Stabilitas desaturase dari mikrosom yang telah dicuci dengan bufer garam yang disimpan pada suhu 25°C dan 50°C lebih tinggi dibandingkan dengan enzim yang disimpan pada suhu 4°C. Hal ini dapat dilihat dari rendahnya nilai kemiringan garis linier stabilitas desaturase dari fraksi mikrosom yang disimpan pada suhu 4°C dibandingkan dengan yang disimpan pada suhu 25°C dan 50°C.

Menurut Suzuki (1991), suhu yang rendah merupakan faktor yang dapat meningkatkan aktivitas degradasi desaturase. Peningkatan aktivitas katalitik desaturase dapat mengakibatkan berubahnya formasi agregat desaturase di mikrosom sehingga resistensinya terhadap protease hilang (Heinemann & Ozols, 1998). Hal ini menyebabkan desaturase yang disimpan pada suhu 4°C memiliki stabilitas lebih rendah dibandingkan dengan stabilitas desaturase yang disimpan pada suhu 25°C dan 50°C.

Kesimpulan

1. Desaturase *A. corymbifera* merupakan enzim intraseluler dengan aktivitas tertinggi sebesar 0,14 U/mL diperoleh

dalam biomassa yang ditumbuhkan pada medium Serrano-Careon dengan sumber karbon dari campuran sukrosa dan parafin yang dipanen pada jam ke-96 masa inkubasi. Aktivitas desaturase tertinggi kedua yaitu sebesar 0,11 U/mL diperoleh pada medium yang sama dengan sumber karbon molases. Aktivitas Δ^6 dan Δ^9 desaturase dapat teridentifikasi pada filtrat kultur dan ekstrak biomassa *A. corymbifera*.

2. Presipitasi filtrat kultur dan ekstraksi lipida biomassa tidak mampu menstabilkan desaturase *A. corymbifera*. Isolasi dan pencucian dengan bufer garam konsentrasi tinggi menghasilkan fraksi mikrosom yang mampu menstabilkan desaturase sekitar 70–80% selama 6 jam pada penyimpanan suhu 25°C dan oven 50°C. Agar penyimpanan desaturase dapat berlangsung lebih lama, perlu dicari inhibitor protease yang secara spesifik mendegradasi desaturase.

Daftar Pustaka

- AOAC (1995). *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists* Vol II A. Washington, AOAC Int. Ch 4. p. 17-19.
- Bakrie, A. (1998). Trilyunan rupiah per tahun nilai komponen aktif alami dalam minyak sawit terbuang percuma. *Makalah Seminar Nasional Minyak Sawit*, Jakarta 24 Februari 1998, 7p.
- Biagi, P. L., A. Bordoni, M. Masi, G. Ricci, C. Fanelli, A. Patrizi & F. Ceccolini (1988). Evening primrose oil (efanol) in the treatment of children with atopic eczema. *Drug Exptl. Clin. Res.*, **14**, 291-297.

- Cahoon, E.B., S. Shah, J. Shanklin, J. Browse (1997). A determinant of substrate specificity predicted from the acyl-acyl carrier protein desaturase of developing Cat's Claw seed. *Pl. Physiol.*, **117**, 593-598.
- Deutscher, M. P. (1993). *Guide to protein purification*. London, Academic Press Inc.
- Djojosoebagio, S. (1997). The effect of palm oil on the level of serum lipoprotein in rabbit. *Makalah Poster Sarasehan Sehari Penelitian Kelapa Sawit 7 PAU Biosains*. Yogyakarta, 28 November 1996
- Gunstone, F. D., J. L. Harwood & F. B. Padley (1986). *The Lipid Handbook*. London, Chapman and Hall.
- Heinemann, F. S. & Ozols J. (1998). Degradation of stearyl-coenzyme a desaturase: endoproteolytic cleavage by an integral membrane protease. *Mol. Biol. Cell*, **9**(12), 3445-3453.
- Horrobin, D. F. (1983). The role of essential fatty acid and prostaglandins in the premenstrual syndrome. *J. Reprod. Med.*, **28**, 465-468.
- Ishikawa, T., Y. Fujiyama, C. Igarashi, M. Morino, N. Fada, A. Kagami, T. Sakamoto, N. Nagano & H. Nakamura (1989). Clinical features of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, **75**, 95.
- James, P & M. D. Carter (1988). Gamma linolenic acid as a nutrient. *Food Technol.*, **42**, 72-82.
- Klausner, D.R. & R. Sitia (1990). Protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell*, **61**, 611-614.
- Macherel, M. H. A., D. Macherel, H. Wada & N. Murata (1995). Site directed mutagenesis of histidine residue in delta 12 acyl lipid desaturase of *Synechocystis*. *FEBS Letter*, **361**, 111-114.
- Murderhwa, J. M., R. Ratomahenina, M. Pina, J. Graille & P. Galzy (1985). Purification and properties of the lipase from *Candida deformans* (Zach) Langeron and Guerra. *JAOCS*, **62** (6), 1031-1036.
- Murphy, D. J. (1999). *Fatty Acid Desaturase: Mechanism, Structure and Regulation*. United Kingdom, John Innes Centre Norwich Research Park.
- Murray, R. K, D. K. Granner, P. K. Mayes & V. W. Rodwell (1997). *Harper's Biochemistry* (edisi terjemahan) Jakarta, Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Ozols, J. (1990). Subcellular fractionation of rat liver. *Methods Enzymol.*, **182**, 225-235.
- Ozols, J. (1997). Degradation of hepatic stearyl Co A Δ^9 -desaturases. *Mol. Biol. Cell*, **8**, 2281-2290.
- Sa'id, E. G. (1987). *Bioindustri*. Bogor, PAU Bioteknologi IPB.
- Serrano-Carreon, L., Y. Hathout, M. Bensoussans & J. M. Belin (1993). Metabolism of linoleic acid or mevalonate and 6-pentyl- α -pyrone biosynthesis by *Trichoderma* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59** (9), 2945-2950.

Suzuki, O. (1991). Recent trends of oleochemical by biotechnology. *In PORIM International Palm Oil Conference Chemistry and Technology*, Malaysia. p. 221-230.

Tri-Panji (1997). Growth and the content of polyunsaturated fatty acids of *Absidia corymbifera* biomass on media containing crude palm oil. *Menara Perkebunan*, **65** (2), 104-110.