



UNIVERSITAS INDONESIA

PEMBUATAN AGEN PENGEMULSI MELALUI REAKSI
ESTERIFIKASI ENZIMATIS GLISEROL DAN ASAM LAURAT
MENGUNAKAN KATALIS LIPASE *MUCOR MIEHEI*
YANG DIIMMOBILISASI

SKRIPSI

DANI WIBOWO
0404060179

FAKULTAS TEKNIK
PROGRAM STUDI TEKNIK KIMIA
DEPOK
JANUARI 2009



UNIVERSITAS INDONESIA

PEMBUATAN AGEN PENGEMULSI MELALUI REAKSI
ESTERIFIKASI ENZIMATIS GLISEROL DAN ASAM LAURAT
MENGUNAKAN KATALIS LIPASE *MUCOR MIEHEI*
YANG DIIMMOBILISASI

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana teknik

DANI WIBOWO
0404060179

FAKULTAS TEKNIK
PROGRAM STUDI TEKNIK KIMIA
DEPOK
JANUARI 2009

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

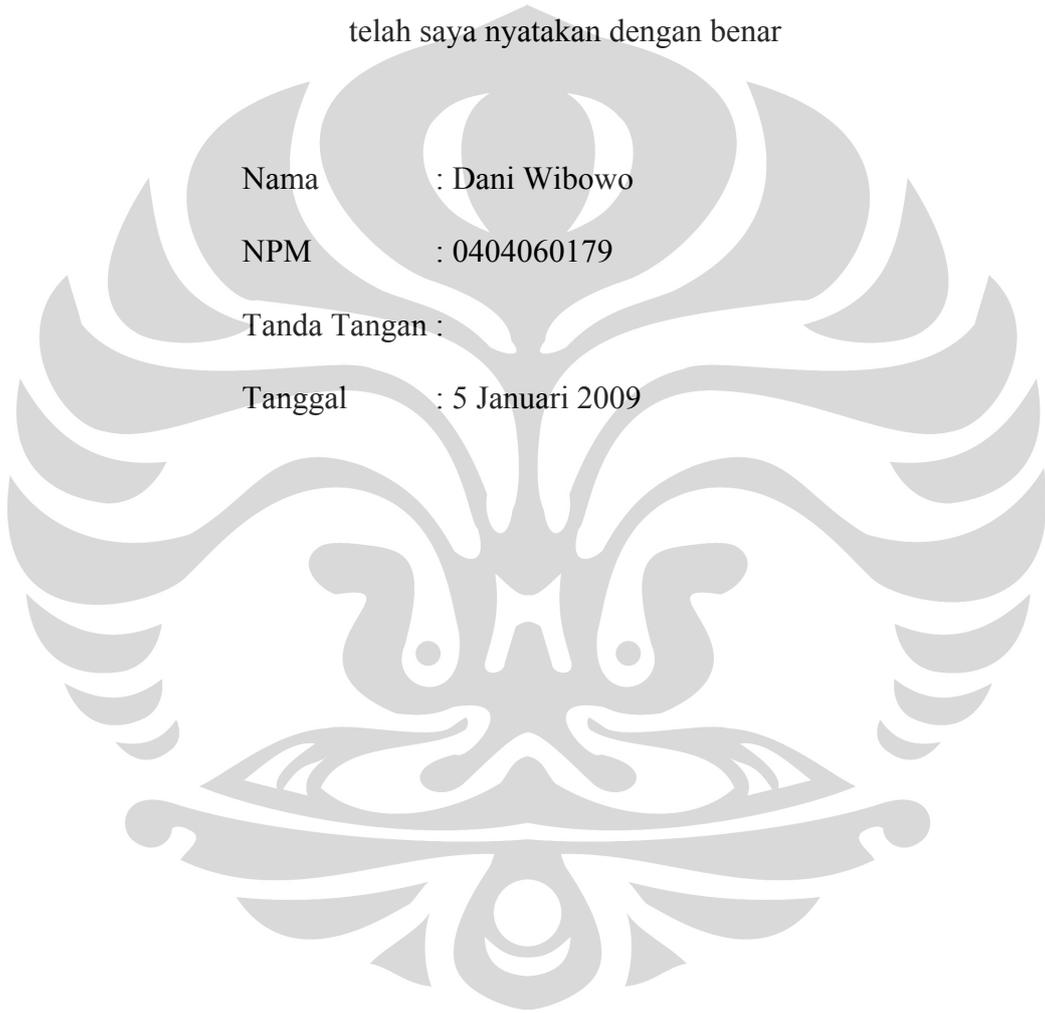
Skripsi ini merupakan hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Dani Wibowo

NPM : 0404060179

Tanda Tangan :

Tanggal : 5 Januari 2009



HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Dani Wibowo
NPM : 0404060179
Program Studi : Teknik Kimia
Judul Skripsi : Pembuatan Agen Pengemulsi Melalui Reaksi Esterifikasi Enzimatis Gliserol dan Asam Laurat Menggunakan Katalis Lipase *Mucor miehei* yang Diimmobilisasi

Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik pada Program Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. Heri Hermansyah, ST, M.Eng ()
Pembimbing : Ir. Rita Arbianti, M.Si ()
Penguji : Dr.Ing.Misri Gozan, M.Tech ()
Penguji : Tania Surya Utami, ST, MT ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 5 Januari 2009

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT karena atas berkat dan rahmat-Nya tugas skripsi ini dapat diselesaikan tepat pada waktunya. Skripsi dengan judul **Pembuatan Agen Pengemulsi Melalui Esterifikasi Gliserol dan Asam Laurat Menggunakan Katalis Lipase yang Diimmobilisasi** ini disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan akademis dalam meraih gelar Sarjana Teknik di Program Studi Teknik Kimia Departemen Teknik Gas dan Petrokimia FTUI.

Dalam penyusunan skripsi ini, penulis banyak mendapatkan banyak bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Dr.Heri Hermansyah, ST, M.Eng dan Ibu Ir.Rita Arbianti, M.Si, selaku dosen pembimbing saya dalam tugas ini. Terima kasih atas segala bantuan serta diskusinya.
2. Rakhmad P sebagai teman satu perjuangan yang menanggung beban pikiran yang sama.
3. Ayah, Ibu dan ketiga Adikku tersayang
4. Wiwit Purwanti, terima kasih atas segala keceriaan, kebahagiaan, semangat, kesabarannya.
5. Teguh F, Rona Ircham, Yanur, Salim, Anif, Aris dan Aziz sebagai teman yang selalu bisa membuat hati lebih ceria.
6. Ahmed, Aji, Aryo, Danar, Denny, MK, bdul, Ramos, Safri, Teman – teman tarbiyah-ku.

Penulis menyadari masih terdapat banyak kekurangan dalam penulisan tugas skripsi ini. Untuk ini, saran dan kritik sangat penulis harapkan untuk memperbaiki penulisan di masa yang akan mendatang.

Depok, 5 Januari 2008

Dani Wibowo

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Dani Wibowo
NPM : 0404060179
Program Studi : Teknik Kimia
Departemen : Teknik Kimia
Fakultas : Teknik
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (Non-exclusive Royalty-Free Right)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Pembuatan Agen Pengemulsi Melalui Reaksi Esterifikasi Enzimatis Gliserol dan Asam Laurat Menggunakan Katalis Lipase *Mucor miehei* yang Diimmobilisasi

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 5 Januari 2009

Yang menyatakan

(Dani Wibowo)

ABSTRAK

Nama : Dani Wibowo
Program Studi : Teknik Kimia
Judul : Pembuatan Agen Pengemulsi Melalui Reaksi Esterifikasi Enzimatis Gliserol dan Asam Laurat Menggunakan Katalis Lipase *Mucor Miehei* yang Diimmobilisasi

Reaksi esterifikasi antara gliserol dan asam laurat dilakukan untuk menghasilkan agen pengemulsi berupa dilaurin menggunakan lipase *Mucor meihei* yang diimmobilisasi pada support hidrofobik dengan pelarut n-heksana. Hasil analisis menggunakan GC/MS menunjukkan bahwa waktu optimum reaksi adalah 25 jam dengan konsentrasi digliserida sebesar 33,23% dan perbandingan mol gliserol dan asam laurat adalah 3:3. Hasil uji tegangan permukaan memperlihatkan bahwa digliserida yang dihasilkan mampu menurunkan tegangan permukaan air hingga 31,9 mN/m. Berdasarkan uji kestabilan emulsi, produk digliserida tersebut dapat mengemulsikan campuran minyak dan air selama 292 detik.

Kata kunci:

Reaksi Esterifikasi, immobilisasi, lipase *Mucor meihei*, digliserida, gliserol, asam laurat

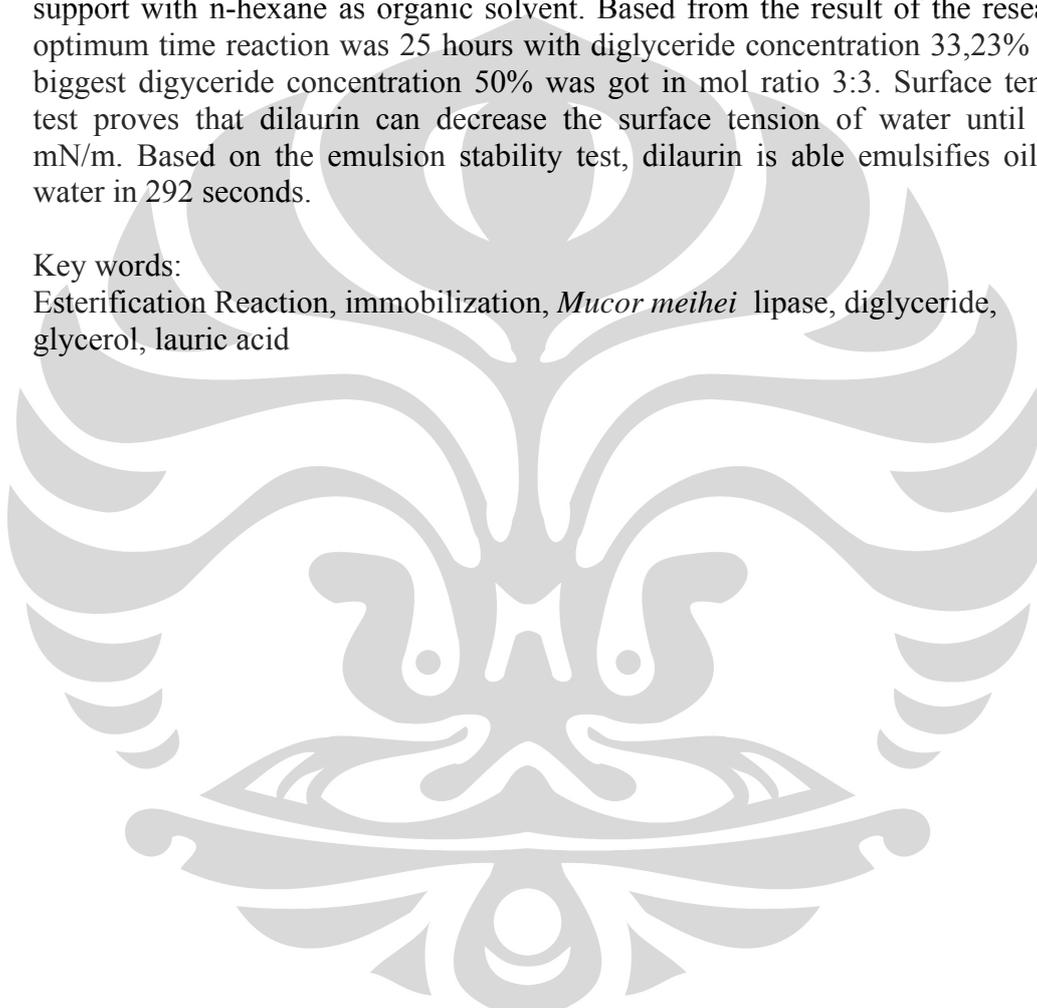
ABSTRACT

Name : Dani Wibowo
Study Program : Chemical Engineering
Title : Emulsifier Synthesis Through Enzymatic Esterification of Glycerol and Lauric Acid by an Immobilized *Mucor Meihei* Lipase

Esterification between glycerols and lauric acid to produce emulsifier which is dilaurin performed by an immobilization *Mucor meihei* lipase on hydrophobic support with n-hexane as organic solvent. Based from the result of the research, optimum time reaction was 25 hours with diglyceride concentration 33,23% .The biggest diglyceride concentration 50% was got in mol ratio 3:3. Surface tension test proves that dilaurin can decrease the surface tension of water until 31,9 mN/m. Based on the emulsion stability test, dilaurin is able emulsifies oil and water in 292 seconds.

Key words:

Esterification Reaction, immobilization, *Mucor meihei* lipase, diglyceride, glycerol, lauric acid



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....	v
ABSTRAK.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
BAB 1 PENDAHULUAN	2
1. 1. Latar Belakang	2
1. 2. Perumusan Masalah	4
1. 3. Tujuan Penelitian	4
1. 4. Batasan Masalah	4
1. 5. Sistematika Penulisan	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Kelapa Sawit	6
2.1.1 Kondisi kelapa sawit Indonesia.....	7
2.1.2 Industri Pengolahan Kelapa Sawit.....	7
2.1.3 Potensi Pengembangan Kelapa sawit.....	8
2.1.4 Trigliserida pada minyak kelapa sawit.....	9
2.2 Asam Laurat.....	10
2.3 Gliserol.....	11
2.4 Esterifikasi	12
2.5 Pembuatan Digliserida	16
2.5.1 Pengaruh kandungan air.....	17
2.5.2 Pengaruh suhu	19
2.5.3 Pengaruh laju pengadukan	20
2.5.4 Pengaruh perbandingan molar.....	21
2.5.5 Pengaruh waktu tinggal reaksi.....	22
2.5.6 Pengaruh waktu reaksi	23
2.5.7 Pengaruh penambahan dimetilformida (DMF).....	23
2.6 Emulsifier.....	24
2.7 Tegangan Permukaan.....	25
2.8 Enzim Lipase.....	28
2.8.1 Cara Kerja Enzim.....	29
2.8.2 Keberadaan Lipase	30
2.8.3 Faktor yang mempengaruhi aktivitas lipase.....	31
2.8.4 Penggolongan lipase	32
2.8.5 Manfaat lipase	33
2.9 Immobilisasi Enzim	34
2.9.1 Teknik dan zat untuk immobilisasi	36
2.9.1.1. Entrapment	36
2.9.1.2. Covalent binding	38

2.9.1.3. Cross-linking	39
2.9.1.4. Adsorpsi	39
2.10 Kitin	41
2.11 Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS)	42
BAB 3 METODE PENELITIAN	45
3.1 Variabel Penelitian	46
3.2 Alat dan Bahan	46
3.2.1 Alat Percobaan	46
3.2.1 Bahan Percobaan	47
3.3 Prosedur Penelitian	48
3.3.1 Tahap Pembuatan Buffer Fosfat 0,1 M pH 7	48
3.3.2 Immobilisasi enzim lipase <i>Mucor meihei</i> pada support	48
3.3.3 Menentukan konsentrasi protein yang terimmobilisasi	48
3.3.4 Reaksi esterifikasi-enzimatis variasi waktu	49
3.3.5 Reaksi esterifikasi-enzimatis variasi mol	50
3.3.6 Pengukuran Tegangan Permukaan	51
3.3.7 Tahap Uji Stabilitas Emulsi	51
3.3.8 Analisis data	52
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	53
4.1 Pengaruh Waktu dalam Reaksi Esterifikasi-Enzimatis Gliserol dan Asam Laurat	56
4.2 Pengaruh Perbandingan Mol Gliserol dan Asam Laurat dalam Reaksi Esterifikasi-Enzimatis Gliserol dan Asam Laurat	61
BAB 5 KESIMPULAN	66
DAFTAR REFERENSI	67

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.Pohon Kelapa Sawit	6
Gambar 2.2.Struktur Kimia Trigliserida	9
Gambar 2.3.Struktur Kimia Asam Laurat	11
Gambar 2.4.Struktur Molekul Gliserol	11
Gambar 2.5.Reaksi Esterifikasi.....	13
Gambar 2.6. Reaksi Esterifikasi Asam Etanoat dengan Etanol	14
Gambar 2.7.Tahap Pertama Reaksi Esterifikasi.....	14
Gambar 2.8.Tahap Kedua Reaksi Esterifikasi	14
Gambar 2.9.Tahap Ketiga Reaksi Esterifikasi	15
Gambar 2.10.Tahap Keempat Reaksi Esterifikasi	15
Gambar 2.11.Tahap Terakhir Reaksi Esterifikasi.....	15
Gambar 2.12.Struktur Kimia Digliserida	17
Gambar 2.13.Pengaruh Kondisi Vakum Terhadap Konsentrasi Digliserida	18
Gambar 2.14.Pengaruh Suhu Reaksi Terhadap Konsentrasi Digliserida.....	19
Gambar 2.15.Pengaruh Laju Pengadukan.....	21
Gambar 2.16.Pengaruh Rasio Molar Terhadap Konsentrasi Digliserida.....	22
Gambar 2.17.Pengaruh Waktu Tinggal Reaksi.....	22
Gambar 2.18.Pengaruh Waktu Reaksi	23
Gambar 2.19.Metode Pengukuran Tegangan Permukaan Metode Cincin.....	27
Gambar 2.20.Metode Pengukuran Tegangan Permukaan Metode Plat	28
Gambar 2.21.Lipase Guinea Pig	29
Gambar 2.22.Skema Cara Kerja Enzim	30
Gambar 2.23.Metode immobilisasi enzim	35
Gambar 2.24.Metode Entrapment.....	37
Gambar 2.25.Covalent Binding	38
Gambar 2.26.Cross-Linking.....	39
Gambar 2.27.Immobilisasi Metode Adsorpsi	40
Gambar 2.28.Struktur Kimia Kitin	41
Gambar 2.29.Skema Alat GC/MS.....	43
Gambar 3.1.Alur Penelitian untuk Mendapatkan Kondisi Optimum dalam Reaksi Esterifikasi-Enzimatis	45
Gambar 3.2.Skema Reaksi Esterifikasi-Enzimatis.....	47
Gambar 4.1.Kurva Kalibrasi Standar Protein	55
Gambar 4.2.Peak Chromatogram Sampel Dilaurin t=25 jam	57
Gambar 4.3.Konsentrasi Sampel Variasi Waktu.....	58
Gambar 4.4.Tegangan Permukaan Air: Variasi Waktu	59
Gambar 4.5.Uji Stabilitas Emulsi: Variasi Waktu	60
Gambar 4.6.Skema Reaksi untuk Menghasilkan 1,2 Dilaurin.....	61
Gambar 4.7.Konsentrasi Sampel dari Beberapa Rasio Mol Gliserol dan Asam Laurat	62
Gambar 4.8.Tegangan Permukaan Air: Variasi Mol	63
Gambar 4.9.Uji Stabilitas Emulsi: Variasi Mol	64
Gambar 4.10.Perbandingan hasil antara free enzim dan enzim diimmobilisasi pada variasi waktu optimum.....	63
Gambar 4.11. Perbandingan hasil antara free enzim dan enzim diimmobilisasi pada variasi mol optimum.....	65

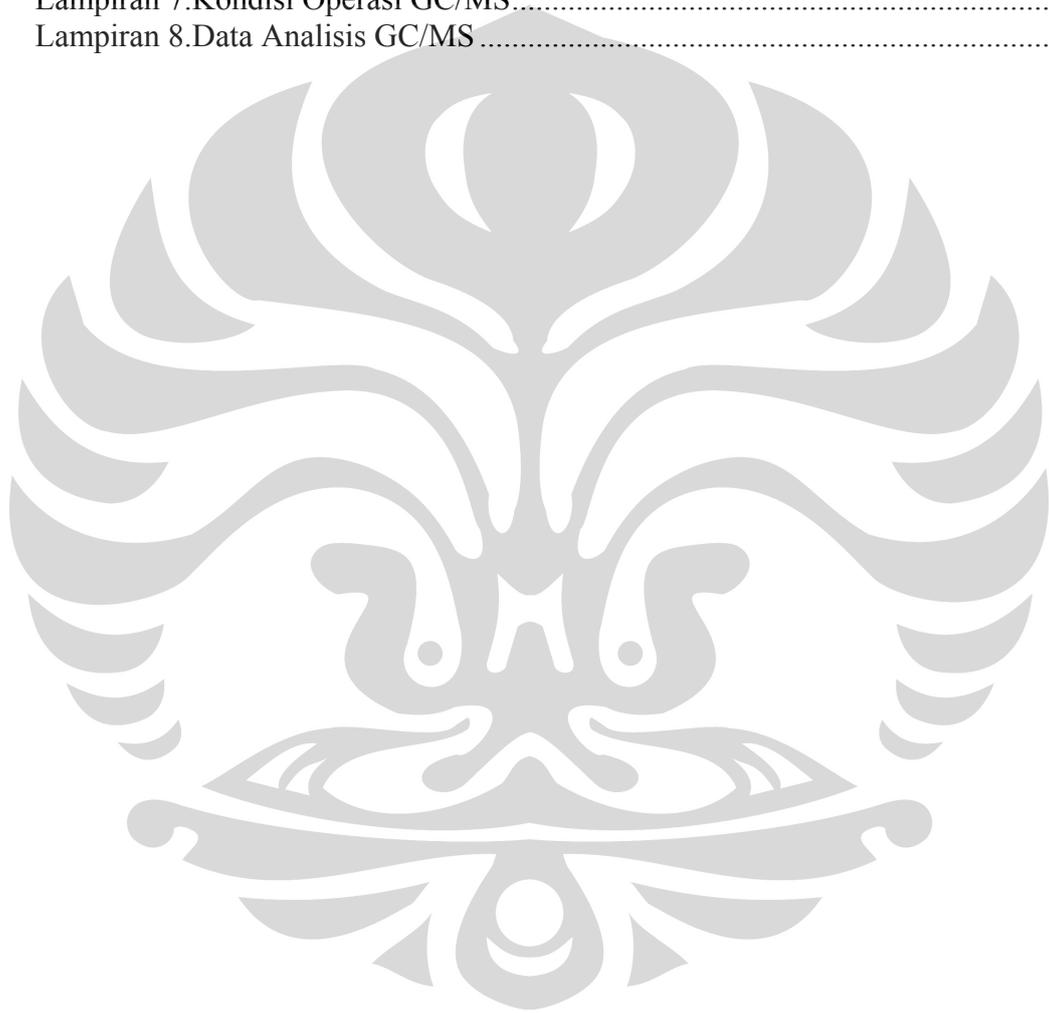
DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Jenis Industri, Perkiraan Investasi dan Nilai Tambah Industri Berbasis Minyak Sawit	8
Tabel 2.2. Komposisi Trigliserida dan Tabel Komposisi	9
Tabel 2.3. Asam Lemak Yang Terdapat dalam Struktur Trigliserida.....	10
Tabel 2.4. Sifat-Sifat fisik gliserol	12
Tabel 2.5. Lipase Pada Bakteri dan Actinomyces.....	30
Tabel 2.6. Lipase Pada Pada Ragi dan Jamur	31
Tabel 2.7. Berbagai Macam Metode Immobilisasi untuk Enzim	36
Tabel 2.8. Contoh Immobilisasi Enzim	37



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Foto-Foto Penelitian	71
Lampiran 3 Peak Library	74
Lampiran 4 Data Analisis Tegangan Permukaan dan Stabilitas Emulsi.....	77
Lampiran 5.Data Immobilisasi Enzim dan Perhitungan Enzim Loading	78
Lampiran 6.Perhitungan Konsentrasi Sampel dengan GC/MS.....	80
Lampiran 7.Kondisi Operasi GC/MS.....	81
Lampiran 8.Data Analisis GC/MS	82



BAB 1

PENDAHULUAN

1. 1. Latar Belakang

Indonesia merupakan negara penghasil minyak kelapa sawit (Crude Palm Oil) terbesar nomor dua di dunia setelah Malaysia. Pada tahun 2005, total produksi Crude Palm Oil (CPO) Indonesia mencapai 17 juta ton dan mengekspor 10 juta ton CPO ke pasar mancanegara (60% dari total produksi) sedangkan sisanya untuk konsumsi dalam negeri (Tryfino, 2006). Besarnya ekspor tersebut karena belum berkembangnya industri hilir pengolahan CPO di Indonesia. Industri hilir di Indonesia sebagian besar masih diperuntukkan untuk pangan (80%-85%) dan sisanya untuk industri oleokimia (Goenadi et al., 2005).

Produk yang berasal dari minyak kelapa sawit akan mempunyai nilai tambah apabila dilakukan pengembangan industri oleokimia dasar yang banyak dibutuhkan pada industri deterjen, sabun dan kosmetik. Berdasarkan *Oil World and Reuter*, industri oleokimia dasar Indonesia baru mampu menyumbangkan produksi sebesar 3,6% dari total produksi oleokimia dunia (Goenadi et al., 2005). Berdasarkan data tersebut tentunya Indonesia harus mampu meningkatkan industri oleokimia mengingat ketersediaan bahan baku kelapa sawit yang melimpah.

Salah satu industri dasar tersebut adalah industri *emulsifier* yang dapat meningkatkan nilai tambah dari minyak sawit menjadi sekitar 200% (Goenadi et al., 2005). Oleh karena itu, diperlukan suatu proses pengolahan minyak sawit menjadi *emulsifier* yang selain dapat meningkatkan nilai tambah dari minyak tersebut, juga dapat merangsang pertumbuhan industri kosmetik dan makanan di Indonesia.

Salah satu bahan baku pembuatan *emulsifier* adalah digliserida. Senyawa ini dapat dibuat melalui reaksi esterifikasi gliserol dan asam lemak yang berasal dari CPO. Apabila ditinjau dari ketersediaan bahan baku minyak sawit yang melimpah di Indonesia, tentunya industri pengolahan minyak kelapa sawit menjadi digliserida akan sangat potensial. Selain untuk meningkatkan nilai

tambah dari minyak kelapa sawit, industri ini juga bermanfaat untuk mengembangkan industri oleokimia dasar.

Digliserida (Diasilgliserol; DAG) terdiri dari dua bentuk isometrik yaitu 1,2(2,3)-diasilgliserol dan 1,3-diasilgliserol. DAG merupakan *emulsifier* yang sangat bermanfaat bagi industri makanan, kosmetik, dan farmasi. Di Jepang senyawa ini digunakan sebagai minyak untuk memasak sejak tahun 1999 dengan komposisi 80% digliserida dan sisanya trigliserida. Manfaat DAG lainnya yaitu sebagai bahan baku pada sintesis fosfolipid, glikolipid dan lipoprotein (Kristensen, Xu & Mu, 2005). Campuran digliserida dan monogliserida sering digunakan dalam pembuatan *emulsifier* karena memiliki beberapa keunggulan, yaitu harganya murah dan mempunyai kestabilan yang baik apabila digunakan pada industri makanan (Kristensen, Xu & Mu, 2005). Apabila dibandingkan dengan *emulsifier* berbahan baku petrokimia, *emulsifier* ini bersifat lebih mudah terurai secara biologis (biodegradable) sehingga lebih aman untuk dikonsumsi. *Emulsifier* nabati ini juga lebih baik karena bahan bakunya tergolong sumber daya alam yang dapat diperbaharui sehingga ketersediaannya dapat terjamin.

Campuran antara monogliserida dan digliserida dapat diproduksi secara kimiawi pada suhu yang tinggi (220-260⁰C) dan menggunakan katalis anorganik seperti natrium, kalium atau kalsium hidroksida. Alternatif lain untuk memproduksi DAG yaitu reaksi dengan menggunakan biokatalis lipase yang mempunyai beberapa keunggulan, yaitu mampu memberikan selektivitas yang tinggi, kemurnian dan kualitas produk yang tinggi, konservasi energi serta tidak digunakannya katalis yang beracun (Berger, Laumen & Schneider, 1992). Mereka telah berhasil mensintesis digliserida dengan *yield* yang tinggi (lebih besar dari 80%) melalui reaksi esterifikasi gliserol dan asam lemak. Katalis yang digunakan yaitu lipase *Chromobacterium viscosum*, *Rhizopus delemar*, *Rhizomucor miehei* yang selektif terhadap gugus hidroksil 1 dan 3 pada gliserol (Kristensen, Xu & Mu, 2005).

Penggunaan enzim sebagai katalis dalam skala industri ternyata mempunyai beberapa kendala yaitu harga enzim yang mahal, ketidakstabilan struktur enzim, dan ketersediaannya hanya dalam jumlah yang kecil. Enzim juga dapat larut dalam media cair dan diperlukan biaya yang mahal untuk memperoleh

kembali enzim dari reaktor setelah digunakan pada proses enzimatik. Kendala tersebut dapat diatasi dengan suatu teknik yaitu immobilisasi enzim. Immobilisasi enzim membuat struktur enzim lebih stabil, produk yang dihasilkan mempunyai kemurnian yang tinggi serta enzim dapat digunakan secara berulang-ulang sehingga memungkinkan enzim digunakan pada proses secara kontinyu (Souza, 1998)

Pada sintesis digliserida yang dilakukan oleh Watanabe et al. (2005) esterifikasi dilakukan pada *packed bed bioreactor* dengan adanya peralatan tambahan untuk mengendalikan kandungan air berupa *water removal vessel*. Penelitian tersebut berusaha untuk mengetahui pengaruh variasi suhu dari 40⁰C, 50⁰C, 60⁰C pada tekanan 0,4 kPa. Hasil yang diperoleh ternyata laju sintesis digliserida pada suhu 50⁰C lebih tinggi daripada 40⁰C, dan terjadi kenaikan laju reaksi yang kecil dari 50⁰C ke 60⁰C. Akan tetapi dengan semakin meningkatnya laju reaksi ternyata akumulasi air yang terjadi semakin banyak sehingga selanjutnya laju esterifikasi kemurnian produk digliserida menurun.

Penelitian tentang reaksi esterifikasi yang lain diantaranya penelitian yang membandingkan pengaruh suhu terhadap reaksi esterifikasi dengan katalis lipase *Candida rugosa* yang *free* dengan lipase yang diimmobilisasi pada kitin. Penelitian tersebut menyimpulkan bahwa reaksi untuk lipase yang *free* mempunyai suhu optimum sebesar 37⁰C dan suhu optimum untuk lipase yang diimmobilisasi sebesar 45 °C. Hal ini menunjukkan bahwa lipase yang diimmobilisasi lebih stabil (Gomez, 2003).

Di jurusan Teknik Kimia juga pernah dilakukan penelitian tentang *screening support* untuk immobilisasi enzim lipase *Candida rugosa* pada support kitin, silica gel, Al₂O₃, dan CaCO₃ oleh Prabu (2007). Dari penelitian tersebut diperoleh bahwa kitin merupakan support terbaik untuk immobilisasi enzim dengan metode adsorpsi.

Berdasarkan penelitian-penelitian tersebut maka pada penelitian ini akan dilakukan reaksi esterifikasi untuk untuk menghasilkan digliserida dengan katalis lipase *Mucor meihei* yang diimmobilisasi pada support kitin karena terbukti mampu mengimmobilisasi enzim dengan baik serta dengan adanya immobilisasi struktur enzim lebih stabil dibandingkan dengan *free enzim*.

1. 2. Perumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh rasio umpan gliserol dan asam laurat terhadap produk digliserida?
2. Bagaimana pengaruh waktu reaksi terhadap produk digliserida?

1. 3. Tujuan Penelitian

1. Menentukan pengaruh waktu reaksi terhadap digliserida yang dihasilkan dalam reaksi esterifikasi-enzimatis gliserol dan asam laurat.
2. Menentukan pengaruh perbandingan mol gliserol dan asam laurat terhadap digliserida yang dihasilkan dalam reaksi esterifikasi-enzimatis gliserol dan asam laurat.

1. 4. Batasan Masalah

Pada Penelitian ini, penulis membatasi permasalahan ke dalam ruang lingkup:

1. Bahan baku yang digunakan dalam penelitian adalah gliserol dan asam laurat komersial.
2. Katalis yang digunakan adalah enzim lipase *Mucor meihei* yang diimmobilisasi dengan metode adsorpsi pada support kitin.
3. Penelitian difokuskan pada reaksi esterifikasi-enzimatis antara gliserol dan asam laurat untuk menghasilkan produk digliserida (1,2 dilaurin).
4. Metode analisis digliserida adalah dengan metode GC/MS (*Gas Chromatography/ Mass Spektrometry*),
5. Kinerja dari digliserida yang dihasilkan diukur dengan tegangan permukaan dan stabilitas emulsi.

1. 5. Sistematika Penulisan

Makalah skripsi ini ditulis berdasarkan sistematika sebagai berikut:

BAB I PENDAHULUAN

Bab ini terdiri atas latar belakang, rumusan masalah, tujuan penelitian, pembatasan masalah, dan sistematika penulisan.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

Bab ini menjelaskan berbagai informasi yang didapatkan dari berbagai pustaka mengenai minyak kelapa sawit, gliserol, asam laurat, reaksi esterifikasi, *emulsifier*, immobilisasi enzim, lipase, analisis GC/MS (Gas Chromatography/ Mass Spektrometry).

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

Berisi tentang tahapan-tahapan pelaksanaan penelitian, alat dan bahan yang digunakan, analisis produk, dan pengolahan data.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Berisi tentang penyajian data penelitian yang diperoleh, analisis kecenderungan pada berbagai variasi variabel bebas, dan pembahasan mengenai fenomena yang terjadi dalam proses esterifikasi enzimatis

BAB V KESIMPULAN

Berisi tentang kesimpulan yang dapat diambil berdasarkan percobaan yang dilakukan terkait dengan tujuan dari penelitian ini.

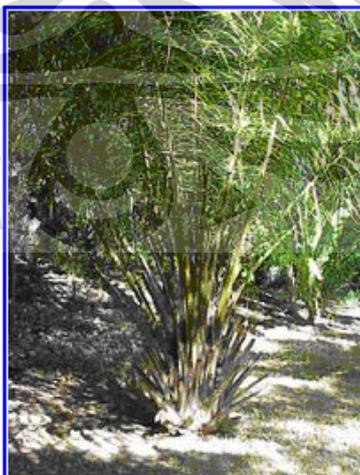
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kelapa Sawit

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis*) termasuk golongan tanaman berkeping satu yang termasuk dalam famili *Palmae*. Kelapa sawit dapat tumbuh dengan baik di daerah tropis dengan curah hujan 2000 mm/tahun dan kisaran suhu 22°C – 32°C (Ketaren, 1986). Kelapa sawit membutuhkan iklim dengan curah hujan stabil, yaitu daerah yang tidak tergenang air saat hujan dan tidak kekeringan saat kemarau

Daun kelapa sawit merupakan daun majemuk, berwarna hijau tua dan pelepahnya berwarna sedikit lebih muda. Penampilannya mirip dengan pohon salak, hanya durinya tidak terlalu keras dan tajam. Batang tanaman diselimuti bekas pelapah hingga umur 12 tahun. Setelah umur 12 tahun pelapah yang mengering akan terlepas sehingga menjadi mirip dengan tanaman kelapa. Akar tanaman ini berjenis akar serabut yang mengarah ke bawah dan ke samping (Kelapa, 2007).



Gambar 2.1. Pohon Kelapa Sawit

Sumber: www.wikipedia.org

Bunga jantan dan betina terpisah dan memiliki waktu pematangan berbeda sehingga sangat jarang terjadi penyerbukan sendiri. Bunga jantan memiliki bentuk lancip dan panjang sementara bunga betina terlihat lebih besar dan mekar. Buah sawit mempunyai warna bervariasi dari hitam, ungu, hingga merah tergantung bibit yang digunakan. Kandungan minyak bertambah sesuai kematangan buah. Setelah melewati fase matang, kandungan asam lemak bebas (FFA, free fatty acid) akan meningkat dan buah akan rontok dengan sendirinya. Buah terdiri dari tiga lapisan yaitu *eksoskarp*, *endoskarp*, dan *mesoskarp*. Inti sawit merupakan endosperm dan embrio dengan kandungan minyak inti yang berkualitas tinggi (Kelapa, 2007).

2.1.1 Kondisi kelapa sawit Indonesia

Melalui berbagai upaya pengembangan, baik yang dilakukan oleh perkebunan besar, proyek-proyek pembangunan maupun swadaya masyarakat, perkebunan kelapa sawit telah berkembang sangat pesat. Pada tahun 1968, luas areal yang baru 120 ribu ha menjadi 4,926 juta ha pada tahun 2003 (Goenadi et al., 2005). Data pada tahun 2005 menunjukkan bahwa luas perkebunan kelapa sawit yang tertanam di Indonesia adalah 5,6 juta ha, yang terdiri dari 1,9 juta ha perkebunan rakyat, perkebunan pemerintah 0,7 juta ha, dan perkebunan swasta 3,0 juta ha. Rata-rata pertumbuhan lahan per tahun sebesar 15% atau 200.000 ha per tahun. Sementara itu, produksi kelapa sawit Indonesia di tahun 2005 telah mencapai 17 juta ton meningkat 63,7% dibandingkan tahun 2003 yang mencapai 10,4 juta ton (Tryfino, 2006).

Sebagian besar lahan perkebunan kelapa sawit di Indonesia terletak di Pulau Sumatera (69%) disusul Pulau Kalimantan (26%), sisanya di Pulau Sulawesi, Papua dan Jawa. Sejalan dengan perkembangan areal perkebunan, produksi kelapa sawit juga mengalami peningkatan, dari hanya 181 ribu ton CPO pada tahun 1968 menjadi 10,4 juta ton pada tahun 2003 dan 17 juta ton pada tahun 2005 (Tryfino, 2006).

2.1.2 Industri Pengolahan Kelapa Sawit

Industri pengolahan kelapa sawit yang mengolah tandan buah segar menjadi *Crude Palm Oil* (CPO) terus mengalami peningkatan seiring dengan

peningkatan luas areal dan produksi. Sampai tahun 2004 jumlah unit pengolahan di seluruh Indonesia mencapai 320 unit (Tryfino, 2006).

Dari segi pertumbuhan, industri hilir kelapa sawit yang berupa industri oleokimia dasar yaitu *fatty acid, fatty alcohol, stearin, glycerin dan metallic soap* mengalami pertumbuhan yang sangat pesat. Pada 1988 produksi oleokimia dasar Indonesia baru 79.500 ton, naik menjadi 217.700 ton pada 1993, dan menjadi 652 ribu ton pada 1998 atau tumbuh dengan laju sekitar 23,5% tiap tahun. Walaupun pertumbuhan industri dasar oleokimia cukup pesat tetapi hanya sekitar 15-20% dari produksi CPO yang digunakan untuk konsumsi dalam negeri (Goenadi et al., 2005).

2.1.3 Potensi Pengembangan Kelapa sawit

Industri oleokimia dasar dapat merangsang pertumbuhan industri barang konsumen seperti deterjen, sabun, dan kosmetik. Dalam sepuluh tahun terakhir, pemakaian minyak sawit dalam industri oleokimia naik dengan laju sekitar 9% tiap tahun. Berikut tabel tentang jenis industri, perkiraan investasi dan nilai tambah industri berbasis minyak sawit.

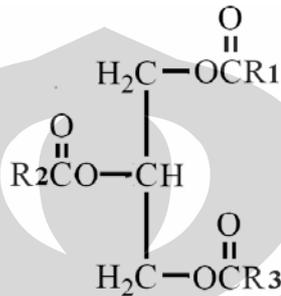
Tabel 2.1. Jenis Industri, Perkiraan Investasi dan Nilai Tambah Industri Berbasis Minyak Sawit

No	Produk	Bahan baku	Tingkat Teknologi	Perkiraan investasi	Pertambahan Nilai
1	<i>Olein & Stearin</i>	CPO	Menengah		20%
2	<i>Fatty acids</i>	CPO, PKO, katalis	Tinggi	200-700 milyar	50%
3	<i>Ester</i>	<i>Palmitat, Miristat</i>	Tinggi	100-500 milyar	150%
4	<i>Surfactant/ Emulsifer</i>	<i>Stearat, Oleat, sorbitol, gliserol</i>	Tinggi	200-700 milyar	200%
5	Sabun mandi	CPO, PKO, NaOH, pewarna, parfum	Sederhana	Mulai dari kurang 1 milyar	300%
6	Lilin	<i>Stearat</i>	Sederhana	Mulai dari kurang 1 milyar	300%
7	Kosmetik (lotion, cream), bedak	<i>Surfaktan, ester, amida</i>	Sederhana	1-200 milyar	600%

Sumber : Goenadi et.al., 2005

2.1.4 Trigliserida pada minyak kelapa sawit

Minyak kelapa sawit merupakan salah satu jenis minyak yang komponen utamanya tersusun atas trigliserida.



Gambar 2.2. Struktur Kimia Trigliserida

Apabila ketiga asam lemak penyusunnya sama maka trigliserida ini disebut trigliserida sederhana, dan apabila salah satu atau lebih asam lemak penyusunnya tidak sama maka disebut trigliserida campuran. Berikut ini adalah tabel dari komposisi trigliserida dan tabel komposisi asam lemak dari minyak kelapa sawit.

Tabel 2.2. Komposisi Trigliserida dan Tabel Komposisi Asam Lemak dari Minyak Kelapa Sawit

Trigliserida	Jumlah (%)
Tripalmitin	3 - 5
Dipalmito - Stearin	1 - 3
Oleo - Miristopalmitin	0 - 5
Oleo - Dipalmitin	21 - 43
Oleo - Palmitostearin	10 - 11
Palmito - Diolein	32 - 48
Stearo - Diolein	0 - 6
Linoleo - Diolein	3 - 12

Sumber: Pasaribu, 2004

Selain mengandung trigliserida, kelapa sawit juga mempunyai kandungan asam lemak. Asam lemak merupakan rantai karbon yang setiap atom karbonnya mengikat satu atau dua atom hidrogen, kecuali atom karbon terminal mengikat tiga atom hidrogen, sedangkan atom karbon terminal lainnya mengikat gugus karboksil. Asam lemak yang pada rantai hidrokarbonnya terdapat ikatan rangkap disebut asam lemak tidak jenuh, dan apabila tidak terdapat ikatan rangkap pada rantai hidrokarbonnya karbonnya disebut dengan asam lemak jenuh. Pada tabel 2.3 ditampilkan berbagai macam asam lemak yang mungkin terdapat dalam struktur trigliserida.

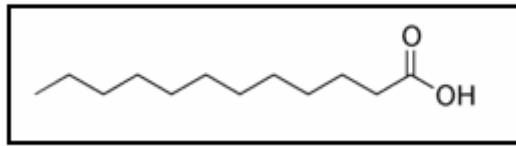
Tabel 2.3. Asam Lemak Yang Terdapat dalam Struktur Trigliserida

Nama umum	Nama sintetik	Kandungan (%)
Asam lemak jenuh		
Laurat	n-Dodekanoat	< 1
Miristat	n-Tetradekanoat	1-6
Palmitat	n-Hexadekanoat	32-47
Stearat	n-Oktadekanoat	1-6
Arakhidrat	n-Eikosanoat	< 1
Asam lemak tak jenuh		
Palmitoleat	n-Hexadek-9-enoat	< 1
Oleat	n-Oktadek-9-enoat	40-52
Gadolear	n-eikos-0-anoat	< 1
Asam lemak poli-tak jenuh		
Linoleat	n-Oktadek-9,12-dienoat	

Sumber: Tarigan, 2002

2.2 Asam Laurat

Asam laurat merupakan asam lemak jenuh dengan struktur formula $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$. Asam laurat merupakan asam utama pada minyak kelapa dan minyak inti kelapa sawit dan asam ini dapat bertindak sebagai antimikrobia (Lauric, 2007). Asam ini pertama kali ditemukan pada tahun 1849 oleh Marsson pada biji-bijian *lauraceae*. Struktur kimia asam laurat dapat dilihat pada gambar 2.3.



Gambar 2.3. Struktur Kimia Asam Laurat

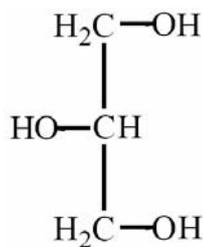
Sumber : www.en.wikipedia.org

Asam laurat tergolong sebagai asam lemak berantai sedang karena memiliki dua belas atom karbon dan tidak terdapat ikatan rangkap. Asam laurat mempunyai beberapa manfaat untuk meningkatkan metabolisme tubuh, mengatasi obesitas dan sebagai antimikrobia. Asam laurat bebas juga banyak yang digunakan sebagai bahan pada pembuatan kosmetik, *defoaming agent* dan zat aditif pada makanan (Lauric, 2007).

Asam laurat dapat mengatasi obesitas karena pada proses pencernaan asam lemak ini tidak diubah menjadi lipoprotein dan tidak disimpan sebagai cadangan energi tubuh dalam bentuk lemak. Asam lemak ini dicerna dan langsung dibawa ke hati untuk diubah menjadi energi.

2.3 Gliserol

Gliserol suatu senyawa hidrofilik dengan formula kimia $C_3H_5(OH)_3$ dengan penampilan fisik tak berwarna, tak berbau, dan kental. Gliserol dapat dihasilkan dari transesterifikasi dan hidrolisis minyak nabati seperti minyak kelapa sawit. Gliserol juga didapatkan sebagai hasil samping pembuatan biodiesel. Sekitar 10% dari produk proses pembuatan biodiesel adalah gliserol.



Gambar 2.4. Struktur Molekul Gliserol

Tabel dibawah ini menyajikan sifat-sifat fisik dari gliserol.

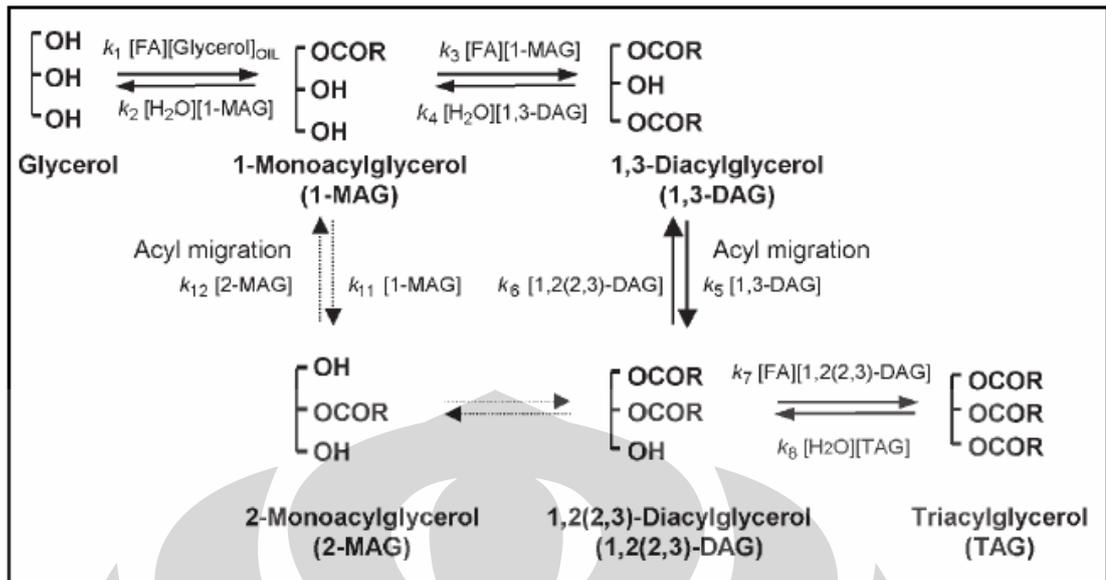
Tabel 2.4.Sifat-Sifat fisik gliserol

Massa molekul	92.09382 g/mol
Densitas	1.261 g/cm ³
Viskositas	1.5 Pa.s
Titik leleh	18 °C (64.4 °F)
Titik didih	290 °C (554 °F)
Flash point	160 °C

Sumber : www.en.wikipedia.org

2.4 Esterifikasi

Esterifikasi merupakan suatu reaksi pembentukan ester. Pada penelitian ini digunakan esterifikasi gliserol dengan asam lemak hal ini dikarenakan dengan menggunakan metode ini kita mendapatkan digliserida dengan gugus asil yang kita kehendaki. Asam lemak yang berperan sebagai donor asil merupakan asam laurat. Reaksi esterifikasi ini merupakan reaksi bolak-balik yang akan menghasilkan digliserida sebagai produk utama dan air. Mekanisme reaksi lebih jelas terlihat pada gambar 2.5.



Gambar 2.5.Reaksi Esterifikasi

Sumber : Watanabe et al., 2003

Berger, Laumen & Schneider (1992) telah berhasil mensintesis digliserida dengan *yield* yang tinggi (lebih besar dari 80%) melalui reaksi esterifikasi gliserol dan asam lemak. Metode yang dilakukan adalah dengan mengadsorpsi gliserol pada suatu support sehingga penelitian ini kurang sesuai apabila digunakan untuk reaksi pada skala besar.

Reaksi esterifikasi enzimatis memerlukan suatu katalis yang mempunyai sifat selektif sehingga dapat diperoleh hasil yang sesuai dengan yang diharapkan. Oleh sebab itu pada esterifikasi tersebut digunakan lipase *Chromobacterium viscosum*, *Rhizopus delemar*, *Rhizomucor miehei* yang selektif terhadap gugus hidroksil 1 dan 3 pada gliserol

Kristensen, Xu & Mu (2005) mencoba untuk melakukan screening lipase untuk mengetahui lipase yang mempunyai selektivitas yang baik. Penelitian tersebut didasarkan pada lipase yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang berbeda mempunyai karakteristik yang berbeda pada reaksi tertentu. *Pseudomonas cepacia*, *P. fluoresces*, *Rhizopus oryzae*, *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosa*, dan *Rhizomucor miehei* diuji melalui reaksi gliserolisis enzimatik untuk memperoleh lipase terbaik dalam reaksi gliserolisis. Sebagai

hasilnya lipase yang berasal dari *Rhizomucor miehei* dan *Thermomyces lanuginosa* menghasilkan *yield* digliserida yang terbaik.

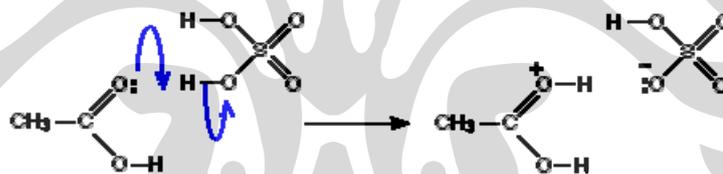
Mekanisme reaksi esterifikasi terdiri dari lima langkah (*Esterification*, 2007), dan sebagai contohnya pada pembentukan etil etanoat dengan mereaksikan asam asetat dan etanol dengan bantuan katalis asam sulfat.



Gambar 2.6. Reaksi Esterifikasi Asam Etanoat dengan Etanol

Sumber: www.chemguide.co.uk

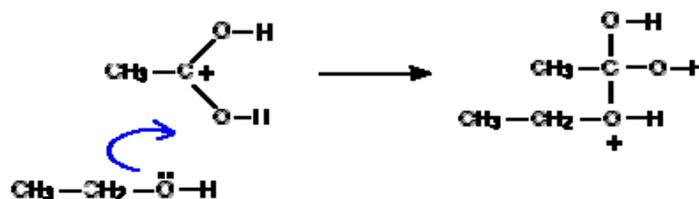
Langkah pertama, asam asetat menerima proton (ion hidrogen) dari asam sulfat. Proton tersebut lalu berikatan dengan oksigen yang berikatan rangkap dengan karbon. Perpindahan proton ke oksigen membuatnya jadi bermuatan positif.



Gambar 2.7. Tahap Pertama Reaksi Esterifikasi

Sumber: www.chemguide.co.uk

Langkah kedua, muatan positif pada atom karbon diserang oleh satu elektron oksigen dari molekul etanol.



Gambar 2.8. Tahap Kedua Reaksi Esterifikasi

Sumber: www.chemguide.co.uk

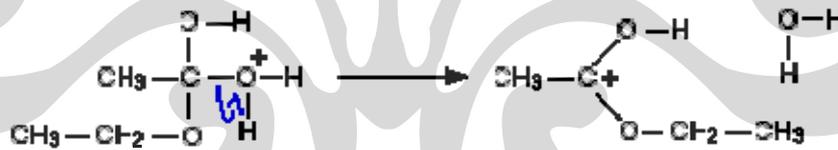
Langkah ketiga, pada fase ini terjadi perpindahan proton (ion hidrogen) dari oksigen terbawah ke atom oksigen lainnya.



Gambar 2.9. Tahap Ketiga Reaksi Esterifikasi

Sumber: www.chemguide.co.uk

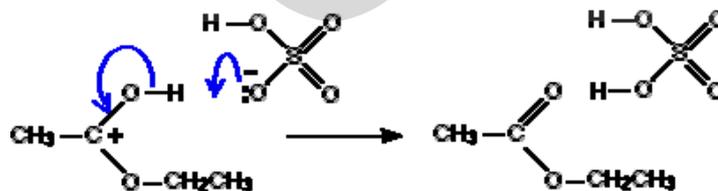
Langkah keempat, pada fase ini terbentuk molekul air akibat terputusnya ikatan ion.



Gambar 2.10. Tahap Keempat Reaksi Esterifikasi

Sumber: www.chemguide.co.uk

Langkah terakhir, yaitu pemisahan hidrogen dari oksigen oleh reaksi dari ion hidrogen sulfat yang terbentuk pada langkah pertama.



Gambar 2.11. Tahap Terakhir Reaksi Esterifikasi

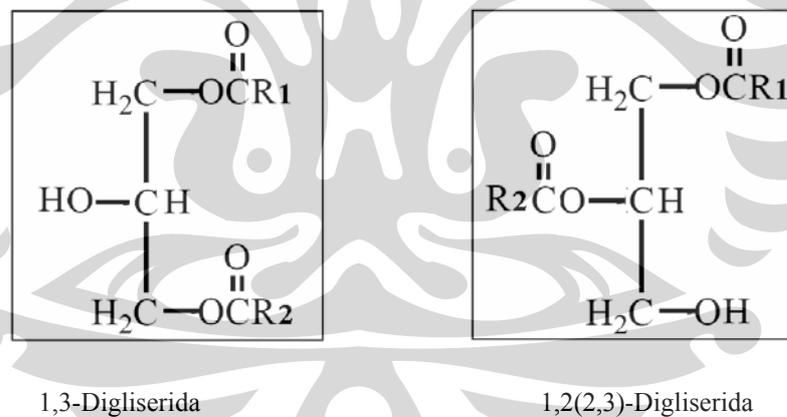
Sumber: www.chemguide.co.uk

2.5 Pembuatan Digliserida

Digliserida (Diasilgliserol) secara alami terdapat dalam jumlah kecil pada beberapa jenis lemak dan minyak. Struktur digliserida terdiri dari dua, yaitu 1,2(2,3)-Diasilgliserol dan 1,3-Diasilgliserol. Pada minyak alami, komposisinya terdiri dari 70% 1,3-Diasilgliserol dan sisanya 1,2(2,3)-Diasilgliserol dari total digliserida secara keseluruhan. Minyak komersial dengan kandungan digliserida yang tinggi juga mempunyai komposisi digliserida yang sama seperti pada minyak alami, hal ini terjadi karena kesetimbangan pada proses *refining* dan penyimpanan setelah proses sintesis. Digliserida pernah digunakan sebagai *blooming agent* pada roti coklat dan juga merupakan produk antara pada sintesis lemak. Penelitian tentang kandungan gizi pada digliserida menyatakan bahwa digliserida dapat mengurangi konsentrasi trigliserida pada darah sehingga dapat menurunkan berat badan (Watanabe et al., 2003). Digliserida juga digunakan sebagai bahan untuk sintesis fosfolipid, glikolipid dan lipoprotein (Berger, Laumen & Schneider, 1992). Sontang (1984) mensintesis digliserida secara kimiawi dari lemak dan minyak menggunakan gliserol melalui gliserolisis pada suhu lebih dari 200⁰C menggunakan katalis alkali. Kekurangan dari proses ini adalah *yield* dan kemurnian masih rendah.

Cara yang lain untuk memproduksi DAG yaitu dengan reaksi dengan katalis lipase yang mampu memberikan selektifitas yang tinggi, kemurnian dan kualitas produk yang tinggi, konservasi energi serta tidak digunakannya katalis yang beracun (Kristensen, Xu & Mu, 2005). Cara yang lain untuk memproduksi 1,3-diasilgliserol adalah melalui hidrolisis triolein menggunakan katalis lipase, tetapi *yield* yang dihasilkan hanya 43% karena banyak terbentuk monogliserida sebagai produk sampingan (Plou et al, 1996). Gliserolisis enzimatik minyak sapi juga pernah dilakukan untuk memproduksi digliserida dengan suhu operasi 48⁰C-60⁰C dan ternyata *yield* 1,3-diasilgliserol yang dihasilkan cukup tinggi yaitu sekitar 90%. Kekurangan dari produksi digliserida ini yaitu memerlukan waktu yang lama untuk mencapai *yield* tersebut (Yamane, Kang, Kawashara & Koizumi, 1994).

Esterifikasi merupakan reaksi yang reversibel sehingga produk samping yang berupa air mendapat perhatian serius karena keberadaan air mempengaruhi pergeseran kesetimbangan. Oleh sebab itu, pada esterifikasi enzimatis gliserol dan asam lemak untuk mensintesis 1,3-Diasilgliserol digunakan pelarut organik yang mengandung sedikit air (Berger, Laumen & Schneider, 1992). Kekurangan dari penggunaan pelarut organik tersebut adalah gliserol tidak dapat larut, sehingga sebelum reaksi dilakukan gliserol harus diadsorpsi terlebih dahulu pada *support* untuk menciptakan suatu lapisan buatan yang berperan sebagai tempat katalisis. Sebagai alternatif penggunaan pelarut organik, Rosu et al. (1999) mensintesis digliserida melalui esterifikasi gliserol pada sistem tanpa pelarut dan air yang dihasilkan dipindahkan secara serentak. Hasil yang diperoleh cukup baik yaitu *yield* 84,6% dan kemurnian 96% ketika asam kaprilat digunakan sebagai sumber asam lemak.



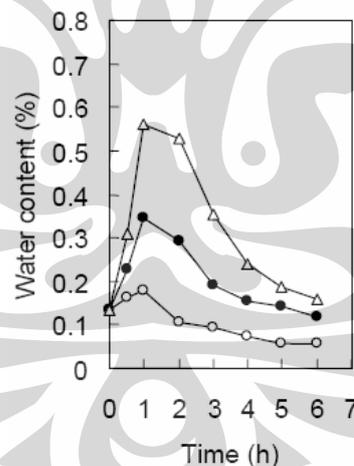
Gambar 2.12. Struktur Kimia Digliserida

2.5.1 Pengaruh kandungan air

Reaksi esterifikasi merupakan reaksi yang dapat menghasilkan monogliserida, digliserida, trigliserida dan produk samping berupa air. Air merupakan produk samping yang sangat berpengaruh pada reaksi esterifikasi. Air mempunyai peranan yang sangat penting pada kesetimbangan reaksi dan aktivitas enzim. Seiring berjalannya reaksi maka akan semakin banyak air yang terakumulasi pada produk, hal ini dapat menyebabkan kesetimbangan reaksi

bergeser ke arah hidrolisis. Air juga diperlukan dalam jumlah yang sedikit untuk aktivitas enzim. Oleh sebab itu, kandungan air pada reaksi esterifikasi harus benar-benar menjadi perhatian yang utama karena untuk mendapatkan *yield* digliserida yang tinggi kita harus mampu untuk mengendalikan kandungan air selama reaksi berlangsung.

Penelitian untuk mengendalikan kandungan air pada esterifikasi diantaranya dengan menggunakan pompa vakum (Watanabe et al., 2003), menambahkan garam hidrat, menggunakan nitrogen. Penggunaan pompa vakum tersebut ternyata mempunyai kekurangan yaitu akan bertambahnya biaya untuk investasi peralatan, penggunaan garam hidrat juga akan menambah proses pemisahan untuk memisahkan garam hidrat dari produk. Sebagai alternatif untuk mengontrol kandungan air, dapat digunakan kosolven organik yaitu dimetilformida (Kim & Kim, 2000). Penggunaan dimetilformida (DMF) sebagai pengendali kandungan air dapat membuat *water activity* rendah sehingga reaksi akan tetap berjalan ke arah esterifikasi sehingga *yield* digliserida yang dihasilkan akan tinggi.



Gambar 2.13. Pengaruh Kondisi Vakum Terhadap Konsentrasi Digliserida

Sumber: Watanabe et.al.,2003

Penggunaan DMF sebagai pengendali *water activity* harus tepat, dalam hal ini banyaknya DMF yang ditambahkan pada reaksi harus benar-benar sesuai. Kandungan DMF yang tinggi dapat menyebabkan rusaknya struktur protein pada enzim sehingga dapat menonaktifkan kerja enzim. Pada kandungan sekitar 7,5%

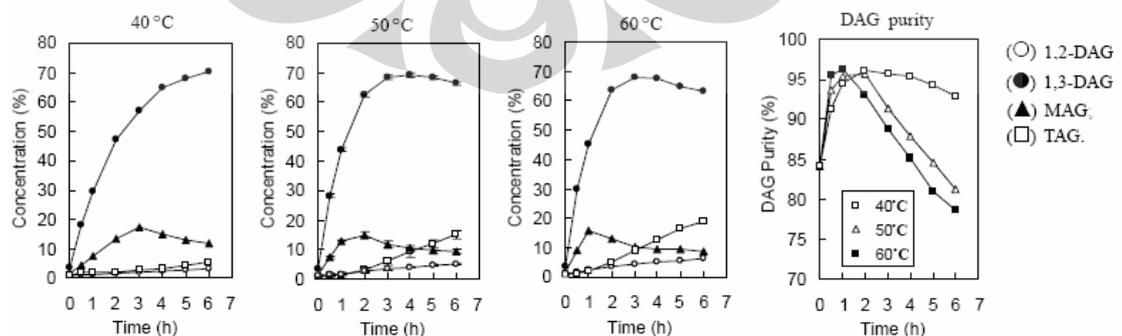
(volume/berat) DMF bekerja secara optimal menghilangkan air yang terikat pada enzim sehingga produk yang diperoleh akan lebih banyak (Kim & Kim, 2000).

2.5.2 Pengaruh suhu

Suhu merupakan salah satu faktor penting pada suatu reaksi, karena dengan naiknya suhu maka laju reaksi akan meningkat karena reaksi mendapat tambahan energi untuk mencapai energi aktivasinya. Hal ini sesuai dengan persamaan Arrhenius yang menyatakan bahwa konstanta laju reaksi berbanding eksponensial dengan suhu.

Penentuan suhu reaksi akan sangat berpengaruh pada produk yang dihasilkan karena setiap reaksi tentunya mempunyai kondisi operasi yang berbeda-beda. Pada reaksi esterifikasi dengan biokatalis tentunya suhu dibatasi oleh rusaknya enzim ketika digunakan pada suhu yang tinggi. Enzim pada umumnya akan optimal digunakan pada suhu dibawah 60°C .

Pada sintesis digliserida yang dilakukan oleh Watanabe et al. (2005) esterifikasi dilakukan pada *packed bed bioreactor* dengan adanya peralatan tambahan untuk mengendalikan kandungan air berupa *water removal vessel*. dilakukan variasi suhu dari 40°C , 50°C , 60°C pada tekanan 0,4 kPa. Hasil yang diperoleh ternyata laju sintesis digliserida pada suhu 50°C lebih tinggi daripada 40°C , dan terjadi kenaikan laju reaksi yang kecil dari 50°C ke 60°C . Akan tetapi dengan semakin meningkatnya laju reaksi ternyata akumulasi air yang terjadi semakin banyak sehingga selanjutnya laju esterifikasi kemurnian produk menurun.



Gambar 2.14. Pengaruh Suhu Reaksi Terhadap Konsentrasi Digliserida

Sumber: Watanabe et.al., 2003

Dengan naiknya suhu reaksi, produksi trigliserida (TAG) juga semakin meningkat. Konsentrasi TAG selama 2 jam reaksi pada suhu 40°C, 50°C, 60°C berturut-turut 2%, 3%, 5%. Pada gambar diatas dapat dilihat terjadi kenaikan konsentrasi TAG menjadi 5,6%, 16,3%, 18,8% pada suhu 40°C, 50°C, 60°C selama 6 jam reaksi. Kenaikan konsentrasi TAG menyebabkan konsentrasi digliserida menurun.

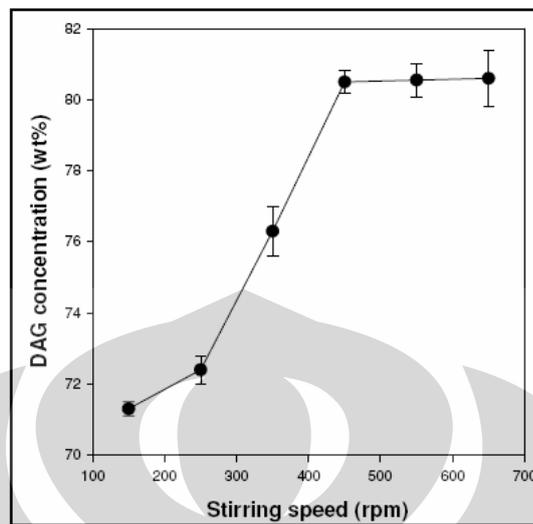
2.5.3 Pengaruh laju pengadukan

Pengaruh laju pengadukan pernah diteliti oleh Lue et al. (2005) pada esterifikasi *cinnamic acid* dan alkohol pada pelarut isooktana dan 2-butanon. Pengaruh laju pengadukan dilakukan dengan memvariasikan laju pengadukan dari 0-200 rpm, menggunakan lipase dengan konsentrasi 4 mg/cc pada suhu 55°C selama 2 hari. Aktivitas enzimatik ternyata meningkat dari 108,6 menjadi 156,5 nmol/gram. Secara keseluruhan, meningkatnya aktivitas enzimatik menandakan bahwa batasan difusi eksternal tidak terjadi pada laju pengadukan 0-200 rpm. Meningkatnya laju pengadukan dapat mengurangi lapisan pembatas cair yang mengelilingi *support* sehingga menghasilkan batasan diffusional yang rendah.

Konversi pada suatu sistem dua fasa cair-cair dipengaruhi oleh adanya transfer massa reaktan dari kondisi awal menuju tahap reaksi. Penelitian tentang pengaruh transfer massa dilakukan oleh Kraai, Winkelmana, Vriesb & Heeresa (2008) pada reaksi esterifikasi asam oleat dan butanol. Laju pengadukan divariasikan dari 250-2000 rpm. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa laju pengadukan dibawah 1500 rpm, laju reaksi awal merupakan fungsi dari laju pengadukan.

Pengaruh laju pengadukan juga pernah dilakukan oleh Kim dan Lee (2006) pada esterifikasi asam linoleat dan gliserol dengan katalis lipase *Rhizomucor meihei* yang diimmobilisasi dan pada keadaan mendekati hampa udara. Pengaruh tersebut dilakukan dengan laju pengadukan 150, 250, 350, 450, 550 dan 650 rpm, enzim sebanyak 5% dari total berat reaktan, suhu 40°C dan waktu reaksi 8 jam. Konsentrasi digliserida ternyata meningkat secara signifikan dari 71,3% menjadi 80,4% ketika laju pengadukan ditingkatkan dari 150 rpm menjadi 450 rpm. ketika laju pengadukan melebihi 450 rpm, konsentrasi

digliserida cenderung konstan. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada gambar 2.15.

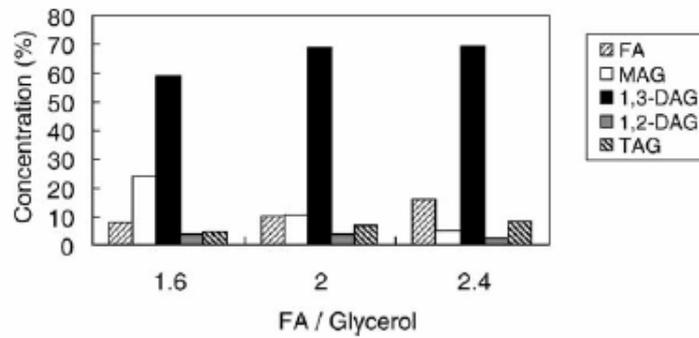


Gambar 2.15. Pengaruh Laju Pengadukan

Sumber: Kim & Lee, 2006

2.5.4 Pengaruh perbandingan molar

Penelitian tentang pengaruh perbandingan molar asam lemak dan gliserol pada esterifikasi pernah dilakukan oleh Watanabe et al. (2005). Pengaruh perbandingan molar asam lemak dan gliserol tersebut dilakukan dengan jumlah asam lemak dan gliserol yang tetap pada suhu 50°C , tekanan 0,4 kPa dan laju alir reaktan 220 ml/menit. Pada gambar 2.16 terlihat bahwa konsentrasi 1,3 diasilgliserol mencapai 70% pada perbandingan molar lebih besar dari 2,0 dan konsentrasinya menjadi sekitar 60% pada perbandingan molar kurang dari 1,6. Konsentrasi trigliserida meningkat dari 4,4%, menjadi 8,0% pada perbandingan molar 1,6 dan 2,4. Dengan meningkatnya konsentrasi trigliserida menyebabkan kemurnian digliserida menurun dari 93,4% menjadi 90%. Sebaliknya dengan semakin kecilnya perbandingan molar maka konsentrasi monogliserida akan meningkat. Hal ini disebabkan karena asam lemak tidak cukup untuk melengkapi reaksi dan monogliserida terakumulasi sebagai produk antara esterifikasi.

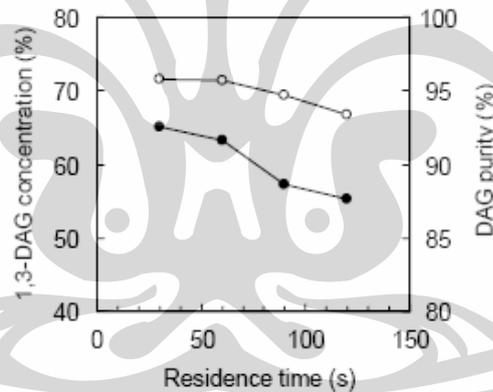


Gambar 2.16. Pengaruh Rasio Molar Terhadap Konsentrasi Diglisierida

Sumber: Watanabe et.al., 2005

2.5.5 Pengaruh waktu tinggal reaksi

Watanabe et al. (2005), mencoba untuk meneliti pengaruh waktu tinggal reaksi dengan merubah laju sirkulasi dari reaksi. Penelitian dilakukan pada suhu 50°C , tekanan 0,4 kPa dan perbandingan molar asam lemak terhadap gliserol 2,0.



Gambar 2.17. Pengaruh Waktu Tinggal Reaksi

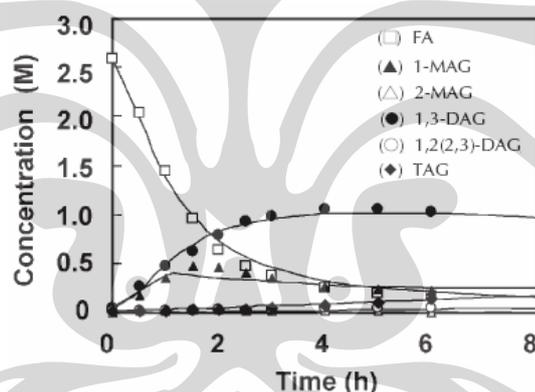
Sumber: Watanabe et.al., 2005

Dengan semakin meningkatnya waktu tinggal (laju sirkulasi menurun) maka konsentrasi diglisierida menurun yang disebabkan karena terjadi reaksi hidrolisis akibat meningkatnya akumulasi air. Ketika waktu tinggal semakin naik, kandungan air pada keluaran *packed bed bioreactor* semakin meningkat dari 0,18% menjadi 0,33% selama 120 detik. Menurut penelitian tersebut, untuk

memperoleh kandungan digliserida yang tinggi maka waktu tinggal harus sesingkat mungkin.

2.5.6 Pengaruh waktu reaksi

Sintesis digliserida menggunakan lipase dapat berlangsung tanpa pelarut dan dengan pelarut. Pada penelitian yang dilakukan oleh Watanabe et al. Digunakan enzim lipase terimmobilisasi pada suatu sistem tanpa pelarut. Konsentrasi asam lemak 2,59 M dan gliserol 1,29 M, suhu reaksi 50⁰C. Pada gambar 2.18 terlihat bahwa asam lemak di awal reaksi dikonsumsi secara signifikan dan terjadi peningkatan 1,3-digliserida sampai 1,05 M setelah 4 jam reaksi. Kemurnian dari 1,3-digliserida 96% pada 2,5 jam reaksi kemudian menurun menjadi 92% setelah 4 jam reaksi (Watanabe et.al.,2005).



Gambar 2.18. Pengaruh Waktu Reaksi

Sumber: Watanabe et.al.,2005

2.5.7 Pengaruh penambahan dimetilformida (DMF)

Penambahan pelarut mimik air mempengaruhi laju reaksi dan *yield* produk. Pelarut ini bersifat hidrofilik yang dapat mengubah aktivitas air pada medium reaksi. Pada reaksi yang menghasilkan air, misalnya esterifikasi, pengendalian *water activity* sangat penting untuk menjaga laju reaksi dan untuk meningkatkan *yield*. Akumulasi air pada esterifikasi dapat menurunkan aktivitas dari enzim sehingga medium reaksi harus dibuat lebih hidrofilik atau menghilangkan air yang terikat pada enzim menggunakan pelarut organik untuk menghilangkan air yang berlebihan. Pelarut hidrofilik menghalangi partikel enzim

dari air. Pemisahan air yang cepat menggunakan DMF akan meningkatkan laju esterifikasi dengan menurunkan konsentrasi air disekitar enzim (Kim & Kim, 2000).

Pengaruh dari pemisahan air antara enzim dan asam lemak menggunakan asam kaprilat sebagai acuannya. Pada mulanya kandungan air enzim 64 mg/gram, kemudian enzim ditambahkan asam kaprilat yang mengandung 0,7% (vol/vol) air, kandungan air meningkat menjadi 74 mg/gram selama kurang dari 1 jam. Ketika enzim ditambahkan ke asam kaprilat yang mengandung 10% (vol/vol) DMF dan 0,7% (vol/vol) air, enzim kehilangan airnya dan kandungan air turun menjadi 50 mg/gram selama kurang dari 1 jam. Hasil ini menandakan bahwa aktivitas enzim pada asam lemak dapat berubah dengan perbedaan *water activity* yang disebabkan adanya penambahan DMF (Kim & Kim, 2000).

2.6 Emulsifier

Emulsifier atau zat pengemulsi didefinisikan sebagai senyawa yang mempunyai aktivitas permukaan (*surface-active agents*) sehingga dapat menurunkan tegangan permukaan (*surface tension*) antara udara-cairan dan cairan-cairan yang terdapat dalam suatu sistem (Sibuae, 2007). Kemampuannya dalam menurunkan tegangan permukaan menjadi hal yang menarik karena *emulsifier* memiliki keajaiban struktur kimia yang mampu menyatukan dua senyawa berbeda polaritasnya. Fenomena campuran air dan minyak yang cenderung berpisah dapat menyatu karena adanya *emulsifier*. Tetesan-tetesan kecil yang tersebar disebut sebagai fase diskontinu atau fase internal ataupun fase terdispersi. Sedangkan cairan tempat fase internal tersebut terdispersi disebut sebagai fase eksternal. Bila campuran minyak dan air dikocok butiran-butiran minyak terdispersi ke dalam air dan emulsi terbentuk. Namun, tak lama kemudian butiran minyak bergabung kembali karena emulsi yang terbentuk tidak stabil. Guna menjaga kestabilan emulsi (butiran minyak atau air terdispersi secara baik dalam waktu lama) kehadiran *emulsifier* amat dibutuhkan. Contohnya adalah pada pembuatan es krim dan industri makanan lainnya.

Fenomena *emulsifier* ini disebabkan karena *emulsifier* memiliki dua ujung yang berbeda polaritasnya yaitu ujung non polar (lipofilik) dan satunya lagi berupa ujung polar (hidrofilik). Bagian hidrofilik akan berikatan dengan air dan

bagian lipofilik akan berikatan dengan minyak. Hal ini akan membantu kedua fasa (minyak dan air) untuk tetap tercampur membentuk emulsi. Emulsi air dan minyak dapat digolongkan menjadi dua. Pertama, yaitu sistem emulsi di mana tetes-tetes minyak terdispersi dalam air dan disebut *oil in water*. Kedua, yaitu emulsi di mana tetes-tetes air terdispersi dalam minyak dan disebut *water in oil*.

Ukuran relatif bagian hidrofilik dan lipofilik zat pengemulsi menjadi faktor utama yang menentukan perilakunya dalam pengemulsian. Untuk memilih pengemulsi yang cocok untuk pemakaian pada produk pangan olahan tertentu, telah dikembangkan apa yang disebut sistem HLB (*hidrophilic/lipophilic balance* atau neraca hidrofilik/lipofilik). Bila *emulsifier* tersebut memiliki kecenderungan terikat lebih kuat pada air atau nilai HLB tinggi, dapat membantu terbentuknya emulsi *oil in water* (O/W). Contohnya, antara lain es krim. Sebaliknya bila *emulsifier* memiliki kecenderungan terikat lebih kuat terhadap minyak atau nilai HLB rendah, akan terbentuk emulsi *water in oil* (W/O). Contohnya, antara lain adalah mentega.

Senyawa *emulsifier* selain memberikan fenomena menarik, juga menjadi tantangan bagi industri pangan nasional untuk merancang berbagai produk makanan baru. Dengan pemilihan *emulsifier* yang tepat, diyakini dapat meningkatkan mutu olahan pangan sekaligus dapat bersaing dengan produk pangan sejenis dari negara-negara maju. Untuk memperbaiki mutu es krim misalnya, peranan *emulsifier* amat penting pada semua tahap pembuatannya. Tak hanya meningkatkan kekuatan dan stabilitas agglomerasi globula lemak, tapi juga mengendalikannya sehingga dapat mencegah terjadinya *oiling out* selama tahap pembekuan.

2.7 Tegangan Permukaan

Salah satu fungsi dari *emulsifier* adalah menurunkan tegangan permukaan air secara nyata. Untuk memahami mengapa agen pengemulsi memiliki efek tersebut, perlu diketahui mekanisme tegangan permukaan dan/atau antarmuka.

Gaya kohesif bekerja antara molekul-molekul, tarik-menarik satu sama lain membentuk cairan atau padatan. Molekul-molekul ini saling melekat dan tidak terpisah, sehingga mempertahankan bentuk cair atau padatan tersebut.

Molekul yang berada di bagian dalam cairan atau padatan merasakan gaya tarik ini dari molekul-molekul tiap sisi, tetapi molekul yang berada pada permukaan tidak menerima gaya tersebut dari sisi atmosfer (udara).

Semakin rapat molekul, semakin rendah (lebih stabil) tingkat energinya. Jadi, molekul-molekul yang berada pada permukaan berada dalam keadaan tingkat energi tinggi akibat tidak adanya molekul-molekul pada satu sisi. Karena energi bebas yang lebih tinggi pada permukaan inilah sehingga terdapat kecenderungan ilmiah berupa penurunan luas permukaan sedapat mungkin. Itulah sebabnya satu tetes membentuk bulatan, yang merupakan bentuk permukaan terkecil yang paling mungkin terbentuk.

Tegangan permukaan berhubungan dengan besarnya gaya kohesif yang bekerja di antara molekul-molekul pada permukaan. Zat-zat yang mempunyai gaya kohesif lebih besar memiliki tegangan permukaan yang lebih besar pula. Air mempunyai tegangan permukaan lebih besar daripada kebanyakan cairan lain karena gaya kohesifnya yang lebih besar akibat adanya ikatan hidrogen. Tegangan permukaan air menurun dengan naiknya suhu.

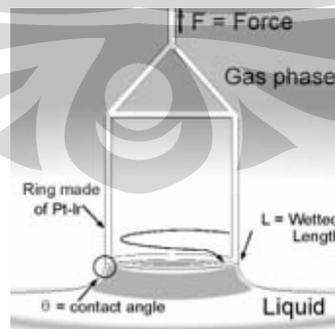
Dalam hal mekanisme tegangan antarmuka, molekul-molekul pada antarmuka kontak dengan molekul-molekul jenis lain, dan menerima gaya tarik dengan kekuatan yang berbeda dengan molekul-molekul yang berada dalam masing-masing fasa. Maka tegangan antarmuka terjadi karena molekul-molekul pada antarmuka memiliki energi bebas yang lebih tinggi dibandingkan dengan energi bebas molekul-molekul dalam masing-masing fasa.

Bila dalam air terkandung *emulsifier*, molekul-molekul emulsifier mengalami orientasi dan teradsorpsi pada permukaan larutan dengan gugus hidrofobik menghadap ke udara. Dengan demikian permukaan larutan tertutupi dengan gugus hidrofobik *emulsifier*. Seperti telah disebutkan sebelumnya, tegangan permukaan yang disebabkan gaya kohesif cairan (atau padatan) membesar dengan meningkatnya gaya kohesif. Karena gaya kohesif hidrokarbon lebih kecil daripada air, tegangan permukaan larutan air (juga lebih kecil daripada air). Itulah sebabnya tegangan permukaan air menurun dengan penambahan *emulsifier* (Cornlis et al., 2007). Metode yang digunakan untuk mengukur tegangan permukaan, antara lain:

1. *DuNouy ring*

Metode ini menggunakan cincin yang terbuat dari logam platinum yang diinteraksikan dengan permukaan cairan yang ingin diukur. Mula-mula cincin ditenggelamkan di bawah permukaan cairan kemudian cincin tersebut dinaikkan sampai diatas permukaan cairan hingga menimbulkan meniscus dari cairan tersebut sampai pada akhirnya, meniscus tersebut pecah. Prosesnya adalah sebagai berikut:

1. Cincin berada di atas permukaan cairan, belum ada gaya yang dihasilkan.
2. Cincin menyentuh permukaan cairan sehingga menghasilkan gaya positif yang tidak signifikan.
3. Cincin melewati batas permukaan cairan, namun belum berhasil menembus dikarenakan tegangan permukaan yang dimiliki oleh cairan tersebut. Hal ini menghasilkan gaya yang bekerja pada cincin bernilai negatif.
4. Cincin berhasil menembus permukaan sehingga gaya yang bekerja bernilai positif.
5. Saat dinaikkan gaya yang terukur mulai meningkat.
6. Gaya tetap meningkat sampai akhirnya.
7. Gaya maksimum telah tercapai.
8. Setelah tercapai gaya maksimum, terdapat sedikit pengurangan gaya hingga akhirnya lamela terpecah.

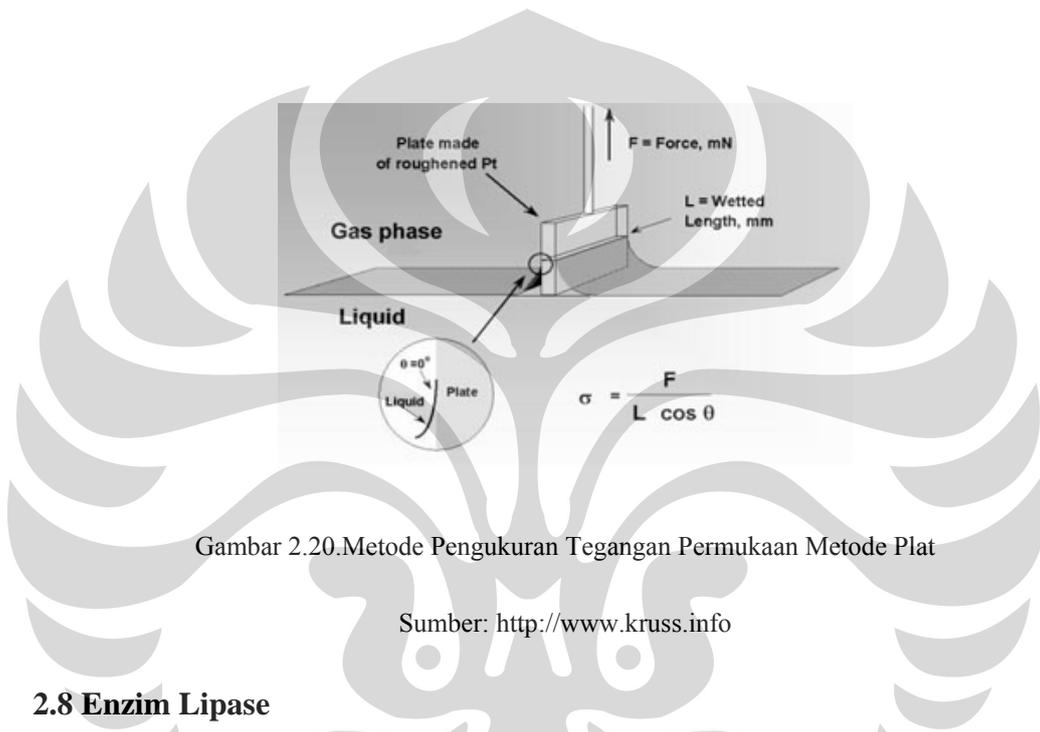


Gambar 2.19. Metode Pengukuran Tegangan Permukaan Metode Cincin

Sumber: http://www.ksvinc.com/703_brochure.htm

2. *Wihelmy Plate*

Metode ini menggunakan sejenis plat yang terbuat dari logam platinum. Perhitungan berdasarkan pada geometri permukaan yang terbasahi saat dikontakkan dengan cairan yang ingin diukur pada keadaan plat tepat diatas permukaan cairan. Hal penting dalam metode ini adalah posisi plat terhadap permukaan cairan.



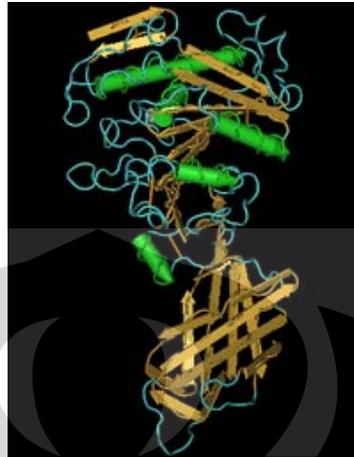
Gambar 2.20. Metode Pengukuran Tegangan Permukaan Metode Plat

Sumber: <http://www.kruss.info>

2.8 Enzim Lipase

Lipase (asilgliserol hidrolase; triasilgliserol hidrolase; gliserol ester hidrolase) merupakan enzim yang mampu memecah lemak. Lipase yang berasal dari mikroba merupakan enzim yang disekresikan oleh mikroba ke dalam medium pertumbuhannya untuk mencerna lemak atau minyak. Lipase dapat berperan sebagai biokatalis untuk memecah lemak menjadi digliserida, monogliserida, asam lemak bebas dan gliserol pada industri makanan, kimia, farmasi, kosmetik, kulit, dan detergen (Berger, Laumen & Schneider, 1992). Aktivasi lipase terjadi dipermukaan air-lemak, yang merupakan karakteristik struktural yang unik dari kelas enzim ini. Lipase menjadi unit oligopeptida heliks yang melindungi *active site* sehingga disebut pada interaksi dengan permukaan *hidrofobik* seperti droplet lemak, memungkinkan pergerakan seperti dalam jalan untuk membuka *active site* untuk substrat. *Active site* biasanya dikarakterkan dengan senyawa triad serin,

histidin, dan aspartat, kompleks enzim asli menjadi perantara penting dalam mengkatalisis reaksi lipase.



Gambar 2.21.Lipase Guinea Pig

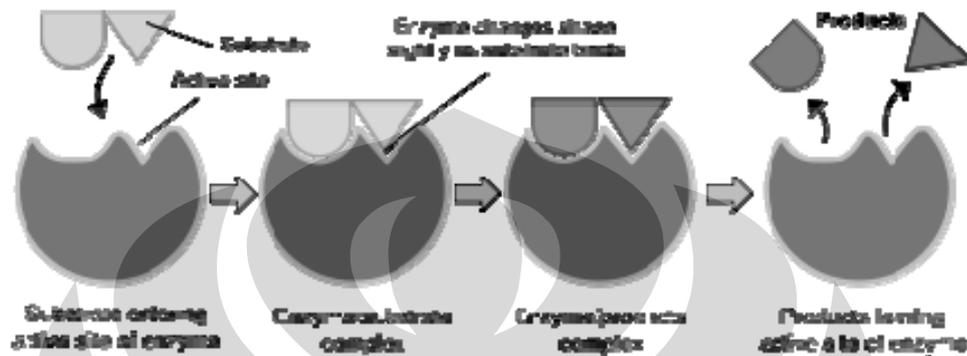
Sumber:www.wikipedia.org

Lipase merupakan enzim yang dapat diproduksi oleh beberapa mikroorganisme diantaranya yaitu bakteri dan jamur. Meningkatnya ketertarikan terhadap lipase karena enzim ini dapat digunakan sebagai katalis dalam hidrolisis untuk mensintesis ester asam lemak.

2.8.1 Cara Kerja Enzim

Enzim terkenal akan selektivitasnya yang tinggi, bagaimana selektivitas itu didapat masih menjadi perdebatan. Akan tetapi ada beberapa hipotesis yang dapat menjelaskan tentang selektivitas enzim tersebut, pada tahun 1894 seorang ilmuwan Jerman bernama Emil Fischer mengemukakan model *the lock and key*. Pada model ini dijelaskan bahwa baik substrat maupun enzim memiliki bentuk geometri spesifik yang sangat cocok antara substrat dengan enzim, akan tetapi model ini tak dapat menjelaskan stabilisasi pada keadaan transisi yang enzim dapatkan. Pada tahun 1958, Daniel Koshland menyempurnakan model yang dibuat oleh Fischer (Koshald, 1958). Dalam teorinya dijelaskan bahwa karena enzim memiliki struktur yang fleksibel, maka gugus aktifnya akan terus-menerus berubah akibat adanya interaksi antara enzim dengan substrat. Dan hasilnya

substrat tersebut tak secara langsung terikat dalam gugus aktif enzim, rantai samping asam amino membuat gugus aktif bergabung dengan posisi substrat yang dapat membuat enzim melakukan fungsinya sebagai katalis. Gugus aktif dari enzim akan terus berubah sampai substrat terikat sempurna.



Gambar 2.22. Skema Cara Kerja Enzim

Sumber: Koshland, 1958

2.8.2 Keberadaan Lipase

Keberadaan lipase dari berbagai jenis bakteri dan jamur telah banyak dilaporkan (Kulkarni, 2002). Pada tabel 2.5 dipaparkan tentang keberadaan lipase pada bakteri dan actinomycetes, sedangkan pada tabel 2.6 dipaparkan tentang keberadaan lipase pada ragi dan jamur.

Tabel 2.5. Lipase Pada Bakteri dan Actinomycetes

<i>Achromobacter lipolyticum</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i> ,	<i>Escherichia coli</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i> MCC-2	<i>Flavobacterium odoratum</i>
<i>Aerovibrio lipolytica</i>	<i>Lactococcus helveticus</i>
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	<i>Leuconostoc citrovorum</i>
<i>B. alcalophilus</i>	<i>Mycobacterium rubrum</i>
<i>Bacillus stearothermophilus</i> SB-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>B. atrophaeus</i> SB-2	<i>P. alcaligenes</i> ,
<i>B. licheniformis</i> SB-3	<i>P. fluorescens</i> ,
<i>B. circulans</i> ,	<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>
<i>B. pumilus</i> ,	<i>Selenomonas lipolytica</i>

2.5.(Sambungan)

<i>B. subtilis</i>	<i>Serratia liquefaciens,</i>
<i>Brevibacterium linens</i>	<i>Streptococcus cremoris,</i>
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Staphylococcus aureus,</i>
<i>B. glumae,</i>	<i>S. epidermidis,</i>
<i>B.pseudomallei</i>	<i>S. haemolyticus</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
<i>Chromobacterium viscosum</i>	<i>Thermus sp.</i>

Sumber: Kulkarni, 2002

Tabel 2.6.Lipase Pada Pada Ragi dan Jamur

<i>Actinomucor taiwanensis</i>	<i>Conidiobolus</i>
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Cryptococcus sp.</i>
<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Cunninghamella echinulata.</i>
<i>A. carneus</i>	<i>Fusarium culmorum</i>
<i>A. flavipes</i>	<i>Galactomyces geotrichum</i>
<i>A. foetidus</i>	<i>Geotrichum asteroides</i>
<i>A. fumigatus</i>	<i>Mucor mucedo</i>
<i>A. repens</i>	<i>Pichia burtonii</i>
<i>Basidiobolus</i>	<i>Rhizomucor miehei</i>
<i>Botryosphaeria</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>
<i>Byssochlamys fulva</i>	<i>Syncephalastrum racemosum</i>
<i>Candida antarctica</i>	<i>Thermomyces lanuginosus</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Trichothecium roseum</i>
<i>C.rugosa</i>	<i>Ustilago maydis.</i>

Sumber: Kulkarni, 2002

2.8.3 Faktor yang mempengaruhi aktivitas lipase

Aktivitas enzim merupakan besarnya kemampuan enzim dalam mempercepat reaksi penguraian sumber karbon. Aktivitas enzim dinyatakan dalam unit per ml dimana 1 unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah

yang menyebabkan perubahan 1 mikromol sumber karbon atau satu mikromolekul produk yang dihasilkan per menit pada kondisi tertentu.

Sifat-sifat lipase tergantung pada substrat dan asal perolehannya. Lipase dari *Chromobacterium viscosum*, *Rhizopus delemar*, *Rhizomucor miehei* digunakan sebagai katalis pada sintesis digliserida dengan esterifikasi gliserol. Reaksi berlangsung pada suhu kamar dan pelarut yang digunakan merupakan pelarut organik. Ternyata konversi paling besar diperoleh ketika digunakan lipase *Rhizomucor miehei* dengan konversi sekitar 98% (Berger, Laumen & Schneider, 1992). Sembilan lipase komersial yaitu: lipases dari *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Candida rugosa*, *Rhizopus delemar*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus oryzae*, *C. rugosa*, *Alcaligenes* sp. and *Chromobacterium viscosum* digunakan sebagai katalis untuk memproduksi digliserida. Produksi digliserida menggunakan katalis lipase *Pseudomonas sp* ternyata memiliki aktivitas hidrolitik sebesar 10,42 U/mg dan mempunyai konversi terbesar yaitu 28,05% pada suhu 45°C (Kristensen, Xu & Mu, 2005).

Kestabilan lipase juga bergantung pada derajat keasaman (pH). Ketika kondisi pH yang lebih tinggi dari pH optimum akan menyebabkan inaktivasi enzim, karena terjadi kerusakan struktur protein enzim. Derajat keasaman yang terlalu rendah mengakibatkan ion H⁺ akan berikatan dengan -NH₂ membentuk -NH₃⁺. Proses pengikatan tersebut menyebabkan ikatan hidrogen antara atom nitrogen dengan atom hidrogen terputus, sehingga enzim terdenaturasi. Kondisi pH yang tinggi mengakibatkan ion OH⁻ berikatan dengan atom hidrogen dari gugus COOH enzim membentuk H₂O. Hal tersebut mengakibatkan rusaknya ikatan antara atom hidrogen dengan nitrogen atau oksigen, sehingga struktur enzim mengalami kerusakan (Pandey, Benjamin, Soccol, Nigam, Krieger & Soccol)

2.8.4 Penggolongan lipase

Lipase yang diisolasi dari mikroba dapat digolongkan menjadi tiga kelompok yaitu:

- Lipase yang menghidrolisis TAG secara acak terhadap posisi asam lemak pada trigliserida menjadi asam lemak. Anggota dari kelompok ini antara

lain: Lipase yang dihasilkan oleh *Candida Rugosa*, *Candida viscosum* dan *Pseudomonas sp.*

- Lipase yang menghidrolisis spesifik pada posisi 1 dan 3 dari trigliserida. Produk yang dihasilkan berupa asam lemak bebas, 1,2-diasilgliserol, dan 2-monogliserol. Contohnya: Lipase yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* dan *Rhizomucor meihei*.
- Lipase yang menghidrolisis secara spesifik asam lemak tertentu dari triasilgliserol. Contohnya yaitu Lipase yang dihasilkan oleh *Geotrichum candidum*.

2.8.5 Manfaat lipase

Lipase biasanya digunakan sebagai biokatalis pada hidrolisis, interesterifikasi, esterifikasi, alkoholisis, asidolisis and aminolisis. Lipase dapat digunakan pada pelarut organik dan mampu menunjukkan selektifitas untuk jenis reaksi tertentu. Penggunaan lipase ternyata cukup ekonomis jika dibandingkan dengan proses tradisional apabila ditinjau dari segi konsumsi energi dan hasil sampingan reaksi (Kulkarni, 2002).

Pada industri makanan lipase digunakan untuk meningkatkan proses kimia tradisional, diantaranya *Pseudomonas* lipase untuk pembuatan minyak dan makanan. Pada industri keju, produksi ester untuk penyedap menggunakan lipase *Staphylococcus warneri* dan *Staphylococcus xylosus*. Karena kemampuannya untuk reaksi dengan regioselektifitas yang tinggi pada berbagai jenis pelarut organik, lipase muncul sebagai biokatalis yang penting dalam aplikasi obat-obatan (Kulkarni, 2002).

Beberapa jenis pestisida (insektisida, herbisida, fungisida) dibuat dengan aplikasi dari lipase. Aplikasi terpenting dari lipase yaitu pada sistesis organik untuk produksi senyawa aktif. Monogliserida dan digliserida yang diperoleh dengan esterifikasi gliserol dengan katalis lipase dapat digunakan untuk surfaktan pada industri kosmetik (Kulkarni, 2002).

2.9 Immobilisasi Enzim

Enzim terbagi menjadi dua yaitu enzim intraseluler dan enzim ekstraseluler, lebih dari 90% enzim merupakan enzim intraseluler. Enzim yang banyak digunakan pada industri adalah enzim ekstraseluler yang diproduksi oleh mikroba karena enzim ini mudah diisolasi, lebih stabil terhadap gangguan daripada enzim intraseluler. Enzim intraseluler isolasinya sangat mahal dan labil. Kekurangan pada enzim intraseluler dapat diatasi dengan penggunaan sel yang dipermeabilisasi sebagai sumber enzim (Souza, 1998).

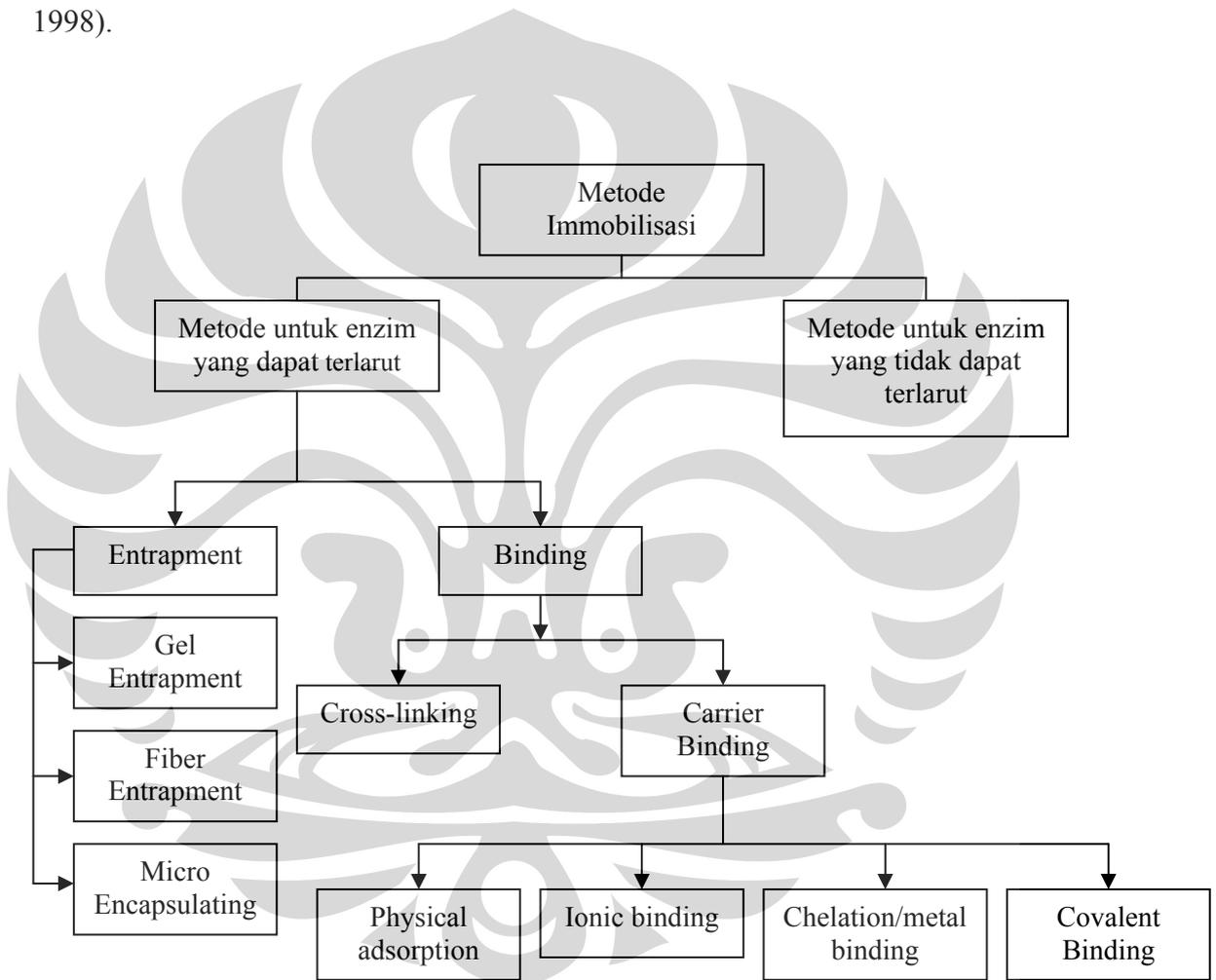
Bioteknologi merupakan alternatif bagi proses konvensional pada bidang industri karena tidak seperti katalis kimiawi, katalis biologi bekerja pada kondisi operasi dengan suhu yang tidak terlalu tinggi yaitu sekitar 60°C. Penggunaan katalis biologi juga memberikan efisiensi proses yang baik, hasil sampingan yang sedikit, meningkatkan kapasitas pabrik, meningkatkan *yield* produk (Souza, 1998).

Selain banyak manfaatnya, penggunaan enzim pada dunia industri juga dibatasi oleh beberapa hal khususnya harga enzim yang tinggi, ketidakstabilan enzim, perolehannya hanya dalam jumlah yang sedikit, enzim larut dalam media cair, susah untuk memperoleh kembali enzim setelah digunakan. Penelitian untuk mengatasi masalah ini telah banyak dilakukan selama setengah abad terakhir dan diantaranya penelitian tentang immobilisasi enzim yang memungkinkan untuk penggunaan enzim secara luas pada dunia industri, pengolahan limbah, obat-obatan (Souza, 1998).

Immobilisasi biokatalis sangat membantu dari segi ekonomi karena enzim dapat digunakan kembali dan dapat digunakan untuk mengembangkan proses secara kontinyu. Biokatalis dapat diimmobilisasi dengan mengisolasi enzim atau isolasi seluruh sel. Immobilisasi dapat membuat struktur enzim stabil sehingga enzim dapat digunakan pada kondisi lingkungan yang kurang baik, misalnya pH, suhu dan pelarut organik (Souza, 1998).

Immobilisasi berarti menghubungkan biokatalis dengan matriks yang tidak dapat larut, sehingga enzim dapat ditahan di reaktor sehingga enzim dapat digunakan kembali pada kondisi yang stabil. Dengan adanya immobilisasi enzim, enzim dapat dijaga dari aliran cairan yang mengandung reaktan dan produk.

Immobilisasi bermanfaat pada perkembangan proses secara kontinu, otomatisasi, mengurangi tenaga kerja dan mengurangi rasio investasi/kapasitas. Manfaat lain dari adanya immobilisasi enzim yaitu perolehan kemurnian produk yang lebih tinggi. Kemurnian produk merupakan hal yang sangat penting pada industri makanan dan obat-obatan karena apabila ada kontaminasi dapat menyebabkan keracunan. Manfaat yang lain yaitu kontrol yang lebih besar pada reaksi enzimatik dengan produk yang tinggi dan waktu tinggal yang kecil (Souza, 1998).



Gambar 2.23. Metode Immobilisasi Enzim

Sumber: Prabu, 2007

2.9.1 Teknik dan zat untuk immobilisasi

Teknik untuk immobilisasi serta zat yang digunakan untuk immobilisasi banyak sekali, pemilihannya bergantung pada sifat enzim dan substrat serta aplikasi terbaiknya.

Teknik untuk immobilisasi enzim terbagi menjadi 4 jenis yaitu entrapment, covalent binding, cross-linking dan adsorpsi. perpaduan dari satu atau lebih teknik ini telah diteliti, pertimbangan dari sisi ekonomi, stabilitas dari biokatalis merupakan faktor yang sangat penting (Since, 2004)

Tabel 2.7. Berbagai Macam Metode Immobilisasi untuk Enzim

karakteristik	Cross-linking	Adsorpsi Fisik	Ikatan Ionik	Ikatan Logam	Ikatan Kovalen	Entrapping
Preparasi	sedang	mudah	sedang	mudah	sulit	Sulit
Gaya ikatan	kuat	lemah	sedang	sedang	kuat	Sedang
Aktivitas enzim	rendah	sedang	tinggi	tinggi	tinggi	Rendah
Regenerasi carrier	tak mungkin	mungkin	mungkin	mungkin	sangat mungkin	mungkin
Biaya immobilisasi	sedang	rendah	rendah	sedang	tinggi	Sedang
Stabilitas	tinggi	rendah	sedang	sedang	tinggi	Tinggi
Perlindungan dari kontaminasi	sedikit	tidak ada	tidak ada	tidak ada	tidak ada	Ada

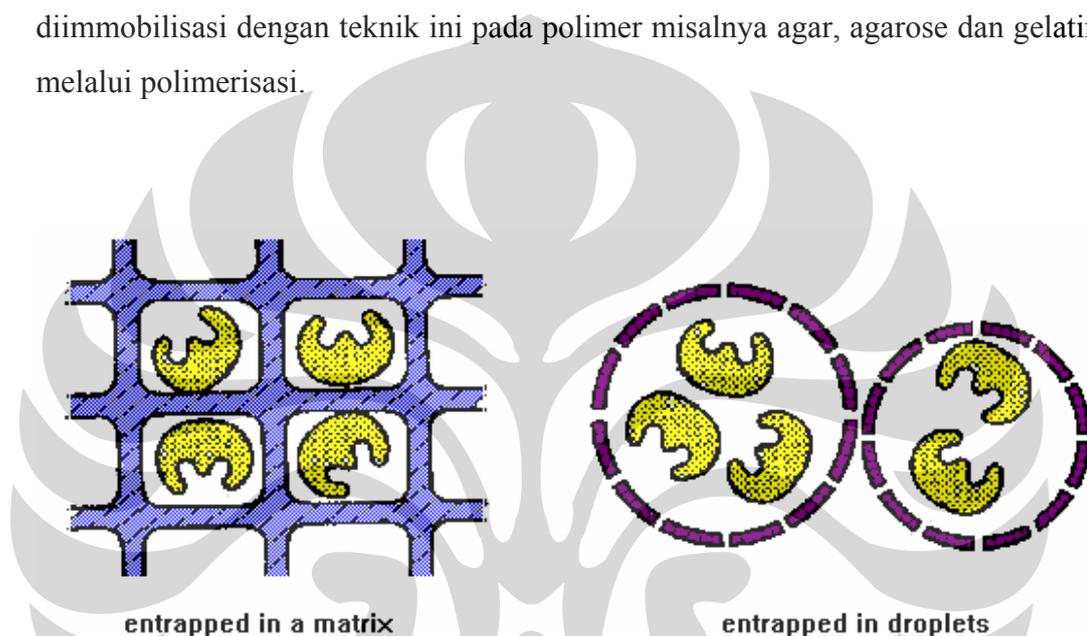
Sumber: Prabu, 2007

2.9.1.1. Entrapment

Immobilisasi enzim dengan metode entrapment mengacu pada immobilisasi menggunakan suatu matriks yang memiliki porositas. Entrapment terjadi ketika molekul enzim tidak dapat terlepas dari matriks support karena molekul support memiliki jari-jari efektif lebih besar dari molekul enzim. Hal ini menyebabkan reaksi antar reaktan serta produk dapat berdifusi keluar-masuk dengan bebas. Enzim tidak berinteraksi dengan support secara langsung sehingga enzim yang terimmobilisasi aktivitasnya tidak berubah. Enzim yang terperangkap ini dapat memperoleh kestabilan karena pergerakan enzim tertahan oleh matriks support. Metode ini juga membuat enzim stabil terhadap suhu, pH dan peracunan

kimia. Kekurangan dari metode ini adalah aktivitas enzim yang terimmobilisasi lebih kecil dari free enzim (Kaar, 2001).

Metode immobilisasi ini telah banyak digunakan untuk immobilisasi sel, tetapi tidak banyak digunakan untuk immobilisasi enzim. Hambatan untuk immobilisasi enzim dengan teknik ini adalah adanya kemungkinan terjadi kebocoran ketika digunakan untuk proses kontinyu jika ditinjau dari kecilnya ukuran molekul jika dibandingkan dengan sel (Goel, 1994). Biokatalis diimmobilisasi dengan teknik ini pada polimer misalnya agar, agarose dan gelatin melalui polimerisasi.



Gambar 2.24. Metode Entrapment

Sumber: <http://www.rpi.edu>

Polimer sintesis yang dapat digunakan untuk media salah satunya yaitu polyacrylamide. Polyacrylamide baik digunakan pada pengolahan limbah, tetapi tidak dapat digunakan pada industri makanan karena beracun.

Tabel 2.8. Contoh Immobilisasi Enzim

Enzim	Sumber	Teknik/support
I Invertase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Entrapment/polyacrylamide,alginate
Invertase	<i>S. cerevisiae</i>	Adhesion to cotton threads,woll
Invertase	<i>S. marxianus</i>	Entrapment/gelatine
catalase	<i>S.cerevisiae</i>	Entrapment/ polyacrylamide

2.8.(Sambungan)

catalase	<i>Trigonopsis variabilis</i>	Entrapment/ polyacrylamide
D-amino acid oxidase	<i>T.variabilis</i>	Entrapment/ polyacrylamide
Alcohol dehydrogenase	<i>S. cerevisiae</i>	Entrapment/ polyacrylamide
Penicillin acylase	<i>Escherichia coli</i>	Entrapment/ polyacrylamide
Urease	<i>Ureolytic cells</i>	Adhesion to cotton threads
L-Histidine ammonia lyase	<i>Achromobacter iquidium</i>	Entrapment/ polyacrylamide
Fumarase	<i>Liver mitochondria</i>	Entrapment/ polyacrylamide
Fumarase	<i>Brevibacterium flafus</i>	Entrapment/carrageenan
Aspartase	<i>E.Coli</i>	Entrapment

Sumber: Souza, 1997

2.9.1.2. Covalent binding

Metode covalent binding merupakan metode immobilisasi yang dilakukan dengan reaksi dari gugus fungsional enzim dengan support padat (Kaar, 2001). Teknik immobilisasi ini telah banyak digunakan untuk immobilisasi enzim, tetapi teknik ini tidak baik apabila digunakan untuk immobilisasi sel. Enzim dihubungkan secara kovalen pada support yang berupa gugus fungsi pada enzim dengan support amino, karboksil dan golongan fenol dari tirosin. Immobilisasi ini akan lebih baik dengan adanya substrat atau inhibitor kompetitif untuk melindungi sisi aktif (Goel, 1994).



Gambar 2.25.Covalent Binding

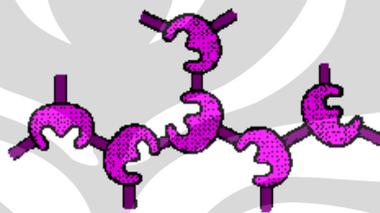
Sumber: Kaar, 2001

Enzim glucose oxidase, peroxidase dan invertase telah dapat diimmobilisasi dengan teknik ini. Enzim yang diimmobilisasi dengan teknik ini telah digunakan di dunia industri dengan support anorganik (Souza, 1998).

Apabila dibandingkan dengan metode entrapment dan metode adsorpsi, metode ini lebih mempunyai kestabilan terhadap perubahan suhu (Kaar, 2001).

2.9.1.3. Cross-linking

Enzim atau sel di-cross-linked dengan adanya sebuah protein inert seperti gelatine, albumin, and kolagen. Penelitian terbaru ini telah menggunakan putih telur ayam mentah sebagai cara yang paling ekonomis, banyak tersedia, dan mempunyai banyak kandungan protein yang dapat digunakan untuk immobilisasi enzim dalam bentuk butiran.



Gambar 2.26. Cross-Linking

Sumber: <http://www.rpi.edu>

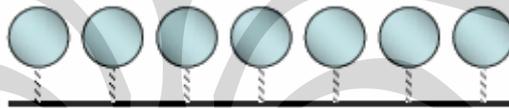
Keunikan dari bahan support ini adalah besarnya konsentrasi lysozyme alami yang terkandung dalam putih telur ayam mentah yang dapat digunakan sebagai bahan pra-immobilisasi, jadi dengan menambahkan bakteri kedalam support, adsorpsi yang diikuti dengan cross-linking dapat digunakan sebagai immobilisasi enzim. Teknik cross-linking adalah dengan adanya protein inert yang dapat di aplikasikan pada enzim atau sel lainnya (Souza, 1998). Teknik immobilisasi jenis ini mahal dan aktivitas enzim rendah karena beberapa material protein bertindak sebagai support (*Enzyme*, 2007)

2.9.1.4. Adsorpsi

Enzim yang diimmobilisasi dengan metode adsorpsi adalah dengan mengikatkan molekul enzim pada suatu support melalui interaksi ionik, non kovalen atau afinitas. Immobilisasi adsorpsi secara fisis dilakukan melalui salah satu atau kombinasi dari ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik atau gaya Van der Walls. Adsorpsi dengan interaksi afinitas mampu memberikan hasil yang lebih

baik dari pada adsorpsi dengan cara yang lain. Metode ini lebih sederhana jika dibandingkan dengan metode immobilisasi yang lain serta tidak melibatkan zat kimia yang kompleks. Metode adsorpsi, seperti halnya metode entrapment mampu meningkatkan ketegaran struktur terlebih ketika terdapat interkasi ganda antara enzim dan support. Apabila dibandingkan dengan metode yang lain, metode ini juga memiliki interaksi yang lemah antara enzim dengan supportnya. Perubahan pH dan kekuatan ionik dapat menyebabkan enzim ter-leaching (Kaar, 2001).

Immobilisasi enzim melalui interaksi hidrofobik sangatlah menjanjikan. Salah satu yang paling penting dan berarti dari metode ini adalah tidak seperti metode ikatan ion umumnya, interaksi hidrofobik distabilkan dengan konsentrasi ion yang tinggi. Ini memungkinkan untuk penggunaan substrat berkonsentrasi tinggi yang diinginkan oleh proses industri tanpa adanya desorpsi (Goel, 1994).



Gambar 2.27. Immobilisasi Metode Adsorpsi

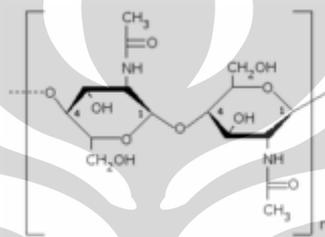
Sumber: Kaar, 2001

Manfaat dari immobilisasi ini yaitu murah, mudah dilakukan sedangkan kekurangannya yaitu enzim yang diimmobilisasi dapat terdesorpsi karena perubahan temperatur, pH dan kekuatan ionik (Deng et al., 2004). Teknik immobilisasi dengan metode adsorpsi sudah banyak sekali dilakukan diantaranya lipase *Candida rugosa* yang diimmobilisasi pada support hidrofobik sebagai katalis reaksi esterifikasi gliserol dan asam lemak untuk sintesis gliserida. Metode yang digunakan adalah immobilisasi lipase *Candida rugosa* pada support polypropylene hollow fiber membrane (Deng et al., 2004). Immobilisasi lipase jenis *Bacillus thermocatenuatus* juga pernah dilakukan pada support hidrophobik (Palomo et al., 2004). Gomez et al. (2003) mencoba untuk membandingkan pengaruh suhu terhadap reaksi esterifikasi dengan katalis lipase *Candida rugosa* yang *free* dengan lipase yang diimmobilisasi pada kitin. Penelitian tersebut

menyimpulkan bahwa reaksi untuk lipase yang free mempunyai suhu optimum sebesar 37°C dan suhu optimum untuk lipase yang diimmobilisasi sebesar 45 °C. Hal ini menunjukkan bahwa lipase yang diimmobilisasi lebih stabil.

2.10 Kitin

Kitin merupakan sebuah homopolimer dari N-asetilglukosamin ($C_8H_{13}O_5N$)_n yang berasal dari berbagai sumber dan secara komersial diperoleh dari limbah industri perikanan.



Gambar 2.28. Struktur Kimia Kitin

Sumber: www.wikipedia.org

Kitin merupakan polimer alami yang dapat terurai ketika dikatalisis oleh enzim yang disebut chitinase. Enzim ini merupakan hasil sekresi dari mikroorganisme seperti bakteri dan jamur dan dapat juga diproduksi oleh beberapa jenis tanaman (*Chitin*, 2007).

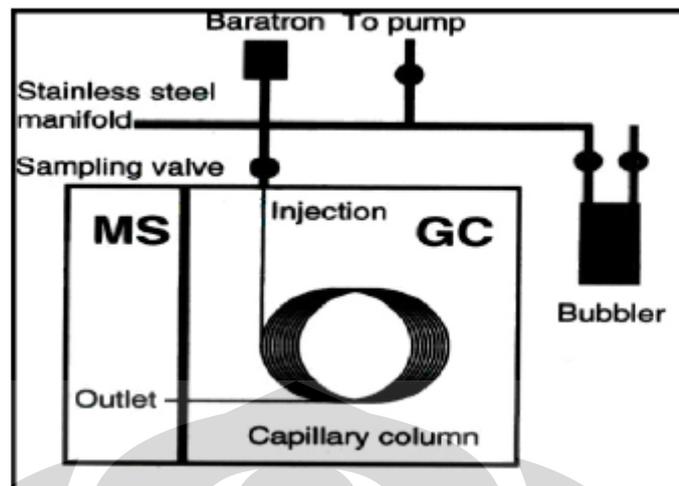
Kitin sesuai untuk digunakan sebagai support untuk immobilisasi pada industri makanan karena sifatnya yang *food grade* (tidak beracun), mudah dipakai, tersedia dalam berbagai bentuk (bubuk, gel, serat dan membran), mempunyai affinitas protein yang tinggi, dan mudah untuk dibentuk. Telah dilaporkan bahwa setiap lima gugus amino dari enam molekul kitin dalam bentuk gugus asetil. Keberadaan gugus amino pada molekul kitin menyediakan daerah yang mampu mengikat protein. Hal ini membuat daerah tersebut digunakan sebagai matriks untuk tempat immobilisasi beberapa enzim yang sangat menarik dari sudut pandang teknis maupun sudut pandang ekonomis. Sebagai contohnya enzim glukamilase yang diimmobilisasi secara kovalen pada kitin (24-60 mesh) dan

menghasilkan enzim yang mempunyai aktivitas lebih baik dari immobilisasi yang dilakukan pada support yang lain (Gomez et al. ,2003)

2.11 Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS)

Gas Chromatography/Mass Spectrometry merupakan alat analisis yang merupakan kombinasi dari kromatografi gas untuk proses pemisahan komponen dan spektrometri massa untuk mendeteksi dan mengidentifikasi komponen dari sampel yang diinjeksikan. Penggunaan GC/MS untuk analisis kualitatif dan kuantitatif telah ini dikembangkan sejak 1960-an. Pada mulanya penggunaannya masih terbatas untuk kepentingan laboratorium tetapi setelah terintegrasi dengan teknologi komputer, GC/MS saat ini telah dapat disederhanakan pengoperasian instrumennya dan waktu analisis dapat lebih cepat (Hites, 1995).

Penggunaan alat analisis ini tidak hanya terbatas pada deteksi obat-obatan, analisis lingkungan, investigasi ledakan, tetapi dapat juga digunakan di bandara guna mendeteksi barang maupun manusia. Metode analisis dilakukan dengan membandingkan konsentrasi massa atom dari spektrum yang dihasilkan. Terdapat dua macam analisis yang mungkin dilakukan, analisis spektrum perbandingan dan analisis spektrum *original*. Analisis perbandingan membutuhkan perbandingan spektrum hasil dan spektrum literatur untuk melihat kemiripan karakteristik hasil dengan literatur. Analisis *original* menghasilkan puncak dominan yang menandakan total massa dari senyawa yang tidak diketahui. Nilainya dapat digunakan untuk menentukan rumus kimia berbagai macam unsur yang diasumsikan muncul pada senyawa. Pola isotop pada spektrum, dimana tiap unsur memiliki beberapa isotop yang spesifik, dapat digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan berbagai unsur tersebut. Bila rumus kimia sudah sesuai dengan spektrum, maka struktur molekul dan tipe ikatan bisa diidentifikasi. Skema Alat GC/MS dapat dilihat pada gambar 2.29.



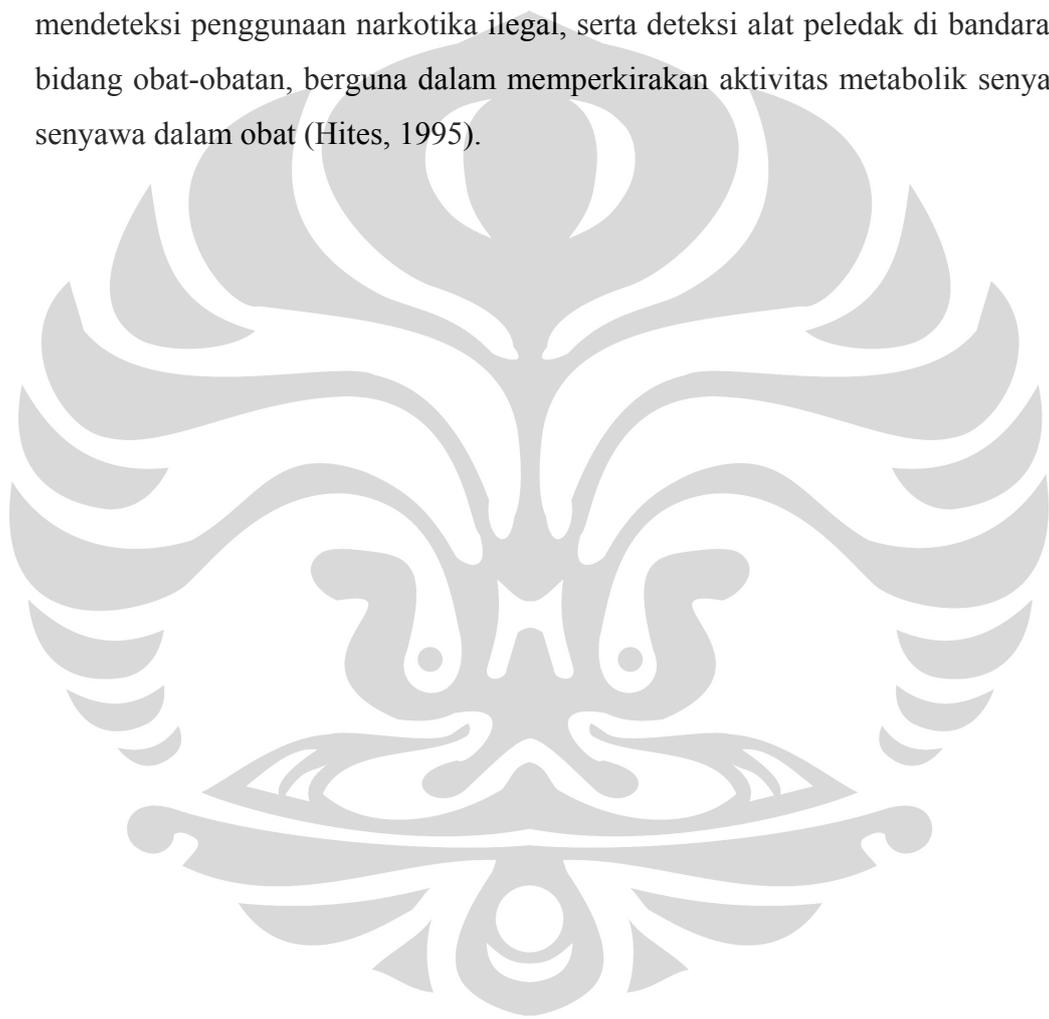
Gambar 2.29. Skema Alat GC/MS

Sumber: Hites, 1995

Prinsip kerja GC/MS dimulai dari senyawa sampel yang akan ditembak oleh arus elektron dan menyebabkan senyawa terpisah menjadi fragmen. Fragmen ini dapat lebih besar atau lebih kecil dari molekul aslinya. Fragmen sebenarnya adalah muatan ion dengan massa tertentu. Massa fragmen jika dibagi muatan disebut perbandingan massa per muatan (M/Z). M/Z biasanya mewakili berat molekul fragmen. Empat elektromagnet (quadropole) akan memfokuskan fragmen melewati celah menuju detektor. Quadropole diprogram oleh komputer untuk hanya mengarahkan fragmen M/Z tertentu yang melewati celah. Sisanya akan terpental menjauh. Komputer memiliki siklus quadropole untuk M/Z berbeda hingga semua daerah M/Z telah terdeteksi. Siklus ini berlangsung berkali-kali per detik. Setiap siklus disebut *scan*. Komputer merekam grafik pada setiap *scan*. Sumbu x mewakili rasio perbandingan M/Z . Sumbu y mewakili intensitas sinyal untuk setiap fragmen terdeteksi selama *scan*. Grafik ini disebut spektrum massa. Spektrum massa yang dihasilkan oleh senyawa kimia biasanya sama untuk setiap waktu. Oleh karena itu, spektrum massa sangat penting untuk mengidentifikasi senyawa. Komputer GC-MS memiliki literatur spektrum yang bisa digunakan untuk mengidentifikasi senyawa kimia yang tidak diketahui. Literatur akan membandingkan spektrum massa dari komponen sampel dan membandingkan

dengan spektrum massa dari literatur. Hasilnya berupa identifikasi bersama dengan probabilitas kemiripan secara statistik (Hites, 1995).

Aplikasi pemanfaatan GC/MS antara lain, dapat melacak polutan organik di lingkungan walaupun masih kurang sensitif terhadap pestisida dan herbisida. Dalam bidang forensik dan kriminal, GC/MS dapat digunakan untuk menganalisis partikel dari tubuh manusia sehingga dapat membantu menghubungkan antara tindak kriminal dan pelaku kejahatan. GC/MS juga dapat dimanfaatkan untuk mendeteksi penggunaan narkoba ilegal, serta deteksi alat peledak di bandara. Di bidang obat-obatan, berguna dalam memperkirakan aktivitas metabolik senyawa-senyawa dalam obat (Hites, 1995).

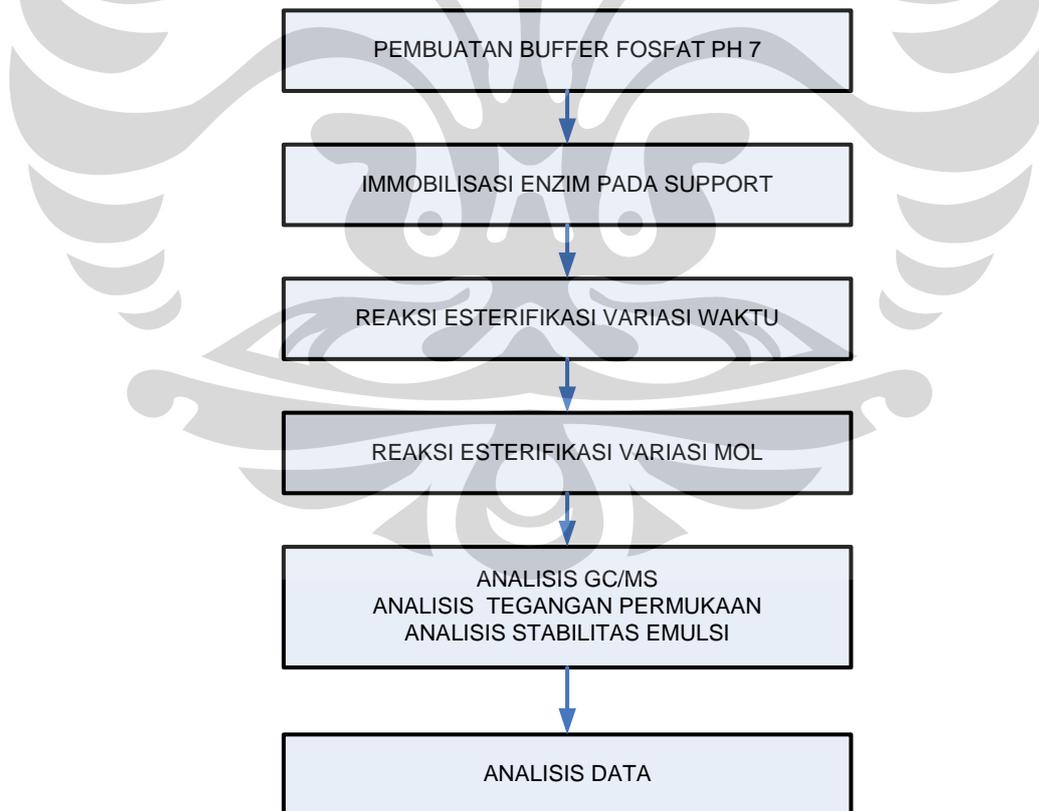


BAB 3

METODE PENELITIAN

Secara umum, penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan yaitu tahap preparasi alat dan bahan penelitian, immobilisasi enzim, reaksi esterifikasi pada reaktor tumpak, analisis menggunakan GC/MS, tegangan permukaan, uji stabilitas dan analisa data. Sebagian besar penelitian (termasuk analisis tegangan permukaan dan uji stabilitas emulsi) dilakukan di Laboratorium Dasar Proses Kimia (DPK), Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia. Analisis sampel dengan GC/MS dilakukan di Laboratorium Forensik Mabes POLRI.

Alur pembuatan produk digliserida dari gliserol dan asam laurat ditunjukkan pada bagan di bawah ini,



Gambar 30. Alur Penelitian untuk Mendapatkan Kondisi Optimum dalam Reaksi Esterifikasi-Enzimatis

3.1 Variabel Penelitian

- Variabel tetap atau kondisi operasi yang tidak berubah dalam penelitian ini ialah : pH, suhu, tekanan.
- Variabel bebas atau kondisi operasi yang diubah pada penelitian ini adalah waktu reaksi, perbandingan mol gliserol dan asam laurat.
- Variabel terikat atau parameter yang akan diamati sebagai hasil dari penelitian dalam penelitian ini adalah, konsentrasi dilaurin yang dihasilkan dari reaksi esterifikasi-enzimatis gliserol dengan asam laurat dan katalis lipase.

3.2 Alat dan Bahan

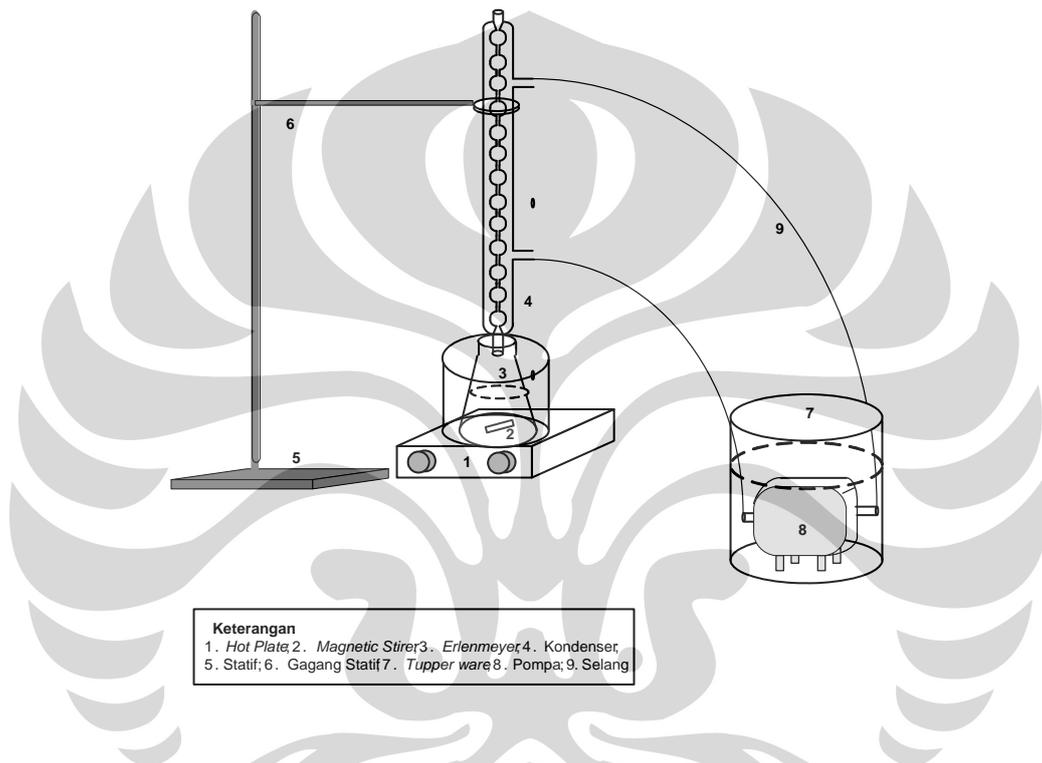
3.2.1 Alat Percobaan

Alat-alat yang digunakan adalah:

1. GC/MS yang digunakan sebagai alat untuk menganalisa sampel.
2. Termometer digunakan untuk memastikan suhu pada reaksi yang sedang dilakukan.
3. Stop watch digunakan untuk pengukur waktu dalam pengambilan sampel.
4. *Magnetic stirrer* sebagai alat pengaduk pada reaksi esterifikasi-enzimatis.
5. Hot plate sebagai alat pemanas untuk memberikan sumber panas bagi reaksi yang terjadi didalam labu erlenmeyer dan didalamnya terdapat magnet yang dapat memutar *magnetic stirrer*.
6. Kondenser digunakan untuk mendinginkan bagian atas reaktor.
7. Labu erlenmeyer 250 ml sebagai tempat reaksi.
8. Labu erlenmeyer 50 ml sebagai tempat immobilisasi enzim.
9. Beaker glass sebagai tempat bahan penelitian.
10. Kertas saring untuk memisahkan enzim terimmobilisasi dengan buffer
11. Pompa air yang digunakan untuk memompa air yang akan dialirkan kedalam kondenser untuk proses pendinginan.
12. Selang air digunakan untuk mengalirkan air yang akan melalui kondenser

13. pH meter digunakan untuk mengukur pH.
14. Gelas ukur untuk mengukur volume bahan yang dibutuhkan.

Berikut ini merupakan rangkaian alat untuk reaksi esterifikasi-enzimatis gliserol dan asam laurat.



Gambar 3.2..Skema Reaksi Esterifikasi-Enzimatis

3.2.1 Bahan Percobaan

Bahan-bahan yang digunakan adalah:

1. Gliserol
2. Asam laurat
3. n-Heksana
4. *Rhizomucor miehei* lipase
5. KH_2PO_4
6. K_2HPO_4
7. Support Chitin

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Tahap Pembuatan Buffer Fosfat 0,1 M pH 7

1. Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan. Yaitu K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , aquades, pengukur pH, gelas ukur dan *beaker glass*.
2. Membuat larutan 0,1 M K_2HPO_4 dan 1 M KH_2PO_4 , masing-masing 500 ml.
3. Mengukur pH larutan 0,1 M K_2HPO_4 dan 1 M KH_2PO_4 .
4. Mengambil sedikit larutan K_2HPO_4 , yaitu 200 ml. Kemudian dilakukan penambahan setiap ml KH_2PO_4 dengan selalu memeriksa pH larutan campuran yang merupakan buffer fosfat. Penambahan larutan KH_2PO_4 dihentikan ketika buffer fosfat telah mencapai pH 7.

3.3.2 Immobilisasi enzim lipase *Mucor meihei* pada support

1. Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan, yaitu labu erlenmayer 50 ml, *magnetic stirrer*, pro pipet, kertas saring, support kitin dan enzim lipase.
2. Menambahkan lipase sebanyak 7 mg ke dalam 4 ml buffer fosfat kemudian mengaduknya menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan putaran 250 rpm selama 30 menit.
3. Menambahkan 100 mg support chitin ke campuran enzim-buffer kemudian dishaker dengan kecepatan 90 rpm selama 4 jam pada suhu kamar.
4. Memisahkan support dengan penyaringan dan pencucian dengan buffer sebanyak dua kali.

3.3.3 Menentukan konsentrasi protein yang terimmobilisasi

Metode yang digunakan untuk menentukan konsentrasi protein yang terimmobilisasi adalah dengan menggunakan metode lowry.

Persiapan Bahan:

1. Membuat larutan Bovine Serum Albumin (BSA) dengan konsentrasi 1 mg/ml.

2. Membuat reagen untuk analisis:
 - a. Mencampurkan 50 ml larutan Natrium Karbonat 2% wt dengan 50 ml NaOH 0,1 N.
 - b. Mencampurkan 10 ml larutan CuSO₄ 1,56% wt dengan Natrium Potassium Tartarate 2,37% wt.
3. Mencampurkan 100 ml reagen A dengan 2 ml reagen B.
4. Menyiapkan reagen Folin – Ciocalteau 1 N.

Prosedur :

1. Membuat BSA dengan konsentrasi yang berbeda dengan melarutkan larutan BSA dengan. Volume dari setiap tabung reaksi adalah 5 ml. Konsentrasi BSA berkisar antara 0.05 sampai 1 mg/ ml.
2. Mengambil 0,2 ml dari setiap tabung ke tabung yang berbeda kemudian menambahkan 2ml reagen analisis.
3. Mengaduk campuran lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit.
4. Menambahkan 0,2 ml reagen Folin Ciocalteau 1N pada setiap tabung lalu diinkubasi selama 30 menit.
5. Mempersiapkan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600nm.
6. Memplot absorbansi dengan konsentrasi protein untuk mendapatkan kurva kalibrasi.
7. Mengecek absorbansi sampel dan menentukan konsentrasi sampel yang tidak diketahui menggunakan kurva kalibrasi.
8. Menghitung konsentrasi enzim yang terimmobilisasi dengan rumus:

$$C_E = C_0 - C_t$$

C_E = konsentrasi enzim terimmobilisasi

C_0 = konsentrasi enzim sebelum immobilisasi

C_t = Konsentrasi enzim setelah immobilisasi

9. Menghitung enzim loading (dalam persen) dengan rumus:

$$\% \text{ loading} = \frac{C_E}{C_0} \times 100\%$$

3.3.4 Reaksi esterifikasi-enzimatis variasi waktu

1. Mempersiapkan alat dan bahan yang diperlukan. Yaitu gliserol, asam laurat, enzim yang telah diimmobilisasi, buffer fosfat pH 7, n-heksana, labu erlenmayer 250 ml, kondenser, *magnetic stirrer*, dan hot plate.

2. Variasi yang akan dilakukan ialah variasi waktu reaksi 10 jam, 15 jam, 20 jam, 25 jam, dan 30 jam.
3. Memakai perbandingan mol gliserol dan asam laurat 1 : 3 dengan laju perputaran *magnetic stirrer* sebesar 250 rpm.
4. n-Heksana yang dipakai sebanyak 30 ml.
5. Buffer fosfat pH 7 yang dipakai sebanyak 6 tetes.
6. Melakukan reaksi esterifikasi-enzimatis, yaitu mereaksikan gliserol dan asam laurat dengan bantuan katalis lipase *Rhizomucor miehei* yang telah diimmobilisasi, pada pelarut organik heksana, dan dengan buffer fosfat pH 7. Reaksi dilakukan pada suhu 50⁰C, pada tekanan 1 atm.
7. Melakukan analisis GC/MS untuk menentukan waktu reaksi optimum dari produk dilaurin yang didapat.
8. Hasil waktu reaksi optimum digunakan untuk percobaan reaksi esterifikasi-enzimatis variasi mol.

3.3.5 Reaksi esterifikasi-enzimatis variasi mol

1. Mempersiapkan alat dan bahan yang diperlukan yaitu gliserol, asam laurat, enzim yang telah diimmobilisasi, buffer fosfat pH 7, n-heksana, labu erlenmayer 250 ml, kondenser, *magnetic stirrer*, dan hot plate.
2. Variasi yang akan dilakukan ialah variasi perbandingan mol gliserol dan asam laurat
3. Variasi perbandingan mol gliserol dan asam laurat adalah 1:3, 2:3, 3:3, 4:3, 5:3, 1:5, dan 1:7.
4. Waktu reaksi yang digunakan adalah waktu reaksi optimum yang diperoleh dari percobaan sebelumnya.
5. Laju perputaran *magnetic stirrer* sebesar 250 rpm.
6. n-Heksana yang dipakai sebanyak 30 ml.
7. Buffer fosfat pH 7 yang dipakai sebanyak 6 tetes.
8. Melakukan reaksi esterifikasi-enzimatis, yaitu mereaksikan gliserol dan asam laurat dengan bantuan katalis lipase *Rhizomucor miehei* yang telah diimmobilisasi, pada pelarut organik heksana, dan dengan buffer fosfat pH 7. Reaksi dilakukan pada suhu 50⁰C, pada tekanan 1 atm.

9. Melakukan analisis GC/MS untuk menentukan perbandingan mol optimum dari produk dilaurin yang didapat.
10. Hasil waktu reaksi optimum digunakan untuk percobaan reaksi esterifikasi-enzimatis variasi laju sirkulasi.

3.3.6 Pengukuran Tegangan Permukaan

1. Menyiapkan sampel dilaurin yang akan diukur tegangan permukaannya.
2. Sebelum melakukan pengukuran, cincin dan gelas tempat sampel harus dicuci terlebih dahulu. Pencucian yang dilakukan harus benar-benar bersih. Pencucian dapat dilakukan dengan menggunakan alkohol atau aseton, kemudian dipanaskan.
3. Masukkan campuran air dan sampel dilaurin kedalam gelas sampel. Jumlah sampel dilaurin yang dimasukkan ialah sebesar 15% dari berat air.
4. Aduk sesaat sebelum diukur tegangan permukaannya.
5. Menurunkan *cross staff* dengan memutar *handwheel*, lalu masukkan gelas yang telah berisi sampel kedalamnya .
6. Menyalakan KRUSS. Atur *light pointer* KRUSS pada kondisi 0. Periksa posisi garis di layar berada tepat di tengah garis.
7. Naikkan lagi gelas yang telah berisi cairan dengan memutar *handwheel* sampai cincin masuk seluruhnya kedalam cairan.
8. Melakukan pengukuran tegangan permukaan cairan dengan memutar *circuit division*.
9. Apabila posisi *light pointer*-nya berada pada posisi maksimal, maka posisinya diukur lagi dengan memutar micrometer *screw tensionmeter* hingga posisi *light pointer* kembali ke posisi tengah (semula).
10. Mencatat nilai tegangan permukaannya.

3.3.7 Tahap Uji Stabilitas Emulsi

Uji stabilitas emulsi dilakukan dengan variasi persen berat sampel dilaurin (*agen pengemulsi*) yang ditambahkan. Uji emulsi ini dilakukan dengan

sistem w/o (*water in oil*). Dengan metode ini dapat diketahui apakah produk yang didapatkan dapat berfungsi sebagai emulsi. Prosedur yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Mencampurkan minyak dan air dengan perbandingan berat 1:5. Campuran tersebut ditambahkan sampel (yang akan diuji sebagai emulsi) sebanyak 15% berat.
2. Mengocok selama beberapa saat hingga minyak-air terlihat menyatu.
3. Mencatat waktu yang diperlukan oleh sistem minyak-air tersebut untuk kembali terdispersi.

3.3.8 Analisis data

Untuk mengetahui % yield dilaurin yang dihasilkan maka sampel di analisis menggunakan GC/MS (Gas Chromatography/Mass Spectrometry). Penggunaan GC/MS didasari oleh sifat fasa sampel yang berbentuk cair. Pengujian analisis sampel menggunakan GC/MS yang dilakukan di Puslabfor (Pusat Laboratorium Forensik) Mabes POLRI. Spesifikasi alatnya adalah sebagai berikut:

Tabel 3.2. Spesifikasi Alat GC/MS

Vendor	Agilent Technologies
Diameter kolom	0,25 mm
Panjang kolom	30 mm
Ketebalan lapisan	0,25 mikro meter
Bahan Kolom	Metil Polixyloxan
Eluen	Helium
Oven Temperature	290 ⁰ C

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi operasi optimum yang diperlukan dalam reaksi esterifikasi-enzimatis untuk menghasilkan produk *emulsifier* (1,2 dilaurin). Kondisi optimum yang diteliti adalah waktu reaksi dan perbandingan mol gliserol dan asam laurat. Reaksi esterifikasi-enzimatis ini menggunakan enzim lipase *Mucor miehei* yang diimmobilisasi dengan metode adsorpsi pada support kitin.

Pada tahap awal dilakukan persiapan alat dan bahan. Reaktor yang digunakan untuk reaksi adalah reaktor tumpak. Reaktor tumpak yang digunakan pada penelitian ini berupa labu erlenmayer 250 ml yang dilengkapi dengan kondenser, hotplate dan *magnetic stirrer*. Kondenser digunakan berfungsi untuk *me-refluks* pelarut karena pelarut yang digunakan berupa n-heksana yang mudah menguap. Labu erlenmayer ditempatkan pada beaker glass yang berisi air yang berfungsi sebagai water bath supaya kalor yang diterima oleh labu erlenmayer bisa lebih seragam dan suhu lebih stabil. Suhu reaksi yang digunakan adalah 50°C, hal ini sesuai dengan suhu optimum reaksi esterifikasi-enzimatis dengan katalis Lipase *Mucor miehei* yang diperoleh oleh Watanabe et al. yaitu 50°C. Untuk lebih mengoptimalkan kinerja katalis dan mempercepat terjadinya reaksi antara gliserol dan asam laurat, maka digunakan *magnetic stirrer*. Pengadukan akan semakin meningkatkan konsentrasi produk yang terbentuk pada saat lajunya 150-450 rpm (Kim & Lee, 2006). Pada penelitian ini digunakan laju pengadukan 250 rpm. Reaktor tumpak ini digunakan untuk reaksi esterifikasi-enzimatis variasi waktu dan variasi mol.

Reaksi esterifikasi gliserol dengan asam laurat ini dilakukan pada sistem dua fasa yaitu fasa organik (nonpolar) yang berupa asam laurat dan n-heksana sedangkan fasa aqueous (polar) yang terdiri dari gliserol dan buffer fosfat. Selain menggunakan n-heksana, reaksi esterifikasi dapat juga menggunakan pelarut organik dengan kandungan air yang rendah yaitu dietil eter, tersier Butil

Metoksida (Berger, Laumen & Schneider, 1992). Heksana merupakan pelarut organik yang mampu melarutkan asam laurat serta memiliki volatilitas tinggi dan titik didih yang rendah yaitu 68°C. Dengan volatilitasnya yang tinggi serta suhu reaksi yang mendekati titik didihnya, maka diperlukan kondenser untuk *refluks* heksana tersebut. Pemilihan heksana sebagai pelarut selain karena heksana merupakan pelarut yang paling banyak digunakan untuk esterifikasi menggunakan enzim lipase juga karena dengan adanya pelarut organik ini reaksi dapat berjalan sempurna pada kondisi *microaqueous*. Reaksi esterifikasi menggunakan pelarut heksana ternyata mampu membuat stabilitas serta aktivitas enzim lebih tinggi, yaitu 92,86% jika dibandingkan dengan benzena dan kloroform yang masing-masing aktivitasnya hanya 47% dan 32% (Monteiro, 2003).

Biokatalis Lipase merupakan biokatalis yang sudah banyak digunakan untuk reaksi esterifikasi karena berbagai keunggulan. Enzim ini dapat berfungsi baik pada pH 6,5-7 (Kristensen, Xu & Mu, 2005). Pada penelitian digunakan buffer fosfat pH 7 untuk mengoptimalkan kerja katalis dan pembuatan buffer fosfat 0.1 M pH 7 dilakukan dengan mencampurkan larutan KH_2PO_4 0,1 M dan K_2HPO_4 0,1 M.

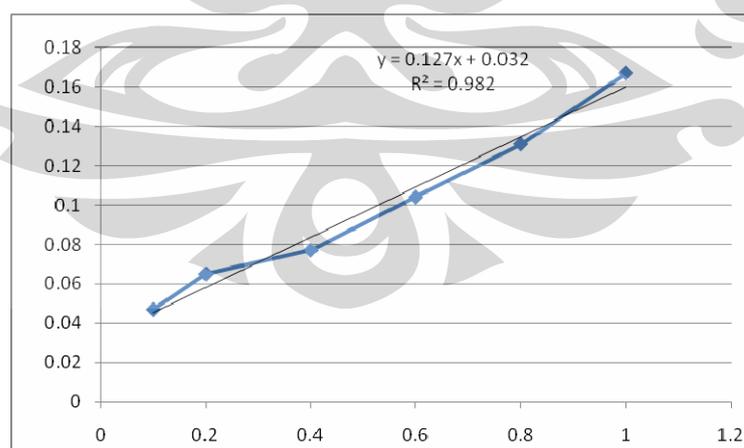
Immobilisasi enzim dilakukan sesuai dengan prosedur immobilisasi yang dilakukan mirip dengan metode yang dilakukan oleh Vaidya, Gera & Ramakrishna (2008) dengan sedikit modifikasi. Pada mulanya enzim dan support dicampurkan kemudian diaduk selama 30 menit. Setelah pengadukan selesai, larutan enzim ditambahkan support kitin yang kemudian di shaker selama 4 jam pada suhu ruang dengan kecepatan 90 rpm. Filtrasi dilakukan untuk memisahkan enzim yang terimmobilisasi pada support dengan kertas saring. Support kitin dipilih karena merupakan support yang berasal dari bahan alami sehingga tidak beracun, mudah digunakan, memiliki afinitas protein yang tinggi (Gomez, et al, 2003) serta sudah terbukti dapat digunakan sebagai support immobilisasi lipase. Immobilisasi enzim dilakukan dengan tujuan supaya enzim lebih stabil.

Metode yang digunakan untuk menentukan konsentrasi protein yang terimmobilisasi dilakukan dengan metode lowry menggunakan BSA sebagai protein standar. Metode untuk menghitung enzim yang terimmobilisasi melalui pengukuran kandungan protein sebelum dan sesudah immobilisasi dengan metode

BSA (Vaidya, Gera & Ramakrishna, 2008). Metode ini berdasarkan pada reaksi antara protein dengan folin yang menyebabkan perubahan fisis pada larutan. Perubahan fisis ini berupa perubahan larutan dari bening menjadi berwarna biru. Semakin banyak kadar protein di dalam larutan maka warna biru yang dihasilkan akan semakin pekat.

Pada mulanya prosedur dilakukan dengan mengukur absorbansi dari sampel protein (Bovine Serum Albumin) karena kandungan proteinnya mendekati murni. Konsentrasi BSA divariasikan dari 0,1-1mg/ml untuk mendapatkan kurva standar. Sample BSA dicampurkan kedalam larutan *lowry reagent* kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Campuran tersebut selanjutnya ditambahkan reagen Folin dan dibiarkan dalam suhu ruang selama 30 menit sebelum diukur absorbansinya agar reaksi berjalan hingga maksimal

Pada gambar terlihat bahwa kurva kalibrasi merupakan persamaan garis linear $y = 0,127x + 0,032$. Sumbu y merupakan absorbansi sedangkan sumbu x merupakan konsentrasi protein. Pengukuran enzim yang teimmobilisasi pada kitin dilakukan sebanyak tiga kali selanjutnya diperoleh konsentrasi lipase rata-rata adalah 1,953 mg/ml. Setelah dilakukan immobilisasi diperoleh konsentrasi lipase yang terimmobilisasi yaitu 0, 827 mg/ml.



Gambar 4.1. Kurva Kalibrasi Standar Protein

Kitin merupakan senyawa organik yang terdiri dari ikatan antara monomernya yang terangkai dengan glukosida pada posisi $\beta(1-4)$. Gugus

hidroksil yang terikat pada atom karbon nomor dua adalah gugus asetamina (-NHCOCH₃) sehingga kitin menjadi sebuah polimer berunit N-Asetil glukosamin. Lipase yang terlarut dalam buffer akan teradsorpsi pada pori kitin seiring dengan teradsorpsinya molekul air pada kitin. Enzim loading dapat dihitung sebagai berikut:

$$\text{Enzim loading (\%)} = \frac{C_e}{C_o} \times 100\% = \frac{0,827}{1,953} \times 100\% = 42,34\%$$

4.1 Pengaruh Waktu dalam Reaksi Esterifikasi-Enzimatis Gliserol dan Asam Laurat

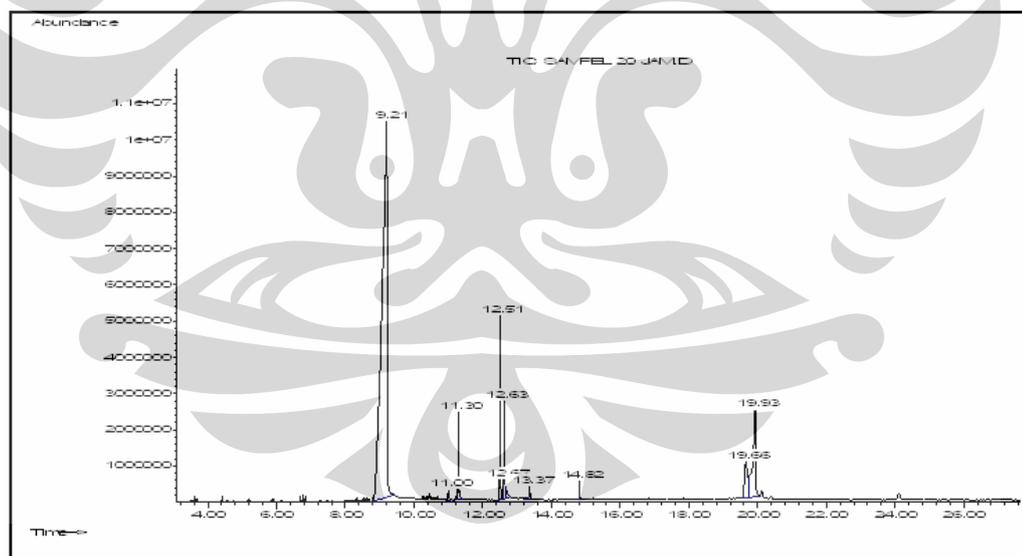
Penelitian tentang pengaruh waktu reaksi esterifikasi-enzimatis antara gliserol dan asam laurat bertujuan untuk mendapatkan variasi waktu reaksi optimum. Reaksi ini dilakukan di reaktor tumpak dengan suhu reaksi sebesar 50°C. Suhu ini merupakan suhu optimum reaksi esterifikasi menggunakan katalis lipase *Mucor meihei* (Watanabe et al., 2003). Suhu merupakan salah satu faktor penting dalam setiap reaksi khususnya bagi reaksi enzimatik karena suhu reaksi dibatasi oleh suhu deaktivasi enzim. Secara umum enzim akan mengalami deaktivasi ketika reaksi dilakukan pada suhu yang lebih tinggi dari 60°C. Suhu yang terlalu rendah juga kurang menguntungkan karena laju reaksinya akan rendah. Hal tersebut disebabkan karena reaksi kurang mendapatkan tambahan energi untuk mencapai energi aktivasinya.

Derajat keasaman juga memegang peranan penting dalam reaksi esterifikasi-enzimatis. Kondisi pH yang jauh dari optimum dapat menyebabkan struktur enzim rusak sehingga kehilangan kemampuan untuk mengkatalisis reaksi. Ketika kondisi pH yang lebih tinggi dari pH optimum akan menyebabkan inaktivasi enzim, karena terjadi kerusakan struktur protein enzim. Derajat keasaman yang terlalu rendah mengakibatkan ion H⁺ akan berikatan dengan -NH₂ membentuk -NH₃⁺. Proses pengikatan tersebut menyebabkan ikatan hidrogen antara atom nitrogen dengan atom hidrogen terputus, sehingga enzim terdenaturasi. Kondisi pH yang tinggi mengakibatkan ion OH⁻ berikatan dengan atom hidrogen dari gugus COOH enzim membentuk H₂O. Hal tersebut mengakibatkan rusaknya ikatan antara atom hidrogen dengan nitrogen atau

oksigen, sehingga struktur enzim mengalami kerusakan (Pandey, Benjamin, Soccol, Nigam, Krieger & Soccol, 1999).

Variasi yang dilakukan sebanyak lima variasi waktu reaksi yaitu 10 jam, 15 jam, 20 jam, 25 jam, dan 30 jam. Perbandingan mol gliserol dan asam lauran yang digunakan adalah 1:3 dan laju pengadukan sebesar 250 rpm. Untuk mengetahui kandungan 1,2 dilaurin pada sampel maka sampel dianalisis menggunakan GC/MS di Puslabfor Mabas Polri.

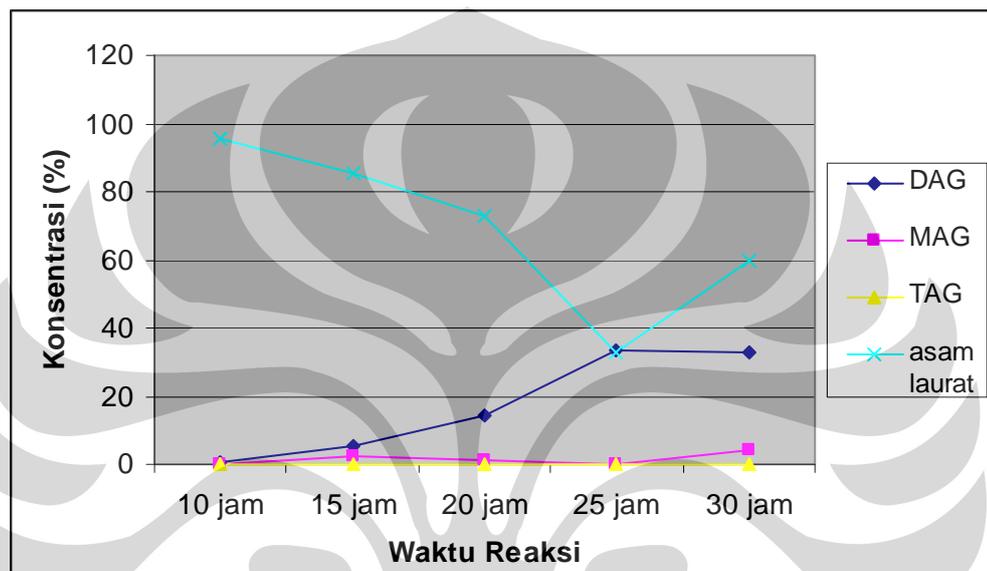
Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Yu-Chih Yeh (1998) dikatakan bahwa pada waktu reaksi esterifikasi diatas 6 jam dapat menghasilkan produk dilaurin yang cukup besar. Sebagai contoh hasil analisis sampel adalah pada reaksi dengan variasi waktu 20 jam. Pada gambar 4.2 terlihat peak 19,89 menit yang menandakan terdapat 1,2 dilaurin yang mempunyai konsentrasi 14,6%. Pada peak 11,00 menit menandakan terdapat 1-monolaurin dengan konsentrasi 0,28%.



Gambar 4.2. Peak Chromatogram Sampel Dilaurin t=25 jam

Pada gambar 4.3 merupakan hasil reaksi esterifikasi-enzimatis antara gliserol dan asam laurat dengan katalis lipase untuk menghasilkan produk 1,2 dilaurin. Terlihat dalam grafik tersebut bahwa dari lama reaksi selama 10 jam hingga 25 jam konsentrasi 1,2 dilaurin terus mengalami peningkatan dari 0,48%

menjadi 33,23%. Setelah waktu reaksi lebih dari 25 jam ternyata konsentrasi digliserida menurun menjadi 32,86%. Hal ini diakibatkan dari semakin lama waktu reaksi yang diberikan maka reaksi akan semakin berlangsung sempurna hingga sampai pada titik maksimum dan kemudian untuk waktu yang lebih lama lagi akan terjadi reaksi lain (Rosu, 1999).

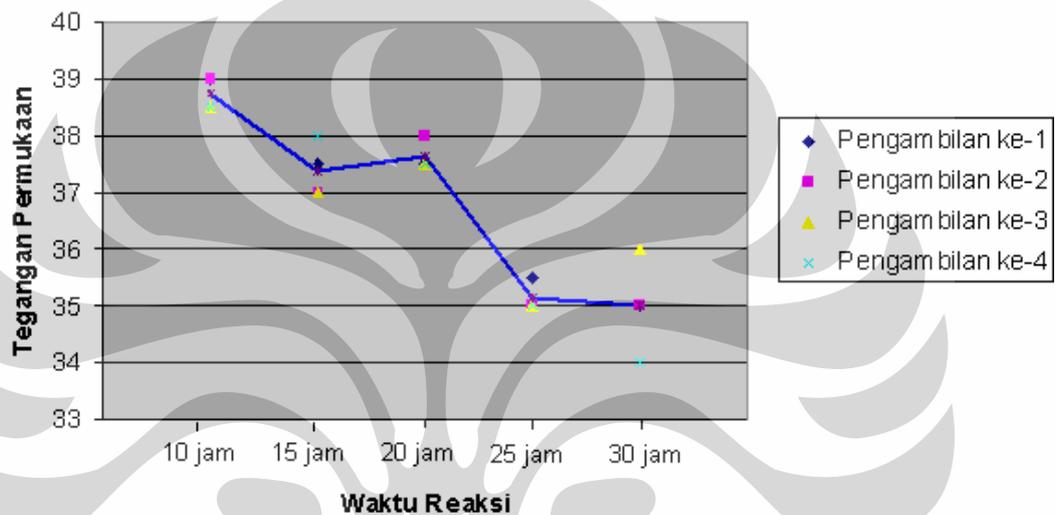


Gambar 4.3. Konsentrasi Sampel Variasi Waktu

Pada waktu reaksi 30 jam ternyata konsentrasi dilaurin menjadi 32,86%, hal ini kemungkinan disebabkan oleh mulai terdeaktivasinya enzim sehingga enzim sudah tidak maksimal lagi mengkatalis reaksi.

1,2 dilaurin merupakan suatu senyawa yang bersifat sebagai emulsifier sehingga perlu dilakukan pengujian untuk membuktikan kemampuan emulsifier tersebut dalam menurunkan tegangan permukaan. Tegangan permukaan air pada keadaan normal adalah 70 mN/m (Sibuea, 2003). Data tersebut sesuai dengan data hasil pengukuran yang dilakukan. Pengukuran tegangan permukaan dilakukan pada tiap sampel dilaurin yang telah didapatkan pada setiap tahap reaksi. Untuk mengurangi kesalahan yang mungkin terjadi, pengukuran tegangan permukaan pada setiap sampel dilakukan berulang kali sebanyak empat kali, dan data yang diambil ialah rata-rata dari keempat data tersebut. Percobaan dikatakan berhasil

jika penambahan sampel dilaurin dapat menurunkan tegangan permukaan air (Sibuea, 2003). Pengukuran tegangan permukaan dilakukan dengan alat pengukur tegangan permukaan. Campuran sampel dilaurin dimasukkan kedalam wadah silinder dengan jumlah sampel dilaurin sebesar 15% dari berat air. Jumlah minimum agen pengemulsi yang diberikan pada larutan sebesar 5% (Sibuea, 2003). Pada gambar 4.4 ditampilkan hasil pengujian tegangan permukaan untuk reaksi variasi waktu.

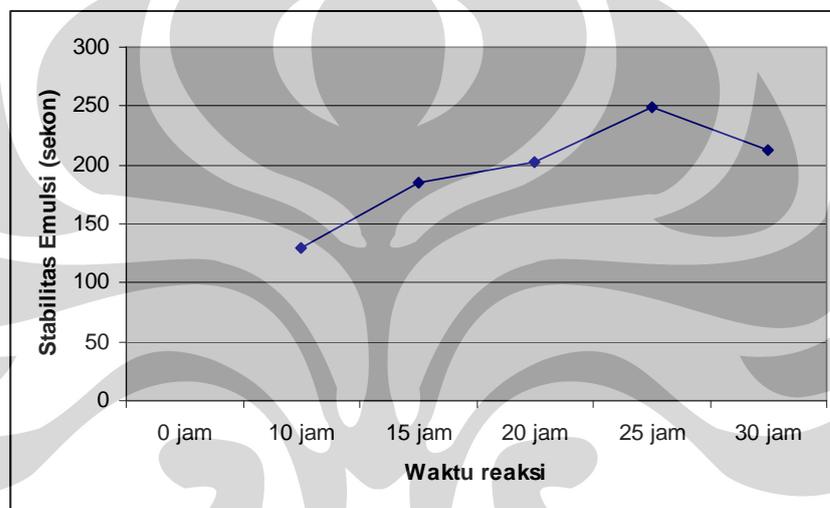


Gambar 4.4. Tegangan Permukaan Air: Variasi Waktu

Terlihat dalam grafik bahwa tegangan permukaan yang paling kecil diperoleh ketika waktu reaksi 30 jam yaitu sebesar 35 mN/m. Hasil pengamatan ini cukup berbeda dengan hasil yang dilakukan dengan metode GC/MS yang menghasilkan konsentrasi emulsifier paling besar pada waktu reaksi 25 jam. Hal ini kemungkinan disebabkan karena kurang telitinya alat pengukur tegangan permukaan pada konsentrasi sampel yang berdekatan. Pada hasil GC/MS diperoleh konsentrasi sampel 33,23 % dan 32,86 % untuk masing-masing waktu reaksi 25 jam dan 30 jam.

Kinerja dari emulsifier dilakukan dengan menggunakan uji kestabilan emulsi. Uji emulsi ini merupakan waktu yang mampu dipertahankan oleh sampel dilaurin untuk mampu mengemulsikan campuran minyak-air. Pada uji ini percobaan yang dilakukan pada tabung reaksi dengan minyak sebanyak 1 ml dan

air sebanyak 5 ml. Pada mulanya setelah minyak dan air dicampurkan, maka campuran tersebut di kocok kemudian dicatat waktu yang diperlukan sampai kedua fasa ini terlihat terpisah. Untuk campuran minyak-air diperoleh data kestabilan emulsi selama 128 detik. Waktu ini nantinya digunakan sebagai pembandingan untuk percobaan pada sampel dilaurin. Untuk menguji kestabilan sampel dilaurin maka campuran minyak-air ditambahkan dengan sampel dilaurin sebanyak 0,9 ml.



Gambar 4.5. Uji Stabilitas Emulsi: Variasi Waktu

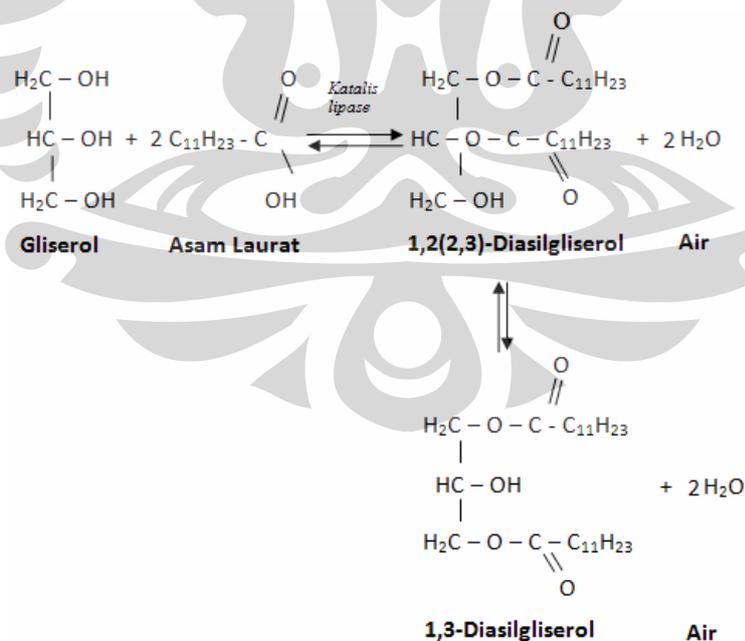
Hasil uji stabilitas yang diperoleh dapat dilihat pada gambar, ternyata sesuai dengan hasil yang diperoleh dengan GC-MS. Ternyata dari uji kestabilan emulsi yang dilakukan pun menunjukkan bahwa terdapat pengaruh yang diberikan oleh sampel dilaurin terhadap kestabilan emulsi campuran minyak-air. Pada uji kestabilan emulsi variasi waktu terlihat pada grafik terdapat kecenderungan penurunan stabilitas emulsi dalam sistem o/w (*oil in water*) seiring dengan makin meningkatnya waktu reaksi. Dan stabilitas emulsi terbaik didapatkan waktu reaksi 25 jam yaitu 249 sekon. Jika dibandingkan dengan data hasil pengukuran campuran minyak-air, maka hasil pengukuran sampel menunjukkan kestabilan yang lebih baik. Hal ini disebabkan karena agen pengemulsi memiliki ujung nonpolar (yang tidak bermuatan dan memiliki afinitas terhadap minyak, disebut lipofilik), dan ujung polar (yang memiliki muatan dan afinitas terhadap air,

disebut hidrofilik). Bagian hidrofilik akan berikatan dengan air dan bagian lipofilik akan berikatan dengan minyak. Hal ini akan membantu kedua fasa (minyak dan air) untuk tetap tercampur membentuk emulsi (Sibuea,2003).

4.2 Pengaruh Perbandingan Mol Gliserol dan Asam Laurat dalam Reaksi Esterifikasi-Enzimatis Gliserol dan Asam Laurat

Penelitian ini bertujuan untuk mencari nilai optimum perbandingan mol antara gliserol dan asam laurat dalam reaksi esterifikasi-enzimatis antara gliserol dan asam laurat dan katalis lipase *Mucor miehei*. Penelitian tentang pengaruh perbandingan mol gliserol dan asam laurat masih menggunakan reaktor tumpak. Waktu reaksi yang digunakan adalah 25 jam yang merupakan waktu reaksi optimum yang diperoleh pada percobaan yang sebelumnya. Variabel reaksi yang lain seperti suhu, laju pengadukan, dan enzim loading diatur seperti percobaan variasi waktu.

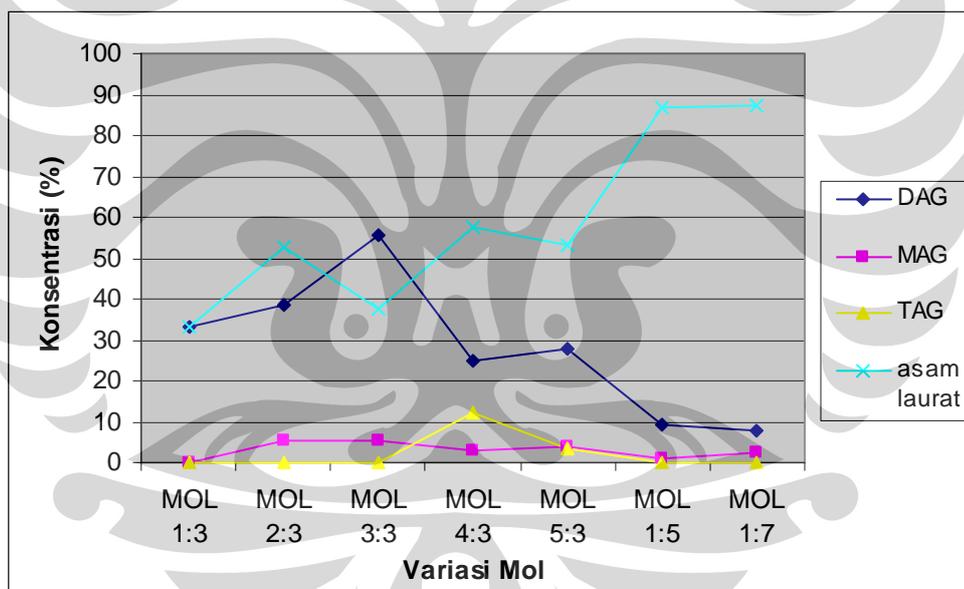
Reaksi esterifikasi-enzimatis yang terjadi antara gliserol dan asam laurat dengan katalis lipase dalam menghasilkan produk dilaurin adalah sebagai berikut:



Gambar 4.6. Skema Reaksi untuk Menghasilkan 1,2 Dilaurin

Dari gambar 4.6 terlihat bahwa secara stoikiometrik pada reaksi gliserol dan asam laurat untuk menghasilkan 1,2 dilaurin adalah 1:2. Pada percobaan variasi waktu yang telah dilakukan sebelumnya ternyata konsentrasi asam laurat masih berlebih jika dibandingkan dengan gliserol yang tidak tampak hasilnya di GC/MS. Oleh karena itu pada percobaan ini dilakukan penambahan gliserol sehingga diharapkan mampu untuk meningkatkan konsentrasi digliserida.

Pada tahap ini variasi perbandingan mol yang dilakukan antara gliserol dan asam laurat adalah 1:3 ; 1:5 ; 1:7; 2:3 ; 3:3 ; 4:3 ; dan 5:3. Variasi perbandingan mol ini dilakukan karena reaksi esterifikasi-enzimatis yang merupakan reaksi reversibel, sehingga jika jumlah reaktan ditambah maka akan memperbesar jumlah produk (hukum kesetimbangan reaksi reversibel). Berikut ini ialah grafik hasil analisis sampel 1,2 dilaurin.



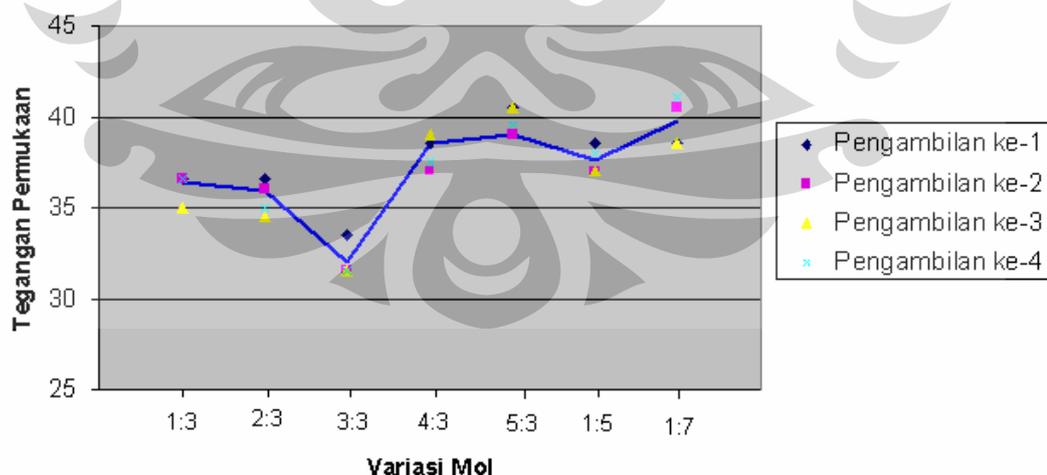
Gambar 4.7. Konsentrasi Sampel dari Beberapa Rasio Mol Gliserol dan Asam Laurat

Dari gambar 4.7 dapat dilihat bahwa konsentrasi 1,2 dilaurin yang paling besar diperoleh ketika perbandingan mol gliserol dan asam laurat adalah 3:3. Konsentrasi 1,2 dilaurin terus meningkat ketika perbandingan mol 1:3 sampai 3:3 yaitu dari 33,23% menjadi 55,41%. Hal ini terjadi karena dengan semakin banyak gliserol yang digunakan maka reaksi akan berjalan lebih sempurna. Perbandingan mol 4:3 mengalami penurunan konsentrasi dilaurin yang drastis karena terbentuk

trilaurin yang cukup banyak yaitu 12,31%. Dapat disimpulkan dari grafik bahwa kondisi optimum diperoleh ketika perbandingan mol adalah 3:3.

Dalam penelitian yang dilakukan Yu-Chih Yeh (1998) dengan berbagai variasi perbandingan mol reaktan antara gliserol dan asam laurat (10:1; 10:2; 10:4; 10:6; 10:8 dan, 1:1). Penelitian tersebut menjelaskan bahwa perbandingan mol antara gliserol dan asam lemak dalam reaksi esterifikasi tidak terlalu berpengaruh terhadap produk yang dihasilkan, asalkan perubahan perbandingan mol tersebut berkisar pada perbandingan mol stoikiometriknya yaitu 1 : 2. Produk yang dihasilkan dapat mengalami peningkatan hasil jika pada reaksi diberikan gliserol secara berlebih.

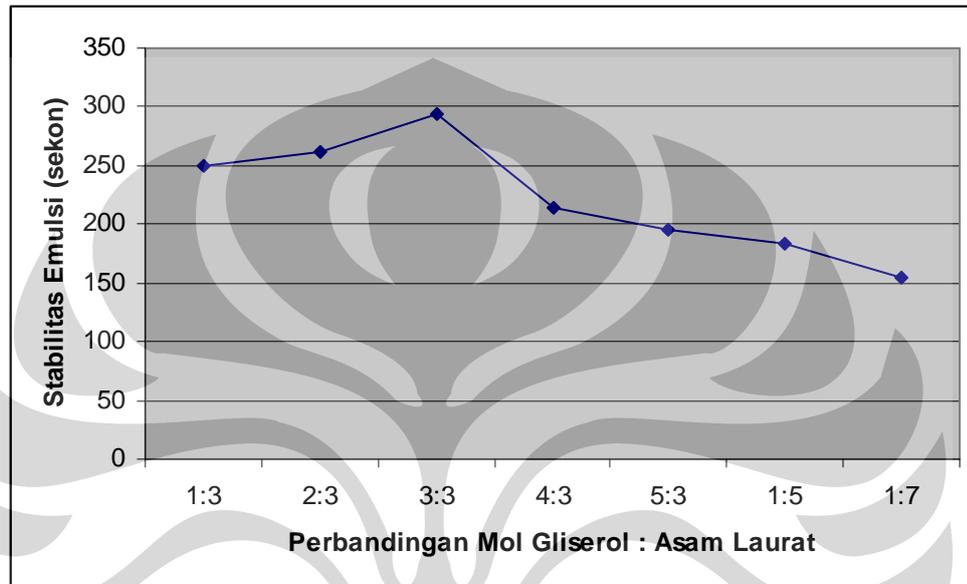
Pada grafik dibawah ini ditampilkan hasil pengujian tegangan permukaan untuk reaksi variasi mol. Terlihat dalam gambar 4.8 bahwa tegangan permukaan yang paling kecil diperoleh ketika variasi mol 3:3. Hal tersebut berarti pada variasi mol 3:3 sampel mampu menurunkan tegangan permukaan sampai sebesar 31,9 mN/m dan berarti bahwa kandungan emulsi terbesar berada pada sampel untuk variasi mol ini. Hasil pengamatan ini menguatkan hasil yang dilakukan dengan metode GC/MS yang menghasilkan konsentrasi emulsifier paling besar pada variasi mol 3:3.



Gambar 4.8. Tegangan Permukaan Air: Variasi Mol

Ketika dilakukan uji kestabilan emulsi, hasil yang diperoleh ternyata sesuai dengan hasil yang diperoleh dengan GC-MS. Ternyata dari uji kestabilan

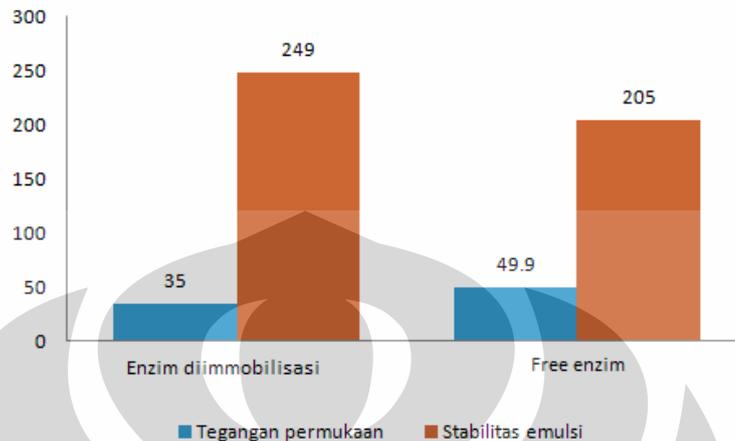
emulsi yang dilakukan pun menunjukkan bahwa terdapat pengaruh yang diberikan oleh sampel dilaurin terhadap kestabilan emulsi campuran minyak-air. Pada uji kestabilan emulsi variasi waktu terlihat pada grafik terdapat kecenderungan penurunan stabilitas emulsi dalam sistem o/w (oil in water). Dan stabilitas emulsi terbaik didapatkan variasi mol 3:3 yaitu 292 sekon.



Gambar 4.9. Uji Stabilitas Emulsi: Variasi Mol

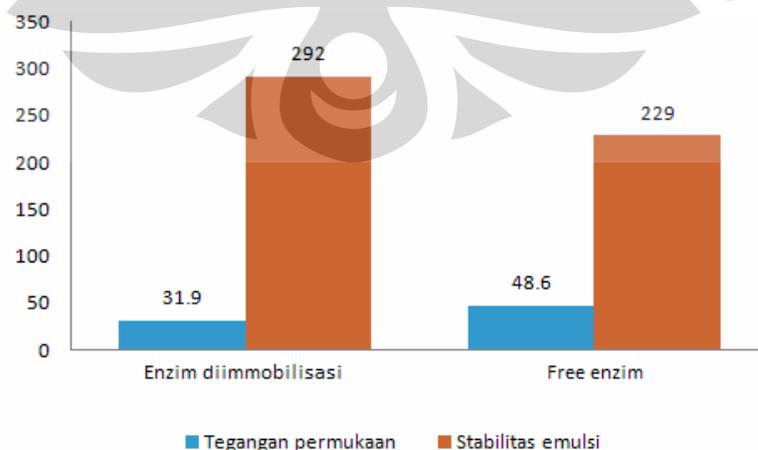
Sebelumnya pernah dilakukan penelitian tentang reaksi esterifikasi enzimatis gliserol dan asam laurat dengan katalis enzim lipase *Mucor meihei* untuk menghasilkan agen pengemulsi yang berupa digliserida (1,2 Dilaurin). Penelitian yang dilakukan oleh Alfaria Rizki (2008) menggunakan enzim yang *free* untuk menyelidiki pengaruh waktu reaksi serta perbandingan mol gliserol dan asam laurat. Pada reaksi tersebut divariasikan waktu reaksi esterifikasi selama 4, 6, 9, 12, 15, dan 24 jam serta perbandingan mol gliserol dengan asam laurat sebesar 1:3, 2:3, 3:3, 4:3, dan 5:3. Berdasarkan penelitian tersebut didapatkan waktu reaksi optimum ialah selama 15 jam. Sampel waktu reaksi optimum tersebut mampu menurunkan tegangan permukaan sampai 49,9 mN/m dan dapat mengemulsikan campuran minyak-air selama 205 detik. Sebagai perbandingan pada penelitian ini memperoleh waktu reaksi optimum sebesar 25 jam dengan penurunan tegangan permukaan sampai 35mN/m serta mampu mengemulsikan

campuran minyak-air selama 249 sekon. Apabila ditampilkan dalam bentuk grafik dapat dilihat sebagai berikut.



Gambar 4.10. Perbandingan hasil antara free enzim dan enzim diimmobilisasi pada variasi waktu optimum

Pada penelitian yang dilakukan oleh Alfaria Rizki diperoleh perbandingan mol optimum antara gliserol dengan asam laurat adalah 4:3. Dari uji tegangan permukaan, produk digliserida yang dihasilkan dapat menurunkan tegangan permukaan air hingga 47 mN/m. Berdasarkan uji kestabilan emulsi, produk dilaurin tersebut dapat mengemulsikan campuran minyak dan air selama 229 detik. Untuk lebih melihat perbandingan kedua penelitian akan lebih jelas apabila ditampilkan dalam grafik sebagai berikut.



Gambar 4.11. Perbandingan hasil antara free enzim dan enzim diimmobilisasi pada variasi mol optimum

BAB 5

KESIMPULAN

Dari percobaan yang telah dilakukan dan hasil-hasil analisis yang didapatkan, maka disimpulkan bahwa:

1. Waktu reaksi optimum dalam reaksi esterifikasi-enzimatis gliserol dan asam laurat ialah selama 25 jam dengan konsentrasi 1,2 dilaurin 33,23%. Tegangan permukaan air sebesar 35 mN/m dan stabilitas emulsi minyak-air selama 249 detik.
2. Perbandingan mol gliserol dan asam laurat optimum dalam reaksi esterifikasi-enzimatis gliserol dan asam laurat ialah 3:3 dengan konsentrasi 1,2 dilaurin 55,41%. Tegangan permukaan air sebesar 31,9 mN/m dan stabilitas emulsi minyak-air selama 292.
3. Produk yang dihasilkan mampu menurunkan tegangan permukaan air lebih dari 50% dan mampu meningkatkan stabilitas emulsi minyak dalam air sebesar lebih dari 200%. Sehingga dapat disimpulkan bahwa produk yang dihasilkan memiliki sifat sebagai agen pengemulsi.

DAFTAR REFERENSI

Chitin. (n.d.). May 20, 2007. www.en.wikipedia.org/chitin

Glycerol. (n.d.). May 20, 2007. www.en.wikipedia.org/glycerol

Hydrophilic Lipophilic Balance. (n.d.). May 29, 2007. www.en.wikipedia.org.

Immobilized Enzyme, (n.d.). March 23, 2007.

<http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/IMMOB/immob.htm>

Introduction: Immobilized Enzymes: Past, Present and Prospects. (n.d.). May 26, 2007. <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/IMMOB/introduct.htm>

Kelapa Sawit. (n.d.). May 20, 2007. http://id.wikipedia.org/wiki/Kelapa_sawit

Lauric Acid . (n.d.). May 23, 2007. <http://www.lauric.org/technical.html>

Lauric Acid. (n.d.). May 30, 2007. http://en.wikipedia.org/Lauric_acid

Enzyme. (n.d.). March 10, 2007. <http://www.en.wikipedia.org/Enzyme>

Sigma 703. (n.d.). March 5, 2007. http://www.ksvinc.com/703_brochure.htm

Measuring. (n.d.). March 5, 2007. <http://www.kruss.info>

The Mechanism for the Esterification Reaction. (n.d.). March 10, 2007
www.chemguide.co.uk

Berger M., Laumen K. & Schneider M.P. (1992). Enzymatic Esterification of Glycerol I. Lipase-Catalyzed Synthesis of Regioisomerically Pure 1,3-sn Diacylglycerols. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 69, 10.

Cornils, B.. Introduction to Surfactants. February 20, 2007.
http://media.wiley.com/product_data/excerpt

Deng, et.al. (2004). Adsorption and Activity of *Candida rugosa* Lipase on Polypropylene Hollow Fiber Membrane Modified with Phospholipid Analogous Polymers. *Langmuir*, 20, 10168-10173.

Goel, M. K. *Immobilized enzymes*. (n.d). 1994 <http://www.rpi.edu/>

Goenadi, et.al. (2005). Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis Kelapa Sawit di Indonesia. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Departemen Pertanian.

Gomez. (2003). Immobilization of lipase on Chitin and Its Use in Nonconventional Biocatalysis. *Biomacromolecules Journal*.

Hites , Ronald. (1995). Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Indiana University*.

Kaar, J.L. (2001). Using Enzyme Structure-Environment-Activity Relationships to Enhance Biocatalyst Utility. Chemical Engineering, University of Pittsburgh.

Ketaren, S. (1986). *Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan*. Jakarta: Universitas Indonesia

Kim & Lee. (2006). Synthesis of Diacylglycerols Containing CLA by Lipase Catalyzed Esterification. *Journal of Food Science*.

Kim, J. & Byung-Gee Kim. (2000). Lipase-Catalyzed Synthesis of Lysophosphatidylcholine Using Organic Cosolvent for in situ Water Activity Control. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 77, 791-797.

Koshland D.E. (1958). *Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis*. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 44, 98–104.

Kraai, G.N., Winkelmana, J.G.M., Vriesb, J.G., & H.J. Heeresa. (2008). Kinetic studies on the *Rhizomucor miehei* lipase catalyzed esterification reaction of oleic acid with 1-butanol in a biphasic system. *Biochemical Engineering Journal*, 41, 87–94.

Kristensen, J.B., Xu X., & Mu H. (2005). Diacylglycerol Synthesis by Enzymatic Glycerolysis: Screening of Commercially Available Lipases. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 82, 329-334.

Kulkarni, N. (2002). Studies on Lipase Enzyme from *Pseudomonas Fluorescens* NS2W. *Chemical engineering division national chemical laboratory pune. India*.

Lue et al. (2005). Lipase-Catalyzed Esterification of Cinnamic Acid and Oleyl Alcohol in Organic Solvent Media. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 462–468.

Monteiro, J.(2003). Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerol in a homogeneous system. *Biotechnology Letters*, 25: 641–644.

Palomo, J. et al. (2004). Purification, Immobilization, and Stabilization of a Lipase from *Bacillus thermocatenulatus* by Interfacial Adsorption on Hydrophobic Supports. *Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Science of Orense, University of Vigo. Spanyol.*

Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N. and Soccol, V. T. (1999). The Realm of Microbial Lipases in Technology. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 29, 119-131.

Pasaribu, Nurhida. (2004). *Minyak Buah Kelapa Sawit*. Jurusan Kimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sumatera Utara.

Plou et al. (1996). High-Yield Production of Mono- and Dioleoylglycerol by Lipase Catalyzed Hydrolysis of Triolein. *Enzyme Microbial Technology*.

Prabu, Dimas. (2007). Reaksi Hidrolisis Minyak Zaitun Menggunakan Lipase Non Spesifik yang Diimmobilisasi dengan Metode Adsorpsi. *Departemen Teknik Kimia UI*.

Rizki, Alfaria. (2008). Pengaruh Kondisi Operasi dalam Reaksi Esterifikasi Enzimatis Gliserol dengan Asam Laurat pada Pembuatan Agen Pengemulsi Depok : Universitas Indonesia.

Rosu et al. (1999). Enzymatic Synthesis of Symmetrical 1,3-Diacylglycerols by Direct Esterification of Glycerol in Solvent-Free System. *Journal of American Oil Chemistry Society*.

Sibuea, P. (2007, March 10) Emulsifier, Senyawa Ajaib dalam Industri Makanan. www.kompas.com

Sontang. (1984). New development in Fatty Acid Industry in America. *Journal of American Oil Chemistry Society*.

Souza, D.F. (1998). Immobilized Enzymes in Bioprocess. Nuclear Agriculture and Biotechnology Division, Bhabha Atomic Research Centre, Trombay, Mumbai. India.

Tarigan, Juliati. (2002). *Ester Asam Lemak*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Jurusan kimia Universitas Sumatera Utara.

Tripathi, V. (2006). Lipase-Catalyzed Synthesis of Diacylglycerols and Monoacylglycerols from Unsaturated Fatty Acid in Organic Solvent System. *Journal of Oleo Science*, 55, 65-69.

Tryfino. (2006, Mei 13). Potensi Dan Prospek Industri Kelapa Sawit. *Economic Review*.

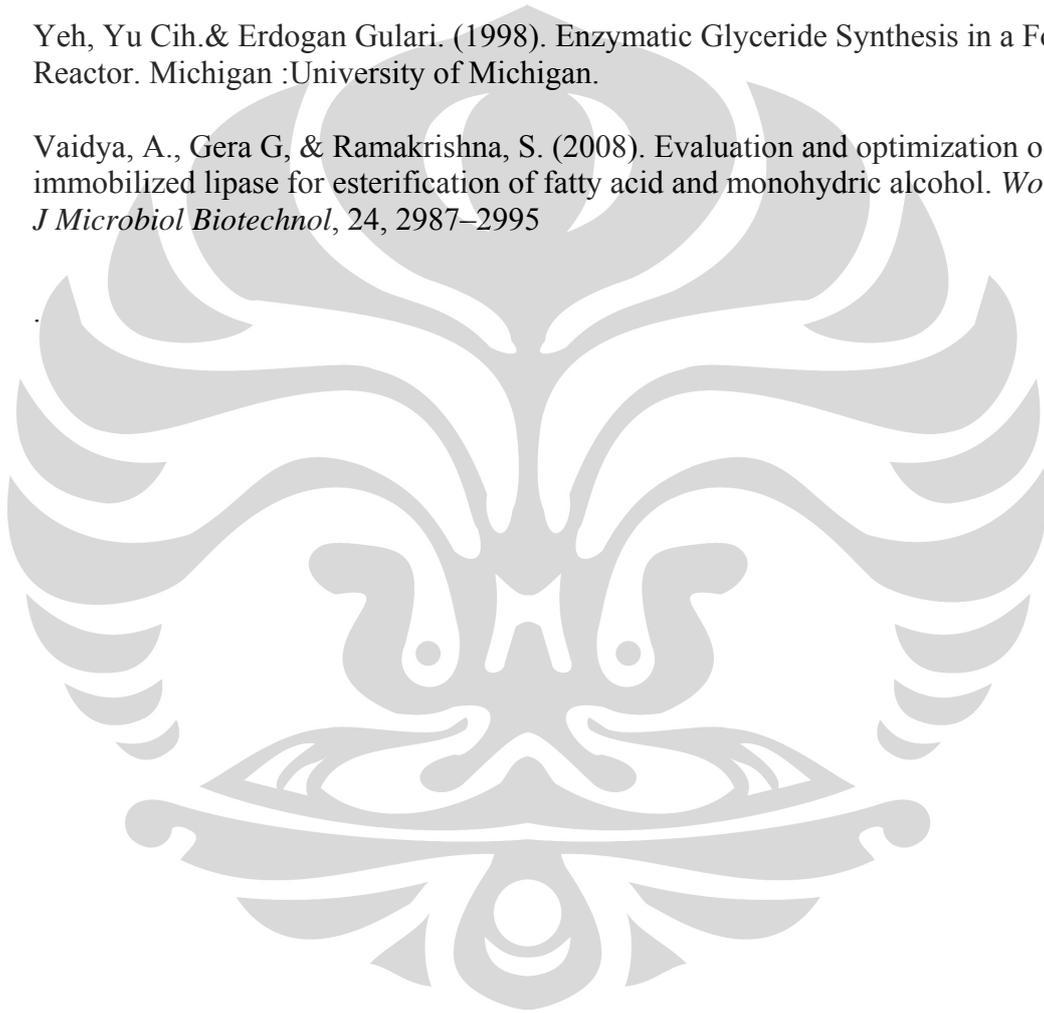
Watanabe et al. (2005) Diacylglycerol Production in A Packed Bed Bioreactor. *Elsevier Process Biochemistry*, 40, 637–643.

Watanabe et.al. (2003). Optimization of Reaction Condition for the Production of DAG Using Immobilized 1,3-Regiospecific Lipase Lipozyme RM IM. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 80, 12.

Yamane, Kang, Kawashara & Koizumi. (1994). Diacylglycerol formation by Solid-Phase Enzymatic Glycerolysis of Hydrogenated Beef Tallow. *Journal of American Oil Chemistry Society*.

Yeh, Yu Cih.& Erdogan Gulari. (1998). Enzymatic Glyceride Synthesis in a Foam Reactor. Michigan :University of Michigan.

Vaidya, A., Gera G, & Ramakrishna, S. (2008). Evaluation and optimization of immobilized lipase for esterification of fatty acid and monohydric alcohol. *World J Microbiol Biotechnol*, 24, 2987–2995



Lampiran 1. Foto-Foto Penelitian



Gambar L.1.1. Beberapa bahan yang dipakai dalam penelitian



Gambar L.1.2. Alat yang dipakai dalam reaksi esterifikasi-enzimatis



Gambar L.1.3. Tahap Immobilisasi Enzim



Gambar L.1.4. Tensiometer Pengukur Tegangan Permukaan



Gambar L.1.5. Bahan-bahan untuk analisa enzim yang terimmobilisasi



Gambar L.1.6. Sampel penelitian



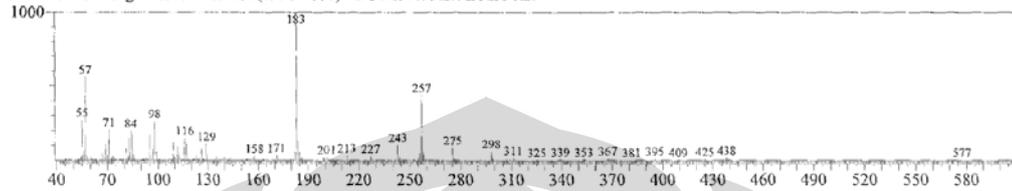
Gambar L.1.7. Unit GC/MS yang Digunakan untuk Menganalisis Dilaurin

Lampiran 2 Peak Library

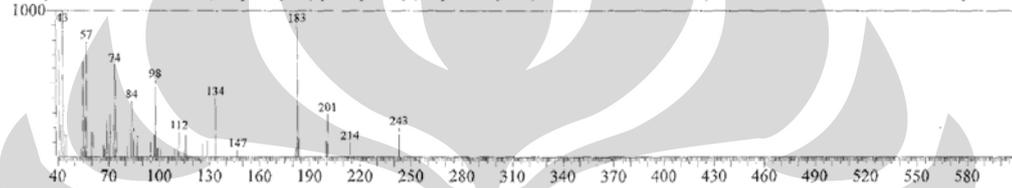
Gambar L.2.1. Unit GC/MS yang Digunakan untuk Menganalisis Dilaurin

Spectrum Comparison

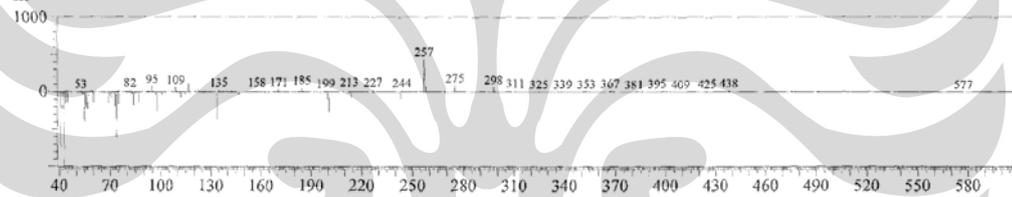
Spectrum1 #Data# Dilaurin05.qgd R.Time:19.650(Scan#:1999)
MassPeaks:255 BasePeak:183.10(1000)
RawMode:Averaged 19.642-19.658(1998-2000) BG Mode:Calc. from Peak



Spectrum2 #Library# WILEY7.LIB Entry:184642 Formula:C15 H30 O4 CAS:1678-45-1 MolWeight:274 RetIndex:0
MassPeaks:50 BasePeak:43.00(1000)
CompName:Dodecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester (CAS) 2-Monolaurin \$\$ Laurin, 2-mono- \$\$.beta.-Monolaurin \$\$ Glycerol 2-



Spectrum3 #Calculation Result#
MassPeaks:264 BasePeak:257.10(439)



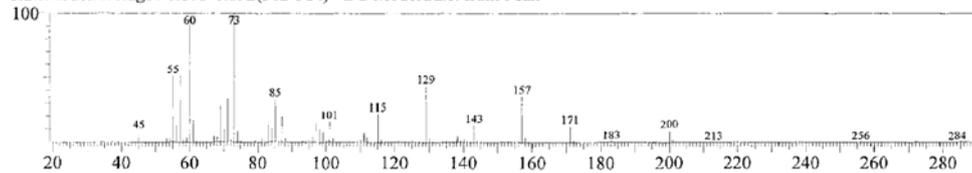
Gambar L.2.2. Unit GC/MS yang Digunakan untuk Menganalisis Dilaurin

Library Search

<< Target >>

Line#:1 R.Time:6.183(Scan#:383) MassPeaks:149 BasePeak:73.05(7805371)

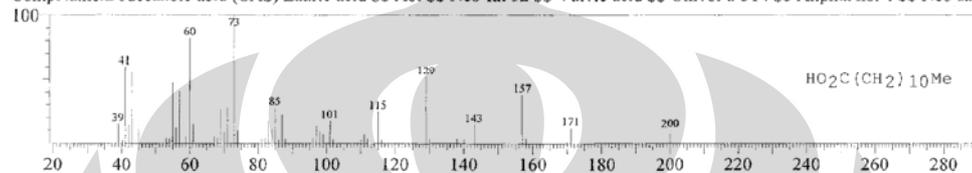
RawMode:Averaged 6.175-6.192(382-384) BG Mode:Calc. from Peak



Hit#:1 Entry:95895 Library:WILEY7.LIB

SI:97 Formula:C12H24O2 CAS:143-7-7 MolWeight:200 RetIndex:0

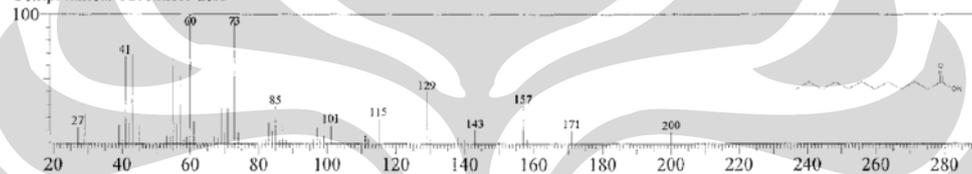
CompName:Dodecanoic acid (CAS) Lauric acid SS Abl \$\$ Neo-fat 12 \$\$ Vulvic acid \$\$ Univol u-314 \$\$ Aliphatic no. 4 \$\$ Neo-fat



Hit#:2 Entry:16285 Library:NIST27.LIB

SI:96 Formula:C12H24O2 CAS:143-7-7 MolWeight:200 RetIndex:0

CompName:Dodecanoic acid



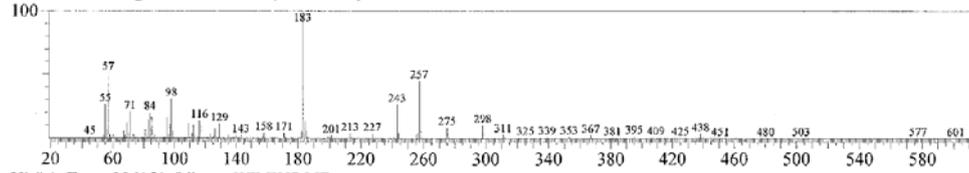
Gambar L.2.3. Unit GC/MS yang Digunakan untuk Menganalisis Dilaurin

Library Search

<< Target >>

Line#: 1 R Time: 19.908 (Scan#: 2030) MassPeaks: 312 BasePeak: 183.10 (3743544)

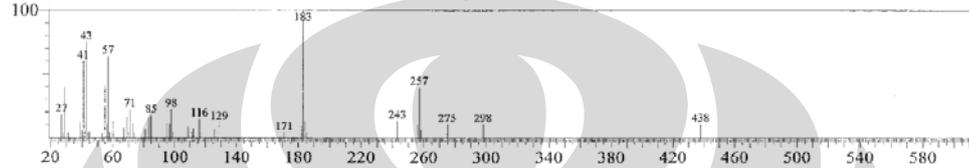
RawMode: Averaged 19.900-19.917 (2029-2031) BG Mode: Calc. from Peak



Hit#: 1 Entry: 306151 Library: WILEY7.LIB

SI: 91 Formula: C₂₇H₅₂O₅ CAS: 17598-94-6 MolWeight: 456 RetIndex: 0

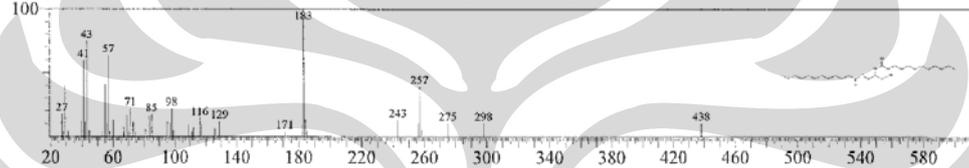
CompName: DODECANOIC ACID, 1-(HYDROXYMETHYL)-1,2-ETHANEDIYL ESTER \$\$



Hit#: 2 Entry: 137821 Library: NIST147.LIB

SI: 91 Formula: C₂₇H₅₂O₅ CAS: 17598-94-6 MolWeight: 456 RetIndex: 0

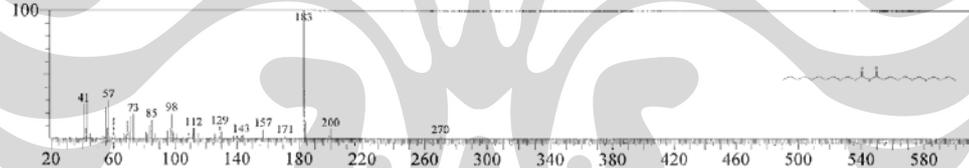
CompName: Dodecanoic acid, 1-(hydroxymethyl)-1,2-ethanediyl ester \$ 2-(Dodecanoyloxy)-1-(hydroxymethyl)ethyl laurate # \$\$



Hit#: 3 Entry: 26234 Library: NIST27.LIB

SI: 73 Formula: C₂₄H₄₆O₃ CAS: 645-66-9 MolWeight: 382 RetIndex: 0

CompName: Lauric anhydride



Lampiran 3.Data Analisis Tegangan Permukaan dan Stabilitas Emulsi

Tabel L.3.1. Hasil Analisis Tegangan Permukaan: Variasi Waktu

Variasi Waktu	10 jam	15 jam	20 jam	25 jam	30 jam
Pengambilan data ke-1	39	37.5	37.5	35.5	35
Pengambilan data ke-2	39	37	38	35	35
Pengambilan data ke-3	38.5	37	37.5	35	36
Pengambilan data ke-4	38.5	38	37.5	35	34
Rata-rata	38.75	37.375	37.625	35.125	35

Tabel L.3.2. Hasil Analisis Tegangan Permukaan: Variasi Mol

Variasi Mol	1:3	2:3	3:3	4:3	5:3	1:5	1:7
Pengambilan data ke-1	36.5	36.5	33.5	38.5	40.5	38.5	38.5
Pengambilan data ke-2	36.5	36	31.5	37	39	37	40.5
Pengambilan data ke-3	35	34.5	31.5	39	40.5	37	38.5
Pengambilan data ke-4	36.5	35	31.5	37.5	39.5	38	41
Rata-rata	36.3125	35.875	31.9375	38.5	38.9375	37.625	39.8125

Tabel L.3.3. Hasil Uji Stabilitas Emulsi: Variasi Waktu

Variasi Waktu	10 jam	15 jam	20 jam	25 jam	30 jam
Stabilitas Emulsi	129	185	203	249	213

Tabel L.3.4. Hasil Uji Stabilitas Emulsi: Variasi Mol

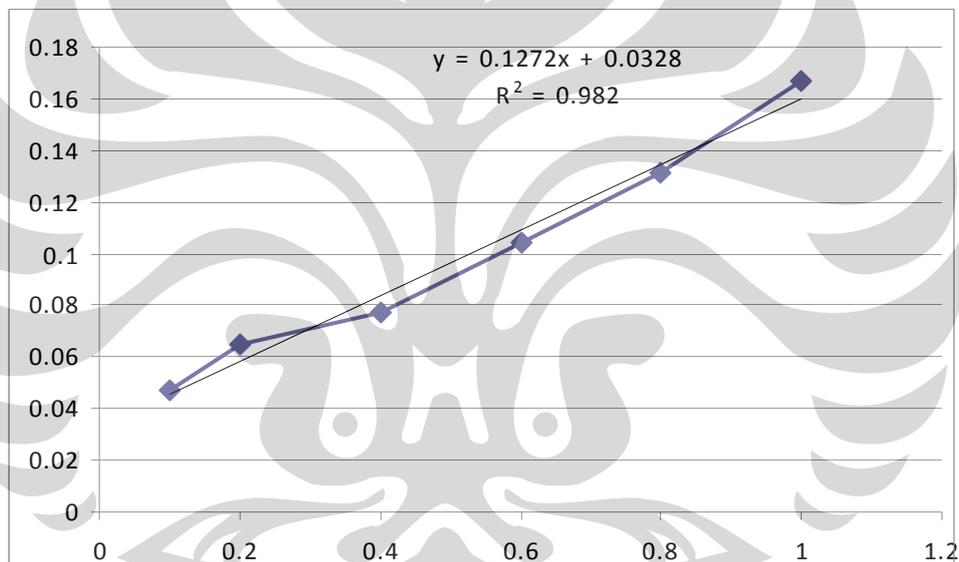
Variasi Mol	1:3	2:3	3:3	4:3	5:3	1:5	1:7
Stabilitas Emulsi	249	261	292	214	196	183	154

Lampiran 4. Data Immobilisasi Enzim dan Perhitungan Enzim Loading

Data BSA Sebagai Standar

Konsentrasi	Absorbansi
0.1	0.047
0.2	0.065
0.4	0.077
0.6	0.104
0.8	0.131
1	0.167

Dari data tersebut diperoleh kurva standar sebagai berikut



Grafik standar tersebut memiliki persamaan garis linear sebagai berikut:

$$Y = 0,1272 X + 0,0328$$

Dimana: Y merupakan absorbansi

X merupakan konsentrasi protein

Data tersebut digunakan untuk menghitung konsentrasi dari enzim yang terimmobilisasi pada support dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Menghitung konsentrasi enzim sebelum diimmobilisasi

$$Y = 0,1272 X + 0,0328$$

$$\text{Absorbansi} = 0,1272 \cdot C_0 + 0,0328$$

$$0,280 = 0,1272 \cdot C_0 + 0,0328$$

$$\text{Maka } C_0 = \frac{(0,280 - 0,0328)}{0,1272} = 1,953 \text{ mg / ml}$$

Absorbansi Awal	0.280	0.280	0.280
Absorbansi Akhir	0.176	0.178	0.171

2. Menghitung konsentrasi enzim yang terfiltrasi (free enzim)

$$Y = 0,1272 X + 0,0328$$

$$\text{Absorbansi} = 0,1272 \cdot C_0 + 0,0328$$

$$0,280 = 0,1272 \cdot C_t + 0,0328$$

$$\text{Maka } C_{t1} = \frac{(0,176 - 0,0328)}{0,1272} = 1,134 \text{ mg / ml}$$

$$\text{Maka } C_{t2} = \frac{(0,178 - 0,0328)}{0,1272} = 1,150 \text{ mg / ml}$$

$$\text{Maka } C_{t3} = \frac{(0,171 - 0,0328)}{0,1272} = 1,094 \text{ mg / ml}$$

3. Menghitung konsentrasi enzim yang terimmobilisasi pada support

Perhitungan konsentrasi enzim yang terimmobilisasi pada support dilakukan dengan menghitung selisih dari konsentrasi enzim mula-mula dengan konsentrasi enzim yang terfiltrasi.

$$C_e = C_0 - C_{t1} = 1,953 \text{ mg/ml} - 1,134 \text{ mg/ml} = 0,819 \text{ mg/ml}$$

$$C_e = C_0 - C_{t2} = 1,953 \text{ mg/ml} - 1,150 \text{ mg/ml} = 0,803 \text{ mg/ml}$$

$$C_e = C_0 - C_{t3} = 1,953 \text{ mg/ml} - 1,094 \text{ mg/ml} = 0,858 \text{ mg/ml}$$

$$C_e \text{ rata-rata} = \frac{0,819 + 0,803 + 0,858}{3} = 0,827 \text{ mg / ml}$$

$$\text{Enzim loading} = \frac{C_e}{C_0} \cdot 100\% = \frac{0,827}{1,953} \cdot 100\% = 42,34\%$$

Lampiran 5.Perhitungan Konsentrasi Sampel dengan GC/MS

rteres - Notepad

File Edit Format View Help

Area Percent Report

Data Path : H:\SKRIPSI+PKMP\gcms\RAKHMAD PRIASMORO\
 Data File : SAMPEL 30 JAM ULANG.D
 Acq On : 22 Oct 2008 13:19
 Operator : RAKHMAD PRIASMORO
 Sample : SAMPEL 30 JAM
 Misc : DILAURIN
 ALS vial : 1 Sample Multiplier: 1
 Integration Parameters: autoint1.e
 Integrator: Chemstation
 Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\DEFAULT.M
 Title :
 Signal : TIC

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	5.182	236	251	261	BB	89451	1193444	0.07%	0.042%
2	6.801	441	444	447	PV	62420	720674	0.04%	0.026%
3	7.212	486	493	513	BB	102661	2408919	0.15%	0.086%
4	9.301	683	742	780	PV	10898160	1644471412	100.00%	58.533%
5	9.653	780	784	792	VV 5	90659	3284639	0.20%	0.117%
6	9.745	792	795	809	VB 5	50618	1940015	0.12%	0.069%
7	10.995	932	944	959	BB	275639	4477910	0.27%	0.159%
8	11.205	960	969	975	BV	73967	1083618	0.07%	0.039%
9	11.297	975	980	1004	PV	2897520	46243272	2.81%	1.646%
10	11.759	1018	1035	1055	PV 2	453094	11260301	0.68%	0.401%
11	12.497	1107	1123	1132	BV	1832797	28867078	1.76%	1.027%
12	12.665	1132	1143	1164	PV 2	4140667	115164070	7.00%	4.099%
13	12.891	1164	1170	1181	VV 2	216297	5814993	0.35%	0.207%
14	13.319	1218	1221	1224	VV 2	133594	2115318	0.13%	0.075%
15	13.369	1224	1227	1238	VV 2	168946	2596428	0.16%	0.092%
16	14.812	1385	1399	1421	BV	248219	4140400	0.25%	0.147%
17	15.215	1441	1447	1457	PV 2	69383	1151070	0.07%	0.041%
18	17.849	1751	1761	1773	BB 6	120298	3441823	0.21%	0.123%
19	19.719	1929	1984	1990	PV	3840380	290502682	17.67%	10.340%
20	20.005	1990	2018	2028	VV	7120638	624506232	37.98%	22.229%
21	20.122	2028	2032	2057	VV 3	243531	10439055	0.63%	0.372%
22	24.090	2485	2505	2521	BB 2	70789	3649521	0.22%	0.130%

sum of corrected areas: 2809472873

Perhitungan konsentrasi sampel secara detail dapat dijelaskan sebagai berikut:

Dari hasil GC/MS diperoleh luas area dari masing-masing peak yang muncul. Pada gambar diatas terlihat luas area dari peak pada angka yang diberi kotakan warna biru.

Selanjutnya semua luas area dari peak yang muncul di jumlah sehingga memperoleh luas area total sebesar 2809472873.

Contoh perhitungan konsentrasi sampel dengan GC/MS

Misalkan kita ingin menghitung konsentrasi dari sampel pada peak ke-20 dengan peak 20,005 menit.

Dari gambar terlihat bahwa luas area untuk peak ke-20 adalah 624506232.

$$\% \text{ konsentrasi dihitung dengan} = \frac{\text{Luas area peak}}{\text{Luas total peak}} \cdot 100\% = \frac{624506232}{2809472873} =$$

22,229%.

Lampiran 6.Kondisi Operasi GC/MS

COLUMN 1

Capillary Column
Model Number: Agilent 19091S-433 (metil polysiloksan)
HP-5MS, 0.25mm * 30m * 0.25um
Max temperature: 350 'C
Nominal length: 30.0 m
Nominal diameter: 250.00 um
Nominal film thickness: 0.25 um
Mode: constant flow
Initial flow: 1.0 mL/min
Nominal init pressure: 6.42 psi
Average velocity: 36 cm/sec
Inlet: Front Inlet
Outlet: MSD
Outlet pressure: vacuum

FRONT INLET

Mode: Split
Initial temp: 290 'C (Off)
Pressure: 6.42 psi (On)
Split ratio: 100:1
Split flow: 99.4 mL/min
Total flow: 103.3 mL/min
Gas saver: Off
Gas type: Helium

FRONT DETECTOR ()

Temperature: 250 'C (Off)
flow: 40.0 mL/min (Off)
flow: 450.0 mL/min (Off)
Mode: Constant makeup flow
flow: 45.0 mL/min (Off)
Makeup Gas Type: Helium
Flame: Off
Electrometer: Off
Lit offset: 2.0

Lampiran 7.Data Analisis GC/MS

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\MAHASISWA\S1 UI\RAKHMAD PRIASMORO\
 Data File : DILaurin.D
 Acq On : 16 Oct 2008 15:36
 Operator : RAKHMAD PRIASMORO
 Sample : DILaurin
 Misc : SAMPEL 25 JAM
 ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\wiley7n.l Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual			
1	8.93	34.14	C:\Database\wiley7n.l						
			Dodecanoic acid	115373	000143-07-7	96			
			Dodecanoic acid (CAS) \$\$ Lauric acid \$\$ Abl \$\$ Neo-fat 12 \$\$ Vulvic acid \$\$ Univol u-314 \$\$ Aliphatic no . 4 \$\$ Neo-fat 12-43 \$\$ Dodecylic acid \$\$ Ninol aa62 extra \$\$ Laurostearic acid \$\$ n-Dodecanoic acid \$ \$ 1-Undecanecarboxylic acid \$\$ Univol U 314 \$\$ Luna	115383	000143-07-7	95			
1	8.93	34.14	Dodecanoic acid (CAS) \$\$ Lauric acid \$\$ Abl \$\$ Neo-fat 12 \$\$ Vulvic acid \$\$ Univol u-314 \$\$ Aliphatic no . 4 \$\$ Neo-fat 12-43 \$\$ Dodecylic acid \$\$ Ninol aa62 extra \$\$ Laurostearic acid \$\$ n-Dodecanoic acid \$ \$ 1-Undecanecarboxylic acid \$\$ Univol U 314 \$\$ Luna	115375	000143-07-7	91			
			2	11.30	9.69	C:\Database\wiley7n.l			
			methyl 4-oxohexadecanoate			231131	000000-00-0	14	
Cyclohexanone, 2-propyl- \$ \$ 2-Propylcyclohexanone	36114	000094-65-5	11						
2	11.30	9.69	Tridecanedioic acid, diethyl ester	249779	015423-05-9	10			
			3	12.51	3.66	C:\Database\wiley7n.l			
			Indolizine, 3-methyl- (CAS) \$ \$ 3-METHYL-INDOLIZINE			27434	001761-10-0	38	
Indolizine, 3-methyl-2,4-Difluorophenol \$ \$ Phenol, 2,4-	27435	001761-10-0	38						
3	12.51	3.66		25971	000367-27-1	35			

difluoro-

4	12.62 4.74	C:\Database\wiley7n.l Floxadine Indan, 1-methyl- Silane, methylenebis [dimethyl- 2,4-Disilapentane, 2,4-dimethyl- \$ Silane, methylenebis@dimethyl	180559 28351 27713	000050-91-9 000767-58-8 018163-84-3	42 32 28
5	19.64 16.07	C:\Database\wiley7n.l Lauric anhydride 5-(N-methyl-N-t-butylaminomethylen e)-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-di one \$\$ 1,3-Dioxane-4,6-dione, 5-[[(1,1-dimethylethyl)methylamino]met hylene]-2,2-dimethyl- (CAS) Dodecanoic acid, 1-(hydroxymethyl) -1,2-ethanediyl ester	321633 174970 356874	000645-66-9 096994-21-7 017598-94-6	64 53 43
6	19.77 2.80	C:\Database\wiley7n.l Dodecanoic acid, 1-(hydroxymethyl) -1,2-ethanediyl ester Pyrrolizin-1-thione, 7-propyl- 5-Hydroxy-2-methyl-4-nitroanisole	356874 90835	017598-94-6 000000-00-0	87 25
7	19.89 30.43	C:\Database\wiley7n.l Dodecanoic acid, 1-(hydroxymethyl) -1,2-ethanediyl ester 2,4-Diamino-6-hydroxy-5-thiocyanat opyrimidine \$\$ Thiocyanic acid, 2, 6-diamino-1,4-dihydro-4-oxo-5-pyri midinyl ester (CAS) \$\$ Thiocyanic acid, 2,4-diamino-6-hydroxy-5-pyri midinyl ester Lauric anhydride	356874 90656 321633	017598-94-6 022288-75-1 000645-66-9	87 47 45

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\MAHASISWA\S1 UI\RAKHMAD PRIASMORO\
 Data File : SAMPEL 20 JAM.D
 Acq On : 17 Oct 2008 16:23
 Operator : RAKHMAD PRIASMORO
 Sample : SAMPEL 20 JAM
 Misc :
 ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\wiley7n.l Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	9.21	73.09	C:\Database\wiley7n.l Dodecanoic acid (CAS) \$\$ Lauric acid id \$\$ Abl \$\$ Neo-fat 12 \$\$ Vulvic acid \$\$ Univol u-314 \$\$ Aliphatic no . 4 \$\$ Neo-fat 12-43 \$\$ Dodecylic acid \$\$ Ninol aa62 extra \$\$ Lauros tearic acid \$\$ n-Dodecanoic acid \$ \$ 1-Undecanecarboxylic acid \$\$ Uni vol U 314 \$\$ Luna	115375	000143-07-7	97
			Dodecanoic acid (CAS) \$\$ Lauric ac id \$\$ Abl \$\$ Neo-fat 12 \$\$ Vulvic acid \$\$ Univol u-314 \$\$ Aliphatic no . 4 \$\$ Neo-fat 12-43 \$\$ Dodecylic acid \$\$ Ninol aa62 extra \$\$ Lauros tearic acid \$\$ n-Dodecanoic acid \$ \$ 1-Undecanecarboxylic acid \$\$ Uni vol U 314 \$\$ Luna	115383	000143-07-7	97
			Dodecanoic acid	115373	000143-07-7	95
2	11.00	0.28	C:\Database\wiley7n.l Dodecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydr oxymethyl)ethyl ester (CAS) \$\$ 2-M onolaurin \$\$ Laurin, 2-mono- \$\$.b eta.-Monolaurin \$\$ Glycerol 2-laur ate \$\$ Lauric acid .beta.-monoglyc eride \$\$ 1,2,3-Propanetriol 2-dode canoate \$\$ Glycerol .beta.-dodecan oate	218390	001678-45-1	64
			Dodecanoic acid, ethenyl ester \$\$ Lauric acid, vinyl ester \$\$ Vinyl laurate \$\$ Vinyl dodecanoate	154363	002146-71-6	43
			8H-Thiazolo[5,4-c]azepin-8-one, 2- amino-4,5,6,7-tetrahydro-	90746	000000-00-0	43

3	11.30	2.67	C:\Database\wiley7n.l N-methoxymethylpiperidine 3-mercapto-2-methyl-4,5-dihydrofuran n-Heptylamine, N-acetyl-1-cyano-	25604 16210 89506	000000-00-0 000000-00-0 000000-00-0	22 22 18
4	12.50	4.63	C:\Database\wiley7n.l Glycyl-d-tryptophan Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1-methoxy- 1H-Indole, 2-methyl- \$\$ Indole, 2-methyl- \$\$ 2-Methyl-1H-indole \$\$ 2-Methylindole	201109 62632 27399	000000-00-0 001008-18-0 000095-20-5	38 37 32
5	12.63	2.89	C:\Database\wiley7n.l 1-Brom-1-benzylcyclobutane Indan, 1-methyl- 1,3,5,7-Cyclooctatetraene, 1-(4-bromobutyl)-	150396 28351 170234	000000-00-0 000767-58-8 055538-75-5	53 50 47
6	12.66	0.94	C:\Database\wiley7n.l Dodecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester \$\$ Laurin, 2-mono- \$\$.beta.-Monolaurin \$\$ Glycerol 2-laurate \$\$ Lauric acid .beta.-monoglyceride \$\$ 2-Monolaurin \$\$ 1,2,3-Propanetriol 2-dodecanoate \$\$ Glycerol .beta.-dodecanoate 1,3-Oxathiane, 2-methyl-2-(1-methylethyl)- (CAS) \$\$ 2-ISOPROPYL-2-METHYL-1,3-OXATHIANE \$\$ 1,3-Oxathiane, 2-isopropyl-2-methyl-1-(benzenesulphonyl)-1-phenylcyclopropane \$\$ Benzene, [(1-phenylcyclopropyl)sulfonyl]- (CAS) \$\$ Phenyl 1-phenylcyclopropyl sulfone	218391 59552 197545	001678-45-1 030098-81-8 034782-55-3	32 27 22
7	13.37	0.44	C:\Database\wiley7n.l 2-(P-METHOXYPHENYL)-2-OXAZOLIN-4-ONE \$\$ 4(5H)-Oxazalone, 2-(4-methoxyphenyl)- (CAS) d-Lyxose, dinonyl mercaptal 2-methyl 3-(4-(1'-methylethyl)-phenyl) propanal \$\$ Cyclamen aldehyde \$\$ PHENYLPROPIONALDEHYDE \$\$ 2-METHYL-3-(P-ISOPROPYLPHENYL) PROPION ALDEHYDE)- \$\$ 3-(4-Isopropylphenyl 2-methylpropionaldehyde \$\$.alpha.-Methyl-p-isopropylhydrocinnamic aldehyde	101380 355455 100832	057764-64-4 123390-11-4 000103-95-7	27 25 15

8	14.82	0.46	C:\Database\wiley7n.l 12-Tricosanone \$\$ Diundecyl ketone \$\$ Lauron \$\$ Laurone \$\$ Undecyl k etone \$\$ di-n-Undecyl ketone	288734	000540-09-0	81
			1-Methylcyclododecanol	113136	000000-00-0	50
			2-Dibenzofuranamine \$\$ 2-Aminodibe nzofuran \$\$ 2-Aminodiphenylene oxi de \$\$ 2-ADO	91227	003693-22-9	38
9	19.66	4.14	C:\Database\wiley7n.l Dodecanoic acid, 1-(hydroxymethyl) -1,2-ethanediyl ester	356874	017598-94-6	68
			furanamine \$\$ 4-Aminodibe nzofuran	91230	050548-43-1	52
			2-Dibenzofuranamine \$\$ 2-Aminodibe nzofuran \$\$ 2-Aminodiphenylene oxi de \$\$ 2-ADO	91227	003693-22-9	50
10	19.93	10.46	C:\Database\wiley7n.l Dodecanoic acid, 1-(hydroxymethyl) -1,2-ethanediyl ester	356874	017598-94-6	64
			Lauric anhydride	321633	000645-66-9	52
			4-Dibenzofuranamine \$\$ 4-Aminodibe nzofuran	91230	050548-43-1	46

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\MAHASISWA\S1 UI\RAKHMAD PRIASMORO\
 Data File : SAMPEL B.D
 Acq On : 24 Oct 2008 14:46
 Operator : RAKHMAD PRIASMORO
 Sample : VARIASI MOL 3 : 3
 Misc :
 ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\wiley7n.l Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: Chemstation Integrator - EVENTS.E

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	9.09	35.78	C:\Database\wiley7n.l Dodecanoic acid (CAS) \$\$ Lauric acid id \$\$ Abl \$\$ Neo-fat 12 \$\$ Vulvic acid \$\$ Univol u-314 \$\$ Aliphatic no . 4 \$\$ Neo-fat 12-43 \$\$ Dodecylic acid \$\$ Ninol aa62 extra \$\$ Lauros tearic acid \$\$ n-Dodecanoic acid \$ \$ 1-Undecanecarboxylic acid \$\$ Uni vol U 314 \$\$ Luna	115375	000143-07-7	99
			Dodecanoic acid (CAS) \$\$ Lauric ac id \$\$ Abl \$\$ Neo-fat 12 \$\$ Vulvic acid \$\$ Univol u-314 \$\$ Aliphatic no . 4 \$\$ Neo-fat 12-43 \$\$ Dodecylic acid \$\$ Ninol aa62 extra \$\$ Lauros tearic acid \$\$ n-Dodecanoic acid \$ \$ 1-Undecanecarboxylic acid \$\$ Uni vol U 314 \$\$ Luna	115381	000143-07-7	96
			Dodecanoic acid	115373	000143-07-7	94
2	11.28	1.75	C:\Database\wiley7n.l Dodecanoic acid (CAS) \$\$ Lauric ac id \$\$ Abl \$\$ Neo-fat 12 \$\$ Vulvic acid \$\$ Univol u-314 \$\$ Aliphatic no . 4 \$\$ Neo-fat 12-43 \$\$ Dodecylic acid \$\$ Ninol aa62 extra \$\$ Lauros tearic acid \$\$ n-Dodecanoic acid \$ \$ 1-Undecanecarboxylic acid \$\$ Uni vol U 314 \$\$ Luna	115386	000143-07-7	43
			2-Oxecanone, 10-methyl-, (+/-)- \$\$ 2-Oxecanone, 10-methyl-, (+/-) - \$\$ (+/-)-Decan-9-olide \$\$ (+/-))-Phoracantholide I \$\$ (+/-)-Phorac antholide I \$\$ 9-Decanolide	73612	065371-24-6	27
			Cyclooctanone (CAS) \$\$ CYCLOOCTANO	22899	000502-49-8	27

3	12.50	1.51	C:\Database\wiley7n.l Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1-methoxy-2-Acetoxytetralin 1H-Indole, 2-methyl- \$\$ Indole, 2-methyl- \$\$ 2-Methyl-1H-indole \$\$ 2-Methylindole	62632 100551 27399	001008-18-0 000000-00-0 000095-20-5	37 25 25
4	12.65	5.55	C:\Database\wiley7n.l Dodecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester \$\$ Laurin, 2-mono- \$\$.beta.-Monolaurin \$\$ Glycerol 2-laurate \$\$ Lauric acid .beta.-monoglyceride \$\$ 2-Monolaurin \$\$ 1,2,3-Propanetriol 2-dodecanoate \$\$ Glycerol .beta.-dodecanoate Dodecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester (CAS) \$\$ 2-Monolaurin \$\$ Laurin, 2-mono- \$\$.beta.-Monolaurin \$\$ Glycerol 2-laurate \$\$ Lauric acid .beta.-monoglyceride \$\$ 1,2,3-Propanetriol 2-dodecanoate \$\$ Glycerol .beta.-dodecanoate Dodecanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester \$\$ Laurin, 1-mono- \$\$.alpha.-Monolaurin \$\$ Glycerin 1-monolaurate \$\$ Glycerol .alpha.-monolaurate \$\$ Glycerol 1-monolaurate \$\$ Glyceryl monododecanoate \$\$ Glyceryl monolaurate \$\$ Lauric acid .alpha.-monoglycerid	218391 218390 218387	001678-45-1 001678-45-1 000142-18-7	90 90 83
5	19.69	15.63	C:\Database\wiley7n.l Dodecanoic acid, 1-(hydroxymethyl)-1,2-ethanediyl ester Dodecanoic acid, ethenyl ester \$\$ Lauric acid, vinyl ester \$\$ Vinyl laurate \$\$ Vinyl dodecanoate N-acetylbutylpiperidine	356874 154363 91173	017598-94-6 002146-71-6 000000-00-0	90 38 37
6	19.96	39.78	C:\Database\wiley7n.l Dodecanoic acid, 1-(hydroxymethyl)-1,2-ethanediyl ester 5-(N-methyl-N-t-butylaminomethylene)-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione \$\$ 1,3-Dioxane-4,6-dione, 5-[[1,1-dimethylethyl)methylamino]methylene]-2,2-dimethyl- (CAS) Dodecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester (CAS) \$\$ 2-M	356874 174970 218390	017598-94-6 096994-21-7 001678-45-1	45 43 40

onolaurin \$\$ Laurin, 2-mono- \$\$.b
eta.-Monolaurin \$\$ Glycerol 2-laur
ate \$\$ Lauric acid .beta.-monoglyc
eride \$\$ 1,2,3-Propanetriol 2-dode
canoate \$\$ Glycerol .beta.-dodecan
oate



Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\MAHASISWA\S1 UI\RAKHMAD PRIASMORO\
 Data File : SAMPEL C.D
 Acq On : 24 Oct 2008 15:25
 Operator : RAKHMAD PRIASMORO
 Sample : VARIASI MOL 4 : 3
 Misc :
 ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\wiley7n.l Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: Chemstation Integrator - EVENTS.E

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	9.42	57.68	C:\Database\wiley7n.l Dodecanoic acid (CAS) \$\$ Lauric acid id \$\$ Abl \$\$ Neo-fat 12 \$\$ Vulvic acid \$\$ Univol u-314 \$\$ Aliphatic no . 4 \$\$ Neo-fat 12-43 \$\$ Dodecylic acid \$\$ Ninol aa62 extra \$\$ Lauros tearic acid \$\$ n-Dodecanoic acid \$ \$ 1-Undecanecarboxylic acid \$\$ Uni vol U 314 \$\$ Luna	115375	000143-07-7	99
			Dodecanoic acid (CAS) \$\$ Lauric ac id \$\$ Abl \$\$ Neo-fat 12 \$\$ Vulvic acid \$\$ Univol u-314 \$\$ Aliphatic no . 4 \$\$ Neo-fat 12-43 \$\$ Dodecylic acid \$\$ Ninol aa62 extra \$\$ Lauros tearic acid \$\$ n-Dodecanoic acid \$ \$ 1-Undecanecarboxylic acid \$\$ Uni vol U 314 \$\$ Luna	115381	000143-07-7	97
			Dodecanoic acid	115373	000143-07-7	94
2 1	1.30	0.80	C:\Database\wiley7n.l Carbazic acid, 3-pentylidene-, met hyl ester (CAS) \$\$ VALERALDEHYDE N-METHOXYCARBONYLHYDRAZONE	57305	014702-36-4	35
			2-Propenoic acid, 3-(dimethylamino)-, methyl ester (CAS) \$\$ METHYL- BETA.-DIMETHYLAMINOACRYLATE \$\$ Methyl 3-(dimethylamino)acrylate \$\$ A crylic acid, 3-(dimethylamino)-, m ethyl ester	25425	000999-59-7	30
			2-Propenoic acid, 3-(dimethylamino)- , methyl ester	25426	000999-59-7	30
3	12.51	0.91	C:\Database\wiley7n.l Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1- methoxy-	62632	001008-18-0	37

		2-Acetoxytetralin	100551	000000-00-0	25
		2-Phenylcyclohexanone \$\$ Cyclohexanone, 2-phenyl-	79045	001444-65-1	25
4	12.66 2.87	C:\Database\wiley7n.l Dodecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester \$\$ Laurin, 2-mono- \$\$.beta.-Monolaurin \$\$ Glycerol 2-laurate \$\$ Lauric acid .beta.-monoglyceride \$\$ 2-Monolaurin \$\$ 1,2,3-Propanetriol 2-dodecanoate \$\$ Glycerol .beta.-dodecanoate	218391	001678-45-1	91
		Dodecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester (CAS) \$\$ 2-Monolaurin \$\$ Laurin, 2-mono- \$\$.beta.-Monolaurin \$\$ Glycerol 2-laurate \$\$ Lauric acid .beta.-monoglyceride \$\$ 1,2,3-Propanetriol 2-dodecanoate \$\$ Glycerol .beta.-dodecanoate	218390	001678-45-1	91
		Dodecanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester \$\$ Laurin, 1-mono- \$\$.alpha.-Monolaurin \$\$ Glycerin 1-monolaurate \$\$ Glycerol .alpha.-monolaurate \$\$ Glycerol 1-monolaurate \$\$ Glyceryl monododecanoate \$\$ Glyceryl monolaurate \$\$ Lauric acid .alpha.-monoglycerid	218387	000142-18-7	72
5	12.72 0.35	C:\Database\wiley7n.l Lauric anhydride \$\$ Dodecanoic acid, anhydride	321634	000645-66-9	55
		DIMETHYL CIS-1,3-CYCLOPENTANE DIACETATE \$\$ 1,3-Cyclopentane diacetic acid, dimethyl ester, cis- (CAS)	135543	055409-56-8	50
		Dodecanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester	218388	000142-18-7	40
6	19.43 1.31	C:\Database\wiley7n.l Dodecanoic acid, 1,2,3-propanetriol ester \$\$ Laurin, tri- \$\$ Glycerol trilaurate \$\$ Glyceryl tridodecanoate \$\$ Glyceryl trilaurate \$\$ Lauric acid triglyceride \$\$ Lauric acid triglycerin ester \$\$ Trilaurin \$\$ Glycerin trilaurate	384822	000538-24-9	90
		Dodecanoic acid, 1,2,3-propanetriol ester	384824	000538-24-9	90
		6-oxo-3-benzoyl-1,2-dicarbomethoxyindeno[2,1-g]indolixine	350839	000000-00-0	78

7	19.70	8.12	C:\Database\wiley7n.l Lauric anhydride Dodecanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester Dodecanoic acid, ethenyl ester Lauric acid, vinyl ester Vinyl laurate Vinyl dodecanoate	321633 384824 154363	000645-66-9 000538-24-9 002146-71-6	87 46 43
8	19.98	16.96	C:\Database\wiley7n.l Lauric anhydride 4-Dibenzofuranamine 4-Aminodibenzofuran 5-(N-methyl-N-t-butylaminomethylene)-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione 1,3-Dioxane-4,6-dione, 5-[[1,1-dimethylethyl)methylamino]methylene]-2,2-dimethyl- (CAS)	321633 91230 174970	000645-66-9 050548-43-1 096994-21-7	70 38 38
9	20.16	3.50	C:\Database\wiley7n.l Dodecanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester Dodecanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester Laurin, tri- Glycerol trilaurate Glyceryl tridodecanoate Glyceryl trilaurate Lauric acid triglyceride Lauric acid triglycerin ester Trilaurin Glycerin trilaurate 9-Ethoxy-7-phenyl-3-tert-butyl-2,3,4,4a,5,6-hexahydro-1H-pyrido[1,2-a][1,8]naphthridin-5,5,8-tricarbonitrile	384824 384822 350862	000538-24-9 000538-24-9 000000-00-0	91 90 78
10	20.34	4.16	C:\Database\wiley7n.l Dodecanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester Dodecanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester Laurin, tri- Glycerol trilaurate Glyceryl tridodecanoate Glyceryl trilaurate Lauric acid triglyceride Lauric acid triglycerin ester Trilaurin Glycerin trilaurate	384824 384822	000538-24-9 000538-24-9	91 83

		cid triglycerin ester \$\$ Trilaurin \$\$ Glycerin trilaurate Lauric anhydride	321633	000645-66-9	81
11	20.50 3.34	C:\Database\wiley7n.1 Dodecanoic acid, 1,2,3-propanetriy l ester	384824	000538-24-9	91
		Dodecanoic acid, 1,2,3-propanetriy l ester \$\$ Laurin, tri- \$\$ Glycero l trilaurate \$\$ Glyceryl tridodeca noate \$\$ Glyceryl trilaurate \$\$ La uric acid triglyceride \$\$ Lauric a cid triglycerin ester \$\$ Trilaurin \$\$ Glycerin trilaurate	384822	000538-24-9	83
		6-oxo-3-benzoyl-1,2-dicarbomethoxy indeno[2,1-g]indolixine	350839	000000-00-0	72

