

**SINTESIS MINYAK DIASILGLISEROL (DAG) MELALUI
KOMBINASI PARSIAL HIDROLISIS DAN PARSIAL
ESTERIFIKASI MENGGUNAKAN BIOKATALIS
TERIMMOBILISASI DALAM REAKTOR HOLLOW FIBER
MEMBRAN**

SKRIPSI

**DIANDRA NOVITA
0606076261**



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS TEKNIK
PROGRAM STUDI TEKNIK KIMIA
DEPOK
JULI 2010**

**SINTESIS MINYAK DIASILGLISEROL (DAG) MELALUI
KOMBINASI PARSIAL HIDROLISIS DAN PARSIAL
ESTERIFIKASI MENGGUNAKAN BIOKATALIS
TERIMMOBILISASI DALAM REAKTOR HOLLOW FIBER
MEMBRAN**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana

**DIANDRA NOVITA
0606076261**



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS TEKNIK
PROGRAM STUDI TEKNIK KIMIA
DEPOK
JULI 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Diandra Novita

NPM : 0606076261

Tanda Tangan : 

Tanggal : 5 Juli 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Diandra Novita
NPM : 060607621
Program Studi : Teknik Kimia
Judul Skripsi : Sintesis Minyak Diasilgliserol (DAG) Melalui Kombinasi Parsial Hidrolisis dan Parsial Esterifikasi Menggunakan Biokatalis Terimmobilisasi dalam Reaktor Hollow Fiber Membran

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana 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 : Ir. Dianursanti, MT ()

Penguji : Tania Surya Utami, ST, MT ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 5 Juli 2010

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT karena atas berkat dan rahmat-Nya skripsi ini dapat diselesaikan tepat pada waktunya. Skripsi dengan judul **“Sintesis Minyak Diasilgliserol (DAG) Melalui Kombinasi Parsial Hidrolisis dan Parsial Esterifikasi Menggunakan Biokatalis Terimmobilisasi dalam Reaktor Hollow Fiber Membran”** ini disusun sebagai salah satu persyaratan akademis untuk meraih gelar Sarjana Teknik di Departemen Teknik Kimia FTUI.

Dalam proses pendalaman materi skripsi ini, tentunya penulis banyak mendapatkan bimbingan, arahan, koreksi dan saran, untuk itu rasa terima kasih yang dalam-dalamnya penulis sampaikan kepada :

1. Dr. Heri Hermansyah, ST., M.Eng selaku pembimbing skripsi atas segala ide, kritik, serta sarannya kepada penulis.
2. Prof. Dr. Ir. Widodo W. Purwanto, DEA, selaku Ketua Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia.
3. Ir. Praswasti P. D. K. Wulan selaku pembimbing akademik.
4. Mang Jajat, Mang Ijal, Mbak Fita, Ius, Mas Sriyono, Mas Taufik dan semua karyawan DTK yang selalu membantu penulis.
5. Mama dan Ayah yang selalu mendampingi, memberikan nasihat, dan membantu, baik secara moril maupun materiil.
6. Herry atas perhatian, dukungan dan motivasi dalam menyelesaikan skripsi ini. *You are my nothing, and nothing last forever.*
7. Daus sebagai partner penelitian, serta Fajar, Ayu, Arya, Mei, Fadli, Didit yang telah banyak membantu.
8. Teman-teman Teknik Kimia UI angkatan 2006 atas suka dan duka selama ini.
9. Pihak-pihak lainnya yang mendukung dan membantu yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

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

Depok, 5 Juli 2010

Penulis



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

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

Nama : Diandra Novita
NPM : 06060676261
Program Studi : Teknik Kimia
Departemen : Teknik Kimia
Fakultas : Teknik
Jenis karya : Skripsi

demikian 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 :

Sintesis Minyak Diasilgliserol (DAG) Melalui Kombinasi Parsial Hidrolisis dan Parsial Esterifikasi Menggunakan Biokatalis Terimmobilisasi dalam Reaktor Hollow Fiber Membran

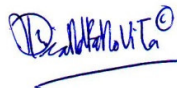
berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 5 Juli 2010

Yang menyatakan



(Diandra Novita)

ABSTRAK

Nama : Diandra Novita
Program Studi : Teknik Kimia
Judul : Sintesis Minyak Diasilgliserol (DAG) Melalui Kombinasi Parsial Hidrolisis dan Parsial Esterifikasi Menggunakan Biokatalis Terimmobilisasi dalam Reaktor Hollow Fiber Membran

Mengonsumsi minyak diasilgliserol (DAG) dapat mencegah akumulasi lemak dan obesitas. Penelitian ini meneliti tentang teknologi produksi minyak DAG satu tahap dari minyak kelapa sawit menggunakan kombinasi parsial hidrolisis dan parsial esterifikasi menggunakan biokatalis terimmobilisasi di dalam sebuah bioreaktor hollow fiber membran. Hasil dari reaksi parsial hidrolisis digunakan sebagai umpan reaksi parsial esterifikasi untuk meningkatkan yield minyak DAG. Pengaruh konfigurasi arah aliran minyak dalam sintesis tidak signifikan. Semakin besar konsentrasi enzim yang digunakan, meningkatkan yield minyak DAG yang dihasilkan. Melalui studi laju alir minyak, diperoleh bahwa pada konsentrasi biokatalis 5 mg/mL dan laju alir optimum 0,05 mL/ dihasilkan minyak DAG dengan kemurnian 79,19%.

Kata kunci:
DAG, hidrolisis, esterifikasi, biokatalis, laju alir.

ABSTRACT

Name : Diandra Novita
Study Program : Chemical Engineering
Tittle : Synthesis of Diacylglycerol (DAG) Oil by Combination of Partial Hydrolysis and Partial Esterification Using Immobilized Biocatalyst In Hollow Fiber Membrane Reactor

Consumption of Diacylglycerol (DAG) oil can prevent fat accumulation and obesity. This research investigated one step DAG oil production technology from palm oil by a combination of the partial hydrolysis and partial esterification reaction using immobilized biocatalyst in a hollow fiber membrane bioreactor. The result of partial hydrolysis is used to be the feed of partial esterification reaction to increase the yield of DAG oil. The effect of configuration of oil flow direction in the synthesis process is not significant. Higher enzyme concentration increased the yield of DAG oil produced. Through the study of oil flow rate, obtained that by using 5 mg/mL biocatalyst concentration and 0,05 mL/s as optimum flow rate can produce 79,19% DAG Oil purity.

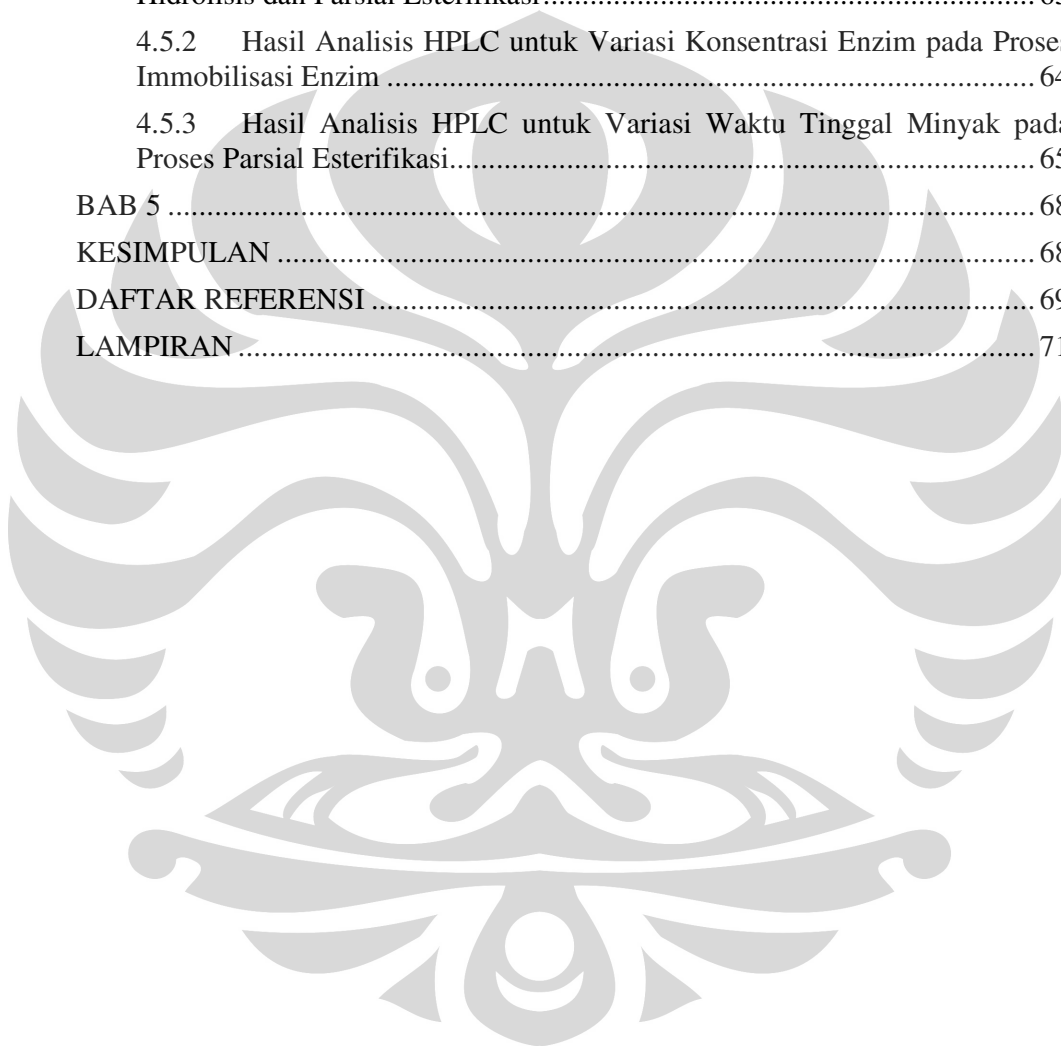
Keywords:
DAG, hydrolysis, esterification, biocatalyst, flow rate.

DAFTAR ISI

SKRIPSI.....	1
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	vi
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB 1	1
PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Batasan Penelitian.....	3
1.5 Sistematika Penulisan	3
BAB 2	5
TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Diasilgliserol	5
2.1.1 Keberadaan Diasilgliserol di Alam	6
2.1.2 Definisi Minyak Goreng Diasilgliserol.....	6
2.1.3 Karakteristik Minyak Diasilgliserol	7
2.1.4 Sifat Fisika-Kimia Minyak Diasilgliserol.....	7
2.1.5 Fungsi Menguntungkan Minyak Diasilgliserol.....	9
2.1.6 Pencernaan, Penyerapan dan Metabolisme Diasilgliserol	12
2.2 Produksi Diasilgliserol Secara Enzimatis	14
2.2.1 Produksi Diasilgliserol pada Reaktor Batch Berpengaduk.....	15
2.2.2 Produksi DAG di Packed-Bed Bioreactor	19
2.2.3 Kesimpulan Mengenai Produksi Enzimatis DAG.....	21
2.3 Hidrolisis.....	22
2.4 Esterifikasi.....	23
2.5 Enzim Lipase sebagai Biokatalis.....	24

2.6	Immobilisasi Enzim	25
2.6.1	Metode Immobilisasi Enzim	26
2.6.2	Metode Adsorpsi Biokatalis dalam Hollow Fiber Membran	28
2.7	Hollow Fiber Membran Reaktor	28
2.7.1	Hollow Fiber Membran	28
2.7.2	Aplikasi Hollow Fiber Membran dalam Industri	29
2.7.3	Immobilisasi Enzim dalam Reaktor Hollow Fiber Membran	29
2.7.4	Keuntungan Immobilisasi Enzim dalam Reaktor Hollow Fiber Membran.....	30
BAB 3	32
METODOLOGI PENELITIAN	32
3.1	Alur Penelitian.....	32
3.2	Alat dan Bahan Percobaan	34
3.2.1	Alat Percobaan	34
3.2.2	Bahan Percobaan	36
3.3	Prosedur Percobaan	38
3.3.1	Percobaan Penentuan Enzim <i>Loading</i>	38
3.3.2	Percobaan Immobilisasi Biokatalis	40
3.3.3	Reaksi Hidrolisis	42
3.3.4	Reaksi Esterifikasi	43
BAB 4	46
HASIL DAN PEMBAHASAN	46
4.1	Desain Reaktor	46
4.1.1	Desain Sistem Reaktor Overall	46
4.1.2	Desain Reaktor Hollow Fiber Membran.....	47
4.1.3	Detail Desain Sistem Reaksi Dalam Reaktor Hollow Fiber Membran	48
4.2	<i>Preliminary Experiment</i>	50
4.2.1	Hasil Tes Kebocoran.....	50
4.2.2	Hasil Tes Stabilitas Temperatur	52
4.2.3	Hasil Tes Aliran Fluida.....	53
4.3	Immobilisasi Biokatalis	54
4.3.1	Kurva Kalibrasi untuk Penentuan Enzim <i>Loading</i>	54
4.3.2	Hasil Perhitungan Enzim <i>Loading</i>	55
4.4	Hasil Reaksi Hidrolisis dan Esterifikasi	57

4.4.1 Hasil Variasi Konfigurasi Arah Aliran pada Proses Parsial Hidrolisis dan Parsial Esterifikasi.....	59
4.4.2 Hasil Variasi Konsentrasi Enzim pada Proses Immobilisasi Enzim.....	60
4.4.3 Hasil Variasi Waktu Tinggal Minyak pada Proses Parsial Esterifikasi.....	60
4.5 Hasil Analisis HPLC.....	61
4.5.1 Hasil Analisis HPLC untuk Variasi Konfigurasi pada Proses Parsial Hidrolisis dan Parsial Esterifikasi.....	63
4.5.2 Hasil Analisis HPLC untuk Variasi Konsentrasi Enzim pada Proses Immobilisasi Enzim.....	64
4.5.3 Hasil Analisis HPLC untuk Variasi Waktu Tinggal Minyak pada Proses Parsial Esterifikasi.....	65
BAB 5	68
KESIMPULAN	68
DAFTAR REFERENSI	69
LAMPIRAN	71



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1. Struktur Diasilgliserol (Yasukawa, 2004)	5
Gambar 2. 2. Penyusunan kristal dari sn-1,3-DAG bentuk β dan sn-1,2-DAG bentuk β' (Seong, 2007)	9
Gambar 2. 3. Perbedaan efek DAG dan TAG pada konsentrasi TAG dalam serum darah setelah makan (Tada, 2001)	10
Gambar 2. 4. Persen perubahan rata-rata \pm SEM pada berat badan dari basis diantara subjek yang ditandai untuk kelompok minyak DAG dan minyak TAG. Nilai-P mewakili hasil dari perulangan pengukuran ANOVA (Maki, 2002)	11
Gambar 2. 5. Analisis produk pencernaan (Watanabe, 1997)	13
Gambar 2. 6. Karakteristik metabolisme DAG pada perbandingan dengan TAG	14
Gambar 2. 7. Reaksi esterifikasi menggunakan 1,3-regioselektif lipase (Hirota, 1988)	15
Gambar 2. 8. Diagram penggunaan reaktor batch berpengaduk untuk reaksi esterifikasi mensintesis diasilgliserol.....	16
Gambar 2. 9. Laju reaksi esterifikasi menggunakan lipase yang diimmobilisasi dimulai dengan 2,59M asam lemak dan 1,29M gliserol. Reaksi dilakukan pada 50°C dan rasio molar asam lemak terhadap gliserol sebesar 2,0 dan konsentrasi resin enzim yang diimmobilisasi 5% (basis berat kering). Pembuangan air dilakukan pada keadaan vakum 3 mmHg. (\square),Asam lemak; (\blacktriangle),1-MAG; (\triangle),2-MAG; (\bullet),1,3-DAG; (\circ),1,2(2,3)-DAG; (\blacklozenge),TAG. (Data dari referensi Watanabe (2003), simulasi tidak ditunjukkan).....	17
Gambar 2. 10. Efek kondisi vakum pada sintesis 1,3-DAG. Reaksi dilakukan pada 50°C dan rasio molar asam lemak terhadap gliserol sebesar 2,0 dan konsentrasi resin enzim yang diimmobilisasi 5% (basis berat kering). Pembuangan air dilakukan pada keadaan vakum 1 mmHg(\triangle),3 mmHg (\bullet), 6 mmHg (\diamond), 10 mmHg (\blacksquare). (Watanabe, 2003).	18
Gambar 2. 11. Diagram Packed-Bed Reactor yang digunakan untuk reaksi esterifikasi untuk sintesis diasilgliserol (Yamada, 2005)	20
Gambar 2. 12. Reaksi hidrolisis senyawa ester. (www.smapgii1.sch.id).....	22
Gambar 2. 13. Penyerangan gugus karbonil pada senyawa ester (www.smapgii1.sch.id)	23
Gambar 2. 14. Mekanisme reaksi hidrolisis ester. (www.smapgii1.sch.id)	23
Gambar 2. 15. Tahapan reaksi hidrolisis trigliserida. (www.smapgii1.sch.id)....	23
Gambar 2. 16. Reaksi esterifikasi suatu asam karboksilat secara umum. (http://library.usu.ac.id).....	24
Gambar 2. 17. Reaksi esterifikasi dan hidrolisis dari gliserol. (Watanabe, 2004)	24
Gambar 2. 18. Skema metode adsorpsi (Immobilization of Enzyme and Cells, 2006)	28
Gambar 2. 19. Reaktor hollow fiber membran	30
Gambar 3. 1. Diagram alir penelitian	32
Gambar 3. 2. Reaktor hollow fiber membran	34

Gambar 3. 3. Botol sampel	34
Gambar 3. 4. Beaker glass	34
Gambar 3. 5. UV Spektrofotometer	35
Gambar 3. 6. Pipet tetes.....	35
Gambar 3. 7. pH meter	35
Gambar 3. 8. Termometer.....	35
Gambar 3. 9. Timbangan	35
Gambar 3. 10. Pompa peristaltik.....	36
Gambar 3. 11. Stopwatch	36
Gambar 3. 12. Unit HPLC	36
Gambar 3. 13. Selang silikon.....	36
Gambar 3. 14. Candida rugosa lipase.....	37
Gambar 3. 15. Porcine pancreas lipase.....	37
Gambar 3. 16. Minyak goreng	37
Gambar 3. 17. Gliserol	37
Gambar 3. 18. Buffer phosphate	37
Gambar 3. 19. Lowry reagent	38
Gambar 3. 20. Phenol reagent.....	38
Gambar 3. 21. Bovine serum albumin.....	38
Gambar 3. 22. Proses pembuatan larutan enzim.....	40
Gambar 3. 23. Pengukuran konsentrasi enzim dengan metode Lowry	41
Gambar 3. 24. Proses immobilisasi pada reaktor hollow fiber membrane.....	41
Gambar 3. 25. Prosedur pembuatan air pemanas untuk pemanas pada reaktor...	42
Gambar 3. 26. Prosedur reaksi hidrolisis pada reaktor hollow fiber membran ...	43
Gambar 3. 27. Prosedur reaksi esterifikasi pada reaktor hollow fiber membran.	45
Gambar 4. 1. Sistem reaktor overall.....	46
Gambar 4. 2. Pemanas pada sistem reaktor	46
Gambar 4. 3. Reaktor hollow fiber membran dan hollow fiber membran	47
Gambar 4. 4. Sistem reaktor aktual	49
Gambar 4. 5. Sistem reaktor 2 dimensi	50
Gambar 4. 6. Tes kebocoran menggunakan air yang dilakukan di luar water bath	51
Gambar 4. 7. BSA yang digunakan sebagai standar untuk kalibrasi konsentrasi enzim.....	54
Gambar 4. 8. Kurva kalibrasi perhitungan enzim loading.....	55
Gambar 4. 9. Sampel minyak goreng fresh yang akan digunakan sebagai reaktan untuk proses parsial hidrolisis	57
Gambar 4. 10. (a) Minyak hasil hidrolisis pertama yang diberi silica gel; (b) Silica gel yang digunakan untuk mengabsorpsi air	58
Gambar 4. 11. Minyak fresh, hasil reaksi hidrolisis dan hasil esterifikasi eksperimen pertama sebelum dilakukan pemisahan dengan asam lemak bebas yang diproduksi selama hidrolisis	59
Gambar 4. 12. Kandungan (mol/L) TAG, DAG, dan MAG pada minyak fresh yang akan digunakan sebagai reaktan untuk proses parsial hidrolisis.....	62
Gambar 4. 13. Kandungan (%) TAG, DAG, dan MAG pada minyak fresh yang akan digunakan sebagai reaktan untuk proses parsial hidrolisis	62

Gambar 4. 14. Perbandingan konsentrasi TAG (☒), DAG (□), dan MAG (■) pada eksperimen variasi konfigurasi..... 64
Gambar 4. 15. Perbandingan konsentrasi TAG (☒), DAG (□), dan MAG (■) pada eksperimen variasi konsentrasi enzim 65
Gambar 4. 16. Hubungan antara waktu tinggal minyak pada proses parsial esterifikasi dengan konsentrasi TAG(○), DAG (●) dan MAG (Δ) pada produk minyak..... 66

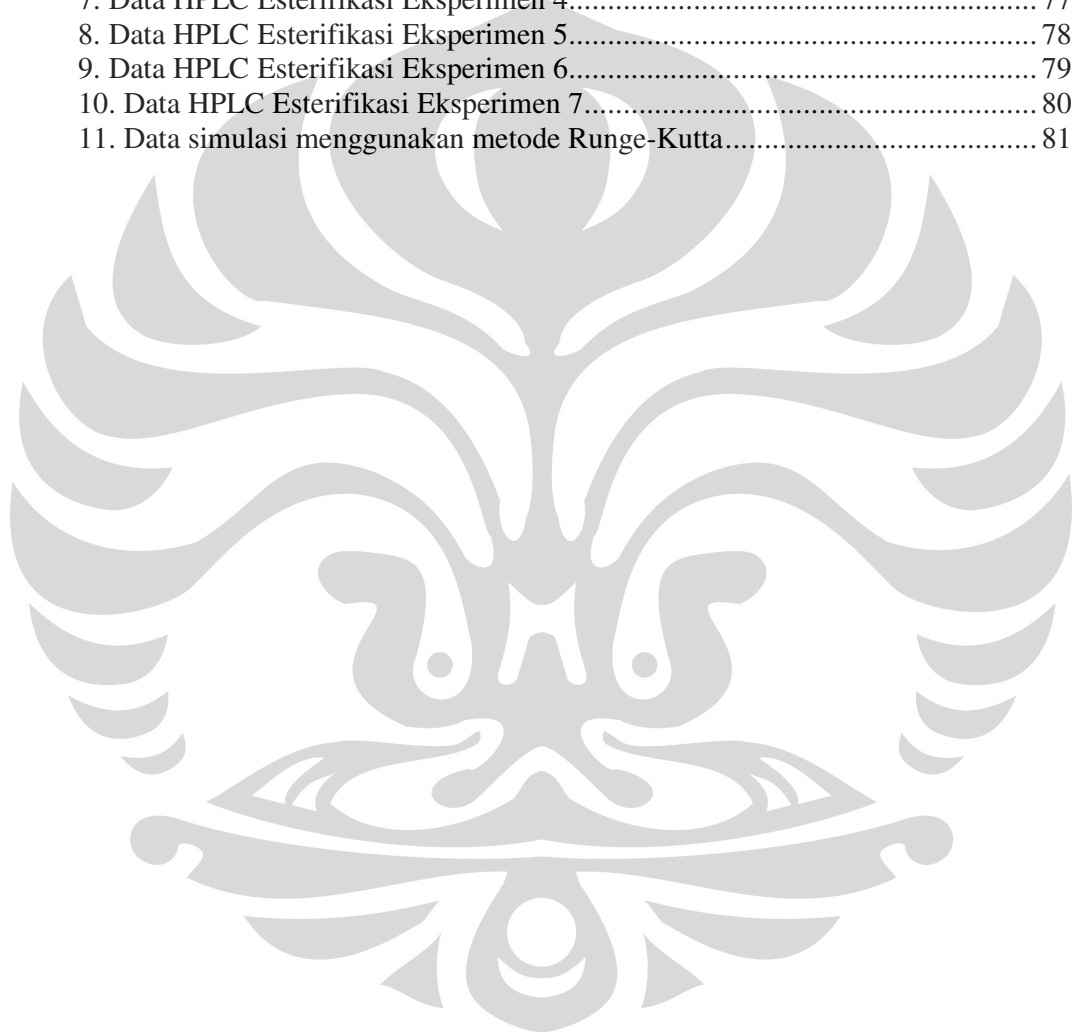


DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1. Kandungan asilgliserol (dalam % berat) pada minyak makan dari berbagai sumber.....	6
Tabel 2. 2. Kandungan minyak goreng DAG (Nishide, 2004).....	7
Tabel 2. 3. Perbandingan kandungan gliserida, asam lemak, dan tocopherol dalam minyak.....	8
Tabel 2. 4. Sifat fisika-kimia minyak DAG dan minyak TAG (Nakajima, 2004)..	8
Tabel 2. 5. Perubahan kondisi tubuh dari pria yang mengkonsumsi minyak DAG dan TAG selama	12
Tabel 2. 6. Komposisi asam lemak	16
Tabel 2. 7. Hasil produksi diasilgliserol dalam <i>Packed-Bed Reactor</i> (Yamada, 2005).....	21
Tabel 3. 1. Bahan-bahan yang digunakan untuk membuat kurva kalibrasi	39
Tabel 4. 1. Spesifikasi bioreaktor hollow fiber membran	48
Tabel 4. 2. Total Luas dan Volume Lumen Hollow Fiber	48
Tabel 4. 3. Data enzim loading pada reaktor.....	56
Tabel 4. 4. Data kondisi konfigurasi arah aliran minyak pada proses parsial hidrolisis dan parsial	60
Tabel 4. 5. Data kondisi operasi variasi konsentrasi enzim pada proses immobilisasi enzim.....	60
Tabel 4. 6. Data kondisi operasi variasi laju alir minyak pada proses parsial esterifikasi	61
Tabel 4. 7. Hasil analisis HPLC pada minyak produk dengan variasi konfigurasi arah aliran.....	63
Tabel 4. 8. Persentase komposisi TAG, DAG, dan MAG, serta kemurnian DAG pada variasi.....	63
Tabel 4. 9. Hasil analisis HPLC pada minyak produk dengan variasi konsentrasi enzim pada.....	64
Tabel 4. 10. Persentase komposisi TAG, DAG, dan MAG, serta kemurnian DAG pada variasi.....	65
Tabel 4. 11. Hasil analisis HPLC pada minyak produk dengan variasi laju alir minyak pada	66
Tabel 4. 12. Persentase komposisi TAG, DAG, dan MAG, serta kemurnian DAG pada variasi laju	66

DAFTAR LAMPIRAN

1. Contoh perhitungan volume reaktor	71
2. Data HPLC standar dan minyak fresh.....	72
3. Data HPLC Hidrolisis dan Esterifikasi Eksperimen 1	73
4. Data HPLC Hidrolisis dan Esterifikasi Eksperimen 2.....	74
5. Data HPLC Hidrolisis Eksperimen 3-7.....	75
6. Data HPLC Esterifikasi Eksperimen 3.....	76
7. Data HPLC Esterifikasi Eksperimen 4.....	77
8. Data HPLC Esterifikasi Eksperimen 5.....	78
9. Data HPLC Esterifikasi Eksperimen 6.....	79
10. Data HPLC Esterifikasi Eksperimen 7.....	80
11. Data simulasi menggunakan metode Runge-Kutta.....	81



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diasilgliserol adalah komponen alami dari berbagai minyak (terutama minyak nabati) yang dapat dimakan dan biasanya digunakan di makanan sebagai emulsifier. Manusia secara tidak sadar telah mengkonsumsi diasilgliserol (DAG) sejak bertahun-tahun yang lalu. Namun komposisi DAG dalam minyak nabati sangatlah rendah. Studi klinis yang dilakukan oleh para peneliti menunjukkan bahwa diasilgliserol, khususnya pada isomer 1,3, memiliki efek metabolisme yang berbeda dengan minyak konvensional yang kaya akan triasilgliserol (TAG).

Pada awal 1999, Kao memperkenalkan sebuah penerapan baru minyak diasilgliserol (DAG) kepada konsumen Jepang. Peneliti di Kao telah menemukan bahwa minyak DAG memiliki karakteristik metabolik yang berbeda dari minyak konvensional yang mengandung triasilgliserol (TAG). Dengan mengkonsumsi minyak DAG diklaim dapat mengurangi tingkat postprandial serum TAG dan dengan demikian menguntungkan bagi pencegahan dan pengelolaan obesitas. DAG sering digunakan dalam diet lemak karena memiliki efek yang menguntungkan sehubungan dengan pencegahan dan manajemen obesitas dan postprandial lipemia (peningkatan kadar lemak tubuh secara berlebihan setelah makan). (Tada, 2003)

Teknologi produksi minyak DAG yang berkembang di Jepang saat ini terdiri dari dua step yaitu hidrolisis minyak kelapa sawit menggunakan teknologi Colgate-Emmery dan dilanjutkan dengan proses esterifikasi FFA dengan gliserol menggunakan teknologi biokatalis. Teknologi produksi yang dua step ini mengakibatkan harga minyak goreng DAG sangat mahal yaitu 11 kali lipat minyak goreng konvensional.

Untuk mengatasi masalah ini, proses produksi minyak DAG dua step teknologi dapat diganti menjadi satu step produksi dimana dilakukan dengan mengombinasikan reaksi parsial hidrolisis dan parsial esterifikasi. Proses sintesis minyak DAG melalui reaksi hidrolisis dan esterifikasi memerlukan katalis. Katalis memegang peranan yang sangat penting dalam proses pembuatan minyak DAG.

Katalis digunakan untuk memecahkan minyak TAG dan melepaskan *fatty acid*. Pemakaian katalis dapat mempengaruhi reaksi yang terjadi antara minyak dengan air pada proses hidrolisis dan minyak dengan alkohol pada proses esterifikasi. Tanpa adanya katalis reaksi akan berjalan dengan sangat lambat.

Biokatalis yang sering digunakan dalam proses sintesis adalah enzim lipase. Penggunaan enzim lipase ini dapat dilakukan pada temperatur yang tidak terlalu ekstrim dan menghasilkan konversi yang cukup tinggi. Selain itu, enzim lipase juga dapat mengarahkan reaksi secara spesifik tanpa adanya reaksi samping yang tidak diinginkan (Gupta dan Roy, 2004). Oleh karena itu penelitian ini dilakukan dengan menggunakan kombinasi enzim *Candida Rugosa Lipase* dan *Porcine Pancreas Lipase*.

Oleh karena itu penelitian ini dilakukan dengan merubah dan mengkombinasikan teknologi produksi dua step menjadi satu step langsung dari kelapa sawit dengan cara kombinasi proses parsial hidrolisis dan parsial esterifikasi menggunakan teknologi biokatalis yang diimobilisasi dalam hollow fiber membran reaktor. Reaktor hollow fiber membran digunakan untuk melakukan proses sintesis secara kontinyu. Hal ini disebabkan penggunaan reaktor kontinyu yang memberikan banyak keuntungan daripada penggunaan reaktor *batch*. Dengan penggunaan reaktor kontinyu maka produk yang dihasilkan lebih cepat sehingga bila dilihat segi ekonomi lebih menguntungkan. Analisis yang dilakukan pada reaktor kontinyu akan lebih mudah untuk pergantian kondisi dan penggunaan reaktor kontinyu hanya dijalankan satu kali operasi sehingga lebih efisien dan ekonomis. Hasil penelitian ini diharapkan mampu menghasilkan minyak goreng yang memiliki kandungan DAG dengan yield yang tinggi dengan biaya produksi yang rendah.

1.2 Rumusan Masalah

Teknologi produksi Kao Corp. yang terdiri dari dua step proses mengakibatkan harga minyak goreng DAG sangat mahal yaitu 11 kali lipat minyak goreng konvensional. Dengan harga yang semahal itu pun, permintaan minyak DAG di Jepang terus meningkat karena khasiat minyak DAG yang baik bagi kesehatan.

Dalam rangka membuat minyak DAG dengan harga yang lebih murah, maka penelitian ini mengusulkan untuk merubah teknologi produksi dua step menjadi satu step langsung dari kelapa sawit dengan cara kombinasi proses parsial hidrolisis dan parsial esterifikasi menggunakan teknologi biokatalis yang diimobilisasi dalam hollow fiber membran reaktor. Keberhasilan penelitian ini diharapkan mampu menghasilkan minyak goreng yang memiliki kandungan DAG mendekati kandungan DAG yang sudah dihasilkan oleh Kao Corp. di Jepang dengan harga yang jauh lebih murah.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilaksanakannya penelitian ini adalah:

- Mendapatkan teknologi produksi minyak goreng DAG yang lebih murah dibanding teknologi yang dipakai oleh Kao Corp.
- Menghasilkan produk diasilgliserol dengan konversi dan yield maksimal dengan sistem reaktor hollow fiber membran melalui reaksi hidrolisis dilanjutkan dengan reaksi esterifikasi.
- Mendapatkan kondisi operasi yang optimum untuk menghasilkan 1,3-diasilgliserol.

1.4 Batasan Penelitian

Batasan-batasan yang digunakan adalah :

- Minyak yang digunakan berasal dari minyak nabati, minyak goreng yang berasal dari kelapa sawit.
- Reaktor yang digunakan merupakan reaktor hollow fiber membran.
- Enzim yang digunakan adalah kombinasi enzim *Candida Rugosa Lipase* dan *Porcine Pancreas Lipase*.
- Reaksi yang akan digunakan yaitu hidrolisis dan esterifikasi.

1.5 Sistematika Penulisan

Sistematika penulisan yang digunakan dalam makalah seminar ini adalah:

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 teori yang menjadi dasar penelitian ini.

BAB III : METODE PENELITIAN

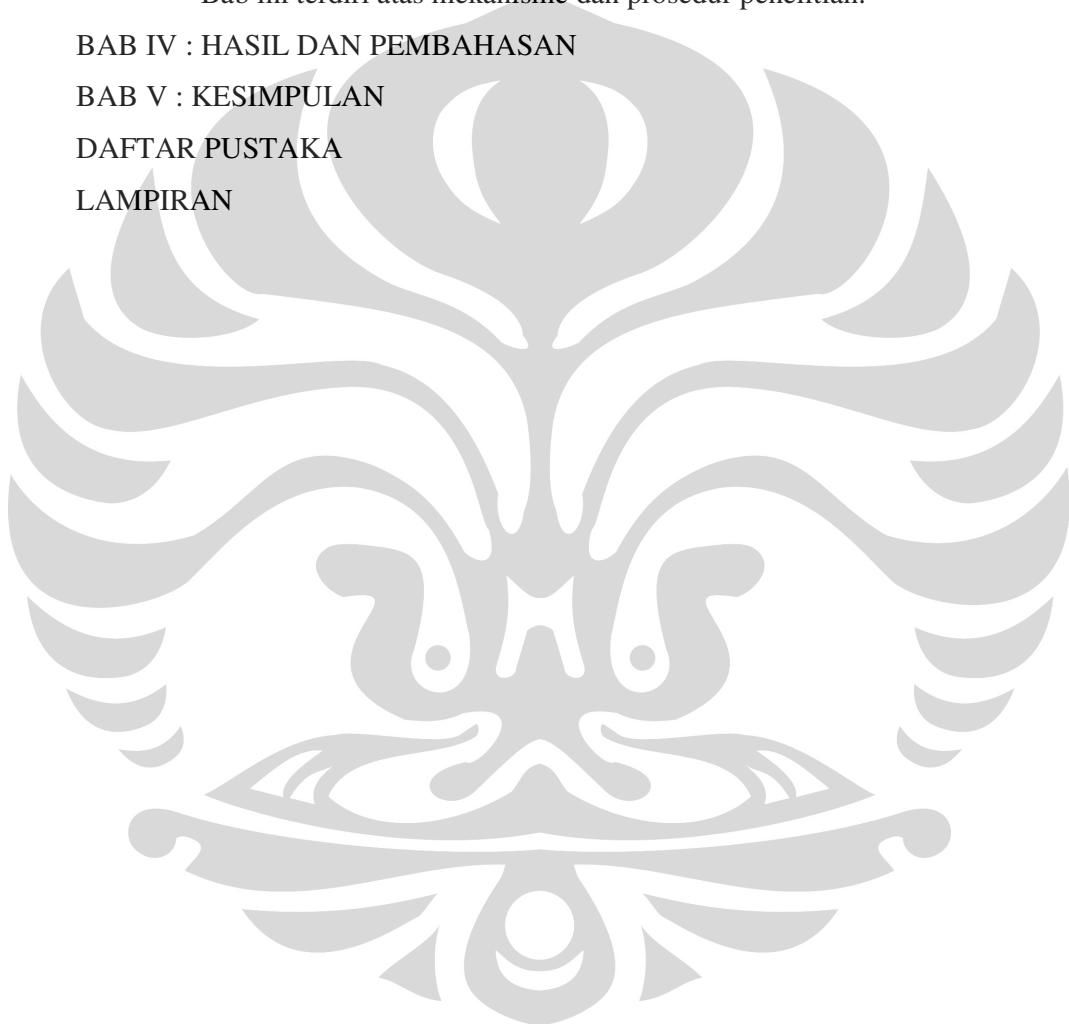
Bab ini terdiri atas mekanisme dan prosedur penelitian.

BAB IV : HASIL DAN PEMBAHASAN

BAB V : KESIMPULAN

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

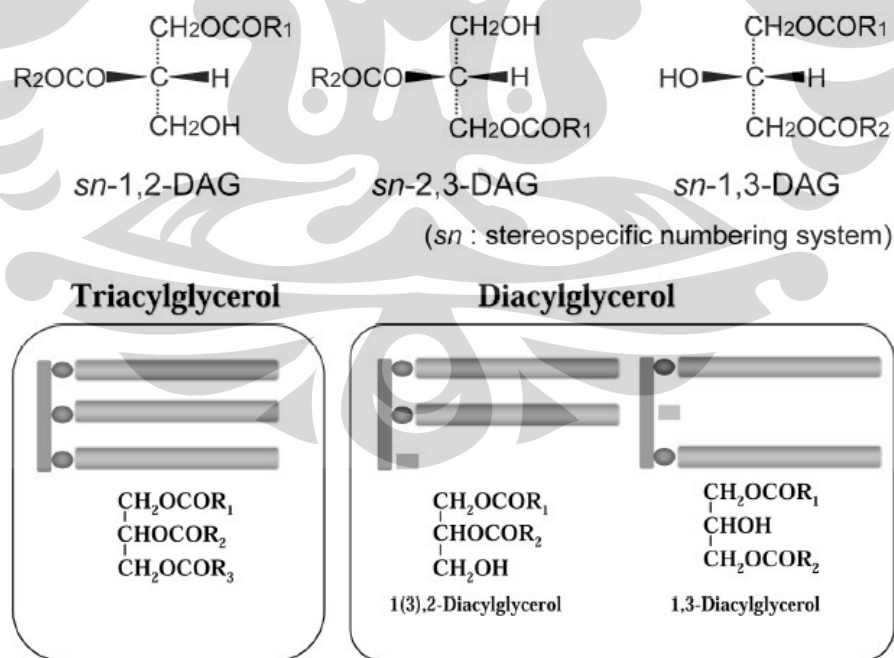


BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diasilgliserol

Diasilgliserol (DAG) adalah satu dari asilgliserol yang merupakan komponen alami dari lemak hewani dan nabati yang terdapat dalam berbagai minyak yang dapat dimakan, selain Monoasilgliserol (MAG), dan Triasilgliserol (TAG). Tubuh manusia juga memproduksi DAG, sebagai hasil dari pencernaan TAG. DAG telah lama digunakan dan ditambahkan dalam makanan sebagai emulsifier.

DAG terdiri dari dua isoform, yaitu, *sn*-1,2(2,3)-diasilgliserol (1,2-DAG) dan *sn*-1,3-diasilgliserol (1,3-DAG) seperti ditunjukkan pada Gambar 2.1. Isoform 1,2-DAG diakui sebagai perantara metabolik yang terbentuk setelah pencernaan dari TAG. DAG yang terkandung dalam minyak nabati sebagian besar dikonversi menjadi 1,3-isoform oleh perpindahan dari gugus asil selama proses produksi dalam suhu tinggi.



Gambar 2. 1. Struktur Diasilgliserol (Yasukawa, 2004)

2.1.1 Keberadaan Diasilgliserol di Alam

TAG adalah unsur pokok paling banyak dari minyak yang dapat dimakan. Namun demikian, minyak nabati umumnya mengandung sekitar 10% DAG, dengan jumlah yang relatif, tergantung dari bahan baku minyak tersebut. Kandungan DAG dari berbagai minyak makan telah dilaporkan. Dalam kebanyakan minyak nabati yang bisa dikonsumsi, sekitar 70% (w/w) dari DAG hadir sebagai 1,3-isoform seperti ditunjukkan pada Tabel 2.1.

Tabel 2. 1. Kandungan asilgliserol (dalam % berat) pada minyak makan dari berbagai sumber (Yasukawa, 2004)

	TAG	DAG			MAG	Lain-lain
		Total DAG	1,2-DAG	1,3-DAG		
						(g/100 g)
Kacang kedelai	97,9	1,0	TD	TD	0,0	1,1
Sawit	93,1	5,8	TD	TD	<DL	1,1
Biji kapas	87,0	9,5	TD	TD	0,2	3,3
Jagung	95,8	2,8	1,5	2,9	<DL	1,4
<i>Safflower</i>	96,0	2,1	1,2	2,7	<DL	1,9
Zaitun	93,3	5,5	TD	TD	0,2	2,3
Zaitun (%mol)	18-41					
<i>Rapeseed</i>	96,8	0,8	TD	TD	0,1	2,3
Minyak sayur	98,3	1,7	0,6	1,1	<DL	TD
Canola	97,1	2,9	1,0	1,9	<DL	TD
Wijen	95,2	4,1	1,2	2,9	0,8	TD
Beras	92,4	7,6	2,4	5,2	<DL	TD
Minyak DAG	17,3	81,4	28,4	53,0	1,2	TD

^aAbreviation: TD, tidak ditentukan; <DL, di bawah limit deteksi (<0,1 g/100g).

2.1.2 Definisi Minyak Goreng Diasilgliserol

Minyak goreng adalah hasil akhir (*refined oils*) dari sebuah proses pemurnian minyak nabati dan terdiri dari beragam jenis senyawa trigliserida, yang berguna sebagai medium pemanas yang memiliki pengaruh dalam memberikan rasa, aroma dan tekstur makanan.

Minyak diasilgliserol merupakan minyak yang telah diperkaya dengan diasilgliserol dengan kandungan > 80% DAG, <20% TAG, <3% monoasilgliserol (MAG), dan sejumlah kecil antioksidan dan emulsifier untuk menjaga kualitas

minyak. DAG umumnya dibuat dari asam lemak yang berasal dari minyak sayur dan gliserin dengan menggunakan 1,3-regiospesifik lipase terimmobilisasi. Kandungan yang berada dalam minyak DAG ditunjukkan dalam Tabel 2.2.

Tabel 2. 2. Kandungan minyak goreng DAG (Nishide, 2004)

Minyak DAG (80% diasilgliserol)	99,42– 99,83%
Emulsifier	0,07– 0,35%
Antioksidan <i>Tocopherols</i> L-Ascorbyl palmitat	0,1– 0,23%

2.1.3 Karakteristik Minyak Diasilgliserol

Struktur diasilgliserol yang terdapat secara alami pada fosfolipid adalah sn-1,2-diasilgliserol. *Monoacylglycerol acyltransferase* (MGAT) yang berperan sebagai 2-monoasilgliserol selama proses resintesis triasilgliserol setelah konsumsi dan absorpsi lemak dan minyak lebih sering membentuk sn-1,2-diasilgliserol dibandingkan sn-2,3-diasilgliserol (Lehner, 1993). Karena migrasi terjadi di dalam minyak goreng selama penyimpanan dan pemanasan pada proses produksi untuk menghilangkan bau, rasio sn-1,2-DAG dan sn-2,3-DAG dapat mencapai 1:1 pada sejumlah DAG yang terkandung dalam minyak goreng alami dan pada minyak goreng diasilgliserol. Sifat fisika kimia minyak diasilgliserol dapat dilihat pada tabel 2.3 dengan perbandingan terhadap minyak triasilgliserol.

2.1.4 Sifat Fisika-Kimia Minyak Diasilgliserol

Minyak DAG mengandung aditif seperti antioksidan dan gliserin dalam jumlah kecil. Aditif ini mempengaruhi tegangan interfasial, nilai asam awal, dan stabilitas oksidatif minyak DAG, namun tidak mempengaruhi sifat fisika kimia minyak DAG. Distribusi komposisi asam lemak dan gliserida dari minyak DAG dan minyak goreng konvensional (TAG) ditunjukkan pada Tabel 2.3, dan sifat fisika kimianya ditunjukkan dalam Tabel 2.4. (Nakajima, 2004)

Tabel 2. 3. Perbandingan kandungan gliserida, asam lemak, dan tocopherol dalam minyak DAG dan minyak TAG (Nishide, 2004)

	Minyak DAG	Minyak TAG
Distribusi Gliserida		(%)
Triasilgliserol	13.7	94.4
Diasilgliserol	85.6	1.4
(1,2-DAG)	(28.3)	(0.6)
(1,3-DAG)	(57.3)	(0.8)
Monoasilgliserol	0.7	0.2
Komposisi Asam Lemak		(%)
C16	3.0	6.5
C18	1.3	2.8
C18:1	38.9	45.4
C18:2	47.3	33.5
C18:3	8.0	9.3
C20	0.1	0.6
C20:1	0.2	1.0
C22	0.1	0.1
C22:1	Trace	0.1

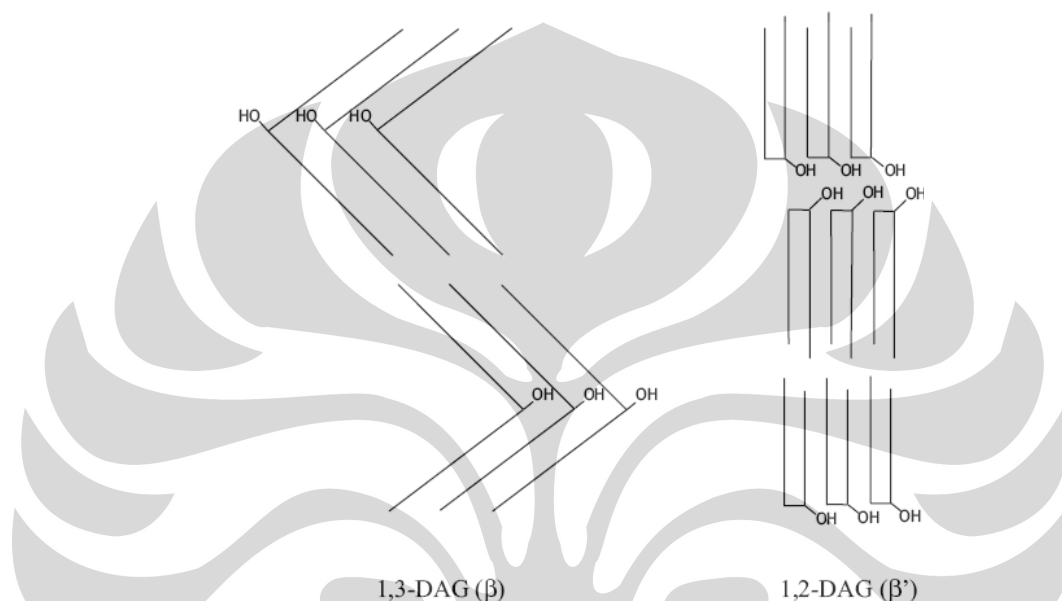
Tabel 2. 4. Sifat fisika-kimia minyak DAG dan minyak TAG (Nakajima, 2004)

Karakteristik	Minyak DAG	Minyak TAG
Specific gravity (g/mL)	8,8 °C	0,923
	20,0 °C	0,926
	30,0 °C	0,920
Viskositas (mPa.s)	8,8 °C	84,8
	20,0 °C	55,3
	30,0 °C	37,9
Melting point (°C)	-2,0	-24,0
Smoke point (°C)	220	250
Flash point (°C)	298	344
Fire point (°C)	320	354
Auto-ignition point (°C)	416	435
Tegangan permukaan (mN/m pada °C)	33,8 (33,9 ^b)	33,7
Tegangan interfacial (mN/m pada °C)	11,9 (14,6 ^b)	23,8

^b pengukuran pada DAG tanpa aditif.

Secara umum, titik leleh sn-1,3-DAG lebih tinggi 10°C dari TAG, dan titik leleh sn-1,2-DAG 10°C lebih rendah dari sn-1,3-DAG, pada komposisi lemak yang sama (Bockish,1998). Pengaruh dari perbedaan titik leleh ini terletak pada kekuatan ikatan hidrogen dari gugus hidroksil dan penyusunan rantai asam lemak dari isomer DAG. Sn-1,3-DAG memiliki susunan rantai asam lemak berbentuk V, sementara sn-1,2-DAG memiliki penyesuaian berbentuk *hairpin* (Gambar 2.2).

Jenis-jenis penyusunan molekul isomer DAG berhubungan dengan bentuk polimorfiknya. Tidak seperti polimorfik TAG, DAG memiliki 2 tipe bentuk polimorfik. Sn-1,2-DAG memiliki bentuk α dan β' tetapi tidak memiliki bentuk β , sementara sn-1,3-DAG tidak memiliki bentuk α tetapi memiliki dua bentuk β , yaitu β_1 dan β_2 yang tidak stabil. (Nakajima, 2004)



Gambar 2. 2. Penyusunan kristal dari sn-1,3-DAG bentuk β dan sn-1,2-DAG bentuk β' (Seong, 2007)

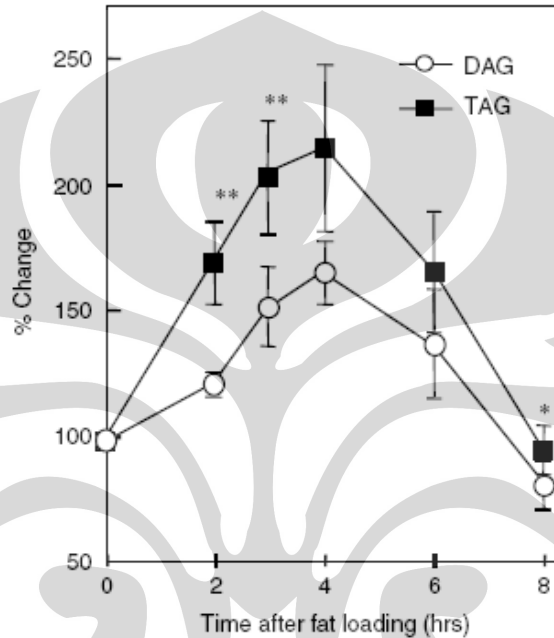
2.1.5 Fungsi Menguntungkan Minyak Diasilgliserol

Mengonsumsi minyak DAG memiliki kelebihan dibandingkan dengan mengonsumsi minyak TAG. Efek menguntungkan dari konsumsi minyak DAG ini telah diteliti oleh beberapa peneliti. Efek menguntungkan itu antara lain:

1. Postprandial lipemia yang lebih rendah.

Ketika emulsi lemak ditelan, konsentrasi TAG darah meningkat dan mencapai puncak ketinggian pada sekitar empat jam setelah menelan minyak dan menurun secara berangsur-angsur pada manusia. Peningkatan konsentrasi TAG darah setelah makan ini terlihat lebih rendah ketika minyak DAG digunakan, dibandingkan dengan minyak TAG. Efek penurunan hipertrigliseridemia (kadar gliserida dalam darah berlebih) ini adalah salah satu karakteristik DAG. TAG dalam serum adalah sumber

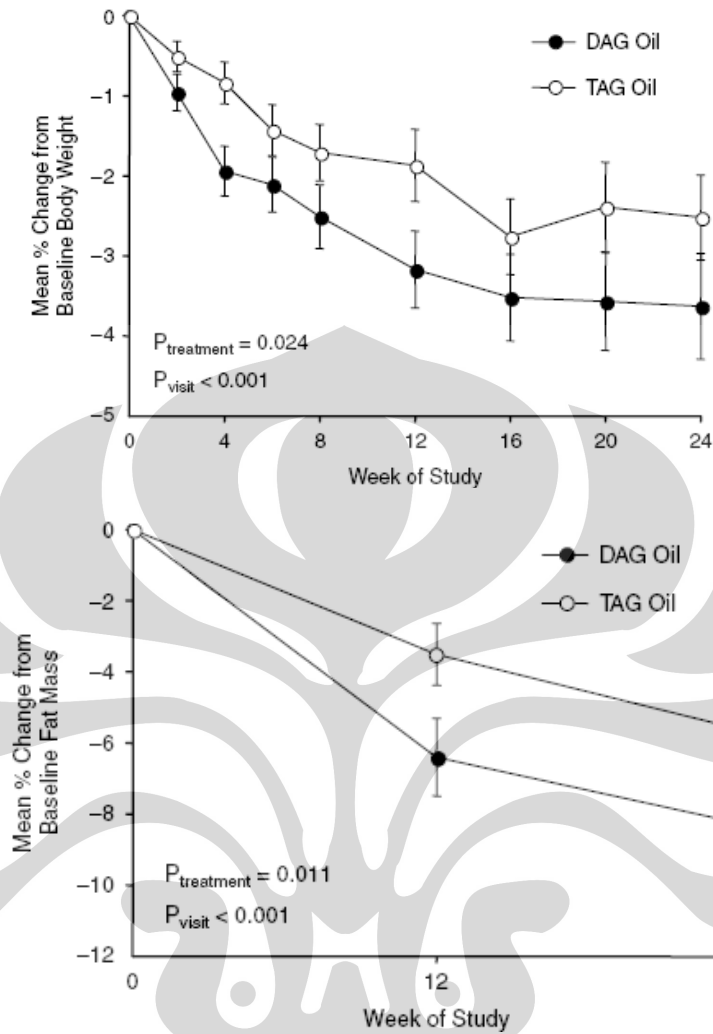
lemak yang diakumulasikan di tubuh dan hiperlipidemia setelah makan adalah faktor yang beresiko pada penyakit kardiovaskular. Gambar 2.3 memperlihatkan perubahan konsentrasi TAG dalam serum darah setelah menelan emulsi lemak tunggal pada laki-laki dewasa sehat (Tada, 2001). Kedua minyak uji memiliki komposisi asam lemak yang sama.



Gambar 2. 3. Perbedaan efek DAG dan TAG pada konsentrasi TAG dalam serum darah setelah makan (Tada, 2001)

2. Penurunan kadar lemak tubuh pada konsumsi minyak DAG pada jangka panjang.

Studi dilakukan pada subjek laki-laki dan wanita yang dikategorikan sebagai obesitas maupun kelebihan berat. *Chicago Center for Clinical Research* melakukan sebuah studi paralel *double-blind* pada 131 pria dan wanita obesitas atau kelebihan berat yang mencerna diet DAG dan TAG selama 24 minggu (Maki, 2002). Penurunan berat badan dan lemak tubuh secara signifikan lebih tinggi pada kelompok DAG daripada kelompok TAG (Gambar 2.4).



Gambar 2. 4. Persen perubahan rata-rata \pm SEM pada berat badan dari basis diantara subjek yang ditandai untuk kelompok minyak DAG dan minyak TAG. Nilai-P mewakili hasil dari perulangan pengukuran ANOVA (Maki, 2002)

Uji coba pada seekor tikus menunjukkan bahwa setelah 5 bulan melakukan diet dengan mengkonsumsi minyak dengan kandungan DAG 30% menghasilkan penurunan berat badan sebanyak 70% (Murase, 2001). Tabel 2.5 berikut menunjukkan perbedaan pengaruh dari mengkonsumsi DAG dan TAG selama 16 minggu yang diujikan pada 38 pria sehat (Nagao, 2000).

Tabel 2. 5. Perubahan kondisi tubuh dari pria yang mengkonsumsi minyak DAG dan TAG selama 16 hari (Nagao, 2000)

		Minyak DAG	Minyak TAG
Berat tubuh (kg)	Basis	72.1	68.1
	Perubahan	-2.6	-1.1
Index berat tubuh (kg/m ²)	Basis	24.1	23.5
	Perubahan	-0.9	-0.4
Lingkar pinggang (cm)	Basis	85.0	82.0
	Perubahan	-4.4	-2.5
Lingkar pinggul (cm)	Basis	97.1	96.1
	Perubahan	-1.1	-0.7
Rasio pinggal/pinggul	Basis	0.87	0.85
	Perubahan	-0.04	-0.02
Lemak tubuh (g/100g)	Basis	21.6	20.3
	Perubahan	-1.1	-1.5
Area lemak total (cm ²)	Basis	227	182
	Perubahan	-38	-17
Visceral fat area (cm ²)	Basis	79	56
	Perubahan	-16	-5
Subcutaneous fat area (cm ²)	Basis	148	126
	Perubahan	-22	-8
Visceral/subcutaneous fat ratio	Basis	0.55	0.46
	Perubahan	-0.05	0.00
Rasio hati/limpa ^a	Basis	1.24	1.23
	Perubahan	0.06	0.01

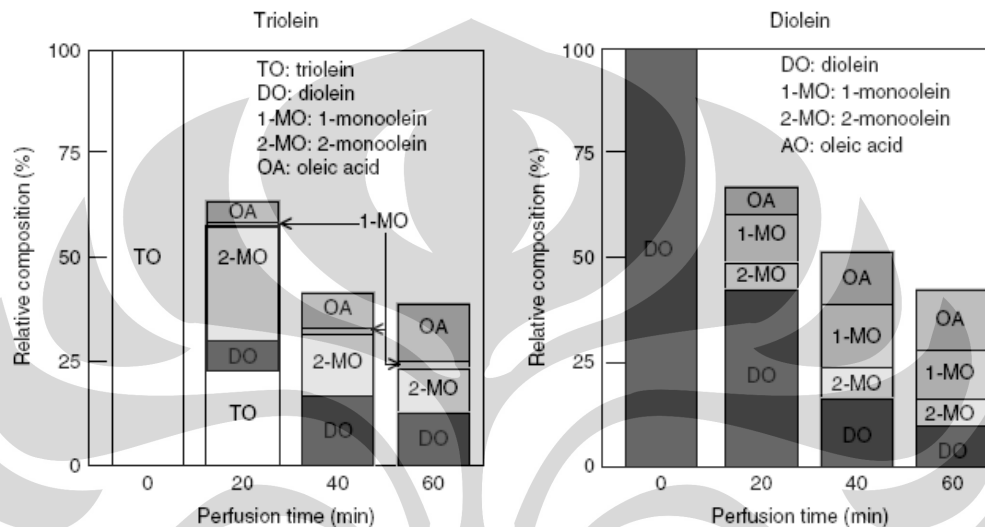
^a Rasio unit Hounsfield dari perhitungan tomografi

2.1.6 Pencernaan, Penyerapan dan Metabolisme Diasilgliserol

Proses pencernaan dan absorpsi DAG diinvestigasi dalam eksperimen yang melibatkan perubahan waktu-jalan pada komposisi lemak setelah perfusi triolein and diolein (1,2-:1,3-diolein = 3:7) dalam bidang intestinal pada tikus (Watanabe, 1997). Pada perfusi diolein, berbeda dengan perfusi triolein, 65% monoolein ditemukan menjadi 1(3)-monoolein pada 60 menit setelah inisiasi perfusi (Gambar 2.5). Kondo dkk melaporkan bahwa, ketika DAG diinfusi di usus dua belas jari pada pembentukan emulsi, TAG dicerna menjadi 1,2-DAG, 2-MAG, dan FFA, sedangkan 1,3-DAG dicerna menjadi 1(3)-MAG dan FFA (Kondo, 2003). Dengan demikian, pembentukan 1(3)-MAG dibandingkan 2-MAG mungkin merupakan salah satu ciri khas metabolisme DAG.

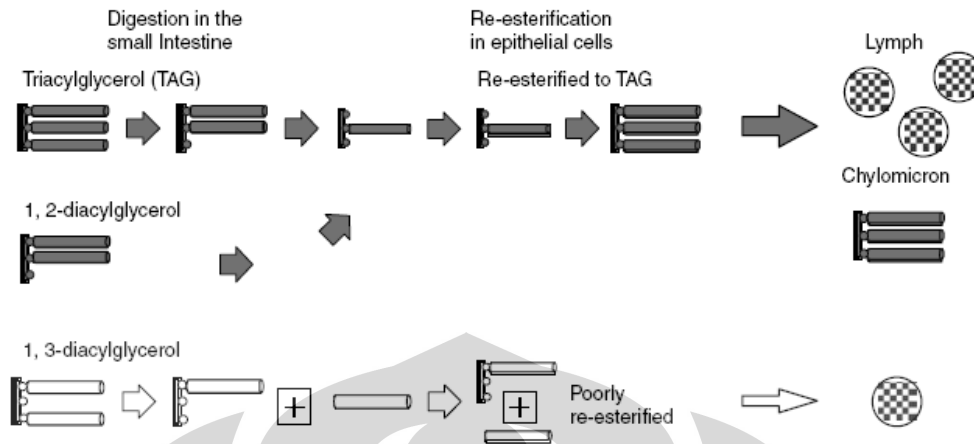
Jalur pembentukan kembali TAG di sel etitelial intestinal termasuk jalur 2-MAG dan jalur gliserofosfat, dengan TAG yang lebih dominan. Mengingat 2-MAG adalah substrat yang baik dalam reaksi dari jalur 2-MAG, reaktivitas 1(3)-MAG sangat kecil. Gliserol bebas adalah substrat pada jalur gliserofosfat, namun

laju reaksinya lebih rendah dari yang ada pada jalur 2-MAG, dan kontribusinya pada pembentukan ulang TAG cukup kecil. Penggabungan ^{14}C -terlabeli asam linoleat menjadi TAG secara signifikan diperlambat di *mucosa intestinal* tikus yang diinfuskan emulsi minyak DAG dibandingkan emulsi minyak TAG (Kondo, 2003).



Gambar 2. 5. Analisis produk pencernaan (Watanabe, 1997)

Murata dkk melaporkan bahwa laju pelepasan re-sintesis TAG menjadi limfa siklomikron intestinal lebih rendah setelah pemberian emulsi DAG daripada emulsi TAG (Murata, 1994). Sekresi limfatik yang lebih rendah dari ^{14}C -terlabeli triolein setelah infusi intra-gastric dari ^{14}C -1,3-diolein juga telah ditunjukkan pada uji terhadap tikus (Yanagita, 2002). Ini mungkin hasil laju re-esterifikasi asam lemak yang lebih rendah setelah menelan DAG. Gambar 2.6 mengilustrasikan karakteristik metabolisme DAG, sebagaimana dibandingkan dengan TAG.



Gambar 2. 6. Karakteristik metabolisme DAG pada perbandingan dengan TAG

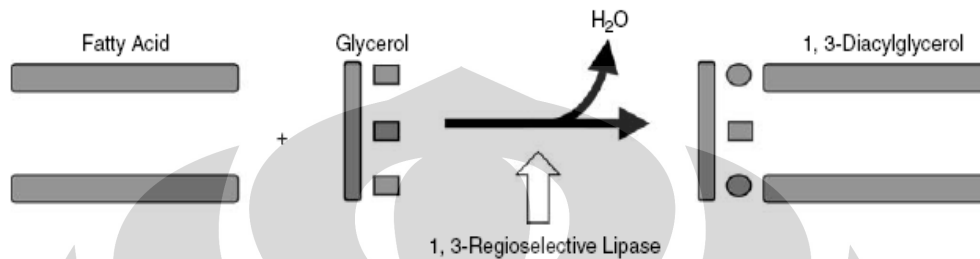
2.2 Produksi Diasilgliserol Secara Enzimatis

Campuran MAG dan DAG sejak lama telah digunakan sebagai emulsifier dan penstabil pada industri makanan. MAG dan DAG umumnya disintesis dari lemak dan minyak dengan gliserol melalui reaksi gliserolisis kimia pada suhu di atas 200°C menggunakan katalis alkali. Distribusi komponen seperti MAG, DAG, dan TAG tergantung pada rasio molar antara gliserol dan gugus asil yang digunakan pada pada reaksi (Sonntag, 1982). Gliserolisis kimia adalah proses yang telah lama digunakan untuk memproduksi MAG dan DAG. Namun demikian proses tersebut tidak ideal untuk memproduksi minyak dengan kandungan DAG yang tinggi karena produk utama dari gliserolisis kimia adalah MAG, sedangkan yang diinginkan adalah minyak masak dengan kandungan DAG yang tinggi yang diperuntukkan mengganti minyak konvensional. Persyaratannya adalah sebagai berikut:

- Memiliki kandungan DAG yang tinggi untuk meningkatkan efek keuntungan pada kesehatan
- Kondisi proses yang ringan untuk meminimalkan penurunan dan pergantian komposisi asam lemak
- Sifat fisik yang dapat dibandingkan dengan minyak konvensional yang berperan pada rasa dan aroma makanan yang dimasak.

Beberapa peneliti melaporkan produksi DAG menggunakan lipase melalui jalur alternatif. Hirota et al. mematenkan metode pengolahan sebuah minyak yang mengandung DAG murni dengan kadar tinggi melalui esterifikasi asam lemak,

menggunakan 1,3-regioselektif lipase, yang dikombinasikan dengan pembuangan air secara simultan, dimana 1,3-DAG disintesis dari esterifikasi asam lemak dengan gliserol menggunakan 1,3-regioselektif lipase yang diimmobilisasi (Hirota, 1988).



Gambar 2. 7. Reaksi esterifikasi menggunakan 1,3-regioselektif lipase (Hirota, 1988)

Dengan cara yang sama Rosu et al. menggunakan reaksi esterifikasi dari beberapa asam lemak dan gliserol pada sistem tanpa pelarut dengan pembuangan air menggunakan *Lipozyme IM*. Hasilnya, mereka mendapatkan 85% hasil 1,3-DAG ketika asam capilat digunakan (Rosu, 1999). Demikian metode-metode esterifikasi tersebut yang secara luas dapat digunakan untuk memproduksi minyak yang kaya akan DAG. Mempertimbangkan produksi DAG pada skala industri, penggunaan kembali enzim menjadi penting untuk menekan biaya enzim. Untuk tujuan ini, yang sesuai adalah enzim yang diimmobilisasi. Hanya beberapa enzim lipase yang diimmobilisasi yang dapat dimanfaatkan. Kinetika dan kondisi reaksi *Lipozyme RM IM* (*Rhizomucor meiheii* 1,3-regioselektif lipase yang diimmobilisasi pada resin penukar ion), diproduksi oleh Novozymes, diinvestigasi oleh Watanabe et al (Watanabe, 2003).

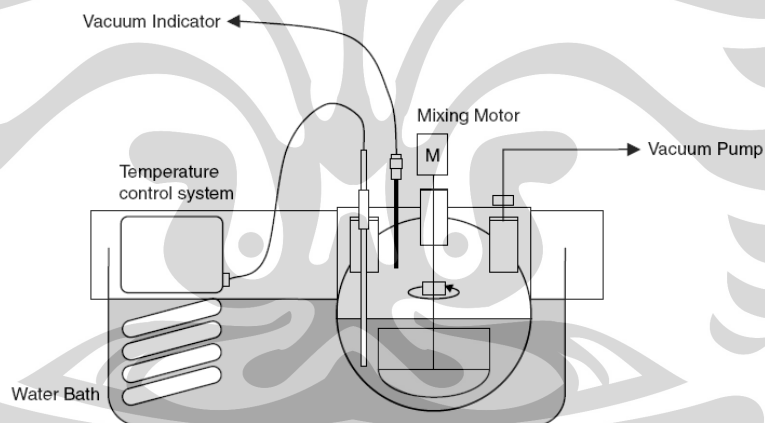
2.2.1 Produksi Diasilgliserol pada Reaktor Batch Berpengaduk

Esterifikasi asam lemak dengan gliserol pada sistem bebas pelarut menggunakan *Lipozyme RM IM* pada reaktor batch berpengaduk telah diinvestigasi sebelumnya (Watanabe, 2003). Asam lemak yang digunakan sebagai bahan esterifikasi didapatkan dari minyak lobak dan minyak kacang kedelai, yang direduksi menjadi asam lemak jenuh. Komposisi dari produk ini disajikan pada Tabel 2.6. Karena titik leleh DAG lebih tinggi dari TAG dengan komposisi asam

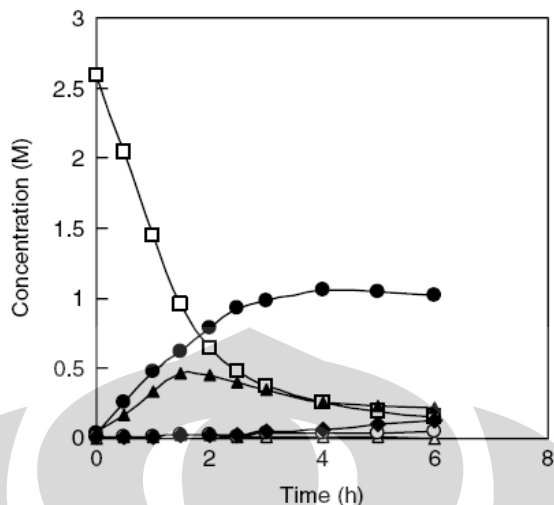
lemak yang sama, perlu digunakan asam lemak jenuh tereduksi sebagai substrat untuk minyak kaya DAG. Sebagai contoh reaktor batch berpengaduk untuk memproduksi DAG disajikan pada Gambar 2.8. Gambar 2.9 memperlihatkan hasil yang khas dari esterifikasi menggunakan reaktor batch berpengaduk pada 50°C dan 3mmHg.

Tabel 2. 6. Komposisi asam lemak

Komponen Asam Lemak		Kandungan (% berat)
Asam palmitat	(C16:0)	3,1
Asam stearat	(C18:0)	1,3
Asam Oleat	(C18:1)	38,2
Asam linoleat	(C18:2)	47,5
Asam linoleat	(C18:3)	7,5
Asam arachnidat	(C20:0)	0,7
Asam gadoleat	(C20:1)	0,6
Asam behenat	(C22:0)	0,1
Asam erucat	(C22:1)	0,2



Gambar 2. 8. Diagram penggunaan reaktor batch berpengaduk untuk reaksi esterifikasi mensintesis diasilgliserol.



Gambar 2. 9. Laju reaksi esterifikasi menggunakan lipase yang diimmobilisasi dimulai dengan 2,59M asam lemak dan 1,29M gliserol. Reaksi dilakukan pada 50°C dan rasio molar asam lemak terhadap gliserol sebesar 2,0 dan konsentrasi resin enzim yang diimmobilisasi 5% (basis berat kering). Pembuangan air dilakukan pada keadaan vakum 3 mmHg. (□),Asam lemak; (▲),1-MAG; (Δ),2-MAG; (●),1,3-DAG; (○),1,2(2,3)-DAG; (◆),TAG. (Data dari referensi Watanabe (2003), simulasi tidak ditunjukkan).

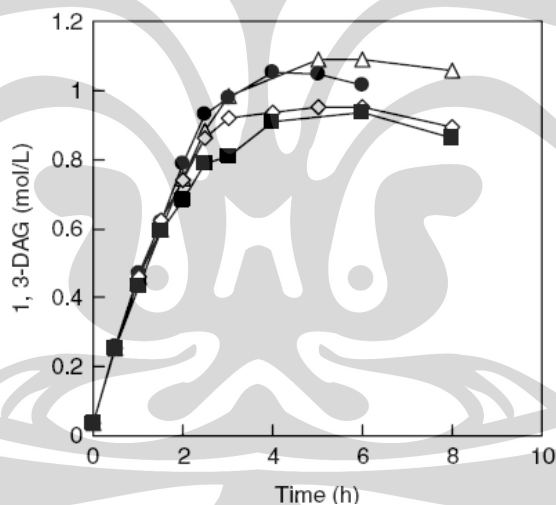
2.2.1.1 Perlakuan pada Lipase Yang Diimmobilisasi

Reaksi lipase terjadi pada permukaan lapisan minyak-air, namun pada reaksi yang menggunakan lipase yang diimmobilisasi, reaksi asam lemak dengan gliserol akan terjadi pada fasa minyak dan bukan pada fasa gliserol (Watanabe, 2002). Data eksperimen mengindikasikan bahwa reaksi esterifikasi tidak terjadi ketika terjadi kontak pertama kali antara enzim yang diimmobilisasi dengan gliserol diikuti asam lemak. Oleh karena itu, enzim yang diimmobilisasi awalnya sebaiknya dijenuhkan dalam asam lemak (fasa minyak) lebih dulu untuk penambahan gliserol. Penggunaan gliserol yang terabsorpsi pada silika gel adalah metode yang efektif untuk esterifikasi asam lemak dengan gliserol pada pelarut organik. Metode tersebut juga menghindari kontak langsung antara gliserol dengan lipase yang diimmobilisasi (Yamada, 2005)

2.2.1.2 Pembuangan Air

Pembuangan air yang dibentuk pada esterifikasi adalah poin penting, karena kesetimbangan mungkin bergeser ke arah esterifikasi seiring pembuangan kandungan air. Beberapa metode untuk membuang air dapat dimanfaatkan, misalnya penggunaan aliran gas nitrogen, agen pengering seperti silika gel atau

penyaring molekular, dan penggunaan pompa vakum. Sistem vakum lebih disukai untuk produksi komersial DAG. Berbagai kondisi vakum antara 1 hingga 10 mmHg telah diperiksa, dan hasilnya, yield maksimum 1,3-DAG didapatkan pada konsentrasi 1,09M pada 1mmHg (Gambar 2.10). Hasil ini menyarankan bahwa kondisi vakum yang lebih tinggi (laju pembuangan air yang lebih tinggi) akan lebih menguntungkan pada produksi 1,3-DAG. Telah diketahui bahwa air memegang peranan penting dalam mengatur struktur enzim dan aktivitas katalitiknya. Dengan demikian, pembuangan kelebihan air mungkin memudahkan deaktivasi enzim. Percobaan pada kondisi vakum 3mmHg, kandungan air termasuk pada enzim yang diimmobilisasi sekitar 3% pada akhir reaksi, serupa dengan reaksi sebelumnya. Dengan demikian, jumlah air yang dibutuhkan selama reaksi dapat diatur selama esterifikasi pada kondisi vakum, ketika enzim lipase yang diimmobilisasi digunakan.



Gambar 2. 10. Efek kondisi vakum pada sintesis 1,3-DAG. Reaksi dilakukan pada 50°C dan rasio molar asam lemak terhadap gliserol sebesar 2,0 dan konsentrasi resin enzim yang diimmobilisasi 5% (basis berat kering). Pembuangan air dilakukan pada keadaan vakum 1 mmHg(Δ),3 mmHg (●), 6 mmHg (◇), 10 mmHg (■). (Watanabe, 2003).

2.2.1.3 Migrasi Asil

Pembentukan TAG tidak diharapkan pada produksi DAG karena hal tersebut menyebabkan penurunan kemurnian DAG. Karena separasi TAG dari minyak produk sangat sulit, TAG, yang diproduksi selama reaksi esterifikasi, mungkin tetap berada pada produk akhir minyak. Dengan demikian, menurunkan

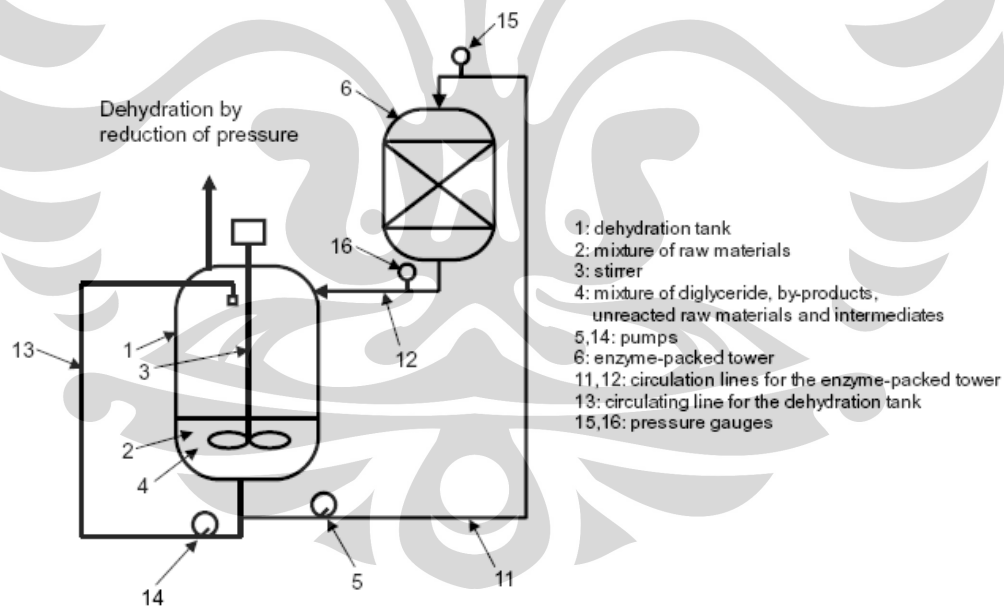
kandungan TAG menjadi penting untuk mendapatkan minyak kaya DAG. Pada reaksi esterifikasi menggunakan Lipozyme RM IM, yaitu 1,3-regioselektif lipase, 1,3-DAG yang diproduksi sangat baik dengan jumlah 1,2-DAG yang dapat diabaikan. Migrasi asil, yaitu dari 1,3-DAG menjadi 1,2-DAG, terjadi selama reaksi berlangsung, dan ketika 1,2-DAG terbentuk, maka dengan mudah akan diubah menjadi TAG oleh lipase. Akibatnya, kadar rendah TAG membuat peningkatan migrasi asil menjadi lebih rendah. Efek dari berbagai faktor seperti kandungan air, suhu, enzim yang diisi, dan waktu reaksi pada migrasi asil pada reaksi transesterifikasi diinvestigasi oleh Xu et al (1999), hasilnya menunjukkan bahwa semua faktor tersebut memiliki pengaruh positif pada migrasi asil. Efek berbagai faktor terhadap peningkatan migrasi asil juga diinvestigasi untuk reaksi esterifikasi menggunakan Lipozyme RM IM. Sebagai hasil, pada produksi 1,3-DAG menggunakan Lipozyme RM IM semakin tinggi suhu dan enzim yang diisi menunjukkan kenaikan konsentrasi TAG, daripada laju reaksi yang lebih tinggi. Hasil tersebut menyarankan bahwa suhu dan jumlah enzim yang lebih rendah akan lebih menguntungkan pada produksi 1,3-DAG yang lebih tinggi. Penentuan suhu reaksi dan jumlah enzim optimal yang diisi adalah hal penting pada produksi DAG pada skala industri baik dari sudut pandang laju produksi 1,3-DAG maupun kemurnian DAG (Yamada, 2005).

2.2.2 Produksi DAG di Packed-Bed Bioreactor

Sebuah reaktor terpadati unggun (*packed-bed reactor*) sering digunakan sebagai reaktor enzim yang diimmobilisasi pada skala industri karena memiliki keuntungan yaitu ukurannya yang tidak terlalu besar. Keuntungan lainnya meliputi pemisahan produk dan produksi yang berkelanjutan.

Reaksi enzimatis menggunakan lipase pada *packed-bed reactor* telah diinvestigasi oleh sejumlah peneliti untuk transesterifikasi dan untuk alkoholisis asam lemak dengan alkohol. Reaksi di *packed-bed reactor* untuk esterifikasi asam lemak dan gliserol belum dipelajari secara meluas. Air umumnya krusial untuk mengatur struktur dan stabilitas enzim. Namun demikian, pada kasus esterifikasi, kelebihan air dihasilkan selama reaksi. Dengan demikian sebuah sistem untuk mengurangi air yang dibentuk selama reaksi menjadi penting untuk mendapatkan

hasil yang tinggi pada reaksi esterifikasi menggunakan kolom *packed-bed*. Akumulasi air pada *packed-bed reactor* juga menyebabkan penurunan stabilitas enzim. Karenanya, metode untuk mencegah akumulasi air di dalam reaktor dilaporkan pada kasus reaksi esterifikasi menggunakan pelarut organik, seperti penggunaan pelarut polar, pengeringan secara periodik dengan aliran udara, atau dengan pelarut murni. Acros et al. mempelajari esterifikasi tanpa pelarut untuk asam lemak dengan gliserol dalam *packed-bed reactor* kontinu berisi lipase yang diimmobilisasi dari *Mucor meihei*. Mereka menggunakan gliserol berlebih untuk mengurangi air. Yaitu, gliserol berlebih digunakan untuk melarutkan air yang dihasilkan oleh reaksi esterifikasi. Meskipun konversi asam lemak mencapai 90%, namun konsentrasi DAG pada minyak yang dihasilkan hanya 48%. Sistem produksi DAG yang efektif menggunakan *packed-bed reactor* diinvestigasi oleh Sugiura et al. yaitu sistem yang meliputi kolom *packed-bed* dan bejana pembuang air eksternal pada kolom *packed-bed* seperti pada Gambar 2.11 (Yamada, 2005).



Gambar 2. 11. Diagram Packed-Bed Reactor yang digunakan untuk reaksi esterifikasi untuk sintesis diasilgliserol (Yamada, 2005)

Pada sistem ini, pembuangan air dicapai dengan menggunakan kondisi vakum. Sistem produksi DAG dari asam lemak dan gliserol menggunakan Lipozyme RM IM ini meliputi operasi batch berulang, sebagaimana diperlihatkan

pada Tabel 2.7. Sistem ini memiliki keuntungan dalam pengontrolan kandungan air oleh kondisi vakum. Hasil DAG yang diperoleh dari asam lemak lobak dan kacang kedelai sekitar 60%. Kemurnian DAG mencapai 80% atau lebih dicapai dengan menggunakan Lipozyme RM IM pada sistem ini.

Tabel 2. 7. Hasil produksi diasilgliserol dalam *Packed-Bed Reactor* (Yamada, 2005)

	1	2	3
Ukuran <i>batch</i> (kg)	100	100	100
Asam oleat (kg)	86	86	86
Gliserol (kg)	14	14	14
Enzim yang diimmobilisasi	Lipozyme IM	Lipozyme IM	Lipozyme IM
Ukuran rata-rata partikel d (mm)	0,43	0,43	0,43
Jumlah (kg)	5	5	20
Ketebalan lapisan (m)	0,18	0,18	0,7
Kecepatan superfisial U (mm/s)	4,4	2,2	3,7
Waktu tinggal (s)	40	79	190
Kehilangan tekanan P (kg/cm ²)	2,6	1,5	9,5
Pipa semprot	Digunakan	Digunakan	Digunakan
Diameter droplet (mm)	1	1	1
Sirkulasi pada sisi spray (m ³ /jam)	1,2	1,2	1,2
Waktu reaksi (jam)	3,5	3,5	3,5
Produk reaksi (% berat)			
Asam oleat	14,1	15,4	11,6
Gliserol	0,3	0,7	0,4
Monogliserida (M)	14,1	18,3	15,0
Digliserida (D)	65,6	58,1	55,7
Trigliserida (T)	5,9	7,5	17,3
Total	100,0	100,0	100,0
Hasil reaksi (D + T) (% berat)	71,5	65,6	73,0
Kemurnian digliserida (D/D + T) (% berat)	91,7	88,6	76,3

2.2.3 Kesimpulan Mengenai Produksi Enzimatis DAG

Esterifikasi asam lemak dan gliserol menggunakan 1,3-regioselektif lipase, yang sangat selektif terhadap isomer 1,3, dapat memastikan produksi 1,3-DAG secara efisien. Lipozyme RM IM, yang diimmobilisasi pada resin. Memiliki kinerja yang signifikan bukan hanya terkait selektivitasnya, namun juga stabil. Kemurnian DAG yang tinggi didapatkan di dalam reaktor batch berpengaduk juga di dalam *packed-bed reactor*. Sebuah *packed-bed reactor* dengan sistem vakum dapat digunakan untuk produksi industrial minyak dengan kandungan DAG yang tinggi. Kandungan 1,3-DAG dalam total DAG lebih besar dari 90% dengan reaksi esterifikasi ini. Namun, sebagian 1,3-DAG dikonversikan menjadi 1,2-DAG

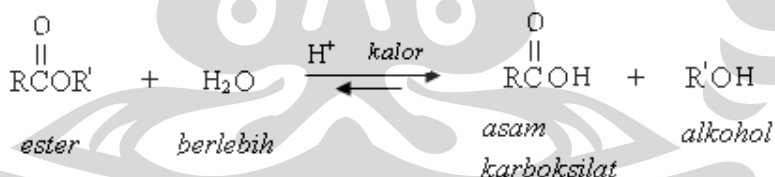
selama proses fabrikasi yang melibatkan pemanasan minyak. Akhirnya, akan dihasilkan campuran dari sekitar 70% 1,3-DAG dan 30% 1,2-DAG sebagai hasil dari kesetimbangan.

Kandungan air pada campuran reaksi memiliki efek yang dapat dipertimbangkan pada hasil 1,3-DAG dalam reaksi esterifikasi. Kandungan air dikontrol umumnya dengan menyeimbangkan air yang dihasilkan oleh reaksi esterifikasi dan air yang dibuang oleh sistem vakum. Karena itu, pemilihan kondisi vakum yang sesuai adalah poin penting untuk efisiensi produksi DAG pada skala industri.

Meskipun produksi enzimatis DAG terlihat efektif, pengembangan lebih lanjut teknik enzim pada bagian ini penting untuk peningkatan proses produksi.

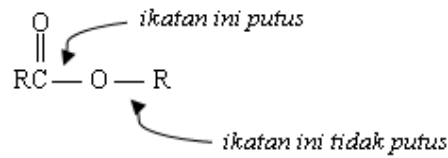
2.3 Hidrolisis

Hidrolisis merupakan suatu reaksi atau proses kimia dimana suatu senyawa kimia akan dipecah melalui reaksi dengan air. Untuk menghasilkan produk berupa asam karboksilat yang lebih banyak, air yang digunakan harus berlebih. Kelebihan air ini akan menggeser kesetimbangan ke arah asam karboksilat. Contoh reaksi hidrolisis dapat dilihat pada Gambar 2.12.



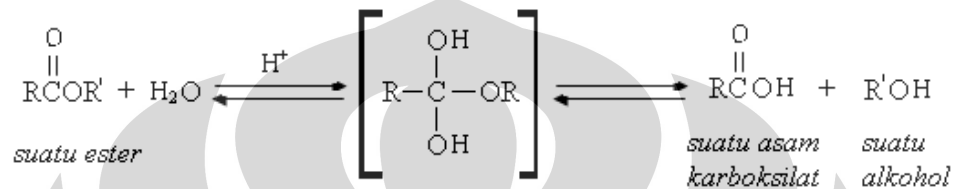
Gambar 2. 12. Reaksi hidrolisis senyawa ester. (www.smapgii1.sch.id)

Jika air yang digunakan diberi oksigen bertanda yaitu oksigen-18 dalam hidrolisis, maka oksigen bertanda tersebut akan berada dalam asam karboksilat. Hal tersebut dikarenakan air menyerang gugus karbonil. Ikatan RO tidak putus dalam hidrolisis.



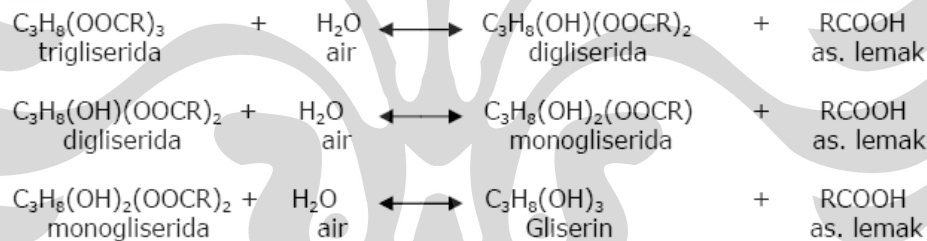
Gambar 2. 13. Penyerangan gugus karbonil pada senyawa ester (www.smapgii1.sch.id)

Secara sederhana, mekanisme hidrolisis ester dapat ditulis sebagai berikut:



Gambar 2. 14. Mekanisme reaksi hidrolisis ester. (www.smapgii1.sch.id)

Dalam reaksi hidrolisis, trigliserida akan diubah menjadi asam-asam lemak bebas dan gliserol. Reaksi hidrolisis ini berlangsung dalam tiga tahapan reaksi.

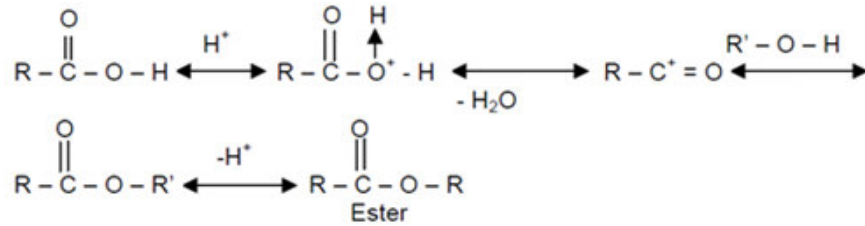


Gambar 2. 15. Tahapan reaksi hidrolisis trigliserida. (www.smapgii1.sch.id)

Ketiga tahap reaksi diatas tidak berlangsung 100%, sehingga tetap saja trigliserida, digliserida, monogliserida terdapat pada gliserin yang dihasilkan. Digliserida dan monogliserida membentuk emulsi pada *gliserin water* dan trigliserida sedikit terapung pada bagian atas air gliserin yang dihasilkan.

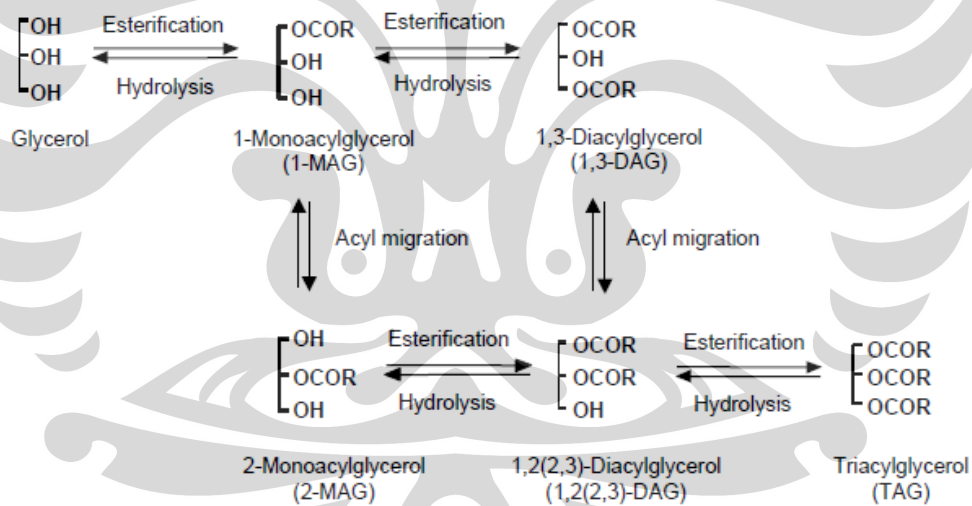
2.4 Esterifikasi

Esterifikasi adalah reaksi antara asam karboksilat dan alkohol untuk membentuk ester yang merupakan reaksi ionik yang merupakan kombinasi dari adisi dan penyusunan kembali dengan reaksi sebagai berikut :



Gambar 2. 16. Reaksi esterifikasi suatu asam karboksilat secara umum. (<http://library.usu.ac.id>)

Esterifikasi asam-asam lemak dengan gliserol telah dikenal sejak 1844 dimana Pelouze dan Getis menggunakan asam butirat. Esterifikasi secara kimia antara asam dan gliserol, alkohol lainnya atau gliserida partial merupakan metode untuk memasukkan (Inkorporasi) asam-asam lemak untuk membentuk trigliserida baru (<http://library.usu.ac.id>). Secara industri esterifikasi kimia telah dilakukan untuk pembuatan trigliserida dan turunannya, pewangi makanan (*flavorings*), dalam parfum (*frangrances*), plastisizer dan emulsifier.



Gambar 2. 17. Reaksi esterifikasi dan hidrolisis dari gliserol. (Watanabe, 2004)

2.5 Enzim Lipase sebagai Biokatalis

Lipase adalah enzim yang memecah lemak. Lipase mikrobial (*glycerol ester hydrolases*) memiliki peran yang penting dalam bioteknologi modern. Nama lain dari lipase adalah asilgliserol hidrolase, triasilgliserol hidrolase atau gliserol ester hidrolase. Lipase yang berasal dari mikroba merupakan enzim yang disekresikan oleh mikroba ke dalam medium pertumbuhannya untuk mencerna

lemak atau minyak. Lipase mengkatalisis lemak atau minyak menjadi diasilgliserol, monoasilgliserol, asam lemak bebas, dan gliserol.

Jenis lipase yang mengkatalisis pemecahan ikatan ester TAG pada posisi satu atau tiga disebut lipase 1,3-regioselektif. Pemecahan dengan lipase tersebut menghasilkan 1,2-DAG, MAG, gliserol, dan asam lemak bebas. Produk 1,2-DAG bersifat tidak stabil. Gugus asil pada posisi dua dapat mengalami migrasi ke posisi satu atau tiga sehingga menghasilkan produk 1,3-DAG. MAG yang di hasilkan berupa 1-MAG. Enzim lipase dapat mengkatalisis semua posisi asam lemak pada TAG dalam waktu yang lama.

Sifat-sifat lipase tergantung pada substrat dan asal perolehannya. Lipase yang berasal dari mikroba tertentu, mempunyai aktivitas optimum yang berbeda dengan mikroba lipolitik lainnya. Aktivitas lipase dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain: pH, suhu, dan waktu. Kestabilan lipase bergantung pada derajat keasaman (pH). Kondisi pH yang jauh dari optimum akan menyebabkan inaktivasi, karena terjadi kerusakan struktur protein enzim. Kondisi pH yang terlalu rendah mengakibatkan ion H^+ akan berikatan dengan $-NH_2$ membentuk $-NH_3^+$. 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 dan gugus $COOH$ enzim membentuk H_2O . Hal tersebut mengakibatkan rusaknya ikatan antara atom hidrogen dengan nitrogen atau oksigen, sehingga struktur enzim mengalami kerusakan.

Suhu merupakan faktor yang mempengaruhi laju reaksi enzimatik. Kenaikan suhu dalam reaksi enzimatik akan meningkatkan laju reaksi, sehingga jumlah produk yang dihasilkan meningkat. Kenaikan suhu pada batas maksimum akan menyebabkan enzim terdenaturasi. Enzim pada umumnya mempunyai aktivitas optimum pada suhu $30-40^{\circ}C$ dan mulai terdenaturasi di atas suhu $45^{\circ}C$.

2.6 Immobilisasi Enzim

Immobilisasi enzim adalah proses menggabungkan suatu enzim dengan suatu matrik padat (*support*) secara fisik, sehingga dapat digunakan secara

berulang kali dan secara kontinyu (Worsfold, 1995). Keuntungan jika kita mengimmobilisasi enzim adalah sebagai berikut: (D'Souza, 2008)

- ❖ Enzim dapat digunakan berulang kali
- ❖ Dapat digunakan pada proses yang kontinyu
- ❖ Meningkatkan kestabilan enzim
- ❖ Produk yang dihasilkan memiliki kemurnian yang lebih tinggi
- ❖ Kontrol yang lebih besar terhadap reaksi enzimatik

Penggunaan lipase memiliki potensi yang bagus untuk menjadikan biaya produksi lebih efektif ketika enzim digunakan dalam bentuk terimmobilisasi dibanding dalam bentuk tersuspensi. Pada prinsipnya, teknik immobilisasi lipase ini ditujukan untuk mengembangkan produksi secara kontinyu dan komersial dalam skala besar yang memiliki efisiensi tinggi per unit volume reaktor (Malcata, 1991). Penggunaan immobilisasi lipase juga dapat mengurangi potensi produk terkontaminasi melalui sisa lipase. Hal tersebut tentu saja menguntungkan, karena dapat menghindari perlakuan tambahan untuk memurnikan produk.

Dengan immobilisasi, penggunaan lipase sebagai biokatalis dapat digunakan secara berulang. Selain itu juga dapat memberikan kontrol yang lebih baik pada proses maupun kualitas produk. Namun kekurangan dari immobilisasi adalah (Ramachandra, 2002):

- ❖ Kemungkinan terjadinya deaktivasi lipase selama proses immobilisasi
- ❖ Keterbatasan substrat dalam berdifusi
- ❖ Terdapatnya lipase yang tidak terikat oleh *support*

2.6.1 Metode Immobilisasi Enzim

Pada umumnya, enzim dapat diimmobilisasi dengan berbagai teknik, diantaranya adsorpsi, sol gel, ikatan kovalen, dan intermolecular cross-linking (Prameshwari, 2009).

2.6.1.1 Metode Adsorpsi

Adsorpsi merupakan metode yang paling sering digunakan dalam proses immobilisasi enzim. Penyerapan enzim ke dalam permukaan padatan bahan

pendukung (*support*) didasari oleh adanya interaksi antara permukaan enzim dan bahan pendukung. Proses immobilisasi enzim secara ionik, adsorpsi, dan desorpsi enzim tergantung dari ion exchange-nya. Metode ini memiliki biaya lebih murah dibandingkan dengan metode yang lain, lebih mudah dilakukan, dan memberikan gangguan kestabilan protein yang rendah.

2.6.1.2 Sol gel

Sol adalah sistem di mana enzim terjebak dalam jaringan partikel padat. Proses sol-gel itu sendiri terdiri dari reaksi hidrolisis dan kondensasi yang berlangsung secara simultan selama proses sintesis gel, meskipun ada kemungkinan salah satu reaksi tersebut berjalan dengan lebih dominan. Dari proses ini, ketika sol menjadi tidak stabil dan terhidrolisis lalu terkondensasi, ia berubah menjadi gel. Pembentukan sol menjadi gel dapat berlangsung dalam beberapa detik, namun dapat pula berjalan lama yaitu dalam beberapa hari. Pelapisan dengan metode sol-gel dapat dilakukan dengan melapisi *support* dengan sol, lalu menghidrolisis dan mengkondensasikannya sehingga membentuk gel.

2.6.1.3 Ikatan kovalen

Enzim dihubungkan secara kovalen ke *support* melalui suatu gugus fungsi di dalam enzim, yang tak berpengaruh terhadap aktivitas katalitik. Gugus fungsi yang sering diinvestigasi adalah amino, karboksil, dan gugus fenol pada *tyrosine*. Ikatan kovalen sering menggunakan *support* inorganik. Jenis enzim seperti *glucose oxidase*, *peroxidase*, *invertase* telah berhasil diimmobilisasi menggunakan teknik ini.

2.6.1.4 Intermolecular Cross-Linking

Proses immobilisasi enzim ini adalah dengan menghubungkan secara silang ikatan kovalen antar molekul protein. Metode ini sangatlah mahal dan tidak mencukupi kebutuhan katalis yang besar, selain itu enzim yang terbentuk memiliki aktivitas sangat rendah.

2.6.2 Metode Adsorpsi Biokatalis dalam Hollow Fiber Membran

Adsorpsi fisik dibuat dengan mengikat enzim pada *support* padat, metode adsorpsi fisik merupakan teknik immobilisasi yang paling tua dan paling umum. Pemilihan *support* dan metode ikatannya sangatlah penting. *Support* yang ideal untuk metode ini adalah *support* yang apabila berinteraksi dengan enzim akan meningkatkan ikatan substrat, mengurangi rintangan produk, menggeser nilai pH optimal ke nilai yang diinginkan, mencegah tumbuhnya mikroba dan dapat *recovery* enzim untuk dapat digunakan.

Adsorpsi didasari pada kontak antara enzim dengan permukaan *support*. Bergantung dengan sifat alami permukaan tersebut, ikatan enzim boleh jadi merupakan hasil dari interaksi ionik, adsorpsi fisik, ikatan hidrofobik atau gaya *van der waals* (atau kontaminasi dari semuanya). Prosedurnya didasarkan pada pencampuran enzim dengan material *support* pada kondisi yang tepat, diikuti dengan interaksi hingga periode tertentu, diakhiri dengan proses pemisahan enzim yang tidak larut dengan sentrifugasi atau filtrasi.



Gambar 2. 18. Skema metode adsorpsi (Immobilization of Enzyme and Cells, 2006)

Karena tidak terdapatnya senyawa yang bereaksi, tidak ada pula perubahan penyesuaian pada enzim dalam immobilisasinya. Karena itu aktivitas spesifik yang mirip dengan enzim aslinya bisa didapatkan. Adsorpsi enzim bergantung pada parameter-parameter seperti pH, sifat dasar pelarut, kekuatan ionik, konsentrasi enzim, adsorbent, dan temperatur.

2.7 Hollow Fiber Membran Reaktor

2.7.1 Hollow Fiber Membran

Hollow fiber membran biasa digunakan sebagai pemisah antar fasa satu dengan fasa lainnya dalam suatu reaksi. Struktur serat di dalam modul hollow fiber membran yang asimetrik memiliki diameter dalam sekitar 42 mikron (0.0016

inci) dan diameter luar sekitar 85 mikron (0.0033 inci). Jutaan serat ini akan dibentuk menjadi bundel dan dilipat setengah dengan konfigurasi kerapatan pengepakan yang paling tinggi mencapai $30000 \text{ m}^2/\text{m}^3$. (Margareta, 2010).

Unit hollow fiber membran dapat beroperasi pada aliran non-turbulen atau laminar dan juga dapat digunakan dengan berbagai orientasi aliran (berlawanan arah atau searah) dan flat vertikal ataupun horizontal. Hollow fiber membran tidak tahan terhadap tekanan dan temperatur tinggi (Margareta, 2010).

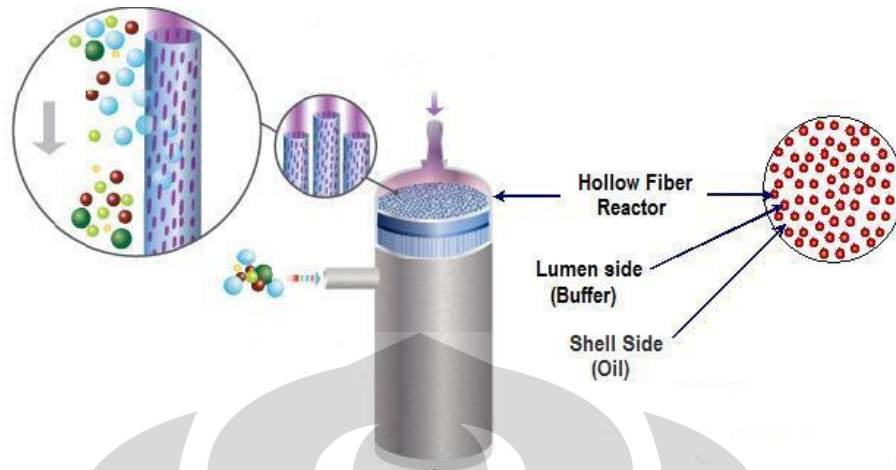
2.7.2 Aplikasi Hollow Fiber Membran dalam Industri

Hollow fiber membran sudah banyak digunakan untuk proses membran dalam berbagai bidang, seperti berikut ini (www.cheresources.com) :

1. Kesehatan
 - a. Fraksinasi darah
 - b. Unit ginjal buatan
2. Industri Kimia dan Petrokimia
 - a. Pemisahan Gas
 - b. Desalinasi
3. Industri Bioteknologi dan Biokimia
 - a. Proses Hilir
 - b. Bioreaktor Membran

2.7.3 Immobilisasi Enzim dalam Reaktor Hollow Fiber Membran

Dalam beberapa tahun terakhir, peralatan hollow fiber membran telah dicoba untuk reaktor immobilisasi enzim. Hollow fiber membran semipermeabel menyediakan cara untuk immobilisasi fisik enzim tanpa teknik kimia. Membran ini impermeabel terhadap enzim, tapi permeabel terhadap substrat dan produk (Hong, 1986).



Gambar 2. 19. Reaktor hollow fiber membran

Reaktor membran dapat digunakan untuk cairan dua fasa maupun satu fasa. Dalam satu jenis reaktor, fasa aqueous dan organik dipisahkan dengan sebuah membran padat yang merupakan tempat terimmobilisasinya enzim. Reaktor membran ini dapat menggunakan dua jenis pola aliran, yaitu aliran tangensial dan normal terhadap membran. Untuk aliran tangensial, kedua fasa tersebut dialirkan paralel terhadap membran baik secara co-current maupun counter current. Penurunan tekanan sepanjang reaktor sangat kecil. Untuk aliran normal terhadap membran, salah satu fase dipompakan melalui membran, dimana fase lainnya tetap diam, sehingga membentuk campuran air dan minyak yang dapat dipisahkan secara gravitasi (Hong, 1986).

2.7.4 Keuntungan Immobilisasi Enzim dalam Reaktor Hollow Fiber Membran

Immobilisasi enzim menggunakan metode adsorpsi dalam reaktor hollow fiber membran memiliki beberapa keuntungan, diantaranya (Hong, 1986):

1. Rasio luas area permukaan terhadap volume reaktor yang sangat tinggi.
2. Selektivitas untuk reaktan dengan menggunakan membran padat memiliki permeabilitas berbeda atau karakteristik biaya tetap.
3. Tidak memerlukan proses pemisahan enzim dari aliran produk limbah yang mahal.
4. Memungkinkan operasi dalam keadaan *steady*.

5. Melindungi enzim dari pengotor makromolekul di aliran umpan seperti enzim proteolitik.
6. Mudah dalam regenerasi atau penggantian enzim.

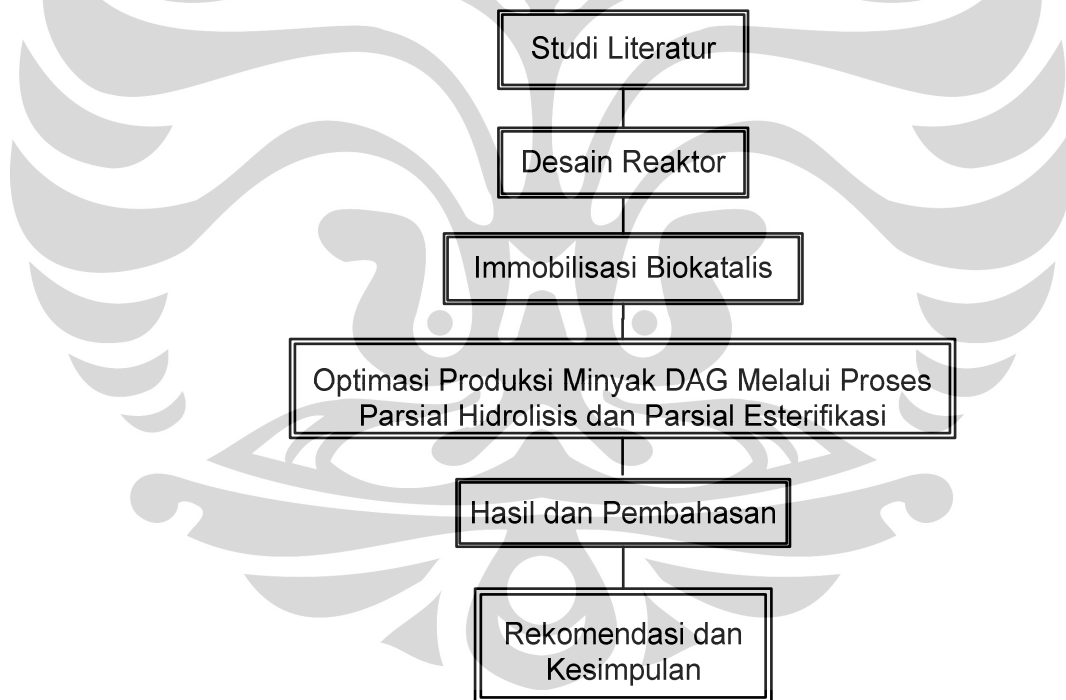


BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

Dalam bab ini akan dibahas alur proses penelitian, peralatan dan bahan yang akan digunakan selama penelitian, variabel penelitian, dan prosedur penelitian. Sebagian besar penelitian akan dilakukan di Laboratorium Dasar Proses Kimia (DPK), Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia, kecuali untuk uji analisa dengan menggunakan unit HPLC yang ada di LIPI.

3.1 Alur Penelitian

Diagram alir rencana penelitian ini dapat dilihat pada gambar di bawah ini:



Gambar 3. 1. Diagram alir penelitian

Penelitian yang dilakukan terdiri dari beberapa pekerjaan utama, yaitu:

1. Studi literatur
2. Desain Reaktor

Sistem reaktor skala lab yang akan terdiri dari dua buah reaktor hollow fiber membran yang terbuat dari polipropilen yang disusun seri akan di rakit sendiri seperti terlihat pada gambar.

Reaktor pertama (REAKTOR I) akan berfungsi sebagai bioreaktor untuk reaksi parsial hidrolisis minyak kelapa sawit untuk pengayaan kandungan DAG tahap pertama. Selanjutnya minyak hasil tersebut akan digunakan sebagai umpan di reaktor kedua (REAKTOR II) dimana akan berlangsung reaksi parsial esterifikasi untuk pengayaan kandungan DAG tahap kedua.

3. Immobilisasi Biokatalis

Proses immobilisasi biokatalis dilakukan untuk menanam biokatalis di permukaan material membran. Jenis membran yang akan digunakan adalah hollow fiber yang akan berfungsi selain tempat immobilisasi juga untuk memisahkan fasa air dan minyak pada reaksi parsial hidrolisis dan memisahkan fasa minyak dan alkohol pada reaksi parsial esterifikasi. Metode adsorpsi yang telah terbukti efektif akan digunakan untuk meng-immobilisasi biokatalis ke Hollow Fiber Membran.

Proses immobilisasi ini digunakan dengan menggunakan larutan enzim dengan kombinasi enzim *Candida Rugosa* Lipase dan *Porcine Pancreas* Lipase dengan perbandingan 1:1 untuk menghasilkan proses immobilisasi yang murah. Enzim *Candida Rugosa* Lipase bekerja dominan pada proses hidrolisis, dimana enzim ini berfungsi untuk memotong ikatan fatty acid dari triasilgliserol secara optimal sedangkan enzim *Porcine Pancreas* Lipase bekerja dominan pada proses esterifikasi, dimana enzim ini bersifat selektif sehingga gliserol dapat mengikat fatty acid pada posisi 1,3 membentuk 1,3 diasilgliserol.

4. Optimasi Produksi Minyak DAG Melalui Proses Parsial Hidrolisis dan Parsial Esterifikasi

Optimasi kondisi operasi sintesis minyak DAG melalui parsial hidrolisis yang dilanjutkan dengan parsial esterifikasi menggunakan biokatalis yang diimmobilisasi dalam Hollow Fiber Membran Bioreaktor skala Lab. Faktor-faktor yang berpengaruh untuk sistem reaktor kontinyu seperti variasi konfigurasi, variasi konsentrasi biokatalis, dan variasi waktu tinggal, akan

dilakukan untuk mendapatkan kondisi operasi terbaik dengan temperatur dan pH konstan yaitu 37°C dan 7.

5. Hasil dan Pembahasan

Hasil eksperimen ini diperoleh melalui analisis HPLC. Uji komposisi menggunakan alat HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) yang terdapat di LIPI. Dengan alat ini maka kita akan mendapatkan komposisi DAG dalam sampel.

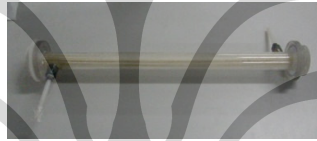
6. Kesimpulan dan Rekomendasi

3.2 Alat dan Bahan Percobaan

3.2.1 Alat Percobaan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Reaktor Membran hollow fiber, Tempat sintesis, memisahkan fasa minyak dan air



Gambar 3. 2. Reaktor hollow fiber membran

2. Botol sampel, sebagai wadah sampel larutan



Gambar 3. 3. Botol sampel

3. Beaker glass atau Gelas kimia, Mengukur volume larutan, sebagai wadah



Gambar 3. 4. Beaker glass

4. UV Spectrofotometer, Menganalisa aktifitas enzim



Gambar 3. 5. UV Spektrofotometer

5. Pipet tetes, Mengambil larutan



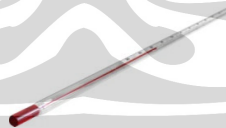
Gambar 3. 6. Pipet tetes

6. pH Meter, Mengukur pH



Gambar 3. 7. pH meter

7. Termometer, Mengukur Suhu



Gambar 3. 8. Termometer

8. Timbangan digital, Mengukur massa bahan



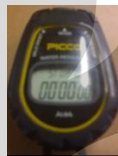
Gambar 3. 9. Timbangan

9. Pompa peristaltik, Mengalirkan larutan



Gambar 3. 10. Pompa peristaltik

10. Stopwatch, Mengukur waktu



Gambar 3. 11. Stopwatch

11. HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) digunakan untuk mengukur konsentrasi reaktan dan produk.



Gambar 3. 12. Unit HPLC

12. Selang silikon



Gambar 3. 13. Selang silikon

3.2.2 Bahan Percobaan

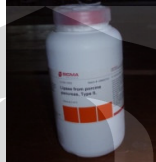
Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Enzim *Candida rugosa* lipase (Sigma.Co)



Gambar 3. 14. Candida rugosa lipase

2. Enzim *Porcine Pancreas* lipase (Sigma.Co)



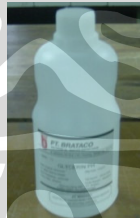
Gambar 3. 15. Porcine pancreas lipase

3. Minyak goreng (Bimoli)



Gambar 3. 16. Minyak goreng

4. Gliserol (PT. Brataco)



Gambar 3. 17. Gliserol

5. Buffer Phosphate – K_2HPO_4 & KH_2PO_4 (Merck KgaA)



Gambar 3. 18. Buffer phosphate

6. Lowry Reagent (membuat sendiri)



Gambar 3. 19. Lowry reagent

7. Phenol Reagent (membuat sendiri)



Gambar 3. 20. Phenol reagent

8. Bovine Serum Albumin (BSA)



Gambar 3. 21. Bovine serum albumin

3.3 Prosedur Percobaan

3.3.1 Percobaan Penentuan Enzim *Loading*

3.3.1.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi Standar

Tujuan dari pembuatan kurva kalibrasi ini adalah untuk mengukur konsentrasi protein dalam larutan. Metode yang digunakan adalah metode Lowry. Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam metode Lowry ini adalah sebagai berikut:

- a. Lowry Reagent (48 mL larutan A + 1 mL larutan B + 1 mL larutan C),
dimana:

- ❖ Larutan A : 2 gram Na_2CO_3 dalam 100 mL 0,1 N NaOH (0,4 gram NaOH dalam 100 mL aquadest)
 - ❖ Larutan B : 0,1 gram NaK Tartrate dalam 10 mL aquadest
 - ❖ Larutan C : 0,1 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam 20 mL aquadest
- b. Phenol reagent (5 mL Follin Ciocalteu phenol reagent + 5 mL aquadest)
- Prosedurnya adalah sebagai berikut:

- 1) Larutan BSA dengan konsentrasi 0,08 gram/mL (8 gram BSA dalam 100 mL larutan *phosphate buffer*).
- 2) Memvariasikan konsentrasi BSA menjadi beberapa konsentrasi dengan cara mengencerkan 0,08 gram/mL larutan BSA yang telah dibuat pada tahap 1. Kemudian menyiapkan tiap-tiap larutan pada tabung reaksi.

Tabel 3. 1. Bahan-bahan yang digunakan untuk membuat kurva kalibrasi

Konsentrasi awal	Konsentrasi akhir	Volume akhir	Volume awal	<i>Phosphate Buffer</i> yang ditambahkan
0,08 g/mL	0,06 g/mL	20 mL	15 mL	5 mL
0,08 g/mL	0,04 g/mL	20 mL	10 mL	10 mL
0,08 g/mL	0,02 g/mL	20 mL	5 mL	15 mL
0,08 g/mL	0,01 g/mL	20 mL	2,5 mL	17,5 mL
0,01 g/mL	0,005 g/mL	20 mL	10 mL	10 mL

- 3) Menambahkan 2 mL Lowry Reagent ke setiap sampel konsentrasi BSA.
- 4) Menginkubasi selama 10 menit pada suhu ruang.
- 5) Menambahkan 0,2 mL larutan phenol reagent pada setiap tabung.
- 6) Vortex (melakukan pencampuran dengan bantuan vibrator) segera setiap tabung tersebut.
- 7) Menginkubasi selama 30 menit pada suhu ruang.
- 8) Mengambil tiap sampel ke dalam kuvet.
- 9) Menentukan absorbansi setiap sampel menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm. (Sampel dibuat triplo dan blanko menggunakan larutan *phosphate buffer*)
- 10) Memplot absorbansi vs gram/mL BSA untuk memperoleh kurva kalibrasi standar.

3.3.1.2 Pengukuran Enzim Loading

Sebanyak 2,5 gram campuran enzim CRL dan PPL dilarutkan ke dalam 500 mL *buffer phosphate* (pH 7) pada beaker glass, kemudian di stirrer sampai enzimnya larut.

Sebelum diimmobilisasi *free* enzim diukur absorbansinya. Mengukur absorbansi tiap sampel dengan menggunakan metode Lowry. Sampelnya dibuat triplo. Enzim *loading* dihitung dengan menggunakan rumus :

$$m_{im} = m_0 - m_t \quad (3.1)$$

$$\text{Enzyme loading} = \frac{m_{im}}{L_{membran}} \quad (3.2)$$

dengan:

m_{im} = massa enzim ter-immobilisasi (mg)

m_0 = massa enzim sebelum immobilisasi, $t = 0$ (mg)

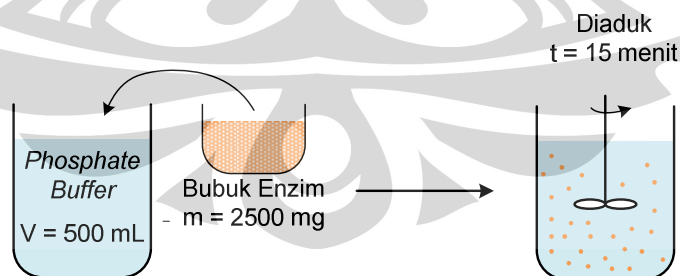
m_t = massa enzim pada waktu t (mg)

$L_{membran}$ = Luas total membran = 2292,2 cm² (mg)

3.3.2 Percobaan Immobilisasi Biokatalis

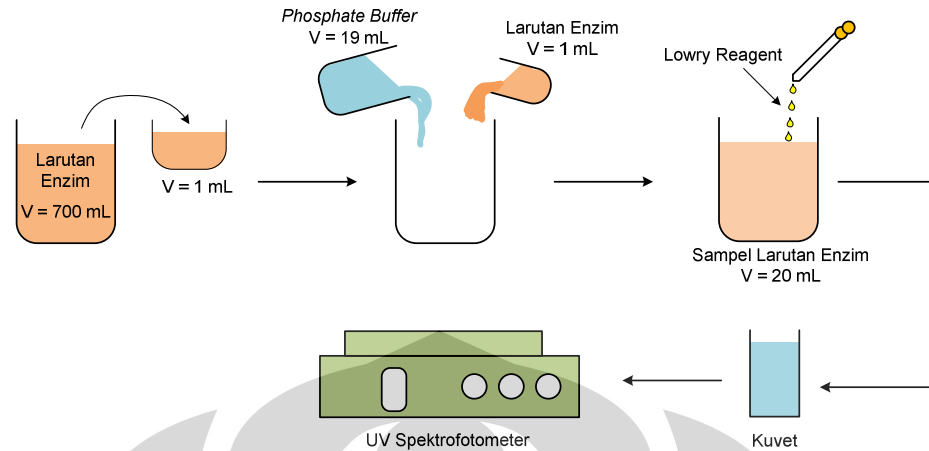
Prosedur immobilisasi biokatalis adalah sebagai berikut:

1. Membuat larutan enzim dengan melarutkan 2500 mg campuran enzim CRL dan PPL ke dalam 500 mL *phosphate buffer* kemudian aduk dengan menggunakan magnetic stirrer selama 15 menit sampai enzim terlarut.



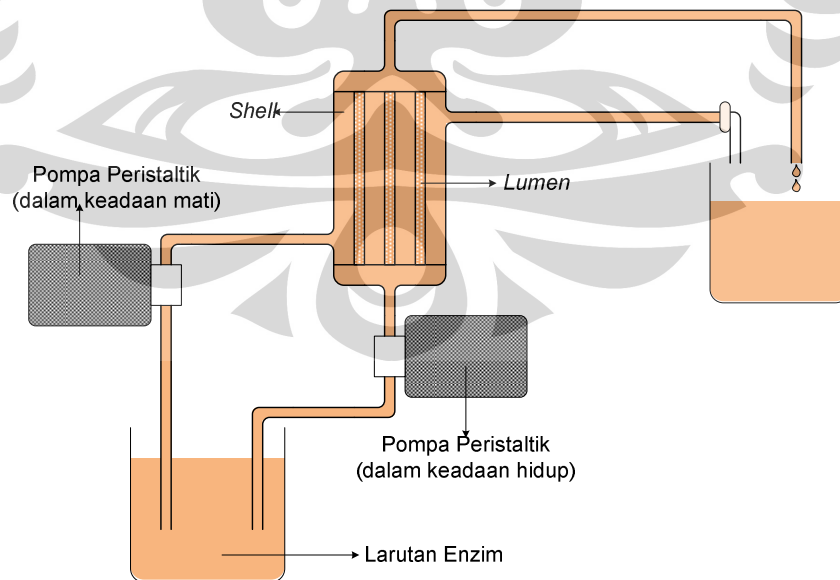
Gambar 3. 22. Proses pembuatan larutan enzim

2. Mengambil 1 mL larutan enzim kemudian encerkan hingga volume 20 mL dengan menggunakan *phosphate buffer* untuk mengukur konsentrasi enzim sebelum immobilisasi menggunakan metode Lowry dengan UV spektrofotometer.



Gambar 3. 23. Pengukuran konsentrasi enzim dengan metode Lowry

3. Masukkan larutan enzim ke dalam botol kemudian hubungkan botol tersebut ke pompa peristaltik dengan menggunakan selang. Larutan enzim tersebut akan dialirkan ke bagian *lumen* maupun *shell* pada reaktor.
4. Mengaktifkan pompa peristaltik dan mengisi penuh bagian shell maupun bagian lumen dari reaktor dengan melakukan resirkulasi. Setelah pada bagian shell reaktor penuh dengan larutan enzim, tutup aliran keluar dari bagian *shell* dan matikan pompa peristaltik pada aliran masuk *shell*. Proses ini dilakukan selama 6 jam.



Gambar 3. 24. Proses immobilisasi pada reaktor hollow fiber membrane

5. Setelah proses imobilisasi selesai kosongkan reaktor baik pada bagian *lumen* maupun pada bagian *shell*.
6. Mengambil 1 mL larutan enzim setelah imobilisasi kemudian larutan tersebut diencerkan hingga volume 20 mL dengan menggunakan *phosphate buffer* untuk mengukur konsentrasi enzim setelah imobilisasi menggunakan metode Lowry dengan UV spektrofotometer.

3.3.3 Reaksi Hidrolisis

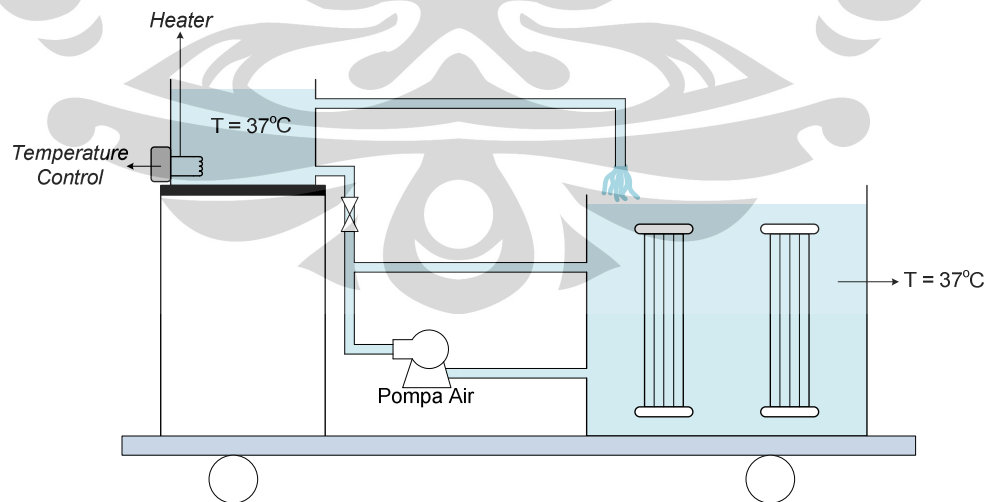
Pada proses ini terjadi reaksi sebagai berikut :



TAG dalam minyak kelapa sawit bereaksi dengan air dari *Buffer Phosphate* di permukaan material membran menghasilkan DAG dan FFA.

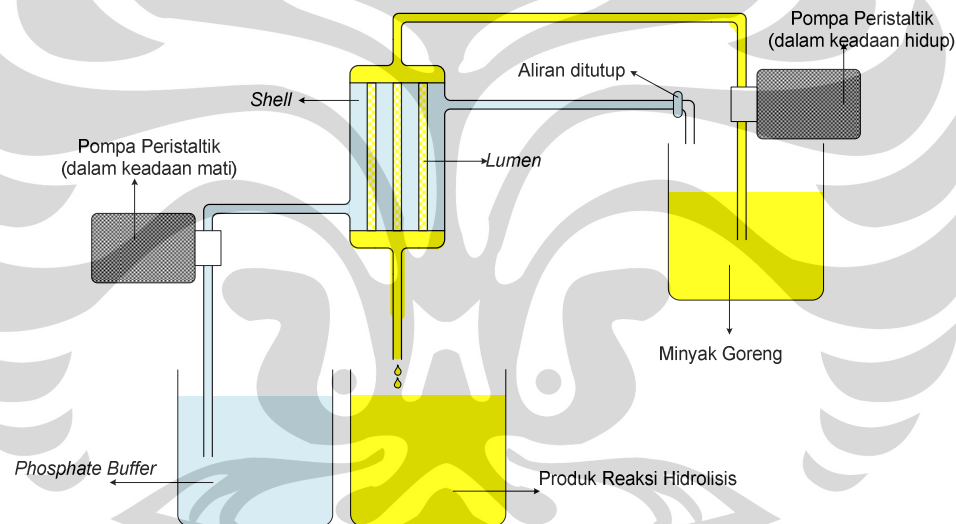
Prosedur reaksi hidrolisis adalah sebagai berikut:

1. Mengisi bak pemanas dengan air kemudian mengaktifkan pemanas (*heater*) dan pompa air sirkulasi hingga suhu air pemanas mencapai 37°C. Bila kenaikan suhu berlangsung lama, maka tambahkan air panas untuk membantu mempercepat kenaikan suhu.



Gambar 3. 25. Prosedur pembuatan air pemanas untuk pemanas pada reaktor

2. Masukkan 500 mL minyak goreng dan 700 ml *phosphate buffer* ke dalam dua botol yang berbeda. Hubungkan masing-masing botol tersebut ke pompa peristaltik. Larutan *phosphate buffer* akan dialirkan ke bagian *shell* pada reaktor sedangkan minyak goreng akan dialirkan ke bagian *lumen* pada reaktor.
3. Jika suhu air pemanas sudah mencapai 37°C aktifkan pompa peristaltik dan isi penuh bagian *shell* pada reaktor dengan *phosphate buffer*. Kemudian matikan pompa peristaltik dan tutup aliran keluar dari bagian *shell* pada reaktor.
4. Mengalirkan minyak goreng ke bagian *lumen* pada reaktor yang telah berisi enzim terimobilisasi dengan laju alir tertentu menggunakan pompa peristaltik.



Gambar 3. 26. Prosedur reaksi hidrolisis pada reaktor hollow fiber membran

5. Mencatat *residence time* yang terjadi.
6. Mengambil sampel pada keluaran lumen (produk yang terbentuk) untuk diuji kandungannya.

3.3.4 Reaksi Esterifikasi

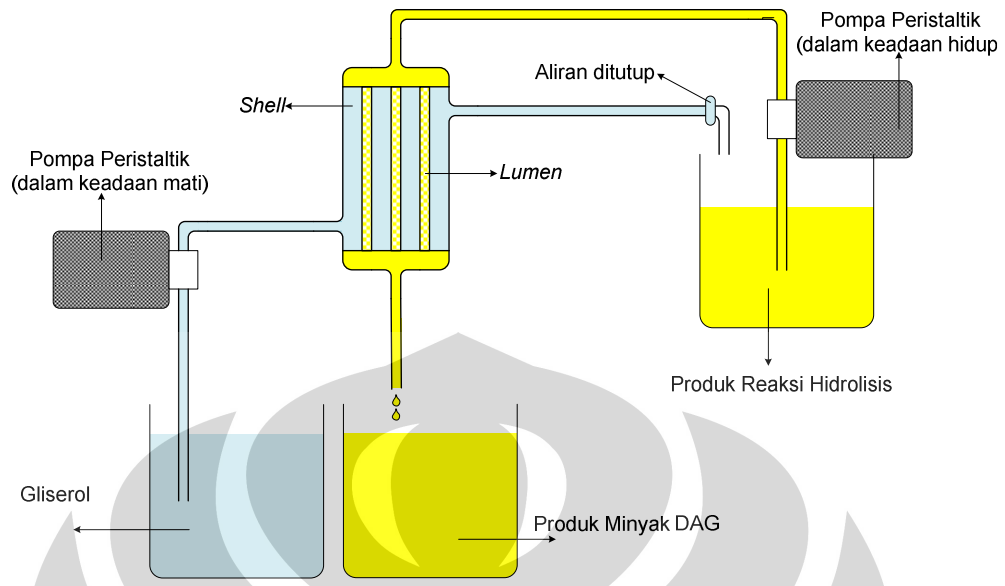
Reaksi parsial esterifikasi menggunakan umpan minyak hasil reaksi hidrolisis dan ditambah dengan memasukkan gliserol. Pada minyak hasil hidrolisis, terdapat peningkatan kandungan DAG sesuai yang diharapkan

sekaligus peningkatan *Free Fatty Acid* (FFA) yang tidak diharapkan sebagai hasil reaksi hidrolisis. FFA tersebut yang mengalir di bagian *lumen* pada reaktor selanjutnya akan diesterifikasi dengan menambahkan gliserol yang mengalir pada bagian *shell*. Reaksi yang terjadi pada parsial esterifikasi adalah sebagai berikut:



Prosedur reaksi esterifikasi adalah sebagai berikut:

1. Mengisi bak pemanas dengan air kemudian mengaktifkan pemanas (*heater*) dan pompa air sirkulasi hingga suhu air pemanas mencapai 37°C. Bila kenaikan suhu berlangsung lama, maka tambahkan air panas untuk membantu mempercepat kenaikan suhu.
2. Masukkan produk reaksi hidrolisis dan 700 mL gliserol ke dalam dua botol yang berbeda. Hubungkan masing-masing botol tersebut ke pompa peristaltik. Larutan gliserol akan dialirkan ke bagian *shell* pada reaktor sedangkan produk reaksi hidrolisis akan dialirkan ke bagian *lumen* pada reaktor.
3. Jika suhu air pemanas sudah mencapai 37°C aktifkan pompa peristaltik dan isi penuh bagian *shell* pada reaktor dengan gliserol. Kemudian matikan pompa peristaltik dan tutup aliran keluar dari bagian *shell* pada reaktor.
4. Mengalirkan produk reaksi hidrolisis ke bagian *lumen* pada reaktor yang telah berisi enzim terimobilisasi dengan laju alir tertentu menggunakan pompa peristaltik.



Gambar 3. 27. Prosedur reaksi esterifikasi pada reaktor hollow fiber membran

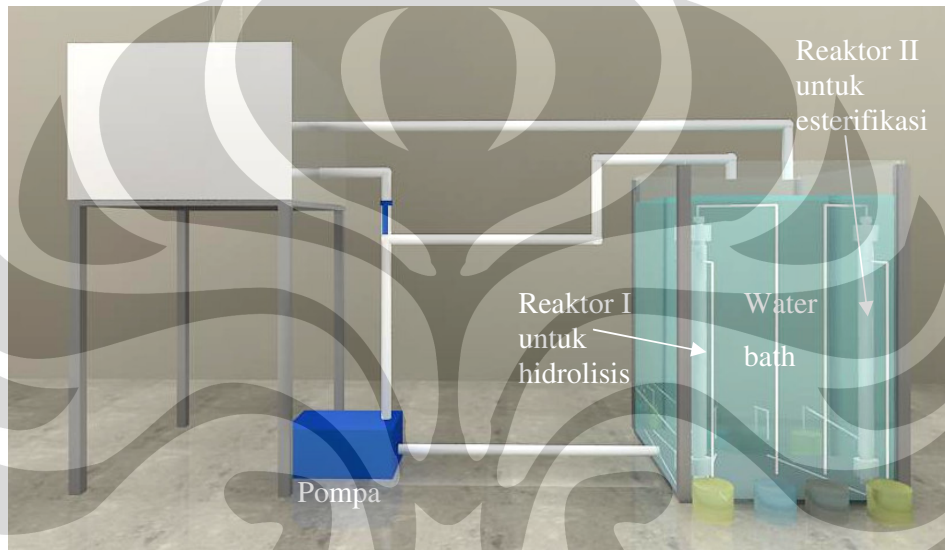
BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

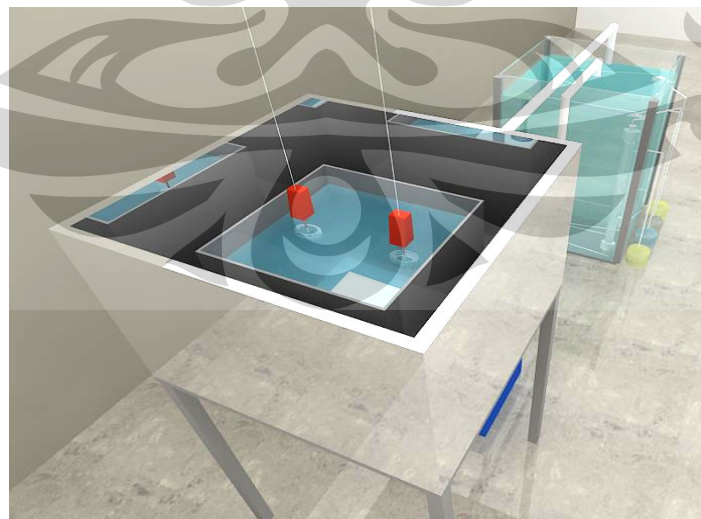
4.1 Desain Reaktor

4.1.1 Desain Sistem Reaktor Overall

Gambar desain reaktor yang akan digunakan untuk mensintesis minyak yang diperkaya dengan kandungan DAG dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4. 1. Sistem reaktor overall



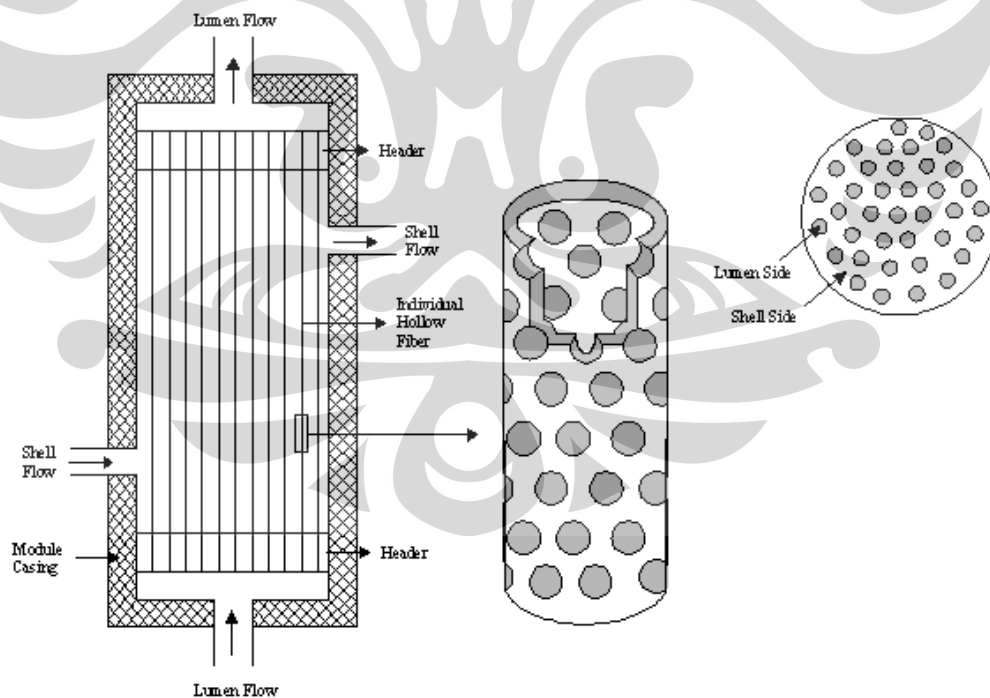
Gambar 4. 2. Pemanas pada sistem reaktor

Gambar 4.2 memperlihatkan desain pemanas air yang digunakan untuk memanaskan air hingga mencapai temperatur operasi dan menjaga agar suhu air tetap pada temperatur tersebut.

Desain reaktor overall dapat dilihat pada Gambar 4.1. Secara keseluruhan, reaktor terdiri atas 2 Reaktor Membran *Hollow Fiber* dan beberapa perlengkapan lain untuk menunjang reaktor yang telah dijelaskan pada Sub Bab 3.2.1.

4.1.2 Desain Reaktor Hollow Fiber Membran

Reaktor yang digunakan dalam penelitian ini adalah reaktor *hollow fiber* membran. Reaktor hollow fiber membran berupa tabung yang terdiri dari beberapa *hollow fiber membrane*. Hollow fiber membran terdiri dari bagian lumen dan bagian shell. Reaktor *hollow fiber* membran memiliki 2 aliran masuk dan 2 aliran keluar. Masing-masing aliran terdiri atas aliran lumen dan shell yang mengalirkan fluida ke dalam bagian lumen dan shell dari hollow fiber membran. Skema reaktor ini dapat dilihat pada Gambar 4.3 berikut:



Gambar 4. 3. Reaktor hollow fiber membran dan hollow fiber membran

Spesifikasi reaktor *hollow fiber membran* yang didesain untuk mengkonversi minyak kelapa sawit menjadi minyak goreng DAG dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4. 1. Spesifikasi bioreaktor hollow fiber membran

Reaktor 1		Reaktor 2	
Shell		Shell	
• Panjang	70 cm	• Panjang	50 cm
• Diameter	40 mm	• Diameter	40 mm
• Bahan	Akrilik	• Bahan	Akrilik
Lumen		Lumen	
• Panjang	73 cm	• Panjang	57 cm
• Diameter	2 mm	• Diameter	2 mm
• Jumlah	50	• Jumlah	50
• Bahan	Membran	• Bahan	Membran

Dari data yang tertera pada Tabel 4.1, dapat dihitung volume dan luas setiap lumen sebagai tempat terjadinya reaksi. Contoh perhitungan untuk reaktor 1 dapat dilihat pada Lampiran 1. Total luas dan volume lumen untuk tempat terjadinya reaksi ditunjukkan pada Tabel 4.2 di bawah ini.

Tabel 4. 2. Total Luas dan Volume Lumen Hollow Fiber

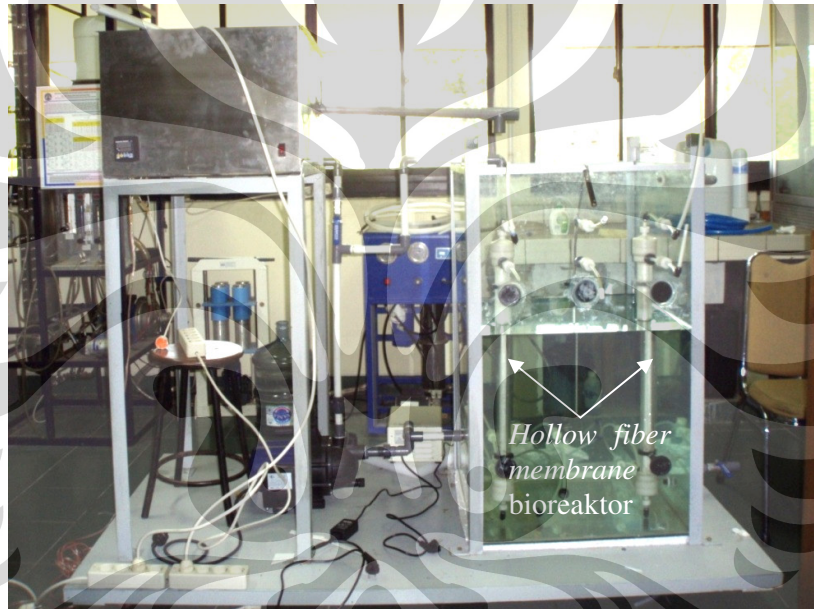
Reaktor 1	
Total Luas Lumen	$45,844 \text{ cm}^2 \times 50 = 2292,2 \text{ cm}^2$
Total Volume Lumen	$2,2922 \text{ cm}^3 \times 50 = 114,61 \text{ cm}^3$
Reaktor 2	
Total Luas Lumen	$35,796 \text{ cm}^2 \times 50 = 1789,8 \text{ cm}^2$
Total Volume Lumen	$1,7898 \text{ cm}^3 \times 50 = 89,5 \text{ cm}^3$

4.1.3 Detail Desain Sistem Reaksi Dalam Reaktor Hollow Fiber Membran

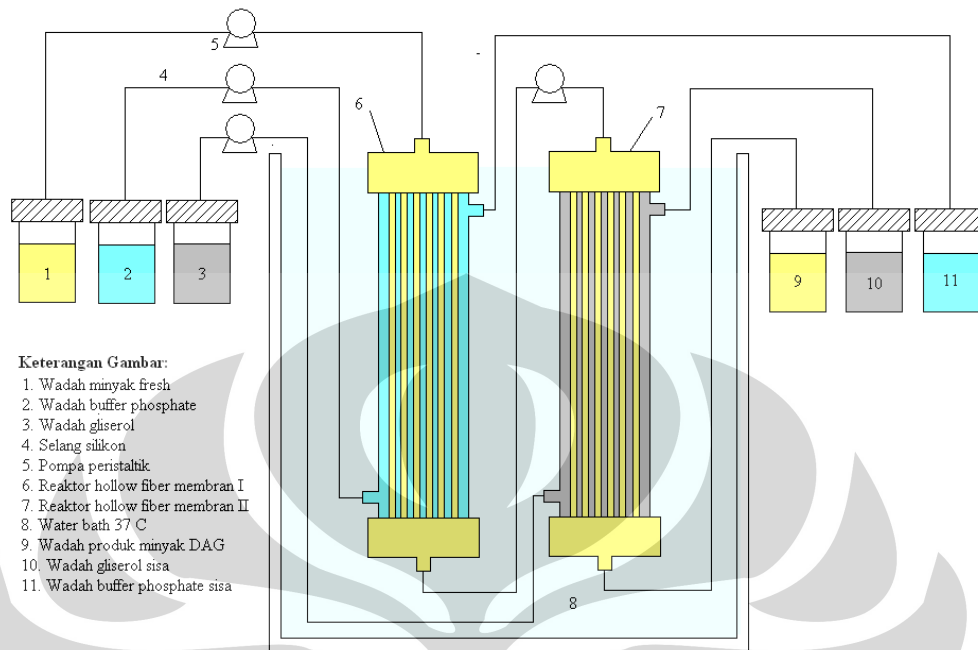
Desain reaktor pada Gambar 4.4 menunjukkan sistem reaktor aktual yang digunakan dalam sintesis minyak kelapa sawit menjadi minyak DAG Sedangkan gambar 4.5 skema reaksi hidrolisis dan esterifikasi yang dilakukan.

Sebelum reaksi hidrolisis dan esterifikasi, terlebih dahulu dilakukan immobilisasi enzim. Immobilisasi dilakukan dengan mensirkulasikan larutan enzim ke dalam lumen dan shell reaktor selama 6 jam. Setelah enzim

terimmobilisasi ke dalam reaktor, dilakukan reaksi hidrolisis. Reaksi hidrolisis dilakukan dengan menggunakan larutan phosphate buffer dan minyak. Larutan phosphate buffer akan dialirkan melalui shell, dan minyak akan dialirkan ke dalam lumen reaktor pertama. Minyak keluaran reaktor pertama yang sudah terhidrolisis dialirkan ke dalam lumen reaktor kedua. Sebelum dialirkan minyak, bagian shell terlebih dahulu diisi dan dialirkan larutan gliserol untuk direaksikan dengan *free fatty acid* yang terbentuk selama hidrolisis di reaktor pertama, sehingga diperoleh minyak yang kaya akan DAG dari keluaran lumen reaktor kedua.



Gambar 4. 4. Sistem reaktor aktual



Gambar 4. 5. Sistem reaktor 2 dimensi

4.2 Preliminary Experiment

4.2.1 Hasil Tes Kebocoran

Tes kebocoran dilakukan untuk memastikan bahwa reaktor yang digunakan berada dalam kondisi baik dan dapat digunakan. Tes ini dilakukan pada saat reaktor belum dipasang dan setelah reaktor terpasang di dalam *water bath*. Uji kebocoran pada reaktor dilakukan dengan mengalirkan air *reverse osmosis* (RO) ke dalam reaktor menggunakan pompa peristaltik. Cara pengujiannya yaitu, air RO dialirkan dengan menggunakan pompa peristaltik melalui bagian lumen reaktor yaitu pada bagian membran hollow fiber dengan laju alir yang tidak terlalu besar (10-15 ml/menit), namun tidak terjadi kebocoran (air keluar lewat jalan yang seharusnya). Lalu selanjutnya, dengan cara yang sama air RO dialirkan pada bagian shell reaktor, hasilnya pun serupa yaitu tidak terjadi kebocoran. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa reaktor yang belum terpasang di dalam bak pemanas air berada dalam keadaan baik atau tidak bocor.



Gambar 4. 6. Tes kebocoran menggunakan air yang dilakukan di luar water bath

Kemudian reaktor dipasang pada *water bath* dan dihubungkan dengan selang pada masing-masing bagian masukan dan keluaran shell dan lumen. Setelah itu, uji kebocoran dilakukan kembali untuk mengetahui apakah terdapat kebocoran, baik pada reaktor, maupun pada bagian persambungan selang dengan inlet/outlet reaktor. Namun demikian, pada dasarnya yang paling perlu diperhatikan pada saat tes kebocoran reaktor yang telah dipasang di dalam water bath adalah kebocoran pada bagian persambungan selang, hal ini dikarenakan kemungkinan terjadinya kebocoran pada reaktor setelah proses pemasangan reaktor pada water bath sangat kecil. Namun demikian, pada saat melakukan tes kebocoran pada reaktor yang telah dipasang pada water bath tetap dilihat apakah reaktor mengalami kebocoran atau tidak. Mekanisme tes kebocoran ketika reaktor telah terpasang pada water bath sama dengan mekanisme tes kebocoran yang dilakukan sebelumnya, ketika reaktor belum terpasang.

Tes kebocoran ini selalu dilakukan pada semua reaktor, baik pada saat reaktor pertama kali dibuat, setelah perbaikan, maupun pada saat akan memulai eksperimen. Hal ini untuk memastikan bahwa reaktor yang digunakan dalam

eksperimen dalam kondisi baik, sehingga tidak ada air dari dalam water bath yang dapat masuk ke dalam reaktor sehingga mempengaruhi sistem yang diamati.

Perbaikan pada reaktor yang mengalami kebocoran dilakukan segera setelah kebocoran ditemukan. Untuk kebocoran ringan, perbaikan dilakukan secara langsung dan dilakukan lagi tes kebocoran untuk memastikan, namun untuk kebocoran yang diakibatkan oleh kondisi reaktor yang cukup parah, reaktor akan digantikan sementara dengan reaktor lain yang kondisinya baik, sementara reaktor yang rusak/bocor diperbaiki.

4.2.2 Hasil Tes Stabilitas Temperatur

Pada penelitian ini, reaksi dilakukan pada keadaan isothermal pada temperatur 37°C. Temperatur 37°C dipilih sebagai temperatur operasi karena merupakan temperatur optimal enzim untuk mengkatalisis suatu reaksi kimia.

Oleh karena itu, temperatur air yang di dalam water bath harus mencapai temperatur 37°C. Untuk memanaskan air dari temperatur 25°C hingga 37°C, digunakan heater yang dihubungkan dengan *temperature controller*. Namun demikian, kapasitas pemanas yang digunakan tidak cukup besar untuk memanaskan air di dalam water bath hingga mencapai temperatur yang diharapkan. Selain itu laju air yang masuk ke dalam bak pemanas tidak sama dengan laju air yang masuk ke dalam bak, akibatnya untuk memanaskan air dalam water bath hingga mencapai temperatur yang diharapkan memerlukan waktu yang cukup lama, yaitu sekitar 8 jam.

Untuk mengatasi masalah tersebut, dilakukan perbaikan aliran pada bak pemanas, dengan mengganti pipa air dengan ukuran yang lebih besar dan menambahkan 2 heater untuk membantu mempercepat pemanasan air dalam bak. Hasilnya diperlukan waktu selama 4 jam 10 menit untuk mencapai suhu 36 °C.

Dengan penambahan heater tersebut, ternyata masih membutuhkan waktu yang cukup lama untuk memanaskan air dalam bak hingga mencapai suhu operasi. Akhirnya, untuk memanaskan suhu air dalam bak digunakan 2 heater sebagai alat bantu ditambah air panas yang didapat dengan memanaskan air dengan menggunakan kompor gas. Dengan cara ini didapatkan waktu yang cukup singkat, yaitu sekitar 30 menit. Namun jika dihitung dengan waktu mengisi air ke

dalam water bath. Maka total waktu yang dibutuhkan untuk mengisi dan memanaskan air dalam bak yaitu sekitar 90 menit.

Setelah temperatur air dalam water bath mencapai 37°C , maka 2 heater tambahan dilepaskan dan heater dalam bak *water heater* diset dengan suhu 39°C . Hal ini karena terjadi kehilangan panas pada saat air disirkulasi antara water bath dan water heater sehingga dengan set temperatur sebesar 39°C , temperatur yang terbaca pada water bath menunjukkan angka 37°C . Pengujian terhadap kestabilan suhu air dalam water bath, dilakukan selama 30 jam. Namun dengan kondisi tersebut suhu dalam bak tidak mengalami penurunan.

4.2.3 Hasil Tes Aliran Fluida

Uji aliran fluida dilakukan untuk memastikan bahwa fluida (terutama minyak) dapat mengalir dengan laju alir yang konstan. Hal ini dikarenakan minyak yang mengalir di dalam lumen merupakan substrat yang paling mempengaruhi laju reaksi karena fluida pada bagian shell (*buffer phosphate* pada saat hidrolisis, dan gliserol pada saat esterifikasi) selalu berada dalam kondisi berlebih (*excess*).

Uji kestabilan aliran fluida dilakukan baik dalam kondisi aliran dari bawah ke atas, maupun dalam kondisi dari atas ke bawah. Dari hasil pengamatan ini diketahui, dari dua pompa peristaltik yang digunakan dalam eksperimen, hanya satu pompa yang dapat digunakan untuk mengalirkan fluida dari bagian bawah reaktor ke bagian atas reaktor, yaitu pompa peristaltik yang memiliki jangkauan laju alir 4 mL/menit hingga 30 mL/menit. Namun demikian, pompa ini sulit dijaga kestabilannya karena pada dasarnya pompa peristaltik tersebut hanya cocok untuk ukuran selang yang lebih besar dari yang dimiliki. Untuk membantu menstabilkan pompa tersebut, digunakan kertas sebagai penyumbat untuk membantu menekan selang.

Karena kestabilan laju alir minyak sangat penting untuk menentukan waktu tinggal yang mempengaruhi konversi TAG menjadi DAG, maka pompa peristaltik yang berukuran lebih kecil yang digunakan untuk mengalirkan minyak di bagian lumen dengan konfigurasi aliran dari bagian atas menuju bagian bawah reaktor sehingga minyak tetap dialirkan dengan laju alir konstan.

Ketika dilakukan ujicoba untuk melakukan reaksi dengan konfigurasi aliran counter current dengan aliran shell dari bawah ke atas, hasilnya menunjukkan adanya air yang masuk ke bagian dalam lumen. Hal ini dikarenakan laju alir terendah dari pompa peristaltik yang digunakan untuk shell masih terlalu tinggi sehingga tekanan di dalam shell lebih tinggi dibandingkan tekanan pada lumen, akibatnya air masuk ke dalam lumen melalui dinding *hollow fiber*. Oleh karena itu, ditetapkan konfigurasi yang digunakan pada eksperimen adalah bagian lumen dialirkan minyak dari atas ke bawah ataupun sebaliknya, dan bagian shell dibiarkan dalam kondisi tidak mengalir setelah sebelumnya diisi hingga penuh dengan *buffer phosphate* (untuk hidrolisis) atau gliserol (untuk esterifikasi).

4.3 Immobilisasi Biokatalis

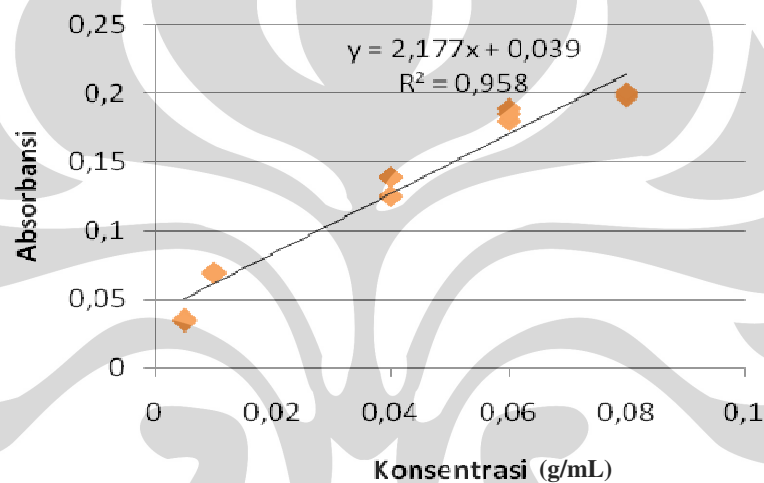
4.3.1 Kurva Kalibrasi untuk Penentuan Enzim Loading

Untuk menentukan enzim loading diperlukan kurva kalibrasi. Pembuatan kurva kalibrasi bertujuan untuk mengukur konsentrasi protein yang terdapat di dalam larutan. Sampel yang diambil akan diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis kemudian dicatat nilai absorbansinya. Metode yang digunakan adalah Metode *Lowry*. Metode ini didasari pada reaksi antara protein dengan Folin-Ciocalteu yang menyebabkan perubahan fisis pada larutan. Perubahan fisis ini meliputi perubahan larutan dari bening menjadi berwarna biru. Semakin banyak kadar protein di dalam larutan, warna biru yang dihasilkan akan semakin pekat.



Gambar 4. 7 BSA yang digunakan sebagai standar untuk kalibrasi konsentrasi enzim

Sampel protein yang digunakan dalam pembuatan kurva kalibrasi ini adalah BSA (*Bovine Serum Albumin*) dimana kadar kandungan proteinnya mendekati kemurnian. Konsentrasi protein BSA ini divariasikan sebanyak 5 variasi konsentrasi, yakni: 0,08 g/mL, 0,06 g/mL, 0,04 g/mL, 0,01 g/mL, dan 0,005 g/mL. Sedangkan pengambilan nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dilakukan secara triplo untuk masing-masing konsentrasi sampel.



Gambar 4. 8 Kurva kalibrasi perhitungan enzim loading

4.3.2 Hasil Perhitungan Enzim Loading

Dari kurva kalibrasi standar protein yang dibuat diperoleh persamaan garis linear $y = 2,177x + 0,039$, dimana y merupakan konsentrasi protein (g/mL) dan x adalah absorbansi. Persamaan linear tersebut nantinya digunakan untuk mengukur konsentrasi larutan enzim dari nilai absorbansinya.

Banyaknya enzim yang dapat teradsorp ke dalam hollow fiber membran dapat dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$m_{im} = m_0 - m_t \quad (3.1)$$

$$Enzyme\ loading = \frac{m_{im}}{L_{membran}} \quad (3.2)$$

dimana:

m_{im}	= massa enzim ter-immobilisasi	(mg)
m_o	= massa enzim sebelum immobilisasi, $t = 0$	(mg)
m_t	= massa enzim pada waktu t	(mg)
$L_{membran}$	= Luas membran reaktor 1 = 2292,2 cm ²	(mg)
	Luas membran reaktor 2 = 1789,8 cm ²	(mg)

Dari persamaan di atas dapat disimpulkan bahwa setelah immobilisasi, konsentrasi enzim akan semakin berkurang. Enzim yang terlarut dalam buffer akan teradsorpsi pada pori membran seiring dengan teradsorpsinya molekul air pada membran. Enzim *loading* dihitung untuk setiap eksperimen.

Data enzim *loading* pada setiap eksperimen disajikan pada Tabel 4.3. Pada eksperimen ini, immobilisasi enzim seluruhnya dilakukan dengan melakukan sirkulasi enzim di dalam lumen dan shell selama 6 jam, dengan demikian, massa enzim pada saat t (m_t) adalah massa enzim pada waktu 6 jam setelah immobilisasi. Immobilisasi enzim dilakukan sebelum hidrolisis.

Tabel 4. 3. Data enzim loading pada reaktor

Eksperimen		Absorbansi	Konsentrasi	Massa Enzim	m_{im}	Enzyme loading
			(mg/mL)	(mg)	(mg)	
Eksperimen 1	m_o	0,097	3,00	1680,00	666,40	0,2907
	m_t	0,074	1,81	1013,60		
Eksperimen 2	m_o	0,082	5,00	2800,00	195,44	0,0853
	m_t	0,079	4,65	2604,56		
Eksperimen 3	m_o	0,113	5,00	2250,00	608,11	0,3398
	m_t	0,093	3,65	1641,89		
Eksperimen 4	m_o	0,103	5,00	2250,00	1195,31	0,6678
	m_t	0,069	2,34	1054,69		
Eksperimen 5	m_o	0,091	5,00	2250,00	443,12	0,2476
	m_t	0,081	4,02	1806,88		
Eksperimen 6	m_o	0,106	5,00	2250,00	638,06	0,3565
	m_t	0,087	3,58	1611,94		
Eksperimen 7	m_o	0,069	5,00	2250,00	300,00	0,1676
	m_t	0,065	4,33	1950,00		

Hasil enzim *loading* masih ada yang cukup rendah, yakni 0,0853 mg/cm² luas membran. Hasil yang cukup rendah ini kemungkinan disebabkan teknik immobilisasi yang dilakukan yaitu adsorpsi fisik masih cukup lemah dalam

mengimmobilisasi, karena metode ini hanya bergantung pada kemampuan dari kontak enzim dengan permukaan membran sebagai *support*.

4.4 Hasil Reaksi Hidrolisis dan Esterifikasi

Proses reaksi hidrolisis dan esterifikasi ini dilakukan di dalam reaktor hollow fiber membran yang sebelumnya telah diimmobilisasi oleh larutan enzim. Proses pertama adalah reaksi parsial hidrolisis dan diikuti dengan reaksi parsial esterifikasi. Minyak goreng dihidrolisis oleh larutan buffer phosphate pada suhu sekitar 37°C dalam reaktor. Larutan buffer phosphate dialirkan ke dalam shell dan kemudian setelah penuh shell ditutup. Kemudian, minyak goreng dialirkan melalui bagian lumen.



Gambar 4. 9. Sampel minyak goreng fresh yang akan digunakan sebagai reaktan untuk proses parsial hidrolisis

Kondisi operasi yang digunakan untuk mensintesis minyak DAG menggunakan biokatalis terimmobilisasi dalam reaktor hollow fiber membran adalah sebagai berikut:

- Hidrolisis
 - Konsentrasi larutan enzim : 5 mg/ml
 - Enzim *Candida rugosa* : 2,054 gr
 - Enzim PPL : 2,046 gr

- Minyak Goreng : 500 mL
 - Buffer phosphate : 800 mL
 - pH buffer phosphate : 7
 - Suhu operasi : 37 °C
 - Laju alir : 0,05 mL/s
- Esterifikasi
 - Konsentrasi enzim: 5 mg/mL
 - Suhu operasi : 37°C
 - Laju alir : 0,05 mL/s

Pada percobaan pertama reaksi parsial hidrolisis dilakukan dengan mengalirkan minyak di bagian lumen pada reaktor dari bawah ke atas. Sedangkan bagian shell pada reaktor terisi larutan buffer phosphate dari proses immobilisasi enzim. Produk yang ditampung pada bagian keluaran lumen bagian atas memiliki campuran air, sehingga kandungan airnya dipisahkan dengan menggunakan silica gel.



Gambar 4. 10. (a) Minyak hasil hidrolisis pertama yang diberi silica gel; (b) Silica gel yang digunakan untuk mengabsorpsi air

Minyak hasil hidrolisis yang sudah tidak mengandung air kemudian diambil sampelnya 80 ml untuk dipisahkan dan dianalisis kandungannya. Sisanya

langsung dilakukan reaksi esterifikasi. Pada percobaan reaksi parsial esterifikasi pertama ini gliserol diisi penuh pada bagian shell dan kemudian aliran ditutup. Sedangkan minyak dialirkan pada bagian lumen dari atas ke bawah. Minyak hasil esterifikasi yang diperoleh pada lumen bagian bawah juga mengandung sedikit air, sehingga juga perlu dipisahkan dengan menggunakan silica gel. Gambar produk yang dihasilkan dari proses hidrolisis dan esterifikasi pada percobaan pertama dapat dilihat pada Gambar 4.11.



Gambar 4. 11. Minyak fresh, hasil reaksi hidrolisis dan hasil esterifikasi eksperimen pertama sebelum dilakukan pemisahan dengan asam lemak bebas yang diproduksi selama hidrolisis

4.4.1 Hasil Variasi Konfigurasi Arah Aliran pada Proses Parsial Hidrolisis dan Parsial Esterifikasi

Eksperimen variasi konfigurasi ini dilakukan dengan memvariasikan arah aliran di dalam reaktor pada proses parsial hidrolisis dan parsial esterifikasi, dimana konfigurasi masing-masing proses adalah sama. Tujuan dari eksperimen ini adalah untuk melihat konfigurasi arah aliran yang dapat menghasilkan konversi minyak DAG yang lebih tinggi. Kondisi operasi yang digunakan pada saat melakukan reaksi parsial hidrolisis dan parsial esterifikasi minyak kelapa sawit dengan konfigurasi yang berbeda ditunjukkan dalam Tabel 4.4.

Tabel 4. 4. Data kondisi konfigurasi arah aliran minyak pada proses parsial hidrolisis dan parsial esterifikasi

Eksperimen	Konsentrasi Enzim Awal ($C_{E,0}$)	Temperatur Operasi	Konfigurasi
2	5 mg/mL	37°C	- Shell: Buffer phosphate, diam Lumen: Minyak, dari bawah ke atas
7	5 mg/mL	37°C	- Shell: Buffer phosphate, diam Lumen: Minyak, dari atas ke bawah

4.4.2 Hasil Variasi Konsentrasi Enzim pada Proses Immobilisasi Enzim

Eksperimen variasi konsentrasi enzim ini dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi larutan enzim yang akan di immobilisasi di dalam reaktor hollow fiber membran. Tujuan dari eksperimen ini adalah untuk melihat hubungan konsentrasi enzim dengan konversi minyak DAG yang dihasilkan. Kondisi operasi yang digunakan untuk melakukan proses immobilisasi enzim ditunjukkan dalam Tabel 4.5.

Tabel 4. 5. Data kondisi operasi variasi konsentrasi enzim pada proses immobilisasi enzim

Eksperimen	Konsentrasi Enzim Awal ($C_{E,0}$)	Enzim Loading	Temperatur Operasi	Laju Alir Minyak
1	3 mg/mL	0,2907 mg/cm ²	37°C	0,05 mL/detik
3	5 mg/mL	0,3398 mg/cm ²	37°C	0,05 mL/detik

4.4.3 Hasil Variasi Waktu Tinggal Minyak pada Proses Parsial Esterifikasi

Eksperimen variasi waktu tinggal ini dilakukan dengan memvariasikan laju alir minyak pada proses esterifikasi. Sebelumnya dilakukan eksperimen hidrolisis tanpa adanya variasi. Tujuan dari percobaan ini adalah untuk melihat hubungan waktu tinggal dengan konversi minyak DAG yang dihasilkan. Selain itu, percobaan ini juga dilakukan untuk memperoleh laju alir optimal untuk menghasilkan minyak DAG. Kondisi operasi yang digunakan pada saat melakukan reaksi parsial hidrolisis minyak kelapa sawit untuk variasi waktu tinggal esterifikasi adalah sebagai berikut:

- Konsentrasi Enzim Awal : 5 mg/ml
 - Candida Rugosa Lipase : 2,0177 g

- Porcine Pancreas Lipase : 2,0155 g
- Temperatur : 37°C
- Minyak Goreng : 5500 mL
- Buffer phosphate : 800 mL
- pH buffer phosphate : 7
- Laju alir : 0,05 mL/detik

Sedangkan kondisi operasi pada reaksi esterifikasi disajikan pada Tabel 4.6 di bawah ini. Dimana waktu tinggal (residence time) untuk setiap laju alir yang digunakan dihitung dengan menggunakan persamaan :

$$\tau = \frac{\text{vol.lumen reaktor(mL)}}{\text{laju alir(mL/s)}} \quad (4.1)$$

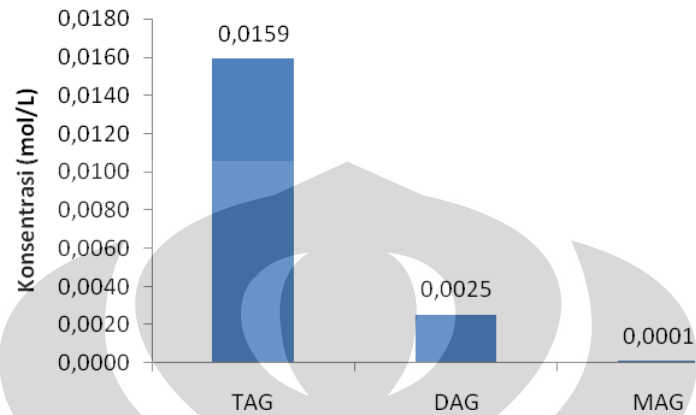
Tabel 4. 6. Data kondisi operasi variasi laju alir minyak pada proses parsial esterifikasi

Eksperimen	Konsentrasi Enzim Awal ($C_{E,0}$)	Temperatur Operasi	Laju Alir Minyak (mL/detik)	Waktu Tinggal
7	5 mg/mL	37°C	0,01	149 menit 9 detik
6	5 mg/mL	37°C	0,04	37 menit 17 detik
3	5 mg/mL	37°C	0,05	29 menit 49 detik
4	5 mg/mL	37°C	0,075	19 menit 53 detik
5	5 mg/mL	37°C	0,1	14 menit 55 detik

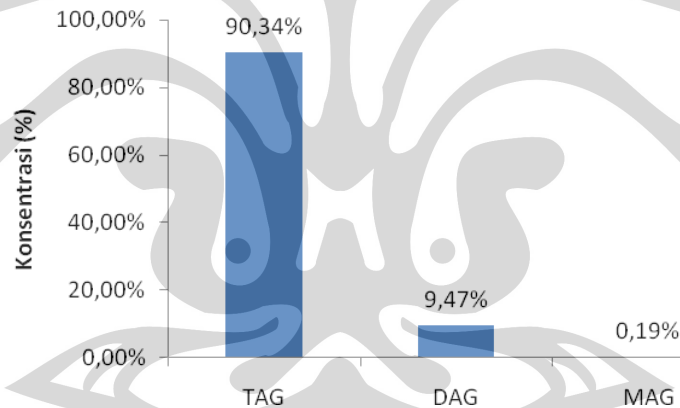
4.5 Hasil Analisis HPLC

Kurva hasil analisis HPLC terdiri dari kurva standar HPLC dan kurva HPLC untuk sintesis diasilgliserol melalui reaksi parsial hidrolisis dan parsial esterifikasi dalam reaktor membran *hollow fiber*. Gambar kurva HPLC dapat dilihat pada lampiran. Standar yang digunakan dalam analisa HPLC adalah asam oleat, sehingga produk DAG yang dihasilkan akan diwakili oleh diolein. Komponen oleat digunakan karena mewakili jumlah komponen asam lemak terbesar di dalam kandungan trigliserida pada minyak kelapa sawit. Data standar HPLC digunakan sebagai pembanding terhadap data percobaan yang dihasilkan. Gambar 4.12 dan 4.13 memperlihatkan kandungan TAG, DAG, dan MAG yang

terdapat pada minyak kelapa sawit yang belum disintesis (umpan pada reaktor yang akan diperkaya kandungan DAG-nya).



Gambar 4. 12. Kandungan (mol/L) TAG, DAG, dan MAG pada minyak fresh yang akan digunakan sebagai reaktan untuk proses parsial hidrolisis.



Gambar 4. 13. Kandungan (%) TAG, DAG, dan MAG pada minyak fresh yang akan digunakan sebagai reaktan untuk proses parsial hidrolisis

Perhitungan konsentrasi dan kemurnian produk DAG yang dihasilkan dilakukan dengan menggunakan persamaan reaksi dan rumus-rumus seperti di bawah ini.

$$3[TG]_0 = 3[TG] + 2[DG] + [MG] \quad (4.2)$$

$$\text{Kemurnian DAG}(\%) = \frac{[DAG]}{[DAG] + [TAG]} \times 100\% \quad (4.3)$$

Dari hasil perhitungan diperoleh data konversi, komposisi, dan konsentrasi TAG, DAG, dan MAG dalam minyak yang telah diperkaya kandungan DAG-nya.

4.5.1 Hasil Analisis HPLC untuk Variasi Konfigurasi pada Proses Parsial Hidrolisis dan Parsial Esterifikasi

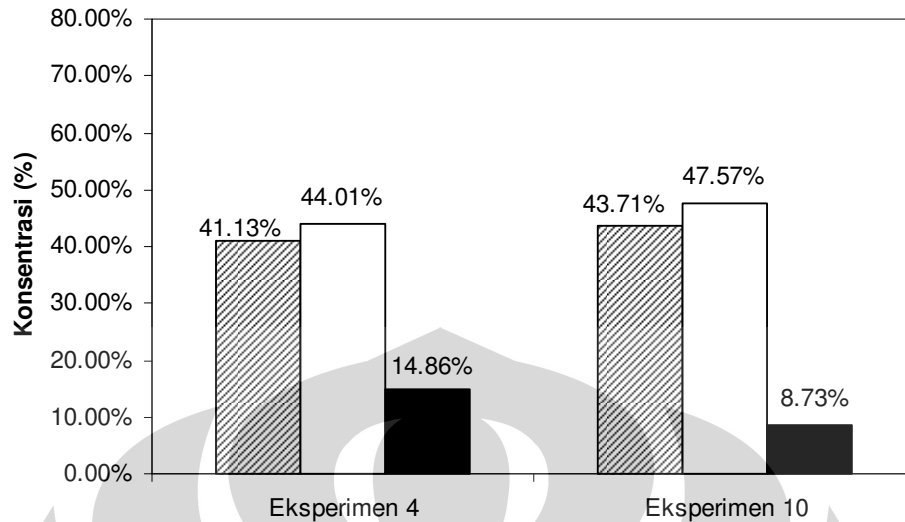
Hasil analisis HPLC untuk eksperimen variasi konfigurasi arah aliran dalam proses parsial hidrolisis dan parsial esterifikasi ditunjukkan pada Tabel 4.7 dan Gambar 4.14.

Tabel 4. 7. Hasil analisis HPLC pada minyak produk dengan variasi konfigurasi arah aliran minyak pada proses parsial hidrolisis dan parsial esterifikasi

Eksperimen	Konfigurasi	(TAG) (mol/L)	(DAG) (mol/L)	(MAG) (mol/L)
2	- Shell: Buffer phosphate, diam Lumen: Minyak, dari bawah ke atas	0,0157	0,0252	0,0107
7	- Shell: Buffer phosphate, diam Lumen: Minyak, dari atas ke bawah	0,0111	0,0182	0,0067

Tabel 4. 8. Persentase komposisi TAG, DAG, dan MAG, serta kemurnian DAG pada variasi konfigurasi arah aliran minyak

Eksperimen	(TAG) %	(DAG) %	(MAG) %	Kemurnian DAG (%)
2	41,13	44,01	14,86	61,61
7	43,71	45,57	8,73	62,01



Gambar 4. 14. Perbandingan konsentrasi TAG (▨), DAG (□), dan MAG (■) pada eksperimen variasi konfigurasi

Pada gambar diatas terlihat bahwa konfigurasi arah aliran minyak dalam proses parsial hidrolisis dan parsial esterifikasi tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap konversi minyak DAG yang dihasilkan. Namun, jika dibandingkan dapat dilihat bahwa eksperimen proses parsial hidrolisis dan parsial esterifikasi yang dilakukan dengan konfigurasi arah aliran dari atas ke bawah menghasilkan konversi yang sedikit lebih tinggi. Sehingga untuk eksperimen berikutnya dilakukan dengan mengikuti konfigurasi yang lebih baik.

4.5.2 Hasil Analisis HPLC untuk Variasi Konsentrasi Enzim pada Proses Immobilisasi Enzim

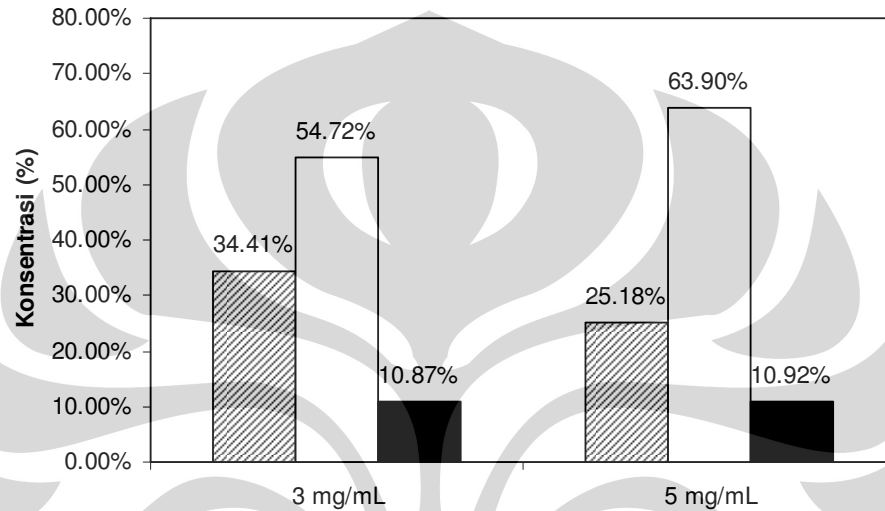
Hasil analisis HPLC untuk eksperimen variasi konsentrasi enzim dalam proses immobilisasi enzim ditunjukkan pada Tabel 4.9 dan Gambar 4.15.

Tabel 4. 9. Hasil analisis HPLC pada minyak produk dengan variasi konsentrasi enzim pada proses immobilisasi enzim

Eksperimen	Konsentrasi Enzim Awal ($C_{E,0}$)	Enzim Loading	(TAG) (mol/L)	(DAG) (mol/L)	(MAG) (mol/L)
1	3 mg/mL	0,2907 mg/cm ²	0,0139	0,0332	0,0132
3	5 mg/mL	0,3398 mg/cm ²	0,0091	0,0345	0,0118

Tabel 4. 10. Persentase komposisi TAG, DAG, dan MAG, serta kemurnian DAG pada variasi konsentrasi wnzim

Konsentrasi Enzim	(TAG)	(DAG)	(MAG)	Kemurnian DAG (%)
	%	%	%	
3 mg/mL	34,41	54,72	10,87	70,46
5 mg/mL	25,18	63,90	10,92	79,19



Gambar 4. 15. Perbandingan konsentrasi TAG (▨), DAG (□), dan MAG (■) pada eksperimen variasi konsentrasi enzim

Pada gambar di atas terlihat bahwa konsentrasi enzim mempengaruhi konsentrasi minyak DAG yang dihasilkan. Semakin besar konsentrasi enzim dan semakin besar enzim loading menyebabkan semakin banyak enzim yang terabsorpsi di dalam hollow fiber membran. Hal ini membuat semakin banyak katalis yang terlibat dalam proses hidrolisis dan esterifikasi, sehingga menghasilkan konversi minyak DAG yang lebih tinggi.

4.5.3 Hasil Analisis HPLC untuk Variasi Waktu Tinggal Minyak pada Proses Parsial Esterifikasi

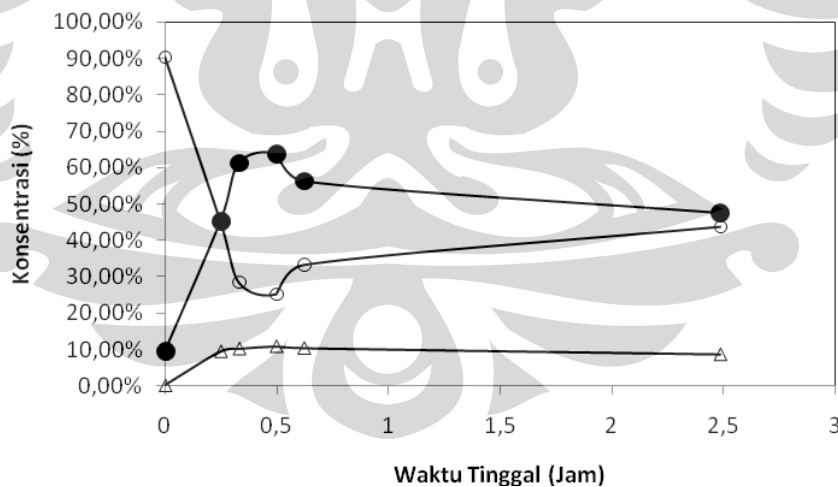
Hasil analisis HPLC untuk eksperimen variasi waktu tinggal minyak pada reaksi parsial esterifikasi ditunjukkan pada Tabel 4.11 dan Gambar 4.16.

Tabel 4. 11. Hasil analisis HPLC pada minyak produk dengan variasi laju alir minyak pada proses parsial esterifikasi.

Laju Alir, F (mL/s)	Waktu Tinggal, τ (jam)	(TAG) (mol/L)	(DAG) (mol/L)	(MAG) (mol/L)
-	0,00	0,0159	0,0025	0,0001
0,1	0,25	0,0097	0,0146	0,0061
0,075	0,33	0,0098	0,0318	0,0107
0,05	0,50	0,0091	0,0345	0,0118
0,04	0,62	0,0104	0,0266	0,0099
0,01	2,49	0,0111	0,0182	0,0067

Tabel 4. 12. Persentase komposisi TAG, DAG, dan MAG, serta kemurnian DAG pada variasi laju alir minyak

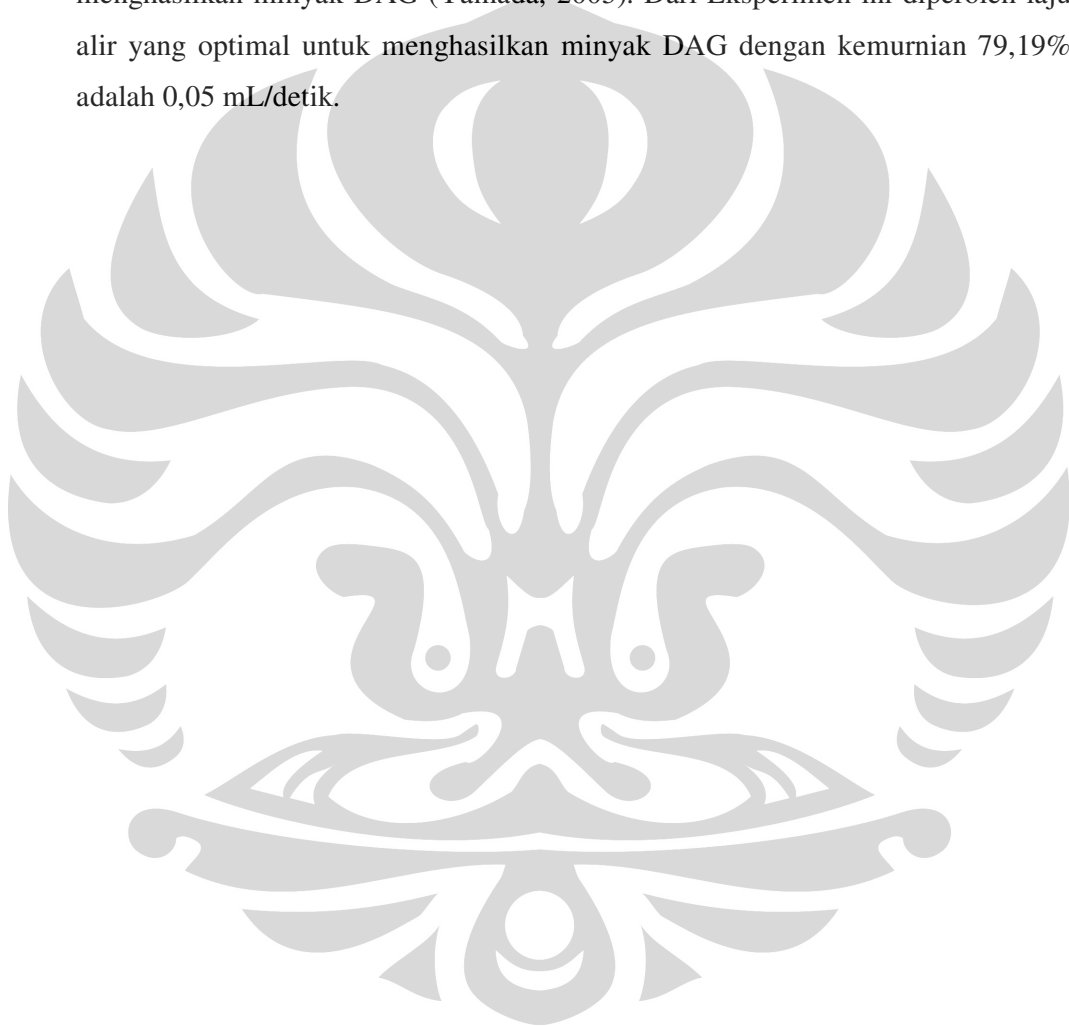
Laju Alir, F (mL/s)	(TAG) %	(DAG) %	(MAG) %	Kemurnian DAG (%)
-	90,34	9,47	0,19	-
0,1	45,21	45,24	9,55	60,02
0,075	28,38	61,34	10,28	76,42
0,05	25,18	63,90	10,92	79,19
0,04	33,22	56,32	10,46	71,77
0,01	43,71	45,57	8,73	62,01



Gambar 4. 16. Hubungan antara waktu tinggal minyak pada proses parsial esterifikasi dengan konsentrasi TAG(\circ), DAG (\bullet) dan MAG (Δ) pada produk minyak

Pada gambar di atas terlihat bahwa waktu tinggal minyak di dalam reaktor tidak berbanding lurus dengan konsentrasi. Semakin lama waktu tinggal minyak

semakin tinggi konsentrasi DAG yang dihasilkan. Namun pada waktu tinggal tertentu, semakin lama waktu tinggal minyak konsentrasi DAG yang dihasilkan semakin kecil. Pada gambar tersebut juga terlihat bahwa dengan meningkatnya waktu tinggal terjadi peningkatan konsentrasi TAG dan pengurangan MAG. Hal ini disebabkan produk utama dari reaksi ini adalah TAG dan air (Watanabe, 2005). Sehingga terdapat waktu tinggal atau laju alir yang optimal untuk menghasilkan minyak DAG (Yamada, 2005). Dari Eksperimen ini diperoleh laju alir yang optimal untuk menghasilkan minyak DAG dengan kemurnian 79,19% adalah 0,05 mL/detik.



BAB 5

KESIMPULAN

Dari hasil percobaan dan analisis data hasil pengamatan bisa disimpulkan beberapa hal berikut ini:

1. Konfigurasi arah aliran minyak pada proses parsial hidrolisis dan parsial esterifikasi tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap yield minyak DAG yang dihasilkan.
2. Semakin besar konsentrasi enzim yang digunakan pada proses immobilisasi biokatalis, semakin banyak enzim yang teradsorb pada permukaan membran, semakin tinggi yield minyak DAG yang dihasilkan.
3. Waktu tinggal tidak berbanding lurus dengan konsentrasi DAG yang dihasilkan, karena DAG merupakan produk intermediet. Terdapat waktu tinggal optimum untuk dapat menghasilkan yield minyak DAG.
4. Rekayasa untuk meningkatkan kandungan DAG dalam minyak kelapa sawit melalui proses parsial hidrolisis dan parsial esterifikasi menggunakan biokatalis yang diimmobilisasi dalam bioreaktor *hollow fiber* membran telah berhasil dikembangkan dengan baik dengan kandungan DAG mencapai 79,19%. Hasil produksi DAG pada temperatur operasi 37°C dan konsentrasi enzim awal 5 mg/mL diperlihatkan pada Tabel 5.1.

Tabel 5. 1. Hasil Produksi DAG

Waktu Tinggal	Kemurnian DAG
15 menit	60,02%
20 menit	76,42 %
30 menit	79,19 %
38 menit	71,77 %
150 menit	62,01 %

Ket: T = 37°C, Konsentrasi Enzim Awal = 5 mg/mL

DAFTAR REFERENSI

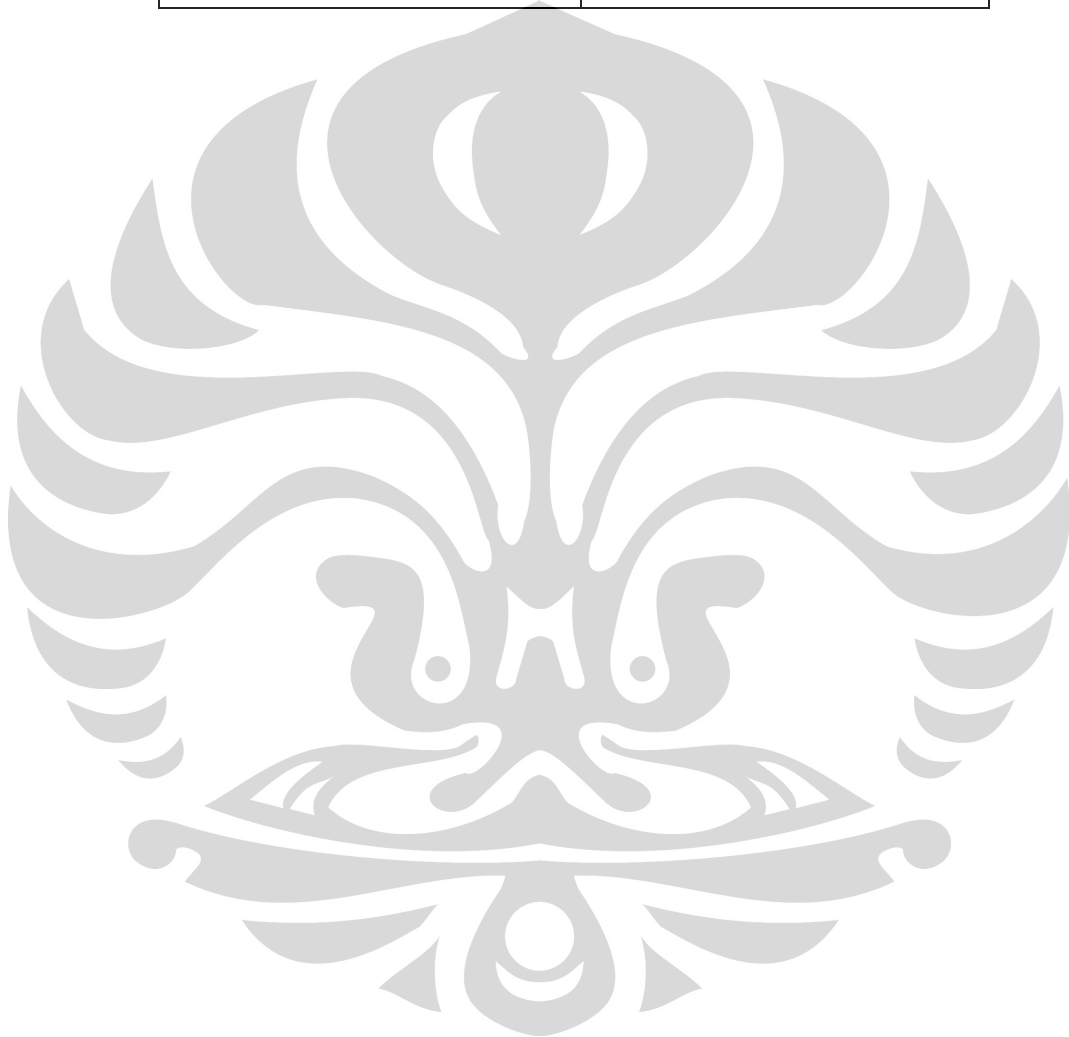
- Anonim. "Reaksi Hidrolisis". www.smapgii1.sch.id/hidrolisis%20final/hidrolisis_parsial_asam (diakses tanggal 5 Mei 2010).
- Anonim "Esterifikasi". <http://library.usu.ac.id/download/fmipa/kimia-ubaidillah.pdf>. (diakses tanggal 13 Mei 2010)
- D'Souza, S.F. *Immobilized Enzymes in Bioprocess*. Style sheet. www.ias.ac.in. Diakses tanggal 20 April 2010.
- Gupta, M. N., Roy, I. *Enzymes in organic media-forms, functions and applications*. Eur. J. Biochem, 2004, 271, 2575-2583.
- Hong, Eock Kee. Analysis of The Hollow Fiber Membrane Reactor Using Immobilized Enzyme with Deactivation. Thesis, Ohio University, Ohio. 1986.
- Hirota, Y., J. Kohori, Y. Kawahara. 1988. Preparation of diglycerides. Europe Patent No. 030715.
- Kondo, H., T. Hase, T. Murase, I. Tokimitsu. 2003. Digestion and assimilation features of dietary DAG in the rat small intestine. *Lipids* 38:25–30.
- Maki, KC., M.H. Davidson, R. Tsushima, N. Matsuo, I. Tokimitsu, D.M. Umporowicz, M.R. Dicklin, G.S. Foster, K.A. Ingram, B.D. Anderson, S.D. Frost, M. Bell. Consumption of diacylglycerol oil as part of a mildly reduced-energy diet enhances loss of body weight and fat compared with a triacylglycerol control oil. *Am J Clin Nutr* 76:1230–1236. 2002.
- Mittlebach, M.; Remschmidt, Claudia. *Biodiesel The Comprehensive Handbook*. Vienna: Boersedruck Ges. M. bH, 2004.
- Nagao, T., H. Watanabe, N. Goto, K. Onizawa, H. Taguchi, N. Matsuo, T. Yasukawa, R. Tsushima, H. Shimasaki, H. Itakura. 2000. Dietary diacylglycerol suppresses accumulation of body fat compared to triacylglycerol in men in a double-blind controlled trial. *J Nutr* 130:792–797.
- Nakajima, Y., Fukasawa, J., and Shimada, A. Diacylglycerol Oil. AOCS Press. Champaign IL: 2004, pp. 182–196.
- Nishide, T., Masao Shimizu, Thomas R. Tiffany, Hisae Ogawa. 2004. Cooking Oil: Cooking Properties and Sensory Evaluation. *Diacylglycerol Oil* 19:1–11. Champaign: AOCS Press.
- Ramachandra Murty, V., "Hydrolysis of Oils by Using Immobilized Lipase Enzyme: A Review", *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2002, 7:57-66.

- Rosu, R., M. Yasui, Y. Iwasaki, T. Yamane. 1999. Enzymatic synthesis of symmetrical 1,3-DAGs by direct esterification of glycerol in solvent-free system. *J Am Oil Chem Soc* 76:839–843.
- Seong, Koon Lo. et al. Diacylglycerol Oil – Properties, Processes and Products: A Review. Food Bioprocess Technol. 2007
- Sontang, N O V. 1982. Glycerolysis of fats and methyl esters-status. *J Am Oil Chem Soc* 59:795A–802A.
- Tada, N., H. Watanabe, N. Matsuo, I. Tokimitsu, M. Okazaki. Dynamics of postprandial remnant-like lipoprotein particles in serum after loading of diacylglycerols. *Clin Chim Acta* 311:109–117. 2001.
- T. Yasukawa, Y. Katsuragi, N. Matsuo, B. Flickinger, I. Tokimitsu, and M. Matlock. AOCS Press, Champaign IL: 2004, pp. 1–15.
- Watanabe, H., K. Onizawa, H. Taguchi, M. Kobori, H. Chiba, Y. Naito, N. Matsuo, T. Yasukawa, M. Hattori, H. Shimasaki. 1997. Nutritional characterization of diacylglycerols in rats. *J Jpn Oil Chem Soc* 46:301–307.
- Watanabe, T., M. Shimizu, M. Sugiura, M. Sato, J. Kohori, N. Yamada, K. Nakanishi. 2003. Optimization of reaction conditions for production of DAG using immobilized 1,3-regiospecific lipase Lipozyme RM IM. *J Am Oil Chem Soc*, 80:1201–1207.
- Watanabe, T., M. Sugiura, M. Sato, N. Yamada, K. Nakanishi. 2004. Diacylglycerol Production in a Packed Bed Bioreactor. *Process Biochemistry* 40: 637-643.
- Worsfold, P.J. *Classification and Chemical Characteristic of Immobilized Enzymes*. Pure & Appl. Chem. 67 (1995): 597-600.
- Yamada, N., N. Matsuo, T. Watanabe, T. Yanagita. 2005. Enzymatic Production of Diacylglycerol and Its Beneficial Physiological Functions. *Handbook of Industrial Biocatalysis*. 11:1-17. Singapura: CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC.
- Yanagita, T., I. Ikeda, Y.M. Wang, H. Nagakiri. 2002. Comparison of the lymphatic transport of radio labeled 1,3-diacylglycerol and triacylglycerol in rats, *Lipids* 39:827–832.

LAMPIRAN

1. Contoh perhitungan volume reaktor

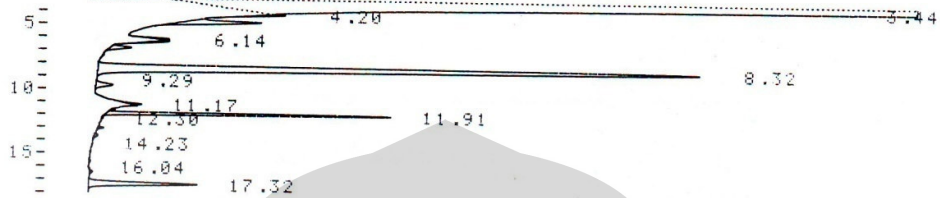
$\begin{aligned}\text{Luas} &= 2 \times \pi \times r \times t \\ &= 2 \times \pi \times 0,1 \text{ cm} \times 73 \text{ cm} \\ &= 45,844 \text{ cm}^2\end{aligned}$	$\begin{aligned}\text{Volume} &= \pi \times r^2 \times t \\ &= \pi \times (0,1 \text{ cm})^2 \times 73 \text{ cm} \\ &= 2,2922 \text{ cm}^3\end{aligned}$
---	---



2. Data HPLC standar dan minyak fresh

STANDAR

CH. 1 C.S 2.50 ATT 10 OFFS 0 10/19/09 12:17



INJ NO. OF STD : 1 / 1 REP : 1st level

D-2500

10/19/09 12:17

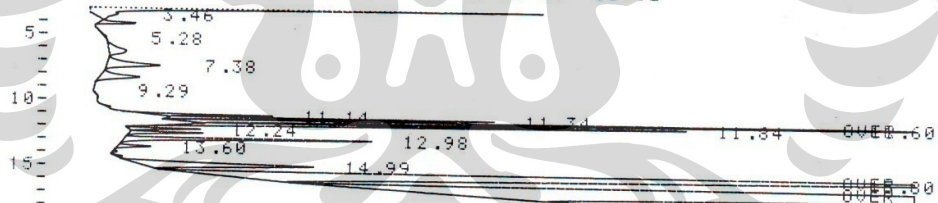
METHOD: BIODIESEL TAG: 3 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	MG	BC	NAME
40	6.83	350311	10.000	BB	METH
43	8.32	15722060	1.000	BB	MONO
49	11.91	3381059	1.000	BB	DI
72	17.32	2066167	1.000	BB	TRI

1

CH. 1 C.S 2.50 ATT 10 OFFS 0 10/19/09 12:52



D-2500

10/19/09 12:52

METHOD: BIODIESEL TAG: 4 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	MG	BC	NAME
47	6.29	753201	21.501	BB	METH
49	8.29	1017571	0.065	BB	MONO
62	11.84	4757997	1.407	BB	DI
71	17.15	30013410	14.526	BB	TRI
TOTAL		36542179	37.499		

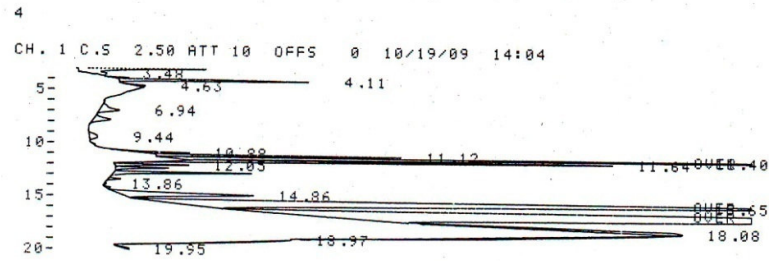
PEAK REJ : 0

SF : 1.000

SAMP-AMT : 1.000

RAW DATA STORAGE NO. 3

3. Data HPLC Hidrolisis dan Esterifikasi Eksperimen 1



D-2500 10/19/09 14:04

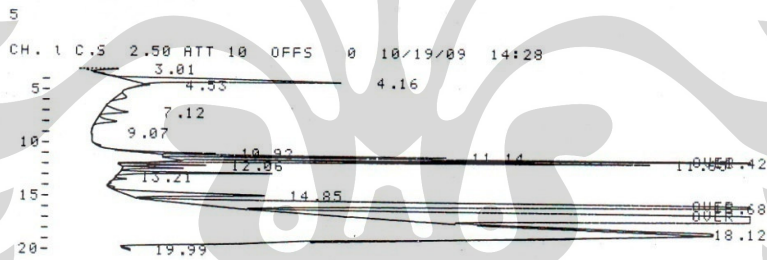
METHOD: BIODIESEL TAG: 7 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	MG	BC	NAME
14	6.94	703064	20.070	BB	METH
16	8.53	74	0.000	BB	MONO
25	12.05	872449	0.258	BB	DI
33	16.95	31244128	15.122	BB	TRI
TOTAL		32819715	35.450		

PEAK REJ : 0
SF : 1.000
SAMP-AMT : 1.000

RAW DATA STORAGE NO. 6



D-2500 10/19/09 14:28

METHOD: BIODIESEL TAG: 8 CH: 1

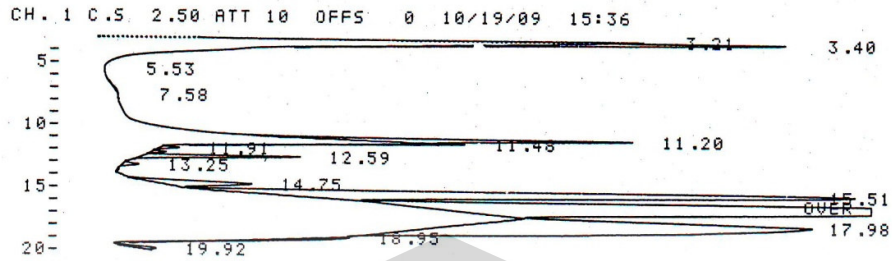
FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	MG	BC	NAME
14	7.12	907581	25.908	BB	METH
16	8.61	33	0.000	BB	MONO
37	12.06	993579	0.294	BB	DI
46	17.01	29354000	14.207	BB	TRI
TOTAL		31255273	40.409		

PEAK REJ : 0
SF : 1.000
SAMP-AMT : 1.000

4. Data HPLC Hidrolisis dan Esterifikasi Eksperimen 2

8



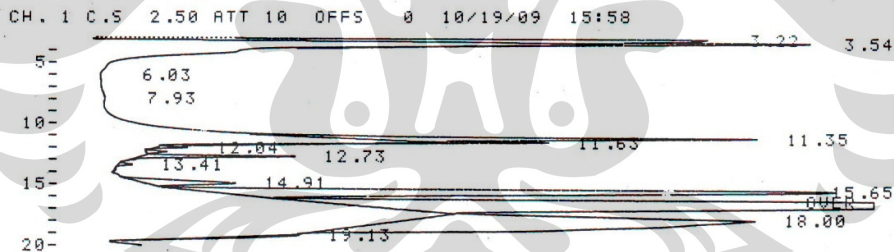
D-2500 10/19/09 15:36
 METHOD: BIODIESEL TAG: 11 CH: 1
 FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	MG	BC	NAME
29	8.00	124	0.000	BB	MONO
32	11.91	206908	0.079	BB	DI
39	16.87	31041016	15.023	BB	TRI
TOTAL		31308048	15.102		

PEAK REJ : 0
 SF : 1.000
 SAMP-AMT : 1.000

RAW DATA STORAGE NO. 10

9



D-2500 10/19/09 15:58
 METHOD: BIODIESEL TAG: 12 CH: 1
 FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	MG	BC	NAME
31	6.83	49	0.001	BB	METH
42	8.40	4	0.000	BB	MONO
49	12.04	420643	0.124	BB	DI
56	16.96	33152495	16.045	BB	TRI
TOTAL		33573191	16.171		

PEAK REJ : 0
 SF : 1.000
 SAMP-AMT : 1.000

RAW DATA STORAGE NO. 11

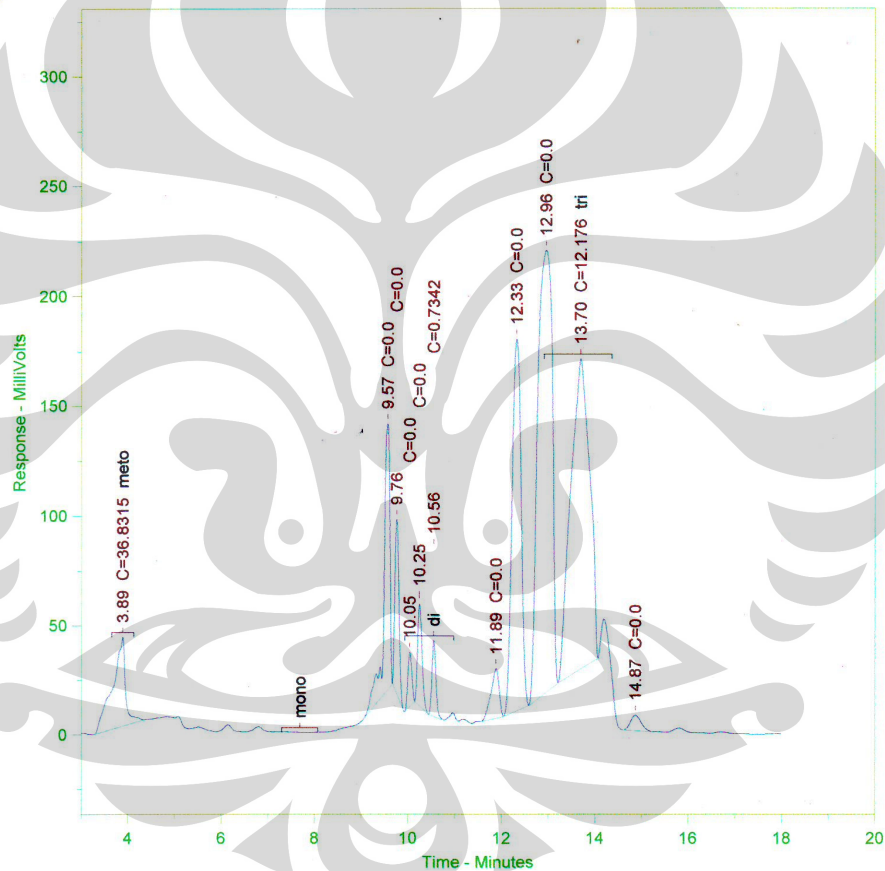
CHART NO. 661-7501

5. Data HPLC Hidrolisis Eksperimen 3-7

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : iqbal 2.0010.RAW (8)
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : iqbal 2.0002.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 4/20/2010 4:29:17 PM
 Analyst : Arie Bachtiar

Minyak Hidrolisis
 $v = 0.0505 \text{ ml/s}$

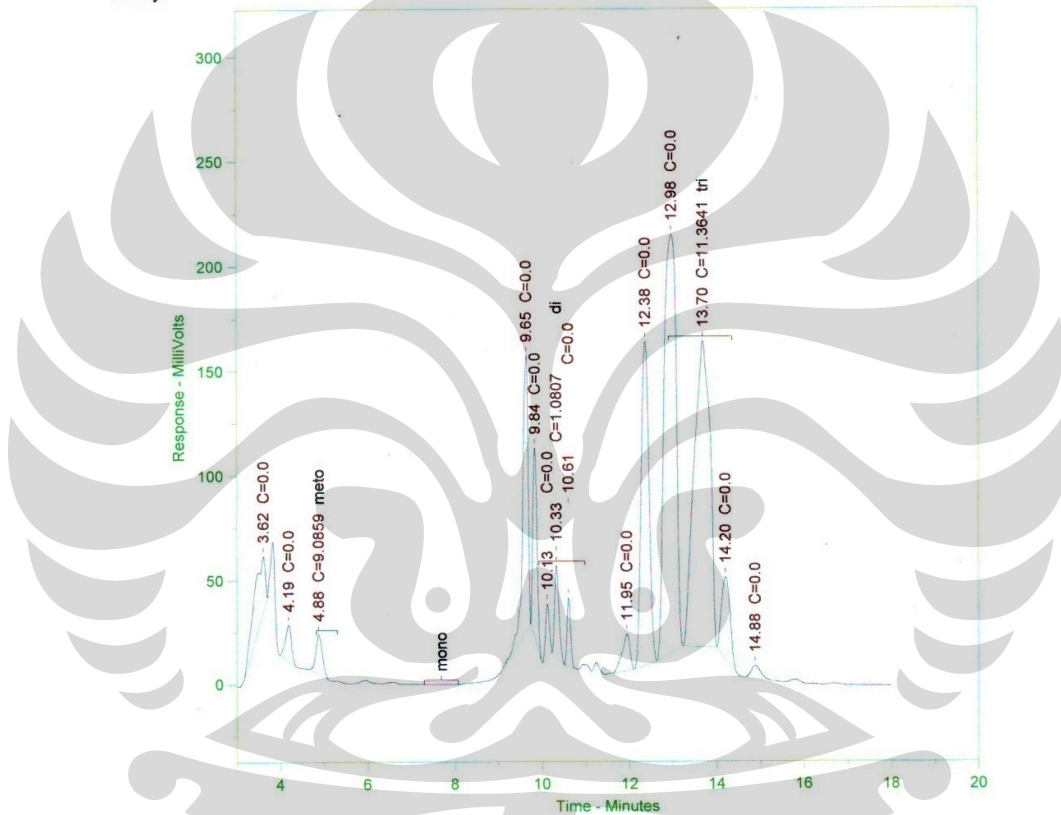


Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.892	802620	36.831	meto
2	9.567	1084371	0.000	
3	9.760	514993	0.000	
4	10.046	146699	0.000	
5	10.252	312617	0.000	
6	10.557	205862	0.734	di
7	11.887	276598	0.000	
8	12.328	2278454	0.000	
9	12.964	4351382	0.000	
10	13.700	3956020	12.176	tri
11	14.873	108762	0.000	

6. Data HPLC Esterifikasi Eksperimen 3

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : iqbal 2.0009.RAW (7)
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : iqbal 2.0002.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 4/20/2010 4:04:52 PM
 Analyst : Arie Bachtiar

DAG $10 \rightarrow v = 0,0105$ 

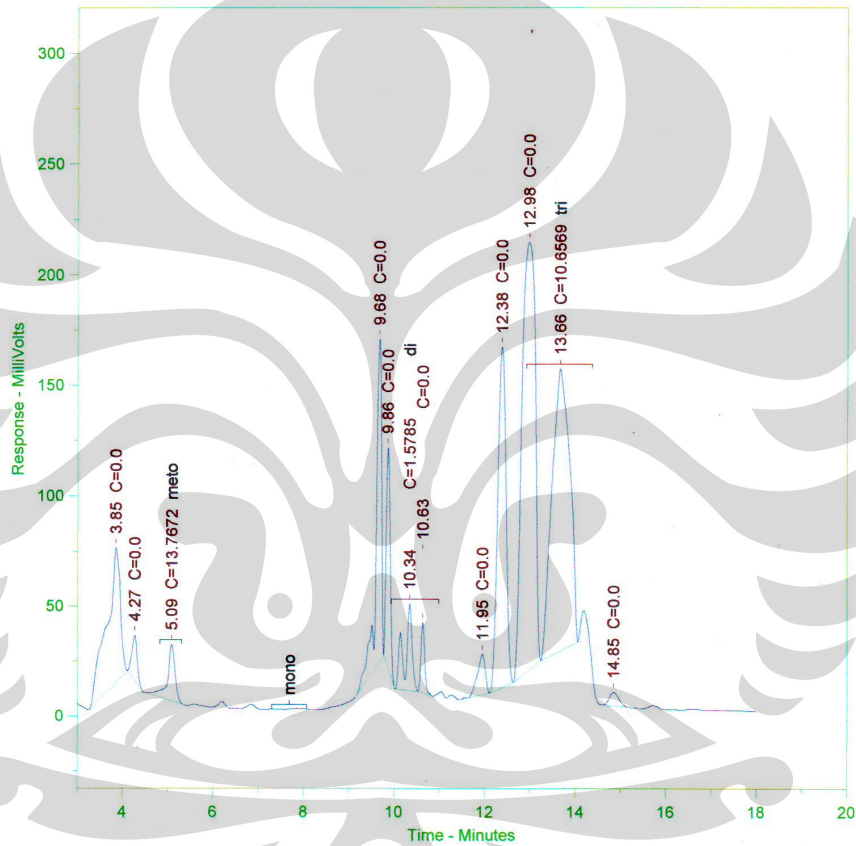
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.616	557905	0.000	
2	4.194	166867	0.000	
3	4.881	197996	9.086	meto
4	9.652	1144244	0.000	
5	9.841	609600	0.000	
6	10.125	154905	0.000	
7	10.332	303029	1.081	di
8	10.610	183786	0.000	
9	11.946	222267	0.000	
10	12.376	1946604	0.000	
11	12.981	3822557	0.000	
12	13.696	3692233	11.364	tri
13	14.204	536203	0.000	
14	14.878	93807	0.000	

7. Data HPLC Esterifikasi Eksperimen 4

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : iqbal 2.0008.RAW (6)
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : iqbal 2.0002.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 4/20/2010 3:41:22 PM
 Analyst : Arie Bachtiar

DAG 9 $v = 0,04$ ml/s

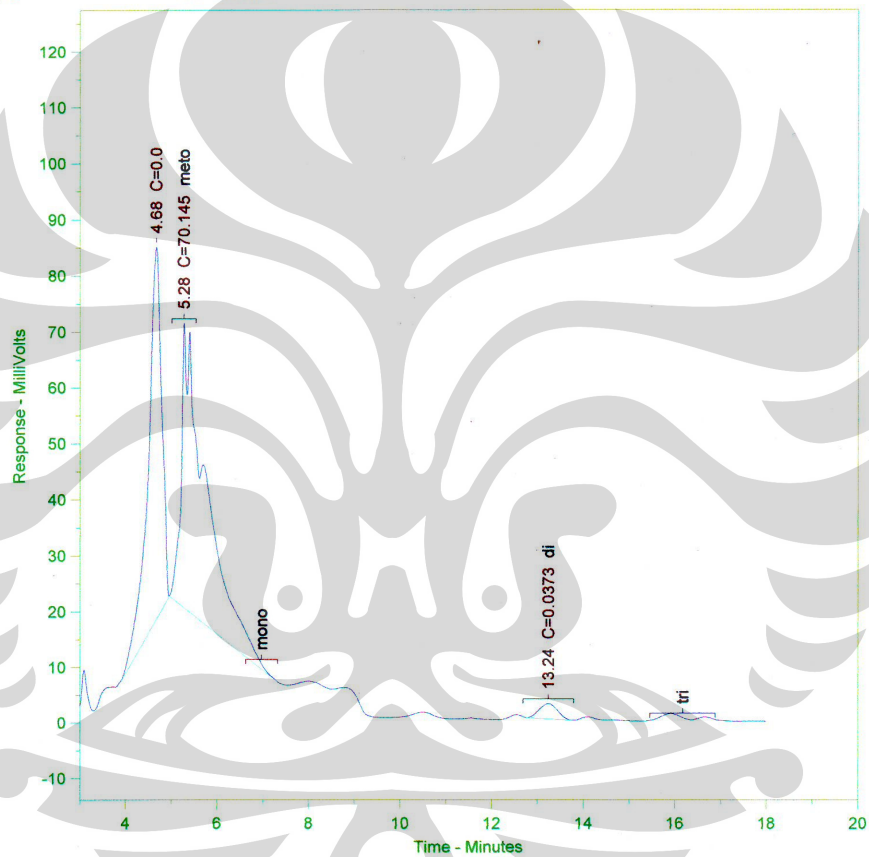


Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.854	1286433	0.000	
2	4.273	173305	0.000	
3	5.089	300010	13.767	meto
4	9.677	1216152	0.000	
5	9.864	620076	0.000	
6	10.343	442625	1.579	di
7	10.635	183420	0.000	
8	11.951	225102	0.000	
9	12.379	1954524	0.000	
10	12.978	3925724	0.000	
11	13.661	3462457	10.657	tri
12	14.850	91216	0.000	

8. Data HPLC Esterifikasi Eksperimen 5

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : biodisel iqbal.0005.RAW / E - 5
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : biodisel iqbal.0010.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 5/11/2010 11:16:40 AM
 Analyst : Arie Bachtiar



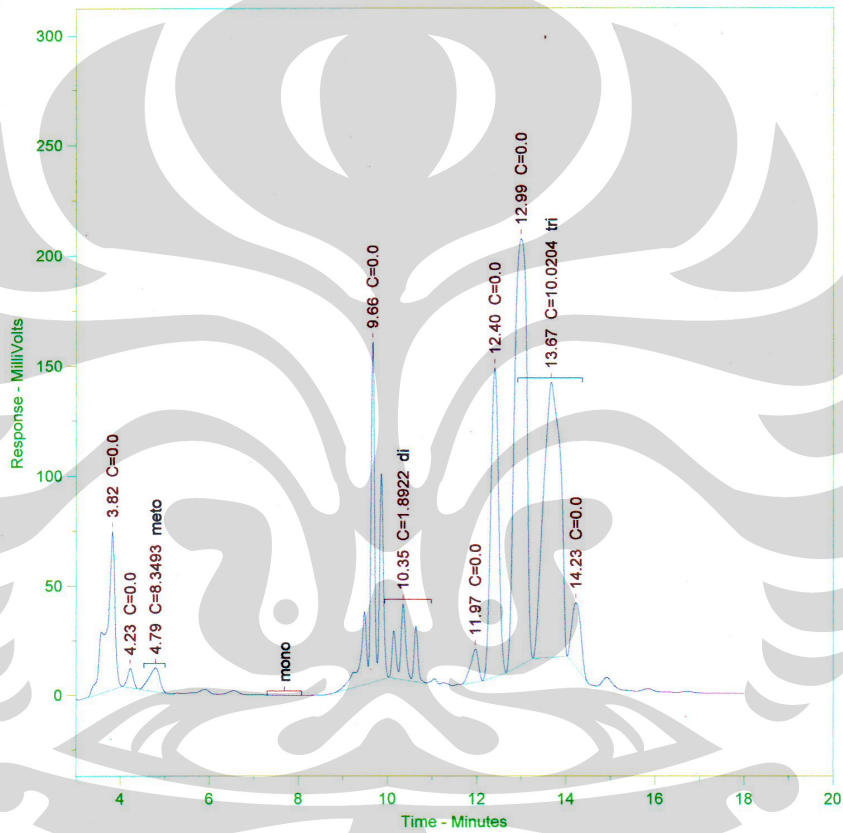
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	4.678	1374178	0.000	
2	5.279	1921959	70.145	meto
3	13.242	74748	0.037	di

9. Data HPLC Esterifikasi Eksperimen 6

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : iqbal 2.0005.RAW (3)
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : iqbal 2.0002.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licrosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 4/20/2010 2:25:28 PM
 Analyst : Arie Bachtiar

DAG 6 → $v = 0,075 \text{ ml/s}$



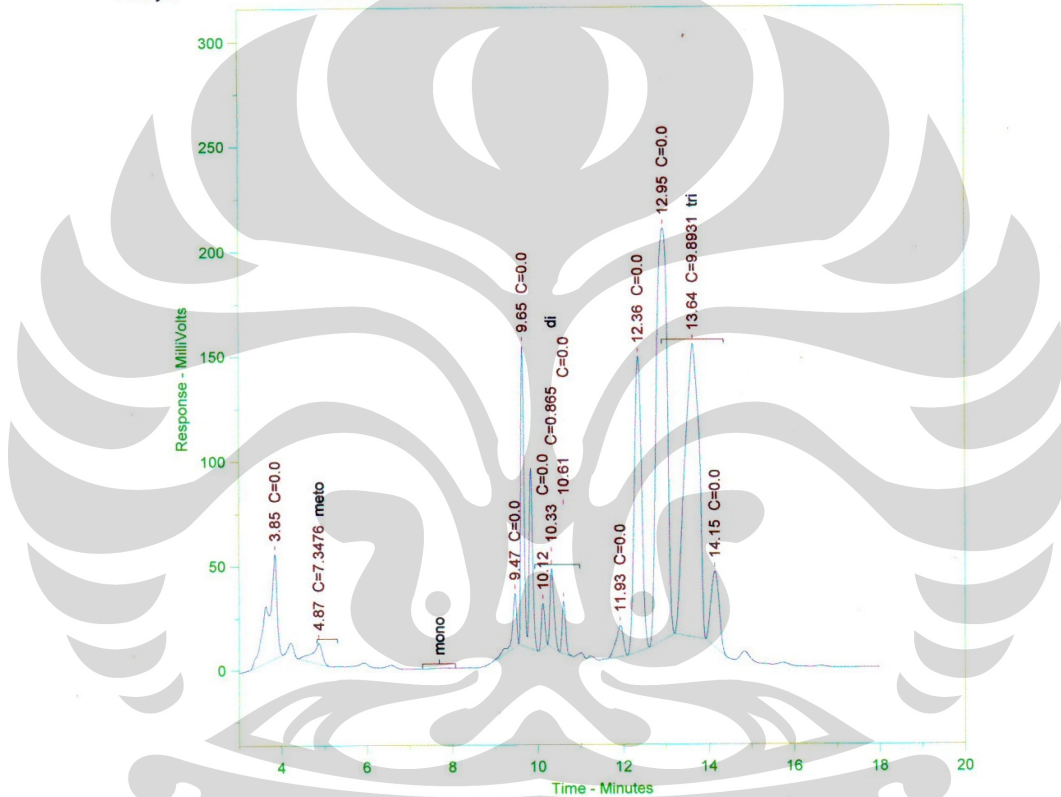
Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.820	993965	0.000	
2	4.226	77610	0.000	
3	4.794	181945	8.349	meto
4	9.664	1789403	0.000	
5	10.350	530560	1.892	di
6	11.971	184430	0.000	
7	12.401	1721010	0.000	
8	12.992	3654033	0.000	
9	13.670	3255658	10.020	tri
10	14.227	418739	0.000	

10. Data HPLC Esterifikasi Eksperimen 7

HPLC Analysis Report, Laboratorium Teknologi Bioindustri, BPPT

File Name : iqbal 2.0007.RAW (5)
 Method File : Biodisel.MET
 Calibration File : iqbal 2.0002.BND.CAL
 Mobile Phase : A: MeOH B: Isopropanol Hexane = 5:4
 Flow Rate : 0.8 ml/min
 Column : Licosphere RP18
 Temperature : Ambient
 Detector : UV 205 nm
 Analysis Date : 4/20/2010 3:14:39 PM
 Analyst : Arie Bachtiar

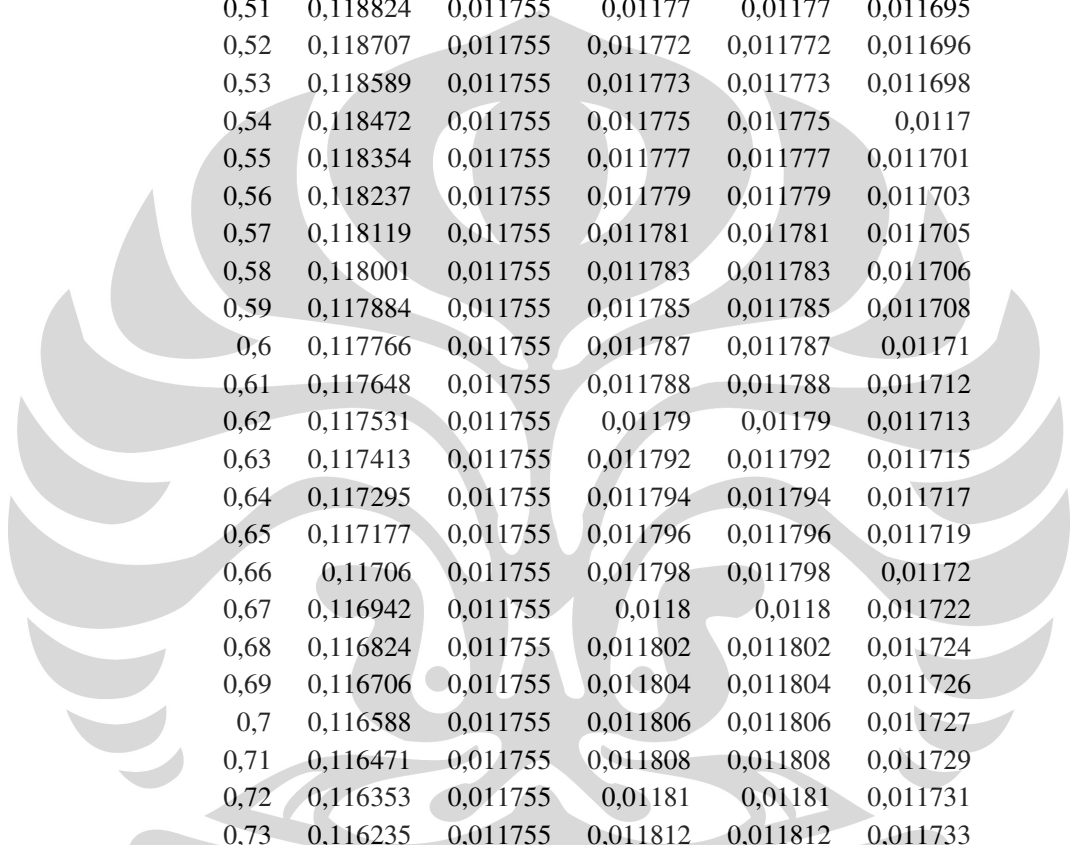
DAG $\delta \rightarrow v = 0,105 \text{ m}^1/\text{s}$



Peak No	Ret. Time	Area	Conc.	Peak Name
1	3.852	771190	0.000	
2	4.875	160116	7.348	meto
3	9.467	185869	0.000	
4	9.648	1230386	0.000	
5	10.124	120174	0.000	
6	10.328	242543	0.865	di
7	10.607	140237	0.000	
8	11.933	179708	0.000	
9	12.356	1689067	0.000	
10	12.947	3447671	0.000	
11	13.638	3214301	9.893	tri
12	14.147	484052	0.000	

11. Data simulasi menggunakan metode Runge-Kutta

τ	(G)	k1	k2	k3	k4
0	0,1248	0,011755	0,011681	0,011681	0,011613
0,01	0,124683	0,011755	0,011682	0,011682	0,011615
0,02	0,124566	0,011755	0,011684	0,011684	0,011616
0,03	0,12445	0,011755	0,011686	0,011686	0,011618
0,04	0,124333	0,011755	0,011687	0,011687	0,011619
0,05	0,124216	0,011755	0,011689	0,011689	0,011621
0,06	0,124099	0,011755	0,011691	0,011691	0,011622
0,07	0,123982	0,011755	0,011692	0,011692	0,011624
0,08	0,123865	0,011755	0,011694	0,011694	0,011625
0,09	0,123748	0,011755	0,011696	0,011696	0,011627
0,1	0,123631	0,011755	0,011697	0,011697	0,011628
0,11	0,123514	0,011755	0,011699	0,011699	0,01163
0,12	0,123397	0,011755	0,011701	0,011701	0,011631
0,13	0,12328	0,011755	0,011702	0,011702	0,011633
0,14	0,123163	0,011755	0,011704	0,011704	0,011635
0,15	0,123046	0,011755	0,011706	0,011706	0,011636
0,16	0,122929	0,011755	0,011708	0,011708	0,011638
0,17	0,122812	0,011755	0,011709	0,011709	0,011639
0,18	0,122695	0,011755	0,011711	0,011711	0,011641
0,19	0,122578	0,011755	0,011713	0,011713	0,011642
0,2	0,122461	0,011755	0,011714	0,011714	0,011644
0,21	0,122344	0,011755	0,011716	0,011716	0,011646
0,22	0,122227	0,011755	0,011718	0,011718	0,011647
0,23	0,12211	0,011755	0,01172	0,01172	0,011649
0,24	0,121993	0,011755	0,011721	0,011721	0,01165
0,25	0,121875	0,011755	0,011723	0,011723	0,011652
0,26	0,121758	0,011755	0,011725	0,011725	0,011653
0,27	0,121641	0,011755	0,011727	0,011727	0,011655
0,28	0,121524	0,011755	0,011728	0,011728	0,011657
0,29	0,121407	0,011755	0,01173	0,01173	0,011658
0,3	0,121289	0,011755	0,011732	0,011732	0,01166
0,31	0,121172	0,011755	0,011734	0,011734	0,011662
0,32	0,121055	0,011755	0,011735	0,011735	0,011663
0,33	0,120938	0,011755	0,011737	0,011737	0,011665
0,34	0,12082	0,011755	0,011739	0,011739	0,011666
0,35	0,120703	0,011755	0,011741	0,011741	0,011668
0,36	0,120586	0,011755	0,011742	0,011742	0,01167
0,37	0,120469	0,011755	0,011744	0,011744	0,011671
0,38	0,120351	0,011755	0,011746	0,011746	0,011673
0,39	0,120234	0,011755	0,011748	0,011748	0,011675
0,4	0,120116	0,011755	0,01175	0,01175	0,011676
0,41	0,119999	0,011755	0,011751	0,011751	0,011678
0,42	0,119882	0,011755	0,011753	0,011753	0,01168



0,43	0,119764	0,011755	0,011755	0,011755	0,011681
0,44	0,119647	0,011755	0,011757	0,011757	0,011683
0,45	0,119529	0,011755	0,011759	0,011759	0,011684
0,46	0,119412	0,011755	0,011761	0,011761	0,011686
0,47	0,119294	0,011755	0,011762	0,011762	0,011688
0,48	0,119177	0,011755	0,011764	0,011764	0,011689
0,49	0,119059	0,011755	0,011766	0,011766	0,011691
0,5	0,118942	0,011755	0,011768	0,011768	0,011693
0,51	0,118824	0,011755	0,01177	0,01177	0,011695
0,52	0,118707	0,011755	0,011772	0,011772	0,011696
0,53	0,118589	0,011755	0,011773	0,011773	0,011698
0,54	0,118472	0,011755	0,011775	0,011775	0,0117
0,55	0,118354	0,011755	0,011777	0,011777	0,011701
0,56	0,118237	0,011755	0,011779	0,011779	0,011703
0,57	0,118119	0,011755	0,011781	0,011781	0,011705
0,58	0,118001	0,011755	0,011783	0,011783	0,011706
0,59	0,117884	0,011755	0,011785	0,011785	0,011708
0,6	0,117766	0,011755	0,011787	0,011787	0,01171
0,61	0,117648	0,011755	0,011788	0,011788	0,011712
0,62	0,117531	0,011755	0,01179	0,01179	0,011713
0,63	0,117413	0,011755	0,011792	0,011792	0,011715
0,64	0,117295	0,011755	0,011794	0,011794	0,011717
0,65	0,117177	0,011755	0,011796	0,011796	0,011719
0,66	0,11706	0,011755	0,011798	0,011798	0,01172
0,67	0,116942	0,011755	0,0118	0,0118	0,011722
0,68	0,116824	0,011755	0,011802	0,011802	0,011724
0,69	0,116706	0,011755	0,011804	0,011804	0,011726
0,7	0,116588	0,011755	0,011806	0,011806	0,011727
0,71	0,116471	0,011755	0,011808	0,011808	0,011729
0,72	0,116353	0,011755	0,01181	0,01181	0,011731
0,73	0,116235	0,011755	0,011812	0,011812	0,011733
0,74	0,116117	0,011755	0,011813	0,011813	0,011734
0,75	0,115999	0,011755	0,011815	0,011815	0,011736
0,76	0,115881	0,011755	0,011817	0,011817	0,011738
0,77	0,115763	0,011755	0,011819	0,011819	0,01174
0,78	0,115645	0,011755	0,011821	0,011821	0,011742
0,79	0,115527	0,011755	0,011823	0,011823	0,011743
0,8	0,115409	0,011755	0,011825	0,011825	0,011745
0,81	0,115291	0,011755	0,011827	0,011827	0,011747
0,82	0,115173	0,011755	0,011829	0,011829	0,011749
0,83	0,115055	0,011755	0,011831	0,011831	0,011751
0,84	0,114937	0,011755	0,011833	0,011833	0,011752
0,85	0,114819	0,011755	0,011835	0,011835	0,011754