



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ESTERIFIKASI ASAM OLEAT DENGAN OKTANOL UNTUK  
MEMPRODUKSI WAX ESTER MENGGUNAKAN  
*Candida rugosa* LIPASE**

**SKRIPSI**

**ANGGA DWI WIBOWO  
0606076116**

**FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA  
PROGRAM SARJANA  
DEPOK  
JULI 2010**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**HALAMAN JUDUL**

**ESTERIFIKASI ASAM OLEAT DENGAN OKTANOL UNTUK  
MEMPRODUKSI WAX ESTER MENGGUNAKAN  
*Candida rugosa* LIPASE**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh  
gelar Sarjana Teknik Kimia**

**Angga Dwi Wibowo  
0606076116**

**FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA  
PROGRAM SARJANA  
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 : Angga Dwi Wibowo**  
**NPM : 0606076116**  
**Tanda Tangan : **  
**Tanggal : 5 Juli 2010**

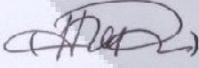
## HALAMAN PENGESAHAN

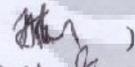
Skripsi ini diajukan oleh

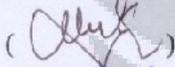
Nama : Angga Dwi Wibowo  
NPM : 0606076116  
Program Studi : Teknik Kimia  
Judul Skripsi : Esterifikasi Asam Oleat dengan Oktanol untuk  
Memproduksi Wax Ester Menggunakan *Candida rugosa*  
Lipase

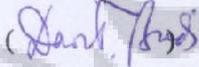
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik Kimia pada Program Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Ir. Bambang Heru Susanto, MT 

Pembimbing I : Dr. Heri Hermansyah, ST, M.Eng (  )

Penguji : Ir. Sukirno, M.Eng (  )

Penguji : Ir. Dewi Tristantini, MT, Ph.D (  )

Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : 5 Juli 2010

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kepada Allah SWT atas izin-Nya skripsi ini dapat diselesaikan tepat pada waktunya. Dalam penyusunan skripsi ini, penulis banyak mendapatkan bantuan, bimbingan, dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Widodo Wahyu Purwanto, DEA, selaku ketua Departemen Teknik Kimia FTUI.
2. Ir. Bambang Heru Susanto, MT, selaku pembimbing yang telah meluangkan banyak waktu untuk berdiskusi dan memberikan bimbingan.
3. Dr. Heri Hermansyah, ST., M. Eng, sebagai pembimbing kedua, yang telah memberi banyak ilmu dan inspirasi untuk menjadi ilmuwan muda.
4. Mama Papa, dan Mba Rini yang telah memberikan dukungan, doa, dan kepercayaan pada Angga.
5. Semua rekan bisnisku, Nuriz, Wahyudi, Julius, Irfan, Mita. Untuk kalian yang berjuang bersamaku, kuanggap kalian saudara. *Pursuit of Happiness!*
6. Untuk Mita, orang yang tak pernah lelah untuk menghapus lelahku. Orang paling sabar yang pernah kutemui. Terimakasih untuk seluruh waktumu bersamaku.
7. Semua dosen Departemen Teknik Kimia atas ilmu yang diberikan.
8. Semua teknisi, laboran, dan karyawan Departemen Teknik Kimia.
9. Teman-teman seangkatan 2006.
10. Pihak-pihak lain yang mendukung dan membantu yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari masih terdapat banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran dan kritik untuk memperbaiki penulisan di masa yang akan datang.

Depok, 5 Juli 2009

Angga Dwi Wibowo

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

---

---

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

Nama : Angga Dwi Wibowo  
NPM : 0606076116  
Program Studi : Teknik Kimia  
Departemen : Teknik Kimia  
Fakultas : Teknik  
Jenis Karya : Skripsi

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

**Esterifikasi Asam Oleat dengan Oktanol untuk Memproduksi Wax Ester  
Menggunakan *Candida rugosa* Lipase**

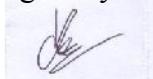
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan 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



(Angga Dwi Wibowo)

## ABSTRAK

Nama : Angga Dwi Wibowo  
Program Studi : Teknik Kimia  
Judul : Esterifikasi Asam Oleat dengan Oktanol untuk Memproduksi Wax Ester Menggunakan *Candida rugosa* Lipase

Penelitian ini telah memproduksi wax ester berbahan dasar asam oleat dan oktanol menggunakan biokatalis *Candida rugosa* lipase. Beberapa variasi dilakukan untuk mengetahui kondisi operasi optimum, seperti persentase enzim, rasio reaktan (asam oleat:oktanol), dan waktu reaksi. Dari variasi tersebut didapatkan konversi optimum 69,76 % untuk 4 % enzim dengan rasio reaktan 1:1 selama 6 jam reaksi. Konversi maksimum sebesar 87,5 % diperoleh untuk kondisi operasi yang sama dengan penambahan 8 % enzim. Kinetika reaksi juga dibuat berdasarkan persamaan *Michaelis-Menten*. Dengan persamaan ini, didapatkan parameter  $K_m$  dan  $v_{max}$  masing-masing sebesar 0,417 dan 2,435.

Kata kunci:

Wax ester, Asam oleat, Oktanol, *Candida rugosa* lipase, Kinetika *Michaelis Menten*

## ABSTRACT

Name : Angga Dwi Wibowo  
Study Program : Chemical Engineering  
Title : Esterification of Oleic Acid with Octanol to Produce Wax Ester  
Using *Candida rugosa* Lipase

The lipase catalyzed reaction of wax esters synthesis using oleic acid and long chain alcohol (octanol) as substrates and *Candida rugosa* lipase (CRL) as biocatalist was carried out. The effects of various reaction parameters such as molar ratio of substrates, amount of enzyme, and reaction time were investigated. The optimum reaction condition for wax ester synthesis is a mixture of oleic acid and octanol with molar ratio of 1:1, with 4% (w/w) CRL for 6 h. Percentage conversion of wax esters obtained at these optimum reaction conditions was 69,76 %. Maximum conversion (87,5 %) obtained by addition of 8 % CRL with the same reaction condition. Kinetic were also studied using *Michaelis-Menten* kinetic model. By using this equation, the  $K_m$  and  $v_{max}$  parameter can be solved with the value of 0,417 and 2,435 respectively.

Key words:

Wax ester, oleic acid, octanol, *Candida rugosa* lipase, Michaelis-Menten kinetic model

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....	v
ABSTRAK .....	vi
ABSTRACT .....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
BAB 1 PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan Penelitian .....	2
1.4 Batasan Masalah.....	2
1.5 Sistematika Penulisan .....	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	4
2.1 Oleokimia.....	4
2.2 Wax Ester .....	6
2.3 Sintesis Wax Ester.....	7
2.3.1 Esterifikasi.....	8
2.3.1 Transesterifikasi .....	8
2.3.3 Asam Oleat.....	9
2.4 Biokatalis untuk Sintesis Wax Ester .....	10
2.4.1 Biokatalis .....	10
2.4.2 Lipase .....	12
2.4.2.1 Klasifikasi Lipase.....	13
2.4.2.4 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Lipase .....	15

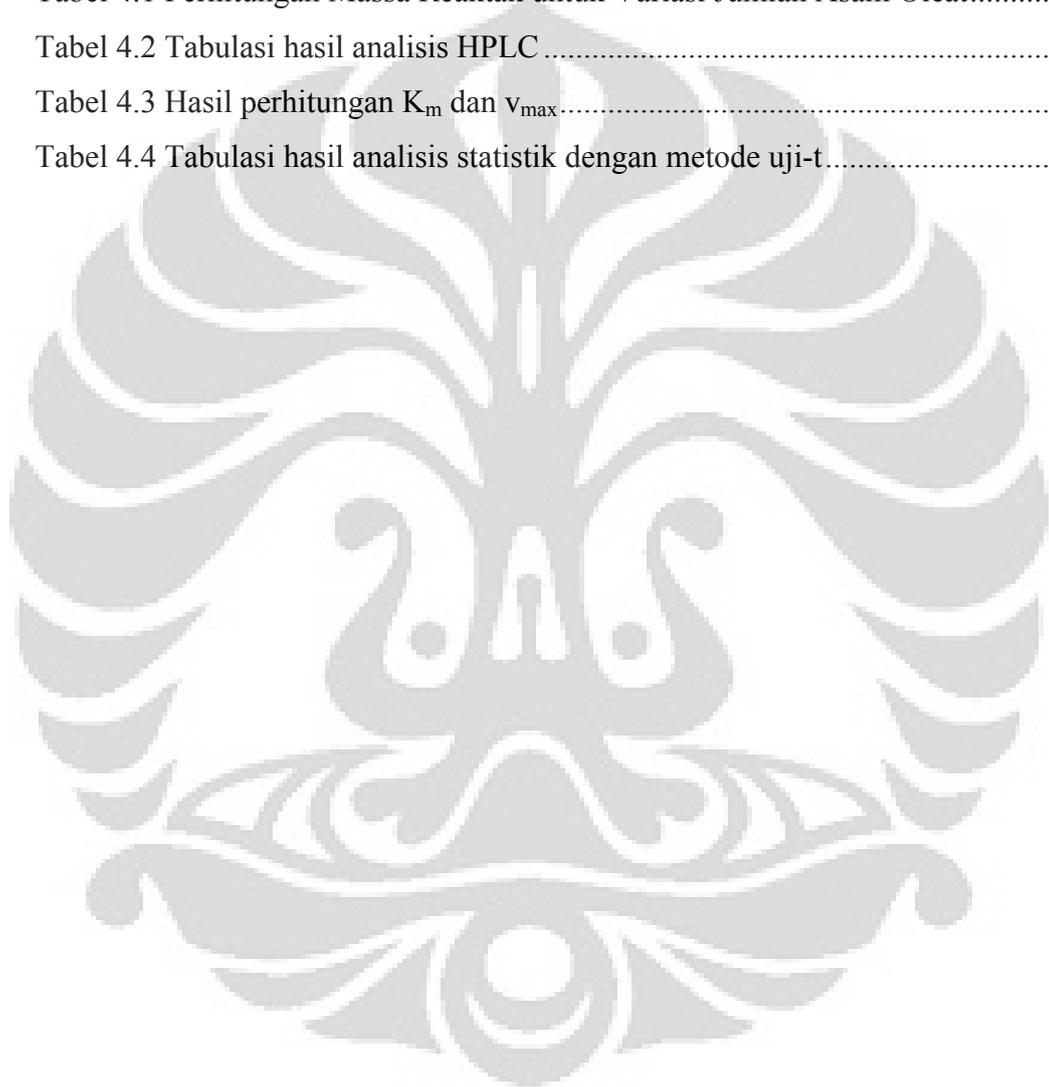
2.4.3 <i>Candida rugosa</i> Lipase (CRL).....	19
2.5 Mekanisme Reaksi Biokatalisis Wax Ester.....	21
2.5 <i>State of the Art</i> .....	22
BAB 3 METODE PENELITIAN.....	25
3.1 Diagram Alir Penelitian .....	25
3.2 Variabel Bebas dan Variabel Terikat .....	26
3.3 Alat dan Bahan.....	26
3.3.1 Alat Percobaan .....	26
3.3.2 Bahan Percobaan.....	27
3.4 Skema Reaktor .....	27
3.4 Prosedur Penelitian.....	28
3.4.1 Pra-Eksperimen .....	28
3.4.2 Eksperimen.....	29
3.4.3 Pasca Eksperimen (Titration Sampel) .....	30
3.5 Analisis Data Penelitian .....	30
3.5.1 Konversi Asam Oleat .....	30
3.5.2 Yield Wax Ester .....	31
3.6 Kinetika Reaksi .....	31
3.6.1 Persamaan Michaelis-Menten .....	31
3.6.2 Penentuan parameter $v_{max}$ dan $K_m$ .....	34
3.6.3 Pembuatan Grafik Konsentrasi Substrat dan Produk .....	35
3.7 Analisis Statistik .....	35
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	36
4.1 Reaksi Esterifikasi.....	36
4.1.1 Variasi Persentase Enzim.....	38
4.1.2 Variasi Rasio Reaktan.....	39
4.1.3 Variasi Jumlah Asam Oleat.....	40
4.1.4 Variasi Waktu.....	41
4.2 Hasil Analisis <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC) .....	42
4.3 Kinetika Reaksi Menggunakan Persamaan <i>Michaelis – Menten</i> .....	43
4.3.1 Penentuan parameter $v_{max}$ dan $K_m$ .....	43
4.3.2 Permodelan dan <i>Fitting</i> Kurva dengan Data Eksperimen.....	45

4.3.3 Variasi $K_m$ dan $v_{max}$ .....	47
4.4 Hasil Analisis Statistik .....	49
BAB 5 KESIMPULAN .....	51
DAFTAR REFERENSI .....	52
LAMPIRAN .....	55



## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Sumber Asam Oleat dan Komposisi Asam Lemak berbagai Minyak Nabati .....	10
Tabel 2.2 Perbandingan efek berbagai macam lipase dalam reaksi esterifikasi ...	11
Tabel 2.3 <i>State of the Art</i> .....	24
Tabel 4.1 Perhitungan Massa Reaktan untuk Variasi Jumlah Asam Oleat.....	40
Tabel 4.2 Tabulasi hasil analisis HPLC .....	43
Tabel 4.3 Hasil perhitungan $K_m$ dan $v_{max}$ .....	45
Tabel 4.4 Tabulasi hasil analisis statistik dengan metode uji-t.....	50



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Turunan Oleokimia .....	5
Gambar 2.2 Krim pelindung sinar UV yang mengandung wax ester berupa oktil oleat.....	6
Gambar 2.3 Produk Turunan dari Asam Oleat.....	9
Gambar 2.4 Struktur lipase .....	12
Gambar 2.5 <i>Pseudomonas sp</i> .....	14
Gambar 2.6 <i>Aspergillus niger</i> .....	14
Gambar 2.7 <i>G. Candidum</i> .....	14
Gambar 2.8 Suhu optimum biokatalis .....	15
Gambar 2.9 Denaturasi enzim.....	16
Gambar 2.10 pH optimum beberapa jenis enzim.....	16
Gambar 2.11 Pengaruh pH terhadap kerja enzim .....	16
Gambar 2.12 Inhibitor kompetitif.....	17
Gambar 2.13 Inhibitor non-kompetitif.....	18
Gambar 2.14 Inhibitor reversibel .....	18
Gambar 2.15 Pengaruh konsentrasi enzim terhadap kecepatan reaksi .....	19
Gambar 2.16 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi.....	19
Gambar 2. 1 <i>Candida sp</i> .....	19
Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian .....	25
Gambar 3.2 Skema Reaktor .....	28
Gambar 3.3 <i>Shaking Waterbath</i> .....	28
Gambar 3.4 Skema reaksi enzimatik dengan satu substrat .....	32
Gambar 3.5 Laju reaksi versus konsentrasi substrat untuk reaksi yang mengikuti kinetika Michaelis-Menten.....	33
Gambar 4.1 Penempatan tabung reaksi tertutup dalam <i>shaking waterbath</i> .....	36
Gambar 4.2 Pengaruh proses <i>sentrifuge</i> pada sample.....	37
Gambar 4.3 Produk wax ester berupa oktil oleat .....	37
Gambar 4.4 Grafik Pengaruh % Enzim terhadap Konversi Asam Oleat .....	38
Gambar 4.5 Grafik Pengaruh Rasio Reaktan terhadap Konversi.....	39
Gambar 4.6 Pengaruh Jumlah Asam Oleat terhadap Konversi.....	40

Gambar 4.7 Pengaruh waktu reaksi terhadap konversi yang dihasilkan.....	41
Gambar 4.8 Linearisasi data untuk mendapatkan nilai $v_{max}$ dan $K_m$ .....	45
Gambar 4.9 Profil konsentrasi substrat dan produk beserta permodelannya.....	46
Gambar 4.10 Hasil fitting data eksperimen dengan model kinetika untuk beberapa variasi $K_m$ .....	48
Gambar 4.11 Hasil <i>fitting</i> data eksperimen dengan model kinetika untuk beberapa variasi $v_{max}$ .....	49



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1: Hasil Analisis HPLC .....	55
Lampiran 2: Data Eksperimen .....	60
2.1 Eksperimen Variasi Waktu .....	60
2.2 Eksperimen Variasi Persentase Enzim.....	60
2.3 Eksperimen Variasi Rasio Reaktan.....	61
2.4 Eksperimen Variasi Mol Asam Oleat .....	61
2.4 Perhitungan Konsentrasi dari Hasil Analisis HPLC .....	62



# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Masalah

Wax ester merupakan komposisi penting dalam formula kosmetik seperti pembersih, kondisioner, pelembab, dan sebagai agen anti penyabunan dalam produksi penisilin, pelumas, pembuat plastic, dan pelitur (Gunawan dan Dedy, 2008). Wax ester terdapat di alam dalam bentuk minyak seperti minyak jobjoba maupun dalam bentuk lain seperti sperma ikan paus (Hadzir, 2000). Namun, karena kebutuhan yang besar akan ketersediaan wax ester dan terbatasnya sumber wax ester di alam, maka banyak peneliti yang melakukan eksperimen untuk memproduksi ester rantai panjang ini dari berbagai bahan baku.

Penelitian di Departemen Teknik Kimia UI sendiri sudah mensintesis wax ester berbahan baku asam oleat dan oktanol menggunakan katalis asam heteropoli yang disanggakan pada zeolit alam lampung (Susanto, 2008). Pemilihan jenis katalis ini didasarkan pada kemudahan pemisahan katalis dari produk dan luas permukaan kontak yang besar. Katalis HPW20/Z yang digunakan mampu menghasilkan konversi asam oleat maksimum sebesar 80,73%. Akan tetap, penggunaan katalis asam ini tidak ramah lingkungan dan menghasilkan reaksi samping yang tidak diharapkan.

Enzim merupakan biokatalis yang diharapkan dapat mengoptimasi kondisi operasi proses dengan mereduksi kebutuhan energi sehingga reaktan dan produk yang dihasilkan juga tidak mengalami kerusakan karena panas (Decagny *et al*, 1998). Enzim lipase merupakan enzim yang umum digunakan untuk katalisis reaksi hidrolisis, esterifikasi, asidolisis, aminolisis, maupun alkoholisis / transesterifikasi (Rajendran *et al*, 2008). Selektivitas enzim merupakan faktor yang penting untuk mengkatalisis suatu reaksi. Pada dasarnya, karena selektivitas lipase inilah yang memungkinkan untuk memperoleh produk yang sulit dihasilkan melalui reaksi kimia konvensional (Salis *et al*, 2003) sehingga diharapkan dengan digunakannya biokatalis ini dapat mengoptimasi produksi wax ester. Pada penelitian-penelitian sebelumnya, enzim digunakan dalam bentuk terimobilisasi dengan disanggakan kepada suatu padatan seperti busa alumina-silika yang

dilapisi karbon nanofiber (Kovalenko *et al*, 2009). Namun Liu *et al*. telah membandingkan aktifitas lipolitik antara lipase yang berasal dari *Burkholderia sp.* C20 terimobilisasi dan tersuspensi (Liu *et al*, 2007) dan hasilnya ternyata lipase tersuspensi memiliki karakteristik yang lebih baik dalam hal spesifitas.

Oleh karena hal-hal di atas, maka penelitian ini, yang akan mensintesis wax ester berbahan dasar asam oleat menggunakan biokatalis enzim lipase, menjadi sangat penting untuk dilakukan.

### 1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana mensintesis wax ester berbahan baku asam oleat dengan metode esterifikasi menggunakan biokatalis *Candida rugosa* lipase sebagai pengganti katalis asam maupun basa yang sebelumnya biasa digunakan.

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini antara lain:

1. Memperoleh produk wax ester berbahan baku asam oleat dalam skala laboratorium.
2. Mengetahui unjuk kerja biokatalis *Candida rugosa* lipase dalam mensintesis wax ester.

### 1.4 Batasan Masalah

Penelitian yang dilakukan ini memiliki batasan-batasan masalah sebagai berikut:

1. Sumber asam lemak bebas yang digunakan adalah asam oleat.
2. Biokatalis yang digunakan adalah *Candida rugosa* lipase tersuspensi.
3. Reaktor yang digunakan adalah reaktor *batch* berupa tabung reaksi berukuran 10 mL yang diletakkan dalam *shaking waterbath*.
4. Parameter yang ingin didapatkan dalam penelitian ini adalah konversi, yield dan kinetika berupa  $K_m$  dan  $v_{max}$ .

## 1.5 Sistematika Penulisan

Metode penulisan yang digunakan dalam studi ini adalah dengan sistematika penulisan sebagai berikut:

### BAB I : PENDAHULUAN

Bab ini terdiri dari latar belakang, rumusan permasalahan, tujuan, batasan masalah, dan sistematika penulisan.

### BAB II : TINJAUAN PUSTAKA

Bab ini berisi tinjauan pustaka dan teori-teori tentang oleokimia, wax ester, sintesis wax ester, biokatalis untuk sintesis wax ester, mekanisme reaksi biokatalisis wax ester, dan *state of the art*.

### BAB III : METODE PENELITIAN

Bab ini menampilkan gambaran umum mengenai diagram alir penelitian, alat dan bahan, skema reaktor, prosedur penelitian, metode analisis data, dan model kinetika reaksi.

### BAB IV : HASIL DAN PEMBAHASAN

Bab ini akan memaparkan hasil dan membahas mengenai pembuatan dan standarisasi larutan KOH, reaksi esterifikasi, hasil dan analisis HPLC, kinetika reaksi menggunakan persamaan *Michaelis-Menten*, serta analisis statistik.

### BAB V : KESIMPULAN

Pada bab inilah kesimpulan dari keseluruhan penelitian diambil dan dijadikan sebagai dasar untuk penelitian berikutnya.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Oleokimia

Oleokimia merupakan bahan kimia yang berasal dari minyak/lemak alami, baik tumbuhan maupun hewani. Contoh hasil olahan oleokimia ialah mentega, sabun, wax ester, dan minyak goreng. Bidang keahlian teknologi oleokimia merupakan salah satu bidang keahlian yang mempunyai prospek yang baik dan penting dalam teknik kimia. Pada waktu yang akan datang, produk oleokimia diperkirakan akan semakin banyak berperan menggantikan produk-produk turunan minyak bumi (petrokimia). Permintaan akan produk oleokimia semakin meningkat karena produk oleokimia mempunyai beberapa keunggulan dibandingkan produk petrokimia, seperti harga, sumber yang dapat diperbaharui dan produk yang ramah lingkungan.

Oleokimia merupakan salah satu alternatif sumber energi masa depan. Industri oleokimia berbasis kepada minyak/trigliserida sebagai bahan bakunya. Senyawa oleokimia dasar seperti asam lemak, *Fatty Acid Methyl Esters* (FAME), alkohol lemak, amina lemak dan gliserol dihasilkan dari berbagai reaksi kimia dan enzimatik. Produk antara yang dihasilkan dari senyawa oleokimia dasar ini antara lain alkohol ethoxylates, alkohol sulfates, alkohol eter sulfat, senyawa kuartener ammonium, monoacylglycerols (MAG), diacylglycerols (DAG), triacylglycerols (TAG), ester dan produk oleokimia lain.



## 2.2 Wax Ester

Wax ester merupakan ester rantai panjang ( $\geq 12$  atom karbon) yang merupakan penurunan dari asam lemak dengan alkohol. Wax biasanya mengacu pada senyawa yang berbentuk padat pada suhu ruang dan mencair pada temperature yang lebih tinggi. Wax ester dapat diklasifikasikan menjadi wax ester padat (berbentuk padat pada suhu ruang) dan cair (cair pada suhu ruang). Sifat ini bergantung pada rantai atom karbon dan jumlah ikatan rangkap. Meningkatnya jumlah atom karbon dan berkurangnya ikatan rangkap akan menaikkan titik leleh dari ester.

Wax ester merupakan komposisi penting dalam formula kosmetik seperti pembersih, kondisioner, pelembab, dan sebagai agen anti penyabunan dalam produksi penisilin, pelumas, pembuat plastic, dan pelitur. Hal ini disebabkan oleh sifat uniknya yang memiliki dapat membasahi tanpa terasa berminyak (Gunawan dan Dedy, 2008).



**Gambar 2.2 Krim pelindung sinar UV yang mengandung wax ester berupa oktil oleat (www.oorilewa.sg)**

Wax ester alami banyak terdapat pada organisme seperti kutikula daun, serangga, alga, dan beberapa jenis bakteri. Pada mamalia, wax ester disintesis di banyak jaringan seperti hati (Tsujita, Maho, and Hiromichi, 1999). Dalam perkembangannya, wax ester sintetis telah dihasilkan dengan berbagai macam metode.

**Universitas Indonesia**

### 2.3 Sintesis Wax Ester

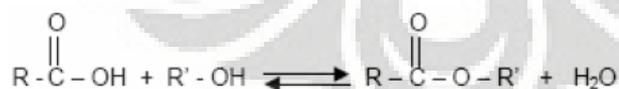
Untuk menghasilkan wax ester, ada beberapa modifikasi yang dapat dilakukan, yaitu (Susanto, 2008):

1. Modifikasi grup karboksil: Esterifikasi / transesterifikasi
2. Modifikasi rantai asam lemak:
  - a. Hidrogenasi selektif
  - b. Dimerisasi / Oligomerasi
  - c. Pembentukan ikatan C – C dan C – O melalui ko-oligomerasi, hidroformiliasi, alkilasi Friedel-Crafts, penambahan radikal, *ene-reaction*, akiloksilasi.
  - d. Metatesis
  - e. Oksidasi (epoksidasi, *oxidative cleavage*)
3. Modifikasi dalam teknik pembibitan dan penanaman.

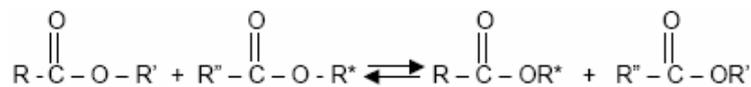
Di alam sendiri ester asam lemak terdapat dalam bentuk ester antara gliserol dengan asam lemak ataupun terkadang ada gugus hidroksilnya yang teresterkan tidak dengan asam lemak tetapi dengan fosfat seperti pada fosfolipid. Disamping itu ada juga ester antara asam lemak dengan alkoholnya yang membentuk monoester seperti terdapat pada minyak jojoba.

Ester asam lemak sering dimodifikasi baik untuk bahan makan maupun untuk bahan surfaktan, pelumas, aditif, detergen dan lain sebagainya. Modifikasi ester asam lemak dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu :

- a. Esterifikasi



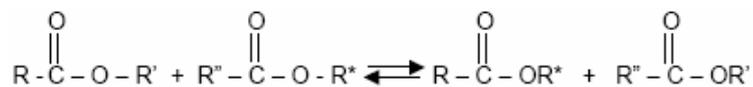
- b. Interesterifikasi



- c. Alkoholisis



## d. Asidolisis

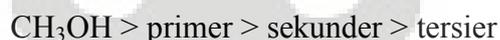


Dari berbagai metode di atas, metode yang paling sering digunakan untuk mensintesis wax ester adalah esterifikasi dan transesterifikasi (alkoholis).

### 2.3.1 Esterifikasi

Reaksi esterifikasi adalah suatu reaksi antara asam karboksilat dan alkohol untuk membentuk ester. Turunan asam karboksilat membentuk ester asam karboksilat. Ester asam karboksilat ialah suatu senyawa yang mengandung gugus -CO<sub>2</sub>R dengan R dapat berupa alkil maupun aril. Esterifikasi dikatalisis asam dan bersifat dapat balik (Fessenden, 1981).

Laju esterifikasi asam karboksilat tergantung pada halangan sterik dalam alkohol dan asam karboksilat. Kekuatan asam dari asam karboksilat hanya mempunyai pengaruh yang kecil dalam laju pembentukan ester. Dimana reaktifitas alkohol terhadap esterifikasi adalah menurut urutan sebagai berikut :

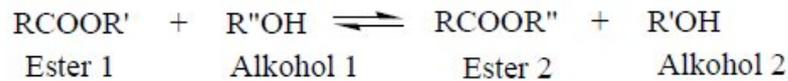


Sedangkan reaktifitas asam karboksilat terhadap esterifikasi adalah menurut urutan berikut :



### 2.3.2 Transesterifikasi

Secara kimia organik, transesterifikasi didefinisikan sebagai proses pertukaran gugus alkoksi dari suatu ester dengan alkohol yang berbeda. Pada transesterifikasi minyak nabati, transesterifikasi tersebut merupakan proses menggunakan alkohol (seperti metanol dan etanol) dengan keberadaan katalis, baik asam atau basa, untuk memutuskan secara kimiawi molekul minyak nabati menjadi metil atau etil ester dari minyak tersebut dengan gliserol sebagai produk sampingannya. Secara umum proses transesterifikasi dapat ditulis sebagai berikut:

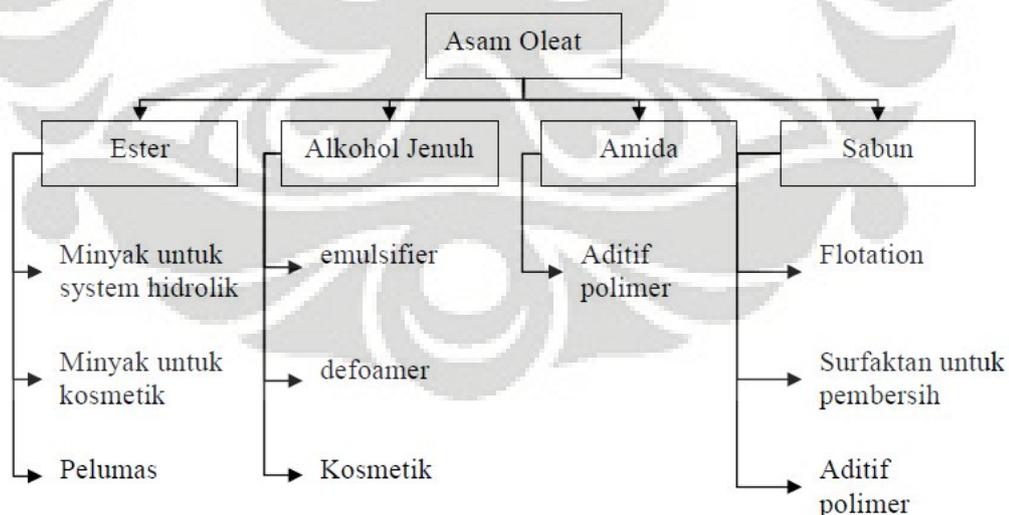


Reaksi transesterifikasi dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain: jenis katalis (asam, basa, atau lipase), jumlah katalis, temperatur, waktu transesterifikasi, dan rasio mol reaktan (Prameshwari, 2009).

Penelitian ini akan memfokuskan pada produksi wax ester dengan esterifikasi asam oleat.

### 2.3.3 Asam Oleat

Asam oleat atau asam 9-oktadekenoat merupakan asam lemak tak jenuh yang banyak terkandung dalam minyak nabati. Asam ini tersusun dari 18 atom C dengan satu ikatan rangkap di antara atom C ke-9 dan ke-10, dengan rumus kimia  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ . Asam lemak ini pada suhu ruang berupa cairan kental dengan warna kuning pucat atau kuning kecokelatan. Asam ini memiliki aroma yang khas. Ia tidak larut dalam air, titik leburnya  $15,3^\circ\text{C}$  dan titik didihnya  $360^\circ\text{C}$  (wikipedia.org). Produk turunan yang dapat dihasilkan dari asam oleat diperlihatkan pada Gambar 2.3, sedangkan sumber-sumber asam oleat dapat dilihat pada Tabel 2.1.



**Gambar 2.3** Produk Turunan dari Asam Oleat

Tabel 2.1 Sumber Asam Oleat dan Komposisi Asam Lemak berbagai Minyak Nabati

Oleic Acid Source	Oleic Acid	Linoleic Acid	Linolenic Acid	Stearic Acid	Palmitic Acid	Others
	C18:1	C18:2	C18:3	C18:0	C18:0	
HO-Sunflower Oil	80-92	3-10	0	2	4	1
HO-Rapeseed Oil	75-85	6-11	3	1-2	4	1,7
HO-Soybean Oil	75-85	2-5	2-5	3-5	6-10	0,7
HO-Safflower Oil	75-80	0,3	0,3	1	5	0,7
Olive Oil	73-78	0,5	0,5	3-5	10	0,7
Rapeseed Oil	57-60	10	10	1-2	4,5	2-3
Palm Oleine (Oil)	40-42	0,4	0,4	4,4	39,8	1-2
Tallow (Fat)	36-40	0,7	0,7	20	36	11
Tallow Oleine (FA)	60-72	1	1	1,5	3-5	13
Palm Oleine (Fa)	47-50	0,3	0,3	3,2	31,5	2,1

## 2.4 Biokatalis untuk Sintesis Wax Ester

### 2.4.1 Biokatalis

Suatu reaksi kimiawi yang menggunakan katalis biologis (biokatalis), merupakan metoda yang tidak asing dalam proses sintesis kimia organik di ranah akademis maupun dalam tataran industri. Sampai saat ini, metoda tersebut banyak berperan dalam industri kimia dan farmasi, industri pangan dan pakan, serta dalam pengelolaan limbah dan remediasi lingkungan. Sehingga, tidaklah mengherankan, bila biokatalis dianggap sebagai komponen penting dan bagian yang tak terpisahkan dari industri (Sukara, 2008).

Biokatalis, yang berupa enzim, sel mikroba (hidup atau mati), yang terikat dalam matriks atau bebas, secara tradisional telah digunakan untuk mengkonversi bahan baku yang berasal dari bahan organik atau bahan baku yang terbarukan. Namun, pemanfaatannya terus meluas, sehingga digunakan juga untuk mengolah material yang berasal dari bahan bakar fosil. Pemanfaatannya juga begitu

beragam, dari biotransformasi senyawa khiral secara enzimatis untuk produksi obat sampai sintesis wax ester. Secara umum, enzim digunakan sebagai biokatalis dalam beragam reaksi, seperti hidrolisis, transesterifikasi, dan lain-lain (Sukara, 2008).

**Tabel 2. 2** Perbandingan efek berbagai macam lipase dalam reaksi esterifikasi (Deng, 2003)

<b>Lipase</b>	<b>% Yield</b>
Porcine pancreas (non-immobilized)	22.45
Porcine pancreas (immobilized)	13.79
Lipolase 100T (immobilized)	42.17
<i>Rhizopus arrhizus</i> lipase (non-immobilized)	66.39
<i>Rhizopus arrhizus</i> lipase (immobilized)	26.31
<i>Rhizopus usarii</i> lipase (non-immobilized)	61.18
<i>Rhizopus usarii</i> lipase (immobilized)	20.60
<i>Candida cylindracea</i> (non-immobilized)	19.72
<i>Candida cylindracea</i> (immobilized)	17.20
<i>Candida</i> sp. 99-125 lipase (non-immobilized)	80.50
<i>Candida</i> sp. 99-125 lipase (immobilized)	81.51

Biokatalis yang akan digunakan dalam sintesis wax ester ini dilakukan pemilihan terlebih dahulu dan proses tersebut disebut *screening biokatalis*. Pada tahap *screening biokatalis* akan dikumpulkan literatur mengenai jenis-jenis lipase terbaik yang digunakan untuk sintesis wax ester dengan menggunakan rute non-alkohol serta referensi mengenai kondisi operasi optimal untuk reaksi sintesis wax ester dengan menggunakan rute *non-alkohol* baik dari buku, jurnal, maupun artikel. Dari hasil studi literatur ini diharapkan diperoleh tinjauan pustaka yang dapat digunakan sebagai dasar dari reaksi sintesis wax ester rute *non-alkohol*. Setelah dilakukan pemilihan terhadap berbagai macam biokatalis yang akan digunakan dalam sintesis wax ester ini maka *Candida rugosa* lipase dipilih sebagai biokatalis untuk proses sintesis wax ester ini karena *Candida rugosa* lipase mempunyai sifat-sifat khusus yang sangat baik untuk sintesis wax ester antara lain *Candida rugosa* lipase bersifat *non-patogenik* (tidak menimbulkan

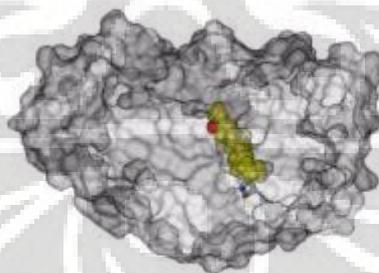
**Universitas Indonesia**

penyakit) dan sangat aktif terhadap rantai panjang trigliserida pada kondisi optimumnya yaitu pada temperatur 30-40 °C dan pH 8 (Benjamin, 1998).

### 2.4.2 Lipase

Lipase (*Triasil gliserol hidrolase*) merupakan enzim yang tersebar yang mengkatalisis hidrolisis lemak dan minyak. Aktivasi lipase terjadi dipermukaan air-lemak, yang merupakan karakteristik struktural yang unik dari kelas enzim ini. Lipase menjadi unit oligopeptida heliks yang melindungi *active site* sehingga disebut pada interaksi dengan permukaan *hidrofobik* seperti droplet lemak, memungkinkan pergerakan seperti dalam jalan untuk membuka *active site* untuk substrat.

*Active site* biasanya dikarakterkan dengan senyawa triad serin, histidin, dan aspartat, kompleks enzim asli menjadi perantara penting dalam mengkatalisis reaksi lipase. Sebagai tambahan dalam fungsi biologisnya pada bakteri, jamur, tumbuhan dan hewan tingkat tinggi, lipase digunakan dalam sejumlah proses industri seperti minyak dan lemak, detergen, roti, pembuatan keju, pembersih permukaan kulit dan proses pembuatan kertas. Selain itu, lipase merupakan enzim yang paling sering digunakan dalam sintesis organik, mengkatalis kemo-, regio- dan atau hidrolisis stereoselektif ester asama karboksilat atau reaksi balik pelarut organik.



Gambar 2.4 Struktur lipase (Ward, 1985)

Enzim mikroorganisme yang banyak digunakan dalam industri umumnya adalah enzim ekstraselular, karena lebih mudah diisolasi dibandingkan enzim intraselular. Metode untuk mengisolasi enzim intraselular lebih rumit karena harus dilisiskan terlebih dahulu.

Lipase mempunyai beberapa kelebihan bila dibandingkan dengan katalis lain. Lipase mempunyai spesififikasi dan stereoselektivitas reaksi relatif tinggi, sangat stabil pada pelarut organik dan menunjukkan substrat ketegasan yang luas. Bull *et al.* (1999) menambahkan bahwa lipase mempunyai sifat lebih ramah lingkungan bila dibandingkan dengan katalis lainnya, terutama katalis logam toksik. Lipase mempunyai peranan penting dalam mewujudkan proses dan produk industri yang ramah lingkungan.

Lipase yang dimanfaatkan dalam bioteknologi industri banyak diproduksi dari bakteri termofilik. Hal ini karena enzim yang dihasilkan oleh bakteri termofilik bersifat tahan panas (termostabil). Enzim tersebut sering disebut termozim (Vielle dan Zeikus, 2001). Termozim selain mempunyai termostabilitas tinggi juga mampu mempertahankan stabilitas serta aktivitasnya, baik pada pH ekstrim maupun pada agen denaturan lain, sehingga dapat digunakan untuk menggantikan enzim mesofilik dan katalis lain dalam beberapa proses industri.

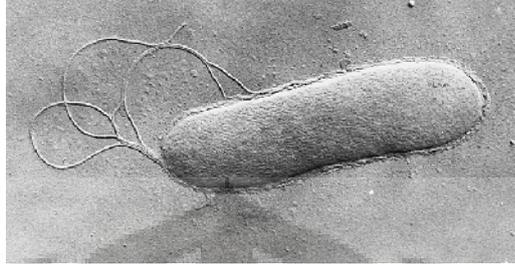
Aplikasi termozim dalam proses industri pada suhu tinggi (lebih dari 50°C) lebih menguntungkan karena laju reaksi berjalan lebih cepat sehingga produk yang dihasilkan lebih tinggi. Laju reaksi yang lebih cepat pada suhu tinggi disebabkan oleh penurunan viskositas dan peningkatan kelarutan substrat. Proses industri pada suhu tinggi juga menurunkan risiko kontaminasi oleh mikroba (Bruins *et al.*, 2001). Selain itu, penggunaan enzim yang berasal dari mikroorganisme mesofilik memerlukan pendinginan bioreaktor untuk mencapai kondisi reaksi optimal sehingga diperlukan biaya lebih besar bila dibandingkan dengan penggunaan termozim.

#### **2.4.2.1 Klasifikasi Lipase**

Lipase yang diisolasi dari mikroba dapat digolongkan menjadi tiga kelompok. Kelompok tersebut antara lain (Mac Rae, 1983) :

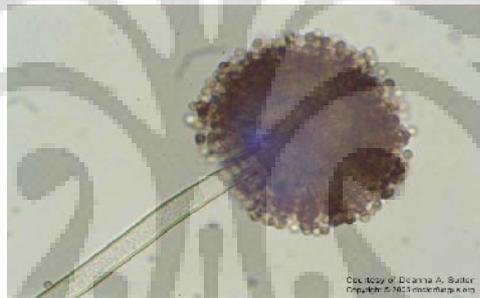
1. Lipase yang menghidrolisis trasilgliserol (TAG) secara acak terhadap posisi asam lemak pada triasilgliserol menjadi asam lemak. Kelompok mikroba

tersebut antara lain *Candida sp.* Dan *Pseudomonas sp.* Enzim dapat menghidrolisis ikatan ester secara sempurna, menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol.



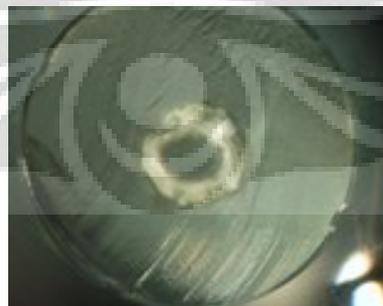
**Gambar 2.5 *Pseudomonas sp***

2. Lipase yang menghidrolisis spesifik pada posisi 1 dan 3 dari triasilgliserol. Contoh mikroba penghasil tersebut adalah *A. niger* dan *M. miehei* produk yang dihasilkan berupa asam lemak bebas, 1,2-diasilgliserol, dan 2 monoasilgliserol.



**Gambar 2.6 *Aspergillus Niger***

3. Lipase yang menghidrolisis secara spesifik asam lemak tertentu dari trasilgliserol. Contoh mikroba penghasil lipase tersebut adalah *G.candidum* yang mempunyai spesifitas terhadap asam lemak rantai panjang.



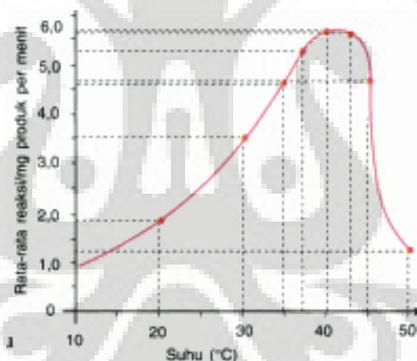
**Gambar 2.7 *G. Candidum***

### 2.4.2.2 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Lipase

Aktivitas enzim adalah besarnya kemampuan enzim dalam mempercepat reaksi penguraian sumber karbon (Pandey, 1999). Aktivitas enzim dinyatakan dalam unit per mL menit di mana 1 unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah yang menyebabkan perubahan 1  $\mu\text{mol}$  sumber karbon atau 1  $\mu\text{mol}$  produk yang dihasilkan per menit pada kondisi tertentu. Jadi, satu unit aktivitas enzim lipase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghidrolisis 1  $\mu\text{mol}$  ikatan per menit pada kondisi pengujian tertentu (Pandey, 1999). Aktivitas biokatalis dipengaruhi oleh faktor-faktor sebagai berikut :

#### 1. Suhu

Pada suhu yang lebih tinggi kecepatan molekul substrat meningkat, sehingga pada saat bertumbukkan dengan enzim, energi molekul substrat berkurang. Hal ini memudahkan terikatnya molekul substrat pada sisi aktif enzim (biokatalis). Aktivitas enzim meningkat dengan meningkatnya suhu sampai pada titik tertentu.

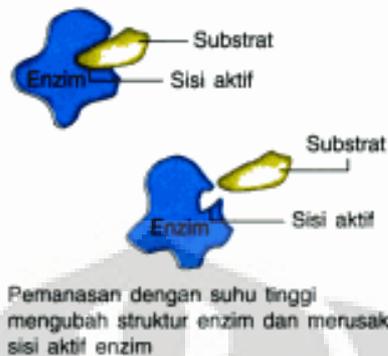


Gambar 2.8 Suhu optimum biokatalis

Pada kurva di atas dapat dilihat bahwa suhu optimum reaksi yang dikatalisis enzim adalah 40 °C. Di atas suhu tersebut, produk yang dihasilkan menurun. Peningkatan suhu di atas suhu optimum menyebabkan putusya ikatan hidrogen dan ikatan lain yang merangkai molekul enzim, sehingga enzim mengalami denaturasi.

Denaturasi adalah rusaknya bentuk tiga dimensi enzim yang menyebabkan enzim tidak dapat lagi berikatan dengan substratnya (Gambar 2.9). Denaturasi menyebabkan aktivitas enzim menurun atau hilang. Denaturasi umumnya bersifat *irreversible* (tidak dapat kembali). Namun, enzim-enzim yang langka seperti

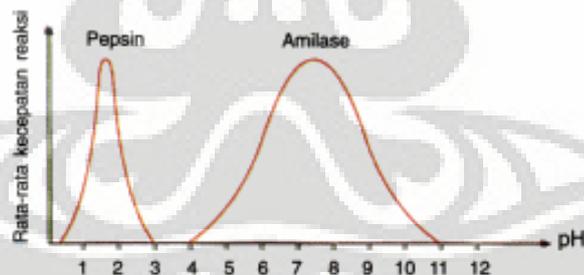
RNAase dapat mengalami denaturasi setelah mengalami denaturasi. Renaturasi adalah kembalinya bentuk enzim yang rusak ke bentuk sebelum rusak.



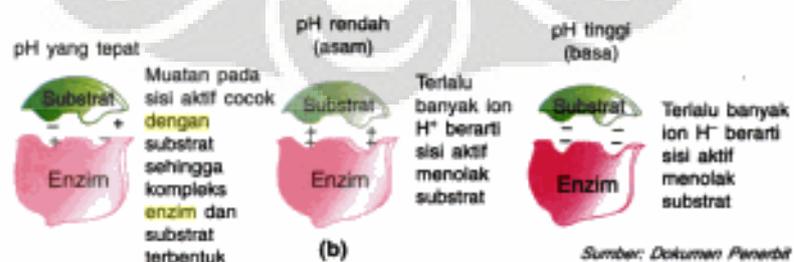
Gambar 2.9 Denaturasi enzim

## 2. pH (Derajat Keasaman)

Derajat keasaman (pH) juga mempengaruhi aktivitas enzim. Perubahan kondisi asam dan basa di sekitar molekul enzim mempengaruhi bentuk tiga dimensi enzim dan dapat menyebabkan denaturasi enzim. Setiap enzim memiliki pH optimum. Sebagai contoh, pepsin (enzim yang bekerja di dalam lambung) memiliki pH optimum sekitar 2 (sangat asam), sedangkan amilase (enzim yang bekerja di mulut dan usus halus) memiliki pH optimum sekitar 7,5 (agak basa). Gambar dibawah ini menunjukkan pH optimum dari biokatalis.



Gambar 2.10 pH optimum beberapa jenis enzim



Gambar 2.11 Pengaruh pH terhadap kerja enzim

### 3. Aktivator

Aktivator merupakan molekul yang mempermudah ikatan antara enzim dengan substratnya. Contoh aktivator adalah ion klorida yang berperan dalam aktivitas amilase dalam saliva.

### 4. Inhibitor

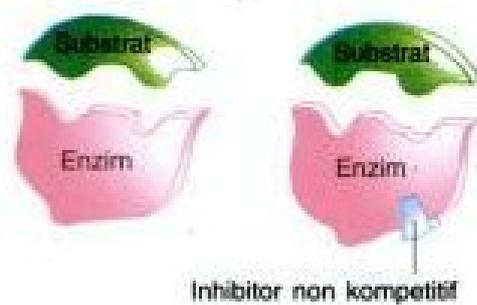
Inhibitor merupakan suatu molekul yang menghambat ikatan enzim dengan substratnya. Contoh inhibitor adalah ion sianida. Ion sianida menutupi sisi aktif enzim yang terlibat dalam respirasi. Inhibitor terhadap reaksi enzimatik dapat diklasifikasikan menjadi dua jenis. Berdasarkan sifat kinetiknya inhibitor dibagi menjadi dua jenis yaitu inhibitor kompetitif dan inhibitor non-kompetitif.

Inhibitor kompetitif adalah molekul penghambat yang cara kerjanya bersaing dengan substrat untuk mendapatkan sisi aktif enzim. Contohnya sianida bersaing dengan oksigen untuk mendapatkan hemoglobin dalam rantai respirasi terakhir. Inhibitor kompetitif dapat diatasi dengan cara penambahan konsentrasi substrat.



**Gambar 2.12 Inhibitor kompetitif**

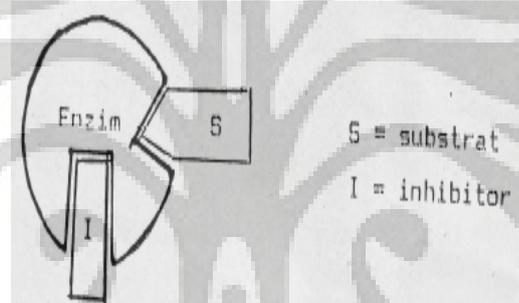
**Inhibitor non-kompetitif** adalah molekul penghambat enzim yang bekerja dengan cara melekatkan diri pada luar sisi aktif, sehingga bentuk enzim berubah dan sisi aktif tidak dapat berfungsi. Inhibitor ini tidak dapat dipengaruhi oleh konsentrasi substrat.



Gambar 2.13 Inhibitor non-kompetitif

Kemudian berdasarkan sifat ikatan enzim-inhibitor dibagi menjadi dua jenis yaitu inhibitor reversibel dan inhibitor irreversibel.

Inhibitor reversibel dapat berikatan dengan enzim bebas maupun kompleks enzim substrat, terikat pada tempat yang berbeda dengan pengikatan substrat dan dapat menurunkan kadar enzim yang aktif.



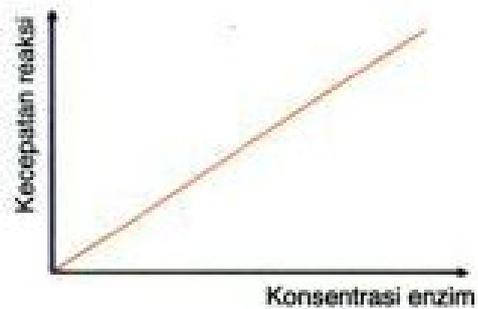
Gambar 2.14 Inhibitor reversibel

**Inhibitor irreversibel** dapat berikatan dengan enzim secara irreversibel dan dapat merubah konformasi enzim atau *active site*, sehingga enzim menjadi inaktif.

#### 5. Konsentrasi Enzim

Konsentrasi enzim juga mempengaruhi kecepatan reaksi. Semakin besar konsentrasi enzim semakin cepat pula reaksi yang berlangsung. Dengan kata lain, konsentrasi enzim berbanding lurus dengan kecepatan reaksi.

Sisi aktif suatu enzim dapat digunakan berulang kali oleh banyak substrat. Substrat yang berikatan dengan sisi aktif enzim akan membentuk produk. Pelepasan produk menyebabkan sisi aktif enzim bebas untuk berikatan dengan substrat yang lainnya. Oleh karenanya hanya dibutuhkan sejumlah kecil enzim untuk mengkatalis sejumlah besar substrat.



Gambar 2.15 Pengaruh konsentrasi enzim terhadap kecepatan reaksi

#### 6. Konsentrasi Substrat

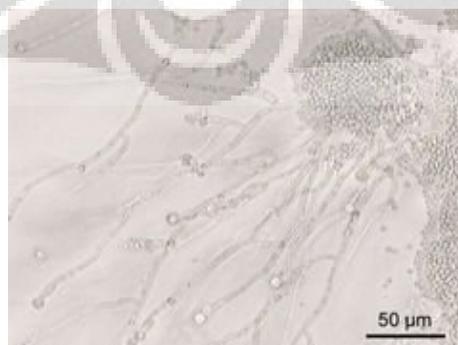
Bila jumlah enzim dalam keadaan tetap, kecepatan reaksi akan meningkat dengan adanya peningkatan konsentrasi substrat. Namun, pada saat sisi aktif semua enzim bekerja, penambahan substrat tidak dapat meningkatkan kecepatan reaksi enzim lebih lanjut. Kondisi ini disebut konsentrasi substrat pada titik jenuh atau disebut dengan kecepatan reaksi telah mencapai maksimum ( $V_{Max}$ ).



Gambar 2.16 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi

#### 2.4.3 *Candida rugosa* Lipase (CRL)

*Candida* sp. merupakan organisme yang tergabung di dalam kingdom fungi. Kelas taksonomi lengkapnya sebagai berikut (Jarvis and Thiele, 1997).



Gambar 2. 17 *Candida* sp (Jarvis and Thiele, 1997)

*Kingdom* : Fungi  
*Phylum* : Ascomycota  
*Subphylum* : Ascomycotina  
*Class* : Ascomycetes  
*Order* : Saccharomycetales  
*Family* : Saccharomycetaceae  
*Genus* : Candida  
*Species* : Candida rugosa

*Candida* sp. merupakan fungi yang hampir tersebar di seluruh dunia. Biasanya hidup berkoloni pada kulit manusia, pada daun, bunga, air, tanah, dan membran mukosa. Genus *Candida* terdiri dari 154 spesies yang sudah diketahui. Sebagian besar dari mereka umumnya bersifat patogen dan dapat menginfeksi manusia. Beberapa yang paling berbahaya adalah *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, dan *Candida lusitaniae*. Infeksi yang disebabkan *Candida* adalah *Candidiasis*.

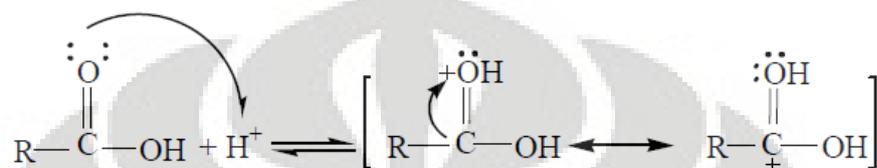
Namun ada juga beberapa spesies yang tidak patogen. Salah satunya adalah *Candida rugosa*. Telah dilaporkan oleh *Food Standards Australia New Zealand* (FSANZ) pada 5 Oktober 2005 bahwa *Candida rugosa* adalah organisme non-patogen. Lipase yang dihasilkan dari organisme ini merupakan lipase yang dapat menyerang ketiga gugus lemak pada rantai trigliserida.

Koloni *Candida* sp. berupa krim yang berwarna kekuningan, tumbuh dengan cepat dan matang dalam tiga hari. *Candida* sp. termasuk dalam golongan *yeast* atau ragi. Ragi merupakan kelompok fungi yang penting. Fungi, sama seperti bakteri, tersebar banyak di alam, meskipun mereka biasanya hidup di tanah dan pada daerah yang relatif lembab dibanding tempat hidup bakteri. Fungi tidak dapat mengambil energi dari sinar matahari. Walaupun kebanyakan fungi memiliki morfologi yang relatif kompleks, ragi dapat dibedakan karena merupakan mikroorganisme bersel satu, dan berukuran panjang dari 5 sampai 30  $\mu\text{m}$  dengan lebar 1 hingga 5  $\mu\text{m}$ .

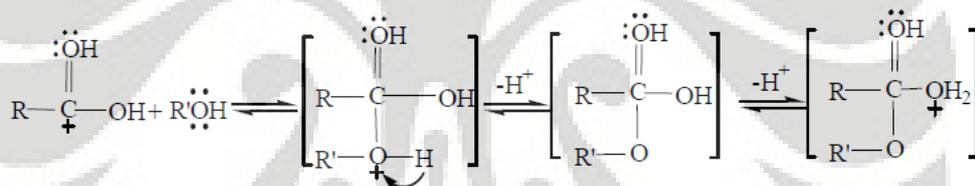
## 2.5 Mekanisme Reaksi Biokatalisis Wax Ester

Secara umum, reaksi esterifikasi untuk menghasilkan wax ester berlangsung melalui beberapa tahap reaksi, yang dapat diterangkan sebagai berikut (Fessenden, 1990):

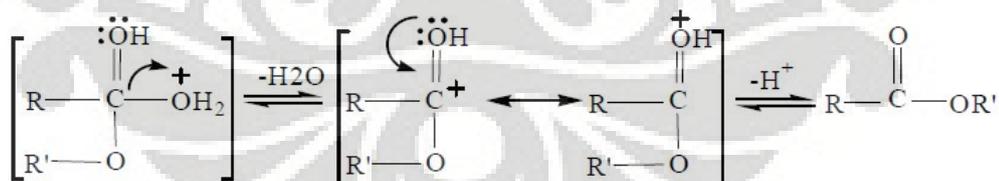
1. Oksigen karbonil diprotonisasi oleh asam. Disini terjadi Transfer proton dari katalis asam ke atom oksigen karbonil, sehingga meningkatkan elektrofilitas dari atom karbon karbonil



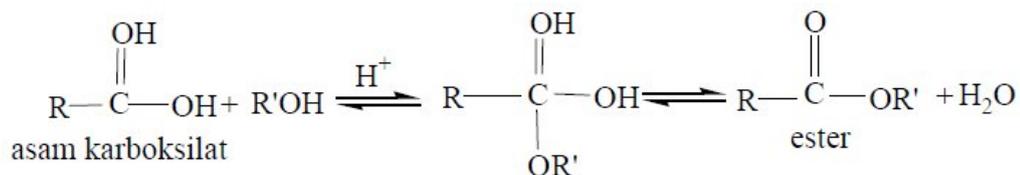
2. Alkohol nukleofilik menyerang karbon positif, di mana atom karbon karbonil kemudian diserang oleh atom oksigen dari alkohol, yang bersifat nukleofilik sehingga terbentuk ion oksonium. Terjadi pelepasan proton dari gugus hidroksil milik alkohol, menghasilkan kompleks teraktivasi.



3. Protonasi terhadap salah satu gugus hidroksil, yang diikuti oleh pelepasan molekul air menghasilkan ester (eliminasi molekul air diikuti penarikan H<sup>+</sup> oleh H<sub>2</sub>O)

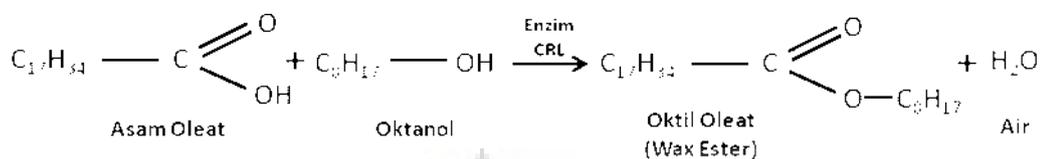


Tahapan reaksi diatas dapat dirangkum menjadi sebagai berikut :



Gambar 2.14 Mekanisme reaksi esterifikasi

Oleh karena penelitian kali ini akan mensintesis ester rantai panjang berupa oktil oleat, maka persamaan reaksinya adalah sebagai berikut:



Gambar 2.15 Mekanisme reaksi esterifikasi untuk menghasilkan wax ester berupa oktil oleat

## 2.6 State of the Art

Penelitian di dunia mengenai sintesis wax ester telah dilakukan menggunakan berbagai jenis katalis. Secara garis besar, katalis tersebut dibagi menjadi dua, yaitu katalis asam dan biokatalis enzim lipase.

Pada proses esterifikasi untuk sintesis solar bio (wax ester) maupun wax ester awalnya dilakukan dengan menggunakan katalis asam, penggunaan katalis homogen yang konvensional pada reaksi-reaksi senyawa organik seperti  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{BF}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HF}$  dan lain-lain kurang menguntungkan, karena dapat menimbulkan dampak yang serius bagi lingkungan reaksi baik toksisitas yang tinggi, korosi akibat pengeluaran asam buangan, juga biasanya diakibatkan adanya kesulitan-kesulitan untuk memisahkan katalis dari produk dan penanggulangannya. Sedangkan katalis konvensional lain seperti resin penukar ion (Amberlyst-15) hanya dapat digunakan pada suhu di bawah  $100^\circ\text{C}$  karena memiliki stabilitas termal yang rendah. Oleh karena itu adanya suatu permintaan yang tinggi terhadap katalis padatan yang tidak larut dalam media reaksi yang dikenal sebagai sistem reaksi heterogen. Hal ini dapat terlihat dari kecenderungan akhir-akhir ini penelitian yang intensif dalam penggunaan katalis heterogen untuk sintesis wax ester, seperti menggunakan Sn-oxalate, resin penukar ion, Fe-Zn, *Double Metal Cyanide* (DMC),  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{Al}_2\text{O}_3$ , dan asam heteropoli (HPA). Selain daripada itu, saat ini telah banyak dikembangkan juga penelitian sintesis ester melalui esterifikasi asam karboksilat dengan alkohol menggunakan enzim lipase.

Enzim lipase belakangan ini cenderung lebih sering digunakan untuk sintesis wax ester karena keunggulannya dalam selektivitas sehingga reaksi

samping dapat dihindari. Lipase dari *Candida antarctica* (Novozym 435) telah digunakan oleh beberapa peneliti untuk mensintesis ester rantai panjang dari berbagai bahan dasar, seperti cetyl palmitate (Wehtje, 1999), triolein (Hadzir, 2000), asam oleat (Mat Radzi, 2005), serta asam lemak dari tanaman crambe dan camelina (Steinke, 2001). Enzim ini berhasil menghasilkan yield wax ester hingga >95% (Steinke, 2001; Mat Radzi, 2000). Bahkan yield >90% masih dapat dihasilkan untuk penggunaan Novozym sebanyak 9 kali (Mat Radzi, 2000). Beberapa peneliti lain telah mensintesis wax ester melalui transesterifikasi lemak maupun minyak nabati dari kelapa sawit (Gunawan, 2008), buah mangga, mowrah, dan sal (De, 1999) menggunakan lipozyme. Sedangkan Decagny telah membandingkan unjuk kerja beberapa jenis enzim lipase dalam sintesis ester rantai panjang berbahan dasar triolein. Lipase dari *Alcaligenes* sp. menunjukkan hasil paling baik dengan yield >50% selama 5 jam reaksi (Decagny, 1998).

Penelitian kali ini akan menggunakan *Candida rugosa* lipase sebagai biokatalis untuk menghasilkan wax ester dari asam oleat melalui rute esterifikasi. Untuk lebih memahami *state of the art* dan posisi penelitian ini, maka disajikan tabel 2.3 yang berisi penelitian yang telah berhasil mensintesis wax ester melalui rute esterifikasi dan transesterifikasi baik menggunakan katalis alkali maupun biokatalis dari berbagai bakteri.

Tabel 2.3 *State of the Art*

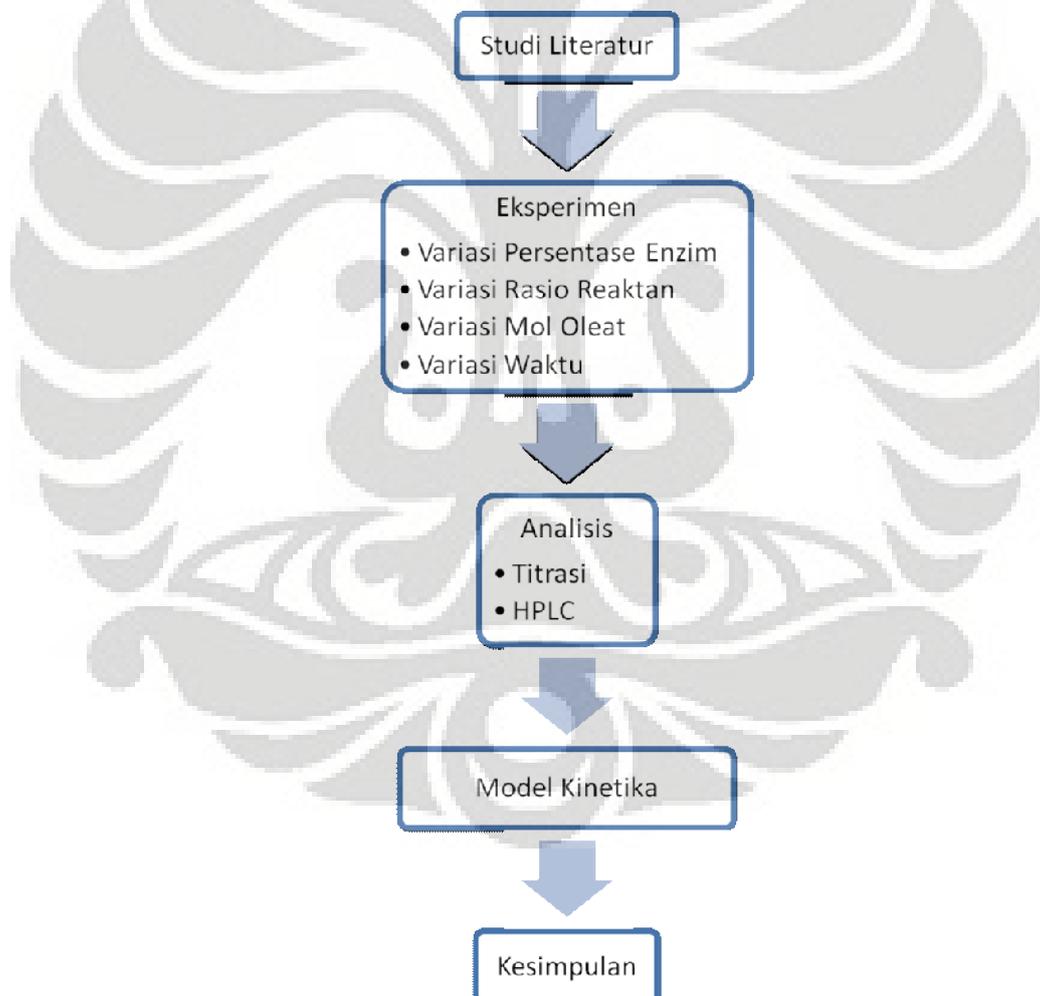
Katalis		Rute	
		Transesterifikasi	Esterifikasi
Asam	Amberlyst-15		Fumin, 2006
	Sn-Oxalate		Sreeparsanth, 2006
	Resin penukar ion		
	Fe-Zn		
	<i>Double Metal Cyanide</i> (DMC)		
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>		de Araujo, 2006
	HPW/Z		Susanto, 2008
Biokatalis Enzim Lipase	Novozym	Wehtje, 1999; Hadzir, 2000	Mat Radzi, 2005; Steinke, 2001
	Lipozyme	De, 1999; Gunawan, 2008	
	<i>Candida rugosa</i>		<b>Penelitian ini</b>
	Alcaligenes sp.		
	C. viscosum	Decagny, 2001	
	M. javanicus		
	P. fluorescense		
	Porcine pancreatic	Decagny, 2001; Tsujita, 1999	
	R. javanicus	Decagny, 2001	
	R. niveus		

## BAB 3 METODE PENELITIAN

### 3.1 Diagram Alir Penelitian

Penelitian akan dibagi dalam beberapa tahap, dimulai dengan tahap pra-penelitian yaitu melakukan studi literatur mengenai hal-hal yang berhubungan dengan wax ester dan enzim. Kemudian penelitian utama difokuskan untuk mencari kondisi operasi optimum untuk memproduksi wax ester dan pengujiannya. Adapun hal-hal yang diuji terbatas pada konversi dan yield saja.

Berikut diagram alir penelitian yang dilakukan:



**Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian**

### 3.2 Variabel Bebas dan Variabel Terikat

Variabel bebas dari kondisi operasi yang divariasikan pada penelitian ini adalah:

1. Rasio reaktan (Asam Oleat : Oktanol)  
Perbandingan reaktan antara asam oleat dengan oktanol dibuat bervariasi mulai dari 1:1 (stoikiometrik), 1:2, 1:3, 1:6, 1:12 dengan penambahan 4 % Enzim CRL untuk reaksi selama 6 jam.
2. Persentase Enzim terhadap Jumlah Asam Oleat Tetap  
Persentase enzim terhadap asam oleat bervariasi antara 0 – 8%. Perbandingan reaktan 1:1 dengan jumlah asam oleat dibuat tetap, yaitu 2 mmol. Reaksi berlangsung selama 6 jam.
3. Jumlah Enzim terhadap Jumlah Asam Oleat yang Bervariasi  
Jumlah enzim dan massa sampel total dibuat tetap sesuai dengan yang digunakan untuk perbandingan reaktan 1:1. Variasi dilakukan dengan mengurangi jumlah asam oleat menjadi 1; 0,5; dan 0,25 mmol. Dengan demikian massa oktanol akan bertambah seiring pengurangan asam oleat.
4. Variasi Waktu  
Pengambilan sampel dilakukan antara selang waktu 0 – 20 jam.

Sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini atau parameter yang akan diamati antara lain:

1. Konversi reaktan.
2. Yield produk.
3. Parameter kinetika, yaitu  $K_m$  dan  $V_{max}$ .

### 3.3 Alat dan Bahan

#### 3.3.1 Alat Percobaan

- |                     |                  |
|---------------------|------------------|
| - Botol kaca 250 mL | - Neraca digital |
| - Tabung reaksi     | - Spatula besi   |
| - Gelas beaker      | - Kaca arloji    |
| - Gelas ukur        | - Stopwatch      |
| - Pipet             | - Stereofom      |

Universitas Indonesia

- Labu Erlenmeyer
- Reaktor (Tabung reaksi dalam *shaking waterbath*)
- Labu ukur 250 mL
- HPLC
- Corong
- Termometer
- Buret
- Sentrifuge
- Botol sampel

### 3.3.2 Bahan Percobaan

Biokatalis: Enzim Lipase *Candida rugosa* berbentuk bubuk, dengan aktivitas hidrolitik 8000 U/g (Biocatalysts, Pontypridd, United Kingdom)

Reaktan :

- a. Asam oleat *technical grade*

BM = 282,4614 g/mol

Berat jenis = 0.895

Titik didih = 360 °C

- b. Oktanol *technical grade* dengan spesifikasi berikut:

BM = 130.23 g/mol

Berat jenis = 0.824 - 0.826

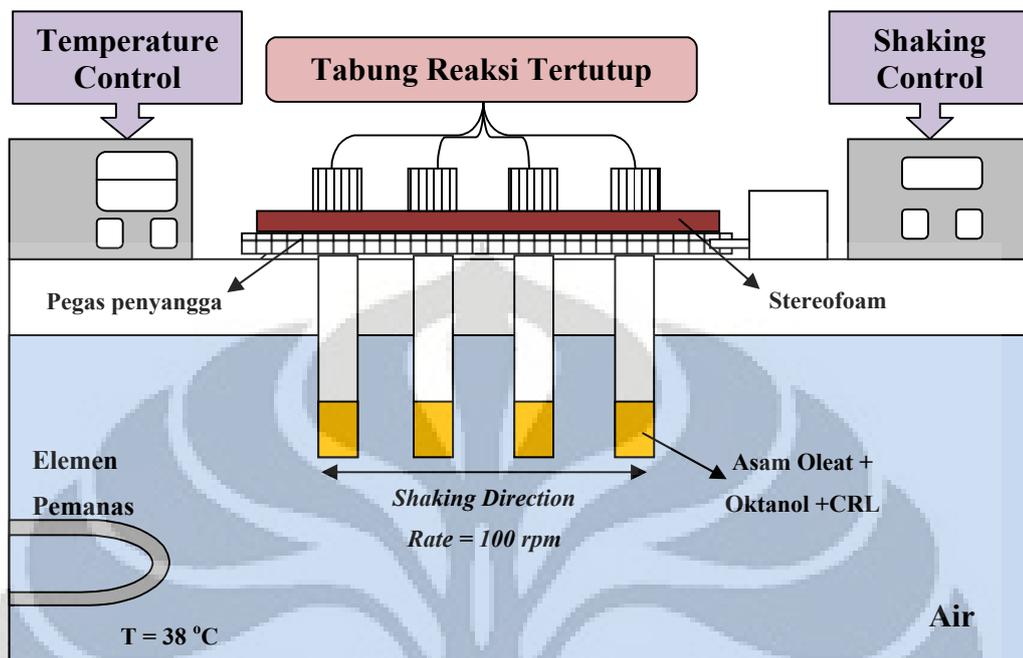
Titik didih = 194 – 195 °C

Bahan kimia lainnya:

- a. KOH
- b. Etanol 96 %
- c. Aquadest (H<sub>2</sub>O)
- d. Indikator PP

### 3.4 Skema Reaktor

Reaktor yang digunakan adalah tabung reaksi tertutup berukuran 10 mL yang dimasukkan dalam *shaking waterbath*. *Stereofoam* digunakan untuk menjaga posisi tabung reaksi selama proses *shaking* agar tidak terlepas. Gambar 3.2 memperlihatkan skema reaktor yang digunakan untuk reaksi esterifikasi asam oleat.



Gambar 3.2 Skema Reaktor



Gambar 3.3 Shaking Waterbath

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Pra-Eksperimen

1. Mempersiapkan alat dan bahan yang akan digunakan untuk eksperimen, termasuk mengeset kecepatan dan suhu *shaking waterbath* agar sesuai dengan kondisi operasi yang diinginkan.

Universitas Indonesia

2. Membuat larutan KOH 0,1 M, dengan cara sebagai berikut:
  - 1) Menimbang KOH seberat 1,4 gram.
  - 2) Melarutkannya dalam 250 mL etanol 96% dalam labu ukur (penambahan etanol dilakukan secara bertahap agar KOH dapat terlarut sempurna).
  - 3) Larutan KOH kemudian dimasukkan ke dalam buret sebagai titran.
3. Standarisasi larutan KOH, dengan cara sebagai berikut:
  - 1) Melarutkan 0,1 gram asam KHP dalam 10 mL aquades.
  - 2) Larutan asam KHP kemudian diberi 3 tetes indikator PP kemudian dititrasi menggunakan larutan KOH.
  - 3) Volume KOH untuk menitrasi asam KHP kemudian dicatat dan akan digunakan untuk menghitung konsentrasi aktual KOH.

#### 3.4.2 Eksperimen

1. Sampling awal (tanpa enzim).
  - 1) Sejumlah asam oleat dan oktanol dicampur, kemudian ditambahkan indikator PP ke dalamnya.
  - 2) Sampel kemudian dititrasi menggunakan larutan KOH yang telah distandarisasi.
  - 3) Volume KOH yang digunakan untuk menitrasi sampel dicatat untuk dimasukkan ke dalam perhitungan ( $V_0$ ).
2. Eksperimen menggunakan enzim, dengan cara sebagai berikut:
  - 1) Asam oleat dan oktanol (jumlah sesuai variabel) masing-masing dihangatkan terlebih dahulu dalam *shaking waterbath* agar suhunya sesuai kondisi operasi.
  - 2) Ukur suhunya dengan thermometer untuk memastikan suhu operasi telah tercapai.
  - 3) Kedua reaktan dicampurkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan enzim (jumlah sesuai variabel).
  - 4) Tabung reaksi dimasukkan ke dalam *shaking waterbath*.

### 3.4.3 Pasca Eksperimen (Titrasi Sampel)

1. Tabung reaksi dimasukkan ke dalam *sentrifuge* untuk mengendapkan enzim.
2. Produk kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dengan penyaringan menggunakan kertas saring terlebih dahulu.
3. Sampel kemudian ditimbang, diberi indikator PP, lalu dititrasi dengan larutan KOH yang telah distandarisasi sebelumnya.
4. Volume KOH yang digunakan untuk menitrasi sampel dicatat untuk dimasukkan ke dalam perhitungan ( $V_t$ ).

## 3.5 Analisis Data Penelitian

### 3.5.1 Konversi Asam Oleat

Perhitungan konversi didasarkan pada jumlah mol asam oleat yang tersisa dalam sampel. Konversi dinyatakan sebagai mol asam oleat yang bereaksi dibagi dengan mol asam oleat awal. Oleh karena mol asam oleat yang bereaksi merupakan selisih dari mol asam oleat awal dengan mol asam oleat sisa, maka dalam persamaan matematis, konversi dinyatakan sebagai berikut:

$$\text{Konversi} = \frac{\text{mol asam oleat awal} - \text{mol asam oleat sisa}}{\text{mol asam oleat awal}} \quad (3.1)$$

dengan mol asam oleat awal =  $V_0 \times M_{\text{KOH}}$

mol asam oleat sisa =  $V_t \times M_{\text{KOH}}$

keterangan:

$V_0$  = Volume KOH untuk menitrasi asam oleat awal (mL)

$V_t$  = Volume KOH untuk menitrasi asam oleat sisa (mL)

$M_{\text{KOH}}$  = Konsentrasi KOH setelah standarisasi (mmol/mL)

Oleh karena konsentrasi yang digunakan untuk menitrasi asam oleat awal (tanpa enzim) dan asam oleat sisa reaksi (dengan enzim) adalah sama, maka konversi dapat dinyatakan sebagai berikut:

$$\text{Konversi} = \frac{V_0 - V_t}{V_0} \times 100 \% \quad (3.2)$$

### 3.5.2 Yield Wax Ester

Untuk mengetahui % yield wax ester berupa oktil oleat, maka analisa dilakukan menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatograph*). Penggunaan HPLC didasari sifat fasa sampel yang berbentuk liquid. Banyaknya (%) yield wax ester yang terbentuk dilihat dari kandungan oktil-oleatnya. Namun, pada kenyataannya hasil dari reaksi tidak hanya menghasilkan oktil oleat melainkan juga metil oleat, triolein, diolein, dan monoolein.

$$\% \text{ yield wax ester} = \frac{C_{WE t=t}}{C_{AO t=0}} \quad (3.3)$$

Keterangan:

$C_{WE t=t}$  : Konsentrasi wax ester atau oktil oleat pada akhir reaksi (mmol/L)

$C_{AO t=0}$  : Konsentrasi asam oleat pada awal reaksi (mmol/L)

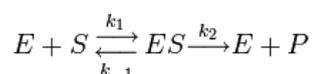
Tes analisa sampel menggunakan HPLC yang dilakukan di PUSPITEK (Pusat Penelitian dan Teknologi), Serpong, Tangerang.

## 3.6 Kinetika Reaksi

### 3.6.1 Persamaan Michaelis-Menten

Kasus paling sederhana dari sebuah reaksi yang berkatalis enzim adalah saat hanya terdapat satu substrat tunggal saja, contohnya pada proses hidrolisis ester. Kebergantungan terhadap konsentrasi substrat dalam banyak kasus ditunjukkan oleh gambar 2.5.

Laju reaksi bervariasi secara linear terhadap konsentrasi substrat pada saat konsentrasi rendah (kinetika orde satu), kemudian menjadi independen terhadap konsentrasi substrat (kinetika orde nol) saat konsentrasi tinggi. Perilaku semacam ini, yang mirip dengan perilaku reaksi permukaan unimolekuler, pertama kali dijelaskan oleh Michaelis & Menten dalam bentuk mekanisme sebagai berikut:



**Gambar 3.4 Skema reaksi enzimatik dengan satu substrat**

Biokatalis (E) bereaksi dengan substrat (S) asam oleat membentuk kompleks substrat-biokatalis (ES), selanjutnya dilepaskan produk oktil oleat (P).

Di mana:

$k_1$  : konstanta laju reaksi pembentukan enzim-substrat kompleks

$k_{-1}$ : konstanta laju reaksi penguraian substrat yang tak berubah dalam enzim, dan

$k_2$  : konstanta laju reaksi pembentukan produk yang terpisah dari enzim.

$C_S$  : Konsentrasi substrat

$C_P$  : Konsentrasi produk

$C_{ES}$  : Konsentrasi kompleks substrat-biokatalis

Laju reaksi  $k_2C_{ES}$  dan dekomposisi  $k_{-1}C_{ES}$  dari kompleks enzim-substrat akan setara dengan laju pembentukan  $k_1C_EC_S$  sehingga

$$k_1C_EC_S = k_{-1}C_{ES} + k_2C_{ES} \quad (3.4)$$

Konsentrasi enzim total,  $C_{E, total}$ , setara dengan jumlah konsentrasi dari enzim bebas,  $C_E$ , dan enzim yang terikat dengan substrat,  $C_{ES}$ .

$$C_{E, total} = C_E + C_{ES} \quad (3.5)$$

$$C_E = C_{E, total} - C_{ES} \quad (3.6)$$

Substitusi persamaan (3.6) ke dalam persamaan (3.4) akan menghasilkan

$$k_1(C_{E, total} - C_{ES})C_S = k_{-1}C_{ES} + k_2C_{ES} \quad (3.7)$$

Dengan pengaturan ulang, didapatkan

$$C_{ES} = \frac{k_1C_S C_{E, total}}{k_{-1} + k_2 + k_1C_S} \quad (3.8)$$

Laju pembentukan produk,  $dC_P/dt$  atau  $v$  dinyatakan sebagai  $k_2C_{ES}$ ,

$$\text{sehingga } v = k_2C_{ES} = \frac{k_1k_2C_S C_{E, total}}{k_{-1} + k_2 + k_1C_S} \quad (3.9)$$

$$v = \frac{k_2C_S C_{E, total}}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + C_S} \quad (3.10)$$

$$\text{atau } v = \frac{k_2C_S C_{E, total}}{K_m + C_S} \quad (3.10)$$

Persamaan 3.10 dikenal sebagai persamaan Michaelis-Menten dan konstanta  $K_m$ , setara dengan  $(k_{-1}+k_2)/k_1$ , disebut konstanta Michaelis.

Saat  $C_S$  jauh sangat kecil, nialinya dapat diabaikan sebagai penyebut dalam perbandingan dengan  $K_m$ , sehingga persamaan 3.10 menjadi

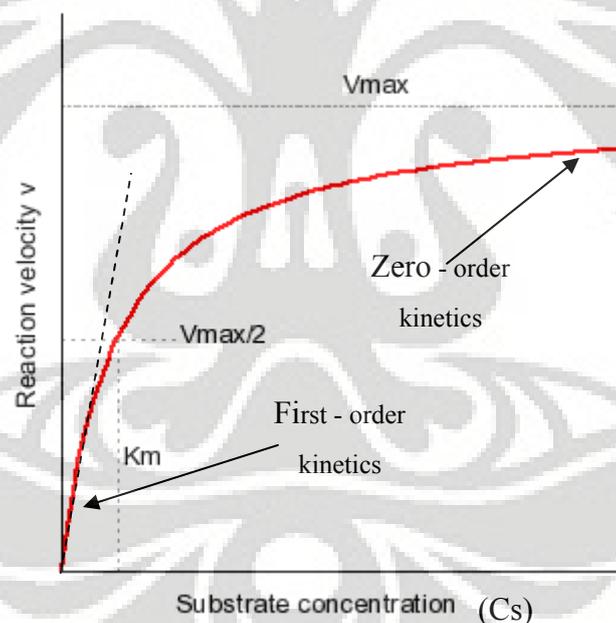
$$v = \frac{k_2 C_S C_{E,total}}{K_m} \quad (3.11)$$

sehingga reaksi akan mengikuti kinetika orde pertama terhadap konsentrasi substrat.

Sebaliknya saat konsentrasi substrat jauh lebih besar dibandingkan  $K_m$ ,  $C_S \gg K_m$ , maka

$$v = k_2 C_{E,total} \quad (3.12)$$

sehingga reaksi akan berjalan dengan kinetika reaksi orde nol. Enzim kemudian akan jenuh terhadap substrat, dan lebih jauh kenaikan konsentrasi substrat tidak akan berdampak lagi terhadap laju reaksi. Semua fenomena ini ditunjukkan pada gambar 2.6.



**Gambar 3.5 Laju reaksi versus konsentrasi substrat untuk reaksi yang mengikuti kinetika Michaelis-Menten**

Persamaan 2.8 dapat ditulis sebagai

$$v = \frac{v_{max} C_S}{K_m + C_S} \quad (3.13)$$

$V_{\max}$ , yang setara dengan  $k_2C_{E,\text{total}}$ , merupakan laju reaksi tercepat pada konsentrasi substrat yang tinggi. Saat  $C_S$  setara dengan  $K_m$ , maka persamaan 3.13 dapat ditulis menjadi

$$v = \frac{v_{\max} C_S}{C_S + C_S} = \frac{v_{\max}}{2} \quad (3.14)$$

### 3.6.2 Penentuan Parameter $v_{\max}$ dan $K_m$

Dua parameter ini dapat diketahui dengan metode linearisasi. Oleh karena itu, persamaan yang menggambarkan hubungan antara konsentrasi substrat dan konsentrasi produk harus terlebih dahulu diturunkan. Penurunan dilakukan dari rumus dasar berikut:

$$\frac{dC_p}{dt} = v = \frac{v_{\max} C_S}{K_m + C_S} \quad (3.15)$$

Oleh karena laju pembentukan produk sama dengan laju pengurangan substrat, maka secara matematis dapat dikatakan bahwa:

$$\frac{dC_s}{dt} = -\frac{v_{\max} C_S}{K_m + C_S} \quad (3.16)$$

Untuk mendapatkan nilai  $K_m$  dan  $v_{\max}$ , maka linearisasi dilakukan pada persamaan 3.15.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + C_S}{v_{\max} C_S} \quad (3.17)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max} C_S} + \frac{C_S}{v_{\max} C_S} \quad (3.18)$$

$$\frac{1}{dC_p/dt} = \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{C_S} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (3.19)$$

Persamaan ini dapat dianalogikan sebagai persamaan garis lurus dengan  $1/C_S$  sebagai x dan  $1/(dC_p/dt)$  sebagai sumbu y. Gradien dari persamaan garis ini merupakan nilai  $K_m/v_{\max}$  dan konstantanya adalah  $1/v_{\max}$  sehingga parameter  $K_m$  dan  $v_{\max}$  dapat diketahui.  $C_S$  dan  $C_p$  merupakan konsentrasi substrat (asam oleat) dan produk (oktil oleat) yang didapatkan dari hasil analisis HPLC.

### 3.6.3 Pembuatan Grafik Konsentrasi Substrat dan Produk

Konversi yang terjadi selama reaksi akan menurunkan konsentrasi asam oleat sebagai substrat. Sebaliknya konsentrasi produk akan bertambah seiring waktu. Konsentrasi asam oleat dan oktil oleat didapatkan dari hasil analisis HPLC.

### 3.7 Analisis Statistik

Analisis ini dilakukan pada variabel bebas yang digunakan selama eksperimen. Pada eksperimen yang dipengaruhi oleh satu variabel dilakukan uji- $t$  ( $t$ -test). Untuk melakukan uji ini, pertama-tama ditentukan terlebih dahulu hipotesis terhadap variabel yang dianalisis. Hipotesis yang diajukan adalah sebagai berikut:

- Hipotesis nol,  $H_0 : \{\tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_n\}$
- Hipotesis alternatif,  $H_i : \{\text{minimal dua } \tau_i \text{ berbeda}\}$

Hipotesis nol menjelaskan bahwa rata-rata nilai dari variabel yang digunakan adalah sama dan tidak berpengaruh signifikan terhadap variabel terikatnya. Hipotesis alternatif menjelaskan bahwa rata-rata nilai dari variabel yang digunakan tidak sama dan dapat memiliki pengaruh signifikan terhadap variabel terikatnya. Tingkat kepentingan ( $\alpha$ ) yang digunakan pada analisis ini adalah 0,05. Apabila nilai kedua uji lebih besar dari tabel kepercayaan, maka hipotesis nol ditolak dan hipotesis alternatif diterima.

## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada bab ini akan dibahas mengenai reaksi esterifikasi, kinetika reaksi berbasis model *Michaelis-Menten*, dan analisis statistik dari data yang diperoleh selama eksperimen.

#### 4.1 Reaksi Esterifikasi

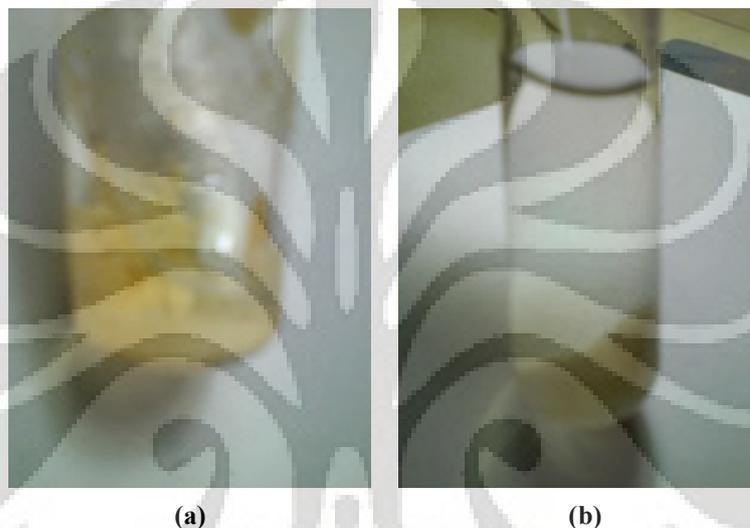
Asam oleat sebagai bahan dasar direaksikan dengan alkohol rantai panjang menggunakan *Candida rugosa* lipase (CRL) untuk menghasilkan wax ester berupa oktil oleat. Beberapa variasi dilakukan untuk mendapatkan kondisi operasi optimum, antara lain variasi persentase enzim, rasio reaktan, dan waktu.

Sejumlah asam oleat ditimbang menggunakan timbangan digital sekaligus dimasukkan ke dalam tabung reaksi bersama oktanol. Campuran reaktan kemudian dihangatkan terlebih dahulu dalam *shaking waterbath* hingga suhu mencapai 37 °C. Prosedur ini dilakukan untuk menyesuaikan kondisi reaktan dengan suhu aktivasi enzim. Setelah suhu tercapai, enzim kemudian dimasukkan ke masing-masing tabung reaksi, kemudian ditutup. Tabung reaksi tertutup digunakan untuk menjaga reaktan agar tidak tumpah karena proses *shaking* dan *sentrifuge*. Oleh karena pegas pada *shaking waterbath* tidak dapat menyangga tabung reaksi, maka *stereof foam* digunakan sebagai penyangga tambahan. *Shaking rate* di-set sebesar 100 rpm untuk memastikan reaktan tercampur dengan baik dengan enzim.



Gambar 4.1 Penempatan tabung reaksi tertutup dalam *shaking waterbath*

Setelah reaksi berakhir, untuk memisahkan sampel dengan enzim yang tercampur, maka tabung reaksi kemudian dimasukkan ke dalam *sentrifuge*. Metode ini cukup efektif mengendapkan enzim di dasar tabung reaksi, sehingga ketika sample dituangkan ke dalam labu erlenmeyer, tidak ada enzim yang terikut. Pemisahan enzim menggunakan kertas saring tidak dilakukan karena jumlah sample sedikit, sehingga lebih banyak sample yang terserap dalam kertas saring daripada yang terlewat. Pemisahan sampel berupa minyak menggunakan kertas saring juga akan memakan waktu yang relatif lama.



**Gambar 4.2** Pengaruh proses *sentrifuge* pada sample. (a) sebelum proses (b) setelah proses

Sampel hasil reaksi dibuat sebanyak 2 buah untuk dititrasi menggunakan KOH yang telah distandarisasi. Selain itu, sampel tanpa enzim juga dititrasi untuk mengetahui jumlah asam oleat awal sebelum terjadinya reaksi. Produk wax ester yang dihasilkan berwarna kuning muda, seperti dapat dilihat pada gambar 4.3.

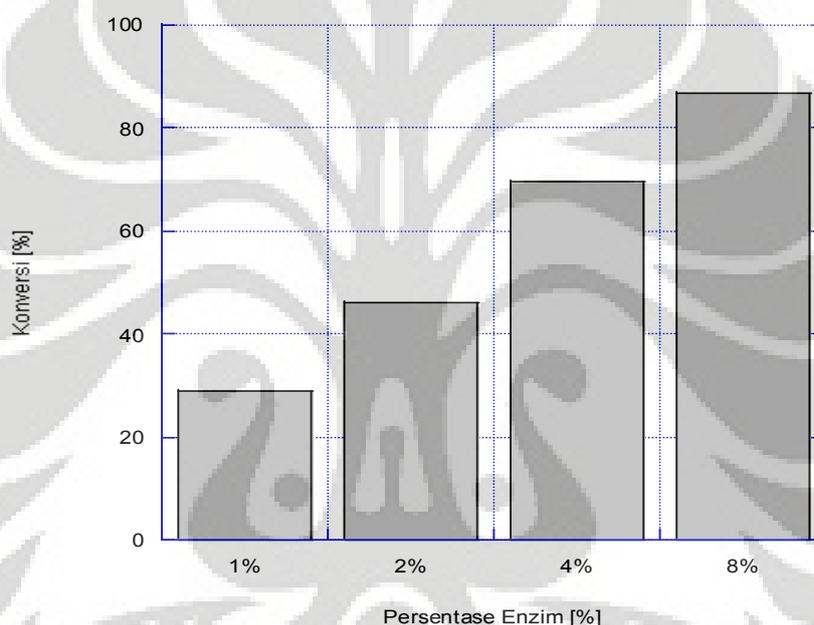


**Gambar 4.3** Produk wax ester berupa oktil oleat

#### 4.1.1 Variasi Persentase Enzim

Variasi ini dilakukan untuk mengetahui jumlah enzim yang optimum untuk mengkatalisis reaksi esterifikasi. Enzim digunakan sebanyak 1 %, 2 %, 4 %, dan 8 % massa asam oleat. Parameter yang dibuat konstan adalah rasio reaktan 1:1 dengan jumlah asam oleat 2 mmol yang direaksikan dengan oktanol dengan jumlah yang sama selama 6 jam dalam tabung reaksi tertutup.

Oleh karena mahalnya harga enzim, maka parameter yang dilihat tidak hanya dari segi konversi, melainkan keekonomian proses. Gambar 4.4 menunjukkan pengaruh % enzim terhadap konversi asam oleat.

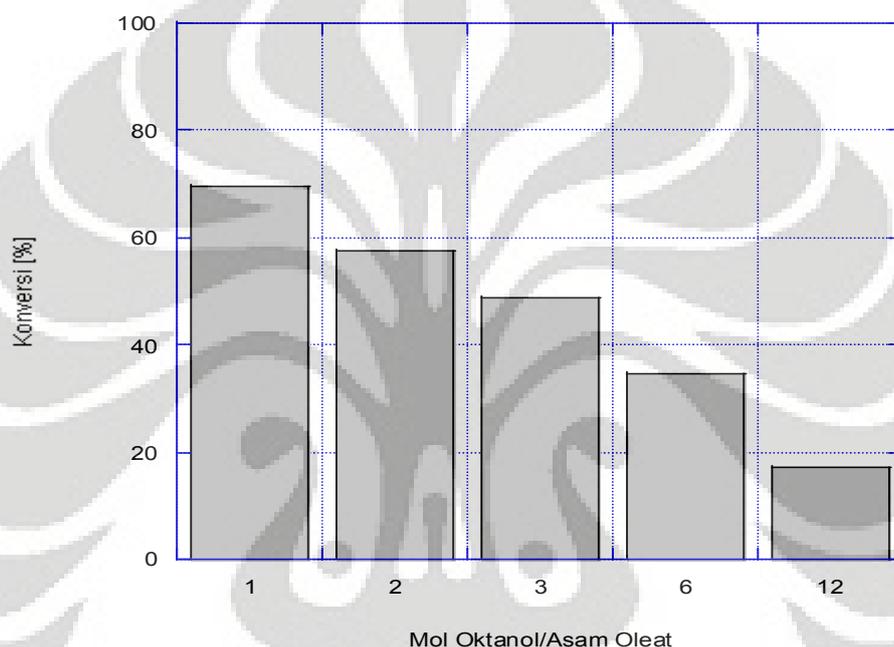


**Gambar 4.4 Grafik Pengaruh % Enzim terhadap Konversi Asam Oleat**

Grafik memperlihatkan bahwa konversi asam oleat meningkat seiring penambahan jumlah enzim. Penambahan 4 % enzim mampu menghasilkan konversi sebesar 69,76 %. Walaupun konversi maksimum sebesar 86,806 % dihasilkan dengan penambahan 8 % enzim, namun proses esterifikasi menjadi kurang ekonomis karena jumlah enzim yang cukup banyak. Oleh karena itu, jumlah enzim yang optimum untuk mengkatalisis reaksi esterifikasi asam oleat adalah sebesar 4 %, karena penambahan enzim menjadi 4 % menghasilkan peningkatan konversi yang cukup signifikan, yaitu sebesar 24,39 %.

#### 4.1.2 Variasi Rasio Reaktan

Perbandingan jumlah asam oleat dengan oktanol dibuat bervariasi untuk mengetahui rasio reaktan yang optimum dalam reaksi esterifikasi. Variasi dilakukan dari rasio stoikiometrik yaitu 1:1, kemudian 1:2, 1:3, 1:6, dan 1:12. Jumlah asam oleat dibuat tetap sebanyak 2 mmol, sedangkan jumlah oktanol ditambahkan sesuai dengan rasio reaktan yang meningkat. Parameter yang dibuat konstan adalah persentase enzim sebanyak 4% dan waktu reaksi selama 6 jam dalam tabung reaksi tertutup.



**Gambar 4.5 Grafik Pengaruh Rasio Reaktan terhadap Konversi**

Grafik ini menunjukkan bahwa peningkatan rasio reaktan akan menurunkan konversi. Dalam jurnalnya, Kanasawud, Claon dan Akoh menduga bahwa hal ini disebabkan oleh kemampuan alkohol berlebih pada rasio reaktan di atas stoikiometrik untuk mengubah sifat dasar lapisan air dari enzim. Pada saat bersamaan, alkohol berlebih akan mengganggu frekuensi interaksi antara substrat dengan lipase (Basri et al, 2005). Rasio stoikiometrik (1:1) menghasilkan konversi maksimum sebesar 69,76 %. Hasil ini dapat meningkatkan keekonomian proses karena jumlah bahan yang digunakan dapat dihemat.

Turunnya konversi juga mungkin disebabkan adanya pengaruh massa total reaktan dengan jumlah enzim tetap terhadap konversi. Untuk membuktikan

hipotesis ini, maka kemudian massa enzim dan massa total reaktan dibuat tetap, sedangkan jumlah asam oleat divariasikan.

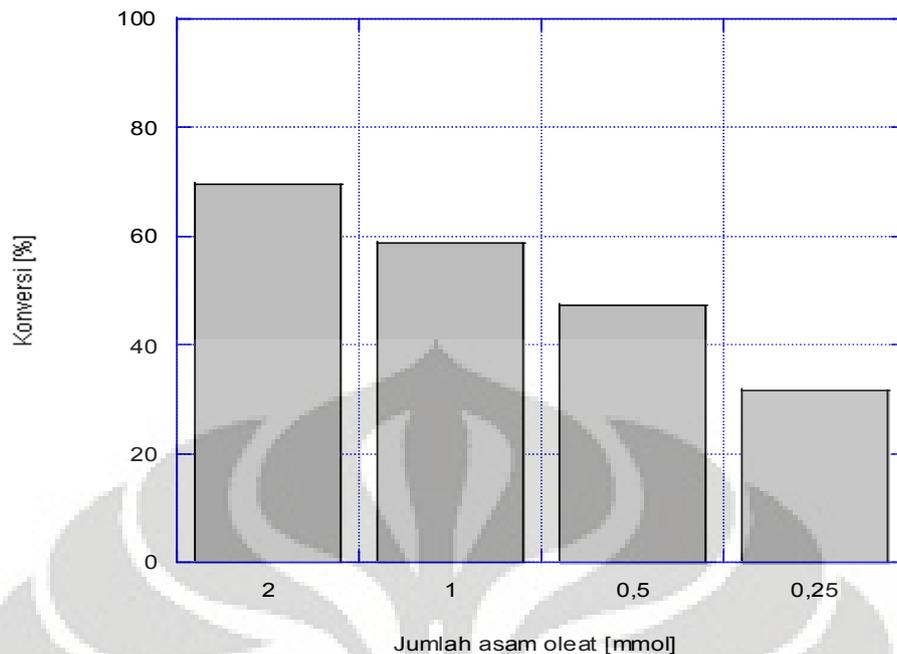
#### 4.1.3 Variasi Jumlah Asam Oleat

Eksperimen ini ditujukan untuk melihat ada tidaknya pengaruh jumlah massa total terhadap konversi asam oleat. Oleh karena itu, jumlah reaktan dan enzim dibuat tetap. Variasi yang dilakukan adalah jumlah asam oleat yang dikurangi menjadi setengahnya.

Perbandingan reaktan 1:1 dengan jumlah asam oleat sebanyak 2 mmol dan 4% CRL dijadikan basis untuk variasi ini. Oleh karena itu, massa total dan massa enzim untuk setiap variasi dibuat sama dengan kondisi pada rasio reaktan 1:1, yaitu 0,8355 gram untuk massa sampel dan 0,023 gram untuk massa enzim CRL. Asam oleat kemudian dikurangi jumlahnya menjadi 1; 0,5; 0,25 mmol. Massa oktanol menyesuaikan sebagaimana sehingga massa total menjadi 0,8355 gram.

**Tabel 4.1 Perhitungan Massa Reaktan untuk Variasi Jumlah Asam Oleat**

<b>mol oleat</b>	<b>Massa Oleat</b>	<b>Massa Enzim</b>	<b>Massa Oktanol</b>	<b>Massa Sampel Total</b>
<b>2,000</b>	<b>0,575</b>	<b>0,023</b>	<b>0,261</b>	<b>0,836</b>
<b>1,000</b>	<b>0,287</b>	<b>0,023</b>	<b>0,548</b>	<b>0,836</b>
<b>0,500</b>	<b>0,144</b>	<b>0,023</b>	<b>0,692</b>	<b>0,836</b>
<b>0,250</b>	<b>0,072</b>	<b>0,023</b>	<b>0,764</b>	<b>0,836</b>

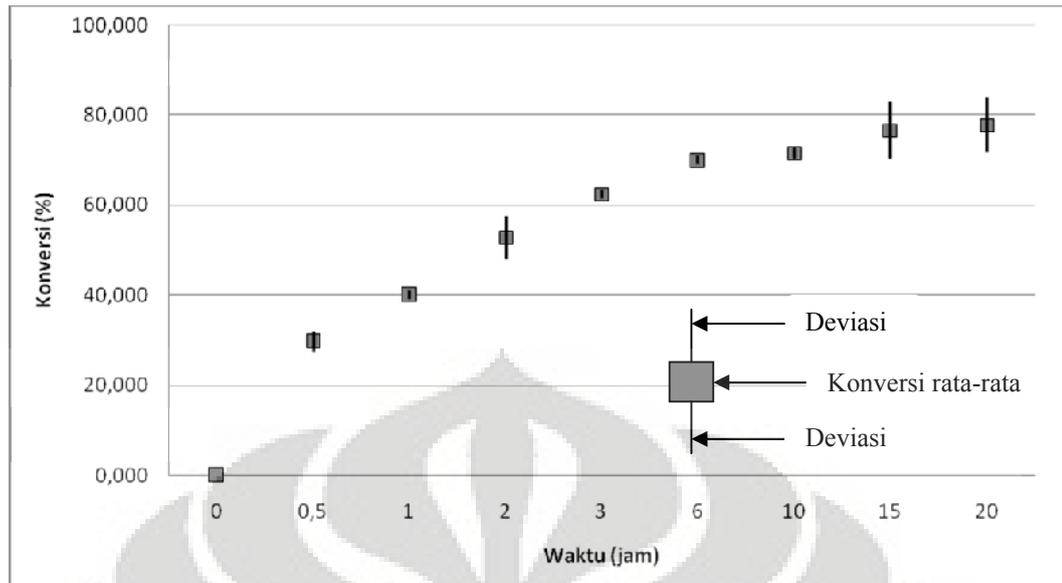


**Gambar 4.6 Pengaruh Jumlah Asam Oleat terhadap Konversi**

Grafik di atas menunjukkan bahwa pengurangan jumlah asam oleat akan mengurangi konversi, meskipun massa total reaktan dan jumlah enzimnya tetap. Jadi, dapat disimpulkan bahwa konversi tidak dipengaruhi oleh persentase massa enzim terhadap massa total reaktan.

#### 4.1.4 Variasi Waktu

Waktu merupakan parameter penting dalam setiap reaksi kimia yang menghasilkan produk. Penentuan waktu optimum bertujuan untuk efisiensi proses. Variasi waktu yang dilakukan dalam eksperimen ini antara lain 30 menit, 1, 2, 3, 6, 10, 15, 20 jam. Reaksi dilakukan dalam botol berukuran 250 mL dan tabung reaksi tertutup. Untuk botol, volume total reaktan yang digunakan sebanyak 100 mL kemudian sampel diambil untuk tiap selang waktu. Perbandingan reaktan dan jumlah enzim dibuat konstan, masing-masing 1:1 dan 4 %. Hasil dari eksperimen ini dapat dilihat pada gambar 4.7.



**Gambar 4.7 Pengaruh waktu reaksi terhadap konversi yang dihasilkan**

Grafik di atas menunjukkan bahwa konversi naik seiring waktu. Konversi maksimum (77,792 %) didapatkan untuk waktu reaksi selama 20 jam. Akan tetapi, waktu optimum untuk reaksi esterifikasi ini adalah 6 jam karena peningkatan konversi yang tidak signifikan untuk waktu lebih lama. Konversi yang dihasilkan untuk waktu reaksi selama 6 jam sebesar 69,76 %. Konversi yang cenderung konstan mungkin terjadi karena reaksi telah mencapai kesetimbangan (Basri et al., 2005).

#### 4.2 Hasil Analisis *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

Analisis HPLC seharusnya dilakukan dengan membandingkan sampel dengan standar oktil oleat. Namun, karena tidak tersedianya standar ini, maka analisis dilakukan menggunakan standar ester lain, yaitu metil oleat yang merupakan standar untuk analisis biodiesel.

Tabel 4.2 Tabulasi hasil analisis HPLC

t (jam)	Konsentrasi (mmol/L)	
	Asam Oleat	Oktil Oleat
0	398,224	44.514
0,5	307,769	184.931
1	248,322	198.799
2	151,281	201.180
3	102,381	203.781
6	46,187	193.708
10	27,961	186.847
15	24,105	197.970
20	23,561	217.439

Dari tabel di atas, kita dapat mengetahui konsentrasi asam oleat pada awal reaksi dan oktil oleat di akhir reaksi, sehingga *yield* wax ester dapat dihitung menggunakan persamaan 3.3. Hasil perhitungan menunjukkan bahwa eksperimen ini hanya menghasilkan *yield* wax ester sebesar 54,602 %. Rendahnya *yield* kemungkinan besar disebabkan tidak akuratnya pendeteksian HPLC terhadap oktil oleat karena keterbatasan standar.

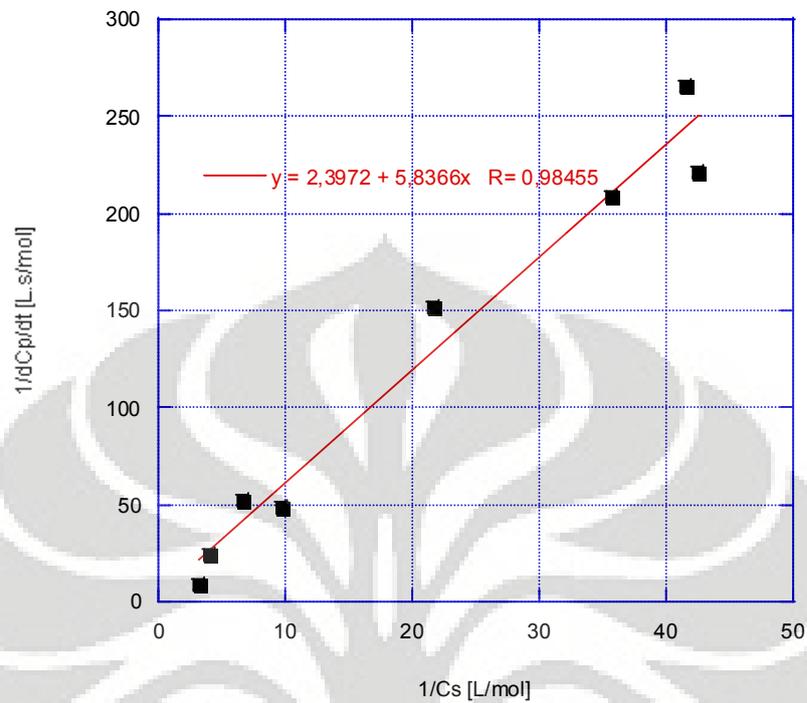
#### 4.3 Kinetika Reaksi Menggunakan Persamaan *Michaelis – Menten*.

Dalam melakukan suatu sintesis secara kimia maupun bioproses, proses yang kompleks dapat ditemui. Supaya kualitas dari proses maupun produk yang dihasilkan baik, maka penting untuk mengontrol perubahan-perubahan secara kimia maupun bio tersebut. Pada eksperimen ini, permodelan dilakukan dua kali, yaitu untuk data hasil analisis HPLC dan titrasi.

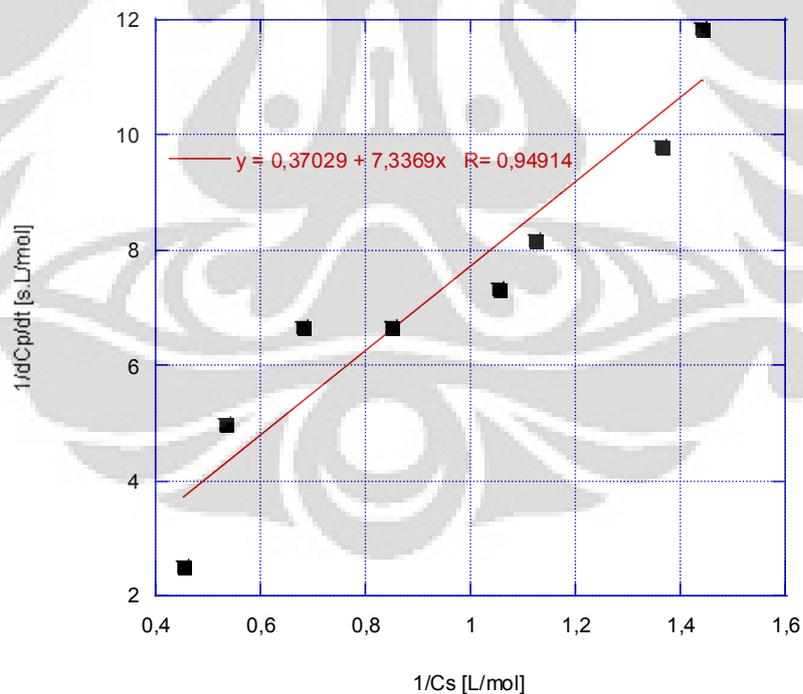
##### 4.3.1 Penentuan parameter $v_{max}$ dan $K_m$

$V_{max}$  merupakan parameter yang menunjukkan kecepatan maksimum dalam reaksi esterifikasi ini, sedangkan  $K_m$  merupakan konstanta *Michaelis-Menten*. Keduanya dapat diselesaikan dengan metode linearisasi data konsentrasi

substrat dan produk. Dengan menggunakan persamaan 3.18, maka akan didapatkan grafik 4.8.



(a)



(b)

Gambar 4.8 Linearisasi data untuk mendapatkan nilai  $v_{max}$  dan  $K_m$  (a) Hasil analisis HPLC  
(b) Hasil titrasi

Dari linearisasi grafik di atas, maka *slope* yang merupakan nilai dari  $K_m/v_{max}$  dan konstanta  $1/v_{max}$  dapat diketahui. Maka setelah nilai-nilai tersebut diketahui, maka nilai  $K_m$  dan  $v_{max}$  dapat dihitung. Hasil perhitungan  $K_m$  dan  $v_{max}$  dapat dilihat pada tabel 4.4.

**Tabel 4.3 Hasil perhitungan  $K_m$  dan  $v_{max}$**

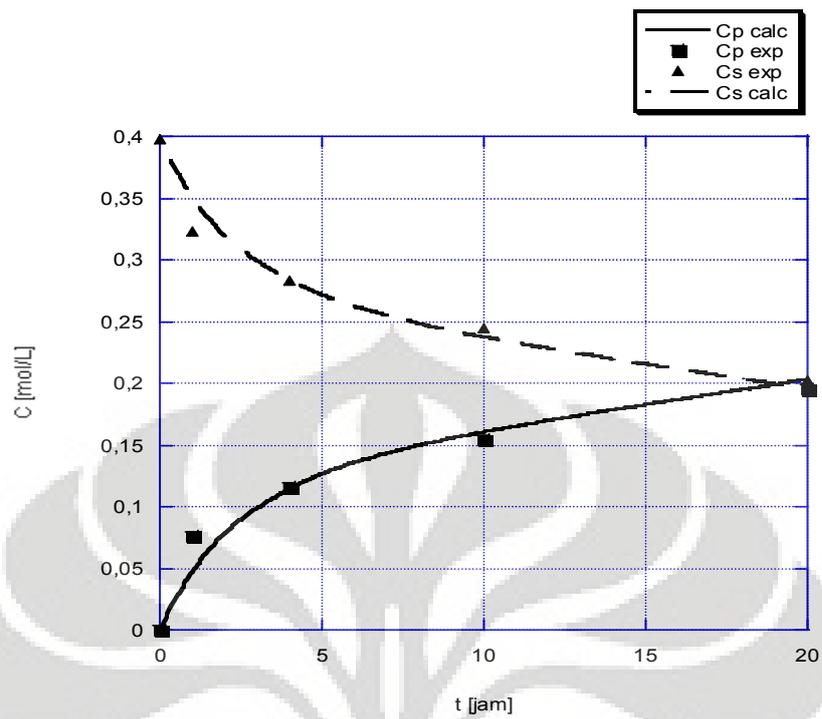
Data	Slope	Konstanta	Km	Vmax
HPLC	5,836	2,397	0,417	2,435
Titration	7,336	0,37	19,827	2,703

Perbedaan yang cukup signifikan antara data hasil HPLC dan titrasi disebabkan oleh tidak akuratnya data konsentrasi asam oleat dan oktil oleat pada data HPLC. Ini disebabkan tidak tersedianya standar oktil oleat.

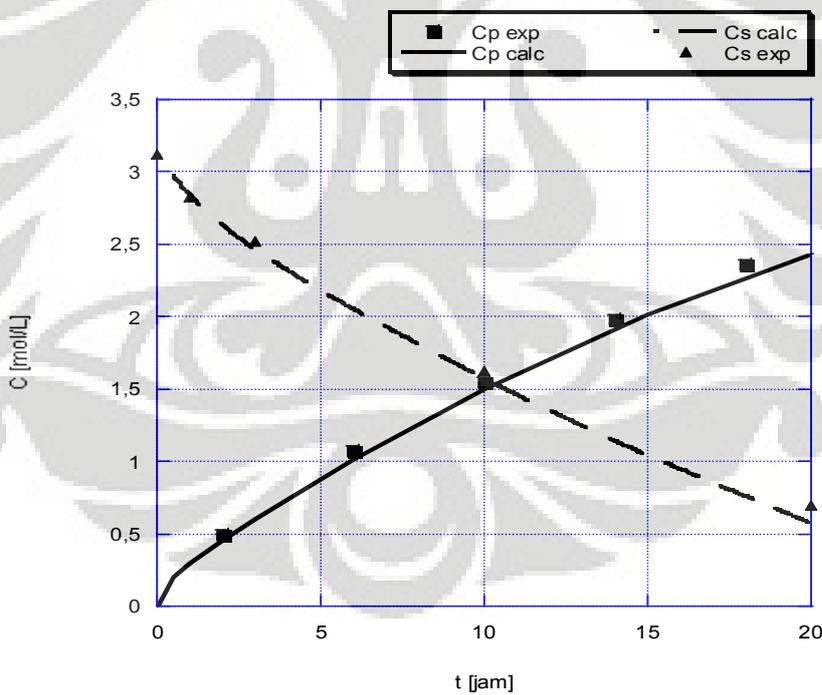
#### 4.3.2 Permodelan dan *Fitting* Kurva dengan Data Eksperimen

Setelah parameter  $K_m$  dan  $v_{max}$  didapatkan, maka model kinetika dapat dibuat. *Fitting* kurva bertujuan untuk melihat kecocokan model *Michaelis Menten* dengan data eksperimen.

Profil konsentrasi dibuat dengan memasukkan kembali konsentrasi asam oleat ke persamaan 3.15 untuk oktil oleat dan 3.16 untuk asam oleat dengan parameter  $K_m$  dan  $v_{max}$  yang telah diketahui. Untuk mendapatkan kurva model yang mulus, maka selisih waktu diperkecil (*dt*) menjadi 0,05 jam.



(a)



(b)

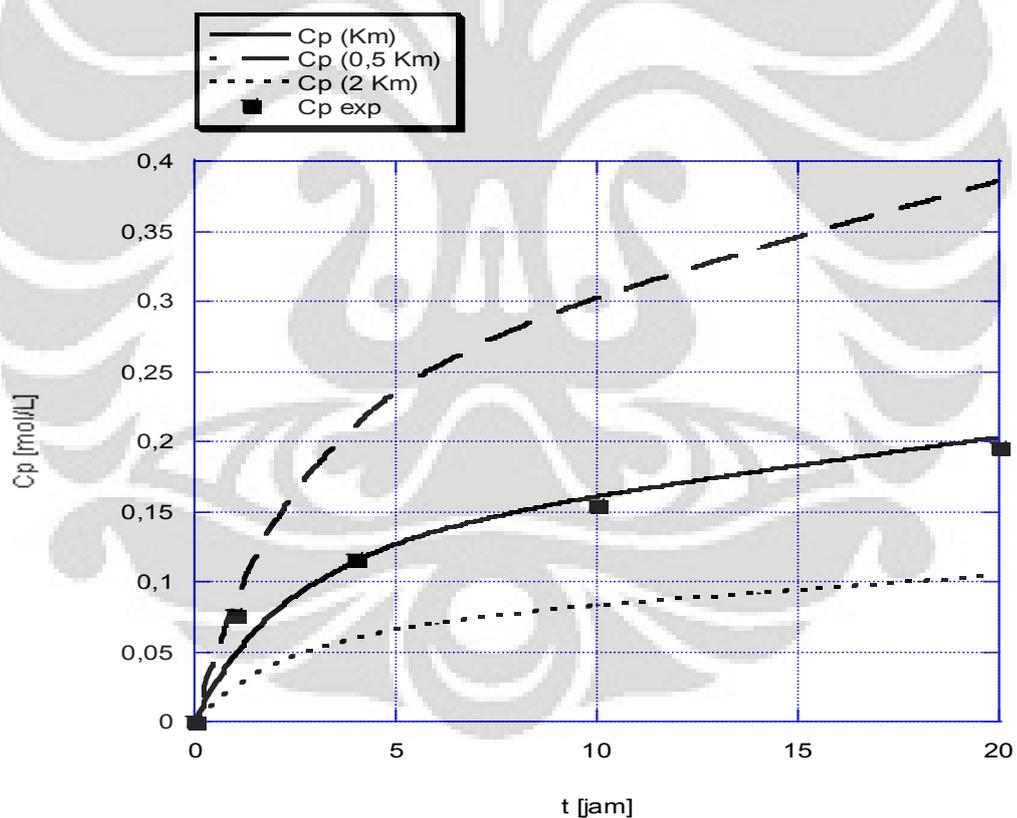
Gambar 4.9 Profil konsentrasi substrat dan produk beserta permodelannya (a) Hasil analisis HPLC (b) Hasil titrasi

Hasil *fitting* data eksperimen dengan kedua grafik menunjukkan hasil yang cukup memuaskan. Adanya deviasi disebabkan oleh linearisasi yang tidak sempurna pada penentuan parameter  $K_m$  dan  $v_{max}$ . Namun dari hasil ini, dapat dikatakan bahwa model kinetika *Michaelis-Menten* mampu mendeskripsikan perilaku substrat dan produk dalam sintesis wax ester menggunakan *Candida rugosa* lipase.

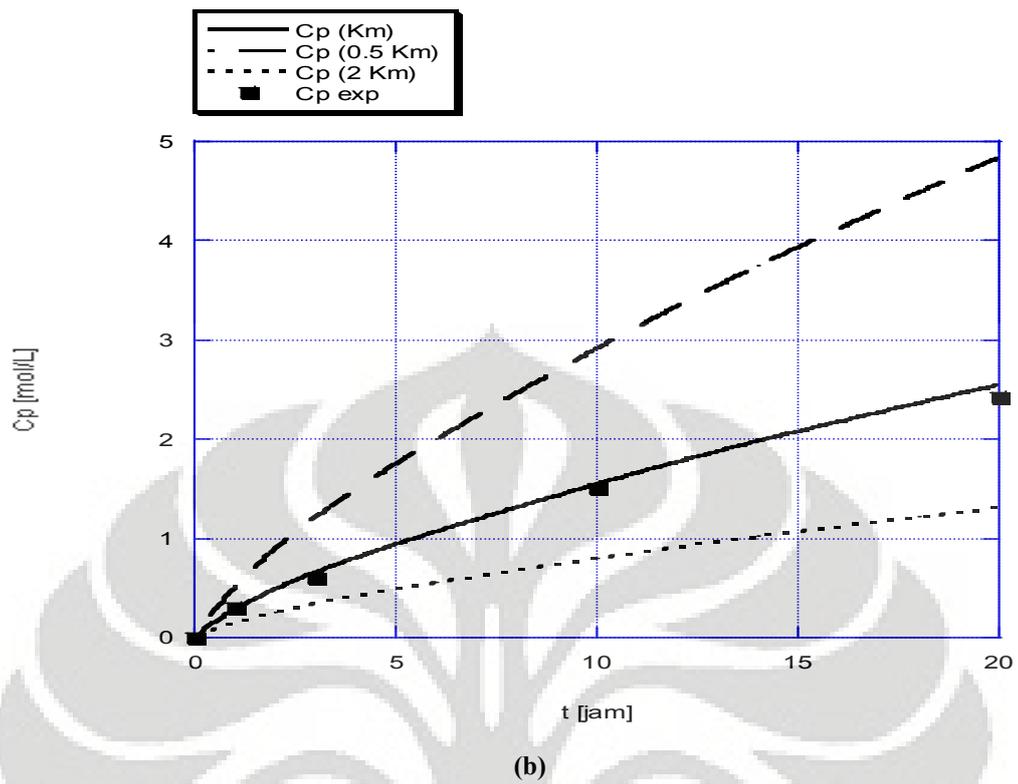
Perbedaan yang cukup signifikan antara data hasil HPLC dan titrasi disebabkan oleh tidak akuratnya data konsentrasi asam oleat dan oktil oleat pada data HPLC. Ini disebabkan tidak tersedianya standar oktil oleat.

#### 4.3.3 Variasi $K_m$ dan $v_{max}$

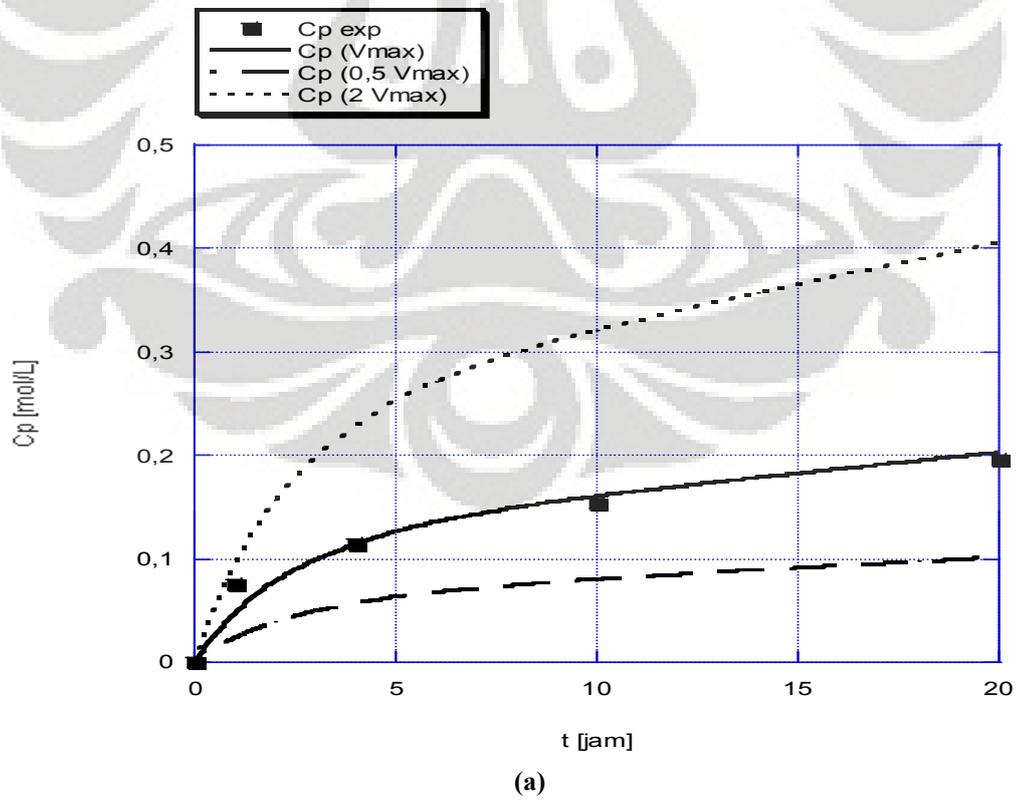
Variasi ini bertujuan untuk melihat sejauh mana pengaruh  $K_m$  dan  $v_{max}$  terhadap konsentrasi oktil oleat. Parameter ini masing-masing divariasikan menjadi setengah dan dua kalinya.

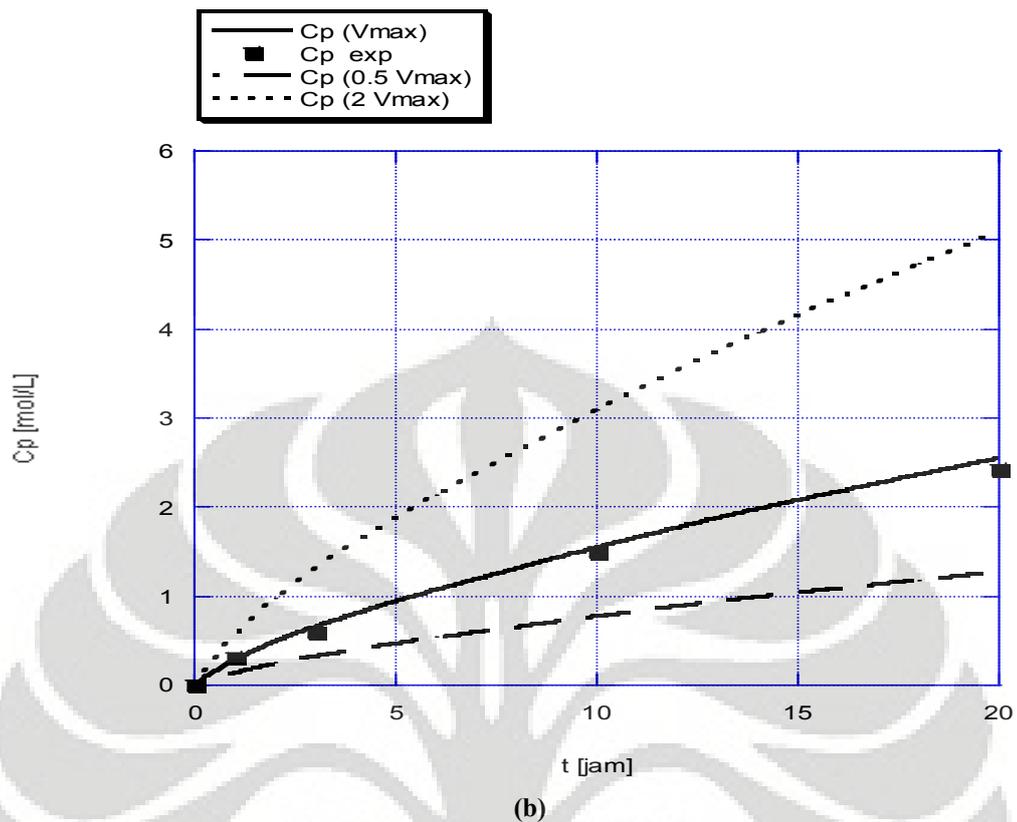


(a)



Gambar 4.10 Hasil *fitting* data eksperimen dengan model kinetika untuk beberapa variasi  $K_m$  (a) Hasil analisis HPLC (b) Hasil titrasi





**Gambar 4.11 Hasil *fitting* data eksperimen dengan model kinetika untuk beberapa variasi  $v_{max}$  (a) Hasil analisis HPLC (b) Hasil titrasi**

Grafik 4.10 menunjukkan bahwa  $K_m$  berbanding terbalik dengan konsentrasi oktil oleat. Ini terlihat dari penurunan konsentrasi oktil oleat dengan peningkatan  $K_m$  dan sebaliknya. Sedangkan grafik 4.11 menunjukkan hasil yang bertolak belakang. Grafik ini menunjukkan hubungan berbanding lurus antara  $v_{max}$  dan konsentrasi oktil oleat.

Perbedaan yang cukup signifikan antara data hasil HPLC dan titrasi disebabkan oleh tidak akuratnya data konsentrasi asam oleat dan oktil oleat pada data HPLC. Ini disebabkan tidak tersedianya standar oktil oleat.

#### 4.4 Hasil Analisis Statistik

Analisis statistik pada pembahasan kali ini bertujuan untuk mengetahui hubungan antar variabel selama eksperimen, dan *fitting* data dengan kurva linearisasi pada penentuan parameter  $K_m$  dan  $v_{max}$ . Metode analisis statistik

dilakukan menggunakan uji-t karena metode ini cocok digunakan untuk pengujian satu variabel dengan populasi kurang dari 30.

Variasi yang dilakukan selama eksperimen akan dilihat hubungan antar variabel dan signifikansi pengaruhnya terhadap konversi.

**Tabel 4.4 Tabulasi hasil analisis statistik dengan metode uji-t**

Variabel	Rentang Variasi	h	p-value	Keterangan
Persentase Enzim	1 - 8 %	1	0,01	Signifikan
Rasio Reaktan (oktanol:asam oleat)	1 - 12	1	0,0105	Signifikan
Mol Asam Oleat	2 – 0,25 mmol	1	0,0036	Signifikan
Waktu	0 – 20 jam	1	$7,88 \times 10^{-5}$	Signifikan

Berdasarkan tabel di atas, dapat ditarik kesimpulan bahwa keempat variabel yang dilakukan memiliki pengaruh yang signifikan terhadap konversi asam oleat. Kesimpulan ini diambil dengan melihat nilai *p-value* yang bernilai kurang dari 0,05 sehingga hipotesis 1 ( $h_1$ ) dipilih sebagai alternatif

Pengujian kecocokan data dengan linearisasi pada penentuan parameter *Michaelis Menten* dilakukan dengan melihat nilai  $R^2$ . Dari hasil linearisasi pada gambar 4.9 untuk hasil HPLC dan titrasi, didapatkan nilai  $R^2$  masing-masing sebesar 0,98455 dan 0,94914. Oleh karena nilai  $R^2$  berada di antara 0,9 dan 1, maka dapat disimpulkan bahwa hasil linearisasi data cukup memuaskan.

## BAB 5

### KESIMPULAN

Melalui penelitian ini, dapat ditarik beberapa kesimpulan, antara lain:

1. Wax ester berupa oktil oleat dapat dihasilkan melalui esterifikasi asam oleat dengan oktanol menggunakan *Candida rugosa* lipase.
2. Semakin besar persentase enzim, maka konversi yang dihasilkan akan semakin besar.
3. Meningkatnya jumlah oktanol akan menurunkan konversi asam oleat.
4. Konversi meningkat seiring waktu hingga mencapai kesetimbangan.
5. Konversi maksimum sebesar 86,806 % dihasilkan oleh rasio reaktan 1:1 (stoikiometrik) dengan penambahan 8% enzim selama waktu reaksi 6 jam.
6. Kondisi operasi optimum pada eksperimen ini adalah rasio reaktan 1:1, 4 % enzim, dan waktu reaksi 6 jam. Dengan kondisi operasi ini, dihasilkan konversi sebesar 69,76 %.
7. Melalui model kinetik *Michaelis-Menten*, didapatkan parameter  $K_m$  dan  $v_{max}$  sebesar 0,417 dan 2,435.
8. *Yield* oktil oleat sebagai wax ester pada penelitian kali ini adalah sebesar 54,602 %.

## DAFTAR PUSTAKA

Benjamin, Sailas. 1998. *Candida rugosa Lipase : Molecular Biology and Versatility in Biotechnology*. Biotechnology Division, Regional Research Laboratory, Trivandrium – 695 019, India

Decagny, B and S. Jan. 1998. Synthesis of Wax Ester through Triolein Alcoholysis: Choise of the Lipase and Study of the Mechanism. *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 578-582.

Divakar, S. and B. Manohar. 2007. Use of Lipases in the Industrial Production of Esters. *Industrial Enzymes*. 2007, 283-300.

Fessenden, R.J and Fessenden, J.S, (1990), “Kimia Organik”, edisi kesatu, Penerbit Erlangga.

Gunawan, E. R and D. Suhendra. 2008. Synthesis of Wax Esters from Palm Kernel Oil Catalyzed by Lipase. *Jurnal Matematika dan Sains*. Vol 13 No.3

Hadzir, N.M, M. Basri, M.B.A. Rahman, C.N.A. Razak, R.N.Z. Rahman, A.B. Saleh. 2001. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, Vol. 7, No. 1. 213-216

Jarvis, N. G. & J. H. Thiele. 1997. *Qualitative Rhodamin B Assay Which Uses Tallow as a Substrate for Lyphytic Obligately Anaerobic Bacteria*. *J. Microbiol Methods* 29 (1): 41-47.

Kovalenko, G.A, L.V. Perminova, T.V. Chuenko, N.A Rudina. 2009. Adsorptive immobilization of enzymatic active substances on alumina–silica foam coated by carbon nanofibers. *Carbon* 47. 420 – 427.

Liu, C. H, and J. S. Chang. 2008. Lipolytic activity of suspended and membrane immobilized lipase originating from indigenous *Burkholderia* sp. C20. *Bioresource Technology* 99. 1616–1622

Mat Radzi, S. and M. Basri. 2005. High Performance Enzymatic Synthesis of Oleyl Oleate Using Immobilized Lipase from *Candida antartica*. *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 8 no.3.

MacRae, A.R. 1983. *Lipase Catalysed Interesterification of Oil and Fats*. *JAOAC*. 60(2):291-294.

Moniaga, Frank. 2009. “Pohon Industri Kelapa Sawit”. *Majalah Infokimia* Vol 1 No. 3, 47.

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

Prameshwari, D. A. 2008. Sintesis Biodisel dari Minyak Goreng Bekas Melalui Rute Non Alkohol Menggunakan Biokatalis Terimobilisasi pada Reaktor *Batch*. Depok: UI Press.

Rajendran, A. and A, Palanisamy. 2008. Lipase Catalyzed Ester Synthesis for Food Processing Industries. *Food Science and Technology*.

Rizkiyadi, M. E. 2008. Reaksi Interesterifikasi Minyak Jelantah dengan Metil Asetat Menggunakan Biokatalis *Candida rugosa* Lipase untuk Memproduksi Biodiesel. Depok: UI Press.

Salis, A. and V. Solinas. 2003. Wax Ester Synthesis from Heavy Fraction of Sheep Milk Fat and Cetyl Alcohol by Immobilized Lipases. *Journal of Molecular Catalyst B: Enzymatic*, 21, 167-174.

Steinke G, P. Weitkamp, and E. Klein. 2001. High-Yield Preparation of Wax Esters via Lipase-Catalyzed Esterification Using Fatty Acids and Alcohols from Crambe and Camelina Oils. *J. Agric. Food Chem*, 49, 647-651.

Sukara, Endang. 2008. *Pemanfaatan Biodiversity*. <http://www.biotek.lipi.go.id>. Diakses tanggal 7 Juli 2010.

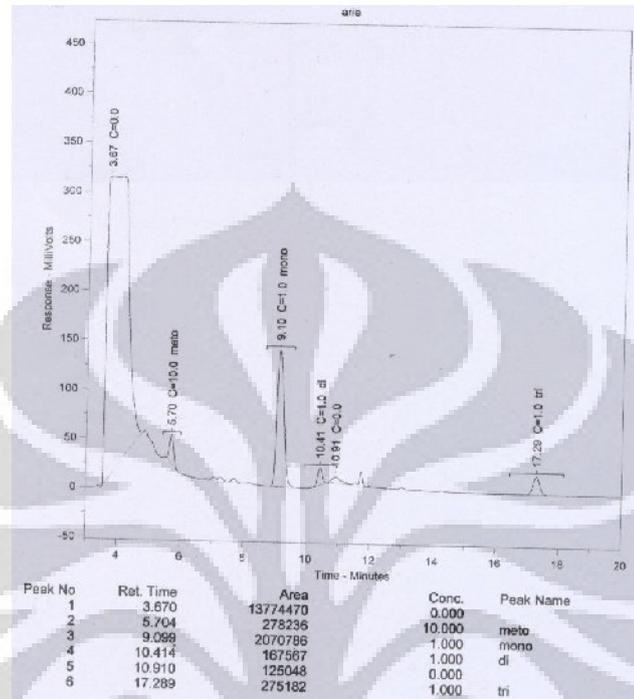
Susanto, B. H. 2008. Sintesis Pelumas Dasar Bio Melalui Esterifikasi Asam Oleat Menggunakan Katalis Asam Heteropoli/Zeolit. Depok: UI Press.

Takahiro Tsujita, Maho S, and Hiromichi O. 1999. Wax Ester-Synthesizing Activity of Lipases. *JAOCS* Vol.34, no.11

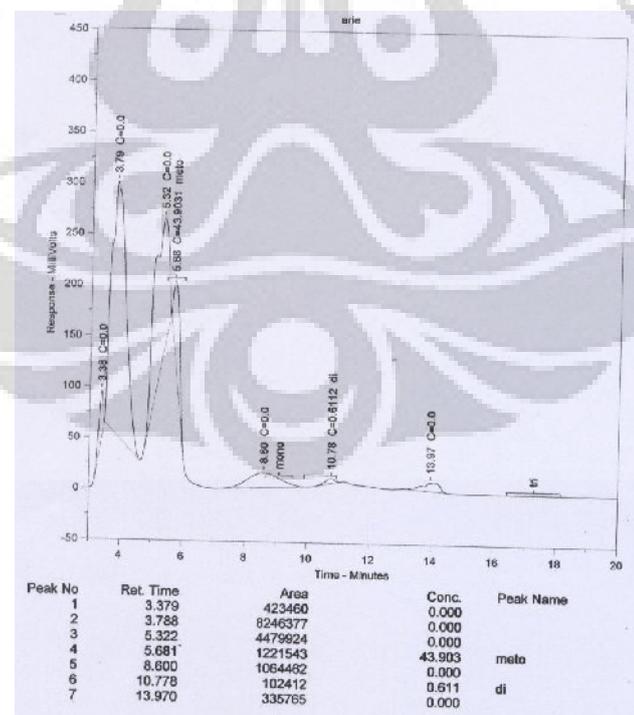
UV Protection Ooriveil Cover. Diunduh dari [www.oorilewa.sg](http://www.oorilewa.sg). Diakses tanggal: 21 Juni 2010.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1: Hasil Analisis HPLC

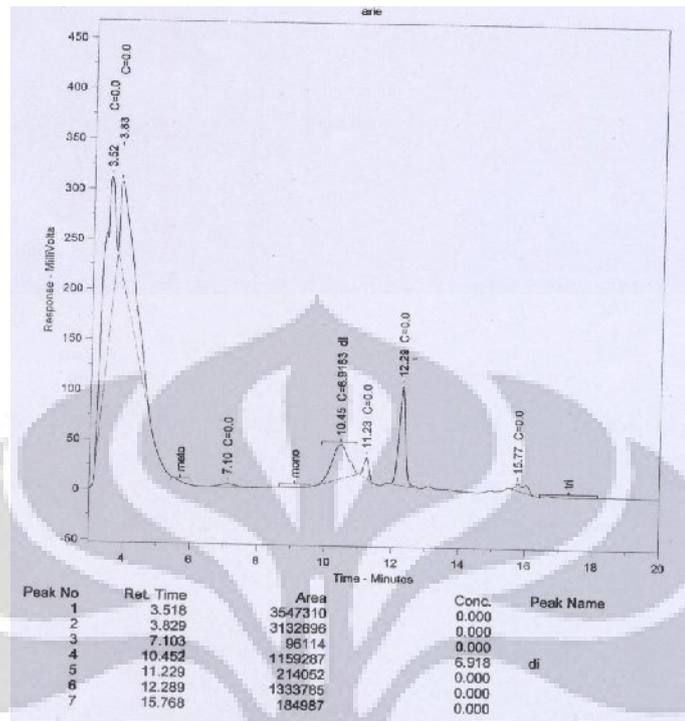


Gambar 1. Standar biodiesel untuk analisis HPLC

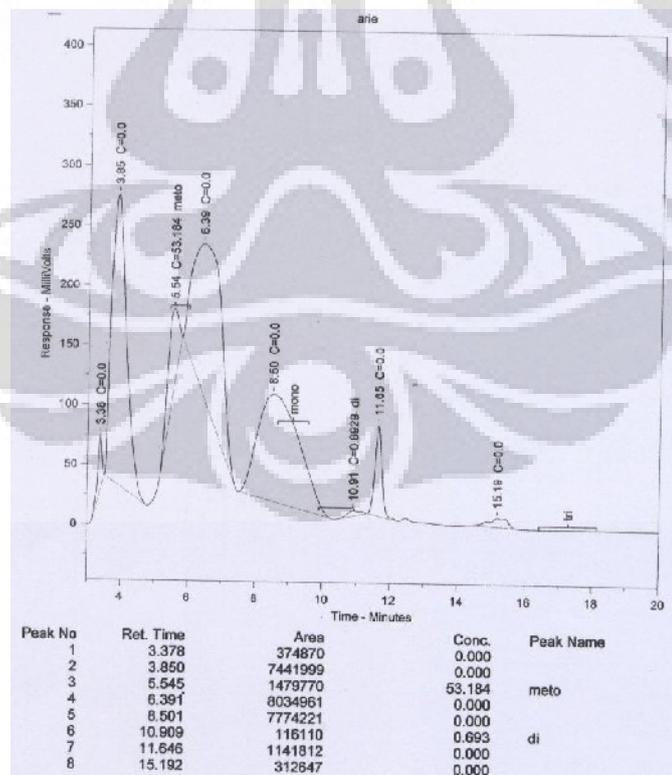


Gambar 2. Hasil analisis HPLC untuk sampel  $t = 0$

(lanjutan)



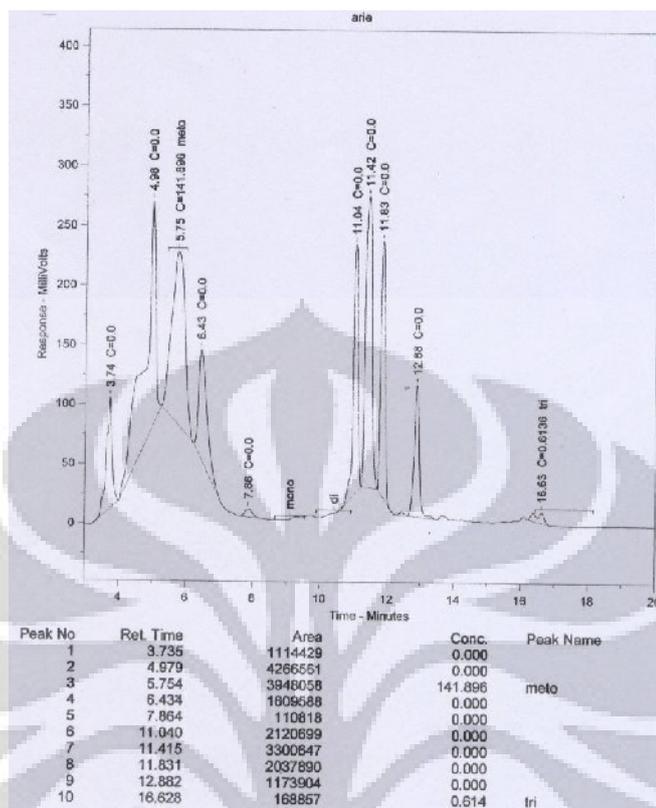
Gambar 3. Hasil analisis HPLC untuk sampel t = 0,5 jam



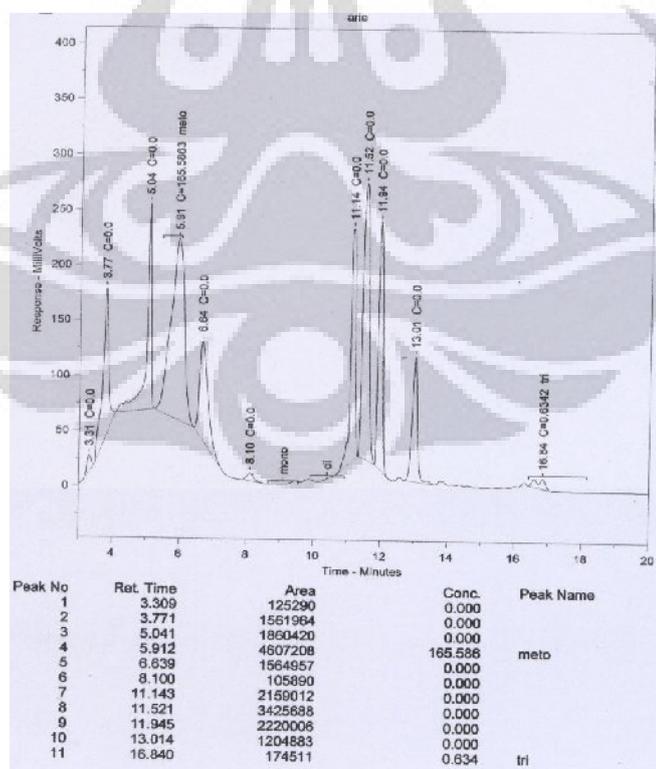
Gambar 4. Hasil analisis HPLC untuk sampel t = 1 jam

Universitas Indonesia

(lanjutan)



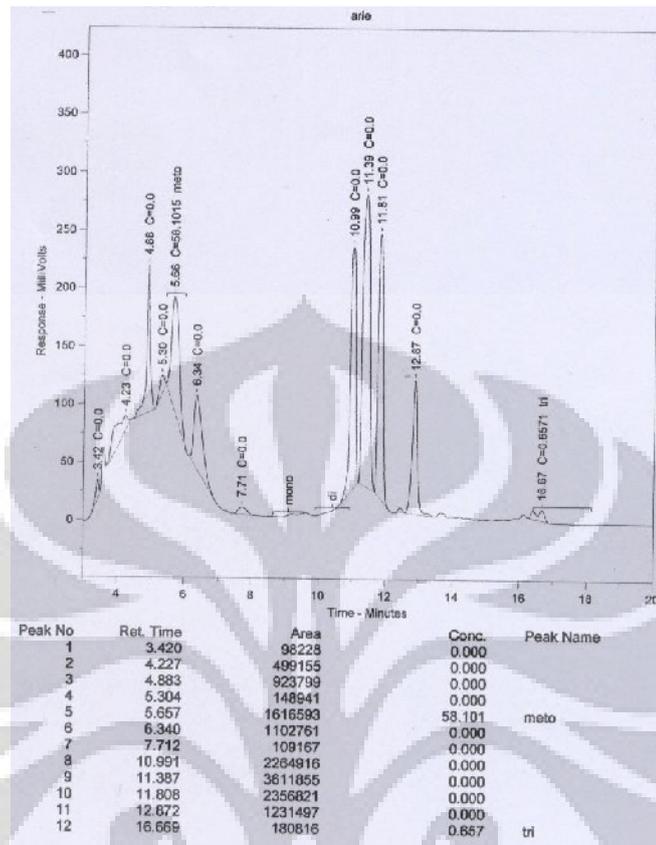
Gambar 5. Hasil analisis HPLC untuk sampel t = 2 jam



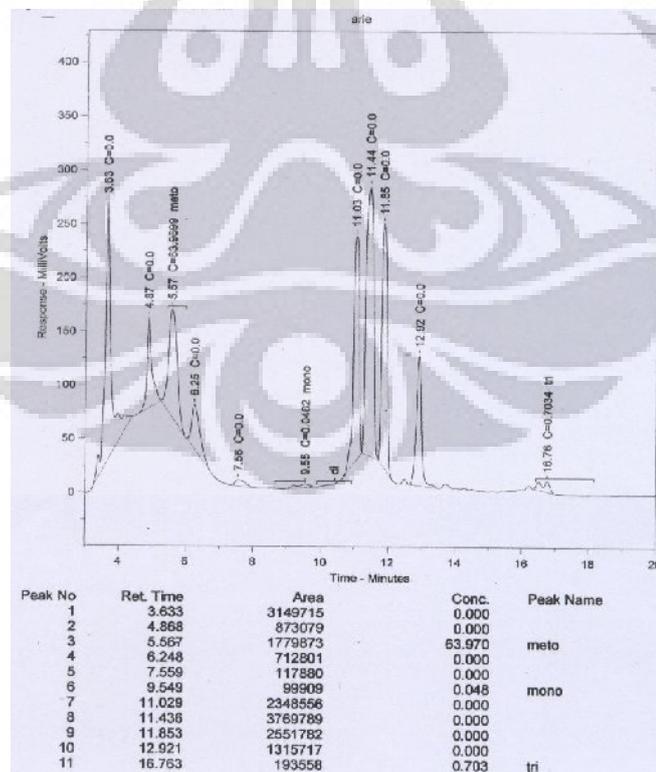
Gambar 6. Hasil analisis HPLC untuk sampel t = 3 jam

Universitas Indonesia

(lanjutan)



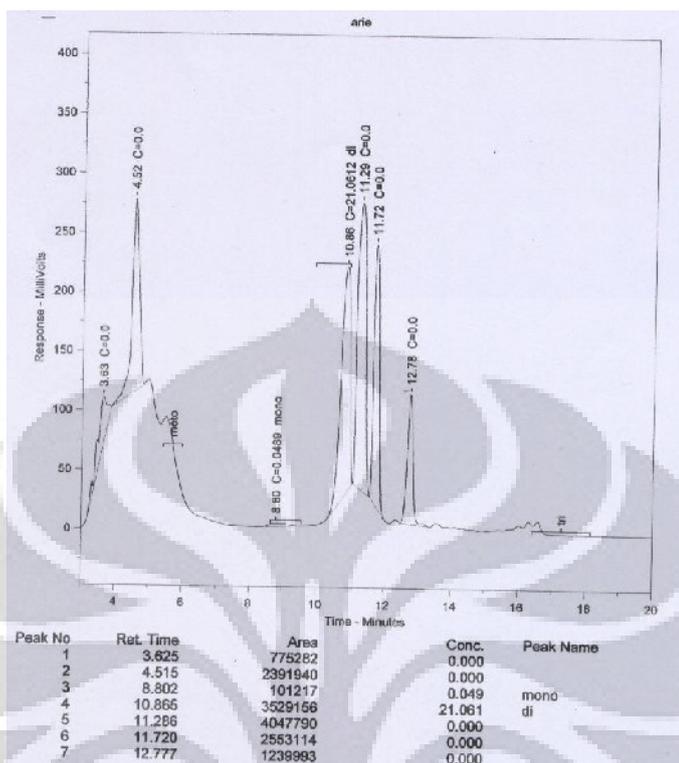
Gambar 7. Hasil analisis HPLC untuk sampel t = 6 jam



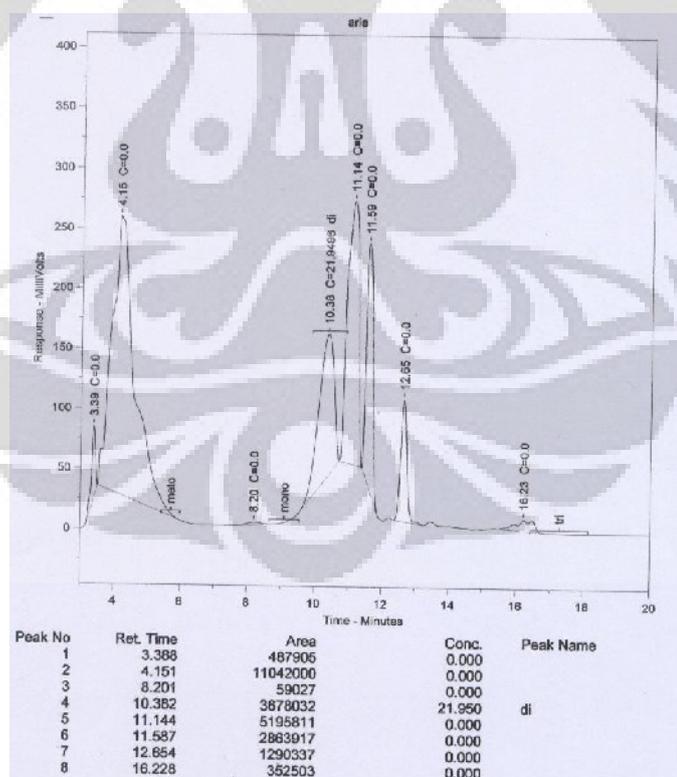
Gambar 8. Hasil analisis HPLC untuk sampel t = 10 jam

Universitas Indonesia

(lanjutan)



Gambar 9. Hasil analisis HPLC untuk sampel t = 15 jam



Gambar 2. Hasil analisis HPLC untuk sampel t = 20 jam

Universitas Indonesia

## Lampiran 2: Data Eksperimen

## 2.1 Eksperimen Variasi Waktu

Tabel 2.1 Hasil Eksperimen dengan Variasi Waktu (4% CRL, rasio reaktan = 1:1)

t (jam)	BOTOL		Konversi (%)	TABUNG REAKSI		Konversi (%)	Konversi rata-rata (%)
	v0 (t = 0)	v1		v0 (t = 0)	v1		
0		24,8	0		21	0	0,000
0,5		18	27,41935		14,3	31,90476	29,662
1		15,1	39,1129		12,4	40,95238	40,033
2		10,5	57,66129		10,9	48,09524	52,878
3		9,1	63,30645		8,1	61,42857	62,368
6	24,8	7,7	68,95161	21	6,1	70,95238	69,668
10		7,4	70,16129		5,7	72,85714	71,509
15		7,4	70,16129		3,6	82,85714	76,509
20		7	71,77419		3,4	83,80952	77,792

## 2.2 Eksperimen Variasi Persentase Enzim

Tabel 2.1 Hasil Eksperimen dengan Variasi Persentase Enzim  
(6 jam reaksi, rasio reaktan = 1:1)

% Enzim	Massa Enzim (gr)	V KOH utk titrasi sampel (mL)		Konversi (%)		Konversi Rata-rata (%)
		Sampel 1	Sampel 2	Sampel 1	Sampel 2	
1%	0,0058	15,7	15	27,315	30,556	28,9352
2%	0,0115	11,8	11,5	45,370	46,759	46,0648
4%	0,0230	6,2	6,3	69,760	70,833	69,6679
8%	0,0460	2,7	3	87,500	86,111	86,8056

### 2.3 Eksperimen Variasi Rasio Reaktan

**Tabel.2.3 Hasil Eksperimen dengan Variasi Rasio Reaktan**  
(6 jam reaksi, 4% CRL)

Rasio Reaktan (as.oleat:oktanol)	V KOH utk titrasi sampel (mL)		Konversi (%)		Konversi Rata-rata (%)
	Sampel 1	Sampel 2	Sampel 1	Sampel 2	
(1:1)	6,4	6,8	69,760	68,519	<b>69,6679</b>
(1:2)	9	9,3	58,333	56,944	<b>57,6389</b>
(1:3)	10,9	11,2	49,537	48,148	<b>48,8426</b>
(1:6)	14,2	14	34,259	35,185	<b>34,7222</b>
(1:12)	18	17,8	16,667	17,593	<b>17,1296</b>

### 2.4 Eksperimen Variasi Mol Asam Oleat

**Tabel.2.3 Hasil Eksperimen dengan Variasi Rasio Reaktan**  
(6 jam reaksi, 4% CRL)

mol oleat	Vo (mL)	Vt (mL)		Konversi (%)		Konversi Rata-rata (%)
		Sampel 1	Sampel 2	Sampel 1	Sampel 2	
<b>2,00</b>	<b>21,8</b>	6,9	6,8	69,760	68,807	<b>69,668</b>
<b>1,00</b>	<b>10,9</b>	4,4	4,6	59,633	57,798	<b>58,716</b>
<b>0,50</b>	<b>5,6</b>	3	2,9	46,429	48,214	<b>47,321</b>
<b>0,25</b>	<b>3,0</b>	2	2,1	33,333	30,000	<b>31,667</b>

## 2.5 Perhitungan Konsentrasi dari Hasil Analisis HPLC

Tabel 2.5 Tabulasi hasil analisis HPLC

t	Oktil Oleat		Asam Oleat		Konsentrasi (mmol/L)						
	ret.time	area	ret.time	area	Asam Oleat	Oktil Oleat	Metil Oleat	Trioleat	Dioleat	Monooleat	Total
0	0	0	3.788	8246377	398,224491	0	43,903	0	0,611	0	44,514
0,5	11.229	1528392	3.829	6373242	307,769224	54,931497	0	0	130	0	184,931
1	11.646	2103872	3.850	5142214	248,321845	75,6146581	53,184	0	70	0	198,799
2	11.415	2631172	3.735	3132696	151,280528	94,5661956	106	0,614	0	0	201,180
3	11.521	3203811	3.771	2120098	102,381318	115,147249	88	0,634	0	0	203,781
6	11.387	3754782	4.227	956428	46,1867136	134,949539	58,101	0,657	0	0	193,708
10	11.436	4287503	3.633	579020	27,9613635	154,095911	32	0,703	0	0,048	186,847
15	11.286	4811293	3.625	499155	24,1046153	172,921297	0	0	25	0,049	197,970
20	11.144	5439201	3.388	487905	23,5613434	195,488758	0	0	21,95	0	217,439