



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI LIPASE EKSTRAK KASAR DARI *Pseudomonas fluorescens* SEBAGAI BOKATALISATOR DALAM STUDI PENDAHULUAN REAKSI ESTERIFIKASI ANTARA ASAM LEMAK MINYAK KELAPA DENGAN SUKROSA**

**SKRIPSI**

**NANIK SUGIHARNI  
0606069161**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI KIMIA  
DEPOK  
JUNI 2010**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ISOLASI LIPASE EKSTRAK KASAR DARI *Pseudomonas fluorescens* SEBAGAI BOKATALISATOR DALAM STUDI PENDAHULUAN REAKSI ESTERIFIKASI ANTARA ASAM LEMAK MINYAK KELAPA DENGAN SUKROSA**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains**

**NANIK SUGIHARNI  
0606069161**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI KIMIA  
DEPOK  
JUNI 2010**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

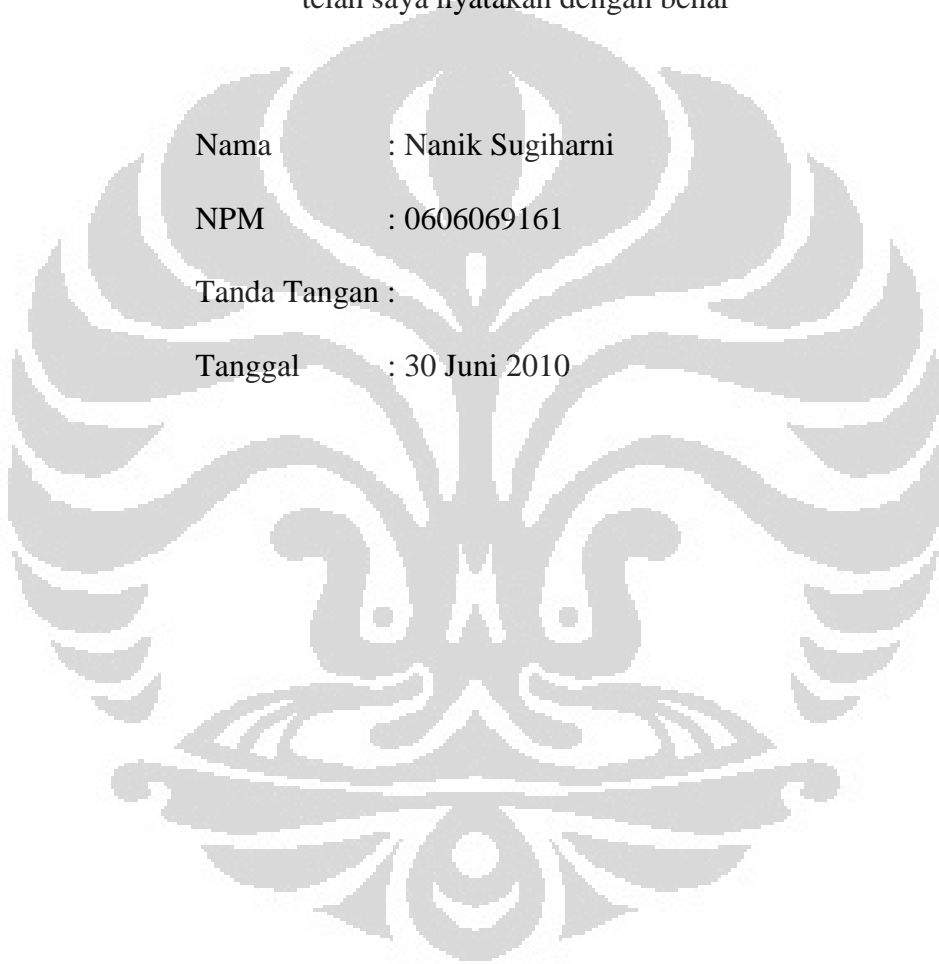
Skripsi ini merupakan hasil karya saya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Nanik Sugiharni

NPM : 0606069161

Tanda Tangan :

Tanggal : 30 Juni 2010



## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Nanik Sugiharni  
NPM : 0606069161  
Program Studi : Kimia S1 Reguler  
Judul Skripsi : Isolasi Lipase Ekstrak Kasar dari *Pseudomonas fluorescens* sebagai Biokatalisator dalam Studi Pendahuluan Reaksi Esterifikasi antara Asam Lemak Minyak Kelapa dengan Sukrosa

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

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Prof. Dr. Sumi Hudiyono, PWS ( )  
Pembimbing : Dra. Sri Handayani M.Biomed ( )  
Penguji : Dra. Siswati Setiasih, M.Si ( )  
Penguji : Dra. Susilowati Hadi Susilo, M.Sc ( )  
Penguji : Prof. Dr. Wahyudi Priyono ( )

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 30 Juni 2010

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, berkah dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul **Isolasi Lipase Ekstrak Kasar dari *Pseudomonas fluorescens* sebagai Biokatalisator dalam Studi Pendahuluan Reaksi Esterifikasi antara Asam Lemak Minyak Kelapa dengan Sukrosa** ini tepat pada waktunya. Tugas akhir ini disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan akademis dalam meraih gelar Sarjana Sains di Program Studi S1 Kimia, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Dalam penyusunan tugas akhir ini, penulis banyak mendapatkan bantuan selama penelitian maupun dalam penyusunan tugas akhir serta bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Sumi Hudiyo, PWS dan Ibu Dra. Sri Handayani M.Biomed, selaku dosen pembimbing, yang telah membimbing dan memberi pengarahan dalam penyusunan tugas akhir ini. Terima kasih atas segala bantuan serta diskusinya.
2. Bapak Dr. Ridla Bakri, selaku Ketua Departemen Kimia, Universitas Indonesia.
3. Ibu Heni yang telah bersedia menyediakan kultur bakteri kepada penulis.
4. Ibundaku tercinta atas motivasi, perhatian, kasih sayang, doa yang tak pernah putus, dan dukungan baik moril dan materil yang menjadi semangat bagi penulis sehingga dapat menyelesaikan tugas akhir ini.
5. Rio Nogo Akbar yang selalu memberikan perhatian, dorongan, semangat serta kasih sayang yang tulus selama ini dan selama-lamanya.
6. Ibu Ir. Maria Honggowati, M.Sc. atas perhatian dan semangat yang telah diberikan selama ini, ”maaf selalu merepotkan”.
7. Britsanti Dewi Hernawati sebagai teman satu perjuangan yang menanggung beban pikiran yang sama. ”maaf merepotkanmu”

8. Tia Erfianti yang telah menemani penulis ke Perpustakaan Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
9. Wiwit Purwanti dan Novi Fauziati yang selalu menemani penulis selama empat tahun terakhir ”terima kasih sudah mau menjadi tempat curahan hati”.
10. Nadya Meilina, Nadiroh dan Narita yang selama empat tahun terakhir ini selalu pulang naik kereta bersama-sama.
11. Teman-teman angkatan 2006 yang selama empat tahun terakhir ini telah mewarnai hidup. ”tanpa kalian kimia terasa hampa”
12. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu yang telah membantu dalam penelitian dan penyusunan tugas akhir ini.

Dalam penulisan tugas akhir ini, disadari masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, sangat diharapkan saran dan kritik yang membangun demi kesempurnaan penulisan di masa yang akan datang. Akhir kata penulis berharap semoga tugas akhir ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu.

Penulis

2010

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

---

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

Nama : Nanik Sugiharni  
NPM : 0606069161  
Program Studi : S1 Kimia  
Departemen : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
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 :

Isolasi Lipase Ekstrak Kasar dari *Pseudomonas fluorescens* sebagai Biokatalisator dalam Studi Pendahuluan Reaksi Esterifikasi antara Asam Lemak Minyak Kelapa dengan Sukrosa

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 30 Juni 2010

Yang menyatakan

( Nanik Sugiharni )

## ABSTRAK

Nama : Nanik Sugiharni  
Program Studi : Kimia  
Judul : Isolasi Lipase Ekstrak Kasar dari *Pseudomonas fluorescens* sebagai Biokatalisator dalam Studi Pendahuluan Reaksi Esterifikasi antara Asam Lemak Minyak Kelapa dengan Sukrosa

Aplikasi lipase telah digunakan secara luas sebagai katalis pada bidang bioteknologi. Akan tetapi harga enzim lipase murni sangat mahal. Untuk menekan tingginya biaya tersebut, maka lipase bisa didapatkan dari mikroba lokal yang secara spesifik mampu mensekresikan enzim tersebut. Penelitian sebelumnya, menunjukkan bahwa produksi lipase dapat diperoleh dari *Pseudomonas fluorescens* dalam media *Nutrient Broth*, dengan nilai aktivitas tertinggi, yaitu sebesar 0,092 U/mL pada waktu fermentasi 30 jam. Tujuan penelitian kali ini adalah mengisolasi enzim lipase ekstrak kasar dari *P. fluorescens* dan untuk mengetahui efektivitas reaksi esterifikasi enzimatik antara asam lemak minyak kelapa dan sukrosa. Isolasi enzim lipase ekstrak kasar dari *P. fluorescens* dilakukan dengan metode sentrifugasi dimana cairan supernatannya diambil sebagai *crude extract* (enzim kasar) lipase. Aktivitas lipolitik enzim lipase ekstrak kasar yang terbesar diperoleh pada waktu fermentasi 48 jam yaitu sebesar 7,58 (U/mL). Kondisi optimum aktivitas lipolitik enzim lipase ekstrak kasar pada waktu fermentasi 48 jam, terjadi pada suhu 30°C dan pH 7. Kondisi reaksi esterifikasi enzimatik antara asam lemak minyak kelapa dan sukrosa untuk menghasilkan ester sukrosa, dilakukan pada suhu 30°C dan pH 7. Namun, hingga reaksi esterifikasi pada hari keempat, produk ester asam lemak sukrosa belum terbentuk. Tidak terbentuknya produk ester asam lemak sukrosa ini mungkin disebabkan oleh rendahnya aktivitas lipase yang digunakan serta penggunaan n-heksana dalam medium reaksi esterifikasi tersebut.

Kata kunci:

Isolasi enzim lipase, *Pseudomonas fluorescens*, sukrosa, minyak kelapa, ester sukrosa

xii+64 halaman : 35 gambar; 5 lampiran; 10 tabel

Daftar Pustaka : 33 (1958-2010)



## ABSTRACT

Name : Nanik Sugiharni  
Study Program : Chemistry  
Title : Isolation of lipase crude extract from *Pseudomonas fluorescens* as biocatalyst in Preliminary Studies of Enzymatic Esterification Reaction between Coconut Oil Fatty Acid with Sucrose

Application of lipase has been used widely in field of biotechnology, however, the price of pure lipase is very expensive. To reduce the high cost, the lipase can be obtained from the local microbes that are specifically able to secrete the enzyme. A previous study showed that lipase production can be obtained from *Pseudomonas fluorescens* in nutrient Broth medium, with the highest activity value, amounting to 0.092 U / mL in 30 hours of fermentation. The purpose of this research is to isolate the crude extract of lipase from *P. fluorescens* and to examine the effectiveness of the enzymatic esterification reaction between fatty acids of coconut oil and sucrose. Isolation of crude extract lipase from *Pseudomonas fluorescens* was done by centrifugation method which its supernatant as lipase crude extract (crude enzyme). Lipase lipolytic activity of the largest crude extract obtained at 48 hours of fermentation is equal to 7.58 (U / mL). Optimum conditions of lipase lipolytic activity of crude extract in 48 hours of fermentation, occurred at 30°C and pH 7. The condition between the enzymatic esterification of fatty acids from coconut oil and sugar to produce sucrose esters, carried out at 30°C and pH 7. However, up to the fourth day of esterification reaction, sucrose fatty acid ester product has not been formed. This may be caused by the low activity of lipase used and the use of n-hexane as an organic solvent in the esterification medium.

Keywords:

Isolation of lipase, *Pseudomonas fluorescens*, sucrose, coconut oil, sucrose esters

## DAFTAR ISI

	<b>HALAMAN</b>
LEMBAR JUDUL	
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	v
ABSTRAK .....	vi
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	2
1.3 Hipotesis .....	2
1.3 Tujuan Penelitian .....	2
1.4 Batasan Masalah.....	3
1.5 Sistematika Penulisan .....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Tanaman Kelapa.....	5
2.2 Minyak Kelapa .....	7
2.2.1 Stándar Mutu Minyak Kelapa .....	9
2.2.2 Keistimewaan Minyak Kelapa .....	11
2.3 Enzim .....	13
2.3.1 Klasifikasi Enzim .....	14
2.3.2 Kerja Enzim .....	15
2.4 Enzim Lipase.....	17
2.4.1 Keberadaan Lipase .....	18
2.4.2 Penggolongan Lipase .....	20
2.4.3 Faktor yang mempengaruhi aktivitas lipase .....	20
2.4.4 Manfaat Lipase Titik Tuang.....	21
2.5 Bakteri <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	23
2.6 Sukrosa .....	24
2.7 Esterifikasi.....	24
2.8 Ester Asam Lemak Sukrosa .....	27
2.9 Produksi Enzim Lipase .....	28
<b>BAB III METODE PENELITIAN.....</b>	<b>30</b>
3.1 Alat dan Bahan .....	31
3.1.1 Alat .....	32
3.1.2 Bahan .....	32
3.2 Prosedur Penelitian.....	33
3.2.1 Pembuatan Medium .....	33
3.2.2 Persiapan Kultur .....	34
3.2.3 Penentuan Jumlah Bakteri .....	34

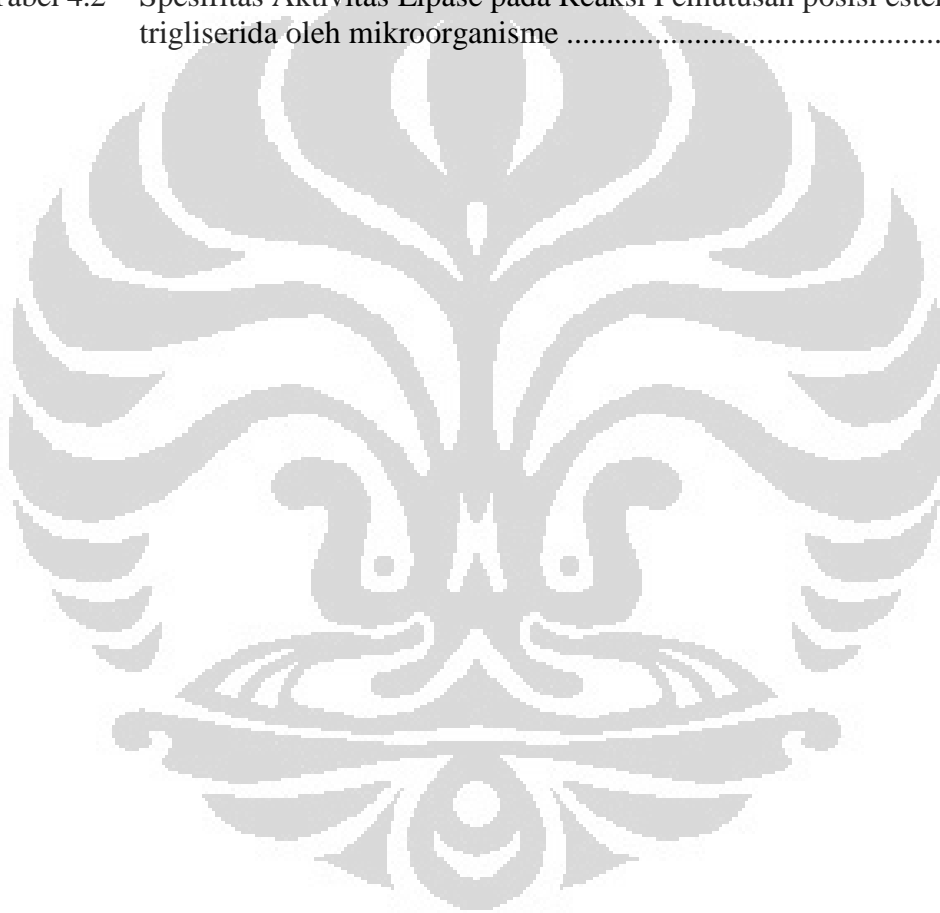
	3.2.4 Pembuatan Inokulum dan Produksi Lipase	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	35
	3.2.5 Uji Kualitatif Adanya Lipase .....	36
	3.2.6 Penentuan Aktivitas Lipolitik .....	36
	3.2.7 Penentuan Kadar Protein .....	37
	3.2.8 Penentuan Aktivitas Spesifik .....	38
	3.2.9 Karakterisasi Enzim Kasar .....	38
	3.2.10 Sintesis Ester Sukrosa (Reaksi Esterifikasi) .....	39
	3.2.11 Determinasi Reaksi Esterifikasi .....	39
	3.2.12 Pemurnian Poliester Sukrosa .....	39
	3.2.13 Uji Adanya Gugus Ester .....	39
<b>BAB IV</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>40</b>
4.1	Penentuan Jumlah Bakteri .....	40
4.2	Uji Kualitatif Adanya Lipase .....	42
4.3	Inokulum dan Produksi Enzim Lipase .....	44
4.4	Penentuan Aktivitas Lipolitik .....	47
4.4.1	Penentuan Lama Fermentasi .....	51
4.4.2	Penentuan Kondisi Optimum Aktivitas Enzim Lipase .....	52
4.4.3	Pengaruh Konsentrasi Minyak Zaitun (Substrat) terhadap Aktivitas Lipolitik Enzim Lipase Ekstrak Kasar .....	54
4.5	Penentuan Kadar Protein .....	56
4.6	Penentuan Aktivitas Spesifik .....	56
4.7	Hidrolisis Trigliserida .....	57
4.8	Sintesis Ester Sukrosa (Reaksi Esterifikasi) .....	58
4.8.1	Determinasi Reaksi Esterifikasi .....	59
4.8.2	Pemurnian Poliester Sukrosa .....	59
4.8.3	Uji Adanya Gugus Ester .....	60
<b>BAB V</b>	<b>PENUTUP</b> .....	<b>64</b>
5.1	Kesimpulan .....	64
5.2	Saran .....	64
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	.....	<b>65</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Pohon Kelapa.....	5
Gambar 2.2	Pohon Industri Kelapa .....	6
Gambar 2.3	Beberapa Struktur Asam Lemak dari Minyak Kelapa.....	12
Gambar 2.4	Struktur Enzim.....	13
Gambar 2.5	Skema Kerja Enzim .....	16
Gambar 2.6	Struktur Lipase Organisme Termofilik.....	18
Gambar 2.7	Struktur Sukrosa .....	24
Gambar 2.8	Reaksi Esterifikasi Asam Etanoat dengan Etanol .....	25
Gambar 2.9	Tahap Pertama Reaksi Esterifikasi .....	25
Gambar 2.10	Tahap Kedua Reaksi Esterifikasi .....	25
Gambar 2.11	Tahap Ketiga Reaksi Esterifikasi .....	26
Gambar 2.12	Tahap Keempat Reaksi Esterifikasi.....	26
Gambar 2.13	Tahap Terakhir Reaksi Esterifikasi .....	26
Gambar 2.14	Struktur Poliester Sukrosa atau Olestra .....	28
Gambar 3.1	Bagan Kerja Secara Umum.....	31
Gambar 4.1	Isolat Bakteri <i>Pseudomonas fluorescens</i> dibawah sinar UV .....	42
Gambar 4.2	Hasil Uji Kualitatif Adanya Enzim Lipase .....	43
Gambar 4.3	Struktur Rhodamine B .....	43
Gambar 4.4	Reaksi Umum Hidrolisis Trigliserida .....	47
Gambar 4.5	Tahapan Hidrolisis Trigliserida oleh Lipase.....	48
Gambar 4.6	Reaksi sangat cepat (a), reaksi lambat (b), dan reaksi sangat lambat (c) pada hidrolisis trigliserida .....	49
Gambar 4.7	Mekanisme Serin Hidrolase .....	49
Gambar 4.8	Inaktivasi enzim lipase.....	51
Gambar 4.9	Grafik Hubungan antara Unit Aktivitas Enzim Lipase Ekstrak Kasar terhadap Lama Fermentasi .....	51
Gambar 4.10	Grafik Hubungan Antara Unit Aktivitas Enzim Lipase Ekstrak Kasar terhadap pH .....	52
Gambar 4.11	Grafik Hubungan Antara Unit Aktivitas Enzim Lipase Ekstrak Kasar Terhadap Suhu.....	54
Gambar 4.12	Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Lipolitik Enzim Lipase .....	55
Gambar 4.13	Grafik Kadar Protein dalam Larutan Enzim Ekstrak Kasar pada Fermentasi Hari ke-2 hingga ke-4.....	56
Gambar 4.14	Grafik Aktivitas Spesifik Enzim Ekstrak Kasar pada Fermentasi Hari ke-2 hingga ke-4 .....	56
Gambar 4.15	Reaksi Hidrolisis Trigliserida Minyak Kelapa dengan Katalis Basa... ..	58
Gambar 4.16	Asam Lemak Minyak Kelapa .....	59
Gambar 4.17	Hasil Ekstraksi dengan Kloroform dan NaOH .....	60
Gambar 4.18	Pemurnian Ester Sukrosa Pencucian dengan Air.....	60
Gambar 4.19	Penambahan Metanol pada Produk .....	61
Gambar 4.20	Hasil Uji Adanya Gugus Ester.....	61

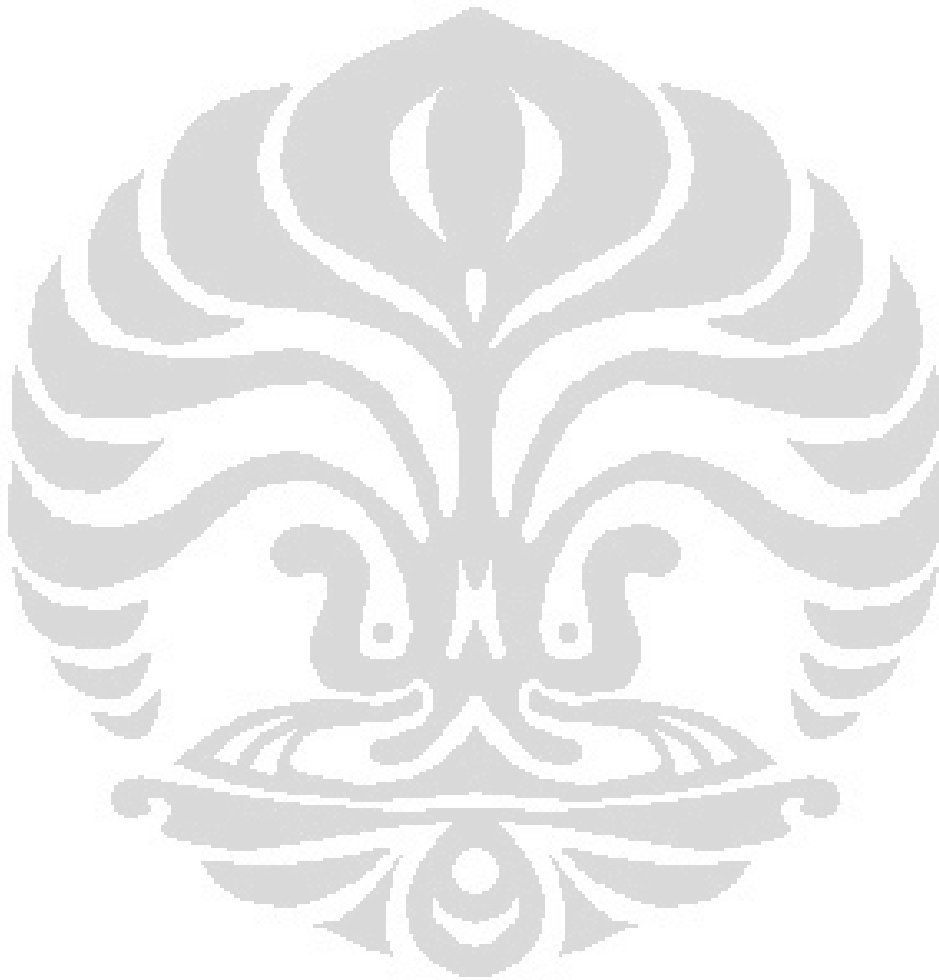
## DAFTAR TABEL

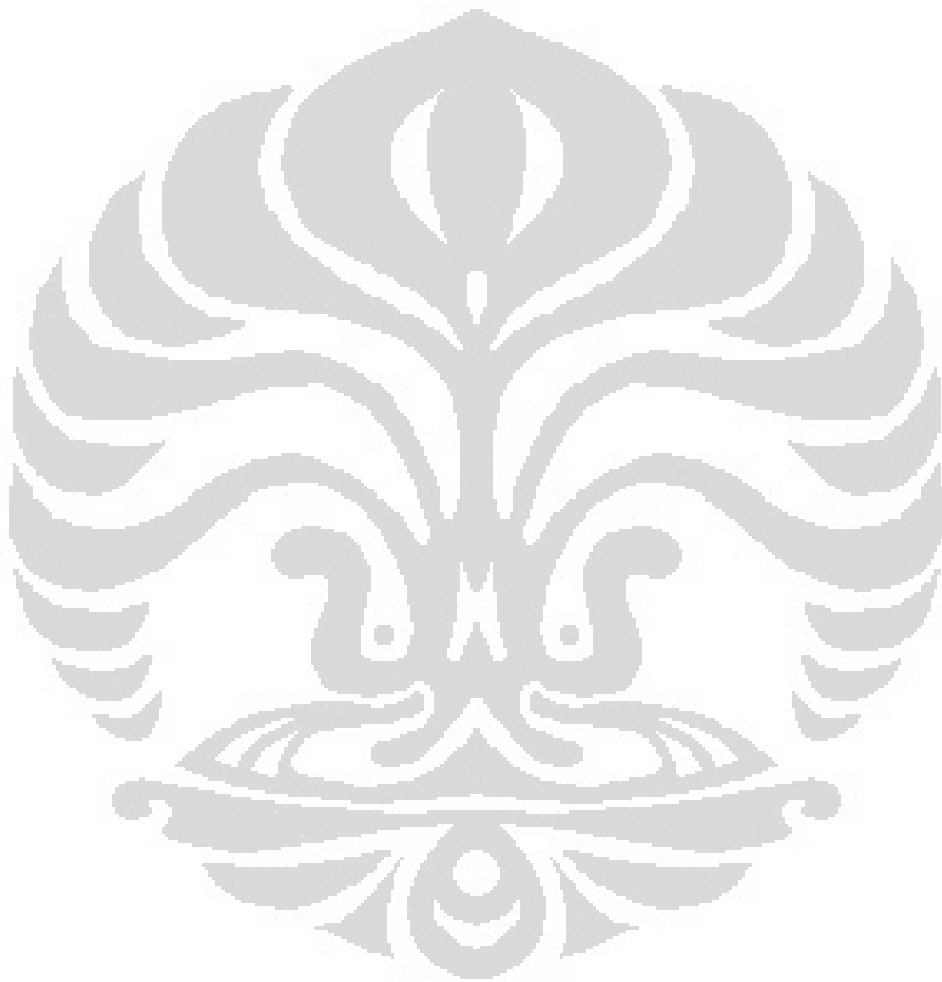
Tabel 2.1	Proyeksi Kebutuhan Minyak Goreng, Periode 1995-2000 .....	7
Tabel 2.2	Komposisi Asam Lemak dari Minyak Kelapa .....	9
Tabel 2.3	Standar Mutu Minyak Goreng Berdasarkan SNI - 3741- 1995 ....	9
Tabel 2.4	Syarat mutu minyak goreng kelapa untuk setiap kelas mutu (Grade) .....	10
Tabel 2.5	Klasifikasi Enzim .....	14
Tabel 2.6	Lipase Pada Bakteri dan Actinomycetes .....	18
Tabel 2.7	Lipase Pada Pada Khamir dan Kapang .....	19
Tabel 2.8	Manfaat Lipase di Bidang Industri .....	21
Tabel 4.1	Data Absorbansi Suspensi Sel pada berbagai Pengenceran .....	41
Tabel 4.2	Spesifitas Aktivitas Lipase pada Reaksi Pemutusan posisi ester trigliserida oleh mikroorganisme .....	55



## DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Gambar Prosedur Kerja Penentuan Jumlah Bakteri
- Lampiran 2. Foto Hasil *Total Plate Count*
- Lampiran 3. Data *Bovine Serum Albumin* Standar
- Lampiran 4. Data Aktivitas Enzim Lipase
- Lampiran 5. Data Kadar Protein dalam Larutan Enzim Lipase Ekstrak Kasar





# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Enzim adalah katalis yang memiliki keunggulan sifat (aktivitas, selektivitas, dan spesifitas tinggi) sehingga dapat membantu proses-proses kimia kompleks pada kondisi percobaan yang lunak dan lebih ramah lingkungan (Khan *et al.*, 2002). Aplikasi enzim telah digunakan secara luas di bidang pangan dan industri kimia. Enzim juga merupakan biokatalisator yang menunjang berbagai proses industri.

Salah satu enzim yang sering digunakan adalah lipase. Lipase adalah enzim yang mengkatalisis hidrolisis lemak dan minyak. Aktivitas lipase terjadi di permukaan air-lemak, yang merupakan karakteristik struktural unik dari kelas enzim ini.

Enzim lipase telah banyak dikenal memiliki cakupan aplikasi yang amat luas dalam bidang bioteknologi, seperti biomedikal, pestisida, pengolahan limbah, industri makanan (pembuatan roti, keju), biosensor, detergen, untuk industri kulit, proses pembuatan kertas dan industri oleokimia (memproduksi asam lemak dan turunannya).

Harga lipase relatif mahal, untuk menekan tingginya biaya tersebut, maka lipase bisa didapatkan dari mikroba lokal yang secara spesifik bisa menghasilkan enzim tersebut. Lipase mikroba dapat diproduksi dari bakteri, khamir, dan fungi. Bakteri yang merupakan penghasil lipase antara lain: *Bacillus substilis*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas sp.* dan *Streptomyces sp.* Khamir penghasil lipase antara lain *Candida rugosa*, *Candida deformans*, *Pichia sp.* dan *Rhodotorula pilimanae*. Sementara itu, kapang yang mampu menghasilkan lipase antara lain *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum*, *Mucor meihei*, *Neurospora sitophila*, *Penicillium citrinum* dan *Rhizopus spp.*

Lipase dari mikroba lokal bisa didapatkan dengan metode isolasi enzim menggunakan sentrifugasi (Judoamidjojo,dkk , 1989). Hasil dari sentrifugasi yang berupa supernatan (cairan) diambil sebagai *crude extract* (enzim kasar) lipase.



Metode ini cukup banyak digunakan karena prosesnya relatif mudah, murah, efektif dan efisien.

Mengingat kian maraknya penggunaan enzim lipase di bidang bioteknologi dan mahalnya lipase di pasaran, maka pada penelitian kali ini difokuskan pada isolasi enzim lipase dari mikroba lokal, yang kemudian digunakan untuk mengkatalisis reaksi esterifikasi antara asam lemak dari minyak kelapa dengan sukrosa.

Hasil reaksi esterifikasi antara asam lemak dari minyak kelapa dengan sukrosa dengan derajat substitusi tinggi (4-8) disebut poliester sukrosa. Poliester sukrosa dapat digunakan sebagai bahan tambahan makanan (*food additive*) yang mampu menggantikan lemak dalam *shortening* dan minyak makan. Poliester sukrosa memiliki sifat yang sama dengan trigliserida tetapi tidak dapat dicerna sehingga tidak akan meningkatkan kadar lemak, kolesterol maupun kalori bagi tubuh.. Poliester sukrosa dapat digunakan sebagai lemak non kalori. Dengan demikian, penambahan poliester sukrosa ini dalam makanan (misalnya sebagai pengganti minyak jagung dalam *mayonnaise*) dapat menyebabkan makanan tersebut menjadi makanan rendah kalori.

## 1.2 Perumusan Masalah

1. Kapan waktu pemanenan yang terbaik, sehingga dihasilkan enzim lipase yang memiliki unit aktivitas enzim lipase ekstrak kasar terbesar?
2. Bagaimana pengaruh variasi suhu, pH, dan konsentrasi substrat terhadap unit aktivitas enzim lipase ekstrak kasar?

## 1.3 Hipotesis

1. Enzim lipase dapat dihasilkan oleh *Pseudomonas fluorescens*.
2. Lipase hasil isolasi dapat digunakan untuk reaksi esterifikasi antara asam lemak dari minyak kelapa dan sukrosa

## 1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengisolasi enzim lipase dari bakteri *Pseudomonas fluorescens*.
2. Menentukan unit aktivitas enzim lipase.

3. Menentukan kondisi optimum aktivitas enzim lipase.
4. Mensintesis ester asam lemak sukrosa dari minyak kelapa dan sukrosa dengan katalis enzim lipase.

### 1.5 Batasan Masalah

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

1. Bahan baku yang digunakan dalam penelitian adalah minyak kelapa dan kultur bakteri *Pseudomonas fluorescens*.
2. Katalis yang digunakan adalah enzim lipase ekstrak kasar yang diisolasi dari bakteri *Pseudomonas fluorescens*.
3. Penelitian difokuskan pada isolasi enzim lipase ekstrak kasar dan reaksi esterifikasi-enzimatis antara sukrosa dan asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa untuk menghasilkan produk ester asam lemak sukrosa.
4. Penentuan unit aktivitas lipolitik enzim lipase ekstrak kasar dari bakteri *Pseudomonas fluorescens* yang dihasilkan diukur dengan metode titrasi.

### 1.6 Sistematika Penulisan

Makalah skripsi ini ditulis berdasarkan sistematika sebagai berikut:

#### BAB I PENDAHULUAN

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

#### BAB II TINJAUAN PUSTAKA

Bab ini menjelaskan berbagai informasi yang didapatkan dari berbagai pustaka mengenai tanaman kelapa, minyak kelapa, enzim, enzim lipase, bakteri *Pseudomonas fluorescens*, sukrosa, reaksi esterifikasi, Ester Asam Lemak Sukrosa, Produksi Enzim Lipase.

#### BAB III METODOLOGI PENELITIAN

Bab ini menjelaskan berbagai informasi tentang tahapan-tahapan pelaksanaan penelitian, alat dan bahan yang digunakan, analisis produk, dan pengolahan data.

#### BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Bab ini menjelaskan berbagai informasi tentang penyajian data penelitian yang diperoleh, analisis kecenderungan pada berbagai variasi variabel bebas, dan pembahasan mengenai fenomena yang terjadi dalam proses isolasi enzim lipase ekstrak kasar dan reaksi esterifikasi enzimatis.

## BAB V PENUTUP

Bab ini menjelaskan tentang kesimpulan yang dapat diambil berdasarkan percobaan yang dilakukan terkait dengan tujuan dari penelitian ini serta saran bagi penelitian selanjutnya.



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tanaman Kelapa

Tanaman kelapa (*Cocos nucifera L*) merupakan tanaman yang tumbuh optimum pada 10° LS-10° LU, dan masih tumbuh baik pada 15° LS-15° LU. Oleh karena itu, tanaman kelapa banyak dijumpai di daerah tropis seperti Philipina, India, Indonesia, Srilangka, dan Malaysia. Pohon ini dapat tumbuh dengan baik di daerah dataran rendah dengan ketinggian 0-450 m dari permukaan laut. Tanaman kelapa tumbuh dengan baik di daerah pada suhu 20-27 °C dan pada daerah dengan curah hujan antara 1300-2300 mm/tahun, bahkan sampai 3800 mm atau lebih, sepanjang tanah mempunyai drainase yang baik. Derajat keasaman (pH) tanah yang terbaik untuk pertumbuhan tanaman kelapa adalah 6,5-7,5, namun demikian masih dapat tumbuh pada tanah dengan pH 5-8 (Sarmidi, 2009).



Gambar 2.1 Pohon Kelapa  
Sumber : [www.plantamor.com](http://www.plantamor.com)

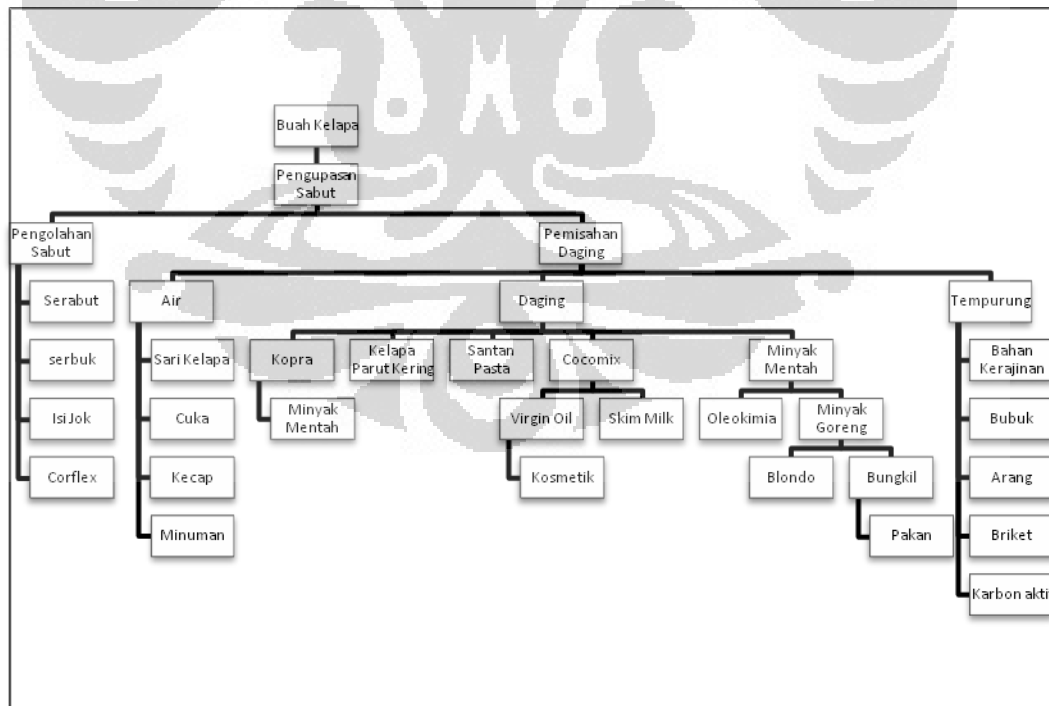
Kelapa dapat dibedakan menjadi tiga varietas, yakni :

1. Kelapa dalam dengan varietas *viridis* (kelapa hijau), *rubescens* (kelapa merah), *macrocorpu* (kelapa kelabu), *sakarina* (kelapa manis).
2. Kelapa genjah dengan varietas *eburnea* (kelapa gading), *regia* (kelapa raja), *pumila* (kelapa puyuh), *pretiosa* (kelapa raja malabar)
3. Kelapa hibrida

Kelapa disebut sebagai pohon kehidupan, karena hampir seluruh bagian pohon kelapa (mulai dari akar, batang, daun sampai buahnya) dapat dimanfaatkan untuk kebutuhan kehidupan manusia sehari-hari.

Berikut macam industri pengolahan kelapa :

1. Industri kopra
2. Industri minyak kelapa
3. Industri oleokimia. Saat ini Indonesia memiliki 6 buah perusahaan oleokimia dengan kapasitas terpasang dari masing-masing: produk asam lemak (*fatty acid*), gliserin, *fatty alcohol*, dan *methyl ester* berturut-turut 347.000 ton/tahun, 50.900 ton/tahun, 90.000 ton/tahun dan 10.000 ton/tahun (Rahman, 1999).
4. Industri kelapa parut
5. Industri gula kelapa
6. Industri pengolahan produk ikutan : bungkil, tempurung, serabut, serbuk sabut kelapa, dan sari kelapa (*nata de coco*).



Gambar 2.2 Pohon Industri Kelapa  
Sumber : Sarmidi Amin, 2009

## 2.2 Minyak Kelapa

Minyak kelapa merupakan minyak yang diperoleh dari kopra (daging buah kelapa yang dikeringkan) atau dari perasan santannya. Kandungan minyak pada daging buah kelapa tua diperkirakan mencapai 30%-35%, atau kandungan minyak dalam kopra mencapai 63-72%. Minyak kelapa sebagaimana minyak nabati lainnya merupakan senyawa trigliserida yang tersusun atas berbagai asam lemak dan 92% diantaranya merupakan asam lemak jenuh. Selain itu minyak kelapa yang belum dimurnikan juga mengandung sejumlah kecil komponen bukan lemak seperti fosfatida, gum, sterol (0,06-0,08%), tokoferol (0,003%), dan asam lemak bebas (< 5%) serta sedikit protein dan karoten. Sterol berfungsi sebagai *stabilizer* dalam minyak dan tokoferol sebagai antioksidan (Ketaren, 1986).

Kebutuhan minyak kelapa di dalam negeri maupun untuk ekspor terus meningkat dari tahun ke tahun. Pada tahun 1995 kebutuhan kelapa untuk rumah tangga sekitar 2.064.000 kg dan meningkat menjadi sekitar 2.771.000 kg pada tahun 2000. Ekspor produk kelapa juga cenderung meningkat dari tahun ke tahun.

Tabel 2.1 Proyeksi Kebutuhan Minyak Goreng, Periode 1995-2000

No	Tahun	Jumlah penduduk pertumbuhan rata-rata 1,5%	Kebutuhan minyak goreng per kapita per kg	Kebutuhan rumah tangga (juta kg)
1	1995	195,28	10,57	2.064
2	1996	198,34	11,05	2.192
3	1997	201,39	11,55	2.326
4	1998	204,42	12,06	2.465
5	1999	207,44	12,60	2.624
6	2000	210,44	13,17	2.771

Sumber : Rahman (1999)

Di pasaran, beredar tiga macam bentuk minyak kelapa, yakni :

1. *RBD-Coconut Oil* (minyak kelapa RBD) yaitu minyak yang diproses di pabrik dengan diberi bahan kimia untuk memurnikan (*Refined=R*), memutihkan (*Bleaching=B*) dan menghilangkan aroma yang kurang sedap (*Deodorized=D*). Bahan bakunya adalah kelapa kopra. Kopra biasanya tercemar oleh debu, kotoran, jamur, kuman, dsb. Maka harus diproses agar minyak yang diperoleh menjadi bersih, nampak bening, putih dan tidak bau. Minyak kelapa bentuk ini banyak dijual di pasar-pasar dan super market.
2. *Traditional Coconut Oil* (minyak kelapa tradisional), yakni buah kelapa segar dihamcurkan atau diparut, lalu diperas untuk diambil santannya. Santan ini kemudian dimasak dengan api kecil sampai minyaknya keluar. Kemudian minyak ini disaring dan dipisahkan dari ampas (*belondo*)-nya. Minyak yang dihasilkan mempunyai aroma yang harum. Belondonya mempunyai rasa gurih dan enak sekali serta dapat dipakai sebagai lauk-pauk. Minyak demikian masih dapat dibeli di desa-desa yang menghasilkan banyak buah kelapa.
3. *Virgin Coconut Oil (VCO)* /Minyak Kelapa murni, minyak ini dihasilkan dengan cara memeras buah kelapa segar untuk mendapatkan minyak tanpa dimasak. Minyak ini juga disebut *Cold Expelled Coconut Oil*, (*CECNO*) atau minyak kelapa ekstrak dingin karena dalam proses pembuatan VCO tidak dilakukan pemanasan seperti pada pembuatan minyak kelapa tradisional. Keuntungan dengan proses ini, minyak yang diperoleh bisa tahan sampai 2 tahun tanpa menjadi tengik (*rancid*) dan keberadaan vitamin E dan enzim-enzim yang terkandung dalam buah kelapa pun terjamin.

Minyak kelapa penting bagi metabolisme tubuh karena mengandung vitamin-vitamin yang larut dalam lemak, yaitu vitamin A, D, E, dan K serta provitamin A (karoten). Selain itu, minyak kelapa mengandung sejumlah asam lemak jenuh dan asam lemak tak jenuh.

Jenis asam lemak yang terkandung dalam minyak kelapa adalah golongan asam lemak rantai karbon sedang (*medium chain fatty acids=MCFA*), yang terdiri atas 12 atom karbon yang diikat jenuh (tidak ada ikatan ganda).

Tabel 2.2 Komposisi Asam Lemak dari Minyak Kelapa

No	Asam Lemak	Rumus Molekul	Minyak Kelapa (%)
1	Asam laurat	$C_{12}H_{24}O_2$	43-51
2	Asam miristat	$C_{14}H_{28}O_2$	16-21
3	Asam palmitat	$C_{16}H_{32}O_2$	7,5-10
4	Asam kaprilat	$C_8H_{16}O_2$	5-10
5	Asam kaprat	$C_{10}H_{20}O_2$	4,5-8
6	Asam kaproat	$C_6H_{12}O_2$	0,4-0,6
7	Asam stearat	$C_{18}H_{36}O_2$	2-4
8	Asam oleat	$C_{18}H_{34}O_2$	5-10
9	Asam linoleat	$C_{18}H_{32}O_2$	1-2,5
10	Asam palmitoleat	$C_{16}H_{30}O_2$	1,3

Sumber : Sarmidi, 2009

Seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2.2, bahwa minyak kelapa memiliki asam lemak jenuh sekitar 92% mulai dari  $C_6$  (kaproat) sampai  $C_{18}$  (stearat). Hanya sekitar 8% berupa asam lemak tidak jenuh (2% asam lemak tidak jenuh ganda dan 6% asam lemak tidak jenuh tunggal) seperti oleat, linoleat, dan palmitoleat.

### 2.2.1 Standar Mutu Minyak Kelapa

Tabel berikut merupakan standar untuk minyak goreng yang digunakan secara nasional.

Tabel 2.3 Standar Mutu Minyak Goreng Berdasarkan SNI - 3741- 1995

No	Kriteria	Persyaratan
1	Bau dan rasa	Normal
2	Warna	Muda jernih
3	Kadar air	Max 0,3%
4	Berat jenis	0,900 g/L
5	Asam lemak bebas	Max 0,3%
6	Bilangan peroksida	Max 2 Meg/kg
7	Bilangan iod	45-46
8	Bilangan penyabunan	196-206
9	Indeks bias	1,448-1,450
10	Cemaran logam	Max 0,1 mg/kg
		Kecuali seng



Selain SNI ada juga penggolongan kelas mutu minyak kelapa berdasarkan rekomendasi APCC (2006), yaitu:

*Grade I* = *Refined and deodorized oil* (minyak yang sudah dimurnikan dan dihilangkan bau)

*Grade II* = *Refined oil* (minyak yang sudah dimurnikan)

*Grade III* = *White oil obtained by wet processing* (minyak tidak berwarna /bening) yang diperoleh dari pengolahan cara basah)

*Grade IV* = *Industrial oil No 1-obtained by the process of extraction* (minyak Industri No 1- diperoleh dengan cara ekstraksi)

*Grade V* = *Industrial oil No 2-obtained by the process of solvent extraction* (minyak Industri No 1- diperoleh dengan cara ekstraksi menggunakan pelarut)

Syarat Mutu dari setiap kelas mutu (*grade*) tersebut di atas dapat dilihat pada Tabel 2.4 berikut ini.

Tabel 2.4 Syarat mutu minyak goreng kelapa untuk setiap kelas mutu (Grade)

No	Karakteristik Syarat Mutu	Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV	Grade v
1	Asam lemak bebas (sebagai asam laurat, % max)	0,10	0,10	1	6	10
2	Kadar air dan kotoran tak larut (% ,max)	0,10	0,10	0,25	0,5	0,5
3	Bahan yang tidak tersabunkan (% , max)	0,5	0,5	0,5	0,8	1
4	Warna pada 1 inchi sell, pada skala Y+5R, (tidak lebih dari)	2	2	4	11	30
5	Nilai penyabunan	255	255	255	248	248
6	Bilangan iod	7,5-9,5	7,5-9,5	7,5-9,5	7-11	7-11
7	Specific gravity pada 30 °C	0,915-0,920	0,915-0,920	0,915-0,920	0,915-0,920	0,915-0,910
8	Indeks refraktif pada suhu 40 °C	1,4480-1,4490	1,4480-1,4490	1,4480-1,4490	1,4480-1,4490	1,4480-1,4490
9	Kandungan mineral asam	nihil	nihil	nihil	nihil	nihil

Sumber : APCC, 2006

### 2.2.2 Keistimewaan Minyak Kelapa

Adanya asam lemak rantai sedang (*medium chain fatty acids*) yang relatif tinggi membuat minyak kelapa memiliki sifat-sifat istimewa. Asam lemak rantai sedang memiliki keunggulan bila dibandingkan dengan asam lemak rantai panjang, yaitu asam lemak rantai sedang lebih mudah dicerna dan diserap. Saat dikonsumsi, asam lemak rantai sedang dapat langsung dicerna di dalam usus tanpa proses hidrolisis dan enzimatis, sehingga asam lemak tersebut langsung masuk ke aliran darah dan diangkut ke hati untuk dimetabolisme guna memproduksi energi dan untuk meningkatkan fungsi semua kelenjar endokrin, organ dan jaringan tubuh.

Sementara itu, minyak yang memiliki asam lemak rantai panjang harus diproses dahulu di pencernaan sebelum diserap oleh dinding usus melalui beberapa proses panjang untuk sampai ke hati. Keunggulan lain dari asam lemak rantai sedang, yaitu di dalam tubuh tidak diubah menjadi lemak atau kolestrol serta tidak mempengaruhi kolesterol darah dan tidak menumpuk di pembuluh darah ([www.smallcrab.com](http://www.smallcrab.com)).

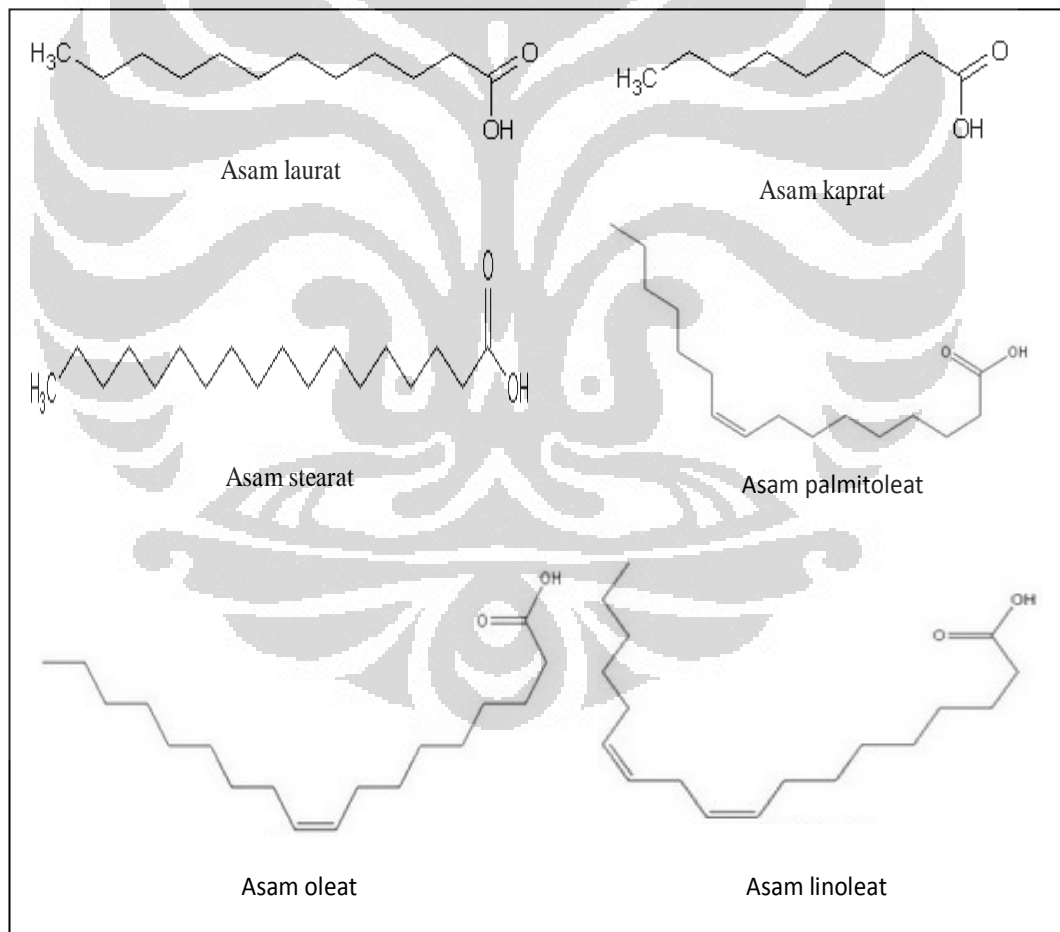
Minyak kelapa mempunyai kemampuan yang spesifik sebagai antivirus, antifungi, antiprotozoa, dan antibakteri. Trigliserida minyak kelapa di dalam tubuh dipecah menjadi digliserida, monogliserida dan asam lemak bebas. Monogliserida dan asam lemak bebas inilah yang mempunyai sifat antimikroba. Asam lemak bebas yang paling aktif adalah asam laurat dan asam kaprat dengan monogliseridanya. Asam laurat dan asam kaprat mampu menembus lipid luar virus, sehingga bersifat antivirus. Kedua asam tersebut dikembangkan menjadi bahan untuk melawan HIV serta Hepatitis B dan C.

Perlu diketahui, bahwa minyak kelapa adalah satu-satunya minyak goreng di muka bumi yang mengandung asam laurat (*lauric acid*) dengan kadar yang paling tinggi setara seperti pada air susu ibu (kurang lebih 50%). Kandungan asam laurat ini sangat bermanfaat bagi kesehatan, karena dalam tubuh manusia dan hewan, asam laurat diubah menjadi monolaurin. Monolaurin merupakan suatu senyawa monogliserida yang bersifat antivirus, antibakteri dan antiprotozoa. Dengan sifat tersebut monolaurin dapat menanggulangi serangan virus-virus

seperti HIV, herpes simplek virus-1 (HSV-1), vesicular stomatis virus (VSV), visna virus, cytomegalovirus (CMV), influenza, dll (Sarmidi, 2009).

Minyak kelapa juga bermanfaat untuk mengontrol berat badan atau obesitas. Obesitas, penyakit jantung dan osteoporosis adalah keadaan-keadaan yang diakibatkan oleh rendahnya tingkat metabolisme tubuh (Sumber : [www.gizi.net](http://www.gizi.net)).

Selain asam laurat (dengan 12 atom C), MCFA juga mengandung asam kaprat (dengan 10 atom C) walaupun kandungan hanya 6%, yang bermanfaat bagi kesehatan. Di dalam tubuh kita, asam kaprat ini dirubah menjadi *monocapri* yang bermanfaat untuk mengatasi penyakit-penyakit seksual seperti virus HSV-2 dan HIV-1 juga bakteri *Neisseria gonorrhoeae* (Sarmidi, 2009).

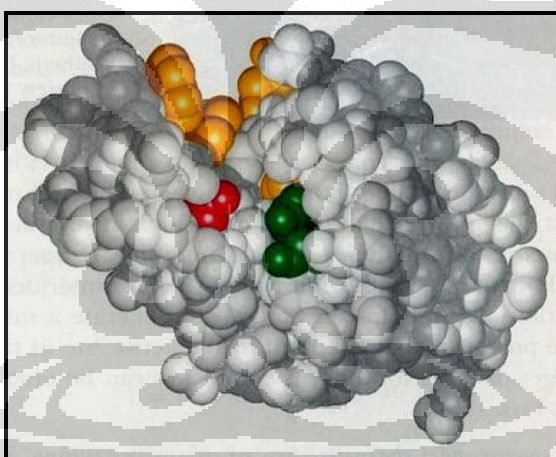


Gambar 2.3 Beberapa struktur asam lemak dari minyak kelapa

Sumber : [www.bio-asli.com](http://www.bio-asli.com)

### 2.3 Enzim

Enzim adalah biomolekul yang berfungsi sebagai senyawa yang mempercepat proses reaksi (katalis) tanpa habis bereaksi dalam suatu reaksi kimia. Hampir semua enzim merupakan protein. Pada reaksi yang dikatalisis oleh enzim, molekul awal reaksi disebut sebagai substrat, dan enzim mengubah substrat tersebut menjadi molekul-molekul yang berbeda, yang disebut produk. Enzim bekerja dengan cara menempel pada permukaan molekul zat-zat yang bereaksi dan mempercepat proses reaksi. Percepatan terjadi karena enzim menurunkan energi pengaktifan yang dengan sendirinya akan mempermudah terjadinya reaksi. Sebagian besar enzim bekerja secara spesifik, yang artinya setiap jenis enzim hanya dapat bekerja pada satu macam senyawa atau reaksi kimia. Hal ini disebabkan perbedaan struktur kimia tiap enzim yang bersifat tetap. Dalam reaksi, enzim tidak ikut bereaksi sehingga struktur enzim sebelum dan sesudah reaksi tidak berubah.



Gambar 2.4 Struktur Enzim

Sumber : [www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com)

Berdasarkan strukturnya, enzim terdiri atas komponen yang disebut apoenzim (berupa protein) dan komponen lain yang disebut gugus prostetik (berupa nonprotein). Gugus prostetik dibedakan menjadi koenzim dan kofaktor. Koenzim berupa gugus organik yang dibutuhkan enzim untuk melakukan fungsinya. Gugus organik pada koenzim pada umumnya merupakan vitamin, seperti vitamin B1, B2,  $\text{NAD}^+$  (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*). Koenzim berfungsi sebagai pembawa sementara dari gugus fungsional yang berperan dalam

**Universitas Indonesia**

reaksi enzimatik. Kofaktor berupa gugus anorganik yang biasanya berupa ion-ion logam, seperti  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , dan  $\text{Fe}^{2+}$ . Jadi, enzim yang utuh tersusun atas bagian protein yang aktif, disebut apoenzim dan koenzim, yang bersatu dan kemudian disebut holoenzim.

Sebagai katalis dalam reaksi-reaksi di dalam tubuh organisme, enzim memiliki beberapa sifat, yaitu:

1. Enzim bekerja secara spesifik.
2. Enzim berfungsi sebagai katalis, yaitu mempercepat terjadinya reaksi kimia tanpa mengubah kesetimbangan reaksi.
3. Enzim hanya diperlukan dalam jumlah sedikit.
4. Enzim dapat bekerja secara bolak-balik.
5. Kerja enzim dipengaruhi oleh lingkungan, seperti oleh suhu, pH, konsentrasi substrat, dan lain-lain.

### 2.3.1 Klasifikasi Enzim

Tatanama enzim berhubungan dengan jenis reaksi yang dikatalisis. Berdasarkan tipe reaksi yang dikatalisis, enzim dibagi menjadi 6 kelas enzim. Berikut enam kelas utama pembagian enzim.

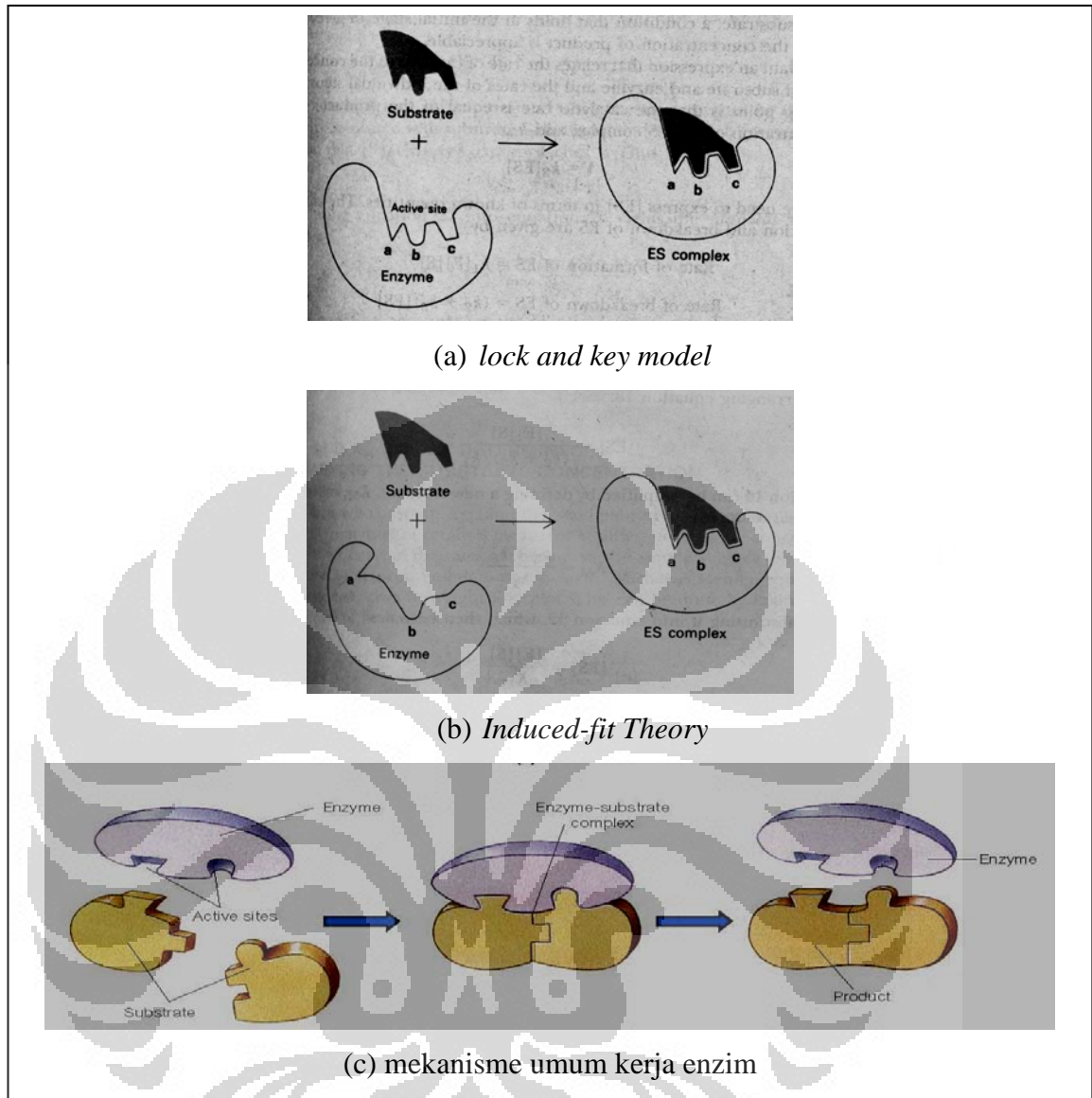
Tabel 2.5 Klasifikasi Enzim

Kelas Enzim	Tipe Reaksi
Oksidoreduktase	Reaksi redoks (transfer elektron atau proton)
Transferase	Transfer atom atau gugus dari satu substrat ke lainnya (di luar reaksi kelas lainnya)
Hidrolase	Reaksi hidrolisis
Liase	Penambahan gugus fungsi pada ikatan rangkap (adisi) atau pemutusan ikatan rangka pelepasan gugus fungsi
Isomerase	Reaksi isomerisasi
Ligase	Pembentukan ikatan C-C, C-S, C-O, dan C-N yang disertai dengan pemutusan isofosfat ATP

Universitas Indonesia

### 2.3.2 Kerja Enzim

Enzim terkenal akan selektivitasnya yang tinggi, bagaimana selektivitas itu didapat masih menjadi perdebatan. Akan tetapi ada beberapa hipotesis yang dapat menjelaskan tentang selektivitas enzim tersebut. Pada tahun 1894 seorang ilmuwan Jerman bernama Emil Fischer mengemukakan model *the lock and key*. Menurut model ini, terjadinya reaksi antara substrat dengan enzim karena adanya kesesuaian bentuk geometrik spesifik antara substrat dengan situs aktif (*active site*) dari enzim, sehingga sisi aktif enzim cenderung kaku. Substrat berperan sebagai kunci masuk ke dalam situs aktif, yang berperan sebagai gembok, sehingga terjadi kompleks enzim-substrat. Pada saat ikatan kompleks enzim-substrat terputus, produk hasil reaksi akan dilepas dan enzim akan kembali pada konfigurasi semula. Akan tetapi model ini tak dapat menjelaskan stabilisasi pada keadaan transisi yang enzim dapatkan. Pada tahun 1958, Koshland menyempurnakan model yang dibuat oleh Fischer. Dalam teorinya (yaitu kecocokan induksi atau *Induced-fit Theory*) dijelaskan, bahwa karena enzim memiliki struktur yang fleksibel, maka gugus aktifnya akan terus-menerus berubah akibat adanya interaksi antara enzim dengan substrat. Dan hasilnya substrat tersebut tidak secara langsung terikat dalam gugus aktif enzim, rantai samping asam amino membuat gugus aktif bergabung dengan posisi substrat yang dapat membuat enzim melakukan fungsinya sebagai katalis. Gugus aktif dari enzim akan terus berubah sampai substrat terikat sempurna.



Gambar 2.5 Skema Kerja Enzim

Sumber: Tri Rini Nuringtyas

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi kerja enzim diantaranya adalah sebagai berikut.

1. Suhu

Enzim tidak dapat bekerja secara optimal apabila suhu lingkungan terlalu rendah atau terlalu tinggi. Suhu optimal enzim bagi masing-masing organisme berbeda-beda.

2. pH (Tingkat Keasaman)

Setiap enzim mempunyai pH optimal masing-masing, sesuai dengan tempat kerjanya.

### 3. Aktivator dan Inhibitor

Aktivator adalah zat yang dapat mengaktifkan dan menggiatkan kerja enzim. Inhibitor adalah zat yang dapat menghambat kerja enzim. Berdasarkan cara kerjanya, inhibitor terbagi tiga, inhibitor kompetitif, inhibitor unkompetitif dan inhibitor nonkompetitif. Inhibitor kompetitif adalah inhibitor yang bersaing aktif dengan substrat untuk mendapatkan situs aktif enzim, contohnya sianida bersaing dengan oksigen dalam pengikatan Hb. Sementara itu, inhibitor nonkompetitif adalah inhibitor yang melekat pada sisi lain selain situs aktif pada enzim, yang lama kelamaan dapat mengubah sisi aktif enzim. Inhibitor unkompetitif adalah yang terikat pada sisi aktif yang berbeda dan terikat pada kompleks ES membentuk kompleks terner ESI.

### 4. Konsentrasi enzim dan substrat

Semakin tinggi konsentrasi enzim akan mempercepat terjadinya reaksi. Konsentrasi enzim berbanding lurus dengan kecepatan reaksi. Jika sudah mencapai titik jenuhnya, maka konsentrasi substrat berbanding terbalik dengan kecepatan reaksi.

Dewasa ini, enzim adalah senyawa yang umum digunakan dalam industri. Enzim yang digunakan pada umumnya berasal dari enzim yang diisolasi dari bakteri. Penggunaan enzim dalam proses produksi dapat meningkatkan efisiensi yang kemudian akan meningkatkan jumlah produksi.

## 2.4 Enzim Lipase

Lipase (EC 3.1.1.3; triasil gliserol hidrolase) merupakan enzim yang mampu menghidrolisis triasilgliserol pada antar muka (*interface*) minyak-air untuk menghasilkan asam lemak dan gliserol. Karena adanya perbedaan kepolaran antara enzim (hidrofilik) dan substrat (lipofilik), maka reaksi yang dikatalisis lipase terjadi pada antar muka (*interface*) fasa air dan fasa minyak (Reis, *et al.* 2008). 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 dicirikan sebagai senyawa *triad*, yang terdiri dari serin, histidin, dan aspartat (glutamat). Kompleks enzim ini menjadi perantara penting dalam mengkatalisis reaksi lipase.



Gambar 2.6 Lipase Organisme Termofilik

Sumber: [www.biology.ed.ac.uk](http://www.biology.ed.ac.uk)

Lipase mampu mengkatalisis berbagai reaksi diantaranya reaksi hidrolisis, inter-esterifikasi, alkoholisis, asidosis, esterifikasi, dan aminolisis (Joseph, *et al.* 2008). Dalam kondisi terdapat pelarut organik dan kandungan air yang sedikit lipase cenderung bekerja dalam reaksi interesterifikasi dan transesterifikasi daripada reaksi hidrolisis. Lipase juga memiliki aktivitas lipolitik dan esterolitik.

#### 2.4.1 Keberadaan Lipase

Enzim lipase dapat dihasilkan dari sejumlah mikroorganisme (bakteri, kapang, khamir), hewan dan tumbuhan. Produksi enzim dari hewan dan tumbuhan memiliki kelemahan, sehingga industri umumnya menggunakan pembiakan mikroorganisme. Pada mikroorganisme, enzim lipase dapat ditemukan sebagai enzim ekstraselular ataupun enzim intraselular. Pada Tabel 2.5 dipaparkan tentang keberadaan lipase pada bakteri dan actinomycetes, sedangkan pada Tabel 2.6 dipaparkan tentang keberadaan lipase pada ragi dan kapang.

Tabel 2.6 Lipase Pada Bakteri dan Actinomycetes

<i>Achromobacter lipolyticum</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i> ,	<i>Escherichia coli</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i> MCC-2	<i>Flavobacterium odoratum</i>

Lanjutan Tabel 2.6

<i>Anerovibrio lipolytica</i>	<i>Lactococcus helveticus</i>
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	<i>Leuconostoc citrovorum</i>
<i>B. alcalophilus</i>	<i>Mycobacterium rubrum</i>
<i>Bacillus stearothermophilus SB-1</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>B. atrophaeus SB-2</i>	<i>P. alcaligenes,</i>
<i>B. licheniformis SB-3</i>	<i>P. fluorescens,</i>
<i>B. circulans,</i>	<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Serratia liquefaciens,</i>
<i>Brevibacterium linens</i>	<i>Streptococcus cremoris,</i>
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Staphylococcus aureus,</i>
<i>B. glumae,</i>	<i>S. epidermidis,</i>
<i>B.pseudomallei</i>	<i>S. haemolyticus</i>
<i>B. pumilus,</i>	<i>Selenomonas lipolytica</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
<i>Chromobacterium viscosum</i>	<i>Thermus sp.</i>

Sumber: Kulkarni, 2002

Tabel 2.7 Lipase Pada Pada Khamir dan Kapang

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

Sumber: Kulkarni, 2002

Menurut Olivia *et al* (1998) kelas kapang merupakan penghasil lipase yang baik.

#### 2.4.2 Penggolongan lipase

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

- Lipase yang menghidrolisis TAG secara acak terhadap posisi asam lemak pada trigliserida menjadi asam lemak. Anggota dari kelompok ini antara lain: Lipase yang dihasilkan oleh *C. Rugosa*, *C. viscosum* dan *Pseudomonas sp.*
- Lipase yang menghidrolisis spesifik pada posisi 1 dan 3 dari trigliserida. Produk yang dihasilkan berupa asam lemak bebas, 1,2-diasilgliserol, dan 2-monogliserol. Contohnya: Lipase yang dihasilkan oleh *A. niger* dan *R. meiheii*.
- Lipase yang menghidrolisis secara spesifik asam lemak tertentu dari triasilgliserol. Contohnya yaitu Lipase yang dihasilkan oleh *G. candidum*.

#### 2.4.3 Faktor yang mempengaruhi aktivitas lipase

Aktivitas enzim merupakan besarnya kemampuan enzim dalam mempercepat reaksi penguraian sumber karbon. Aktivitas enzim dinyatakan dalam unit per mL, 1 unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah yang menyebabkan perubahan 1  $\mu\text{mol}$  sumber karbon atau satu mikromolekul produk yang dihasilkan per menit pada kondisi tertentu.

Sifat-sifat lipase bergantung asal perolehannya. Jensen *et al.* (1990) menyatakan bahwa spesifisitas enzim dipengaruhi oleh sifat fisikokimia enzim dan substrat seperti pH, suhu, jenis pelarut, modifikasi fisik atau kimia dan sumber enzim, sedangkan Van Camp *et al.* (1998) menyatakan bahwa selektifitas dan spesifisitas lipase sangat tergantung pada kondisi yang diterapkan selama proses seperti pH, suhu, jenis pelarut, pilihan kosubstrat dan imobilisasi. Peningkatan suhu pada enzim tertentu dapat meningkatkan kecepatan reaksi sebaliknya sampai batas tertentu peningkatan suhu reaksi dapat menurunkan kecepatan reaksi bahkan dapat menginaktifkan enzim.

#### 2.4.4 Manfaat lipase

Penggunaan lipase akhir-akhir ini berkembang pesat terutama setelah diketahui kemampuan enzim ini bereaksi dalam medium organik dan ketersediaannya secara komersial dari berbagai merk di pasaran. Berbagai produk yang dikatalisis oleh lipase telah dieksplorasi oleh para peneliti dan dilaporkan sangat berpotensi untuk diaplikasikan dalam bidang industri (Bastida, 1998). Penggunaan lipase di bidang industri dipandang cukup ekonomis, jika dibandingkan dengan proses tradisional, apabila ditinjau dari segi konsumsi energi dan hasil samping reaksi (Kulkarni, 2002).

Aplikasi lipase di bidang industri, antara lain: dalam bidang bioteknologi, seperti biomedikal, pestisida, pengolahan limbah, industri makanan, biosensor, detergen, untuk industri kulit dan industri oleokimia (memproduksi asam lemak dan turunannya) (Macrae, 1983). Lipase juga digunakan untuk mempercepat degradasi limbah minyak/lemak dan poliuretan (Jisheng, *et al.* 2005).

Pada industri makanan, mikroorganisme penghasil lipase yang digunakan di antaranya *Pseudomonas sp.* Pada industri ini lipase berfungsi untuk meningkatkan proses kimia tradisional, yaitu untuk pembuatan minyak dan makanan. Pada industri keju, produksi ester untuk penyedap menggunakan lipase dari *S. warneri* dan *S. xylosus*. Kemampuan lipase dalam mengkatalisis reaksi dengan regioselektifitas yang tinggi pada berbagai jenis pelarut organik, lipase muncul sebagai biokatalis yang penting dalam aplikasi obat-obatan (Kulkarni, 2002).

Monogliserida dan digliserida yang diperoleh dengan esterifikasi gliserol dengan katalis lipase dapat digunakan untuk surfaktan pada industri kosmetik (Kulkarni, 2002). Pemanfaatan lipase dibidang industri secara ringkas dapat dilihat pada Tabel 2.8.

Tabel 2.8 Manfaat Lipase di Bidang Industri

Bidang Industri	Kegunaan	Produk
Pangan		
1. Industri susu	Hidrolisis lemak susu	<i>Flavouring agents</i> untuk produk susu

Universitas Indonesia

Lanjutan Tabel 2.8

2. Industri roti dan kue	Meningkatkan aroma/kualitas, memperpanjang umur simpan	Produk roti dan kue
3. Industri bir	Meningkatkan aroma dan mempercepat fermentasi	Produk alkohol seperti sake
4. Industri bumbu	Meningkatkan kualitas/tekstur	Mayonaisse, bumbu-bumbu
5. Industri pengolahan daging dan ikan	Meningkatkan aroma dan mengubah lemak	Produk ikan dan daging
Non Pangan		
1. Industri kimia dan obat-obatan	Transesterifikasi dari minyak alami	Minyak dan lemak
2. Industri oleokimia	Hidrolisis minyak dan lemak	Asam lemak bebas, digliserida, monogliserida, dan gliserol
3. Industri detergen	Analisis asam lemak yang terkandung dalam minyak/lemak, mengubah spot minyak/lemak	Detergen untuk <i>laundry</i> dan penggunaan rumah tangga
4. Industri obat-obatan	Mempermudah daya cerna minyak/lemak dalam pangan	<i>Digestans</i>
5. Kedokteran	Analisis trigliserida dalam darah	<i>Diagnostics</i>
6. Industri komestik	Mengubah lemak	Komestik secara umum

Lanjutan Tabel 2.8

7. Industri kulit	Mengubah lemak dalam jaringan kulit hewan	Produk-produk kulit
8. Penggunaan terpadu	Dekomposisi dan perubahan substansi minyak	Penanganan limbah cair dan limbah lainnya

Sumber : Faizal, 1994

Aplikasi lipase telah dilakukan oleh beberapa peneliti untuk menghasilkan produk turunan atau produk modifikasi lemak/minyak. Produk-produk hasil reaksi menggunakan enzim lipase tersebut antara lain Monoasilgliserol (MAG) yang bersifat antibakteri dari minyak kelapa (Mappiratu, 1999), MAG fungsional (Watanabe, 2002), ester asam lemak untuk flavor (Babali, *et al.* 2001), surfaktan sorbitol oleat (Xu *et al.* 2003), lemak coklat dari minyak sawit (Satiawiharja *et al.* 1999), produk makanan bayi yang kaya akan kandungan asam palmitat pada posisi 2 (Quinlan & Moore 1993), trigliserida kaya DHA (Iremescu, *et al.* 2001), *butyl oleat* untuk aditif biodiesel (Linko, *et al.* 1995) dan lain-lain.

### 2.5 Bakteri *Pseudomonas fluorescens*

Kata *Pseudomonas* yang berarti unit semu berasal dari bahasa Yunani, yakni *pseudo*, yang berarti semu dan *monas*, yang berarti unit tunggal). Kata tersebut digunakan baru-baru ini pada sejarah mikrobiologi untuk mendeskripsikan kuman. Bakteri ini mampu mensekresikan pigmen berpendar yang disebut pyoverdin. Oleh karena itu, bakteri ini diberi nama *fluorescens*.

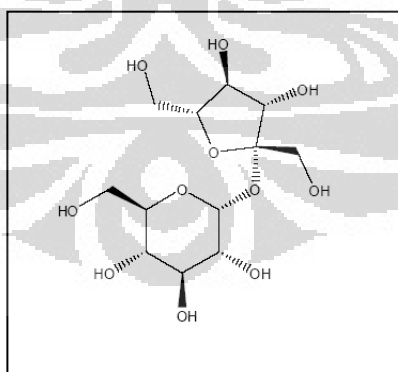
Berdasarkan analisis 16S rRNA, *P. fluorescens* termasuk genus *Pseudomonas*. *P. fluorescens* merupakan bakteri gram negatif yang berbentuk batang dan memiliki flagel ganda. Bakteri yang ditemukan di tanah dan air ini memiliki jalur metabolisme yang beragam. *P. fluorescens* merupakan bakteri aerob obligat tetapi beberapa strain tertentu bakteri ini mampu menggunakan nitrat sebagai pengganti oksigen yang berperan sebagai akseptor elektron terakhir

dalam respirasi sel. Suhu optimal untuk pertumbuhannya adalah 25-30 °C. Hal ini dibuktikan dengan tes oksidase.

*Pseudomonas fluorescens* dan bakteri *Pseudomonas* lainnya memproduksi lipase dan protease. Enzim ini menyebabkan susu menjadi basi yang ditandai dengan rasa asam, kasein yang terpecah dan terdapat lendir serta koagulasi protein (Sumber : [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org)).

## 2.6 Sukrosa

Sukrosa adalah senyawa disakarida (heterodisakarida) dengan rumus molekul  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , yang terbentuk melalui proses fotosintesis yang ada pada tumbuh-tumbuhan. Sukrosa ditemukan dalam gula bit, gula tebu, buah nanas, lobak merah, madu, getah pohon maple, dan beberapa tanaman lainnya. Ikatan glikosida menghubungkan karbon ketal dan asetal dan bersifat  $\beta$  dari fruktosa dan  $\alpha$  dari glukosa. Kedua atom C anomerik dari fruktosa dan glukosa digunakan untuk ikatan glikosida. Sukrosa tidak memiliki gugus hemiasetal. Oleh karena itu, sukrosa di dalam air tidak berada dalam kesetimbangan dengan suatu bentuk aldehida atau keto. Sukrosa tidak menunjukkan mutarotasi dan bukan merupakan gula pereduksi. Secara kimia, sukrosa memiliki 8 gugus hidroksil, 3 diantaranya adalah gugus hidroksi primer (C1, C6' and C6) dan 5 yang lainnya adalah gugus hidroksi sekunder.



Gambar 2.7. Struktur sukrosa  
Sumber : Adamopoulos, Lambrini (2006)

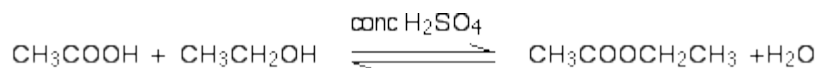
## 2.7 Reaksi Esterifikasi

Esterifikasi merupakan suatu reaksi pembentukan ester antara alkohol dengan asam karboksilat. Asam lemak (sebagai asam karboksilat) yang berperan

**Universitas Indonesia**

sebagai donor asil merupakan asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa. Reaksi esterifikasi enzimatis memerlukan suatu katalis yang mempunyai sifat selektif, sehingga akan diperoleh hasil yang sesuai dengan yang diharapkan.

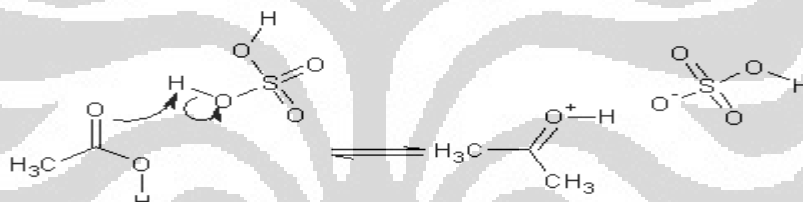
Mekanisme reaksi esterifikasi terdiri dari lima langkah, dan sebagai contohnya pada pembentukan etil etanoat dengan mereaksikan asam asetat dan etanol dengan bantuan katalis asam sulfat (*Esterification*, 2007).



Gambar 2.8. Reaksi Esterifikasi Asam Etanoat dengan Etanol

Sumber: [www.chemguide.co.uk](http://www.chemguide.co.uk)

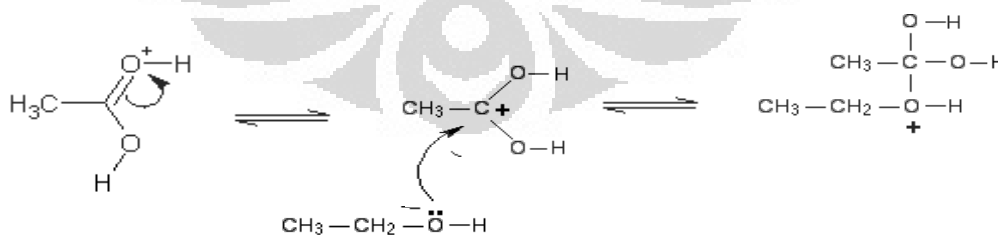
Langkah pertama, asam asetat menerima proton (ion hidrogen) dari asam sulfat. Proton tersebut lalu berikatan dengan oksigen yang berikatan rangkap dengan karbon. Perpindahan proton ke oksigen mengakibatkan bermuatan positif.



Gambar 2.9. Tahap Pertama Reaksi Esterifikasi

Sumber: [www.chemguide.co.uk](http://www.chemguide.co.uk)

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

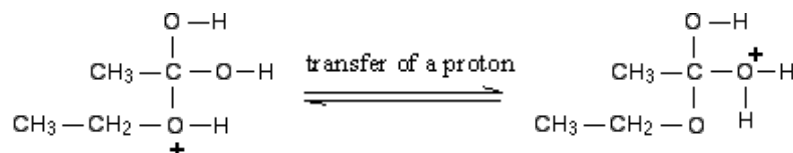


Gambar 2.10. Tahap Kedua Reaksi Esterifikasi

Sumber: [www.chemguide.co.uk](http://www.chemguide.co.uk)



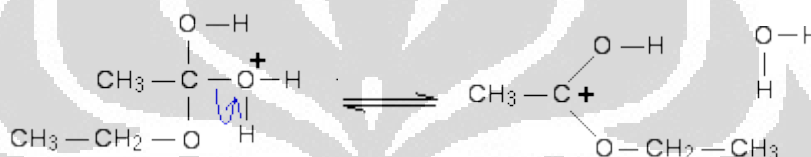
Langkah ketiga, pada fase ini terjadi perpindahan proton (ion hidrogen) dari oksigen terbawah ke atom oksigen lainnya.



Gambar 2.11 Tahap Ketiga Reaksi Esterifikasi

Sumber: [www.chemguide.co.uk](http://www.chemguide.co.uk)

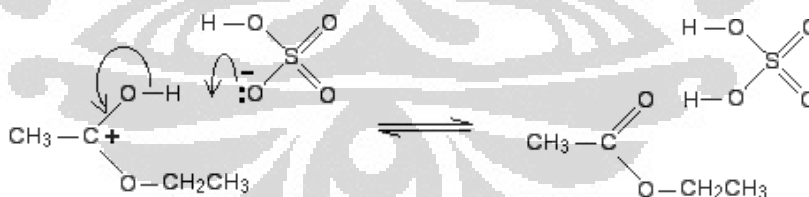
Langkah keempat, pada fase ini terbentuk molekul air akibat terputusnya ikatan ion.



Gambar 2.12. Tahap Keempat Reaksi Esterifikasi

Sumber: [www.chemguide.co.uk](http://www.chemguide.co.uk)

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



Gambar 2.13. Tahap Terakhir Reaksi Esterifikasi

Sumber: [www.chemguide.co.uk](http://www.chemguide.co.uk)

Reaksi esterifikasi yang dikatalisis oleh asam merupakan reaksi yang reversibel, sehingga produk samping yang berupa air mendapat perhatian serius karena keberadaan air mempengaruhi pergeseran kesetimbangan.

## 2.8 Ester Asam Lemak Sukrosa (Ester Sukrosa)

Perubahan letak posisi asam lemak secara reaksi interesterifikasi akhirnya digunakan untuk merekayasa lipid yang tersabunkan menjadi sumber bahan makan yang bermanfaat bagi kesehatan. Ester asam lemak dengan gliserol telah berkembang menjadi ester asam lemak dengan poliol lainnya, seperti glikol, sorbitol dan sukrosa.

Ester asam lemak sukrosa (*Degree of Substitution* atau DS 1-3) merupakan ester non ionik yang memiliki gugus yang bersifat lipofilik dan hidrofilik yang digunakan luas pada bahan pangan, karena mudah dicerna, diabsorpsi dalam tubuh, tidak beracun dan dapat terurai oleh mikroba (*biodegradable*). Ester sukrosa asam lemak digunakan sebagai surfaktan dalam sistem minyak dalam air (o/w) dan air dalam minyak (w/o). Poliester asam lemak karbohidrat (DS 4-14) merupakan molekul yang lipofilik, tidak dapat dicerna dan tidak dapat diserap.

Ester gula memiliki kegunaan yang bervariasi. Campuran regioisomer (mono-, di-, dan tri- ester) digunakan sebagai emulsifier, yang menghasilkan sifat fisiko-kimia yang dipengaruhi oleh rata-rata derajat substitusi dan panjang rantai asam lemak. Ester gula digunakan sebagai surfaktan non-ionik, *bleaching boosters* dan bahan tambahan makanan. Ester asam lemak sukrosa dengan derajat substitusi yang rendah dapat digunakan sebagai emulsifier pada makanan dan kosmetik.

Pada Tahun 1952, sintesis ester asam lemak gula mulai menjadi perhatian. Ester asam lemak sukrosa ini dapat disintesis dengan 3 cara, yakni :

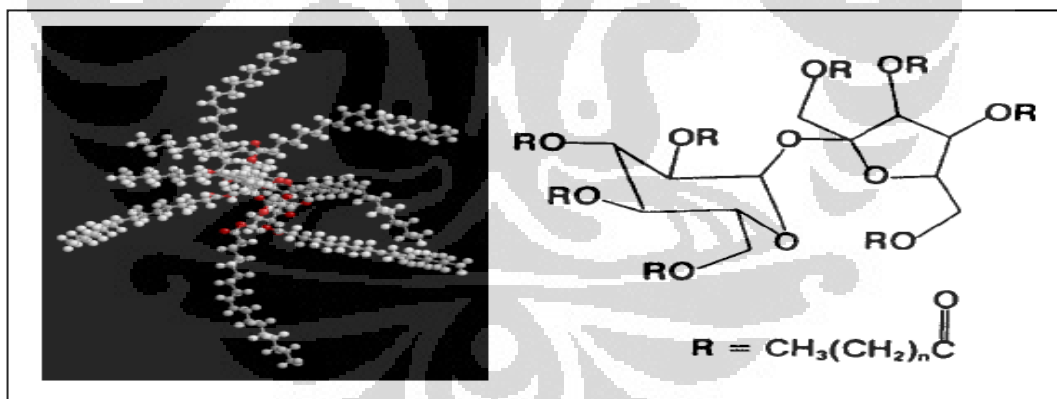
1. Reaksi esterifikasi antara asil klorida asam lemak ataupun anhidrid asam lemak dengan sukrosa.
2. Transesterifikasi antara metil ester asam lemak dengan sukrosa pada pemanasan suhu tinggi.
3. Reaksi enzimatik antara sukrosa dengan asam lemak menggunakan lipase.

Ester asam lemak karbohidrat dengan derajat substitusi 4-14 (Poliester gula) memiliki kegunaan sebagai pengganti lemak. Olestra (*Sucrose Polyester*) dikembangkan oleh Procter dan Gamble, dengan nama komersial Olean merupakan bahan tambahan makanan (*food additive*) yang dinilai aman dan

mampu menggantikan lemak dalam *shortening* dan minyak makan. Olestra merupakan ester asam lemak *polysubstituted* yang digunakan sebagai lemak non kalori. Olestra memiliki sifat yang sama dengan trigliserida tetapi tidak dapat dicerna. Hal ini disebabkan oleh struktur kimia dari olestra yang tidak memungkinkannya untuk tidak tercerna (Giese, 1996).

Ketika empat atau lebih asam lemak yang diesterifikasi ke sukrosa, poliester sukrosa bertindak sebagai lemak dan memiliki sifat fisik dan organoleptik yang sama dengan lemak konvensional tetapi poliester sukrosa tidak menyumbangkan kalori yang signifikan.

Besarnya derajat substitusi mempengaruhi kemudahan hidrolisis. Semakin besar derajat substitusinya, semakin sedikit asam lemak yang mampu dihidrolisis. Oleh karena itu, poliester sukrosa tidak terhidrolisis oleh enzim lipase pankreas dan tidak terserap dalam usus kecil. Hal itu karena sebagian besar asam lemak terikat dengan pusat molekul gula, sehingga enzim lipase pankreas sulit memisahkan atau tidak dapat menghidrolisis asam lemak yang terikat dengan gula. Dengan demikian, asam lemak yang diserap dan dicerna oleh tubuh lebih sedikit.



Gambar 2.14 Struktur Poliester Sukrosa atau Olestra  
Sumber : Adamopoulos, L. (2006).

## 2.9 Produksi Enzim Lipase

Lipase dari mikroba lokal bisa didapatkan dengan metode isolasi enzim menggunakan sentrifugasi. Hasil dari sentrifugasi yang berupa supernatan (cairan) diambil sebagai *crude extract* (enzim kasar) lipase (Judoamidjojo, dkk, 1989).

Metode ini cukup banyak digunakan karena prosesnya relatif mudah, efektif dan efisien.

Produksi enzim dari hewan dan tumbuhan memiliki banyak kelemahan, sehingga yang sering dilakukan industri adalah mengembangbiakkan mikroorganisme penghasil lipase pada media tertentu. Memproduksi enzim dari mikroorganisme memiliki keuntungan, yaitu keberadaan reaksi samping yang tidak diinginkan dalam produksi enzim, dapat dihindari .

Sintesis dan sekresi lipase oleh bakteri dipengaruhi oleh berbagai macam faktor, yaitu faktor nutrisi dan fisikokimia, seperti suhu, pH, nitrogen, garam anorganik, konsentrasi oksigen yang terlarut, lama waktu inkubasi, kondisi pengocokan, ion, sumber karbon, atau polisakarida yang tidak termetabolisme.

Menurut Boing (1982), langkah-langkah umum yang perlu dipertimbangkan bagi industri penghasil enzim secara komersial adalah sebagai berikut :

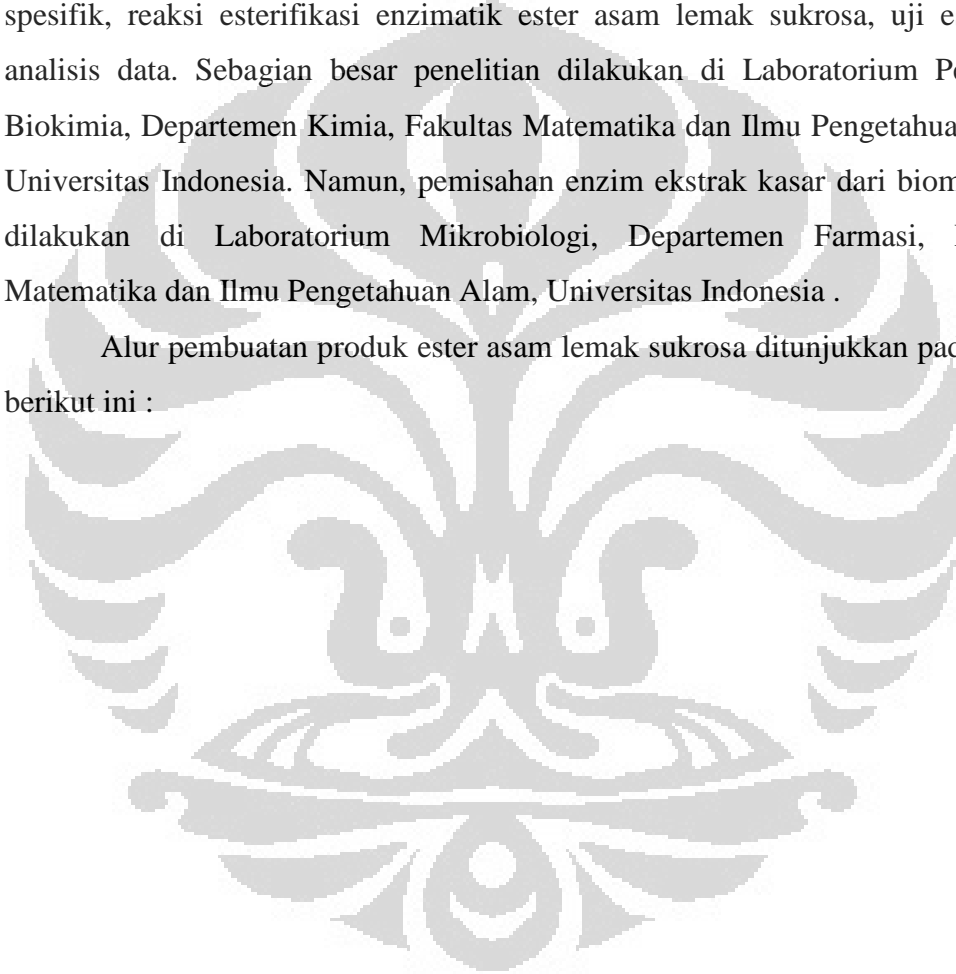
- Kultur mikroorganisme mampu menghasilkan enzim dalam jumlah besar dan waktu kultivasi yang singkat.
- Mikroorganisme tersebut penghasil enzim ekstraseluler, karena proses pemecahan sel mahal dan sulit.
- Mikroorganisme harus berasal dari galur yang stabil, sehingga tidak mudah terjadi mutasi.
- Mikroorganisme mampu tumbuh pada media kultivasi dan dapat dilakukan dengan mudah.
- Mikroorganisme penghasil enzim bukan berasal dari galur yang menginduksi toksin yang mampu memiliki aktivitas antibiotik.
- Pemanenan enzim dari media kultivasi dapat dilakukan dengan mudah.

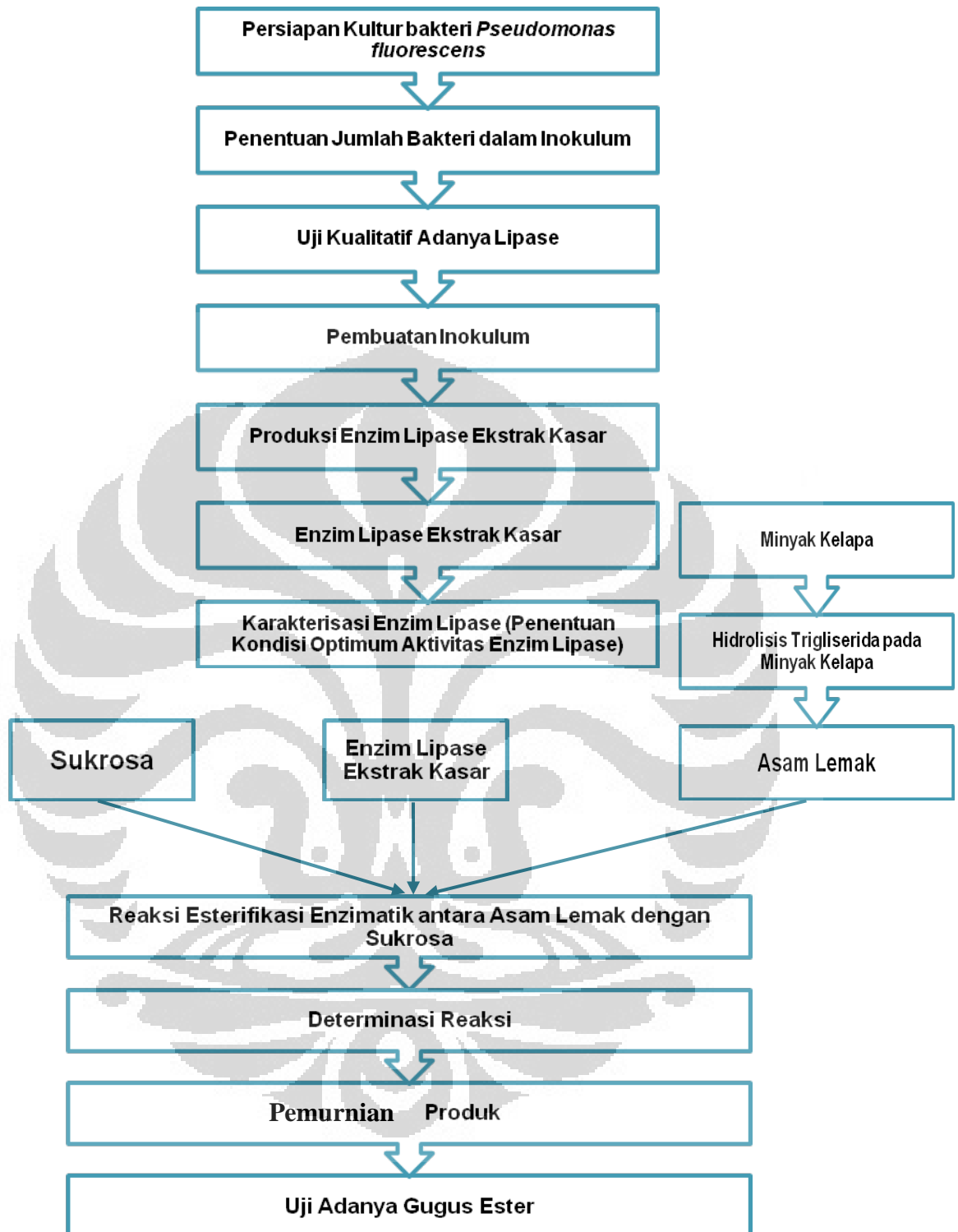
### BAB 3

#### METODE PENELITIAN

Secara umum, penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan yaitu tahap preparasi alat dan bahan penelitian, penyiapan kultur bakteri *P. fluorescens*, penentuan jumlah bakteri, pembuatan inokulum, produksi enzim lipase, uji aktivitas lipolitik enzim lipase ekstrak kasar, penentuan kadar protein, aktivitas spesifik, reaksi esterifikasi enzimatis ester asam lemak sukrosa, uji ester dan analisis data. Sebagian besar penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian Biokimia, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Namun, pemisahan enzim ekstrak kasar dari biomasanya dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia .

Alur pembuatan produk ester asam lemak sukrosa ditunjukkan pada bagan berikut ini :





Gambar 1.1. Bagan Kerja Secara Umum

### 3.1 Alat dan Bahan

#### 3.1.1 Alat

Pada penelitian ini alat yang digunakan meliputi alat-alat gelas yang digunakan di Laboratorium Biokimia dan Mikrobiologi, seperti beaker glass, batang pengaduk, corong biasa, labu ukur, pipet tetes, pipet ukur, gelas ukur, Erlenmeyer, neraca analitik, *micro pipet*, tabung reaksi, jarum ose, tabung *sentrifuge*, *sentrifuge*, lampu spirtus, *magnetic stirrer*, labu leher dua, termometer, corong pisah, *vortex*, *hot plate*, cawan petri, buret, lampu UV, autoklaf, *horizontal shaker incubator* dan pH meter. Peralatan yang digunakan untuk keperluan analisis adalah Spektrofotometer UV/Vis.

#### 3.1.2 Bahan

a. Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan pada penelitian ini adalah *P. fluorescens*, yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Institut Pertanian Bogor.

b. Medium

Bahan medium padat yang digunakan adalah *Nutrient Agar* (NA) sedangkan bahan medium cair yang digunakan adalah *Nutrient Broth* (NB).

c. Bahan kimia

Semua bahan kimia yang digunakan untuk pembuatan medium padat, medium cair, medium produksi, serta untuk keperluan analisis didapatkan dari Laboratorium Biokimia dan Organik Departemen Kimia FMIPA Universitas Indonesia, CV Harum Kimia dan CV Dwinika. Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini, diantaranya : NaOH, indikator fenolftalein (pp), aquades, aseton, minyak kelapa, sukrosa, kloroform, HCl 0,1N dan 3N, KOH 1M dalam etanol 95%, n-heksana, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrat, alkohol 96%, alkohol 70%, CaCl<sub>2</sub>, minyak zaitun, buffer fosfat pH 6-9, *beef extract*, pepton, aquades, Na-K tartarat, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Folin-Ciocalteu, *gum arab* dan *bovine serum albumin* (BSA) sebagai standar.

## 3.2 Prosedur Penelitian

### 3.2.1 Pembuatan Medium

#### 1. Pembuatan Medium Padat

Sebanyak 28 g *Nutrient Agar* (dengan komposisi 0,5% w/v pepton, 0,15% w/v *yeast extract*, 0,5% w/v *beef extract*, 0,5% w/v NaCl dan 1,5% w/v agar) dilarutkan dalam 1000 mL aquades dan dipanaskan sambil di aduk-aduk hingga larut. Dalam keadaan masih panas, larutan NA dimasukkan ke dalam beberapa tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 mL dan 10 mL, kemudian tabung ditutup dengan sumbat kapas berlemak. Setelah itu, tabung disterilisasi dalam autoklaf pada tekanan 1 kg f/ cm<sup>2</sup> dan suhu 121°C selama 15 menit. Tabung reaksi yang berisi 5 mL larutan NA diletakkan miring. Selanjutnya agar miring ini digunakan untuk pemeliharaan bakteri *P. fluorescens*. Sementara tabung reaksi yang berisi 10 mL larutan NA disimpan. Jika NA 10 mL ingin digunakan maka harus dipanaskan kembali hingga larut kembali dan dimasukkan secara aseptik ke dalam cawan petri yang telah steril setelah suhu larutan NA berkisar antara 45-50 °C. Selanjutnya agar pada cawan petri ini digunakan untuk penentuan jumlah bakteri.

#### 2. Pembuatan Medium Cair dan Produksi

Medium cair yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Nutrient Broth* yang dilarutkan dalam larutan buffer pH 8. *Nutrient Broth* (NB) memiliki komposisi yang sama dengan *Nutrient Agar* (NA), tetapi tanpa agar (0,5% w/v pepton, 0,15% w/v *yeast extract*, 0,5% w/v *beef extract*, 0,5% w/v NaCl. Kemudian larutan tersebut disterilisasi dalam autoklaf pada tekanan 1 kg f/ cm<sup>2</sup> dan suhu 121°C selama 15 menit. Medium cair ini selanjutnya digunakan untuk pembuatan inokulum. Medium produksi mempunyai komposisi nutrien yang sama dengan medium cair, hanya ditambahkan minyak zaitun sebanyak 1 % sebagai inducer pada medium fermentasi dan sebagai sumber karbon pada medium cair.



### 3. Pembuatan Medium Padat untuk Uji Kualitatif Lipase

Sebanyak 0,28 g *Nutrient Agar* (NA) dilarutkan dalam 10 mL aquades. Kemudian ditambahkan 1% (w/v) minyak zaitun dan 0,001% w/v Rhodamine B. Larutan tersebut dipanaskan, kemudian memasukkannya ke dalam tabung dalam keadaan panas dan menutup mulut tabung dengan sumbat kapas berlemak. Setelah itu, campuran tersebut disterilisasi dalam autoklaf pada tekanan 1 kg f/ cm<sup>2</sup> dan suhu 121°C selama 15 menit. Jika suhu tabung reaksi berkisar 45-50 °C, campuran tersebut dituang secara aseptis ke dalam cawan petri.

#### 3.2.2 Persiapan Kultur

Kultur *P. fluorescens* diperbanyak dengan agar miring baru yang berisi *nutrient agar* (NA).

#### 3.2.3 Penentuan Jumlah Bakteri

##### 1. Penentuan Jumlah Bakteri dengan Cara Spektrofotometri

Prosedur kerja penentuan jumlah bakteri dengan cara spektrofotometri dapat dilihat pada lampiran 1. Absorbansi larutan pada setiap tabung pengenceran ( $10^0$ - $10^{-8}$ ) diukur dengan spektrofotometer dengan  $\lambda=620$  nm.

##### 2. Penentuan Jumlah Bakteri dengan Metode Hitungan Cawan (*Total Plate Count*)

Prosedur kerja penentuan jumlah bakteri dengan cara metode hitungan cawan (*total plate count*) dapat dilihat pada lampiran 1. Suspensi sel pada setiap tabung reaksi faktor pengenceran  $10^{-1}$ - $10^{-8}$  (percobaan penentuan jumlah bakteri dengan cara spektrofotometri) diambil 1 mL kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri steril secara aseptis. Kemudian tambahkan 10 mL *nutrient agar* (NA) dan biarkan hingga NA memadat. Setelah itu, cawan petri tersebut diinkubasi pada suhu 30 °C selama 3 hari dan koloni yang terbentuk dihitung.

### 3.2.4 Pembuatan Inokulum dan Produksi Lipase *Pseudomonas fluorescens*

Medium yang digunakan untuk produksi lipase *Pseudomonas fluorescens*, merupakan *Nutrient Broth* yang mengandung nutrisi dengan komposisi, sebagai berikut:

0,5% w/v pepton, 0,15% w/v *yeast extract*, 0,5% w/v *beef extract*, 0,5% w/v NaCl dan minyak zaitun.

Kultur *P. fluorescens* ditanam secara aseptis pada medium agar miring. Agar tercipta keseragaman penanaman pada setiap medium agar miring, dilakukan penanaman dengan membuat goresan yang sama banyak pada setiap agar miring. Selanjutnya biakan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 4 hari. Ke dalam biakan bakteri yang telah berumur 4 hari, ditambahkan beberapa mL *nutrient broth* steril dan dikorek dengan jarum ose supaya bakteri terlepas dari agar. Suspensi bakteri dituang ke dalam 50 mL medium *nutrient broth* dalam labu erlenmeyer 250 mL dan diinkubasi pada suhu 30°C dengan *horizontal incubator shaker* dengan agitasi 110 rpm selama dua hari. Suspensi bakteri yang telah diinkubasi tersebut digunakan sebagai inokulum. Jumlah bakteri per mL suspensi bakteri pada inokulum dihitung dengan metode *total plate count* (TPC) dan dengan cara spektrofotometri dengan pengenceran  $10^0 - 10^{-8}$ .

Produksi lipase dilakukan dengan fermentasi *P. fluorescens* di dalam labu erlenmeyer yang berisi 50 mL medium produksi dan 1% inokulum. Kultivasi dilakukan pada suhu 30 °C selama 96 jam dengan agitasi 200 rpm. Setelah dikultivasi selama 96 jam, medium kultur disaring dengan kertas saring untuk memisahkan supernatan dari biomasanya. Filtrat (supernatan) yang diperoleh dikumpulkan dan disentrifugasi pada 4 °C dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit. Sentrifugasi dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Supernatan yang diperoleh disebut enzim kasar (*crude enzyme*).

Aktivitas lipolitik enzim kasar ditentukan terhadap substrat minyak zaitun. Kadar protein enzim kasar ditentukan dengan metode *Lowry* menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai standar protein. Selanjutnya, kadar protein enzim dapat diketahui dengan cara mengalurkan data serapan  $\lambda_{750 \text{ nm}}$  dari larutan enzim

pada kurva standar BSA. Dengan demikian, dapat ditentukan aktivitas spesifik enzim kasar (Unit/ mg protein).

### 3.2.5 Uji Kualitatif Lipase

Kultur bakteri *Pseudomonas fluorescens* digores secara aseptis pada medium *Nutrient Agar* (NA) yang telah mengandung 1% minyak zaitun dan 0,001% Rhodamine B (medium padat untuk uji kualitatif lipase). Kemudian kultur bakteri *Pseudomonas fluorescens* pada medium ini diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30 °C. Kemudian dilakukan pengamatan di bawah lampu UV pada  $\lambda$  366 nm. Jika terdapat pendaran berwarna *orange* maka bakteri menghasilkan enzim lipase.

### 3.2.6 Penentuan Aktivitas Lipolitik

Aktivitas lipolitik lipase ditentukan dengan metode titrimetrik menggunakan substrat minyak zaitun dengan cara sebagai berikut (Pereira *et al.*, 1997):

Sebanyak 1,5 mL enzim lipase dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 mL yang berisi 8,5 mL emulsi minyak zaitun (5%) – gum arabic (5%) dalam buffer fosfat pH 7 dan 1 mL CaCl<sub>2</sub>, kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 1 jam di *horizontal incubator shaker* dengan agitasi 150 rpm. Setelah diinkubasi, reaksi dihentikan dengan penambahan larutan aseton : alkohol 96% (1 : 1 v/v) kemudian ditambahkan indikator fenolftalein sebanyak 2-3 tetes dan dititrasi dengan NaOH 0,05 N. Titrasi dihentikan jika sudah terbentuk warna merah jambu dan jumlah titran untuk menetralkan asam lemak bebas dihitung.

Pengukuran blanko dilakukan dengan komposisi yang sama, tetapi enzim yang dimasukkan sudah dimatikan dengan memanaskan pada penangas air mendidih selama 10 menit. Kemudian diinkubasi dan dititrasi dengan prosedur yang sama seperti di atas.

Aktivitas lipolitik enzim dapat dihitung berdasarkan banyaknya asam lemak bebas yang terbentuk (U/ mL).

$$\text{Aktivitas lipolitik enzim} = \frac{(A - B) \times N \text{ NaOH} \times 1000}{w \times t}$$

A	= mL NaOH untuk titrasi sampel
B	= mL NaOH untuk titrasi blanko
N NaOH	= normalitas NaOH untuk titrasi
w	= berat minyak zaitun (mg) yang digunakan
1000	= konversi dari mmol ke $\mu\text{mol}$
t	= waktu inkubasi dalam menit

Aktivitas lipolitik satu Unit (U) didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan 1  $\mu\text{mol}$  produk per menit di bawah kondisi percobaan.

### 3.2.7 Penentuan Kadar Protein

Penentuan kadar protein dilakukan dengan metode Lowry menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) sebagai standar protein. Pereaksi yang diperlukan adalah sebagai berikut (Plummer, 1987) :

- Pereaksi A, terdiri dari 2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dalam 100 mL larutan 0,1 N NaOH
- Pereaksi B, terdiri dari 0,25 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dalam 50 mL larutan Na-K tartarat 1%.
- Pereaksi C, terdiri dari campuran pereaksi A dan B (50 : 1 v/v)
- Pereaksi D adalah reagen Folin-Ciocalteu 1N

Ke dalam tabung reaksi dimasukkan larutan sampel sebanyak 0,4 mL dan pereaksi C sebanyak 2 mL, dikocok dan didiamkan selama 10 menit. Kemudian ditambah 0,2 mL pereaksi D, dikocok dan didiamkan selama 30 menit. Larutan yang diperoleh diukur absorbansinya pada  $\lambda=750$  nm dengan menggunakan spektrofotometer UV/Vis. Kadar protein dalam larutan enzim ditentukan berdasarkan kurva standar BSA.

#### Pembuatan Kurva Standar BSA :

Disiapkan beberapa larutan BSA standar dengan konsentrasi : 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 dan 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Setiap larutan tersebut diperlakukan sama seperti larutan sampel, selanjutnya diukur serapannya pada  $\lambda=750$  nm menggunakan spektrofotometer UV/Vis. Kemudian dibuat kurva standar antara konsentrasi BSA terhadap serapan pada  $\lambda_{750\text{ nm}}$ .

### 3.2.8 Penentuan Aktivitas Spesifik

Aktivitas spesifik (Unit/mg protein) lipase dapat diketahui dengan menentukan aktivitas lipolitik per mg protein berdasarkan data aktivitas lipolitik total (Unit) dan kadar protein total (mg).

### 3.2.9 Hidrolisis Triglisierida

Hidrolisis triglisierida dilakukan untuk mendapatkan asam lemak yang terdapat pada minyak kelapa. Hidrolisis triglisierida berkatalis basa dilakukan dengan cara sebagai berikut (Hasnisa, *et al.*, 2008) :

Sebanyak 20 g minyak kelapa dimasukkan ke dalam labu bulat leher tiga, kemudian ditambahkan 100 mL KOH 1M dalam alkohol 95%. Campuran ini kemudian dipanaskan dengan sistem refluks selama 1 jam pada suhu  $62 \pm 2$  °C sambil diaduk dengan *magnetic stirer*. Setelah dipanaskan, campuran tersebut ditambahkan 50 mL aquades. Setelah itu, campuran tersebut diasamkan dengan 30 mL HCl 3N. Kemudian campuran tersebut diekstraksi dengan 50 mL n-heksana. Kemudian lapisan atas dipisahkan dari lapisan bawah. Pada lapisan atas ditambahkan 1 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrat. Setelah itu, larutan tersebut didekantasi untuk memisahkan padatan Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrat. Terakhir n-heksana yang terlarut dalam asam lemak diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40 °C hingga filtrat pekat.

### 3.2.10 Sintesis Ester Sukrosa (Reaksi Esterifikasi)

Sintesis ester sukrosa dilakukan dengan cara sebagai berikut :

Mencampurkan sukrosa, asam lemak yang terlarut dalam n-heksana dan enzim lipase ekstrak kasar dari *P. fluorescens*, kemudian ditambahkan dengan larutan buffer fosfat pH=7 dan *gum arab* sebagai emulsifier. Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C dan diaduk dengan *magnetic stirrer*. Reaksi esterifikasi dilakukan sampai 96 jam, setiap 24 jam produknya ditentukan.

### 3.2.11 Determinasi Reaksi Esterifikasi

Sebelum produk reaksi dikarakterisas, reaksi esterifikasi diakhiri dengan penambahan NaOH 0,1 N berlebih. NaOH menetralkan fraksi asam laurat yang tidak bereaksi. Kelebihan basa dititrasi dengan HCl 0,1 N.

### 3.2.12 Pemurnian Ester Sukrosa

Sebelum produk ester sukrosa diidentifikasi maka produk ini harus dimurnikan terlebih dahulu. Cara pemurnian ester sukrosa, yaitu :

Produk ester sukrosa ditambahkan dengan kloroform, kemudian dikocok selama beberapa menit. Setelah itu, campuran tersebut ditambahkan NaOH kemudian diekstraksi dengan corong pisah. Lapisan yang mengandung NaOH dipisahkan dari lapisan yang mengandung kloroform. Kemudian lapisan yang mengandung kloroform dicuci dengan air, kemudian selanjutnya dilakukan identifikasi.

### 3.2.13 Uji Adanya Gugus Ester

Untuk mengetahui apakah produk ester sukrosa sudah terbentuk atau belum, maka dilakukan uji adanya gugus ester. Untuk mengetahui adanya gugus ester maka dilakukan cara sebagai berikut :

Produk poliester sukrosa yang terlarut dalam kloroform ditambahkan metanol, kemudian ditambahkan indikator fenolftalein dan setetes NaOH encer. Kemudian campuran tersebut dipanaskan dalam penangas air hingga warna merah muda menghilang. Hilangnya warna merah muda setelah pemanasan menandakan adanya gugus ester.

## BAB 4 PEMBAHASAN

### 4.1 Penentuan Jumlah Bakteri

Untuk mengetahui jumlah bakteri yang ada dalam medium fermentasi saat memproduksi enzim lipase, digunakan metode hitungan cawan (*total plate count*) dan *optical density* atau dengan cara spektrofotometri. Metode hitungan cawan atau *total plate count* (TPC) dapat digunakan untuk menghitung koloni yang hidup. Namun, metode ini memiliki kelemahan, yaitu membutuhkan waktu yang lama untuk mendapatkan data jumlah koloni.

Penentuan jumlah sel dengan metode hitungan cawan, dilakukan dengan cara menginokulasi suspensi mikroorganisme, kemudian mengencerkannya secara bertingkat dan disebarakan dengan batang gelas steril pada permukaan petri. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam atau lebih hingga tumbuh koloni-koloni yang terpisah-pisah, yang disebut *Cell Forming Unit* (CFU).

Pada penentuan jumlah sel dengan metode hitungan cawan, koloni yang diperbolehkan pada tiap cawan petri sekitar 30-300 koloni. Dalam penelitian ini, dilakukan penghitungan koloni dari faktor pengenceran  $10^{-1}$  hingga  $10^{-8}$ . Data penghitungan koloni pada pengenceran  $10^{-1}$  sampai  $10^{-8}$  tidak dapat digunakan karena jumlah koloni pada setiap pengenceran melebihi jumlah koloni yang diperbolehkan dalam metode ini. Hal ini pun dapat dilihat dari foto hasil TPC dimana jumlah koloni bakteri terlalu rapat dan banyak (pada lampiran). Jumlah koloni pada pengenceran  $10^{-8}$  pun, yaitu sekitar 378 koloni padahal apabila dilihat dari koloninya tidak terlalu rapat.

Perhitungan mikroorganisme dengan cara spektrofotometri merupakan suatu salah satu cara yang mudah dan murah dalam mengestimasi massa sel. Turbiditas suatu suspensi sel diukur pada panjang gelombang  $\lambda=600-720$  nm (Judoamidjojo, *et al.*, 1989). Penentuan jumlah sel dengan metode ini dilakukan dengan cara mengukur banyaknya cahaya yang disebarakan oleh suspensi sel. Pengukuran *turbidity* (kekeruhan) ini didasarkan bahwa partikel-partikel kecil menyebarkan cahaya secara proporsional. Oleh karenanya, dalam penentuan

massa sel pada metode ini harus dipastikan tidak ada komponen medium yang mengabsorpsi cahaya. Dengan demikian teknik ini tidak dapat digunakan bila banyak padatan non sel yang terdapat di dalam medium. Untuk mendapatkan hasil pengukuran absorbansi yang akurat, maka absorbansi medium fermentasi dengan suspensi bakteri dikurangi dengan medium fermentasi tanpa suspensi bakteri (sebagai blanko).

Pada penentuan mikroorganisme dengan cara spektrofotometri juga dilakukan pengenceran dari  $10^0$  hingga  $10^{-8}$ . Data absorbansinya ditunjukkan pada Tabel di bawah ini.

Tabel 4.1 Data Absorbansi Suspensi Sel pada berbagai Pengenceran

Faktor Pengenceran	Absorbansi
$10^0$	0,410
$10^{-1}$	0,129
$10^{-2}$	0,081
$10^{-3}$	0,076
$10^{-4}$	0,069
$10^{-5}$	0,062
$10^{-6}$	0,058
$10^{-7}$	0,059
$10^{-8}$	0,058

Karena pada data pada metode hitungan cawan tidak dapat digunakan maka jumlah bakteri *P. fluorescens* yang terdapat dalam media fermentasi atau produksi untuk memproduksi enzim lipase tidak dapat diketahui. Untuk itu, setiap kali melakukan fermentasi atau produksi enzim lipase, maka dilakukan pengukuran absorbansi dari inokulum (faktor pengenceran  $10^0$ ). Seperti yang terlihat pada Tabel 4.1 absorbansi dari inokulum ialah 0,410, maka setiap kali melakukan produksi, absorbansi inokulum harus sekitar 0,4.



#### 4.2 Uji Kualitatif Adanya Lipase

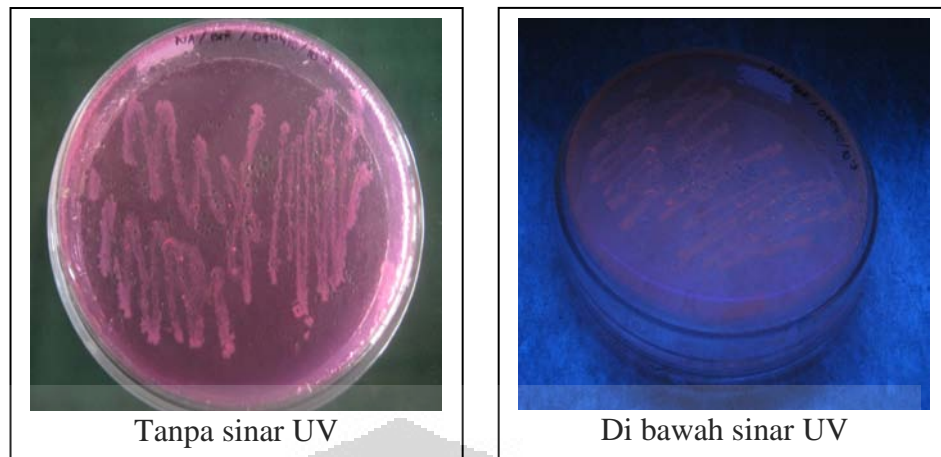
Substrat lipase yang digunakan pada uji kualitatif ini adalah trioleilgliserol. Agar biaya lebih murah dapat digunakan substrat berupa trioleilgliserol jenis minyak zaitun.

Pada uji adanya lipase ini digunakan zat warna Rhodamine B. Adanya Rhodamine B dapat mengindikasikan area lipolisis dengan terlihatnya pendaran berwarna orange di bawah sinar UV pada  $\lambda=366$  nm. Pendaran orange tidak terbentuk ketika esterase teruji pada uji ini. Rhodamine B dalam minyak zaitun membentuk ikatan kompleks dengan asam lemak bebas (Thomson, *et al.*, 1999).

Hasil uji kualitatif adanya lipase pada *P. fluorescens* juga terdapat pendaran berwarna orange. Namun, pendarannya hanya sedikit. Sedikitnya pendaran *orange* mungkin disebabkan karena bakteri *Pseudomonas fluorescens* mampu mensekresikan pigmen berpendar di bawah sinar UV yang disebut pyoverdin, sehingga pendaran berwarna *orange* tertutupi. Oleh karena itu, untuk penelitian selanjutnya sebaiknya digunakan metode uji kualitatif yang lain untuk menghindari tertutupinya pendaran berwarna *orange*.

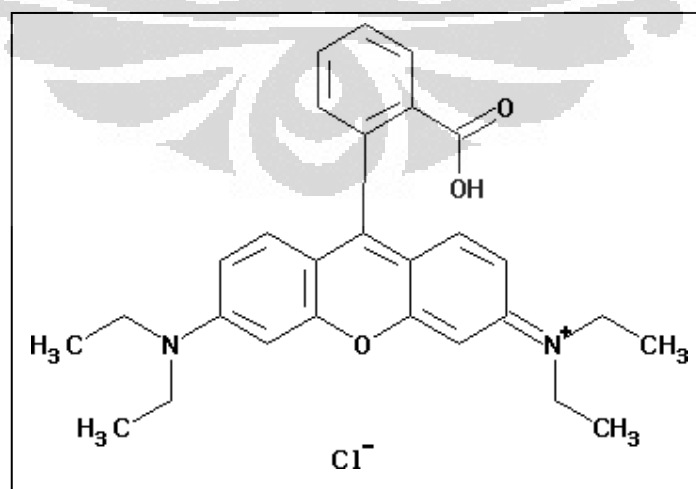


Gambar 4.1 Isolat Bakteri *P. fluorescens* di bawah sinar UV



Gambar 4.2 Hasil Uji Kualitatif Adanya Enzim Lipase.

Pada uji kualitatif adanya lipase pada bakteri *P. fluorescens*, maka lipid yang terdapat dalam medium dihidrolisis oleh lipase menjadi asam lemak dan gliserol. Asam lemak ini masuk ke dalam sel bakteri melalui proses difusi terbantu, dan proses ini difasilitasi oleh protein pembawa. Indikator warna *Rhodamine B* masuk ke dalam sel melalui difusi sederhana (Rani et al., 2005). Asam lemak di dalam sel selanjutnya berikatan dengan *Rhodamine B* sehingga membentuk ikatan kompleks. Pembentukan ikatan kompleks ini terjadi karena reaksi antara kationik pada *Rhodamine B* dengan ion uranil dari asam lemak (Kouker & Jaeger, 1987). Ikatan kompleks inilah yang menyebabkan timbulnya pendaran *orange* pada uji kualitatif ini saat diiradiasi di bawah sinar UV pada  $\lambda=366$  nm.



Gambar 4.3. Struktur Rhodamine B

### 4.3 Inokulum dan Produksi Enzim Lipase

Menurut Judoamidjojo, *et al.* (1989) semua mikroorganisme memerlukan nutrisi dasar sebagai sumber karbon, nitrogen, energi dan faktor esensial pertumbuhan (mineral dan vitamin) untuk menopang pertumbuhannya. Oleh karena alasan tersebut, maka untuk mendapatkan hasil (*yield*) yang maksimum, media pertumbuhan yang digunakan harus mengandung semua nutrisi dasar yang diperlukan.

Produksi enzim lipase dari bakteri dipengaruhi oleh nutrisi dan faktor fisiko kimia, seperti sumber karbon, nitrogen, garam anorganik, suhu, pH, kehadiran lipid, kondisi pengadukan, dan konsentrasi oksigen terlarut (Rosenau dan Jaeger, 2000).

Sumber karbon merupakan faktor utama yang dibutuhkan untuk menghasilkan enzim lipase. Kehadiran karbon bukan saja digunakan untuk biosintesis sel, namun, juga sebagai sumber energi. Sumber karbon dapat tersedia dalam bentuk sumber karbon kimia, seperti glukosa, sukrosa, laktosa atau pati, ataupun dalam bentuk kompleks seperti molases, hidrolisat kayu, selulase, *sulphite liquors*, ester yang dapat terhidrolisis, triasilgliserol, asam lemak, tween, gliserol dan trigliserida atau minyak nabati komersial seperti minyak zaitun.

Pada penelitian kali ini, media yang digunakan untuk media propagasi atau inokulum dan kultivasi (produksi) adalah *Nutrient Broth*. Media yang digunakan untuk inokulum dan kultivasi menggunakan media yang sama. Hal ini bertujuan agar bakteri *P. fluorescens* dapat dengan cepat menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan. Dengan demikian, diharapkan bakteri tidak memerlukan waktu beradaptasi yang terlalu lama. Alasan digunakannya *Nutrient Broth* sebagai media ialah karena media tersebut merupakan media yang paling sederhana yang dapat menumbuhkan *P. fluorescens*.

Sumber karbon yang digunakan adalah minyak zaitun. Penggunaan minyak zaitun diharapkan akan menghasilkan energi yang lebih besar karena sebagian besar minyak nabati mudah dimetabolisme oleh mikroorganisme. Menurut Sikyta (1983) sebagian besar minyak nabati menghasilkan energi dua setengah kali lebih besar dibandingkan karbohidrat. Ginalska, *et al.* (2007)

menyatakan bahwa semakin tinggi sumber karbon dari karbohidrat yang terdapat pada medium produksi lipase, maka aktivitas lipase semakin menurun.

Pemasokan sumber karbon tetap mempunyai batas maksimum walau dapat menyebabkan pertumbuhan mikroorganisme secara optimal. Jika konsentrasi sumber karbon melewati batas maksimum, maka laju pertumbuhan akan terhambat karena adanya perbedaan tekanan osmotik yang dapat menyebabkan plasmolisis dan terjadinya penghambatan sintesis enzim-enzim pada rantai respirasi. Oleh karena itu, konsentrasi minyak zaitun yang digunakan sebagai sumber karbon pada penelitian ini hanya sebesar 1% dari volume total medium produksi (Wang *et al.*, 1979 dalam Permata sari, 1994).

Faktor penting lain yang mempengaruhi pertumbuhan dan pembentukan produk adalah pH media. pH media yang optimum untuk memproduksi lipase dari bakteri *Pseudomonas fluorescens* adalah 7 (Stead, 1986 dalam Faizal, 1994). Oleh karena itu, pH media yang digunakan pada penelitian ini adalah pH 7. Asam amino yang merupakan pusat aktivitas enzim dapat aktif apabila kondisi lingkungan ionnya tepat untuk mensekresikan enzim. Keadaan ionisasi asam amino ditentukan oleh kondisi pH media (Lu & Liska, 1969 dalam Wibowo, 2009). Dengan demikian pH media memiliki peranan penting dalam sekresi enzim.

Selama berlangsungnya proses kultivasi, pH media cenderung mengalami perubahan oleh berbagai sebab. Mengingat pH sangat penting maka dalam kultivasi parameter ini harus terus menerus dikontrol oleh suatu larutan penyangga (Wang, *et al.*, 1979). Oleh karenanya pada penelitian ini pH media yang digunakan adalah buffer pH 7.

Suhu merupakan faktor penting yang mempengaruhi kecepatan reaksi lipase dan sifat emulsi substrat (Lu & Liska, 1969). Suhu optimum ditunjukkan oleh keseimbangan antara pengaruh suhu pada kecepatan reaksi dan pengaruh suhu terhadap kerusakan enzim. Suhu optimal merupakan suhu saat aktivitas metabolisme berjalan baik, akan tetapi hal tersebut berbeda untuk setiap jenis mikroorganismenya dan jenis enzim yang dihasilkan. Suhu optimal pertumbuhan mikroorganisme belum tentu menunjukkan suhu optimal produksi enzim atau aktivitas enzim yang dihasilkan. Pembentukan enzim ekstraseluler akan lebih

baik pada suhu yang lebih rendah dari suhu optimal pertumbuhannya (Dixon et al, 1979). Bakteri *P. fluorescens* merupakan golongan bakteri mesofilik yang memiliki pertumbuhan yang optimal pada suhu 20-40 °C. Sedangkan suhu optimal untuk pembentukan enzim lipase antara 20-45 °C. Pada penelitian ini suhu yang digunakan untuk pertumbuhan dan produksi enzim lipase ekstrak kasar dari bakteri *P. fluorescens* adalah 30 °C.

Bakteri *P. fluorescens* merupakan bakteri aerob obligat. Dengan demikian, bakteri *P. fluorescens* membutuhkan oksigen untuk melakukan respirasi sel aerobiknya. Untuk memasok kebutuhan oksigen pada aktivitas metaboliknya maka dalam pembuatan inokulum dan produksi lipase dilakukan aerasi. Kebutuhan oksigen bagi pertumbuhan mikroorganisme tergantung pada jenis sumber karbon dan efisiensi penggunaan oleh mikroorganisme tersebut (Wang *et al.* 1979). Pada produksi enzim lipase dari bakteri *P. fluorescens*, dilakukan pengocokan dengan kecepatan agitasi 200 rpm. Agitasi berfungsi untuk memudahkan melarutnya oksigen pada media kultivasi dan menghomogenkan suspensi mikroorganisme dan media kultivasi. Adanya pengocokan ini juga berfungsi untuk memenuhi kebutuhan oksigen untuk aktivitas metabolik bakteri *P. fluorescens* yang biasa disebut aerasi.

Enzim lipase yang dihasilkan *P. fluorescens* merupakan enzim ekstraseluler. Enzim ekstraseluler relatif lebih stabil dibandingkan dengan enzim intraseluler. Selain itu, enzim ekstraseluler dapat dihasilkan dengan tingkat kemurnian tinggi serta lebih mudah dipanen. Pada umumnya, enzim ekstraseluler bersifat terinduksi. Produksi enzim tersebut akan meningkat jika ada substrat yang sesuai di sekelilingnya. Tanpa induser, enzim lipase tetap diproduksi, tetapi dalam jumlah yang kecil.

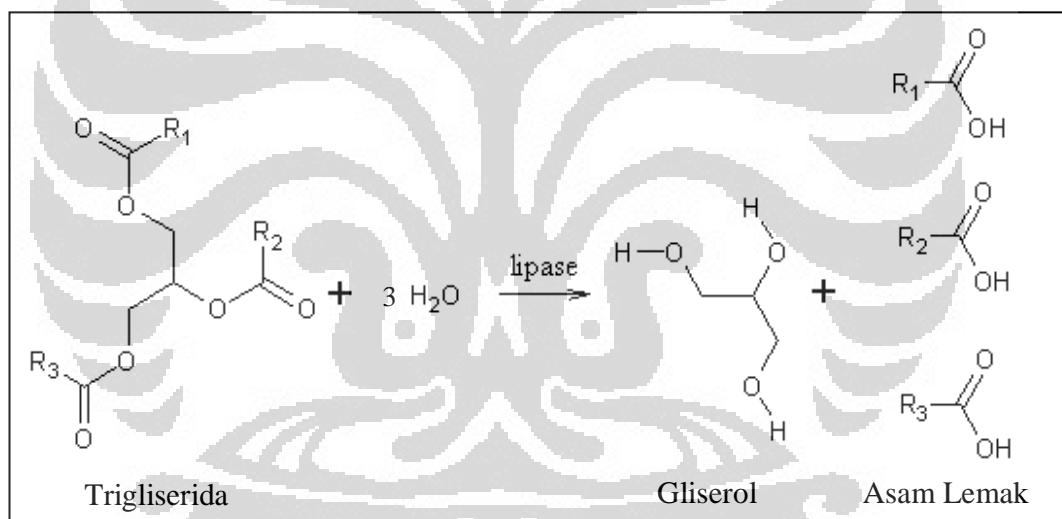
Minyak zaitun sering digunakan sebagai induser dalam memproduksi lipase dari mikroba lokal, karena minyak zaitun merupakan induser yang mudah didapat dibandingkan induser yang lain seperti minyak kacang tanah, minyak biji kapas dan asam oleat. Produksi lipase dari *P. fluorescens* harus diinduksi oleh minyak zaitun (Suzuki, *et al.*, 1988). Penambahan minyak zaitun yang berlebihan dapat menekan produksi lipase. Pada saat *P. fluorescens* ditumbuhkan pada medium tanpa minyak zaitun, aktivitas lipase pada supernatan hampir tidak

terdeteksi. Oleh karena itu, dalam penelitian ini induser yang digunakan adalah minyak zaitun.

#### 4.4 Penentuan Aktivitas Lipolitik

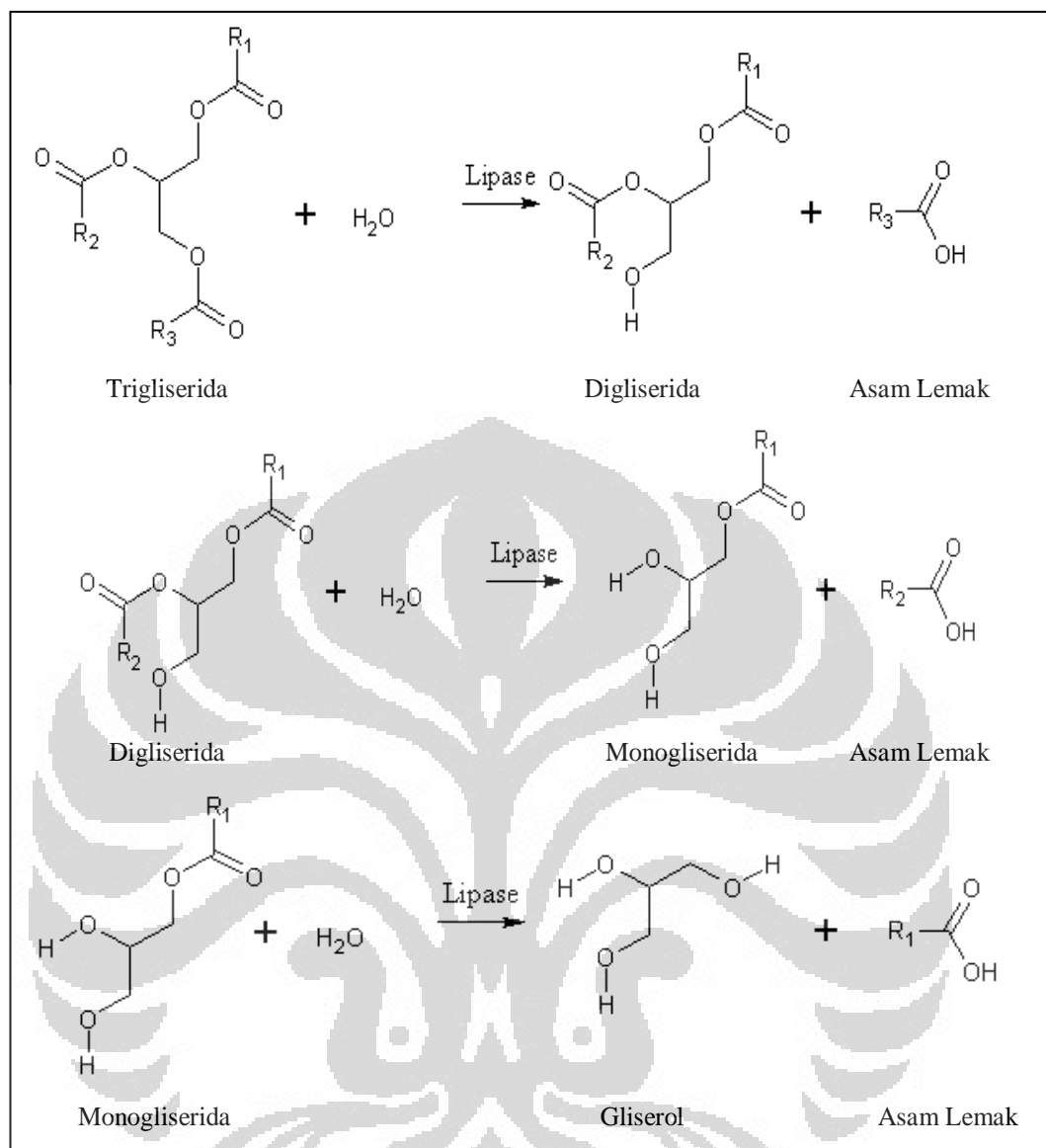
Aktivitas lipolitik satu Unit (U) didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan 1  $\mu\text{mol}$  produk per menit di bawah kondisi percobaan. Dalam penelitian ini, aktivitas lipolitik lipase ditentukan dengan metode titrimetrik menggunakan substrat minyak zaitun (Pereira, *et al.*, 1997). Dasar teori penentuan aktivitas lipolitik enzim lipase ini adalah reaksi hidrolisis lipid atau trigliserida.

Enzim lipase menghidrolisis trigliserida menjadi asam lemak, gliserida parsial (monogliserida atau digliserida), dan gliserol (Macrae, 1983). Dalam keadaan kesetimbangan, reaksi hidrolisis trigliserida secara umum dapat digambarkan sebagai berikut :



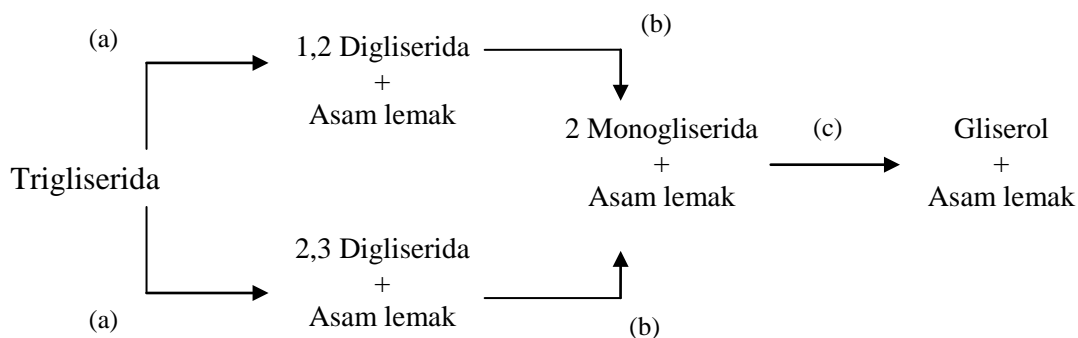
Gambar 4.4 Reaksi Umum Hidrolisis Trigliserida (Macrae, 1983 dalam Faizal, 1993)

Reaksi hidrolisis di atas merupakan hasil reaksi bertahap yang menghasilkan digliserida dan monogliserida sebagai senyawa intermediet.



Gambar 4.5 Tahapan Hidrolisis Trigliserida oleh Lipase (Brockman, 1984)

Reaksi hidrolisis lemak/minyak oleh lipase dapat berjalan pada reaksi sangat cepat, lambat maupun sangat lambat (Winarno, 1983). Hal ini dipengaruhi oleh kerja enzim lipase yang mempunyai spesifitas terhadap lokasi atau posisi esternya. Ester yang letaknya pada bagian luar molekul, yaitu alkohol primer lebih dahulu dipecah, kemudian alkohol sekunder, yaitu pada posisi tengah seperti pada Gambar berikut:

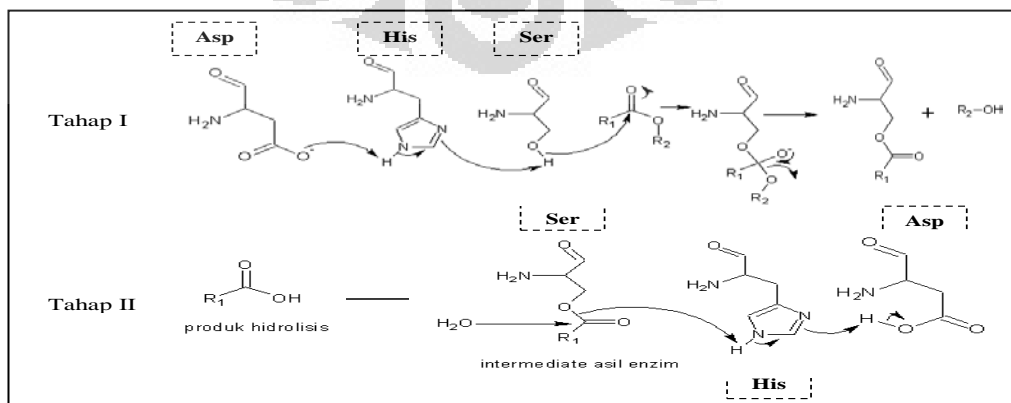


Gambar 4.6 Reaksi sangat cepat (a), reaksi lambat (b), dan reaksi sangat lambat (c) pada hidrolisis trigliserida (Winarno, 1983)

Lipase dalam menghidrolisis lipid yang berikatan dengan karboksil ester membentuk gliserol dan asam lemak. Sisi aktif lipase yang bertanggung jawab adalah serin, histidin, dan aspartat. Jaeger, *et al.* (1999) melaporkan bahwa mekanisme hidrolisis lipid oleh lipase terjadi empat tahap, yaitu pengikatan lipid oleh residu histidin dan penyerangan oleh residu serin, pembentukan transien intermediet tetrahedral, esterifikasi kovalen intermediet, dan pelepasan produk berupa asam lemak dan gliserol.

Mekanisme enzim penghidrolisis amida dan ester, sangat mirip dengan yang digambarkan hidrolisis kimia oleh basa, yaitu gugus nukleofilik dari sisi aktif enzim menyerang gugus karbonil substrat ester atau amida. Yang berfungsi sebagai nukleofil adalah :

- Gugus hidroksil dari serin (misal : esterase hati babi dan lipase dari pankreas atau *Mucor sp.*)
- Gugus karboksil dari asam aspartat (misal : pepsin)
- Gugus thiol dari sistein (misal : papain)



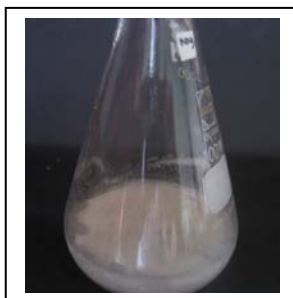
Gambar 4.7 Mekanisme Serin Hidrolase (Faber, 1992)



Serin hidrolase mempunyai tiga residu asam amino : aspartat, histidin, dan serin pada sisi aktif enzim, yang merupakan *actual reacting chemical operator* dan disebut *catalytic triade*. Pengaturan 3 gugus tersebut (Asp, His, Ser) menyebabkan penurunan pK dari OH serin, yang memungkinkannya untuk menyerang gugus C=O substrat R'CO-OR' (tahap I). Gugus asil substrat diikat secara kovalen dengan enzim membentuk intermediet asil-enzim dengan membebaskan R<sup>2</sup>-OH. Kemudian H<sub>2</sub>O dapat menyerang intermediet asil-enzim sehingga terjadi regenerasi enzim dan membebaskan asam karboksilat R'CO-OH (tahap II).

Pada penentuan aktivitas lipolitik, digunakan *gum arabic* sebagai *emulsifier*, karena lipase bekerja pada antar muka (*interface*) fasa air dan fasa minyak. Dengan adanya emulsifier tersebut diharapkan tidak ada perbedaan kepolaran antara substrat (minyak) dan buffer, serta terjadi kontak antara lipase dengan substratnya. Penambahan CaCl<sub>2</sub> dapat meningkatkan kecepatan hidrolisis lipase bila substrat yang digunakan merupakan trigliserida dengan asam lemak rantai panjang (C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>, dan C<sub>18</sub>), sedangkan trigliserida asam lemak rantai pendek atau sedang tidak dipengaruhi oleh penambahan Ca<sup>2+</sup>. Minyak zaitun yang digunakan sebagai substrat, merupakan trigliserida dengan asam lemak dengan rantai panjang (C<sub>18</sub>) maka perlu ditambahkan CaCl<sub>2</sub> untuk meningkatkan kecepatan hidrolisis lipase.

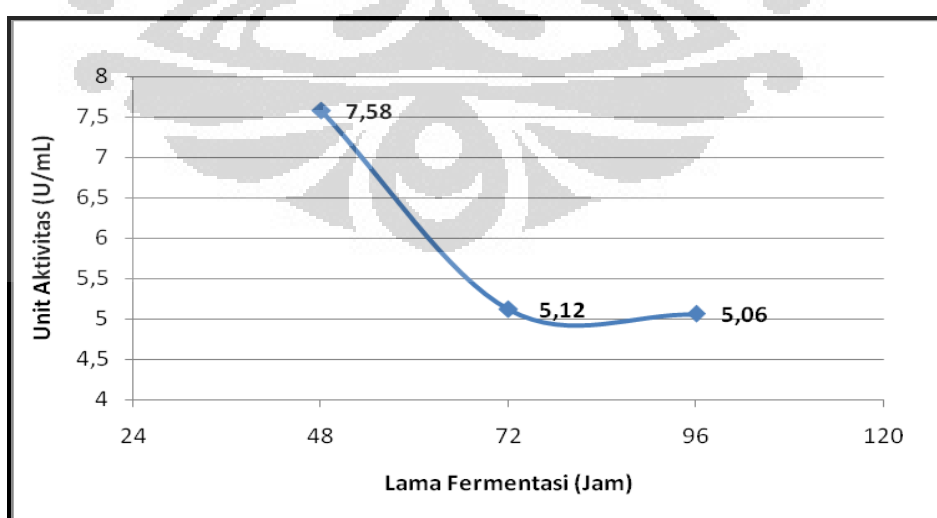
Untuk menghentikan reaksi hidrolisis trigliserida menjadi asam lemaknya, dilakukan penambahan campuran aseton : alkohol 96% (1 : 1 v/v) yang bertujuan untuk menginaktivkan enzim lipase. Hasil inaktivasi enzim terlihat dari panasnya wadah reaksi ketika penambahan campuran aseton : alkohol 96% (1 : 1 v/v) serta timbulnya gumpalan putih. Adanya gumpalan putih (seperti terlihat pada Gambar 4.8) ini mengindikasikan terjadinya pengendapan protein enzim yang mengalami denaturasi.



Gambar 4.8 inaktivasi enzim lipase

#### 4.4.1 Penentuan Lama Fermentasi

Dari grafik di bawah terlihat bahwa unit aktivitas enzim lipase ekstrak kasar terbesar didapat pada waktu fermentasi hari kedua, yaitu sebesar 7,58 (U/mL). Hal ini karena lipase adalah enzim ekstraseluler yang bersifat inducibel, artinya selama substrat lemak dalam medium tersebut masih ada, maka akan terus dihidrolisis menjadi asam lemak. Akumulasi asam lemak ini diduga menghambat pertumbuhan *P. fluorescens* dan dapat menghambat kematian. Selain itu, menurut Faizal (1994), pada waktu kultivasi 72 jam, *P. fluorescens* telah mengalami fase kematian atau penurunan. Pada fase ini laju kematian sel lebih cepat daripada terbentuknya sel-sel baru dan secara otomatis produksi enzim terhenti. Oleh karena itu, pada waktu fermentasi hari ketiga dan keempat terlihat penurunan aktivitas enzim.



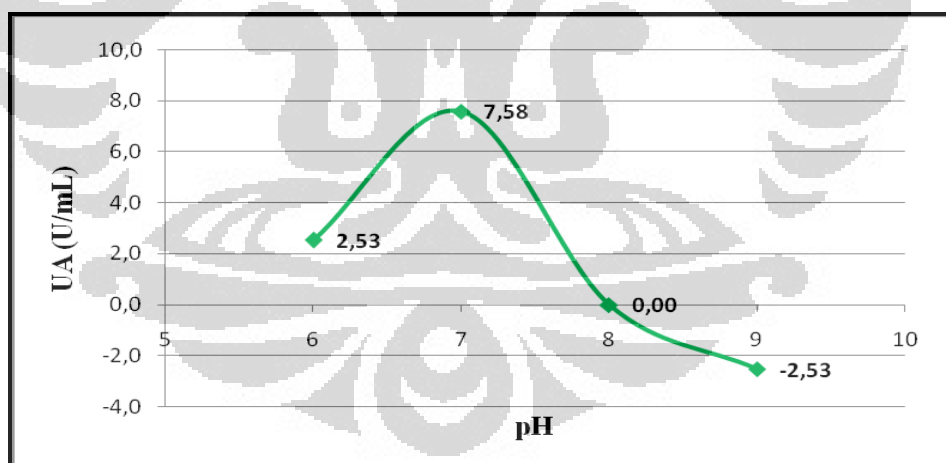
Gambar 4.9 Grafik Hubungan antara Unit Aktivitas Enzim Lipase Ekstrak Kasar terhadap Lama Fermentasi

Oleh karena lipase ekstrak kasar hasil fermentasi hari ke-2 menunjukkan nilai aktivitas terbesar, maka lipase yang digunakan untuk biokatalis reaksi esterifikasi ini digunakan lipase ekstrak kasar hasil fermentasi hari ke-2. Agar reaksi esterifikasi dapat berjalan baik, sebaiknya dilakukan penentuan kondisi optimum aktivitas lipase terlebih dahulu.

#### 4.4.2 Penentuan Kondisi Optimum Aktivitas Enzim Lipase

Untuk menentukan kondisi optimum aktivitas lipase ekstrak kasar, maka dilakukan pengukuran aktivitas lipolitik lipase ekstrak kasar pada berbagai pH dan suhu. Variasi pH yang digunakan ialah antara 6-9, sedangkan variasi suhu yang digunakan ialah antara 25-50 °C.

Enzim memiliki pH optimum yang khas, yaitu pH yang menyebabkan aktivitas enzim maksimal. pH optimum enzim tidak perlu sama dengan pH lingkungan normalnya, dengan pH yang mungkin sedikit di atas atau di bawah pH optimum (Lehninger, 1990). Perubahan pH yang ekstrim juga dapat merusak enzim (Pelczar & Chan, 1981).



Gambar 4.10 Grafik Hubungan Antara Unit Aktivitas Enzim Lipase Ekstrak Kasar terhadap pH

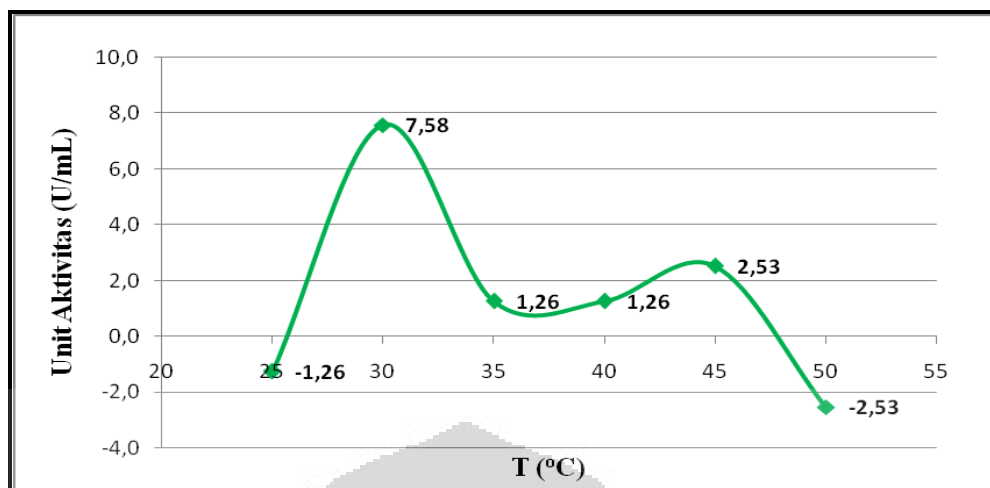
Grafik pada Gambar 4.10 menunjukkan unit aktivitas lipase ekstrak kasar terhadap variasi pH. Pada grafik tersebut terlihat bahwa pH optimumnya terdapat pada pH netral, yaitu pH 7. Kondisi pH yang lebih tinggi atau lebih rendah dari

pH optimum, dapat menurunkan aktivitas enzim. Penurunan aktivitas enzim pada pH di atas pH optimum disebabkan karena terjadinya inaktivasi enzim akibat kerusakan struktur protein enzim.

Derajat keasaman yang terlalu rendah mengakibatkan ion  $H^+$  akan berikatan dengan  $-NH_2$  membentuk  $-NH_3^+$ . Proses pengikatan tersebut menyebabkan ikatan hidrogen antara atom nitrogen dengan atom hidrogen terputus, sehingga enzim terdenaturasi. Kondisi pH yang tinggi mengakibatkan ion  $OH^-$  berikatan dengan atom hidrogen dari gugus  $COOH$  enzim membentuk  $H_2O$ . Hal tersebut mengakibatkan rusaknya ikatan antara atom hidrogen dengan nitrogen atau oksigen, sehingga struktur enzim mengalami kerusakan (Pandey, Benjamin, Soccol, Nigam, Krieger & Soccol).

Variasi suhu dapat berpengaruh pada kecepatan dari tiap tahap reaksi, karena mempengaruhi energi aktivasi Arrhenius. Aktivitas enzim meningkat dengan meningkatnya suhu sampai tercapai aktivitas optimum. Kenaikan suhu selanjutnya, akan menurunkan aktivitas enzim dan akhirnya akan merusak enzim, protein enzim mengalami denaturasi. Dengan kata lain, suhu optimum ditunjukkan oleh keseimbangan antara pengaruh suhu pada kecepatan reaksi dan pengaruh suhu terhadap kerusakan enzim.

Grafik pada Gambar 4.11 menunjukkan bahwa suhu optimumnya terdapat pada suhu  $30\text{ }^\circ\text{C}$ , yaitu sebesar  $7,58\text{ U/mL}$ . Namun, pada suhu  $25$  dan  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , nilai aktivitas enzim negatif. Negatifnya nilai aktivitas enzim pada suhu  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , mungkin disebabkan oleh rusaknya enzim lipase akibat suhu reaksi yang terlalu tinggi. Rendahnya nilai aktivitas enzim pada suhu  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , mungkin karena kerja enzim lipase ekstrak kasar tersebut membutuhkan suhu reaksi yang lebih tinggi.

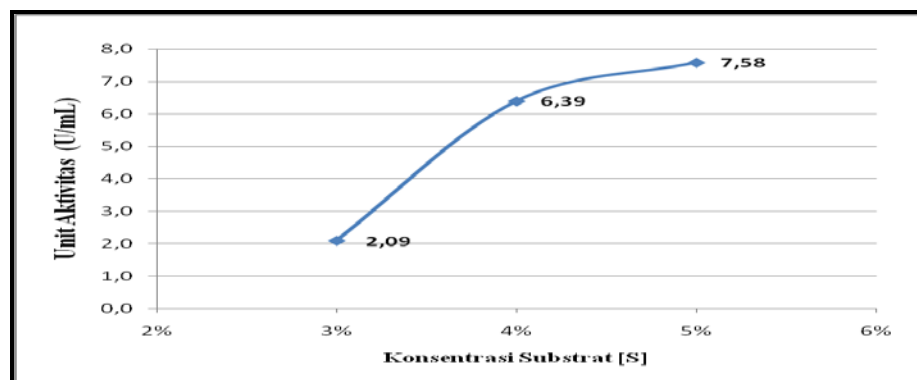


Gambar 4.11 Grafik Hubungan Antara Unit Aktivitas Enzim Lipase Ekstrak Kasar Terhadap Suhu

Data nilai aktivitas lipolitik terlihat di atas bersifat fluktuatif. Hal ini mungkin disebabkan karena hasil isolasi enzim lipase ini belum dimurnikan sehingga mungkin masih banyak kandungan air dan adanya protein non enzim yang terdapat di dalam supernatan.

#### 4.4.3 Pengaruh Konsentrasi Minyak Zaitun (Substrat) terhadap Aktivitas Lipolitik Enzim Lipase Ekstrak Kasar

Konsentrasi substrat (minyak zaitun) juga dapat mempengaruhi aktivitas enzim lipase ekstrak kasar. Pada penelitian ini, dilakukan variasi konsentrasi substrat 3% hingga 5%. Aktivitas lipolitik akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat. Namun, pada konsentrasi tertentu, penambahan konsentrasi substrat tidak meningkat tajam. Hal ini pun terlihat pada Gambar 4.12.



Gambar 4.12 Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Lipolitik Enzim Lipase

Nilai aktivitas enzim lipase mengalami peningkatan yang sangat tajam pada konsentrasi minyak zaitun 4%, sedangkan pada konsentrasi 5 %, peningkatan aktivitas enzim tidak begitu tajam. Pada konsentrasi substrat yang lebih besar lagi mungkin nilai aktivitas enzim lipase akan statis karena sisi aktif enzim telah jenuh dengan substrat.

Nilai unit aktivitas lipase bergantung pada posisi atau lokasi ester, asam lemak dan gliserida parsial. Berdasarkan posisi ester, lipase terdiri dari dua jenis, yaitu lipase non-spesifik dan lipase spesifik. Lipase non spesifik akan menghidrolisis trigliserida menjadi asam lemak dan gliserol dengan 1,2 (2,3)-digliserida, 1,3-digliserida dan monogliserida sebagai hasil antara. Sedangkan lipase spesifik akan menghasilkan asam lemak dengan mengkatalisis hanya bagian posisi luar molekul trigliseridanya dan mengubahnya menjadi asam lemak bebas 1,2 (2,3)-digliserida dan 2-monogliserida sebagai produk akhirnya. Lipase *P.fluorescens* termasuk lipase spesifik (Macrae, 1983).

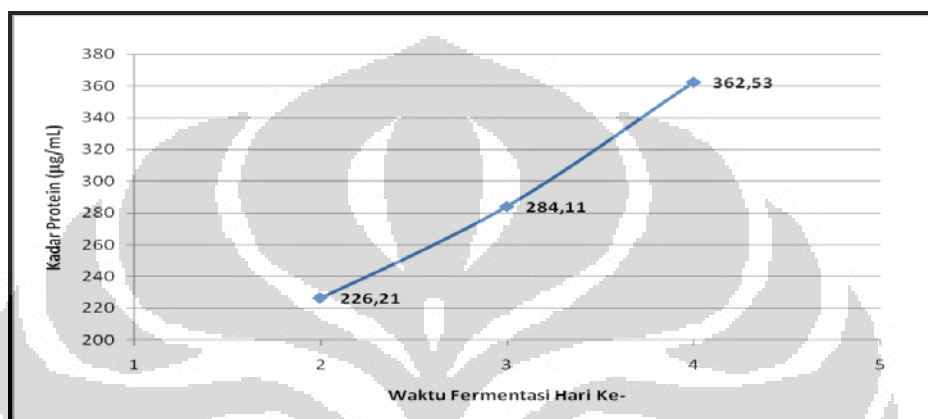
Tabel 4.2 Spesifitas Aktivitas Lipase pada Reaksi Pemutusan posisi ester trigliserida oleh mikroorganism

Spesifitas	Sumber Lipase
Pemutusan posisi 1- atau 3-	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>P. fragi</i> , <i>P. geniculata</i> , <i>A. niger</i> , <i>R. delemar</i> , <i>R. oligosporus</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> .
Pemutusan posisi 1-, 2-, 3-	<i>S. aureus</i> , <i>A. flavus</i>

Sumber : Shahani (1975); Hou & Johnston, 1992)

#### 4.5 Penentuan Kadar Protein

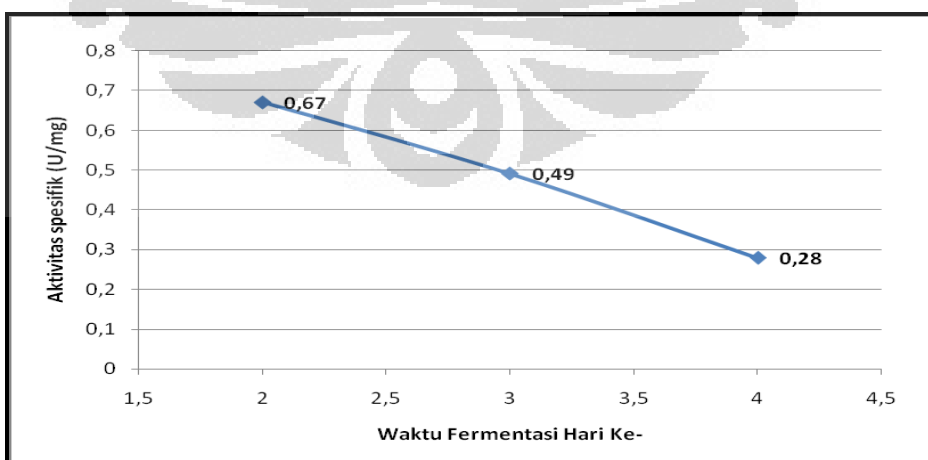
Dari persamaan garis pada kurva standar BSA (pada Lampiran 3), dapat diketahui kadar protein dalam larutan enzim lipase ekstrak kasar pada waktu fermentasi hari kedua hingga hari ke empat. Pada Grafik 4.13 terlihat bahwa kadar protein pada hasil fermentasi hari ke-4 paling besar.



Gambar 4.13 Grafik Kadar Protein dalam Larutan Enzim Ekstrak Kasar pada Fermentasi Hari ke-2 hingga ke-4

#### 4.6 Penentuan Aktivitas Spesifik

Aktivitas spesifik (unit/mg protein) lipase dapat diketahui, dengan menentukan aktivitas lipolitik per mg protein berdasarkan data aktivitas lipolitik total (unit) dan kadar protein total (mg).



Gambar 4.14 Grafik Aktivitas Spesifik Enzim Ekstrak Kasar pada Fermentasi Hari ke-2 hingga ke-4.

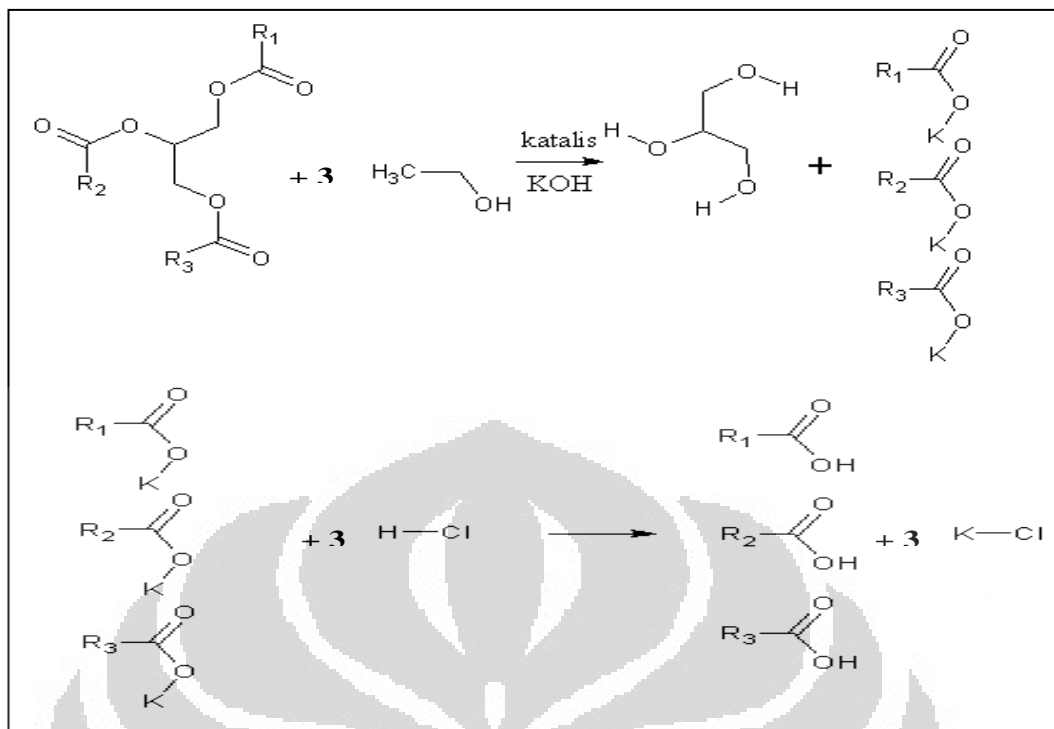
Pada Gambar 4.16 terlihat bahwa nilai aktivitas spesifik yang didapat dalam penelitian ini terlalu rendah. Nilai aktivitas spesifik terbesar terdapat pada enzim ekstrak kasar pada fermentasi hari ke-2, yaitu sebesar 0,67 U/mg. Hal ini mungkin disebabkan oleh karena enzim ini merupakan enzim ekstrak kasar yang tidak dimurnikan terlebih dahulu sehingga masih terdapat protein non enzim yang larut dalam supernatan.

#### **4.7 Hidrolisis Trigliserida**

Dalam proses hidrolisis trigliserida (minyak kelapa) untuk membentuk asam lemak, digunakan katalis basa, yaitu KOH dalam etanol. KOH/NaOH dalam etanol yang berfungsi sebagai katalis dalam proses saponifikasi sedangkan KOH/NaOH dalam air hanya membentuk ion  $K^+/Na^+$  dan  $OH^-$ . Oleh karena itu, KOH dalam etanol digunakan untuk menghindari terbentuknya sabun yang berwujud padat.

Triasilgliserol memiliki berat molekul (BM) yang tinggi dan titik didih yang tinggi. Dengan demikian, diperlukan kondisi reaksi dengan suhu yang tinggi untuk memutuskan ikatan-ikatan triasilgliserol. Namun, ester etil asam lemak memiliki titik didih yang lebih rendah daripada asam lemak. Suhu yang diperlukan untuk memutuskan ikatan ester adalah 60-65 °C.

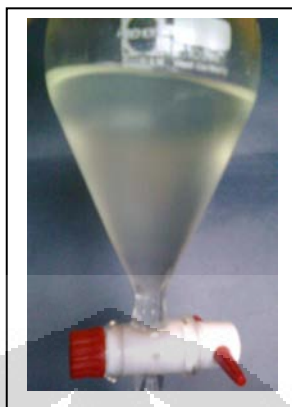




Gambar 4.15 Reaksi Hidrolisis Trigliserida Minyak Kelapa dengan Katalis Basa

Penggunaan KOH lebih baik daripada NaOH, karena sifat kalium yang lebih reaktif dan mudah membentuk garam asam lemak jika dibandingkan dengan Natrium. Garam kalium asam karboksilat pada umumnya lebih larut dalam air daripada garam natrium asam karboksilat. Natrium dan kalium merupakan unsur-unsur yang berada dalam satu tabel berkala, yaitu termasuk golongan alkali. Dalam satu golongan kereaktifan unsur-unsur golongan alkali bertambah dari atas ke bawah. Sifat elektropositif bertambah dari atas ke bawah. Dengan demikian, kalium cenderung membentuk ion positif, K<sup>+</sup>. Hal ini karena semakin besar jari-jari atom semakin jauh elektron valensi dari inti dan semakin mudah dilepaskan. Hal ini juga dapat ditunjukkan dengan energi ionisasi pertama unsur-unsur ini dimana energi ionisasi Na dan K masing-masing ialah 496 dan 419 kJ/mol. Dari segi kekuatan kebasaan hidroksida, sifat kebasaan hidroksida unsur-unsur golongan alkali dari atas ke bawah semakin bertambah. Dalam proses pembuatan sabun, KOH juga merupakan alkali yang biasa digunakan. Hal ini disebabkan kestabilan KOH yang baik dan sabun yang terbentuk lebih lembut daripada menggunakan NaOH.

Dalam reaksi hidrolisis trigliserida minyak kelapa didapat asam lemak yang berwujud cairan berwarna bening (Gambar 4.16).



Gambar 4.16 Asam Lemak Minyak Kelapa

Hal ini disebabkan oleh sebagian besar asam lemak yang terkandung dalam minyak kelapa adalah asam lemak rantai sedang sehingga pada suhu kamar berwujud cair.

#### **4.8 Sintesis Ester Sukrosa (Reaksi Esterifikasi)**

Reaksi esterifikasi pembentukan ester asam lemak sukrosa dilakukan dengan katalis enzim lipase ekstrak kasar yang memiliki aktivitas enzim paling besar, yaitu enzim lipase ekstrak kasar hasil fermentasi hari kedua. Kondisi reaksi yang digunakan ialah kondisi optimum enzim lipase ekstrak kasar, yaitu pada pH=7 dan suhu 30 °C. Reaksi esterifikasi dilakukan sampai 96 jam dan dilakukan pengukuran produk setiap 24 jam.

##### **4.8.1 Determinasi Reaksi Esterifikasi**

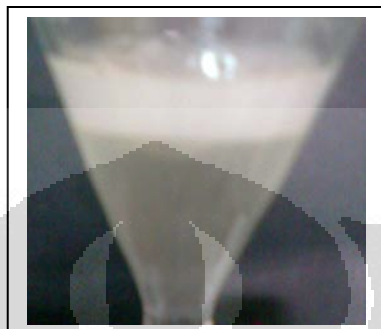
Sebelum produk reaksi dikarakterisasi reaksi esterifikasi diakhiri dengan penambahan NaOH 0,1 N berlebih. Penambahan NaOH menetralkan fraksi asam laurat yang tidak bereaksi. Ketika ditambahkan NaOH, larutan menjadi keruh. Kelebihan basa dititrasi dengan HCl 0,1 N.

##### **4.8.2 Pemurnian Ester Sukrosa**

Sebelum produk ester sukrosa diidentifikasi, maka produk ini harus dimurnikan terlebih dahulu. Pada pemurnian produk ester asam lemak sukrosa,

**Universitas Indonesia**

campuran reaksi ditambahkan kloroform. Penambahan kloroform berfungsi untuk menarik produk ester asam lemak sukrosa yang terbentuk. Setelah itu, campuran ditambahkan NaOH dan diekstraksi dengan corong pisah. NaOH berfungsi untuk menarik kelebihan HCl serta air yang ada dalam larutan.



Gambar 4.17 Hasil Ekstraksi dengan Kloroform dan NaOH  
(Lapisan atas: larutan yang larut dalam NaOH ; Lapisan bawah : larutan yang larut dalam kloroform)

Untuk menghilangkan NaOH, campuran dicuci kembali dengan air dan pisahkan dengan kloroform agar produk ester asam lemak sukrosa benar-benar murni. Kemudian lapisan yang mengandung kloroform selanjutnya siap untuk diidentifikasi.



Gambar 4.18 Pemurnian Ester Sukrosa Pencucian dengan Air  
(Lapisan atas : air ; Lapisan bawah : produk yang terlarut dalam kloroform)

#### 4.8.3 Uji Adanya Gugus Ester

Untuk mengetahui apakah produk ester sukrosa sudah terbentuk atau belum, maka dilakukan uji adanya gugus ester. Sebelum dilakukan uji ini,

campuran reaksi ditambahkan metanol. Pada saat penambahan metanol, larutan menjadi bertambah jernih.



Gambar 4.19 Penambahan Metanol pada Produk

Setelah penambahan metanol, campuran ditambahkan indikator fenolftalein dan setetes NaOH encer. Kemudian campuran tersebut dipanaskan dalam penangas air hingga warna merah muda menghilang. Hilangnya warna merah muda setelah pemanasan menandakan adanya gugus ester. Ikatan ester akan terputus dalam beberapa menit pada suhu 60-65 °C maka adanya warna merah muda yang menandakan terdapatnya NaOH bebas, akan bereaksi dengan asam lemak yang terputus dari produk ester asam lemak sukrosa.

Namun, pada uji adanya gugus ester dalam penelitian ini, produk ester asam lemak sukrosa belum terbentuk. Hal ini terlihat ketika ditambahkan setetes NaOH encer, tidak menimbulkan warna merah muda dan larutan menjadi keruh (Gambar 4.20).

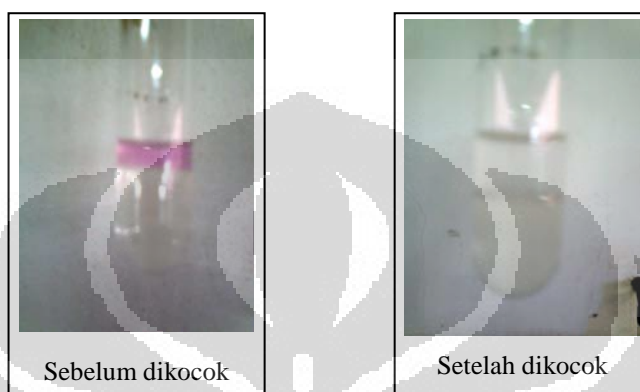


Gambar 4.20 Hasil Uji Adanya Gugus Ester

Tidak adanya warna merah muda serta keruhnya larutan tersebut saat penambahan NaOH, mengindikasikan bahwa larutan tersebut masih mengandung asam lemak. Asam lemak yang masih berada di dalam larutan bereaksi dengan NaOH

membentuk sabun, sehingga menimbulkan kekeruhan pada larutan dan ketika ditambahkan fenolftalein, larutan tidak berwarna merah muda.

Ketika diberikan penambahan NaOH berlebih hingga terbentuk lapisan berwarna merah muda pada lapisan atas (sebelum campuran dikocok), larutan tidak berwarna merah muda (setelah campuran dikocok) dan terbentuk dua lapisan.



Dengan demikian produk ester asam lemak sukrosa pada campuran reaksi tersebut belum terbentuk dan masih terdapat asam lemak. Belum terbentuknya produk ester asam lemak sukrosa mungkin disebabkan oleh aktivitas enzim lipase ekstrak kasar yang terlalu kecil.

Menurut Reslow, *et al.* (1987) dan Singh (2008), dengan menggunakan log P dapat ditemukan kecenderungan proporsional antara aktivitas katalitik yang tinggi dengan hidrofobisitas yang tinggi pula. Nilai P diberi batasan sebagai koefisien partisi dari 1-oktanol dan air. Dengan rumusan sebagai berikut :

$$P = \frac{[\text{pelarut}]_{\text{oktanol}}}{[\text{pelarut}]_{\text{air}}}$$

Pelarut organik dengan nilai log P > 4 akan menyebabkan aktivitas katalitik menjadi lebih tinggi. Pelarut organik yang memiliki nilai log P > 4 di antaranya heptana, oktana, dekanol, dan heksadekana. Pelarut organik dengan nilai 2 < log P < 4 akan menyebabkan aktivitas katalitik enzim lipase mengalami penurunan. Pelarut organik yang memiliki nilai 2 < log P < 4, di antaranya : n-heksana, toluena, benzena, heptanol dan oktanol. Sementara itu, pelarut organik dengan nilai log P < 2 akan menyebabkan aktivitas enzim lebih rendah dari

aktivitas awal pada lingkungan aqueousnya. Pelarut organik yang memiliki nilai  $\log P < 2$  adalah alkohol-alkohol rantai pendek.

Pelarut heksana memiliki nilai  $\log P=3,5$  (Elisabeth, 2002). Berdasarkan penjelasan di atas dapat disimpulkan bahwa adanya pelarut n-heksana sebagai pelarut organik dalam reaksi esterifikasi enzimatis ini akan menurunkan sifat katalisis enzim lipase ekstrak kasar. Dengan demikian, tidak terbentuknya produk ester asam lemak sukrosa diakibatkan oleh terjadinya penurunan aktivitas enzim lipase dalam pelarut organik yang digunakan.

Adanya pelarut organik akan membuat perubahan konformasi sisi aktif enzim, sehingga mengakibatkan berkurangnya sifat katalitik dari enzim lipase. Hidrofobitas dari pelarut heksana tersebut diduga meningkatkan interaksi hidrofobik dari selubung enzim. Terbukanya selubung enzim ini membuat sisi katalitik lipase menjadi terbuka terhadap sistem. Namun, tingginya konsentrasi heksana pada sistem dapat menghidrasi lipase yang digunakan sehingga konsentrasi minimal air yang diperlukan oleh enzim untuk mempertahankan konformasi menjadi hilang. Menurut Klibanov (1986) dalam Sesilia (1999) menyatakan bahwa pada reaksi katalitik enzim diperlukan sejumlah air yang dikenal sebagai air esensial. Air tersebut bersifat esensial bagi suatu enzim untuk dapat melakukan fungsi katalitiknya. Selain itu, menurut Rupley, *et al.* (1983) dalam Sesilia (1999), air esensial merupakan jumlah air minimum suatu enzim untuk mempertahankan konformasinya sehingga sifat katalitiknya tidak hilang. Jika air esensial tersebut tetap dapat melapisi molekul enzim, maka penggantian sisa-sisa air yang lain dengan pelarut organik tidak akan mengganggu aktivitas enzim.

Oleh karena itu, reaksi esterifikasi enzimatis antara asam lemak dari minyak kelapa dengan sukrosa tidak berjalan dengan sempurna, bukan hanya disebabkan oleh enzim lipase ekstrak kasar yang terlalu kecil melainkan oleh hilangnya sifat katalitik dari enzim lipase.

## **BAB 5**

### **PENUTUP**

#### **5.1 Kesimpulan**

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

1. Unit aktivitas enzim lipase ekstrak kasar terbesar terdapat pada lama fermentasi 48 jam.
2. Kondisi optimum aktivitas lipolitik enzim lipase ekstrak kasar adalah pada suhu 30°C dan pH 7, yaitu sebesar 7,58 U/mL.
3. Reaksi esterifikasi enzimatik antara asam lemak dari minyak kelapa dengan sukrosa dilakukan pada kondisi optimum aktivitas enzim lipase ekstrak kasar pada waktu fermentasi hari kedua, yaitu pada pH 7 dan suhu 3<sup>0</sup>C. Produk ester asam lemak sukrosa pada campuran reaksi tersebut belum terbentuk dan masih terdapat asam lemak.

#### **5.2 Saran**

1. Untuk penelitian selanjutnya, hendaknya digunakan enzim lipase yang tersedia secara komersial atau apabila melakukan isolasi enzim lipase, hendaknya dilakukan pemurnian terlebih dahulu.
2. Untuk penelitian selanjutnya, hendaknya digunakan isolat dari kultur kapang agar dihasilkan aktivitas enzim lipase yang besar.
3. Untuk penelitian selanjutnya, sebaiknya ditentukan aktivitas lipase ekstrak kasar pada waktu fermentasi 24 jam.
4. Untuk penelitian selanjutnya, sebaiknya dalam reaksi esterifikasi, menggunakan pelarut organik yang memiliki nilai log P > 4, seperti : heptana, oktana, dekanol, dan heksadekana.
5. Untuk penelitian selanjutnya, hendaknya digunakan jenis karbohidrat yang lebih sederhana lagi seperti fruktosa agar produk ester asam lemak karbohidrat memiliki % konversi yang lebih besar.

## DAFTAR REFERENSI

- Coconut oil*. Januari 21, 2010. [http://id.wikipedia.org/wiki/Minyak\\_kelapa](http://id.wikipedia.org/wiki/Minyak_kelapa)
- Informasi spesies*. Februari 12, 2010. <http://www.plantamor.com/index.php?plant=365>
- Kandungan buah kelapa dilihat dari segi kesehatan*. Januari 21, 2010. <http://www.smallcrab.com/kesehatan/643-kandungan-buah-kelapa-dilihat-dari-segi-kesehatan>
- Manfaat lengkap minyak VCO, minyak kelapa*. Januari 21, 2010. <http://www.minyak-kelapa.blogspot.com/>
- Minyak kelapa, minyak goreng yang paling aman dan paling sehat*. Januari 21, 2010. <http://www.indonesiaindonesia.com/f/8949-minyak-kelapa-minyak-goreng-aman-sehat/>
- Minyak kelapa murni*. Januari 21, 2010. <http://tukino49.blogspot.com/>
- Pengolahan minyak kelapa*. Januari 21, 2010. <http://www.pustaka-deptan.go.id/publikasi/wr272051.pdf>
- Rhodamine B*. Mei 27, 2010. [http://www.merck-chemicals.co.id/rhodamine-b-c-i-45170/MDA\\_CHEM-107599/p\\_FM6b.s1LQe0AAAEWB.EfVhTI](http://www.merck-chemicals.co.id/rhodamine-b-c-i-45170/MDA_CHEM-107599/p_FM6b.s1LQe0AAAEWB.EfVhTI)
- Teknologi proses pengolahan minyak kelapa*. Februari 12, 2010. [http://dekindo.com/content/teknologi/Proses\\_Pengolahan\\_Minyak\\_Kelapa.pdf](http://dekindo.com/content/teknologi/Proses_Pengolahan_Minyak_Kelapa.pdf)
- Thermostable lipase*. Mei 27, 2010. <http://www.biology.ed.ac.uk/research/institutes/structure/structures.php>
- Adamopoulos, L. (2006). *Understanding the formation of sugar fatty acid esters*. Faculty of North Carolina State University.
- Amin, S. (2009). *Cocopreneurship : Aneka peluang bisnis dari kelapa*. Yogyakarta: Lily Publisher.
- Budyanti, S. (1994). *Mempelajari pengaruh komposisi media dan penggunaan induser pada produksi enzim lipase dari candida rugosa*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

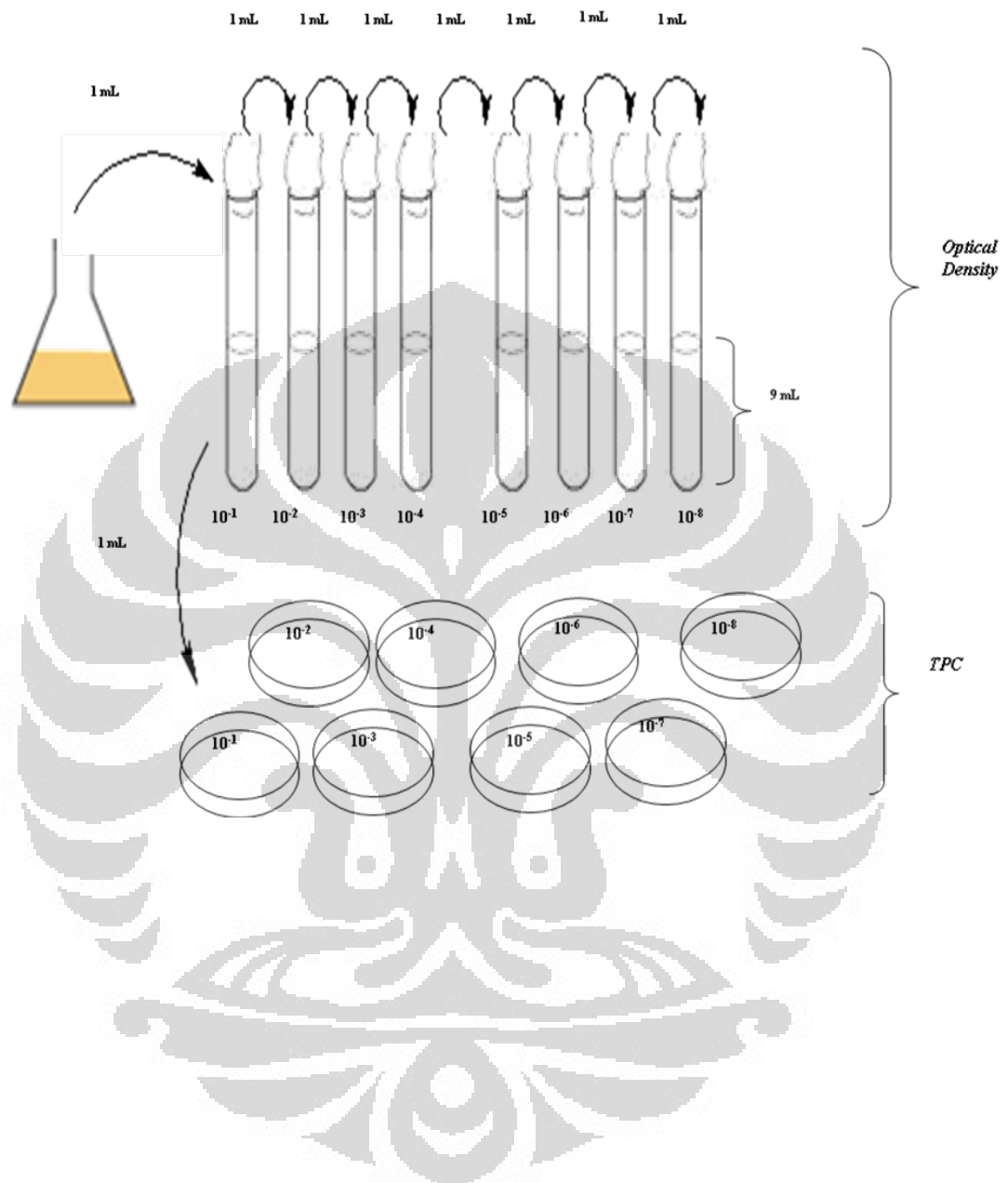


- Chumaidi, A, *et al.* (2009). *Amobilisasi lipase dari Bacillus substilis sebagai biokatalisator pembuatan biodiesel dari minyak randu*. Malang : Politeknik Negeri Malang Jurusan Teknik Kimia.
- Dandekar, PP *et al.* (2009). *Enzymatic synthesis of sucrose ester from mango kernel fat*. India : Institute of Chemical Technology.
- Elisabeth H.N, T. (2002). *Mempelajari Stabilitas Enzim Lipase Ekstraselular dari Kapang Rhizopus orizae Tr 32 dalam Pelarut Heksana, Toluena dan Benzena*. Bogor : Institut Pertanian Bogor
- Faizal, I. (1994). *Penentuan media kultivasi dan penambahan minyak zaitun sebagai induser pada produksi lipase oleh Pseudomonas fluorescens*. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian IPB.
- Handayani, R, *et al.* (2005). *Transesterifikasi ester asam lemak melalui pemanfaatan teknologi lipase*. Bogor: Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.
- Judoamidjojo, M, dkk. (1990). *Teknologi fermentasi*. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Ketaren, S. (1986). *Pengantar teknologi minyak dan lemak pangan*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Kojima, Y. (2003). *Purification and characterization of the lipase from Pseudomonas fluorescens HU380*. Japan. Kyoto University.
- Koshland D.E. (1958). *Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis*. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 44, 98–104.
- Kulkarni, N. (2002). *Studies on lipase enzyme from Pseudomonas Fluorescens NS2W*. *Chemical engineering division national chemical laboratory pune. India*.
- Moentamaria, D, *et al.* (2009). *Kajian awal pembuatan biokatalisator lipase teramobil dari Mucor miehei untuk pengolahan minyak randu menjadi biodiesel*. Malang : Politeknik Negeri Malang Jurusan Teknik Kimia.
- Nuraeni, F. (2008). *Sintesis mono-diasilgliserol (M\_DAG) dari destilat asam lemak minyak sawit (DALMS) melalui esterifikasi enzimatis*. Bogor: Sekolah Pascasarjana IPB.
- Nurosid, *et al.* (2008). *Kemampuan Azospirillum sp. JG3 dalam menghasilkan lipase pada medium campuran dedak dan onggok dengan waktu inkubasi berbeda*. Purwokerto : Universitas Jendral Soedirman.

- Permatasari, T. (1994). *Kajian pengaruh jenis media dan penambahan minyak zaitun sebagai induser pada produksi enzim lipase oleh Candida lipolytica*. Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- Rindengan, B. (2006). *Pembuatan dan pemanfaatan minyak kelapa murni*. Depok: Penebar Swadaya.
- Singh, M. (2007). *Transesterification of primary and secondary alcohols using Pseudomonas aeruginosa lipase*. India. National Institute of Pharmaceutical Education and Research.
- Sumarsih, S. (2000). *Isolasi dan karakterisasi Rhizopus stolonifer UICC 137 serta aplikasinya untuk resolusi (R-S)-Ibuprofen metil ester*. Depok : FMIPA Universitas Indonesia.
- Tika, N, et al. (2007). *Isolasi enzim lipase termostabil dari Bakteri termofilik isolat air panas banyuwedang kecamatan Gerobak, Buleleng Bali*. Singaraja: IKIP Negeri Singaraja.
- Watanabe, et.al. (2003). *Optimization of reaction condition for the production of DAG using immobilized 1,3-regiospecific lipase lipozyme RM IM*. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 80, 12.
- Wibowo, D. (2009). *Pembuatan Agen Pengemulsi Melalui Reaksi Esterifikasi Enzimatis Gliserol dan Asam Laurat Menggunakan Katalis Lipase Mucor miehei yang Diimmobilisasi*. Depok : Fakultas Teknik, Departemen Teknik Kimia, Universitas Indonesia.

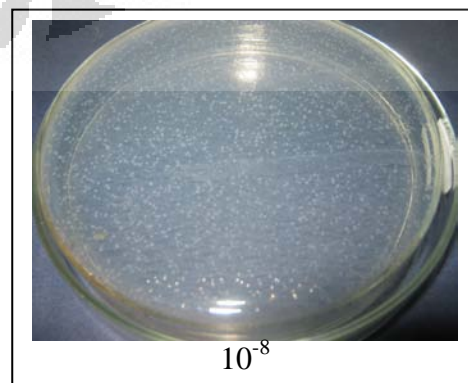
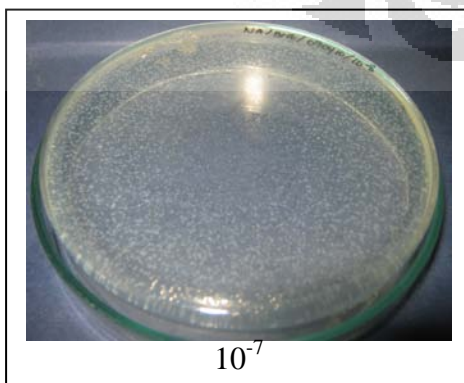
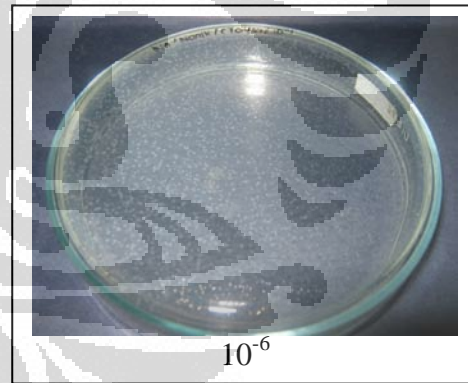
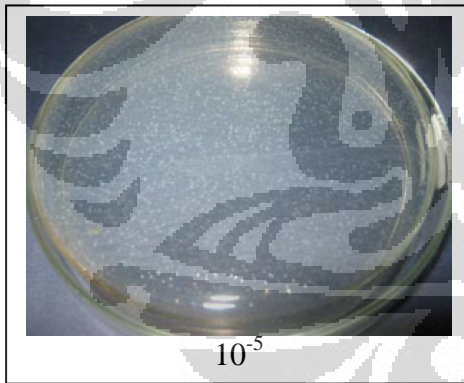
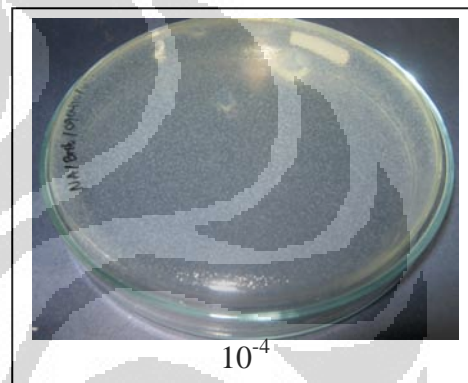
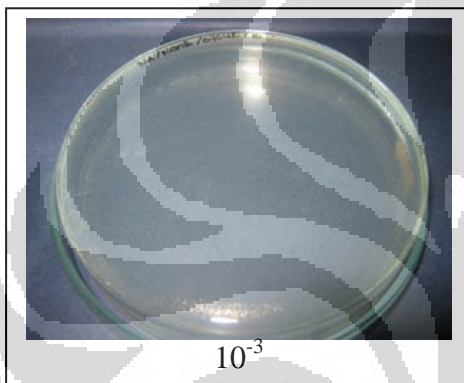
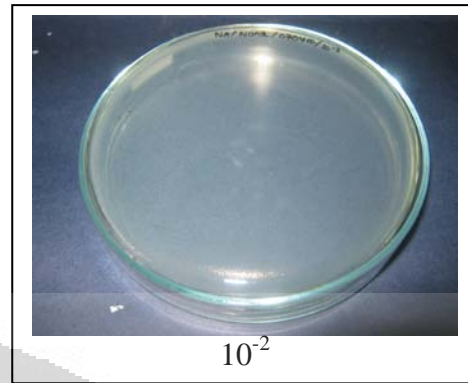
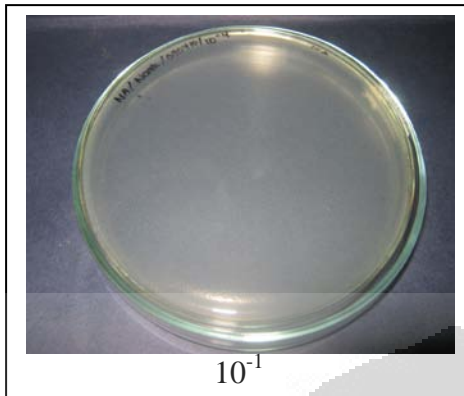
Lampiran 1.

Gambar Prosedur Kerja Penentuan Jumlah Bakteri



Lampiran 2

Foto Hasil *Total Plate Count*

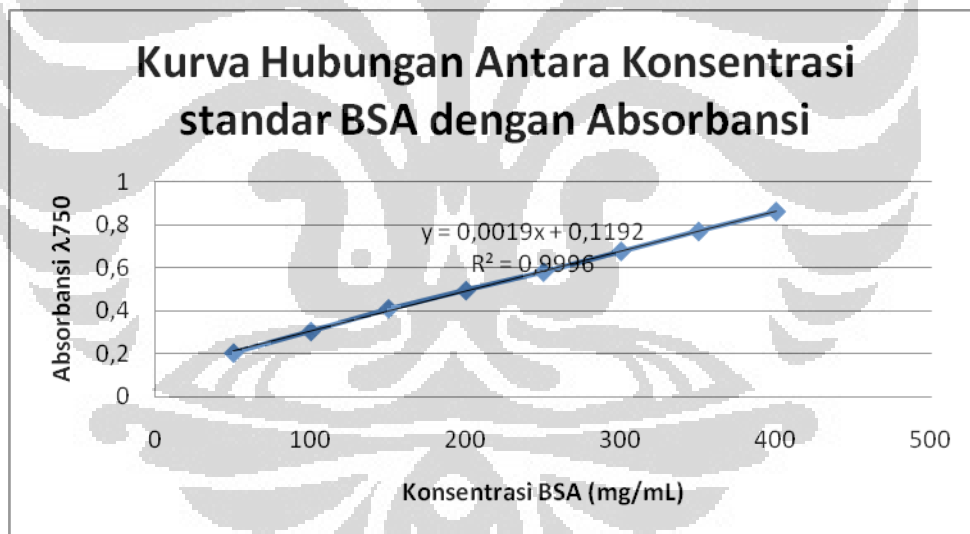


Lampiran 3.

Data *Bovine Serum Albumin* Standar

Tabel L.2 Konsentrasi *Bovine Serum Albumin* Standar

[C] BSA ( $\mu\text{g/mL}$ )	$A_{\lambda 750}$
50	0,204
100	0,304
150	0,409
200	0,493
250	0,579
300	0,675
350	0,767
400	0,859



Gambar L.2 Kurva Standar BSA

Lampiran 4.

Data Aktivitas Enzim Lipase

Tabel L.3.1 Aktivitas Enzim Lipase pada Lama Fermentasi hari ke-2 hingga ke-4

Unit Aktivitas (U/mL)	Lama Fermentasi (Jam)
7,58	48
5,12	72
5,06	96

Tabel L.3.2 Unit Aktivitas Enzim Lipase pada berbagai pH pada hari ke-2

pH larutan	Unit Aktivitas Enzim Lipase (U/mL)
6	2,53
7	7,59
8	0
9	-2,53

Tabel L.3.3 Aktivitas Enzim Lipase di berbagai Temperatur pada Fermentasi hari ke-2

Temperatur (°C)	Unit Aktivitas Enzim Lipase (U/mL)
25	-1,27
30	7,59
35	1,27
40	1,27
45	2,53
50	-2,53

Tabel L.3.1 Unit Aktivitas Enzim Lipase pada berbagai pH pada hari ke-2

Konsentrasi Substrat [S] (% v/v)	Unit Aktivitas Enzim Lipase (U/mL)
3%	2,09
4%	6,39
5%	7,58

Lampiran 5.

Data Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik dalam Larutan Enzim Lipase Ekstrak Kasar

Tabel L.4.1 Kadar Protein dalam Larutan Enzim Lipase Ekstrak Kasar pada Fermentasi Hari ke-2 hingga ke-4

Waktu Fermentasi	Absorbansi (A)	Kadar Protein ( $\mu\text{g/mL}$ )
Hari Ke-2	0,549	226,21
Hari Ke-3	0,659	284,11
Hari Ke-4	0,808	362,53

Tabel L.4.2 Aktivitas Lipolitik, Kadar Protein Total, dan Aktivitas Spesifik Enzim Ekstrak Kasar.

Waktu Fermentasi	Aktivitas Lipolitik ( $\mu\text{mol/mg}$ menit)	Kadar Protein ( $\mu\text{g/mL}$ )	Kadar Protein Total (mg)	Aktivitas Spesifik (Unit/mg)
Hari ke-2	7,58	226,21	11,31	0,67
Hari ke-3	6,98	284,11	14,21	0,49
Hari ke-4	5,06	362,53	18,13	0,28