



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ISOLASI LIPASE EKSTRAK KASAR DARI *Pseudomonas aeruginosa*  
SEBAGAI BIODOKUMENTASI DALAM STUDI PENDAHULUAN  
REAKSI ESTERIFIKASI ANTARA ASAM LEMAK MINYAK SAWIT  
DENGAN SUKROSA**

**SKRIPSI**

**BRITSANTI DEWI HERNAWATI  
0606068953**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM KIMIA  
DEPOK  
JULI 2010**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ISOLASI LIPASE EKSTRAK KASAR DARI *Pseudomonas aeruginosa* SEBAGAI BIOKATALISATOR DALAM STUDI PENDAHULUAN REAKSI ESTERIFIKASI ANTARA ASAM LEMAK MINYAK SAWIT DENGAN SUKROSA**

**SKRIPSI**

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

**BRITSANTI DEWI HERNAWATI  
0606068953**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN  
ALAM  
PROGRAM KIMIA  
DEPOK  
JULI 2010**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Britsanti Dewi Hernawati

NPM : 0606068953

Tanda Tangan :

Tanggal : 1 Juli 2010

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Britsanti Dewi Hernawati  
NPM : 0606068953  
Program Studi : Kimia S1 Reguler  
Judul Skripsi : Isolasi Lipase Ekstrak Kasar dari *Pseudomonas aeruginosa* sebagai Biokatalisator dalam Studi Pendahuluan Reaksi Esterifikasi antara Asam Lemak Minyak Sawit dengan Sukrosa

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Kimia S1 Reguler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Prof. Dr. Sumi Hudyono, PWS (.....)  
Pembimbing : Dra. Sri Handayani M.Biomed (.....)  
Penguji : Dra. Susilowati HS, M.Sc (.....)  
Penguji : Dra. Siswati, M.Si (.....)  
Penguji : Dra. Tresye Utari, M.Si (.....)

Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : Juli 2010

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, karena atas rahmat dan petunjuk-Nya akhirnya penulis dapat menyelesaikan penelitian serta penulisan skripsi ini tepat pada waktunya. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Departemen Kimia pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Penulis mengucapkan terima kasih secara khusus kepada Prof. Dr. Sumi Hudiyo, PWS selaku Pembimbing I serta Dra. Sri Handayani, M.Biomed selaku Pembimbing II atas bimbingan, masukan dan arahan yang selama ini telah diberikan kepada penulis. Terima kasih juga penulis ucapkan kepada Dr. Ir. A. Herry Cahyana selaku Pembimbing Akademis.

Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Dr. Ridla Bakri selaku Ketua Departemen kimia FMIPA UI, Ir. Widyastuti Samadi selaku Koordinator Pendidikan yang telah memberikan bantuan dalam penelitian serta kepada seluruh dosen Departemen Kimia FMIPA UI yang telah memberikan begitu banyak ilmu yang bermanfaat. Tidak lupa penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Bapak Hedi, Mbak Ema, Mbak Trie, Mbak Cucu, Mbak Ina, Mbak Ati, Pak Kiri, Pak Amin, Bapak Sutrisno serta seluruh staf Departemen Kimia yang telah banyak membantu terlaksananya penelitian.

Rasa terima kasih yang begitu dalam juga penulis sampaikan untuk:

1. Mama, papa serta kakak yang selama ini telah berkorban begitu besar dalam segala hal, memberikan dukungan dan semangat kepada penulis.
2. Ibu Vivitri Dewi Prasasty atas bantuannya dalam menyediakan lipase ekstrak kasar serta beberapa materi acuan yang sungguh sangat bermanfaat bagi penulis dan Ibu Ihat LIPI Cibinong atas bantuannya untuk menyediakan biakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* untuk penulis.

3. Prof. Atiek, atas izin yang telah diberikan sehingga saya bisa menggunakan alat sentrifuge di laboratorium mikrobiologi Departemen Farmasi. Terima kasih juga kepada Mba Catur dan Mas Tri yang sudah banyak membantu dalam penelitian ini.
4. Nanik Sugiharni, rekan seperjuangan penelitian selama satu semester ini. Banyak yang sudah kita lalui bersama. Terima kasih telah berjuang bersama, sehingga selama penelitian ini kita dapat menemui berbagai bakat baru yang terpendam dalam diri masing-masing.
5. Kartika Puspa Ningrum untuk pertemanannya selama empat tahun ini. Banyak suka duka yang sudah kita lalui bersama di Kimia maupun di FMIPA ini. Terima kasih juga telah bersedia menjadi tempat keluh kesahku selama penelitian.
6. Vania Retnoningrum, Desi Wulandari, Kharisma Amalia Lukman, Kusnaningsih, Tania, dan Kak Putra atas perhatian dan kasih sayangnya padaku selama perkuliahan maupun penelitian.
7. Kak Meta atas kata-kata penyemangatnya disaat penulis sedang merasa terpuruk dan putus asa, serta tidak lupa penulis mengucapkan terima kasih untuk Papih Awwab H. atas bantuan obat serta kebaikan lainnya.
8. Teman-teman penelitian lantai empat: Steffany, Rindu, Tantri, Atyka, Hogan, Kak Fery, Kak Adin, dan Kak Agung. Teman-teman penelitian lantai 3: Winda, Indra, Anisa, Faiza, Kak Iren, Kak Trijan, Kak Daniel, serta teman-teman seperjuangan lainnya Nissia, Raima, Zico, Ayu, Riri dan Tere.
9. Martinus Adi Anggoro, Bramantya, Yudha, Diana, Noval, Firman, Tirta, Arief, Ardie atas keceriaan selama empat tahun ini.
10. Dan juga teman-teman 2006 lainnya serta teman-teman 2007 dan 2008.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan, oleh karena itu dengan segala kerendahan hati penulis membuka diri untuk kritikan dan saran yang membangun. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi kita semua.

Depok, 1 Juli 2010

Penulis

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

---

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

Nama : Britsanti Dewi Hernawati  
NPM : 0606068953  
Program Studi : S1 Reguler  
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 aeruginosa* sebagai Biokatalisator dalam Studi Pendahuluan Reaksi Esterifikasi antara Asam Lemak Minyak Sawit dengan Sukrosa

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, 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 1 Juli 2010  
Yang menyatakan

(Britsanti Dewi Hernawati)

## ABSTRAK

Nama : Britsanti Dewi Hernawati  
Program Studi : Kimia  
Judul : Isolasi Lipase Ekstrak Kasar dari *Pseudomonas aeruginosa*  
sebagai Biokatalisator dalam Studi Pendahuluan Reaksi  
Esterifikasi antara Asam Lemak Minyak Sawit dengan Sukrosa

Sukrosa ester merupakan suatu senyawa ester karbohidrat yang telah memiliki beragam kegunaan, baik itu sebagai surfaktan hingga menjadi produk pangan yang bersifat rendah kalori. Senyawa sukrosa ester ini merupakan produk oleokimia yang telah banyak disintesis secara reaksi organik konvensional. Pada reaksi konvensional tersebut terdapat keterbatasan, seperti adanya kondisi reaksi temperatur yang cukup ekstrim. Hal ini dapat mengakibatkan terjadinya degradasi bahan baku ataupun dapat dihasilkannya berbagai produk sampingan lainnya. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan lipase sebagai biokatalisator pada reaksi esterifikasi antara asam lemak minyak kelapa sawit dengan sukrosa untuk mensintesis senyawa sukrosa ester. Pada penelitian ini dilakukan isolasi lipase ekstrak kasar dari bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, serta penentuan karakteristik enzim tersebut dan penerapannya sebagai biokatalisator pada reaksi esterifikasi asam lemak minyak sawit dengan sukrosa. Hasil yang diperoleh, yaitu nilai aktivitas katalitik lipase sebesar 16,4307  $\mu\text{mol}/\text{menit mg Substrat}$  pada kondisi optimum pH 7 dengan temperatur reaksi  $30^{\circ}\text{C}$ , dengan aktivitas spesifik 55,1468 U/mg protein. Lipase hasil isolasi tersebut belum dapat berperan sebagai biokatalisator reaksi esterifikasi, karena terlalu kecilnya nilai aktivitas lipase ekstrak kasar yang dihasilkan.

Kata Kunci : enzim, lipase, nilai aktivitas, esterifikasi.  
xv+68 halaman ; 27 gambar; 3 tabel; 5 Grafik  
Daftar Pustaka : 40(1986-2010)

## ABSTRACT

Name : Britsanti Dewi Hernawati  
Program Study : Chemistry  
Title : Isolation of Crude Extract Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* as Biocatalyst in Preliminary Studies of Esterification Reaction between Palm Oil Fatty Acid with Sucrose

Sucrose ester is an ester carbohydrates compound that have a variety of uses, whether as a surfactant or to be low calories food products. Sucrose ester compound is a product that has been widely synthesized oleochemicals by conventional organic reactions. There are limitations of conventional reactions, such as the reaction conditions need sufficiently extreme temperatures. This is can lead to the degradation of raw materials or can produce a variety of other byproducts. Therefore, in this study lipase is used as biocatalyst in esterification between palm oil fatty acids with sucrose for the synthesis of sucrose ester compounds. In this study, we isolated crude extract lipase from *Pseudomonas aeruginosa*, and determined of enzyme characteristics and its application as biocatalyst by esterification of palm oil fatty acids with sucrose. The activity of lipase obtained from this study is 16,4307  $\mu\text{mol} / \text{min mg}$  of substrate at pH 7 with optimum conditions of reaction temperature 30°C, with a specific activity of 55.1468 U / mg protein. The isolated lipase is not able to act as biocatalyst esterification, because of very small activity values from crude extract lipase has been produced.

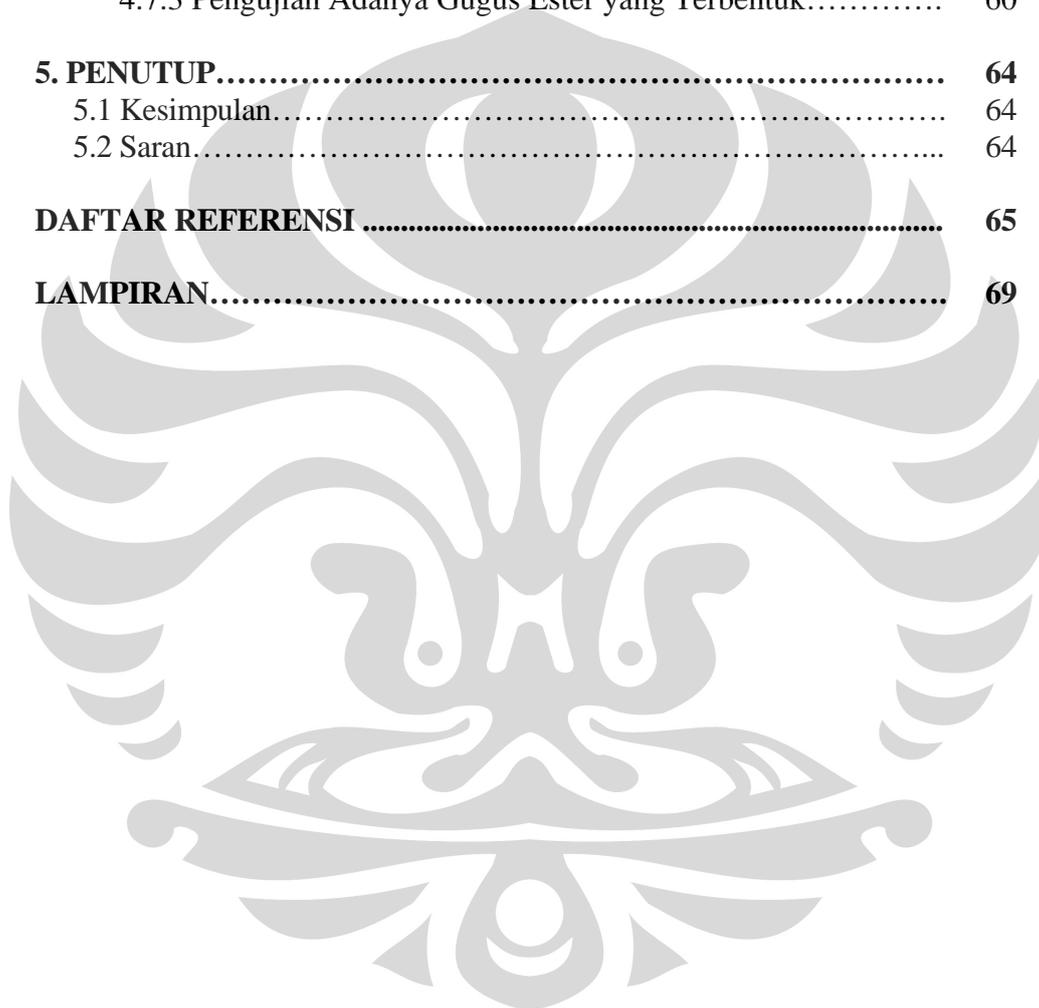
Key Words : Enzyme, Lipase, Catalytic Activity, Esterification.  
xv+68 pages ; 27 pictures; 3 tables; 5 Graph  
Bibliography : 40 (1986-2010)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH .....	vi
ABSTRAK .....	vii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR GRAFIK.....	xiii
DAFTAR TABEL .....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
<b>1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	2
1.3 Metodologi Penelitian.....	2
1.4 Hipotesis.....	3
1.5 Tujuan Penelitian .....	3
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Definisi Enzim.....	4
2.2 Mekanisme Kerja Enzim.....	5
2.3 Lipase.....	7
2.3.1 Sumber-Sumber Lipase.....	8
2.3.1.1 Mikroorganisme Penghasil Enzim Lipase.....	8
2.3.2 Karakteristik Lipase yang Dihasilkan oleh Mikroba.....	10
2.3.3 Lipase dari <i>Pseudomonas, sp</i> .....	11
2.3.3.1 Sintesis dan Sekresi Lipase oleh <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	12
2.3.4 Reaksi yang Dikatalisis oleh Lipase.....	14
2.3.4.1 Reaksi Hidrolisis Secara Enzimatik.....	15
2.3.4.2 Reaksi Esterifikasi Secara Enzimatik.....	16
2.4 Fermentasi.....	18
2.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	19
2.6 Tanaman Kelapa Sawit.....	21
2.7 Sukrosa.....	23

<b>3. METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>24</b>
3.1 Alat dan Bahan.....	24
3.1.1 Alat-alat yang Digunakan.....	24
3.1.2 Bahan-bahan yang Digunakan.....	24
3.2 Prosedur Kerja.....	24
3.2.1 Uji Kualitatif Bakteri Penghasil Lipase.....	24
3.2.2 Pembuatan Inokulum ( <i>Seed Culture</i> ).....	25
3.2.3 Penentuan Jumlah Bakteri.....	25
3.2.4.1 <i>Total Plate Count</i> (TPC).....	25
3.2.4.2 <i>Optical Density</i> (OD).....	25
3.2.4 Produksi Lipase Ekstrak Kasar.....	26
3.2.5 Penentuan Nilai Unit Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar.....	26
3.2.6 Penentuan Kadar Protein Lipase Ekstrak Kasar.....	26
3.2.7 Aplikasi Lipase Ekstrak Kasar Sebagai Biokatalisator Pada Reaksi Esterifikasi Asam Lemak Minyak Sawit Terhadap Sukrosa.....	27
3.2.7.1 Hidrolisis Minyak Sawit.....	27
3.2.7.2 Reaksi Esterifikasi Dengan Menggunakan Lipase Ekstrak Kasar.....	28
3.2.7.3 Analisis Produk.....	28
3.2.8 Bagan Kerja.....	29
3.2.8.1 Bagan Kerja Umum.....	29
3.2.8.2 Bagan Kerja Umum Produksi Lipase Ekstrak Kasar.....	30
3.2.8.3 Uji Kualitatif Bakteri Penghasil Lipase.....	31
3.2.8.4 Pembuatan Inokulum ( <i>Seed Culture</i> ).....	31
3.2.8.5 Produksi Lipase Ekstrak Kasar.....	32
3.2.8.6 Penentuan Nilai Unit Aktifitas Lipase Ekstrak Kasar.....	33
3.2.8.7 Bagan Kerja Reaksi Hidrolisis Minyak Sawit.....	34
3.2.8.8 Reaksi Esterifikasi Enzimatis.....	35
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>36</b>
4.1 Uji Kualitatif Bakteri Penghasil Lipase.....	36
4.2 Pembuatan Inokulum ( <i>Seed Culture</i> ).....	38
4.3 Penentuan Jumlah Bateria.....	39
4.4 Produksi Lipase Ekstrak Kasar.....	40
4.4.1 Fermentasi Lipase Ekstrak Kasar.....	40
4.4.2 Isolasi Lipase Ekstrak Kasar.....	44
4.5 Penentuan Nilai Unit Aktivitas Optimum Lipase Ekstrak Kasar.....	45
4.5.1 Variasi pH Terhadap Nilai Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar.....	45
4.5.2 Variasi Temperatur Terhadap Nilai Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar.....	47

4.5.3 Variasi Konsentrasi Substrat Terhadap Nilai Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar.....	49
4.6 Penentuan Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik Lipase Ekstrak Kasar.....	54
4.7 Aplikasi Lipase Ekstrak Kasar Sebagai Biokatalisator Pada Reaksi Esterifikasi Asam Lemak Minyak Sawit Terhadap Sukrosa.....	56
4.7.1 Hidrolisis Minyak Sawit.....	56
4.7.2 Reaksi Esterifikasi Asam Lemak Minyak Sawit Terhadap Sukrosa.....	58
4.7.3 Pengujian Adanya Gugus Ester yang Terbentuk.....	60
<b>5. PENUTUP.....</b>	<b>64</b>
5.1 Kesimpulan.....	64
5.2 Saran.....	64
<b>DAFTAR REFERENSI .....</b>	<b>65</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>69</b>



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Enzim.....	4
Gambar 2.2	Mekanisme Kerja Enzim Terhadap Susbrat.....	6
Gambar 2.3	Reaksi Hidrolisis Triglicerida yang Dikatalisis Oleh Lipase.....	7
Gambar 2.4	Regulasi Gen Operator <i>lipA</i> Dalam Proses Sekresi Lipase Pada <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	13
Gambar 2.5	Skema Sekresi Lipase Pada <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	14
Gambar 2.6	Mekanisme Reaksi yang Dikatalisis oleh Lipase.....	15
Gambar 2.7	Reaksi Hidrolisis Triglicerida oleh Lipase.....	16
Gambar 2.8	Kesetimbangan Reaksi Hidrolisis-Esterifikasi Secara Umum.....	17
Gambar 2.9	Reaksi Esterifikasi dan Transesterifikasi.....	18
Gambar 2.10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	20
Gambar 2.11	Koloni <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Pada Medium Nutrient Agar.....	21
Gambar 2.12	Pohon Kelapa Sawit (Kanan) dan Sistematika Pohon Kelapa Sawit (Kiri).....	22
Gambar 2.13	Kadar Asam Lemak Dalam Minyak Sawit.....	22
Gambar 2.14	Struktur Kimia Sukrosa.....	23
Gambar 4.1	Hasil Pengamatan Uji Kualitatif Bakteri Penghasil Lipase.....	37
Gambar 4.2	Struktur Rhodamine B.....	38
Gambar 4.3	Media Inokulum ( <i>Seed Culture</i> ) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	39
Gambar 4.4	Isolasi Lipase Ekstrak Kasar.....	45
Gambar 4.5	(a) Larutan Sampel Sebelum Diterminasi, (b) Penggumpalan Enzim Karena Terdenaturasi.....	52
Gambar 4.6	Titration Angka Asam Sampel atau Blanko.....	53
Gambar 4.7	Mekanisme Reaksi Hidrolisis Oleh Lipase.....	54
Gambar 4.8	Reaksi Hidrolisis Pada Suatu Ester.....	56
Gambar 4.9	Hasil Hidrolisis Minyak Goreng Sawit.....	58
Gambar 4.10	Reaksi Umum Hidrolisis Minyak Sawit.....	58
Gambar 4.11	Reaktor Reaksi Esterifikasi Enzimatis Antara Asam Lemak Minyak Sawit dengan Sukrosa.....	59
Gambar 4.12	(a) Senyawa Sukrosa Ester Asam lemak dalam Kloroform, (b) Senyawa Sukrosa Ester Asam Lemak dalam Metanol.....	60
Gambar 4.13	Reaksi Degradasi Warna Merah Muda yang Terjadi.....	61

## DAFTAR GRAFIK

Grafik 4.1.	Nilai Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar Terhadap Waktu Fermentasi.....	44
Grafik 4.2.	Pengaruh Variasi pH Terhadap Nilai Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar .....	46
Grafik 4.3.	Pengaruh Variasi Temperatur Terhadap Nilai Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar.....	48
Grafik 4.4	Pengaruh Variasi Konsentrasi Substrat Terhadap Nilai Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar .....	49
Grafik 4.5	Nilai Aktivitas Spesifik Lipase Ekstrak Kasar Terhadap Waktu Fermentasi.....	55



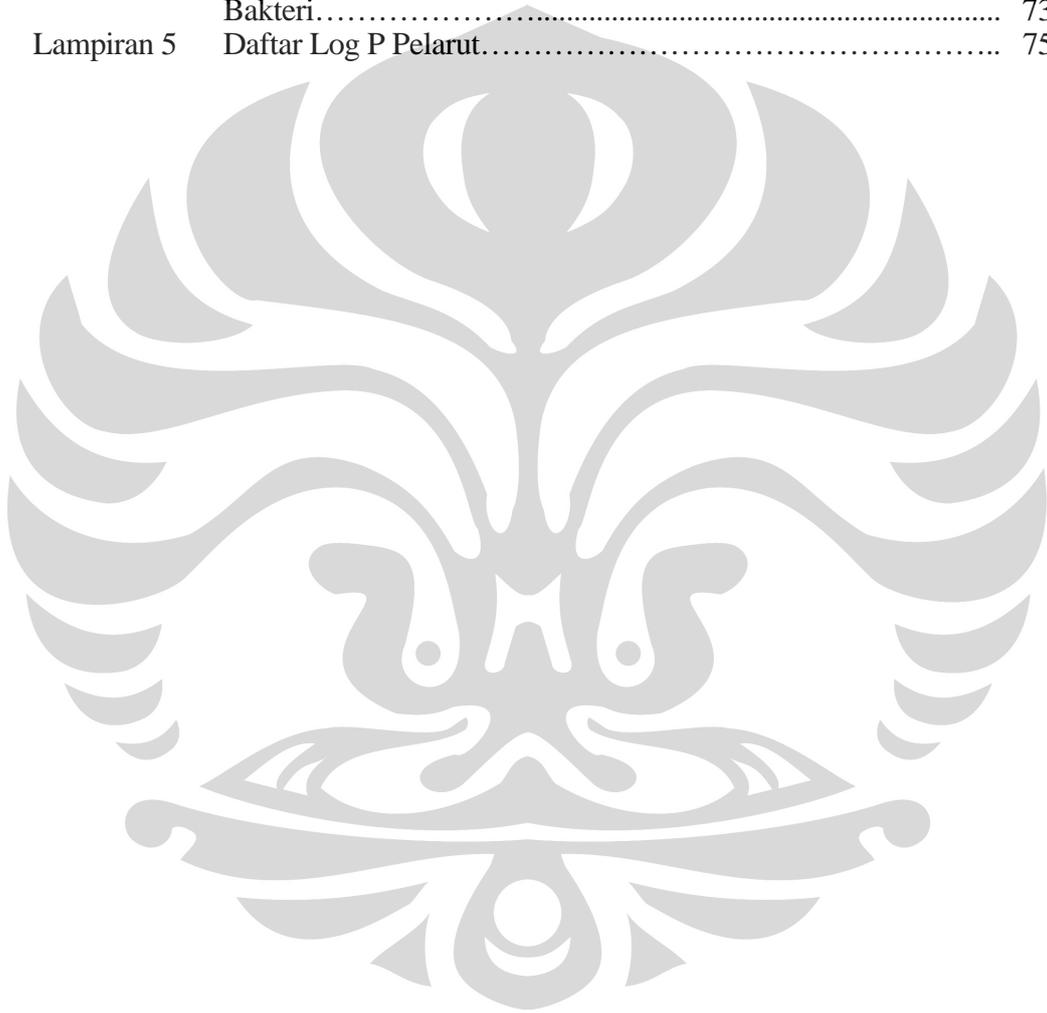
## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Klasifikasi Enzim.....	4
Tabel 2.2	Mikroba Penghasil Lipase.....	9
Tabel 4.1	Kandungan Minyak Oleat-Linoleat Pada Minyak Nabati.....	41



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Pembuatan Kurva Standar Protein.....	69
Lampiran 2	Nilai Unit Aktivitas Spesifik Lipase Ekstrak Kasar.....	70
Lampiran 3	Nilai Unit Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar.....	71
Lampiran 4	Data Pengamatan Penentuan Jumlah Bakteri.....	73
Lampiran 5	Daftar Log P Pelarut.....	75



# BAB 1 PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Kelapa sawit merupakan salah satu komoditas unggulan yang memberikan kontribusi penting pada pembangunan ekonomi Indonesia, khususnya pada pengembangan agroindustri. Pada tahun 2010 luas perkebunan kelapa sawit direncanakan akan mencapai 7 juta Ha, dengan produksi *Crude Palm Oil* (CPO) lebih dari 12 juta ton. Pada tahun tersebut Indonesia diharapkan akan menjadi negara penghasil minyak sawit terbesar di dunia (Kajian, 2000).

Keberadaan minyak sawit sebagai salah satu sumber minyak nabati, relatif mengalami kenaikan yang cukup signifikan dalam pasar domestik maupun pasar dunia. Peningkatan konsumsi minyak nabati dalam negeri dapat terlihat dari tahun 1987 hingga 1995. Dalam kurun waktu tersebut permintaan lokal akan minyak nabati naik dengan laju rata-rata 5,6% per tahunnya, sedangkan di sektor produksinya, laju peningkatan pertumbuhan akan minyak sawit sebesar 9% (Kajian, 2000). Untuk mengantisipasi melimpahnya hasil produksi perkebunan kelapa sawit, maka diperlukan suatu usaha untuk mengolah minyak sawit tersebut menjadi bentuk produk hilirnya. Produk hilir dari pengolahan minyak sawit dapat dikelompokkan menjadi dua, yaitu produk pangan dan non pangan. Hasil pengolahan minyak sawit yang termasuk kedalam produk pangan adalah minyak goreng dan margarin, sedangkan produk non pangan berupa produk oleokimia, yaitu ester, asam lemak, surfaktan, gliserin dan senyawa turunannya (Handayani, 2005).

Salah satu produk hilir potensial dari hasil pengolahan minyak sawit adalah sukrosa ester. Sukrosa ester merupakan suatu senyawa ester yang terbentuk dari asam lemak dengan sukrosa. Sukrosa ester ini memiliki beragam kegunaan, dari surfaktan hingga produk pangan yang bersifat rendah kalori. Berbagai manfaat yang dihasilkan dari sukrosa ester ini bergantung pada banyaknya gugus hidroksi dari sukrosa yang tersubstitusikan dengan rantai asam lemak (Sakidja, 1994).

Dalam proses pengembangan minyak sawit menjadi produk hilirnya, seperti sukrosa ester harus diperhatikan peraturan perindustrian yang ada, baik dalam skala nasional maupun internasional. Beberapa peraturan tersebut adalah suatu proses industri haruslah menyangkut keamanan lingkungan, ekonomi, dan juga sosial. Akan tetapi, pada umumnya industri oleokimia yang berbasis reaksi esterifikasi maupun transesterifikasi dalam proses produksinya tersebut tidak jarang masih menggunakan berbagai pelarut yang bersifat tidak ramah lingkungan. Selain itu, terdapat beberapa keterbatasan yang dijumpai dalam proses produksi konvensional, seperti adanya kondisi reaksi temperatur yang cukup ekstrim. Hal tersebut dapat mengakibatkan terjadinya degradasi bahan baku ataupun dapat dihasilkannya berbagai produk sampingan lainnya (Handayani, 2005).

Beberapa kelemahan di atas telah mendorong untuk diciptakannya suatu proses yang bersifat lebih mudah, aman, namun tetap dapat bersaing dengan proses produksi konvensional. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan lipase sebagai biokatalisator pada reaksi esterifikasi antara asam lemak minyak sawit dengan sukrosa untuk mensintesis senyawa sukrosa ester.

## 1.2 Perumusan Masalah

Beberapa masalah yang dirumuskan dalam penelitian ini, yaitu

- a. Cara untuk mengisolasi lipase ekstrak kasar dari bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.
- b. Pengujian nilai unit aktivitas dan nilai aktivitas spesifik lipase ekstrak kasar yang telah diisolasi.
- c. Pengujian lipase ekstrak kasar sebagai biokatalisator pada reaksi esterifikasi asam lemak minyak sawit dengan senyawa karbohidrat sederhana, yaitu sukrosa.

## 1.3 Metodologi Penelitian

Metodologi yang digunakan pada penelitian ini, yaitu metodologi eksperimental dalam skala laboratorium.

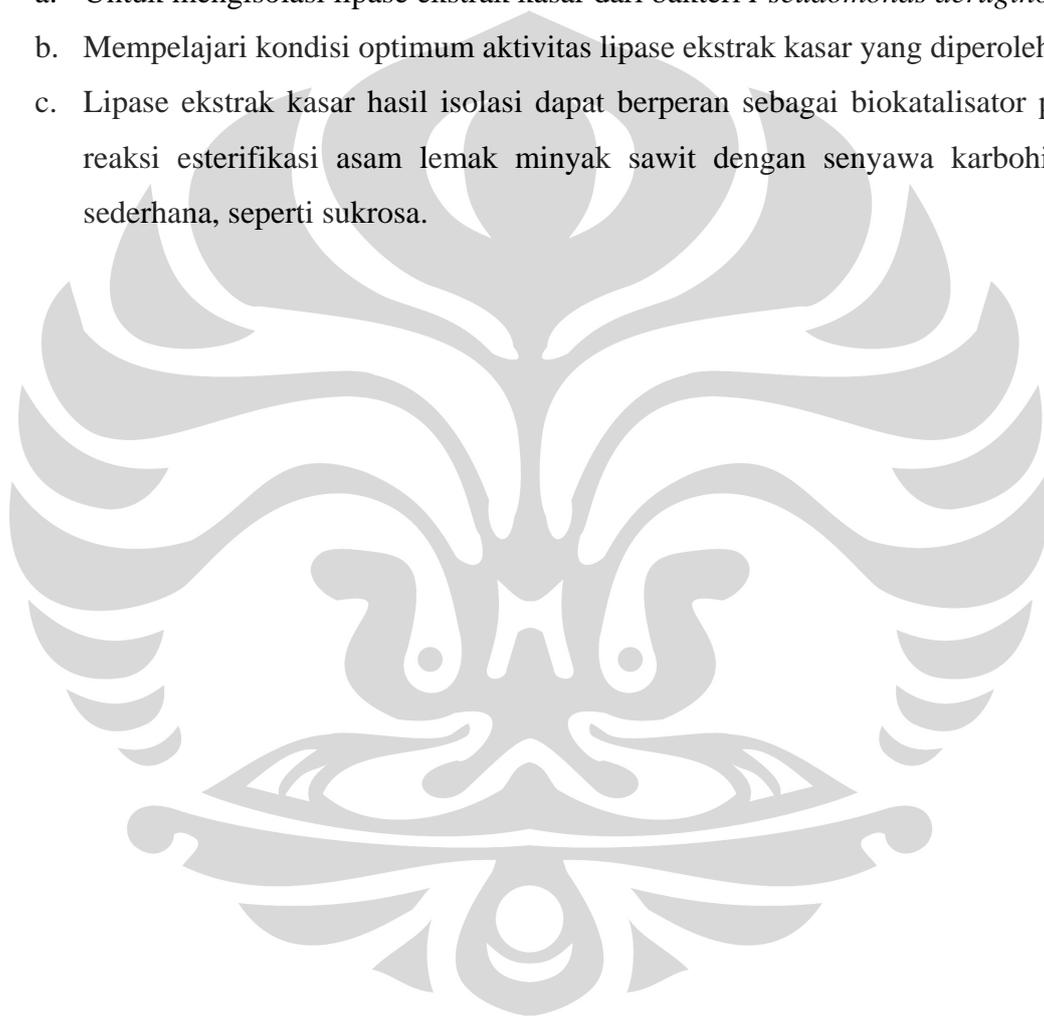
#### 1.4 Hipotesis

Lipase dapat digunakan sebagai biokatalisator pada reaksi esterifikasi asam lemak minyak sawit dengan sukrosa.

#### 1.5 Tujuan Penelitian

Adapun beberapa tujuan yang ingin dicapai pada penelitian ini, yaitu

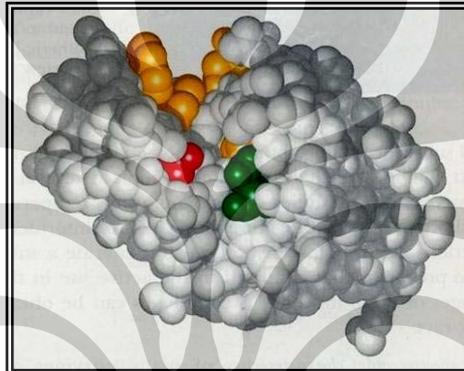
- a. Untuk mengisolasi lipase ekstrak kasar dari bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.
- b. Mempelajari kondisi optimum aktivitas lipase ekstrak kasar yang diperoleh.
- c. Lipase ekstrak kasar hasil isolasi dapat berperan sebagai biokatalisator pada reaksi esterifikasi asam lemak minyak sawit dengan senyawa karbohidrat sederhana, seperti sukrosa.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Definisi Enzim

Enzim merupakan suatu katalis biologis yang berfungsi mempercepat dan mengarah reaksi biokimia (metabolisme) di dalam tubuh. Enzim sebagai biokatalis tersebut bersifat spesifik, baik terhadap substrat yang dikatalisis maupun produk reaksinya (Hudiyono, 2004).



[Sumber: Nuringtyas, 2010]

Gambar 2.1 Enzim

Penamaan enzim berhubungan dengan fungsi dari enzim tersebut, yaitu sesuai dengan jenis reaksi yang dikatalisisnya. Enzim diklasifikasikan ke dalam enam jenis, yaitu oksireduktase, transferase, hidrolase, liase, isomerase, dan ligase (sintetase). Pada Tabel 2.1 merupakan klasifikasi enzim berdasarkan jenis reaksi yang dikatalisisnya.

Tabel 2.1: Klasifikasi Enzim

No.	Kelas Enzim	Tipe Reaksi yang Dikatalisis
1.	Oksireduktase	Reaksi redoks (transfer elektron atau proton)
2.	Transferase	Transfer atom atau gugus dari satu substrat ke substrat yang lainnya (diluar reaksi kelas lainnya)

Lanjutan Tabel 2.1

No.	Kelas Enzim	Tipe Reaksi yang Dikatalisis
3.	Hidrolase	Reaksi hidrolisis
4.	Liase	Penambahan gugus fungsi pada ikatan rangkap (adisi) atau pemutusan ikatan rangkap dengan pelepasan gugus fungsi
5.	Isomerase	Reaksi isomerase
6.	Ligase	Pembentukan ikatan C – C, C – S, C – O, dan C – N diikuti dengan pemutusan isofosfat dari ATP

[ Sumber: Hudiyono, 2004]

Pada mikroba, berdasarkan sifat pembentukannya, enzim dapat diklasifikasikan menjadi dua jenis, yaitu enzim induktif dan enzim konstitutif.

- a. Enzim konstitutif merupakan enzim yang akan dihasilkan tanpa adanya zat penginduksi terlebih dahulu. Contoh enzim yang tergolong dalam kelompok ini adalah beberapa enzim yang terlibat dalam proses glikolisis. Pada enzim jenis ini, berapa pun besarnya konsentrasi substrat yang ada dalam medium jumlah enzim yang dihasilkan adalah tetap.
- b. Enzim induktif merupakan suatu enzim yang terbentuk sebagai respon adaptasi terhadap substrat tertentu yang terdapat dalam medium biakan suatu mikroba.

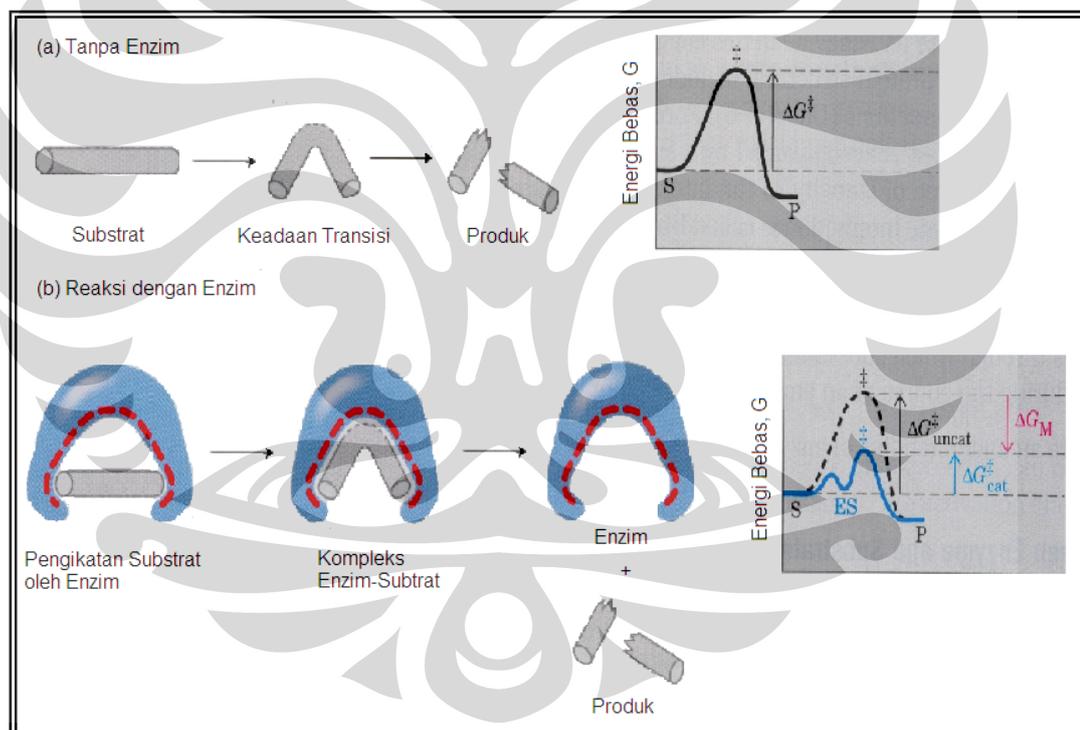
(Budiyanti, 2004)

## 2.2 Mekanisme Kerja Enzim

Cara kerja enzim dalam mempercepat reaksi, yaitu dengan menempelkan sisi aktifnya pada permukaan molekul zat-zat yang bereaksi. Percepatan reaksi ini terjadi karena enzim akan menurunkan energi aktivasi yang diperlukan dalam suatu reaksi. Sebagian besar enzim bekerja secara khas, yaitu setiap jenis enzim hanya dapat bekerja pada satu macam senyawa atau reaksi kimia. Hal ini disebabkan adanya perbedaan struktur kimia tiap enzim yang bersifat tetap.

Enzim dapat bekerja dengan beberapa cara dalam menurunkan  $\Delta G^\ddagger$  reaksi, yaitu sebagai berikut,

1. Menurunkan energi aktivasi dengan menciptakan suatu lingkungan transisi yang terstabilisasi (contohnya mengubah bentuk substrat menjadi konformasi keadaan transisi ketika ia terikat dengan enzim).
2. Menyediakan lintasan reaksi alternatif, seperti bereaksi dengan substrat sementara waktu untuk membentuk kompleks Enzim-Substrat (ES).
3. Menurunkan perubahan entropi reaksi dengan menggiring substrat pada orientasi yang tepat untuk bereaksi. Menariknya, efek entropi ini melibatkan destabilisasi keadaan dasar, dan kontribusinya terhadap katalis relatif kecil (Enzim, 2010).



[Sumber: Nelson, David, L. dan Michael M. Cox, 2007]

Gambar 2.2 Mekanisme Kerja Enzim Terhadap Substrat

Kerja suatu enzim akan dipengaruhi oleh beberapa faktor, terutama oleh konsentrasi substrat, temperatur, keasaman, kofaktor dan inhibitor. Setiap enzim memerlukan temperatur dan pH (tingkat keasaman) optimum yang berbeda-beda



Salah satu kendala utama transesterifikasi dengan katalis lipase adalah gliserol yang dihasilkan dapat secara kompetitif akan menghambat aktivasi lipase dengan menutup permukaan sisi aktifnya (Chumaidi, 2009).

### 2.3.1 Sumber-Sumber Lipase

Pada dasarnya sumber-sumber lipase dapat dibagi dalam tiga kelompok besar, yaitu dari mamalia, tumbuhan, dan mikroba. Lipase yang berasal dari mamalia dikelompokkan menjadi,

- a. Lipase pada sistem pencernaan, seperti lingual, lambung, dan pankreas
- b. Lipase pada jaringan, seperti hati, paru-paru, jantung, dan ginjal
- c. Lipase dalam air susu

Lipase yang bersumber dari tanaman, dikelompokkan kedalam tiga jenis, yaitu

- a. Triasilgliserol lipase, terdapat pada tanaman jagung, minyak sawit, kacang, beras, dan kentang
- b. Silhidrolase, dapat diperoleh dari tanaman kentang
- c. Phospolipase, terdapat pada tanaman seledri, kol, dan kacang
- d. Liphospolipase, terdapat dalam tanaman gandum

Sedangkan lipase yang dihasilkan oleh mikroba dibedakan menjadi tiga jenis sumber, yaitu

- a. Bakteri, seperti lipase *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, dan *Miraxella*
- b. Kapang, seperti lipase *Penicillium camberti*, *Geotrichum candidum*, dan *Mucor meihei*.
- c. Khamir, seperti lipase *Candida antartika*, *C. rugosa*, dan *C.cylindraceae* (Yusnizar, 2001)

#### 2.3.1.1 Mikroba Penghasil Lipase

Terdapat beberapa langkah umum yang perlu dipertimbangkan dalam memproduksi enzim yang bersumber dari mikroba. Pertama penentuan mikroba, mikroba tersebut sebaiknya dapat menghasilkan enzim yang bersifat ekstraseluler,

sehingga isolasi enzim menjadi lebih mudah tanpa melakukan pemecahan sel terlebih dahulu. Kedua, kultur dari mikroba mampu untuk menghasilkan enzim dalam jumlah besar dan memiliki waktu kultivasi yang relatif singkat. Ketiga, mikroba tersebut harus berasal dari galur yang stabil, sehingga tidak mudah mengalami mutasi. Keempat, mikroba pilihan tersebut mampu tumbuh dengan cepat pada media kultivasi. Kelima, pemanenan enzim dari media kultivasi dapat dilakukan dengan mudah. Terakhir, mikroba penghasil enzim tersebut bukan berasal dari galur yang menginduksi toksin yang mampu memiliki aktivitas antibiotika (Faizal, 1994).

Bakteri dapat memproduksi enzim lipolitik yang berbeda kelasnya, yaitu karboksilesterase (EC 3.1.1.1) dan lipase (EC 3.1.1.3). Karboksilesterase merupakan enzim yang dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis suatu ester yang bersifat larut dalam air, sedangkan lipase bersifat mengkatalisis reaksi hidrolisis dari suatu substrat ester rantai panjang yang tidak larut dalam air, seperti trigliserida (Yapasan, 2008).

Lipase yang dihasilkan oleh mikroba khususnya bakteri berasal dari genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, dan *Bukholderia* (Yapasan, 2008). Namun, selain bakteri, terdapat juga mikroba lainnya, seperti kapang dan khamir yang dapat menghasilkan lipase. Dalam Tabel 2.2 berikut ini merupakan contoh beberapa mikroba yang dapat menghasilkan lipase.

Tabel 2.2 Mikroba Penghasil Lipase

Sumber Mikroba	Spesies
<b>Kapang dan Khamir</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>Rhizomucor meihei</i></li> <li>2. <i>Penicillium camberti</i></li> <li>3. <i>Humicolala nuginosa</i></li> <li>4. <i>Rhizopus oryzae</i></li> <li>5. <i>Aspergillus niger</i></li> <li>6. <i>Candida rugosa</i></li> <li>7. <i>Candida antartica</i></li> <li>8. <i>Geotrichium candidum</i></li> </ol>

Lanjutan Tabel 2.2

Sumber Mikroba	Spesies
<b>Bakteri</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>Chromobacterium viscosum</i></li> <li>2. <i>Pseudomonas cepacia</i></li> <li>3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i></li> <li>4. <i>Pseudomonas fluorescens</i></li> <li>5. <i>Pseudomonas fragi</i></li> <li>6. <i>Bacillus thermocatenulatus</i></li> <li>7. <i>Staphylococcus hyicus</i></li> <li>8. <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>9. <i>Staphylococcus epidermidis</i></li> </ol>

[Sumber: Vakhlu et al, 2006]

Enzim yang diisolasi dari mikroba memiliki beberapa keuntungan, seperti produksi enzim dapat dilakukan pada skala besar, peralatan kultivasi dapat dimanfaatkan untuk keperluan produksi berbagai enzim dari mikroba tersebut, serta memiliki daya katalitik yang sangat spesifik sehingga reaksi samping yang tidak diinginkan dapat dihindari (Sa'id, 1987).

### 2.3.2 Karakteristik Lipase yang Dihasilkan oleh Mikroba

Salah satu karakteristik utama dari lipase, yaitu enzim ini dapat bekerja pada lapisan antar muka. Hal ini karena adanya perbedaan kepolaran antara lipase dengan substrat yang dikatalisisnya. Lipase cenderung bersifat polar, sedangkan substratnya berupa senyawa non polar, sehingga lipase bekerja pada bagian antar muka antara fasa yang larut dalam air dan fasa minyak dari substratnya (Yapasan, 2008). Aktivasi pada lapisan antar muka dari lipase ini akan meningkat ketika substrat yang tersedia berada dalam bentuk emulsinya. Sebagai akibat dari karakteristik ini, maka kinetika dari lipase tidak mengikuti aturan klasik model Michaelis-Menten (Jaeger, et al, 1994). Substrat dan produk yang dihasilkan dari katalitik lipase ini terkadang bersifat tidak dapat larut dengan baik dalam media

air. Hal ini membuat enzim dapat dengan mudah dipisahkan dari substrat dan produknya (Yapasan, 2008).

Pada umumnya, enzim bersifat tidak stabil dalam pelarut organik dan dapat terdenaturasi atau hilang aktifitas katalitiknya. Namun lipase dapat stabil dan tetap aktif dalam suatu pelarut organik tanpa adanya penambahan senyawa penstabil. Jenis substrat dari lipase juga terkadang tidak dapat larut atau bersifat sedikit larut dalam media air. Karena itu, dalam fenomena seperti ini digunakan suatu pelarut organik atau larutan organik-air sebagai media reaksi (Jaeger et al, 1994). Karena lipase tetap memiliki kemampuan katalitiknya dalam suatu pelarut organik, membuat lipase banyak diaplikasikan dalam bidang bioteknologi (Jaeger et al 1994). Salah satu aplikasi dari lipase, yaitu sintesis suatu obat yang memerlukan tingkat khiralitas produk yang tinggi atau berupa sintesis senyawa intermediet dari obat tersebut (Yapasan, 2008).

Lipase yang diproduksi oleh bakteri memiliki pH aktifitas netral atau alkali (pH 4 sampai dengan pH 11). Kestabilan lipase terhadap panas cukup tinggi, yaitu dari temperatur 20°C hingga 60°C. Menurut spesifitas substratnya, maka lipase dari mikroba dapat dibedakan kedalam tiga jenis, yaitu non spesifik, regiospesifik, dan spesifik terhadap asam lemak. Lipase non spesifik akan memutuskan ikatan ester yang terdapat pada molekul trigliserida secara acak menjadi bentuk asam lemak dan gliserol. Jenis lipase regiospesifik akan menghidrolisis ikatan ester primer pada trigliserida, yaitu ester pada C1 dan C3 rangka gliserolnya, sedangkan lipase spesifik asam lemak akan aktif daya katalitiknya apabila terdapat kehadiran asam lemak dalam reaksinya (Gupta, 2004).

### **2.3.3 Lipase dari *Pseudomonas*, sp**

Lipase yang dihasilkan oleh bakteri *Pseudomonas* memiliki peranan yang sangat penting dalam bidang bioteknologi, baik sebagai hidrolase untuk bahan aditif pada deterjen maupun sebagai sintetase dalam mengkatalisasi reaksi suatu senyawa rasemik. Enzim yang dihasilkan dari genus ini merupakan suatu katalis yang sangat baik untuk reaksi sintesis transformasi organik dan juga dapat

menghasilkan produk dengan keselektifan enansiomer yang tinggi dari reaksi hidrolisis suatu ester kiral (Yapasan, 2008).

Walaupun lipase dapat dihasilkan oleh beragam bakteri baik gram positif maupun negatif, namun pada umumnya bakteri penghasil lipase tersebut berasal dari genus *Pseudomonas*. Lipase yang dihasilkan tersebut dapat digolongkan kedalam tiga jenis berdasarkan urutan rangkaian asam amino homolognya (Jaeger, et al, 1994). Jenis I terdiri dari lipase yang berasal dari bakteri *P.aeruginosa*, *P.alcaligenes*, dan *P.fragi*, lipase ini memiliki massa molekul relatif (Mr) sekitar 30.000; jenis II merupakan lipase yang berasal dari bakteri *P.cepasia* dan *P.glumae* dengan nilai Mr yang lebih besar, yaitu 33.000; dan terakhir jenis III merupakan lipase dari *P.fluorescens* dengan nilai Mr 50.000 (Yapasan, 2008).

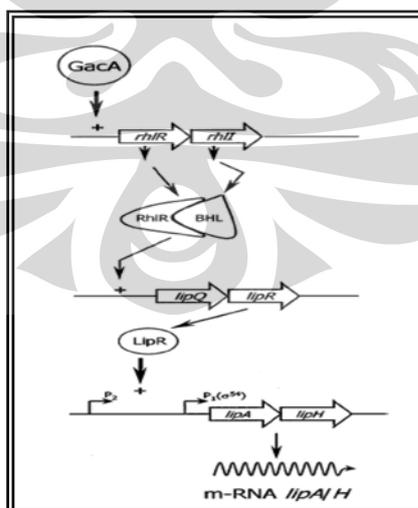
#### **2.3.3.1 Sintesis dan Sekresi Lipase oleh *Pseudomonas aeruginosa***

Jalur sekresi lipase yang telah diketahui, yaitu jalur sekresi dari bakteri *Pseudomonas*, seperti lipase *P.aeruginosa*. Pada bakteri ini sekresi lipase terdiri dari dua tahap mekanisme. Secara umum, sekresi lipase pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* memerlukan suatu protein pembantu berupa molekul *Chaperone* yang berfungsi membantu pelipatan (*fold*ing) protein lipase secara tepat, kedalam bentuk konformasinya. Rekombinan protein pembantu tersebut akan membuat lipase dari bentuk terdenaturasinya menjadi bentuk terrenaturasinya, sehingga menjadi suatu enzim yang dapat aktif. Proses pelipatan lipase kedalam bentuk utuhnya ini dilakukan pada periplasma yang termediasi oleh suatu lip protein yang juga menempel pada membran sitoplasma. Selanjutnya, terdapat protein pembantu lainnya yang berfungsi untuk menempelkan lipase pada membran sitoplasma, sehingga lipase tersebut dapat disekresikan melewati membran terluar (Jaeger et al, 1994).

Secara lebih rinci, sekresi lipase pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat dilihat pada Gambar 2.4. Sekresi lipase terjadi ketika bakteri telah memasuki fasa stasioner, pada masa tersebut densitas suatu sel akan bergantung pada regulasi ekspresi gen lipase. Pada regulasi tersebut, GaCA berperan sebagai *Global Regulator Gen*, apabila GaCA diproduksi dalam jumlah berlebih, maka

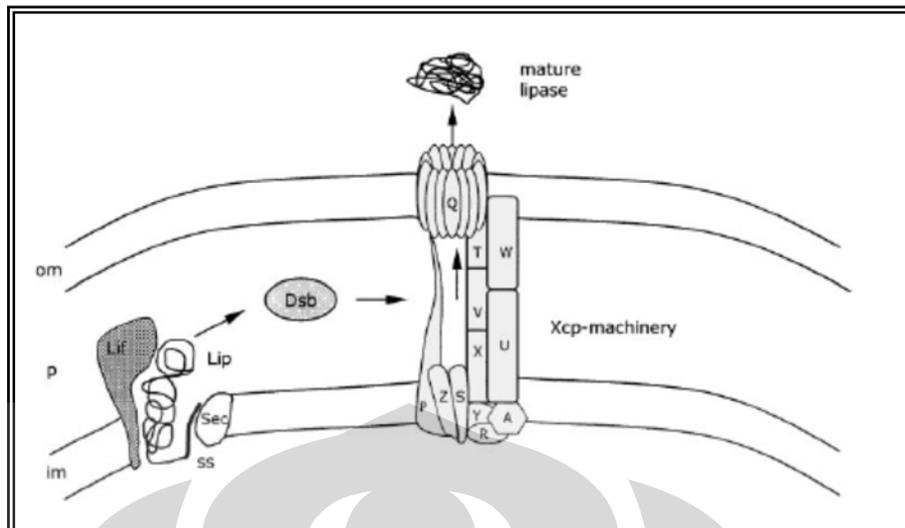
akan terjadi peningkatan aktivitas sekresi lipase ekstraseluler. Produksi dari GacA tersebut akan mempengaruhi suatu *activator RhIR* dan *autoinducer BHL* (N-Butiril Homoserin Lakton). Kedua protein tersebut merupakan pengatur dari sintesis senyawa Rhamnolipid dan enzim ekstraseluler lainnya pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Stimulasi dari transkripsi kedua gen tersebut akan menginduksi lipR yang merupakan suatu gen regulator yang akan memproduksi suatu protein yang disebut repressor. Repressor ini akan memproduksi suatu protein represor. Sedangkan gen promoter tersebut bersama gen operator lipase (operon *lipA/H*) akan menginduksi terjadinya proses transkripsi mRNA yang diikuti dengan translasi dan membentuk enzim sebagai produk akhirnya (Jaeger et al, 1999).

Lipase yang dihasilkan tersebut terdapat dalam bentuk pre-lipase yang berupa rantai informasi protein. Pre-lipase ini akan disekresikan melewati membran dalam (*Inner Membrane*) dengan mekanisme Sec-translokase. Pre-lipase akan mengalami pelipatan menjadi bentuk enzimnya pada bagian periplasma oleh lip kaperon, pada proses ini juga akan dibentuk jembatan disulfida yang terdapat pada lipase *Pseudomonas aeruginosa*. Selanjutnya lipase ini akan melewati membran terluar dengan dimediasikan oleh *Xcp-machinery*, seperti pada Gambar 2.5 (Jaeger et al, 1999).



[Sumber: Jaeger et al, 1999]

Gambar 2.4 Regulasi Gen Operator *lipA* dalam Proses Sekresi Lipase Pada *Pseudomonas aeruginosa*

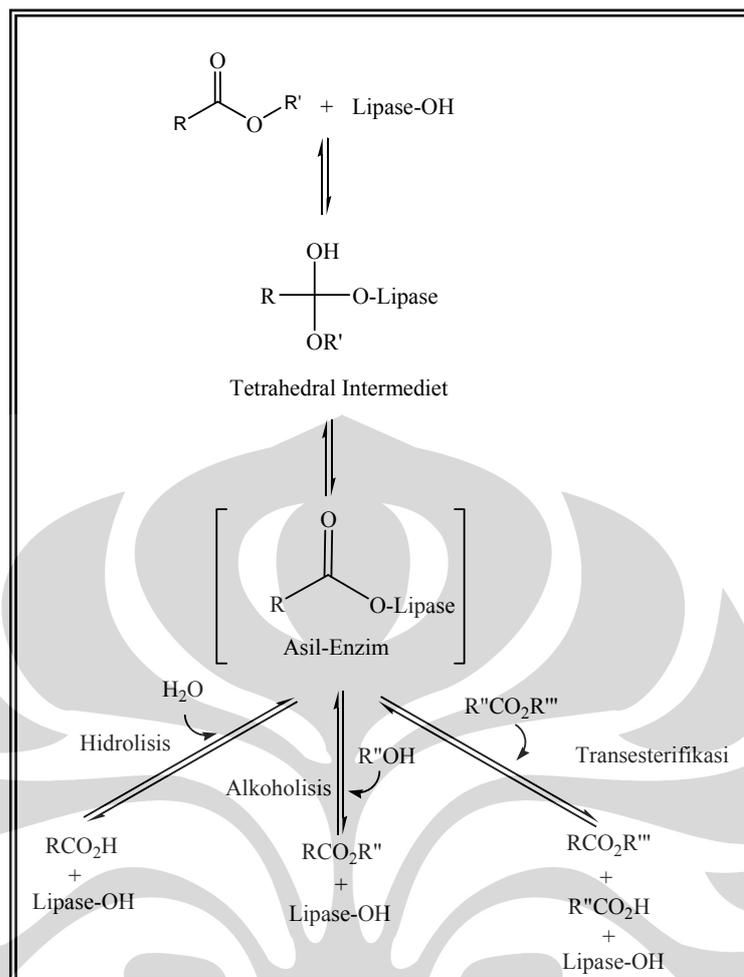


[Sumber: Jaeger et al, 1999]

Gambar 2.5 Skema Sekresi Lipase Pada *Pseudomonas aeruginosa*

### 2.3.4 Reaksi yang Dikatalisis oleh Lipase

Reaksi yang dikatalisis oleh lipase diduga terjadi melalui pembentukan suatu senyawa intermediet asil-enzim. Dalam lingkungan akueus yang mengandung banyak air, maka air tersebut akan berperan sebagai nukleofil yang menyerang senyawa intermediet asil-enzim, sehingga reaksi akan mengarah pada hidrolisis substrat. Sebaliknya dalam kondisi jumlah air yang terbatas maka gugus asil akan ditransfer ke nukleofil lain, seperti alkohol, gliserol, atau ester lainnya (Yusnizar, 2001). Secara skematik, mekanisme katalitik lipase melalui intermediet asil-enzim dapat dilihat pada Gambar 2.6.



[Sumber: Sumiyannah, 2001]

Gambar 2.6 Mekanisme Reaksi yang Dikatalisis oleh Lipase

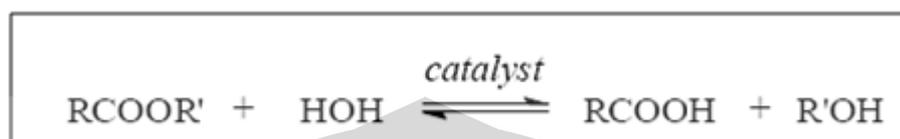
#### 2.3.4.1 Reaksi Hidrolisis Secara Enzimatik

Reaksi hidrolisis suatu ester oleh lipase dapat dilihat pada Gambar 2.7 di bawah ini. Reaksi tersebut merupakan hasil reaksi bertahap yang menghasilkan senyawa digliserida dan monogliserida sebagai senyawa intermedietnya.



gugus alkil yang bersifat nukleofil dari reaktan. Senyawa nukleofil tersebut umumnya merupakan suatu senyawa yang memiliki gugus hidroksil, seperti alkohol (Schuchardt, Ulf, et al. 1997).

Secara sederhana reaksi hidrolisis-esterifikasi dapat digambarkan dalam suatu reaksi kesetimbangan.



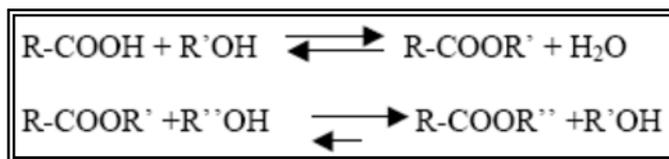
[Sumber: Schuchardt, Ulf, et al. 1997]

Gambar 2.8 Kesetimbangan Reaksi Hidrolisis-Esterifikasi Secara Umum

Pada reaksi esterifikasi terjadi seperti pada Gambar 2.8 tersebut, reaksi akan mengarah ke sebelah kiri atau ke arah pembentukan produk esternya. Pada reaksi ini suatu alkohol dengan gugus alkil (R') akan berpindah menggantikan gugus hidroksi (OH) pada senyawa asam karboksilat. Reaksi esterifikasi ini, walaupun bersifat spontan, namun akan berlangsung dengan waktu reaksi yang cukup lama, dan dapat mencapai berhari-hari. Karena kondisi tersebut, maka pada reaksi esterifikasi ini digunakan suatu katalis yang dapat mempercepat waktu reaksi yang diperlukan oleh reaktan dan substrat untuk mencapai energi aktivasi yang diperlukan. Katalis yang dapat digunakan pada reaksi esterifikasi ini, yaitu katalis asam, katalis basa, enzim, dan lain-lain (Schuchardt, Ulf, et al. 1997).

Beberapa ciri-ciri khusus yang dimiliki oleh enzim, yaitu kemampuan selektivitas mereka yang tinggi serta dapat bekerja pada kondisi yang lebih lunak ini, telah membuat enzim terkenal sebagai katalis yang lebih ramah dalam suatu reaksi (Adamopoulos, 2006).

Suatu enzim hidrolitik mampu untuk mengkatalisis reaksi esterifikasi maupun transesterifikasi. Reaksi ini dapat terjadi pada kondisi jika terdapat kehadiran suatu pelarut organik dalam sistem reaksi. Pada keadaan ini, reaksi yang akan terjadi ialah reaksi kebalikan dari aktivitas lipase pada umumnya. Oleh karena itu, pada kondisi ini lipase akan dapat mengkatalisis suatu reaksi esterifikasi atau transesterifikasi (Adamopoulos, 2006).



[Sumber : Adamopoulos, 2006]

Gambar 2.9 Reaksi Esterifikasi dan Transesterifikasi

Dalam jalur hidrolitik biasa, katalis lipase akan mengikuti prinsip Le Chatelier, yaitu bila pada suatu sistem kesetimbangan diadakan aksi, maka sistem akan mengadakan perubahan-perubahan sedemikian rupa sehingga pengaruh aksi akan sekecil-kecilnya (Widyanti, 1989). Reaksi kesetimbangan di atas (Gambar 2.8) air adalah nukleofil yang menyerang asil-enzim intermediet. Pada reaksi tersebut, apabila salah satu komponen reaktan dikurangi, seperti konsentrasi air dalam medium, maka akan terjadi suatu perubahan kesetimbangan kimia ke arah pembentukan senyawa esternya.

Dalam pelarut organik, serangan nukleofil tersebut dilakukan oleh alkohol, amina, dan thiols, mengarah pada pembentukan ester, amida, dan thioesters (Adamopoulos, 2006). Untuk dapat mengoptimalkan kondisi reaksi, maka jumlah air yang ada dalam sistem harus diawasi. Bahkan, jumlah air yang ada diminimumkan, namun tetap dipastikan bahwa enzim dalam bentuk aktifnya. Pelarut harus bersifat non polar atau rendah polaritasnya, sehingga tidak mempengaruhi hidrasi enzim. Kondisi reaksi (temperatur, pH, waktu reaksi, rasio molar substrat) dan juga jumlah enzim yang digunakan merupakan faktor-faktor yang perlu diperhatikan untuk mengoptimalkan sintesis (Adamopoulos, 2006).

#### 2.4 Fermentasi

Fermentasi berasal dari kata *ferment* yang berarti mendidih. Pada awalnya fermentasi didefinisikan sebagai anggur yang mendidih, kemudian pengertiannya berkembang secara luas menjadi penggunaan mikroba untuk bahan pangan. Oleh Louis Pasteur, fermentasi didefinisikan sebagai proses penguraian gula pada buah anggur menjadi gelembung-gelembung udara (CO<sub>2</sub>) oleh khamir yang terdapat pada cairan ekstrak anggur tersebut. Dari definisi ini kemudian arti fermentasi

berkembang menjadi suatu kultur mikroba untuk menghasilkan produk berupa metabolit-metabolit, enzim, atau produk lainnya (Putri, 2008).

Lipase yang dihasilkan oleh bakteri pada umumnya akan dikeluarkan dari sel bakteri tersebut, atau disebut juga sebagai enzim ekstraseluler. Produksi lipase dari bakteri ini dapat dipengaruhi oleh kondisi nutrisi dan faktor fisika kimia, seperti temperatur, pH, sumber nitrogen dan karbon, adanya lipid, garam anorganik, kondisi pengocokan, serta konsentrasi oksigen terlarut (Jaeger et al, 1994).

Faktor utama yang mempengaruhi produksi lipase, yaitu sumber karbon dari bakteri tersebut. Umumnya, lipase akan diproduksi oleh bakteri apabila tersedianya nutrisi sumber karbon berupa senyawa lipid. Lipid tersebut dapat berupa minyak, triasilgliserol, asam lemak, ester yang dapat terhidrolisis, tweens, dan gliserol. Selain sumber karbon, produksi lipase ini juga dipengaruhi oleh sumber nitrogen bakteri. Sumber nitrogen yang umum digunakan dalam produksi lipase adalah pepton dan ekstrak khamir (Gupta, 2004).

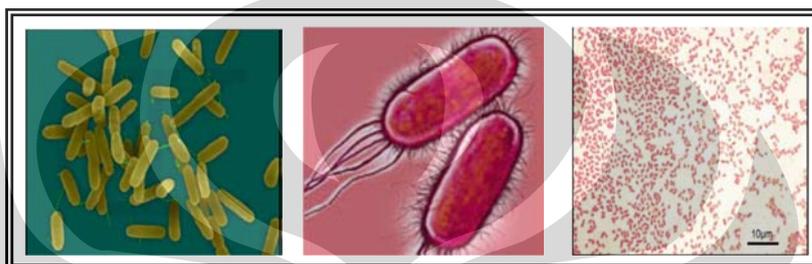
Derajat keasaman dari medium pertumbuhan bakteri juga dapat mempengaruhi banyaknya lipase yang dihasilkan. Bakteri pada umumnya dapat bertahan hidup pada pH 7, pada pH ini juga merupakan kondisi yang optimum dalam menghasilkan lipase. Selain itu, kondisi temperatur yang optimum untuk produksi lipase biasanya berhubungan paralel dengan temperatur yang digunakan untuk pertumbuhan dari bakteri tersebut. Berdasarkan penelitian yang ada, lipase dihasilkan dalam rentang temperatur berkisar 20°C – 45°C (Jaeger et al, 1999). Waktu inkubasi yang diperlukan selama produksi lipase beragam, yaitu berkisar antara beberapa jam hingga beberapa hari sampai diperoleh produksi lipase yang maksimum (Gupta, 2004).

## 2.5 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* termasuk dalam genus *Pseudomonas*, yang ditemukan oleh Migula pada tahun 1984. Berikut ini merupakan sistem klasifikasi dari *P. aeruginosa*.

Kingdom : Bacteria

Phylum : Proteobacteria  
 Class : Gamma Proteobacteria  
 Order : Pseudomonadales  
 Family : Pseudomonadaceae  
 Genus : Pseudomonas  
 Species : *Pseudomonas aeruginosa*  
 (*Pseudomonas aeruginosa*, 2010)



[Sumber: Todar, 2010]

Gambar 2.10 *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* berbentuk batang dengan ukuran sekitar 0,6 x 2 µm. Bakteri ini terlihat sebagai bakteri tunggal, berpasangan, dan terkadang membentuk rantai yang pendek. Bakteri ini termasuk kedalam golongan bakteri gram negatif dengan sifatnya yang aerob, katalase positif, oksidase positif, tidak berspora, tidak mempunyai selubung (*sheat*) dan mempunyai flagel monotrika (flagel tunggal pada kutub) sehingga selalu bergerak. Keunikan dari bakteri ini, yaitu memiliki dua jenis pigmen. Kedua pigmen tersebut adalah *Pyoverdin* (Pigmen *Fluorescent*) dan *Pyocyanin* (*Blue Pigment*) (*Pseudomonas aeruginosa*, 2010).

Berdasarkan habitat alamnya, *P. aeruginosa* umumnya memiliki habitat berupa tempat-tempat yang basah, seperti pada tanah dan air (Todar, 2008). *P. aeruginosa* juga mudah tumbuh pada berbagai media pembiakan, hal ini karena kebutuhan nutrisi bakteri ini sangat sederhana. Namun, di laboratorium, medium paling sederhana untuk pertumbuhannya digunakan asetat dan ammonium sulfat (*Pseudomonas aeruginosa*, 2010).

*P. aeruginosa* dapat memiliki tiga bentuk koloni. Ketiga bentuk koloni tersebut, yaitu berupa koloni dengan ukuran yang kecil serta kasar, memiliki bentuk melebar dan halus, dan terakhir berupa koloni berlendir. Koloni berlendir ini merupakan alginat yang diproduksi oleh bakteri ini (Todar, 2010).



[Sumber: Todar, 2010]

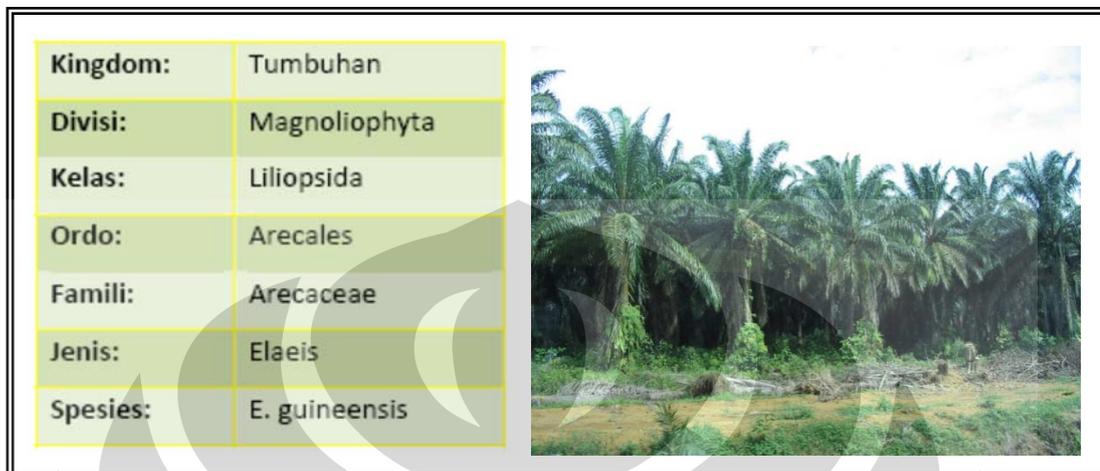
Gambar 2.11 Koloni *Pseudomonas aeruginosa* Pada Medium Nutrient Agar

## 2.6 Tanaman Kelapa Sawit

Kelapa sawit (*Elaeis*) merupakan tumbuhan industri penghasil minyak terbesar, baik itu minyak masak, minyak industri, maupun bahan bakar. Pohon kelapa sawit termasuk kedalam famili *Palma* atau *Arecaceae* yang terdiri dari dua spesies, yaitu pohon kelapa sawit Afrika; *Elaeis guineensis*, yang berasal dari Afrika barat di antara Angola dan Gambia; serta pohon kelapa sawit Amerika, *Elaeis oleifera*, berasal dari Amerika Tengah dan Amerika Selatan (Kelapa Sawit, 2010).

Minyak sawit dan minyak inti kelapa sawit terdiri dari trigliserida, asam lemak, serta gliserol. Dalam keduanya kaya akan konsentrasi asam lemak yang berkisar antara 50% dan 80% masing-masingnya. Pada Gambar 2.13 dapat dilihat kandungan asam lemak yang terdapat pada minyak sawit. Kandungan minyak sawit sebagian besar terdiri atas senyawa trigliserida dengan asam lemak palmitat dan oleat. Selain itu, minyak sawit juga mengandung komponen lainnya, seperti

*tocotrienol*, yaitu merupakan bagian dari vitamin E; vitamin K; dan magnesium (Kelapa Sawit, 2010).



[Sumber: Kelapa Sawit, 2010]

Gambar 2.12 Pohon Kelapa Sawit (kanan) dan Sistematika Pohon Kelapa Sawit (kiri)



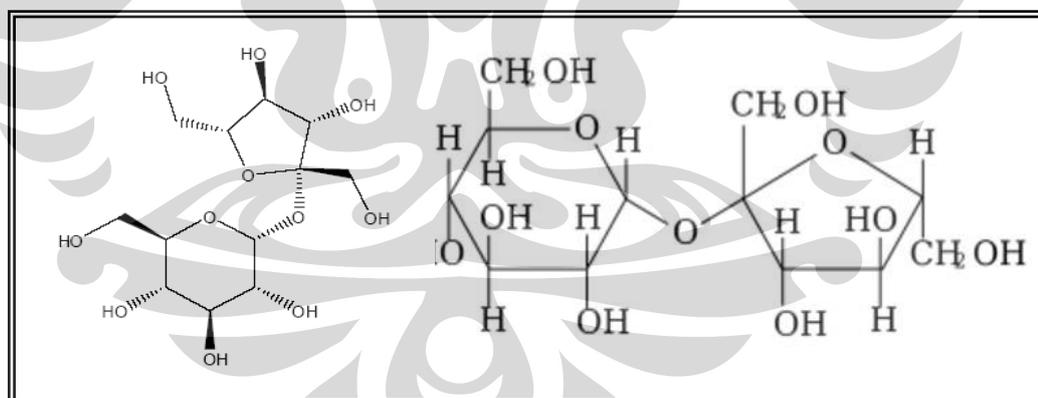
[Sumber: Kelapa Sawit, 2010]

Gambar 2.13 Kadar Asam Lemak Dalam Minyak Sawit

## 2.7 Sukrosa

Sukrosa merupakan senyawa oligosakarida yang memiliki peranan penting dalam pengolahan makanan. Sukrosa banyak dijumpai pada tanaman tebu, bit, siwalan, dan kelapa kopyor. Sukrosa berdasarkan strukturnya berupa senyawa disakarida (heterodisakarida) dengan rumus molekul  $C_{12}H_{22}O_{11}$  (Sukrosa, 2010).

Sukrosa merupakan disakarida gabungan antara monosakarida  $\alpha$ -glukosa dan fruktosa yang terhubung dengan suatu ikatan glikosida. Kedua atom C anomerik dari fruktosa dan juga glukosa digunakan untuk membentuk ikatan glikosida tersebut. Ikatan glikosida ini menghubungkan karbon ketal dan asetal yang bersifat  $\beta$  dari fruktosa dan  $\alpha$  dari glukosa. Hal ini membuat sukrosa tidak memiliki gugus hemiasetal. Oleh karena itu, sukrosa di dalam air tidak berada dalam kesetimbangan dalam bentuk aldehyd atau keto. Sukrosa juga tidak menunjukkan adanya mutarotasi dan tidak termasuk kedalam jenis 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 (Adamopoulos, 2006).



[Sumber: Adamopoulos, 2006]

Gambar 2.14 Struktur Kimia Sukrosa

## BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Alat dan Bahan

#### 3.1.1 Alat-alat yang Digunakan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini, yaitu autoklaf, batang pengaduk, *beaker glass*, botol timbang, buret, cawan petri, corong, corong pisah, gelas arloji, gelas ukur, *hot plate*, *incubator shaker*, *incubator*, kondensor, kuvet, labu bulat, labu bulat leher tiga, labu erlenmeyer, *magnetic stirrer*, neraca digital, pipet tetes, pipet ukur, pipet volumetri, *ring stand*, *rotatory evaporator*, spatula, spektrofotometer *Spectronic 20*, tabung reaksi, tabung sentrifuge, dan *ultrasentrifuge*.

#### 3.1.2 Bahan-bahan yang Digunakan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini, yaitu *aluminium foil*, aquademin, aseton, biakan *Pseudomonas aeruginosa* BTCC B-549, *beef Extract*, dikalium hidrogen fosfat ( $K_2HPO_4$ ), etanol ( $C_2H_5OH$ ), fenoltalein, folin-ciotalteu, gum arab, heksana, kalium dihidrogen fosfat ( $KH_2PO_4$ ), kloroform ( $CHCl_3$ ), metanol ( $CH_3OH$ ), minyak sawit merek Sania, natrium hidroksida ( $NaOH$ ), natrium karbonat ( $Na_2CO_3$ ), natrium klorida ( $NaCl$ ), natrium sulfat ( $Na_2SO_4$ ) anhidrad, natrium tartarat, *nutrient agar*, *olive oil* merek Bertolli, *pepton*, sukrosa, tembaga(II)sulfat anhidrad ( $CuSO_4$ ), dan *yeast extract*.

### 3.2 Prosedur Kerja

#### 3.2.1 Uji Kualitatif Bakteri Penghasil Lipase

Satu ose kultur bakteri digesekkan dalam medium *Nutrient Agar* (NA) yang telah mengandung 0,001 % (w/v) *Rhodamine B* dan *Olive Oil* 1% (w/v). Medium biakan ini kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada temperatur 30°C. Setelah itu biakan disinari di bawah lampu sinar UV. Apabila dihasilkan pendaran warna *orange*, maka biakan tersebut mampu untuk menghasilkan lipase.

### 3.2.2 Pembuatan Inokulum (*Seed Culture*)

Penyiapan Inokulum dilakukan dengan membuat suspensi biakan dalam 50 mL *Nutrient Broth* (NB), yang terdiri dari 0,5% (w/v) pepton; 0,15% (w/v) *yeast extract*; 0,5% (w/v) *beef extract*; 0,5% (w/v) NaCl; yang dilarutkan dalam buffer fosfat pH 8. Kemudian, pada media tersebut ditambahkan sumber karbon berupa *Olive Oil* sebanyak 1% (w/v). Pembuatan suspensi dilakukan dengan cara menuangkan secara aseptis NB ke dalam biakan agar miring bakteri. Dengan menggunakan jarum ose, biakan bakteri yang ada dikeruk hingga terlepas dari media agar miring dan tersuspensikan dalam media NB. Suspensi biakan bakteri yang ada diinkubasi selama 2 hari.

### 3.2.3 Penentuan Jumlah Bakteri

Penentuan jumlah bakteri yang terdapat pada Inokulum dilakukan dengan menggunakan metode *Optical Density* (OD) dan *Total Plate Count* (TPC).

#### 3.2.3.1 *Total Plate Count* (TPC)

Larutan Inokulum yang telah diinkubasi selama 2 hari tersebut diencerkan kedalam beberapa variasi, yaitu  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ , dan  $10^{-8}$ . Metode TPC yang digunakan, yaitu secara Metode Cawan Tuang. Biakan yang telah diencerkan masing-masing dipipet secara aseptis ke dalam cawan petri, kemudian *Nutrient Agar* (NA) dituangkan ke dalam cawan petri yang telah mengandung biakan. Biakan hasil pengenceran tersebut diinkubasi selama dua hari dan setelah itu dilakukan penghitungan jumlah koloni pada setiap konsentrasi biakan. Jumlah koloni yang dianggap dapat mewakili jumlah total biakan, yaitu berkisar 30-300 koloni.

#### 3.2.3.2 *Optical Density* (OD)

Pada metode ini dilakukan pengukuran spektrofotometri terhadap nilai kekeruhan dari masing-masing biakan yang telah mengalami pengenceran pada panjang gelombang 620 nm.

### 3.2.4 Produksi Lipase Ekstrak Kasar

Dilakukan inokulasi pada larutan inokulum sebanyak 1% (w/v) ke dalam media fermentasi yang terdiri dari 50 mL NB yang mengandung 1% (w/v) *Olive Oil* steril. Kemudian fermentasi dilakukan selama 4 hari pada temperatur 30°C dengan kecepatan agitasi sebesar 200 rpm. Selanjutnya, larutan yang telah difermentasi tersebut terlebih dahulu disaring, sehingga warna larutan menjadi lebih jernih. Larutan yang diperoleh kemudian *disentrifuge* dengan kecepatan 10.000 rpm pada temperatur 4°C selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh mengandung lipase ekstrak kasar.

### 3.2.5 Penentuan Nilai Unit Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar

Sebanyak 1,5% (v/v) lipase ekstrak kasar dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 100 mL yang telah berisi 8,5 mL emulsi yang terdiri dari 5% (w/v) *Olive Oil*, 5% (w/v) gum arab dalam buffer fosfat pH 7. Emulsi ini kemudian diinkubasi pada temperatur 30°C dengan kecepatan agitasi 150 rpm selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan campuran aseton-etanol (1:1 v/v). Banyaknya asam lemak bebas yang terbentuk ditentukan dengan metode titrimetrik menggunakan NaOH 0,05 N dengan indikator fenolftalein.

Larutan blanko pada pengujian nilai unit aktivitas lipase ekstrak kasar memiliki komposisi seperti di atas. Namun, enzim yang digunakan terlebih dahulu dimatikan dengan cara pemanasan selama 10 menit pada penangas air mendidih. Selanjutnya pada larutan blanko tersebut dilakukan perlakuan yang sama seperti di atas.

### 3.2.6 Penentuan Kadar Protein Lipase Ekstrak Kasar

Penentuan kadar protein dilakukan dengan menggunakan metode Lowry, dengan *Bovine Serum Albumin* (BSA) digunakan sebagai standar protein. Pereaksi yang diperlukan adalah sebagai berikut (Sumarsih, 2000):

- a. Pereaksi A, terdiri dari Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% dalam 0,1 N NaOH
- b. Pereaksi B, terdiri dari CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,5% dalam Natrium Tartarat

- c. Pereaksi C adalah larutan Cu alkalis, terdiri dari campuran pereaksi A dan B (50:1 v/v)
- d. Pereaksi D adalah reagen Folin-Ciotalteu

Kedalam tabung reaksi dimasukkan larutan sampel sebanyak 0,4 mL dan pereaksi C sebanyak 2 mL, campuran tersebut kemudian dikocok hingga homogen dan didiamkan selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 0,2 mL pereaksi D, dikocok dan didiamkan hingga 30 menit. Larutan yang diperoleh diukur serapannya pada panjang gelombang 750 nm menggunakan spektrofotometer UV/Vis. Kadar protein dalam larutan enzim ditentukan berdasarkan kurva standar BSA.

Kurva standar BSA dibuat dengan beberapa konsentrasi, yaitu 50, 100, 150, 200, 300, 350, dan 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Setiap larutan diperlakukan sama dengan larutan sampel.

### **3.2.7 Aplikasi Lipase Ekstrak Kasar Sebagai Biokatalisator Pada Reaksi Esterifikasi Asam Lemak Minyak Sawit Terhadap Sukrosa**

#### **3.2.7.1 Hidrolisis Minyak Sawit**

Pada proses hidrolisis minyak sawit, diperlukan 20 g minyak yang disaponifikasi dengan menggunakan 100 mL KOH 1 M dalam 95 % Etanol pada temperatur  $(62 \pm 2) ^\circ\text{C}$  selama satu jam. Kemudian 50 mL akuademin ditambah ke dalam campuran saponifikasi tersebut dan bahan yang tidak tersaponifikasi dipisahkan secara ekstraksi dengan menggunakan pelarut heksana sebanyak (2 x 70 mL). Lapisan heksana yang mengandung bahan yang tidak tersaponifikasi dipisahkan. Selanjutnya, lapisan yang mengandung bahan saponifikasi diasamkan dengan menggunakan HCl 3N hingga larutan tersebut memiliki pH=1. Campuran ini dipindahkan ke dalam corong pemisah dan asam lemak bebas diekstrak menggunakan 50 mL heksana. Lapisan heksana yang mengandung asam lemak bebas didehidrasikan dengan menggunakan natrium sulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) anhidrad. Kemudian, pelarut heksana berlebih diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada temperatur  $40 ^\circ\text{C}$ .

### 3.2.7.2 Reaksi Esterifikasi Dengan Menggunakan Lipase Ekstrak Kasar

Reaksi esterifikasi enzimatis antara sukrosa dengan asam lemak minyak sawit dilakukan dengan melarutkan asam lemak minyak sawit dalam 25 mL pelarut heksana. Larutan asam lemak minyak sawit ini kemudian ditambahkan 0,7 mL sukrosa dan 0,3 mL buffer fosfat pH 7 yang telah mengandung 0,25 g gum arab. Pada campuran tersebut dilakukan pra inkubasi selama 5 menit pada temperatur 30°C, kemudian dilakukan penambahan lipase ekstrak kasar sebanyak 1 mL dan inkubasi dilanjutkan selama 4 hari dengan menggunakan pengocokan magnetis.

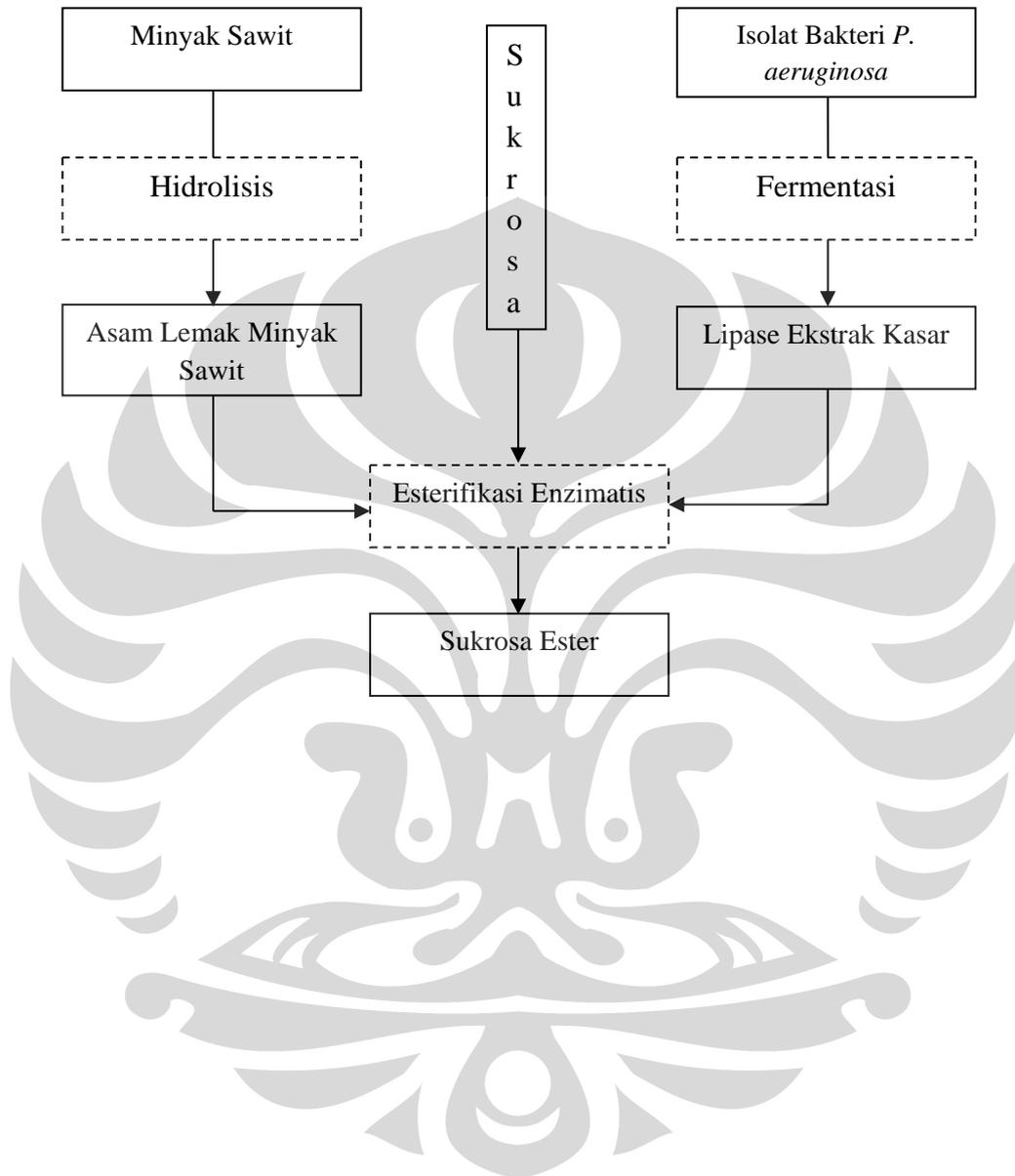
Penghentian reaksi esterifikasi enzimatis Sukrosa Ester (SE) dilakukan dengan penambahan larutan NaOH 0,1 N secara berlebih untuk menetralkan asam lemak yang tidak bereaksi. Konsentrasi basa yang berlebih dalam larutan tersebut dinetralisasi kembali dengan HCl 0,1 N.

### 3.2.7.3 Analisis Produk

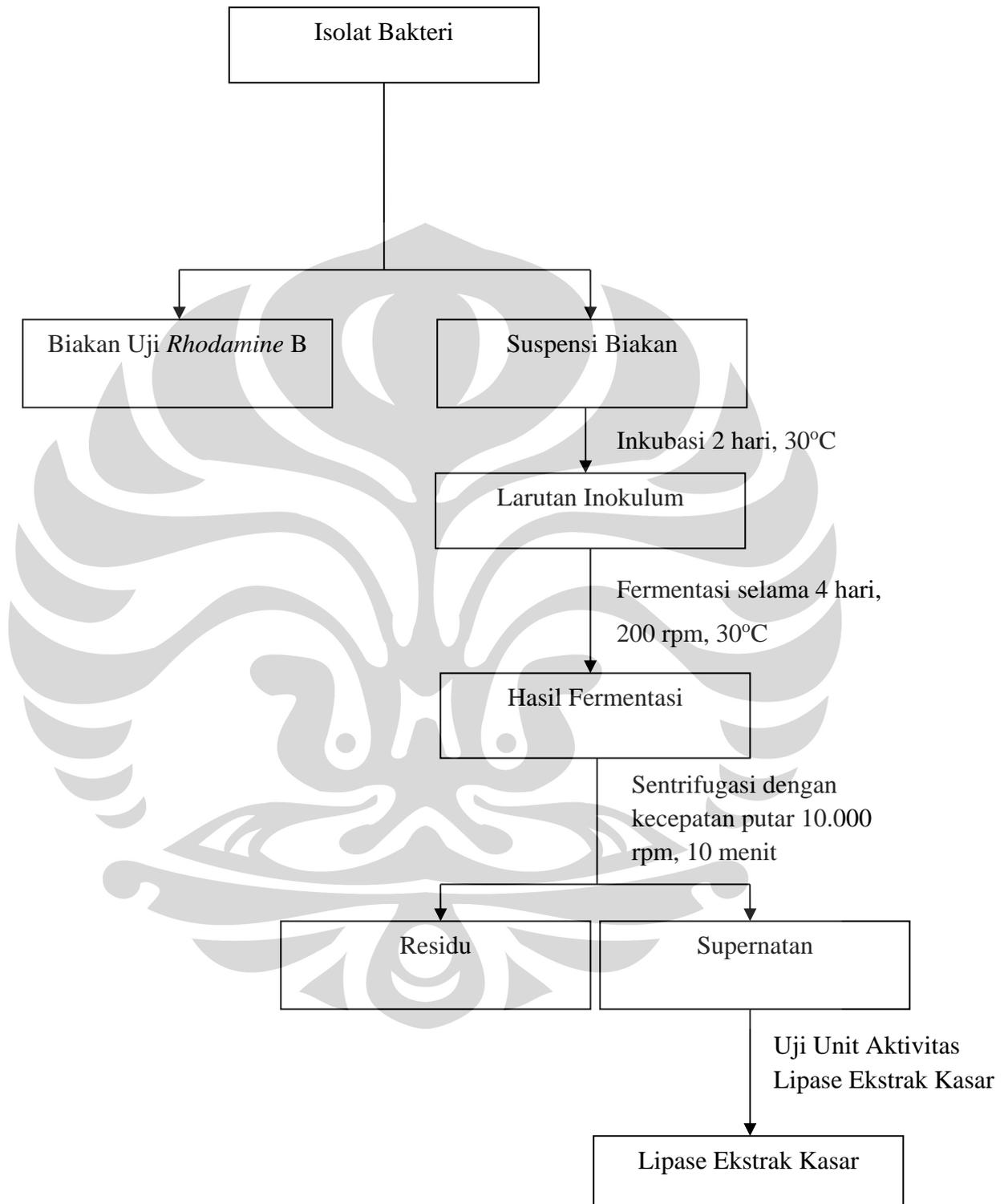
Sukrosa Ester yang berada dalam campuran larutan diekstraksi dari larutan *aqueousnya* dengan menggunakan kloroform 1 : 1 terhadap banyaknya larutan campuran. Lapisan kloroform yang berada di bawah dipisahkan dan ditambahkan dengan metanol hingga jernih. SE yang berada dalam metanol ditetesi oleh larutan indikator fenolftalein dan diberikan NaOH secara berlebih hingga berwarna merah muda. Larutan merah muda ini kemudian dipanaskan hingga menjadi tidak berwarna.

### 3.2.8 Bagan Kerja

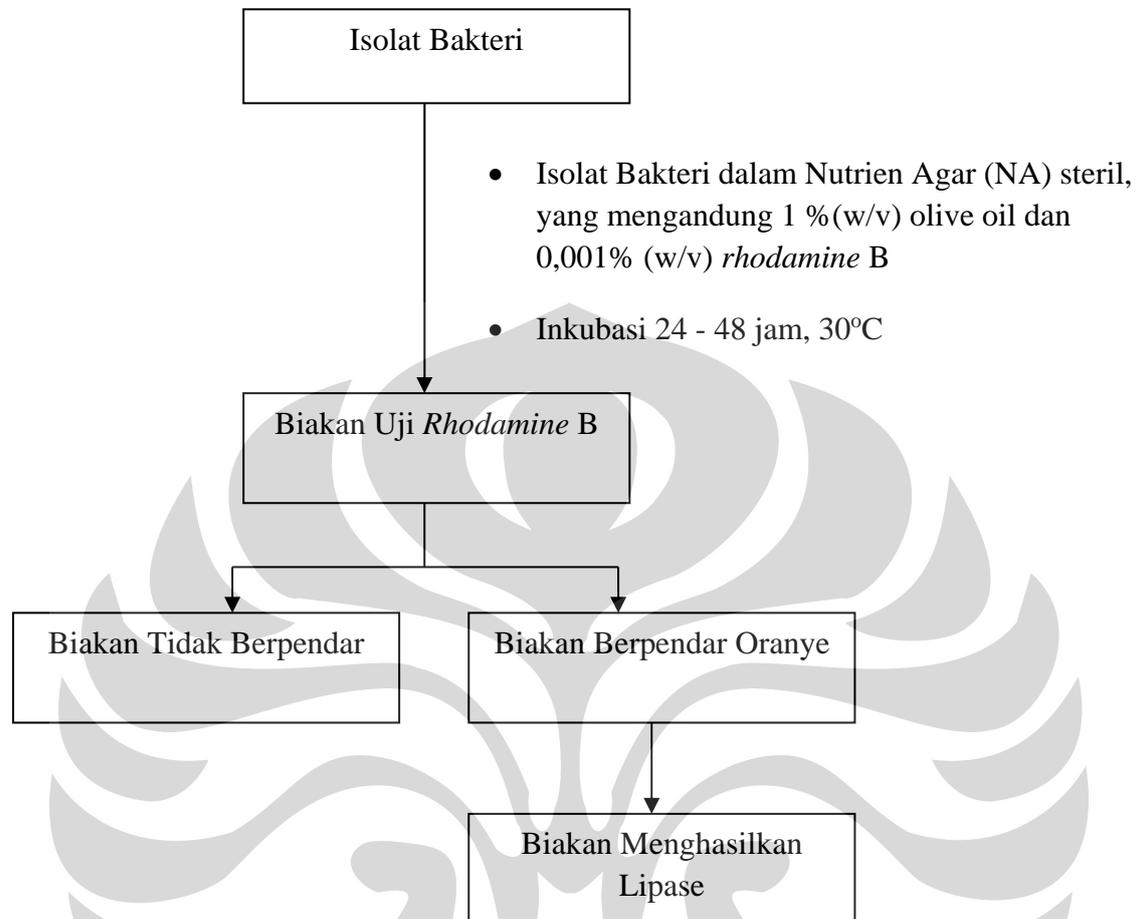
#### 3.2.8.1 Bagan Kerja Umum



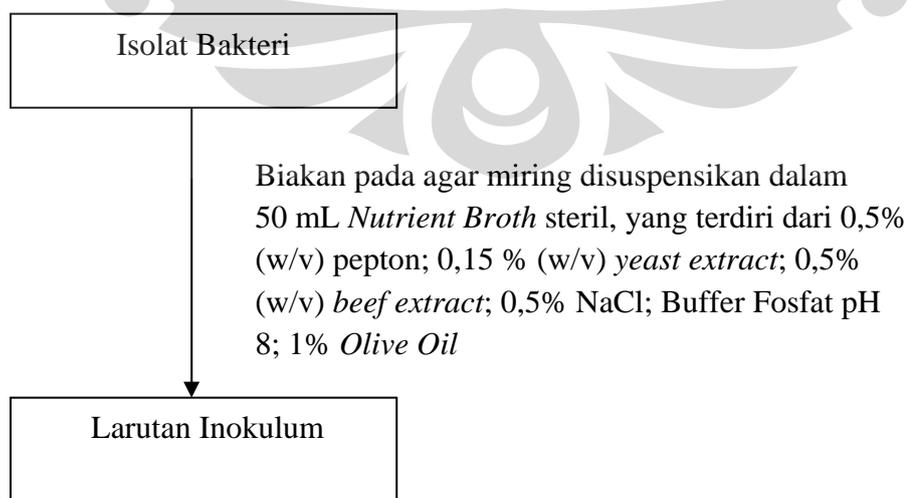
### 3.2.8.2 Bagan Kerja Umum Produksi Lipase Ekstrak Kasar



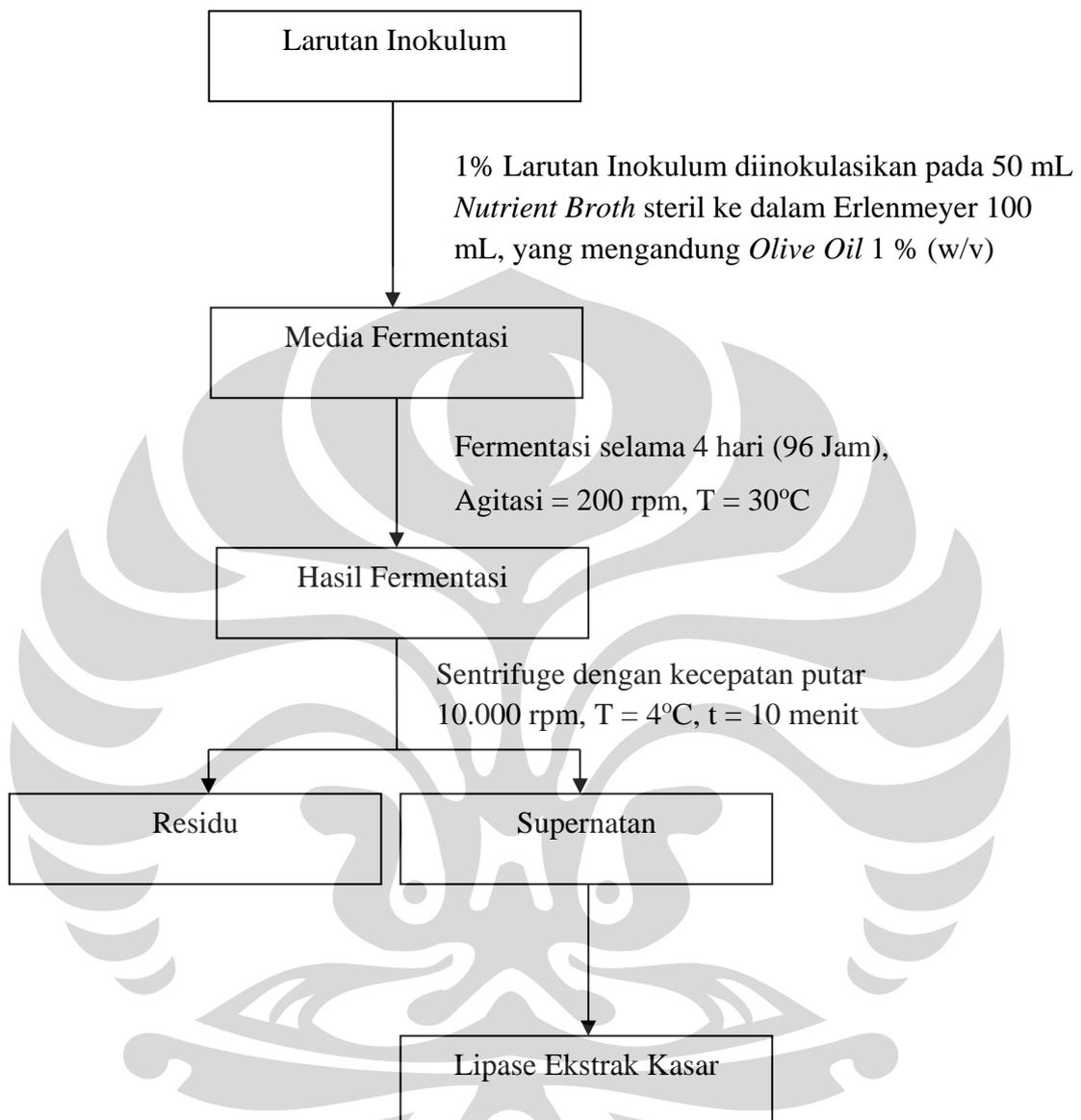
### 3.2.8.3 Uji Kualitatif Bakteri Penghasil Lipase



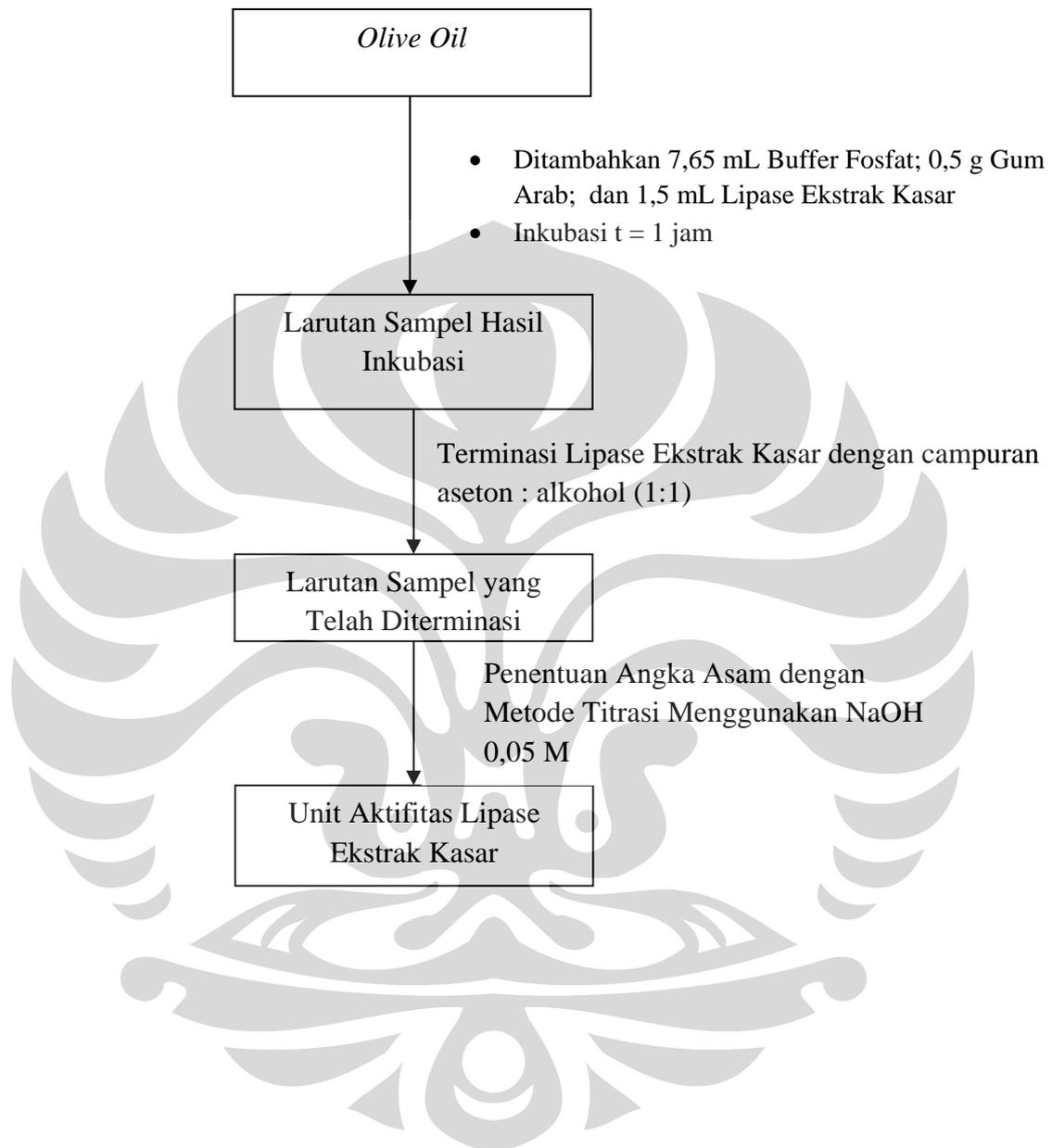
### 3.2.8.4 Pembuatan Inokulum (*Seed Culture*)



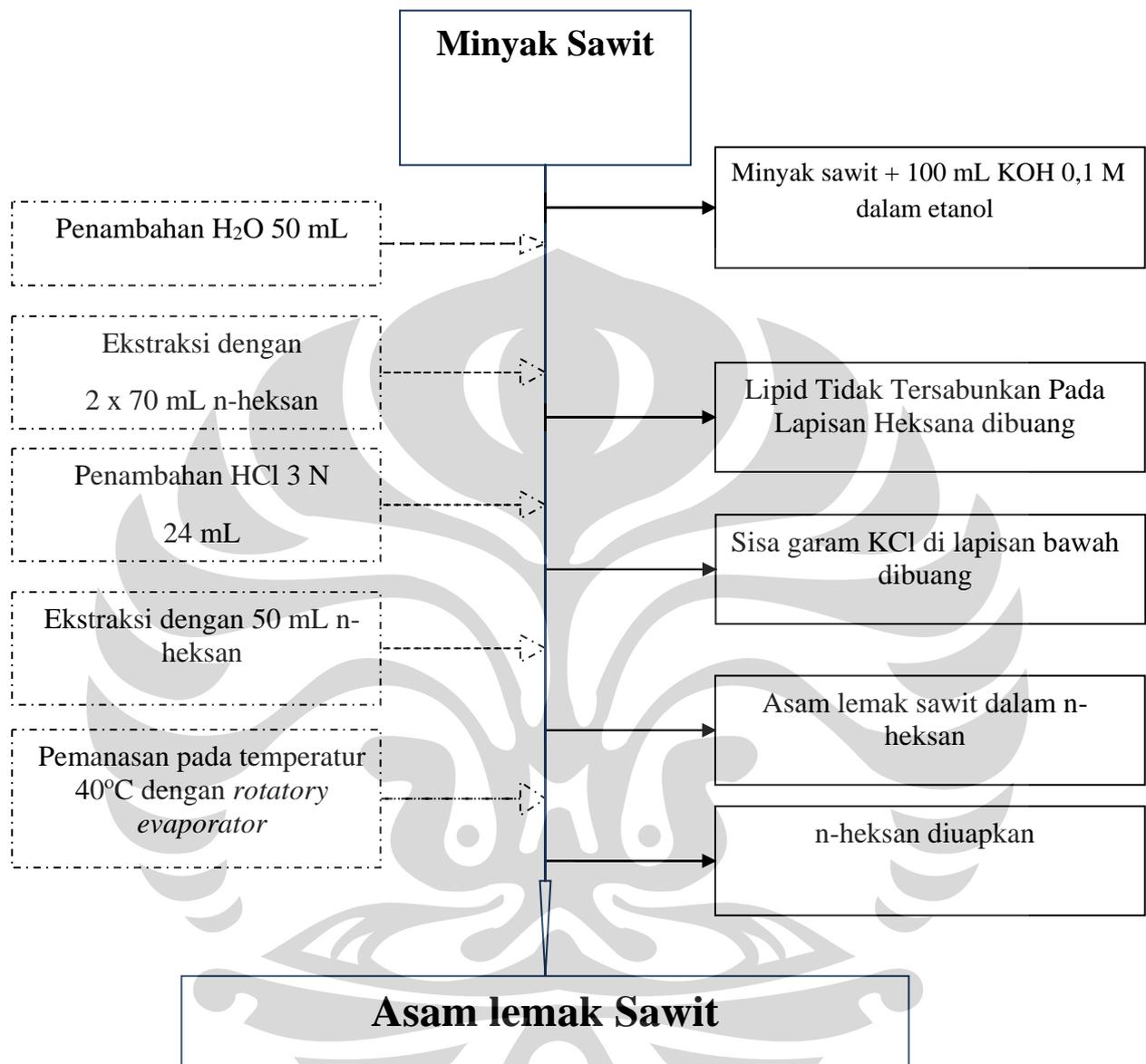
### 3.2.8.5 Produksi Lipase Ekstrak Kasar



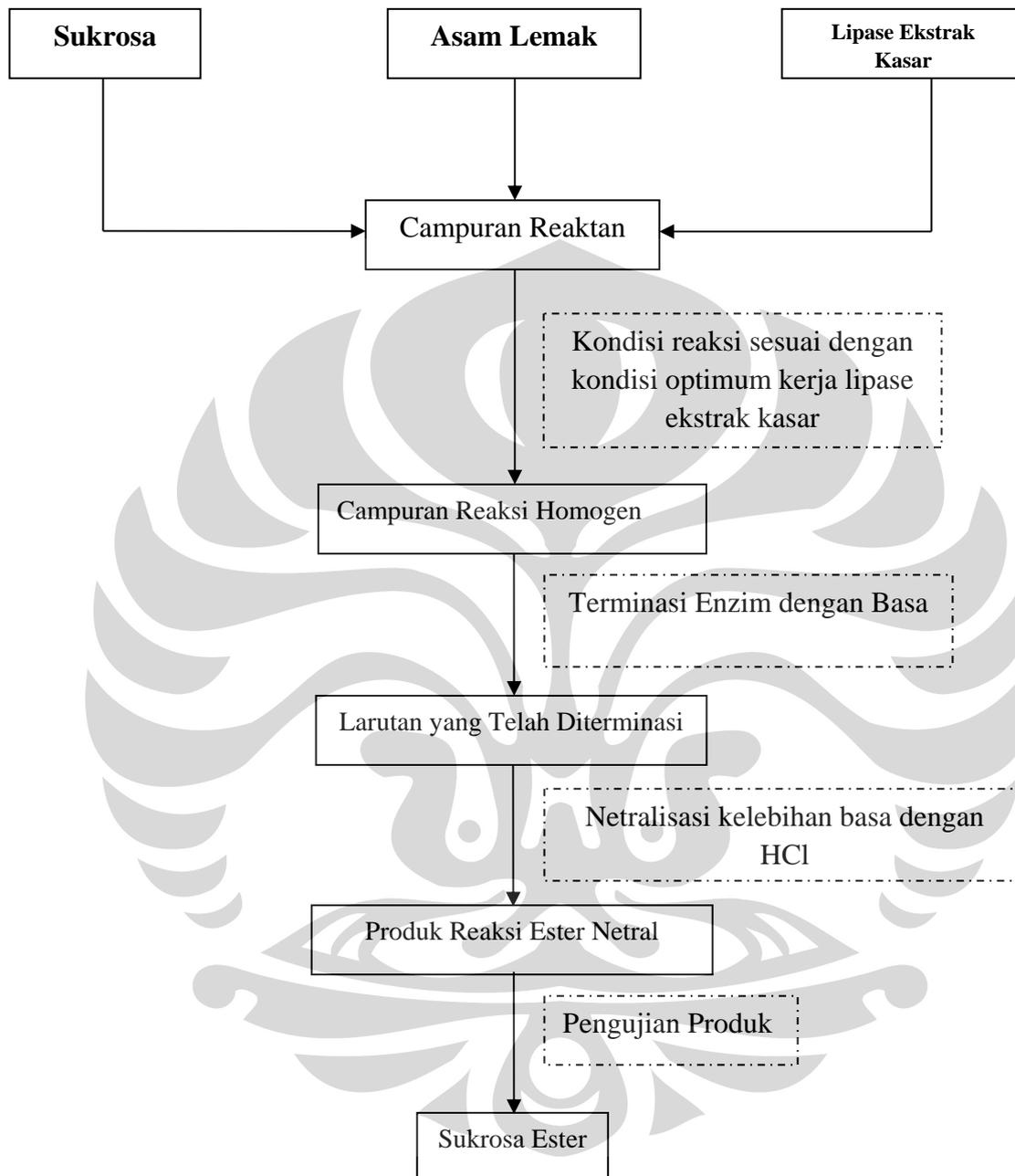
### 3.2.8.6 Penentuan Nilai Unit Aktifitas Lipase Ekstrak Kasar



### 3.2.8.7 Bagan Kerja Reaksi Hidrolisis Minyak Sawit



### 3.2.8.8 Reaksi Esterifikasi Enzimatis



## **BAB 4**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Tujuan dari penelitian ini, yaitu mengisolasi lipase ekstrak kasar dari *P. aeruginosa* serta mengaplikasikannya sebagai biokatalis pada reaksi esterifikasi antara asam lemak minyak sawit dengan senyawa karbohidrat sederhana, seperti sukrosa. Pada penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan. Tahapan pertama, yaitu dilakukannya uji kualitatif pada *P. aeruginosa*, apakah bakteri tersebut dapat menghasilkan lipase ekstraseluler atau tidak. Kemudian setelah uji kualitatif, inokulum dari *P. aeruginosa* diinokulasikan pada medium fermentasi yang telah mengandung sejumlah *Olive Oil*. Proses fermentasi untuk menghasilkan lipase ekstrak kasar ini dilakukan selama empat hari. Selanjutnya, hasil fermentasi berupa lipase ekstrak kasar dikarakterisasi kondisi optimum aktivitas katalitiknya. Terakhir, yaitu pengaplikasian lipase ekstrak kasar tersebut sebagai biokatalisator.

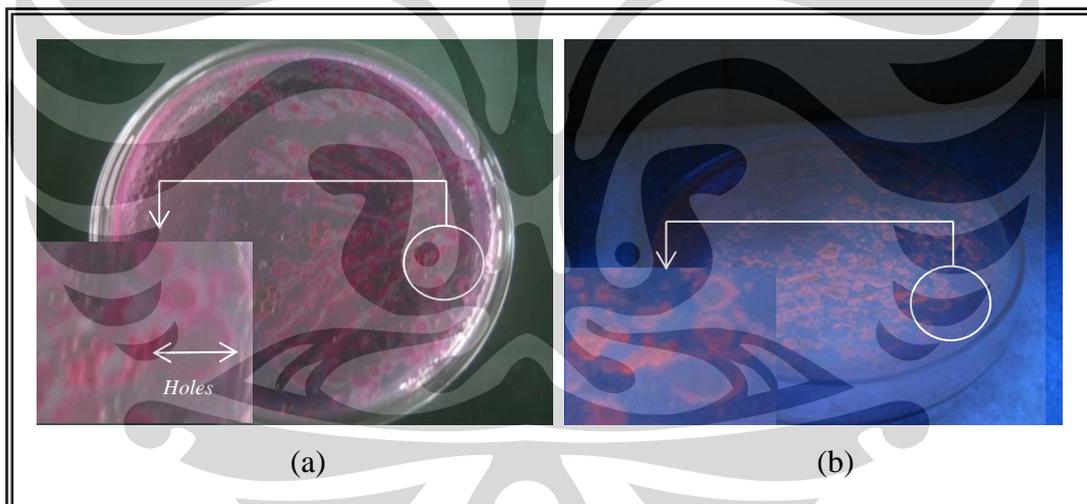
#### **4.1 Uji Kualitatif Bakteri Penghasil Lipase**

Lipase dapat dihasilkan oleh berbagai mikroba, baik bakteri, kapang, maupun khamir. Namun, pada penelitian ini, digunakan spesies dari golongan bakteri untuk menghasilkan lipase. Spesies bakteri yang digunakan sebagai penghasil lipase tersebut, yaitu *Pseudomonas aeruginosa*. Digunakannya bakteri ini sebagai penghasil lipase karena lipase yang dihasilkannya bersifat ekstraseluler sehingga memudahkan dalam tahapan isolasinya (Yapasan, 2008). Walaupun demikian, pada penelitian ini tetap dilakukan pengujian kualitatif bakteri penghasil lipase dengan menggunakan zat warna rhodamine B.

Uji kualitatif bakteri penghasil lipase dilakukan dengan menggunakan metode uji rhodamine B. Pada metode ini *Olive Oil* berperan sebagai substrat dan zat warna rhodamine B sebagai indikator adanya asam lemak yang dihasilkan dari proses hidrolisis substrat oleh lipase. Metode uji kualitatif ini merupakan metode pengujian yang spesifik untuk lipase, karena pada uji ini digunakan *Olive Oil* sebagai substrat yang sebagian besar komposisinya terdiri dari trigliserida dengan ester asam lemak rantai panjang yang merupakan substrat spesifik yang dikatalisis oleh lipase.

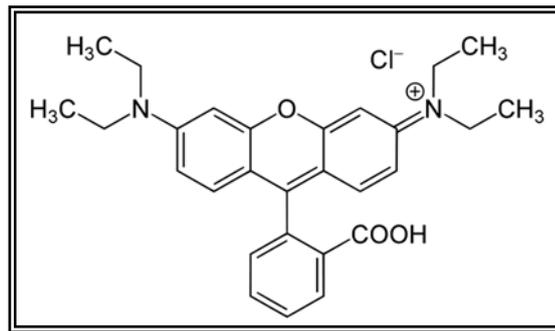
Pada pengujian secara kualitatif ini, bakteri uji, yaitu *P. aeruginosa* pada agar miring diinokulasikan pada sebuah medium padat yang terdiri dari *Nutrient Agar*, *Olive Oil*, serta zat warna rhodamine B. *Olive Oil* pada medium ini berfungsi sebagai sumber karbon bagi bakteri dan juga sebagai zat penginduksi untuk disekresikannya lipase. Hal ini karena lipase merupakan enzim ekstraseluler yang bersifat sebagai enzim induktif. Enzim ini akan diproduksi dalam jumlah yang cukup signifikan apabila terdapat substrat enzim tersebut dalam lingkungan pertumbuhan bakteri.

Produk hasil hidrolisis substrat tersebut akan berpendar *orange* apabila disinari di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 350 nm. Berdasarkan hasil pengamatan pada Gambar 4.1 (a), dapat dilihat bahwa adanya lingkaran (*holes*) bening yang mengindikasikan adanya reaksi hidrolisis trigliserida kedalam asam lemaknya.



Gambar 4.1 Hasil Pengamatan Uji Kualitatif Bakteri Penghasil Lipase, (a) Tanpa Sinar UV, (b) Dengan Penyinaran Sinar UV

Pada Gambar 4.1 (b) dapat dilihat bahwa, *holes* tersebut mengalami pemendaran berwarna *orange* ketika biakan disinari dibawah lampu UV. Pendaran ini karena terbentuknya suatu kompleks antara ion asam lemak yang dihasilkan pada reaksi hidrolisis enzimatik oleh lipase dengan kationik *rhodamine B* (Kouker dan Jaeger, 1986).



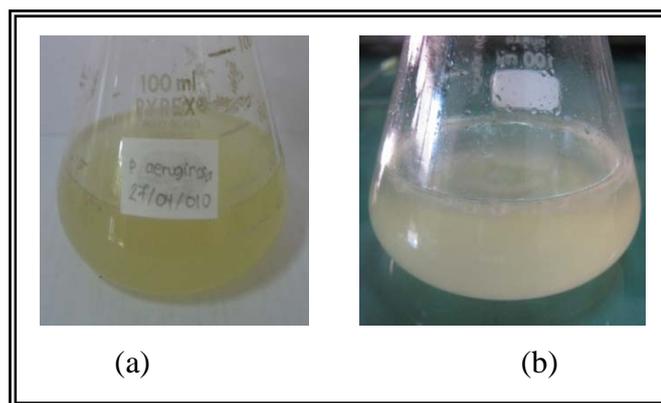
[Sumber: <http://en.wikipedia.org/rhodamineb>]

Gambar 4.2 Struktur Rhodamine B

Asam lemak hasil hidrolisis enzimatis ini akan masuk ke dalam sel bakteri melalui proses difusi terbantu yang difasilitasi oleh suatu protein pembawa. Selanjutnya indikator warna rhodamine B tersebut masuk ke dalam sel melalui difusi sederhana. Asam lemak di dalam sel selanjutnya berikatan dengan rhodamine B sehingga membentuk ikatan kompleks (Nurosid *et al*, 2008).

#### 4.2 Pembuatan Inokulum (*Seed Culture*)

Media inokulum merupakan suatu media cair bernutrisi yang mengandung hasil inokulasi suatu biakan. Media ini berfungsi sebagai media propagasi, yaitu suatu media pembiakkan dalam jangka waktu tertentu hingga biakan tersebut memiliki jumlah koloni yang maksimal. Jumlah koloni maksimal ini dapat diperoleh ketika biakan mencapai fasa akhir pertumbuhan eksponensial atau pada fasa awal stationernya. Media inokulum ini dibuat secara aseptis dengan cara mensuspensikan bakteri *P. Aeruginosa* ke dalam suatu larutan.



Gambar 4.3 Media Inokulum (*Seed Culture*) *Pseudomonas aeruginosa*,  
(a) Sebelum Inkubasi, (b) Setelah Inkubasi

Setelah diinkubasi selama dua hari, maka akan terlihat adanya peningkatan yang sangat signifikan pada kekeruhan larutan inokulum. Adanya pengeruhan media inokulum ini mengindikasikan bahwa *P. aeruginosa* telah mengalami pertumbuhan.

#### 4.3 Penentuan Jumlah Bakteri

Penentuan jumlah bakteri dilakukan dengan secara spektrofotometri dan metode *Total Plate Count* (TPC). Pada kedua prosedur ini, media inokulum *P. aeruginosa* diencerkan dari faktor pengenceran sebesar  $10^{-1}$  hingga  $10^{-8}$ .

Pada metode spektrofotometri, jumlah bakteri ditentukan berdasarkan nilai kekeruhan dari media inokulum *P. aeruginosa*. Nilai kekeruhan pada media ini diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 620 nm. Nilai absorptansi yang diperoleh menyatakan besarnya tingkat kekeruhan dari media inokulum. Besarnya kekeruhan ini sebanding dengan jumlah bakteri yang terdapat pada media inokulum. Berdasarkan pengamatan yang diperoleh, nilai absorptansi inokulum terbesar, yaitu 0,394. Pada faktor pengenceran  $10^{-4}$  hingga  $10^{-8}$  nilai absorptansi dari media inokulum relatif stabil.

Selain itu, untuk mengetahui secara kuantitatif jumlah bakteri yang terdapat di dalam media inokulum, maka dilakukan penentuan lebih lanjut menggunakan metode TPC. Nilai absorptansi yang diperoleh dari hasil pengukuran spektrofotometri kemudian dikorelasikan dengan hasil pengamatan pada metode TPC. Pada metode TPC, jumlah koloni bakteri yang tumbuh dengan

faktor pengenceran terkecil dari inokulum tersebut, berada diluar interval 30-300 koloni. Jumlah koloni bakteri tersebut dianggap tidak dapat mewakili jumlah bakteri sesungguhnya yang berada pada inokulum. Berdasarkan pengamatan jumlah bakteri yang terdapat dalam inokulum tidak dapat ditentukan. Oleh sebab itu, nilai absorpbansi sebesar 0,394 ini akan menjadi nilai standar besarnya kekeruhan yang harus dimiliki oleh media inokulum berikutnya. Hal ini bertujuan agar, pada setiap proses fermentasi, maka jumlah bakteri yang diinokulasikan pada media produksi adalah sama, sehingga adanya faktor variasi jumlah bakteri yang diinokulasikan dapat diabaikan.

#### **4.4 Produksi Lipase Ekstrak Kasar**

Pada produksi suatu enzim yang berasal dari bakteri, terlebih dahulu perlu diperhatikan beberapa faktor yang dapat mempengaruhi banyaknya jumlah enzim yang dapat disekresikan. Faktor-faktor tersebut mencakup nutrisi yang dibutuhkan oleh bakteri; karakteristik dari enzim yang ingin diisolasi, yaitu bersifat ekstraseluler atau intraseluler; kondisi lingkungan fisik yang diperlukan oleh bakteri tersebut untuk dapat hidup; serta lamanya waktu fermentasi yang diperlukan untuk dapat mengisolasi enzim tersebut.

##### **4.4.1 Fermentasi Lipase Ekstrak Kasar**

Medium yang digunakan dalam proses fermentasi suatu mikroba dapat dibedakan menjadi media fermentasi padat dan media fermentasi cair. Pada penelitian ini digunakan media fermentasi cair, karena substrat dapat terlarut atau terdispersi dalam cairan dan mikroba berada dibawah permukaan cairan pada kondisi aerobik dengan bantuan aerasi atau agitasi. Keuntungan dari media fermentasi cair ini, yaitu produk fermentasi akan terlarut dalam medianya, sehingga memudahkan dalam tahap isolasi produk (Budiyanti, 1994). Pada penelitian ini, media fermentasi yang digunakan, yaitu media cair yang mengandung *nutrient broth* dan trigliserida sebagai induser.

Komposisi media merupakan faktor yang penting bagi pertumbuhan dan proses metabolisme dari suatu mikroba. Komponen makro nutrisi pada media

yang diperlukan oleh mikroba umumnya terdiri atas unsur karbon, nitrogen, dan juga mineral (Permata Sari, 1994).

Pada percobaan ini, sumber karbon yang digunakan, yaitu *Olive Oil*. *Olive Oil* ini juga berperan sebagai inducer agar lipase dapat diproduksi oleh *P. aeruginosa*. Suatu senyawa inducer bagi lipase *P. aeruginosa*, yaitu berupa trigliserida dengan kandungan asam lemak rantai panjang, seperti asam oleat (Gupta et al, 2004). Karena kandungan minyak oleat-linoleat yang cukup tinggi dari *Olive Oil*, maka trigliserida ini tepat untuk digunakan sebagai inducer bagi lipase *P. aeruginosa*. Pada Tabel 4.1 berikut ini merupakan nilai kandungan minyak oleat-linoleat dari beberapa minyak nabati, dan dapat dilihat bahwa *Olive Oil* memiliki kandungan minyak oleat-linoleat yang paling tinggi dibandingkan minyak nabati lainnya.

Tabel 4.1 Kandungan Minyak Oleat-Linoleat Pada Minyak Nabati

Minyak Nabati	Stearat (%)	Oleat (%)	Linoleat (%)
<i>Almond Oil</i>	2	69	17
<i>Canola Oil</i>	2	62	22
<i>Coconut Oil</i>	3	6	2
<i>Corn Oil</i>	2	28	58
<i>Cottonseed Oil</i>	3	19	54
<i>Olive Oil</i>	3	71	10
<i>Palm Oil</i>	4	40	10
<i>Palm Kernel Oil</i>	3	15	2
<i>Peanut Oil</i>	2	48	32
<i>Soybean Oil</i>	4	24	54
<i>Sunflower Oil</i>	5	19	68

[Sumber: Zamora, 2010]

Lipase merupakan enzim yang disekresikan sebagai bentuk dari metabolisme sekundernya. Enzim ini akan terinisiasi untuk diproduksi hanya jika terdapat sumber lemak dalam medium perkembangannya. Selain itu, lipase akan disekresikan sebagai bentuk adaptasi jika kandungan glukosa dalam medium telah

habis. Dengan demikian, lipase diekskresikan agar lipid yang tersedia pada medium dapat dihidrolisis kedalam bentuk lebih polarnya, sehingga dapat terabsorpsi ke dalam sel sebagai nutrisi (Nurosid et al, 2008). Oleh karena itu, pada penelitian ini nutrisi karbohidrat yang diberikan dibuat dalam jumlah yang minimum, yaitu hanya berasal dari kandungan telah tersedia pada masing-masing komponen nutrient broth. Hal ini bertujuan untuk meminimalisasi fasa lag pertumbuhan bakteri. Karena jika nutrisi glukosa ditambahkan, maka bakteri akan terlebih dahulu mengonsumsi glukosa sebagai nutrisi karbonnya dibandingkan lipid yang ada pada medium.

Selain sumber karbon, dalam pertumbuhan suatu bakteri juga diperlukan nutrisi lainnya, yaitu sumber nitrogen dan juga mineral. Sumber nitrogen yang digunakan dapat berupa nitrogen anorganik seperti gas amonia, garam amonia dan golongan nitrat; dan sumber nitrogen organik, yaitu pepton, urea, dan tepung kacang kedelai (Permata Sari, 1994). Pada percobaan ini nutrisi nitrogen yang digunakan merupakan nitrogen organik yang tersusun dalam nutrient broth, yaitu pepton, *beef extract*, dan *yeast extract*.

Medium yang mengandung berbagai nutrisi pertumbuhan tersebut kemudian dilarutkan dalam buffer fosfat pH 8, karena pada pH tersebut merupakan kondisi *P. aeruginosa* dapat tumbuh dengan optimal (Singh et al, 2007). Selain itu, adanya larutan penyangga ini bertujuan untuk menstabilkan nilai pH medium fermentasi dari adanya perubahan nilai keasaman yang disebabkan produk-produk hasil metabolisme. Selama berlangsungnya proses kultivasi, pH medium cenderung mengalami perubahan, yaitu bila digunakan amonia sebagai sumber nitrogen, maka pH medium akan cenderung turun atau bersifat lebih asam. Hal ini karena amonia pada larutan dibawah pH 9 terdapat dalam bentuk  $\text{NH}_4^+$ , mikroba kemudian menggabungkannya dengan sel sebagai  $\text{R-NH}_3^+$ , dimana R adalah suatu gugus karbon. Pada proses tersebut akan dilepaskan sebuah ion  $\text{H}^+$  ke dalam medium, sehingga menyebabkan terjadinya penurunan pH. Apabila sumber nitrogen yang digunakan tersebut nitrat dan komponen amino organik, maka pH medium fermentasi akan cenderung meningkat karena senyawa-senyawa tersebut akan mengalami deaminasi (Permata Sari, 1994). Oleh

karena itu, dengan adanya buffer, maka lipase yang disekresikan tidak mengalami kerusakan akibat adanya perubahan nilai pH medium yang signifikan.

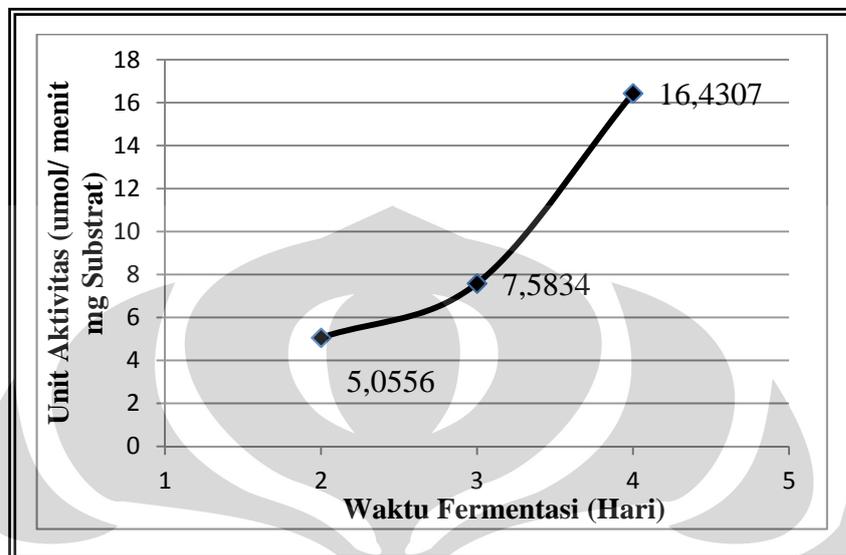
Laju pertumbuhan merupakan fungsi dari temperatur yang berpengaruh terhadap efisiensi konversi substrat menjadi massa sel (Permata Sari, 1994). Temperatur optimal fermentasi merupakan temperatur yang diperlukan oleh suatu mikroba agar aktivitas metabolismenya dapat berjalan dengan baik. Pada *P.aeruginosa* kondisi temperatur yang sesuai untuk produksi lipase ekstraselulernya pada media yang mengandung senyawa trigliserida asam lemak, seperti *Olive Oil* terjadi pada 30°C (Sigh et al, 2007).

Proses fermentasi pada penelitian ini dilakukan agitasi sebesar 200 rpm. Agitasi dengan kecepatan tersebut merupakan agitasi optimum yang digunakan untuk dapat menghomogenkan oksigen yang terlarut dalam media fermentasi *P. aeruginosa* (Gupta, 2004). Aerasi dan agitasi tersebut selain untuk memenuhi kebutuhan oksigen juga untuk menjaga mikrobia tetap tersuspensi dan larutan medium tetap homogen. Adanya pemenuhan kebutuhan oksigen ini disebabkan bakteri *P. aeruginosa* yang bersifat aerobik atau dapat hidup dengan pemenuhan sedikit kandungan oksigen dalam proses metabolisme.

Waktu fermentasi yang diperlukan pada produksi lipase akan berhubungan dengan siklus pertumbuhan mikroba penghasil lipase. Umumnya pertumbuhan mikroba tersebut terdiri dari tiga fasa utama, yaitu fasa awal, fasa eksponensial, dan fasa stationer. Fasa awal merupakan masa penyesuaian mikroba sejak inokulum sel diinokulasikan ke dalam media biakan. Setelah fasa awal selesai, maka akan dimulai terjadinya reproduksi seluler. Pada fasa ini konsentrasi seluler atau biomassa akan meningkat, kemudian pada saat laju pertumbuhan atau reproduksi seluler mencapai titik maksimalnya, maka pertumbuhan telah mencapai fasa eksponensialnya. Tahapan berikutnya, yaitu fasa stationer, pada fasa ini terjadi bila seluruh sel berhenti membelah diri atau sel hidup seimbang dengan sel mati. Meskipun pertumbuhannya telah berhenti, metabolisme dan akumulasi produk masih terjadi dalam sel atau dalam cairan mediumnya (Budiyanti, 1994).

Fermentasi untuk menghasilkan lipase dari *P. aeruginosa*, yaitu berkisar antara 72 atau 96 jam (Gupta, 2004). Pada penelitian ini akan dilihat pengaruh

dari variasi waktu fermentasi terhadap nilai aktivitas lipase yang dihasilkan. Berdasarkan pengamatan pada Grafik 4.1, maka diperoleh hasil bahwa unit aktivitas lipase terbesar terdapat pada waktu fermentasi selama 4 hari atau 96 jam.



Grafik 4.1 Nilai Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar Terhadap Waktu Fermentasi

Tingginya nilai aktivitas dari lipase ekstrak kasar yang dihasilkan pada fermentasi 96 jam ini diduga disebabkan adanya peningkatan kadar protein enzim. Kenaikan ini terjadi ketika nutrisi yang tersedia berkurang jumlahnya, karena pada umumnya enzim ekstraseluler akan banyak dihasilkan pada saat nutrisi yang ada pada lingkungan terdapat dalam jumlah yang terbatas (Sumiyannah, 2001).

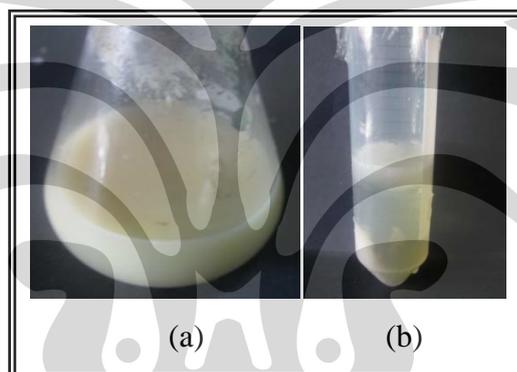
#### 4.4.2 Isolasi Lipase Ekstrak Kasar

Tenik isolasi yang digunakan untuk mendapatkan lipase ekstrak kasar, yaitu melalui teknik sentrifugasi pada kecepatan tinggi dalam kondisi temperatur konstan. Pada tahapan awal teknik isolasi, media kultur terlebih dahulu disaring dengan menggunakan kertas saring. Tujuan dari penyaringan ini, yaitu untuk memisahkan supernatan dari biomasanya serta sisa-sisa media yang masih terdapat dalam larutan. Hasil penyaringan ini akan diperoleh supernatan yang lebih jernih.

Isolasi lipase ekstrak kasar dilakukan dengan menggunakan teknik sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm. Teknik sentrifugasi dengan kecepatan

tinggi ini bertujuan sebagai langkah pre-purifikasi. Pada tahapan ini, dilakukan pemisahan mikroorganisme dari medium supernatannya. Sel-sel dari mikroorganisme yang tersentrifugasi akan hancur dan terkumpul pada bagian bawah tabung sentrifuge atau sebagai residu, sedangkan lipase ekstrak kasar yang dihasilkan akan terlarut dalam supernatannya. Selain itu, teknik sentrifugasi ini juga bertujuan untuk memisahkan partikel-partikel media dari larutan fermentasinya (Pandy, 2006). Pada proses sentrifugasi ini, pemisahan dilakukan pada temperatur rendah, yaitu 4°C. Hal ini bertujuan untuk meredam panas selama proses sentrifugasi, dan menjaga kerusakan enzim dari peningkatan temperatur akibat adanya gaya sentrifugasi yang diberikan, sehingga lipase yang diisolasi tersebut tidak akan rusak atau kehilangan daya katalitiknya.

Pada Gambar 4.4 berikut ini merupakan hasil pengamatan tahapan isolasi lipase ekstrak kasar,



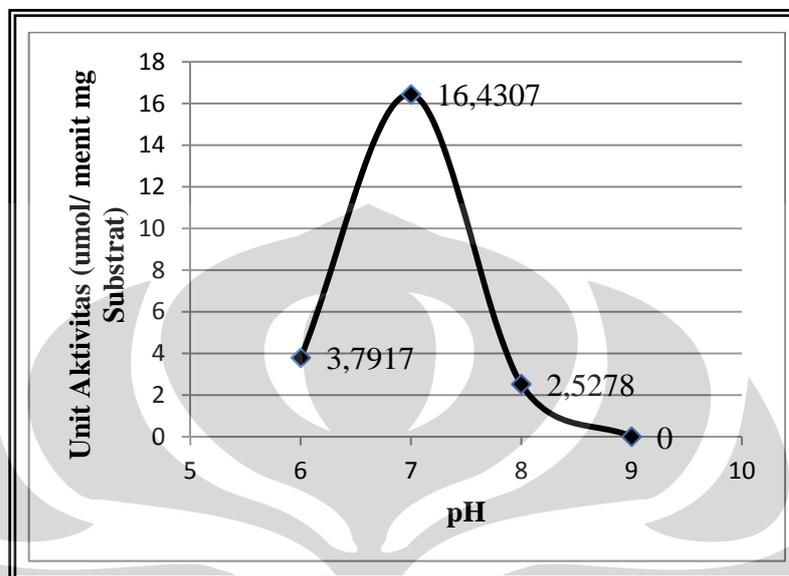
Gambar 4.4 Isolasi Lipase Ekstrak Kasar, (a) Media Produksi Setelah Fermentasi, (b) Lipase Ekstrak Kasar yang Telah Terpisah dari Sel Mikroorganisme

#### 4.5 Penentuan Nilai Unit Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar

##### 4.5.1 Variasi pH Terhadap Nilai Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar

Lipase sebagai suatu molekul protein memiliki daya stabilitas tertentu terhadap kondisi lingkungan dari sistem reaksi yang dikatalisisnya. Adanya perubahan pH larutan dapat mendestabilkan kerja dari lipase tersebut. Profil aktivitas pH enzim menggambarkan pH pada saat gugus pemberi atau penerima proton yang terdapat pada sisi katalitik enzim berada dalam tingkat ionisasi yang diinginkan.

Derajat keasaman (pH) optimum dari kerja lipase dari bakteri *P. aeruginosa*, yaitu cenderung pada pH netral atau pada pH alkali (Gupta, 2004).



Grafik 4.2 Pengaruh Variasi pH Terhadap Nilai Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar

Pada Grafik 4.2 dapat dilihat bahwa aktivitas katalitik dari lipase ekstrak kasar dipengaruhi secara signifikan dengan adanya perubahan nilai pH. Nilai pH optimum yang diperoleh untuk aktivitas katalitik lipase ekstrak kasar, yaitu pada pH 7. Pada pH ini, nilai aktivitas enzim sebesar 16,4307 umol/ menit mg substrat. Apabila lipase ekstrak kasar ini direaksikan pada medium dengan pH di bawah ataupun di atas pH optimum tersebut, maka akan terlihat sekali adanya penurunan yang signifikan dari nilai aktivitas lipase ekstrak kasar.

Adanya perubahan pH akan mempengaruhi transfer proton atau stabilitas muatan yang terdapat pada lipase ekstrak kasar. Pada umumnya, enzim merupakan suatu protein yang dapat bereaksi pada suasana asam atau pun basa. Pada suasana terlalu asam, maka ion  $H^+$  yang terdapat pada media akan bereaksi dengan gugus amina yang ada, hal ini akan mengakibatkan terganggunya ikatan hidrogen yang terdapat pada struktur enzim. Selain itu, apabila terdapat pada media yang terlalu basa, maka gugus  $OH^-$  akan bereaksi dengan  $H^+$  yang terionisasikan dari gugus karboksil menghasilkan molekul  $H_2O$ . Hal ini juga akan

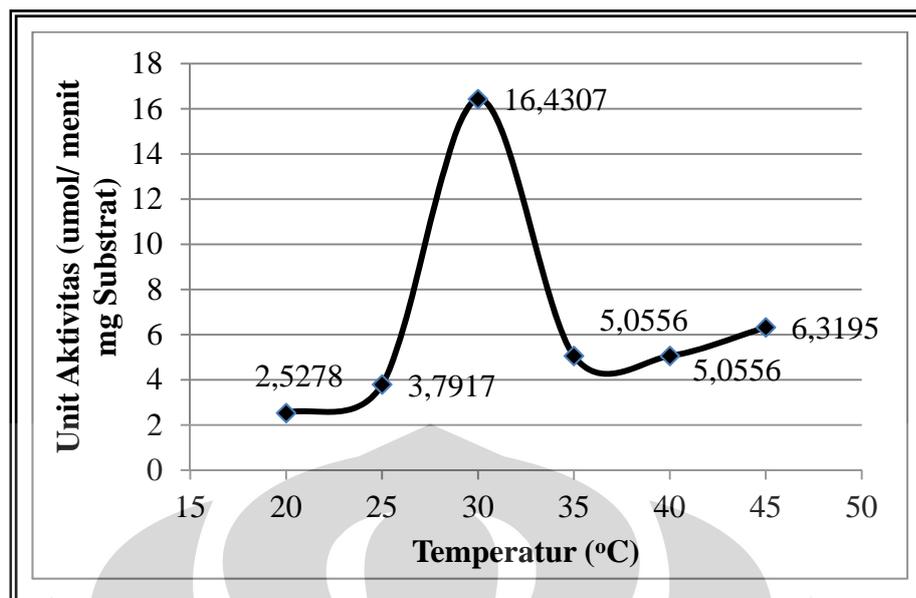
merusak ikatan hidrogen yang ada antara nitrogen dengan hidrogen pada molekul enzim.

Pada pengujian nilai aktivitas di pH 6 ini dapat mendorong lipase ekstrak kasar menuju ke titik isoelektriknya dan mengakibatkan enzim menjadi tidak bermuatan. Titik isoelektrik dari lipase *P. aeruginosa*, yaitu terdapat pada kisaran pH 5,8 (Stuer et al, 1986). Pada keadaan ini membuat lipase ekstrak kasar dapat berkurang nilai aktivitasnya karena kekuatan mengion dari residu katalitik lipase ekstrak kasar berkurang, sehingga dapat mengakibatkan terganggunya pengaktifan residu serin oleh residu asam amino tetangganya. Pada pH 8 serta pH 9 juga dapat mengakibatkan terjadi penurunan nilai aktivitas dari lipase ekstrak kasar. Pada pH ini konsentrasi ion hidroksi menjadi lebih tinggi sehingga mendestabilkan ikatan hidrogen yang ada dan juga dapat membuat rintangan sterik di sekitar substrat, sehingga residu serin sulit bereaksi dengan substrat membentuk kompleks enzim-substrat.

Derajat keasaman optimum lipase ekstrak kasar yang dihasilkan memiliki nilai yang berbeda dari pH medium fermentasinya. Larutan fermentasi memiliki nilai pH 8 sedangkan pH optimum lipase ekstrak kasar terdapat pada pH 7. Hal ini karena pada medium fermentasi, pH larutan yang digunakan bertujuan untuk mencapai kondisi optimum proses metabolisme dari *P. aeruginosa*, sedangkan pH optimum dari lipase ekstrak kasar merupakan pH bagi enzim tersebut untuk dapat tersolvasi dan berada pada kondisi ionisasi yang diinginkan untuk dapat mengkatalitik substraknya.

#### **4.5.2 Variasi Temperatur Terhadap Nilai Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar**

Temperatur optimal pada proses fermentasi enzim belum tentu menyatakan temperatur optimal aktivitas dari enzim yang dihasilkan, karena stabilitas suatu enzim terhadap temperatur dipengaruhi oleh berbagai faktor yang mengakibatkan terjadinya perbedaan sifat enzim. Faktor tersebut antara lain pH, kekuatan ion, dan hadirnya ligan atau kofaktor (Budiyanti, 1994).

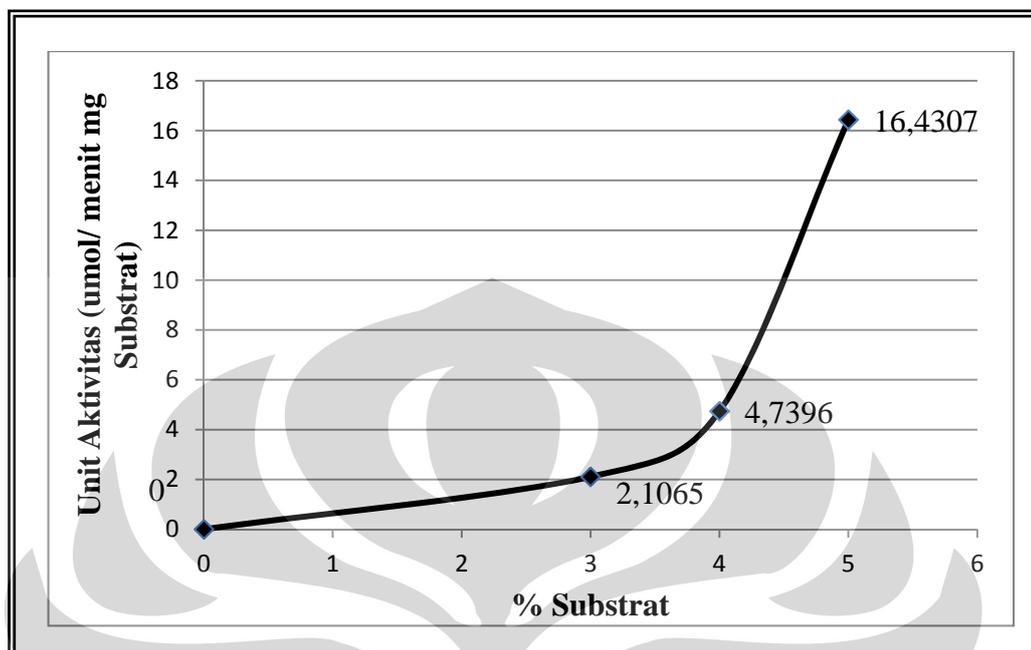


Grafik 4.3 Pengaruh Variasi Temperatur Terhadap Nilai Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar

Pada lipase ekstrak kasar yang dihasilkan dapat dilihat bahwa aktivitas uji katalitik maksimum diperoleh pada temperatur 30°C (Grafik 4.3). Pada temperatur sebelum dan sesudah temperatur optimum tersebut, nilai aktivitas katalitik lipase cenderung memiliki nilai yang rendah. Pada suhu di bawah 30°C, lipase ekstrak kasar tidak mengalami denaturasi atau kehilangan fungsi katalitiknya. Penurunan nilai aktivitas lipase ekstrak kasar yang ada disebabkan karena pada suhu rendah, reaksi akan berjalan lebih lambat dibandingkan kecepatan reaksi pada suhu optimum. Pada suhu di atas 30°C, penurunan nilai aktivitas lipase ekstrak kasar disebabkan berkurangnya fungsi katalitik enzim pada suhu tinggi. Pada suhu tinggi, terdapat getaran panas media yang dapat mendestabilkan struktur enzim.

Kecilnya nilai aktivitas lipase ekstrak kasar hasil isolasi dapat disebabkan karena larutan hasil fermentasi belum dilakukan tahap purifikasi, sehingga lipase yang diinginkan belum terkonsentrasikan. Hal ini membuat lipase ekstrak kasar yang diperoleh bersifat kurang stabil dalam mempertahankan bentuk sisi katalitiknya. Ketidakstabilan ini disebabkan belum banyaknya ikatan internal dari enzim, sehingga pelipatan atau *folding* dari molekul enzim masih dalam jumlah yang sedikit. Oleh karena itu, konformasi sisi katalitiknya belum sempurna (Gupta, 2004).

### 4.5.3 Variasi Konsentrasi Substrat Terhadap Nilai Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar



Grafik 4.4 Pengaruh Variasi Konsentrasi Substrat Terhadap Nilai Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar

Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas katalitik lipase ekstrak kasar dapat dilihat pada Grafik 4.4. Berdasarkan hasil pengamatan, seiring dengan kenaikan konsentrasi substrat, maka akan diperoleh juga peningkatan dari aktivitas katalitik enzim. Nilai aktivitas katalitik akan naik dengan perlahan hingga konsentrasi substrat mencapai 4% dalam larutan. Selanjutnya, nilai aktivitas ini mengalami kenaikan yang cukup besar pada saat konsentrasi substrat mencapai 5%. Hal ini menunjukkan adanya ciri khas lipolitik dari lipase, yaitu peningkatan nilai aktivitas akan berjalan secara perlahan hingga larutan jenuh dengan terbentuknya emulsi/ lapisan antar muka antara minyak (substrat) dengan air.

Berdasarkan Grafik 4.4 dapat dilihat bahwa larutan akan mengalami kejenuhan ketika konsentrasi substrat mencapai 4%. Kejenuhan larutan akan konsentrasi substrat ini membuat banyaknya lapisan antar muka yang tersedia dalam larutan. Tingginya lapisan antar muka ini akan menginisiasikan terbukanya selubung lipase yang bersifat hidrofobik.

Lipase memiliki sisi aktif yang bersifat hidrofobik. Asam-asam amino pada sisi aktif lipase yang terlibat reaksi, yaitu serin, aspartat, dan histidin. Sisi aktif ini terdapat di bagian dalam struktur protein yang ditutupi oleh selubung polipeptida heliks yang bersifat amfifilik. Selubung heliks ini memiliki peranan yang penting dalam menjaga sisi aktif enzim dengan menghambat penguraian asam amino sisi aktif. Pada keadaan tertutup, permukaan selubung yang bersifat hidrofobik berada pada bagian dalam dan terbenam dalam struktur protein. Namun, ketika lipase tersebut dapat mengalami kontak dengan substrat yang bersifat hidrofobik, maka komposisi dari selubung tersebut akan berubah, dimana selubung menjadi terbuka karena adanya interaksi hidrofobik antara substrat dengan bagian selubung yang bersifat hidrofobik. Terbukanya selubung ini akan membuat sisi katalitik dari lipase dapat lebih mudah untuk berinteraksi dengan substratnya (Jaeger et al, 1994). Oleh karena itu, ketika konsentrasi substrat meningkat menjadi 5% atau telah melewati batas konsentrasi substrat untuk membentuk lapisan jenuh antar muka, maka aktivitas katalitik lipase akan mengalami kenaikan yang cukup signifikan. Berdasarkan hasil pengamatan pada variasi konsentrasi substrat terhadap nilai aktivitas lipase, maka kondisi optimum konsentrasi substrat terhadap aktivitas katalitik lipase ekstrak kasar, yaitu sebesar 5% terhadap volume total larutan.

Pada penelitian ini, penentuan nilai aktivitas optimum lipase ekstrak kasar dilakukan dengan menggunakan metode titrimetri. Dengan metode titrimetri, nilai aktivitas lipase ekstrak kasar dianggap sebagai kemampuan hidrolisis dari lipase ekstrak kasar terhadap substratnya (*Olive Oil*) dalam setiap menitnya. *Olive Oil* ini terhidrolisis ke dalam bentuk asam lemaknya, kemudian asam lemak yang dihasilkan diukur dengan menggunakan metode titrasi angka asam. Larutan sampel dan blanko dititrasi dengan NaOH hingga basa menggunakan indikator fenolftalein.

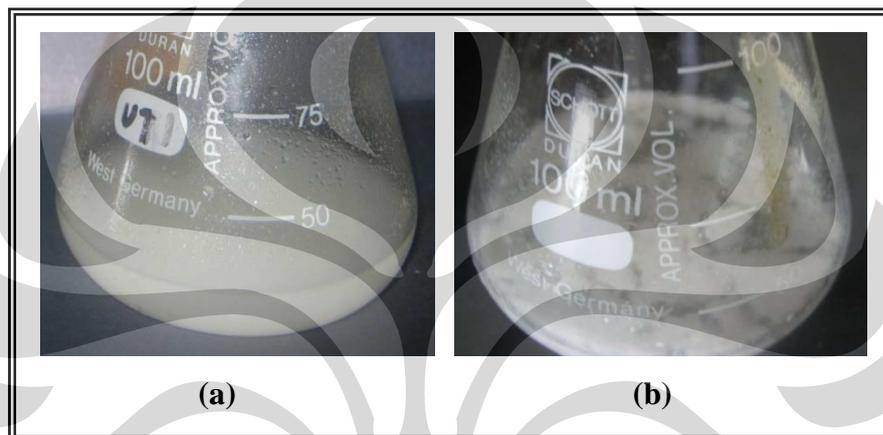
Metode titrimetri ini digunakan sebagai metode uji penentuan aktivitas lipase karena substrat yang diberikan merupakan substrat spesifik untuk lipase, yaitu *Olive Oil* yang berupa senyawa trigliserida rantai panjang. Selain itu, mekanisme hidrolisis substrat oleh lipase berada pada lapisan antar muka dari minyak dengan enzim. Metode ini dilakukan untuk mereduksi adanya pembauran

hasil yang disebabkan enzim lain yang terdapat dalam larutan supernatan, seperti esterase. Hal ini karena esterase tidak dapat menghidrolisis senyawa trigliserida rantai panjang dalam kondisi reaksi pada lapisan antar muka, sedangkan lipase dapat bersifat lipolitik pada kondisi tersebut.

Larutan sampel yang diukur ini terdiri dari substrat *Olive Oil*, larutan penyangga fosfat, larutan  $\text{CaCl}_2$ , gum arab, dan lipase ekstrak kasar. Larutan penyangga fosfat dalam sampel uji ini bertujuan untuk menjaga kestabilan pH larutan sampel agar tetap kondusif bagi kerja lipase. Sedangkan larutan  $\text{CaCl}_2$  yang diberikan bertujuan untuk menyediakan ion  $\text{Ca}^{2+}$  dalam larutan. Ion  $\text{Ca}^{2+}$  ini berfungsi sebagai kofaktor atau aktivator bagi lipase, yaitu dengan menstabilkan struktur dari residu asam amino yang terdapat pada sisi katalitik. Selain itu, pemberian ion  $\text{Ca}^{2+}$  ini juga dapat mendukung daya kerja lipase terhadap perubahan temperatur reaksi (Gupta, 2004). Gum arab yang digunakan berfungsi sebagai bahan emulsifier pada larutan. *Olive Oil* sebagai substrat merupakan suatu senyawa trigliserida yang bersifat non polar dan cenderung tidak dapat bercampur secara homogen dengan lipase yang bersifat polar. Oleh karena itu, dengan adanya agen pengemulsi akan dapat mengemulsikan *Olive Oil* dalam sistem yang berair membentuk emulsi minyak dalam air yang bersifat stabil. Dengan terbentuknya emulsi ini, maka luas lapisan antar muka antara minyak dan air yang dapat dikatalisis oleh lipase akan semakin besar, sehingga reaksi hidrolisis enzimatik akan berjalan lebih optimal.

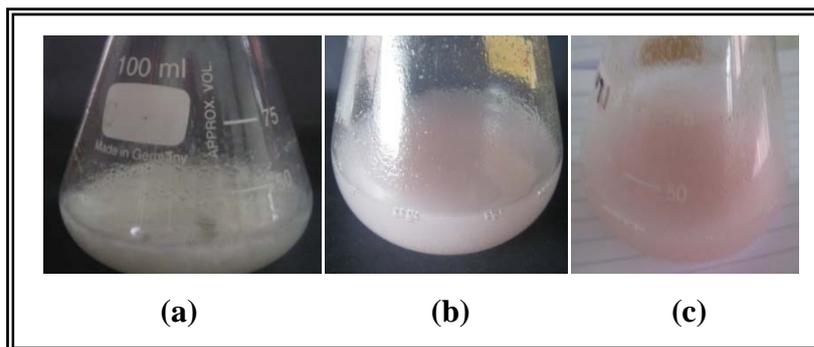
Campuran berbagai komposisi ini kemudian dihomogenkan terlebih dahulu pada temperatur reaksi yang diinginkan. Jika sampel uji telah memiliki temperatur yang homogen, maka lipase ekstrak kasar dimasukkan dalam sistem reaksi. Selain larutan sampel, terdapat pula larutan blanko. Larutan blanko ini memiliki komposisi yang sama dengan larutan sampel uji. Perbedaan diantara keduanya adalah pada larutan blanko enzim yang digunakan terlebih dahulu didenaturasi. Proses pendenaturasian enzim ini dilakukan dengan cara memanaskan lipase tersebut dalam penangas air mendidih. Kemudian larutan sampel maupun blanko diinkubasi bersamaan pada kondisi pH, temperatur, dan waktu inkubasi yang sama.

Reaksi enzimatik ini akan dihentikan dengan penambahan larutan etanol-aseton dengan perbandingan 1:1 sebanyak 10 mL. Tujuan dari pemberian campuran pelarut organik ini adalah untuk menurunkan konstanta dielektrik dan menyebabkan medium menjadi kurang konduktif bagi enzim yang polar. Pengaruh pelarut organik ini juga dapat membuat kekuatan solvasi dari enzim berkurang. Selain itu, etanol merupakan zat pengoksidasi yang dapat menyebabkan terurainya jembatan disulfida antara gugus S-H pada enzim. Pemutusan jembatan disulfida ini menyebabkan enzim menggumpal.



Gambar 4.5 (a) Larutan Sampel Sebelum Reaksi Diterminasi, (b) Penggumpalan Enzim Karena Penambahan Aseton-Alkohol

Sampel tersebut kemudian ditetaskan larutan indikator dan dititrasi oleh NaOH hingga terjadi perubahan warna menjadi merah muda. Selisih nilai angka asam yang diperoleh antara larutan sampel uji dengan larutan blanko tersebut merupakan nilai asam lemak yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis enzimatik oleh lipase.



Gambar 4.6 Titrasi Angka Asam Sampel atau Blanko, (a) Warna Larutan Sebelum Dititrasi, (b) Warna Larutan Pada Titik Akhir Titrasi, (c) Warna Larutan dengan Titrasi Berlebih

Satu unit aktivitas lipase ekstrak kasar setara dengan satu  $\mu\text{mol}$  asam lemak bebas yang dihasilkan dari hidrolisis 1 miligram substrat (*Olive Oil*) yang dikatalisis oleh lipase ekstrak kasar selama 10 menit.

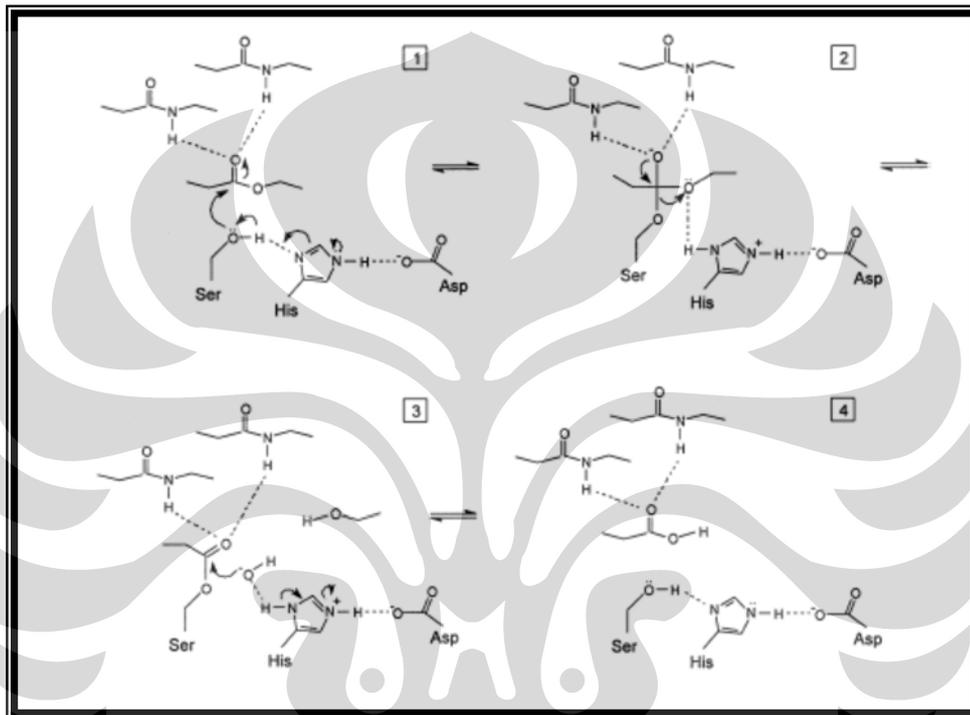
Lipase merupakan suatu enzim hidrolase. Enzim ini memiliki tiga residu asam amino yang berperan aktif dalam reaksi hidrolisis enzimatik yang dikatalisisnya. Ketiga asam amino tersebut, yaitu serin, histidin, dan juga aspartat. Dengan menggunakan ketiga asam amino tersebut substrat trigliserida dapat dihidrolisis menjadi asam lemak penyusunnya.

Berikut ini merupakan beberapa tahapan yang terjadi dalam proses hidrolisis enzimatik suatu ester oleh lipase (Jaeger et al, 1999). Reaksi hidrolisis enzimatik tersebut terdiri dari beberapa tahap, yaitu

- a. Pengikatan lipid oleh residu asam amino yang terdapat pada permukaan enzim, serta aktivasi nukleofilik residu serin oleh residu tetangganya, yaitu histidin. Nukleofilik ini kemudian menyerang atom karbon yang terdapat pada gugus karbonil substrat (Gambar 4.7 no. 1)
- b. Pembentukan transien intermediet tetrahedral, dengan  $\text{O}^-$  distabilisasikan oleh interaksi hidrogen dengan dua peptide yang memiliki gugus  $\text{NH}$ . Residu histidin akan mendonorkan protonnya pada *leaving group* yang terikat pada substrat (Gambar 4.7 no. 2)
- c. Pembentukan intermediet kovalen berupa asil-enzim, dimana komponen yang bersifat asam dari substrat membentuk ester dengan residu serin. Molekul air yang terdapat pada sistem akan diaktivasikan oleh residu histidin tetangga

membentuk ion hidroksi yang dapat bersifat nukleofilik terhadap atom karbon dari gugus karbonil pada intermediet ester enzim, sehingga ikatan antara serin dengan komponen asil akan terputus (Gambar 4.7 no. 3)

- d. Residu histidin mendonorkan protonnya pada atom oksigen dari residu serin yang teraktifkan, serta pelepasan produk berupa asam lemak (Gambar 4.7 no. 4)



Gambar 4.7 Mekanisme Reaksi Hidrolisis Oleh Lipase

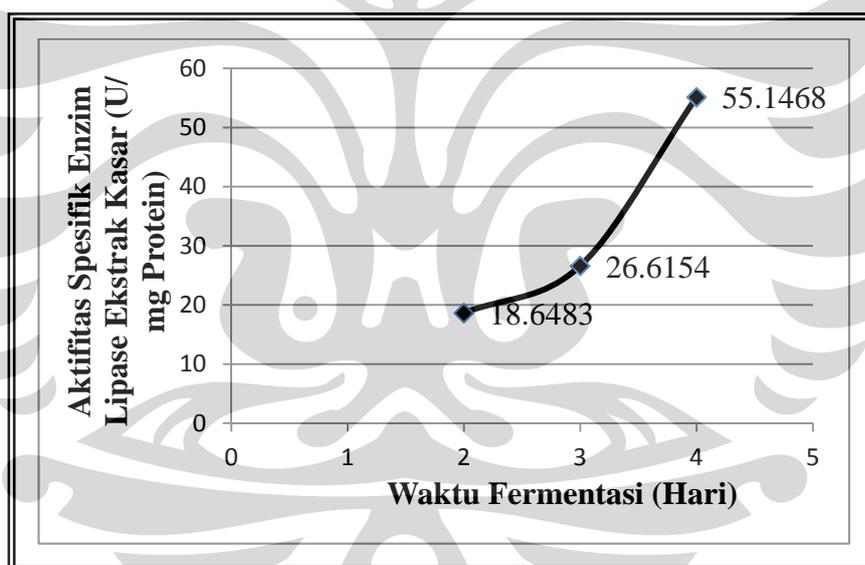
#### 4.6 Penentuan Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik Lipase Ekstrak Kasar

Molekul lipase memiliki sisi aktif atau sisi katalitik tempat enzim berikatan dengan substrat pada saat terjadi reaksi katalitik. Aktivitas spesifik enzim ini dicirikan oleh adanya pengikatan substrat oleh permukaan molekul enzim (Nelson dan Michael, 2007). Selain itu, aktivitas spesifik juga mencerminkan kecepatan reaksi akibat adanya enzim pada keadaan maksimal, yaitu pada keadaan molekul enzim telah jenuh oleh substrat (Faizal, 1994).

Penentuan kadar protein yang terdapat pada lipase ekstrak kasar dilakukan dengan metode Lowry. Pada metode ini banyaknya kadar protein yang terdapat dalam enzim dibandingkan dengan kadar protein standar yang telah diketahui,

yaitu *Bovine Serum Albumine* (BSA). Pada identifikasi kandungan protein dalam lipase ekstrak kasar, perlu diperhatikan bahwa kadar protein yang terukur merupakan kadar protein total yang terdapat pada larutan supernatannya, baik itu berupa senyawa protein enzim maupun senyawa protein non-enzim yang dihasilkan pada medium fermentasi.

Berdasarkan hasil pengamatan (Grafik 4.5), terlihat bahwa semakin lama waktu inkubasi diperoleh kadar protein yang lebih besar. Hal ini disebabkan semakin lama waktu inkubasinya, lipase ekstrak kasar yang dihasilkan semakin meningkat. Namun, peningkatan ini juga dapat diindikasikan sebagai kandungan metabolit-metabolit protein yang juga disekresikan oleh bakteri. Berdasarkan data yang diperoleh, maka secara berturut-turut kadar protein yang diperoleh pada lipase ekstrak kasar yang diisolasi, yaitu 361,47 ug/ mL (2 hari); 379,90 ug/ mL (3 hari); dan 397,26 ug/ mL (4 hari).



Grafik 4.5 Nilai Aktivitas Spesifik Lipase Ekstrak Kasar Terhadap Waktu Fermentasi

Berdasarkan data kadar protein dan nilai aktivitasnya, maka dapat diketahui kemurnian dari lipase ekstrak kasar yang diperoleh. Menurut data tersebut maka tingkat kemurnian enzim yang diperoleh, yaitu 18,6483 U/ mg protein (2 hari); 26,6154 U/ mg protein (3 hari); dan 55,1468 U/ mg protein (4

hari). Dapat dilihat bahwa tingkat kemurnian enzim lipase ekstrak kasar terbesar terdapat pada waktu fermentasi selama 4 hari.

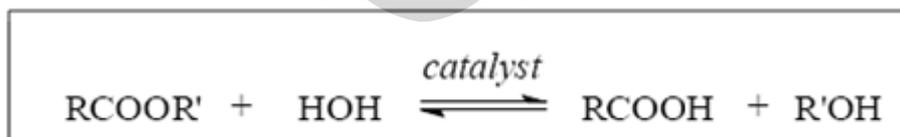
Berdasarkan hasil pengamatan, dapat dilihat bahwa nilai aktivitas spesifik dari lipase ekstrak kasar yang diperoleh memiliki nilai yang relatif kecil. Hal ini dikarenakan pada lipase ekstrak kasar tersebut belum dilakukan tahapan purifikasi, sehingga pada larutan enzim masih terdapat komponen protein non-enzim yang cukup tinggi.

#### 4.5 Aplikasi Lipase Ekstrak Kasar Sebagai Biokatalisator Pada Reaksi Esterifikasi Asam Lemak Minyak Sawit Terhadap Sukrosa

Pada penelitian ini lipase ekstrak kasar hasil isolasi diaplikasikan sebagai biokatalisator dalam suatu reaksi kimia. Reaksi kimia yang digunakan, yaitu reaksi esterifikasi. Lipase dalam kondisi yang ditentukan dapat melakukan reaksi tidak hanya untuk menghidrolisis namun juga dapat mengkatalisis reaksi esterifikasi antara asam lemak rantai panjang dengan senyawa yang mengandung gugus hidroksi (OH-), baik itu senyawa alkohol, diol, maupun senyawa karbohidrat sederhana, seperti glukosa, fruktosa, dan juga sukrosa. Namun pada penelitian ini, lipase ekstrak kasar yang diperoleh akan digunakan sebagai biokatalisator pada reaksi esterifikasi antara asam lemak rantai panjang yang berasal dari hidrolisis minyak sawit dengan sukrosa.

##### 4.5.1 Hidrolisis Minyak Sawit

Pada tahapan ini, minyak sawit dihidrolisis secara reaksi organik menjadi asam-asam lemak penyusunnya. Adapun reaksi sederhana hidrolisis terjadi sebagai berikut,



Gambar 4.8 Reaksi Hidrolisis Pada Suatu Ester

Reaksi hidrolisis dapat dilakukan dengan menggunakan katalis asam maupun katalis basa. Namun, penggunaan katalis basa memiliki reaksi yang lebih

menguntungkan dibandingkan dengan katalis asam. Hal ini karena pada reaksi hidrolisis menggunakan katalis asam, reaksi akan berjalan secara bolak-balik atau reversible, sedangkan pada katalis basa reaksi berlangsung searah, sehingga lebih menguntungkan untuk terbentuknya produk reaksi.

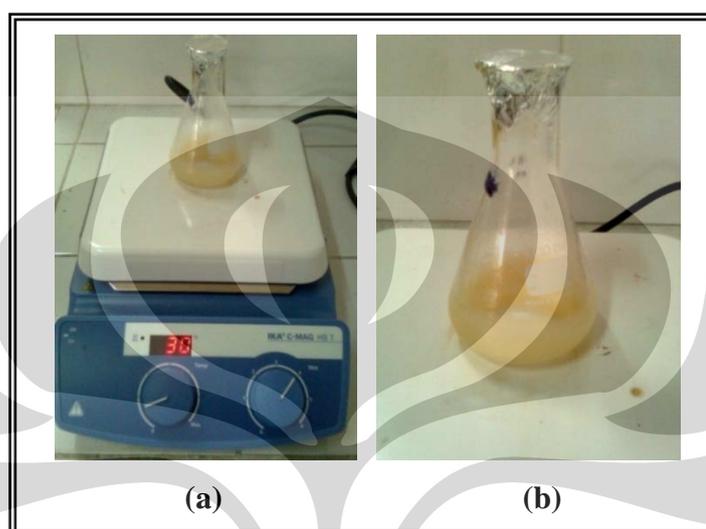
Reaksi hidrolisis tahap pertama pada minyak sawit dilakukan dengan pemanasan pada temperatur konstan, yaitu 60°C. Pada reaksi hidrolisis minyak sawit ini digunakan katalis basa, yaitu KOH. Namun terlebih dahulu KOH ini dilarutkan dalam etanol. Fungsi penambahan etanol adalah untuk menurunkan perbedaan kepolaran antara KOH yang bersifat polar dengan minyak sawit yang non polar. Pelarut etanol akan berperan dalam menjembatani KOH untuk dapat bereaksi dengan minyak sawit. Ion hidroksi yang terbentuk ini akan menyerang atom C pada gugus karboksil dari trigliserida yang terdapat dalam minyak sawit dan membentuk intermediet tetrahedral pada trigliserida. Intermediet tetrahedral ini kemudian mengalami eliminasi gugus -OR dari trigliserida dan menghasilkan satu asam karboksilatnya. Tahapan selanjutnya, yaitu terjadi transfer proton dengan cepat antara asam karboksilat yang terbentuk dengan ion alkoksi trigliserida dan menghasilkan ion karboksilat dalam bentuk garam kalium.

Selanjutnya larutan hasil reaksi tahap tersebut diekstraksi dengan heksana dan akuademin. Hal ini bertujuan untuk memisahkan senyawa-senyawa lipid tidak tersabunkan. Lipid tersabunkan akan terdapat pada fasa air, sedangkan lipid tidak tersabunkan berada dalam fasa heksana. Pada lapisan fasa air yang mengandung garam kalium asam lemak tersebut, diasamkan dengan menggunakan HCl dan membentuk senyawa asam lemaknya. Untuk memisahkan asam lemak yang terbentuk, maka digunakan teknik ekstraksi dengan penambahan pelarut heksana. Pada proses ekstraksi ini akan terbentuk dua lapisan, yaitu lapisan atas berupa senyawa asam lemak yang larut dalam heksana, sedangkan lapisan bawah merupakan lapisan yang larut dalam fasa air, terdiri dari garam KCl dan etanol.

Asam lemak yang terbentuk berwarna kuning emas dan akan memadat menjadi lemak berwarna putih bila didiamkan ditemperatur ruang. Hal ini mengindikasikan bahwa asam lemak yang terdapat pada minyak sawit bersifat asam lemak jenuh rantai panjang.



bekerja sesuai dengan aktivitas optimalnya. Pada sistem reaksi tersebut digunakan larutan penyangga berupa buffer fosfat pH 7 dengan temperatur reaksi pada 30°C. Temperatur dan pH tersebut merupakan kondisi optimal dari fungsi kerja lipase ekstrak kasar hasil isolasi. Reaksi kemudian dilakukan selama empat hari dengan pengadukan secara mekanik menggunakan *magnetic stirrer*.

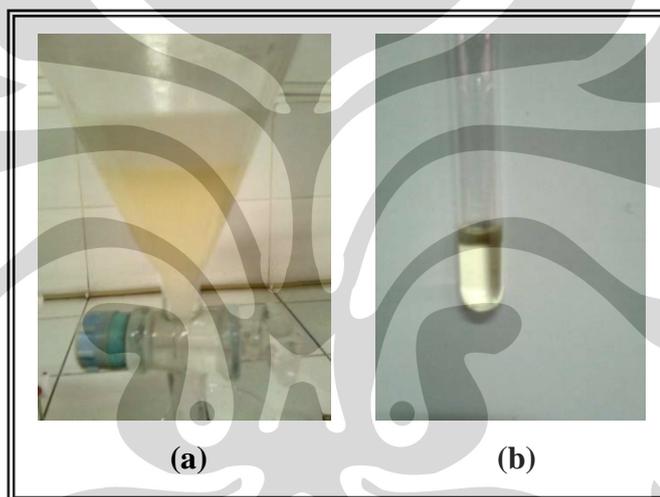


Gambar 4.11 Reaktor Reaksi Esterifikasi Enzimatis Antara Asam Lemak Minyak Sawit dengan Sukrosa

Pada reaksi esterifikasi ini juga digunakan gum arab sebagai agen pengemulsi, agar kontak yang terjadi pada bagian antar fasa enzim substrat dapat maksimum. Selain itu, pada sistem juga diberikan ion  $\text{Ca}^{2+}$ , hal ini untuk menaikkan aktivitas dari lipase ekstrak kasar yang dihasilkan.

Setelah masa inkubasi selama empat hari, maka larutan campuran pada sistem dihentikan dengan menggunakan NaOH hingga berlebih. Jumlah NaOH yang berlebih ini kemudian dinetralkan dengan larutan HCl. Selanjutnya, larutan campuran tersebut diekstraksi dengan menggunakan kloroform. Sukrosa ester akan terdapat pada lapisan kloroform, sedangkan NaOH dan ion-ion lainnya akan terdistribusi dalam fasa air. Kloroform yang mengandung sukrosa ester asam lemak tersebut akan terkumpul pada lapisan bawah. Hal ini dikarenakan massa jenis kloroform yang lebih besar dibandingkan dengan air. Lapisan kloroform tersebut kemudian dipisahkan dan dilarutkan dalam metanol. Tujuan penambahan

methanol ini adalah untuk memisahkan asam lemak minyak sawit yang tidak bereaksi dan sukrosa ester berderajat substitusi rendah (Gugus OH tersubstitusi asam lemak sebanyak 1 hingga 3 buah) dari senyawa sukrosa ester berderajat substitusi tinggi (Gugus OH tersubstitusi asam lemak sebanyak 4 hingga 8 buah). Berdasarkan hasil pengamatan (Gambar 4. 12), terlihat bahwa senyawa sukrosa ester yang terdapat dalam lapisan kloroform larut dengan baik dalam metanol. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa yang dihasilkan dari reaksi esterifikasi enzimatis tersebut tidak membentuk produk berupa sukrosa dengan derajat substitusi tinggi. Oleh karena itu, diperlukan suatu metode pengujian lebih lanjut untuk mengidentifikasi terbentuk atau tidaknya gugus ester pada senyawa hasil reaksi enzimatis tersebut.



Gambar 4.12 (a) Senyawa Sukrosa Ester Asam lemak dalam Kloroform, (b) Senyawa Sukrosa Ester Asam Lemak dalam Metanol

#### 4.5.3 Pengujian Adanya Gugus Ester yang Terbentuk

Tahap terakhir, yaitu pengujian senyawa hasil sintesis enzimatis dengan tes adanya gugus ester yang terbentuk. Senyawa yang diperkirakan mengandung sukrosa ester asam lemak diberikan larutan NaOH berlebih beserta indikator fenolftalein hingga berwarna merah muda. Selanjutnya senyawa uji tersebut dipanaskan pada temperatur 60°C hingga warna merah muda yang ada hilang menjadi tidak berwarna.



Gambar 4.13 Reaksi Degradasi Warna Merah Muda yang Terjadi

Berdasarkan hasil pengamatan pada Gambar 4.13, degradasi warna merah muda terjadi dengan cepat walaupun tanpa dilakukan pemanasan. Hal ini mengindikasikan bahwa produk reaksi, yaitu sukrosa ester asam lemak belum terbentuk. Hilangnya warna merah muda pada larutan tersebut terjadi karena NaOH uji yang diberikan bereaksi dengan asam lemak yang masih terdapat pada larutan. Oleh karena itu, produk dari reaksi yang telah diinkubasi selama empat hari ini masih berupa asam lemak minyak sawit dan belum membentuk senyawa sukrosa ester. Apabila terbentuk senyawa ester pada larutan hasil reaksi, maka pada saat penambahan NaOH uji dengan indikator fenolftalein, warna merah muda yang terbentuk tidak hilang hanya karena adanya pengocokan. Untuk pemudaran warna merah muda pada larutan tersebut diperlukan pemanasan cukup tinggi, yaitu pada temperatur minimum  $60^{\circ}\text{C}$  dengan waktu pemanasan yang cukup lama. Hal ini karena pada temperatur  $60^{\circ}\text{C}$  merupakan temperatur minimum yang dibutuhkan untuk memutuskan sebuah ikatan ester. Pada proses pemanasan tersebut, akan terjadi degradasi warna merah muda pada larutan, hingga menjadi putih keruh. Adanya degradasi warna tersebut sebagai akibat telah putusya ikatan ester dari gugus asil asam lemak membentuk senyawa asam lemak bebasnya. Asam lemak bebas yang dihasilkan akan menetralisasi konsentrasi NaOH uji yang diberikan.

Tidak terbentuknya produk sukrosa ester asam lemak ini dapat disebabkan adanya penurunan aktivitas dari lipase ekstrak kasar dalam pelarut organik yang digunakan. Adanya pelarut organik ini akan membuat perubahan konformasi dari

sisi aktif enzim, dan dapat mengakibatkan berkurangnya sifat katalitik dari lipase ekstrak kasar.

Salah satu korelasi terbaik antara aktivitas katalitik dengan hidrofobisitas pelarut diperoleh jika menggunakan nilai log P. Nilai P tersebut merupakan koefisien partisi dari 1-oktanol dan air yang menyatakan perbandingan antara konsentrasi komponen yang larut dalam n-oktanol terhadap konsentrasi komponen yang larut dalam air. Nilai log P ini digunakan sebagai parameter hidrofobisitas suatu pelarut organik. Kegunaan dari log P adalah untuk mengetahui kecenderungan proporsional antara aktivitas katalitik yang tinggi terhadap hidrofobisitas yang tinggi pula. Nilai P diberi batasan sebagai koefisien partisi (Singh, 2008). Dengan rumusan sebagai berikut,

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

Aktivitas enzim akan menjadi lebih tinggi apabila terdapat dalam pelarut organik yang hidrofobik dengan nilai log P > 4, seperti heptana, oktana, dekanol, dan heksadekana. Nilai aktivitasnya akan mengalami penurunan apabila terdapat dalam pelarut dengan nilai 2 < log P < 4, seperti pada pelarut heksana, toluena, benzena, heptanol, dan oktanol. Nilai aktivitas enzim akan menjadi lebih rendah dari aktivitas awal pada lingkungan aqueousnya apabila terdapat dalam pelarut organik yang bersifat hidrofilik dengan nilai log P < 2, seperti pada alkohol-alkohol rantai pendek.

Berdasarkan tinjauan mengenai sifat hidrofobisitas (Log P) dari pelarut organik (Lampiran 5), dapat dilihat bahwa pelarut heksana memiliki nilai log P sebesar 3,5 (Musthofa, 2009). Hal ini dapat menurunkan sifat katalitik dari lipase ekstrak kasar yang digunakan. Oleh sebab itu, sifat katalitik lipase ekstrak kasar akan berkurang dan mengakibatkan terlalu kecilnya nilai aktivitas yang dimiliki oleh lipase ekstrak kasar yang digunakan sebagai biokatalis pada reaksi esterifikasi enzimatik. Oleh karena terlalu rendahnya nilai aktivitas yang dimiliki lipase ekstrak kasar, maka akan mempersulit lipase untuk dapat mengkatalisis reaksi esterifikasi antara asam lemak minyak sawit dengan sukrosa.

Adanya hidrofobisitas dari pelarut heksana tersebut diduga meningkatkan interaksi hidrofobik dari selubung enzim. Terbukanya selubung enzim ini membuat sisi katalitik lipase ekstrak kasar menjadi terbuka terhadap sistem. Hal

ini seharusnya dapat menguntungkan reaksi esterifikasi yang ada. Namun, tingginya konsentrasi heksana pada sistem dapat mengdehidrasi lipase ekstrak kasar yang digunakan, sehingga konsentrasi minimum air yang diperlukan oleh enzim untuk dapat mempertahankan konformasinya menjadi hilang.

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, air esensial tersebut merupakan jumlah air minimum untuk dapat melapisi molekul enzim, sehingga enzim tersebut tetap dapat mempertahankan konformasi dan sifat katalitiknya. Jika air esensial tersebut tetap dapat dipertahankan, maka penggantian sisa-sisa volume air lainnya dapat diganti dengan pelarut organik. Penggantian dengan pelarut organik ini tidak akan mengganggu aktivitas enzim yang digunakan (Sesilia, 1999).

Selain itu, adanya kadar asam lemak yang tinggi pada larutan dapat menghambat serta menurunkan nilai aktivitas katalitik dari lipase ekstrak kasar. Hal ini karena kadar asam lemak yang tinggi akan menyebabkan tingkat keasaman fasa air esensial di sekitar enzim menjadi tinggi. Akibatnya, akan terjadi proses desorpsi air dari wilayah interfasa pada lipase. Terdesorpsinya air pada lapisan interfasa ini akan menyebabkan tidak aktifnya fungsi katalitik dari lipase (Musthofa, 2009).

Berdasarkan uraian di atas, tidak terbentuknya senyawa sukrosa ester disebabkan hilangnya kemampuan lipase ekstrak kasar untuk dapat mempertahankan konformasinya, sehingga membuat enzim tersebut tidak dapat melakukan aktivitas katalitiknya pada reaksi esterifikasi antara asam lemak minyak sawit dengan sukrosa.

## **BAB 5 PENUTUP**

### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut,

1. Nilai aktivitas maksimum lipase ekstrak kasar diperoleh pada suhu reaksi 30°C dengan kondisi pH larutan reaksi netral atau  $\text{pH} = 7$ . Nilai aktivitas maksimum yang diperoleh, yaitu 16,4307  $\mu\text{mol}/\text{menit mg}$  Substrat.
2. Nilai kadar protein tertinggi lipase ekstrak kasar diperoleh pada hasil fermentasi selama 96 jam, yaitu 397,26  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , dengan nilai aktivitas spesifik sebesar 41,36 U/ mg protein.
3. Lipase ekstrak kasar yang diproduksi dari kultur fermentasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* belum dapat berperan sebagai biokatalisator pada reaksi esterifikasi antara asam lemak minyak sawit dengan sukrosa.

### **5.2 Saran**

1. Pembuatan kurva pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* serta korelasinya terhadap jumlah lipase yang dihasilkan
2. Dilakukannya tahapan purifikasi terhadap lipase ekstrak kasar, sehingga nilai aktivitas katalitiknya menjadi lebih besar.
3. Pemilihan pelarut organik dengan nilai  $\log P > 4$  untuk digunakan dalam reaksi esterifikasi enzimatis.

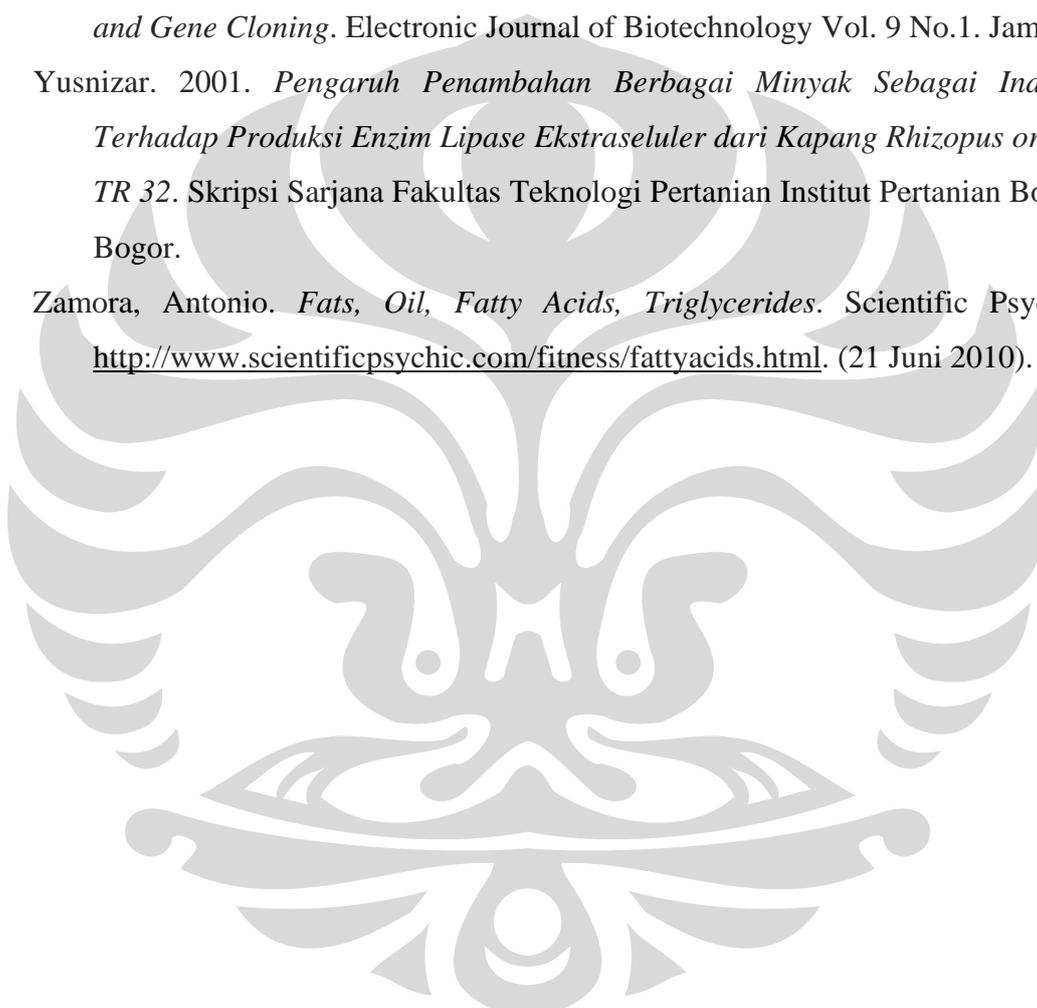
## DAFTAR REFERENSI

- Adamopoulos, Lambrini. 2006. *Understanding the Formation of Sugar Fatty Acid Esters*. North Carolina State University. Raleigh.
- Budiyanti, Siswi. 1994. *Mempelajari Pengaruh Media dan Penggunaan Induser Pada Produksi Enzim Lipase Dari Candida Rugosa*. Jurusan Teknologi Industri Pertanian IPB. Bogor.
- Chumaidi, et al. (2009, Oktober). *Amobilisasi Lipase dari Bacillus subtilis sebagai Biokatalisator Pembuatan Biodiesel dari Minyak Randu*. Seminar Nasional Teknik Kimia Indonesia-STNKI 2009, Malang.
- Dandekar, P. P & V. B. Patravale. 2009. *Enzymatic Synthesis of Fructose Ester from Mango Kernel Fat*. Indian Journal of Chemical Technology, Vol. 16, 317-321.
- Enzim. <http://id.wikipedia.org/enzim/>. Wikipedia Indonesia. (23 Maret 2010)
- Faizal, Irvan. 1994. *Penentuan Media Kultivasi dan Penambahan Minyak Zaitun Sebagai Induser Pada Produksi Lipase Oleh Pseudomonas fluorescens*. Skripsi Sarjana Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Gupta R., N. Gupta, & P. Rhati. 2004. *Bacterial Lipases: an Overview of Production, Purification, and Biochemical Properties*. Microbiol Technol, 64, 763-781. New Delhi.
- Handayani, R., & Joko Sulisty. (2005). *Transesterifikasi Ester Asam Lemak Melalui Pemanfaatan Teknologi Lipase*. Biodiversitas, 3, 164-167.
- Hashim, Hasnia B. dan Jumat Salimon. 2008. *Kajian Pengoptimuman Tindak Balas Hidrolisis Minyak Kacang Soya*. The Malaysian Journal Analytical Sciences, 12. Selangor.
- Hudiyono, Sumi, prof. PWS. 2004. *Kapita Selektu Biokim I: Enzim*. Departemen Kimia FMIPA UI. Depok
- Jaeger et al. 1994. *Bacterial Lipases*. FEMS Microbiology Review, 15, 29-63.

- Jaeger et al. 1999. *Bacterial Biocatalyst: Molecular Biology Three-Dimensional Structure and Biotechnological Application of Lipases*. Review Microbiol, 53, 315-351.
- Kajian Pasar dan Produk Hilir Kelapa Sawit. Institut Pertanian Bogor. <http://seafast.ipb.ac.id/seafast.info>. (23 Maret 2010)
- Kelapa Sawit. Departemen Pertanian dan Perindustrian. <http://www.depperin.go.id/PaketInformasi/KelapaSawit/Minyak%20Kelapa%20Sawit.pdf>. (23 Maret 2010)
- Kouker, Gisela dan K. E. Jaeger. 1986. *Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases*. Applied and Environmental Microbiology, 211-213.
- Kukreja, V., & M. B. Bera. 2005. *Lipase from Pseudomonas aeruginosa MTCC 2488: Partial Purification, Characterization and Calcium Dependent Thermostability*. Indian Journal of Biotechnology, 4, 222-226.
- Musthofa, Chabib. 2009. *Mempelajari Proses Pemekatan DAG (Diasil Gliserol) dari Fraksi Kaya DAG Hasil Gliserolisis Enzimatis RBDPO (Refined Bleached Deodorized Palm Oil)*. Skripsi Sarjana Fakultas Teknologi Pertanian IPB Bogor.
- Nardini, et al. 2000. *Crystal Structure of Pseudomonas aeruginosa Lipase In The Open Conformation*. The Journal of Biological Chemistry, 275, 31219-31225.
- Nelson, David, L. dan Michael M. Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry Fourth Edition*. Electronic Book. (19 Maret 2007).
- Nurosid et al. 2008. *Kemampuan Azospirillum sp. JG3 dalam Menghasilkan Lipase Pada Medium Campuran Dedak dan Onggok Padi dengan Waktu Inkubasi Berbeda*. Departemen Mikrobiologi Fakultas Biologi Universitas Jendral Soedirman.
- Pandy, et al. 2006. *Enzyme Technology*. Springer. Asiatech Publisher Inc.
- Permata Sari, Tetty. 1994. *Kajian Pengaruh Jenis Media dan Penambahan Minyak Induser pada Produksi Enzim Lipase Oleh Candida Lipolytica*. Jurusan Teknologi Industri Pertanian IPB. Bogor.
- Pseudomonas aeruginosa. 2010. <http://en.wikipedia.org/pseudomonasaeruginosa/>. Wikipedia. (23 Maret 2010).

- Putri, Niezha Eka. 2008. *Produksi Xilitol dari Hidrolisat Tongkol Jagung Oleh Khamir Penghasil Enzim Xylose Reduktase (XR)*. Skripsi Sarjana Departemen Kimia FMIPA Universitas Indonesia.
- Rhodamine B. <http://en.wikipedia.org/rhodamine>. Wikipedia. (
- Sa'id, E. Gumbira. 1987. *Bioindustri Penerapan Teknologi Fermentasi*. Jakarta: Mediatama Sarana Perkasa.
- Sakidja. 1994. *Sintesis Poliester Asam Lemak Sukrosa dari Minyak Kelapa Sebagai Bahan Pengganti Lemak Untuk Makanan Rendah Kalori*. Ringkasan Disertasi. Program Studi Ilmu Pangan Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.
- Schuchardt, Ulf, et al. 1997. *Transesterification of Vegetable Oil: a Review*. Journal Brazil Chemistry Vol. 9 No. 1 199-210. Brazil.
- Sesilia, Imelda. 1999. *Mempelajari Stabilitas Termal Enzim Lipase Candida antarctica dan Rhizomuchor miehei dalam Pelarut Heksana, Toluena, Benzena*. Skripsi Sarjana Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor.
- Sigh, Manpreet, et. al. 2008. *Transesterification of Primary and Secondary Alcohols Using Pseudomonas aeruginosa Lipase*. Bioresource Technology 99, 2116-2120.
- Stuer et al. 1986. *Purification of Extracellular Lipase from Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol Vol. 168 No. 3 1070-1074.
- Sukrosa. <http://wapedia.mobi/ms/Sukrosa>. (23 Maret 2010)
- Sumarsih, Sri. 2000. *Isolasi dan Karakterisasi Lipase Rhizopus stolonifer UICC 137 Serta Aplikasinya Untuk Resolusi (R,S)-Ibuprofen Metil Ester*. Tesis Magister Departemen Kimia Universitas Indonesia. Depok.
- Sumiyannah. 2001. *Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Aktivitas Hidrolisis dan Ekstrerifikasi Enzim Lipase Intra dan Ekstraseluler dari Rhizopus oryzae TR 32*. Skripsi Sarana Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Todar, Kenneth. *Pseudomonas aeruginosa*.  
<http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas>. (4 April 2010)

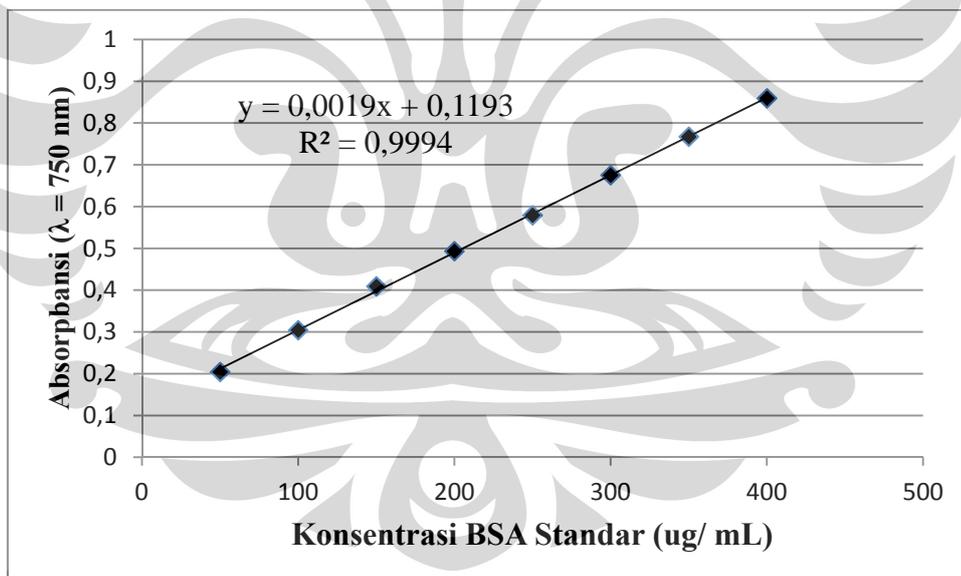
- Widyanti, Astarina. 1989. *Studi Pendahuluan Reaksi Esterifikasi Asam Stearat dan Gliserol dengan Katalis Lipase*. Skripsi Sarjana Departemen Kimia Universitas Indonesia. Depok.
- Yapasan, Ece. 2008. *Partial Purification and Characterization of Lipase Enzyme From a Pseudomonas Strain*. Thesis to Graduate School of Engineering and Sciences of Izmir Institute of Technology. Izmir.
- Vakhlu, et al. 2006. *Yeast Lipases: Enzyme Purification, Biochemical Properties and Gene Cloning*. Electronic Journal of Biotechnology Vol. 9 No.1. Jammu.
- Yusnizar. 2001. *Pengaruh Penambahan Berbagai Minyak Sebagai Induser Terhadap Produksi Enzim Lipase Ekstraseluler dari Kapang Rhizopus oryzae TR 32*. Skripsi Sarjana Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Zamora, Antonio. *Fats, Oil, Fatty Acids, Triglycerides*. Scientific Psychic. <http://www.scientificpsychic.com/fitness/fattyacids.html>. (21 Juni 2010).



## Lampiran 1: Pembuatan Kurva Standar Protein

Konsentrasi BSA (ug/ mL)	Serapan $\lambda$ 750 nm
50	0,204
100	0,304
150	0,409
200	0,493
250	0,579
300	0,675
350	0,767
400	0,859

Kurva Standar BSA



## Lampiran 2: Nilai Aktivitas Spesifik Lipase Ekstrak Kasar

Lipase Ekstrak Kasar Hasil Inkubasi	Kadar Protein (ug/ mL)	Nilai Aktivitas Spesifik (UA/ mg Protein)
2 hari	361,47	18,6483
3 hari	379,90	26,6154
4 hari	397,26	55,1468

Rumus Penentuan Nilai Unit Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar

Nilai Aktivitas Spesifik Lipase Ekstrak Kasar

$$\frac{\text{Nilai Unit Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar (UA)}}{\text{Kadar Protein (mg)}}$$

## Lampiran 3: Nilai Unit Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar

## 1. Pengaruh pH Terhadap Nilai Unit Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar

pH	UA (umol/ menit mg Substrat)
6	3.7917
7	16.4307
8	2.5278
9	0

## 2. Pengaruh Temperatur Terhadap Nilai Unit Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar

Temperatur (°C)	UA (umol/ menit mg Substrat)
20	2.5278
25	3.7917
30	16.4307
35	5.0556
40	5.0556
45	6.3195

## 3. Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Nilai Unit Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar

[S] (% v/v)	UA (umol/ menit mg Substrat)
0	0
3	2,1065
4	4,7396
5	16,4307

(Lanjutan Lampiran 2)

## 4. Rumus Penentuan Nilai Unit Aktivitas Lipase Ekstrak Kasar

$$\text{Nilai Unit Aktivitas} = \frac{((V_{\text{Sampel}} - V_{\text{Blanko}}) \times [\text{NaOH}] \times 1000)}{t \times W}$$

Keterangan:

$V_{\text{Sampel}}$  = Volume NaOH yang dibutuhkan untuk mentitrasi larutan sampel uji berisi lipase ekstrak kasar (mL)

$V_{\text{Blanko}}$  = Volume NaOH yang dibutuhkan untuk mentitrasi larutan blanko berisi lipase ekstrak kasar yang telah didenaturasi (mL)

$[\text{NaOH}]$  = Konsentrasi NaOH (M)

1000 = Faktor konversi mmol menjadi  $\mu\text{mol}$

$t$  = Waktu Inkubasi (Menit)

$W$  = Massa Substrat (mg)

## Lampiran 4: Data Pengamatan Penentuan Jumlah Bakteri

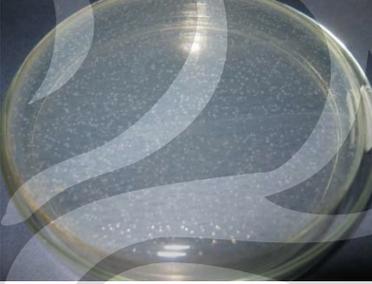
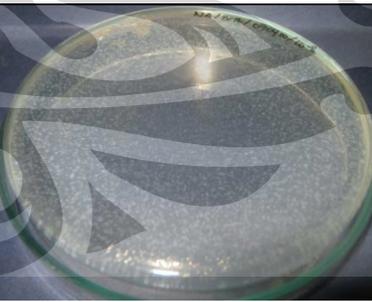
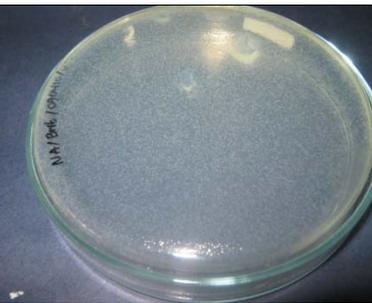
## 1. Metode Optical Density (OD) dan

Faktor Pengenceran	A
$10^0$	0.394
$10^{-1}$	0.159
$10^{-2}$	0.075
$10^{-3}$	0.057
$10^{-4}$	0.054
$10^{-5}$	0.054
$10^{-6}$	0.056
$10^{-7}$	0.054
$10^{-8}$	0.054

2. Metode *Total Plate Count* (TPC)

Faktor Pengenceran	Pengamatan
$10^{-1}$	
$10^{-2}$	
$10^{-3}$	

(Lanjutan Lampiran 4)

Faktor Pengenceran	Pengamatan
$10^{-4}$	
$10^{-5}$	
$10^{-6}$	
$10^{-7}$	
$10^{-8}$	

## Lampiran 5: Daftar Log P Pelarut

Pelarut	Log P
Heptana	4,397
Heksana	3,500
Diklorometana	1,249
Dietil Eter	0,87
Etil Asetat	0,711
Tetrahidrofuran	0,526
2-Propanol	0,074
Aseton	-0,208
Metanol	-0,764
Air	-1,38