



UNIVERSITAS INDONESIA

**STUDI REAKSI ESTERIFIKASI ANTARA ASAM LEMAK
HASIL HIDROLISIS MINYAK KELAPA DENGAN SUKROSA
MENGUNAKAN LIPASE *Candida rugosa* EC 3.1.1.3**

SKRIPSI

**AWALIATUL BARKAH
0706263012**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI KIMIA
DEPOK
2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**STUDI REAKSI ESTERIFIKASI ANTARA ASAM LEMAK
HASIL HIDROLISIS MINYAK KELAPA DENGAN SUKROSA
MENGUNAKAN LIPASE *Candida rugosa* EC 3.1.1.3**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains

**AWALIATUL BARKAH
0706263012**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI KIMIA
DEPOK
2011**

ii

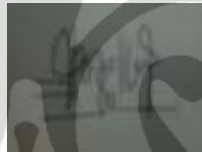
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Awaliatul Barkah

NPM : 0706263012

Tanda Tangan :



Tanggal : 14 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Awaliatul Barkah
NPM : 0706263012
Program Studi : Kimia S1 Reguler
Judul Skripsi : Studi Reaksi Esterifikasi antara Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa dengan Sukrosa Menggunakan Lipase *Candida rugosa* EC 3.1.1.3

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Prof. Dr. Sumi Hudyono, PWS

Pembimbing : Dra. Sri Handayani, M.Biomed

Penguji : Dra. Siswati Setiasih, M.Si

Penguji : Dra. Susilowati Hadi Susilo, M.Sc

Penguji : Drs. Sultan Badjri, M.Si

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 14 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, berkah dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul **Studi Reaksi Esterifikasi antara Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa dengan Sukrosa Menggunakan Lipase *Candida rugosa* EC 3.1.1.3** ini tepat pada waktunya. Tugas akhir ini disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan akademis untuk meraih gelar Sarjana Sains di Program Studi S1 Kimia, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

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

1. Bapak Prof. Dr. Sumi Hudyono, PWS dan Ibu Dra. Sri Handayani M.Biomed, selaku dosen pembimbing, yang telah membimbing dan memberi pengarahan dalam penyusunan tugas akhir ini. Terima kasih atas segala bantuan serta bimbingannya.
2. Bapak Dr. Ridla Bakri, selaku Ketua Departemen Kimia, Universitas Indonesia.
3. Ibu Dr. Ivandini Tribidasari Anggraningrum S.Si., M.Si., selaku Pembimbing Akademis penulis selama empat tahun menimba ilmu di Departemen Kimia FMIPA UI.
4. Bapak dan Ibu dosen Departemen Kimia FMIPA UI. Terima kasih atas segala ilmu yang telah diberikan. Semoga Ilmu tersebut bermanfaat.
5. Laboran Dept Kimia (Mba Ina, Mba Cucu, Mba Ema, Mba Tri) atas bantuannya selama penulis melakukan penelitian dan penyusunan tugas akhir ini.
6. Seluruh karyawan Departemen Kimia FMIPA UI atas segala bantuannya, terutama untuk Bapak Sutrisno, Pak Amin, Pak Kiri, Pak Wito, dll.
7. Kakak dan teman-teman Laboratorium Afiliasi Departemen Kimia FMIPA UI atas segala bantuannya.

8. Kak Iman, terima kasih atas pinjaman labu leher tiga nya selama satu semester.
9. Ibunda tercinta atas motivasi, perhatian, kasih sayang, doa yang tak pernah putus, dan dukungan baik moril maupun materil yang menjadi semangat bagi penulis sehingga dapat menyelesaikan tugas akhir ini.
10. Ayahanda yang selalu mensupport baik moril maupun materil.
11. Adik-adikku, Antoni Akbar, Khairul Rizki, Muhammad Abduh, serta Nurlailatissifah yang telah memberi warna dalam kehidupan ini.
12. Keluarga besar Muhammad Zain dan Muhammad Hasan atas doa serta dukungan yang selalu mengalir untuk penulis selama ini.
13. Ika Novianingsih, teman seperjuangan. Terima kasih dan maaf selalu merepotkan.
14. Zetriyana Puteri, Rahayu Harganingtyas, Savitri Oktaviani, Kurniyasari, Prita Belinda, Riri Ayu Nastiti, Rahman Arif, Hadyan Adli, Evi Oktaviani, dan Umar untuk persahabatan selama empat tahun ini. Terima kasih atas suntikan semangat dan bantuannya.
15. Riski Imaniastuti, Sherly A Dien, Yuliga Setiawati, Silvy Yusri, Rifan, Widi Sukmana, Fitriana Sari, serta Ika Agustina. Terima kasih atas persahabatan yang indah, semangat serta bantuannya.
16. Teman-teman Lt 4, Prita Belinda, Retno Hapsari, Yulinar, K Desi Bettivia, Megawati, Nisa, Bu Eti, Rifan, K Yuda, dan K Arief yang selalu meramaikan suasana di laboratorium Lt 4.
17. Teman-teman Lt 3, Masayu Farina, K nadia, K wiwit, K nope, K nani, K sabri, K Atin, dan teman-teman yang lain. Terima kasih atas bantuan yang diberikan selama penulis melaksanakan penelitian.
18. Teman-teman KILANG 2007, Rohman, Atur, Tegar, Tio, Widi, Ari, Evi, Ikor, Ardila, Hani, atas petualangan yang dilalui bersama.
19. Teman-teman Kimia 2007. Terima kasih atas persahabatan yang indah selama empat tahun ini. Semoga tali silaturahmi kita tidak terputus sampai disini.
20. Teman-teman HR28, Lisa, Adlina, Fika, Vini, Dini, Tyas, Fahrur, Kartika, Hilda, Nisa, atas persahabatan yang telah terjalin selama enam tahun ini.

21. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu yang telah membantu dalam penelitian dan penyusunan tugas akhir ini.

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



Penulis,
2011

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

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

Nama : Awaliatul Barkah
NPM : 0706263012
Program Studi : S1 Kimia
Departemen : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

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

Studi Reaksi Esterifikasi antara Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa dengan Sukrosa Menggunakan Lipase *Candida rugosa* EC 3.1.1.3.

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 14 Juli 2011

Yang menyatakan



(Awaliatul Barkah)

viii

ABSTRAK

Nama : Awaliatul Barkah
Program Studi : Kimia
Judul : Studi Reaksi Esterifikasi antara Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa dengan Sukrosa Menggunakan Lipase *Candida rugosa* EC 3.1.1.3

Poliester sukrosa (SPE) merupakan senyawa yang memiliki struktur mirip dengan lemak alami, suatu substitusi lemak nonkalori yang tidak tercerna serta tidak terabsorpsikan. Ester sukrosa dengan derajat esterifikasi rendah banyak diaplikasikan sebagai emulsifier dan yang berderajat esterifikasi tinggi digunakan sebagai *fat replacer*. Sebagian besar produksi karbohidrat poliester dilakukan secara kimiawi dan saat ini masih dilindungi oleh paten. Sintesis ester sukrosa secara enzimatik dapat dilakukan dengan menggunakan enzim lipase dalam pelarut organik dengan kandungan air yang sedikit. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan studi reaksi esterifikasi antara sukrosa dengan asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa dengan menggunakan enzim lipase *Candida rugosa* dalam pelarut n-heksana. Enzim lipase yang digunakan memiliki aktivitas spesifik 2,45 U/mg. Analisis dengan IR menunjukkan produk hasil reaksi esterifikasi memiliki gugus ester, yang ditunjukkan dengan adanya serapan pada bilangan gelombang 1739 cm^{-1} . Analisis dengan HPLC menunjukkan bahwa ester sukrosa yang terbentuk merupakan campuran mono-, di-, tri-, dan tetraester dengan perbandingan 40,28%, 42,05%, 13,65%, dan 4,03%. Hasil optimasi reaksi esterifikasi diperoleh bahwa kondisi optimum dari reaksi adalah pada waktu reaksi 18 jam, temperatur $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, dan perbandingan mol sukrosa dengan asam lemak sebesar 1:40. Berdasarkan uji kualitatif sederhana pembentukan emulsi, produk hasil sintesis dapat digunakan sebagai emulsifier.

Kata kunci :

Esterifikasi, lipase *Candida rugosa*, sukrosa, minyak kelapa, ester sukrosa

xiv + 57 halaman : 26 gambar; 13 tabel; 14 lampiran

Daftar Pustaka : 34 (1984-2011)

ABSTRACT

Name : Awaliatul Barkah
Study Program : Chemistry
Title : Esterification Reaction of Hydrolized Coconut Oil Fatty Acid and Sucrose Using Lipase from *Candida rugosa* EC 3.1.1.3

Sucrose polyester is a compound that has a similiar structure with natural fat, a noncaloric fat substitute that is non digestible and non absorbable. Sucrose ester with a low degree of substitution could be applied as an emulsifier and a high degree of substitution could be used as fat replacer. Most of sucrose esters were prepared by conventional chemical esterification and still protected by patent. The enzymatic synthesis of sucrose ester can be carried out by using lipase in organic solvent with a less water content. This research aims to study the esterification reaction between sucrose and hydrolized coconut oil fatty acid performed in n-hexane using *Candida rugosa* lipase. The specific activity of enzyme that used in this study is 2,45 U/mg. FT-IR analysis showed that the product of esterification reaction has an ester group shown by the absopction at wave number 1739 cm^{-1} . HPLC analysis showed that the synthesized product were a mixture of mono-, di-, tri-, and tetraester with the composition ratio 40,28%, 42,05%, 13,65%, and 4,03%. The optimum condition of esterification reaction were achieve at reaction time 18 hours, temperature $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, and mole ratio of sugar to fatty acid 1:40 mmol. Based on simple qualitative test of emulsion formation, the product of esterification reaction could be used as an emulsifier.

Key words:

Esterification, *Candida rugosa* lipase, sucrose, coconut oil, ester sucrose.

DAFTAR ISI

	HALAMAN
HALAMAN JUDUL	
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Hipotesis	2
1.4 Tujuan Penelitian	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Tanaman Kelapa	4
2.2 Minyak Kelapa	6
2.2.1 Proses Pembuatan Minyak Kelapa	9
2.2.2 Standar Mutu Minyak Kelapa	9
2.3 Sukrosa	12
2.4 Enzim	13
2.4.1 Klasifikasi Enzim	13
2.4.2 Kerja Enzim	14
2.5 Lipase	19
2.5.1 Sumber Lipase	19
2.5.2 Klasifikasi Lipase	22
2.5.3 Reaksi yang Dikatalisis oleh Lipase	23
2.5.4 Aplikasi Lipase	24
2.6 Lipase <i>Candida rugosa</i>	24
2.7 Esterifikasi	25
2.8 Ester Asam Lemak Sukrosa	27
2.9 Emulsifier	28
2.10 FT-IR	28
BAB 3 METODE PENELITIAN	30
3.1 Alat dan Bahan	32
3.1.1 Alat	32
3.1.2 Bahan	32
3.2 Prosedur Penelitian	33
3.2.1 Hidrolisis Trigliserida pada Minyak Kelapa	33
3.2.2 Sintesis Ester Asam Lemak Sukrosa	33
3.2.3 Terminasi Reaksi Esterifikasi	34
3.2.4 Sentrifugasi Hasil Reaksi Esterifikasi	34

3.2.5	Titration Fasa Organik	34
3.2.6	Identifikasi Produk	35
3.2.7	Uji Sederhana Kemampuan Ester Sukrosa Hasil Sintesis sebagai Emulsifier	35
3.2.8	Penentuan Jenis Emulsi dengan Menggunakan Mikroskop	36
BAB 4	PEMBAHASAN	37
4.1	Hidrolisis Trigliserida	37
4.2	Sintesis Ester Asam Lemak Sukrosa	40
4.3	Identifikasi Ester Sukrosa	44
4.3.1	Identifikasi Menggunakan Instrumentasi FT-IR	44
4.3.2	Identifikasi Menggunakan HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	48
4.4	Optimasi Waktu Reaksi	50
4.5	Optimasi Temperatur Reaksi	51
4.6	Optimasi Perbandingan Konsentrasi antara Sukrosa dan Asam Lemak	52
4.7	Uji Kualitatif Sederhana Kemampuan Ester Sukrosa Hasil Sintesis sebagai Emulsifier	54
4.8	Penentuan Jenis Emulsi dengan Menggunakan Mikroskop	54
BAB 5	PENUTUP	56
5.1	Kesimpulan	56
5.2	Saran	56
	DAFTAR PUSTAKA	58

DAFTAR GAMBAR

	HALAMAN
Gambar 2.1. Pohon Industri Kelapa.....	6
Gambar 2.2. Negara Eksportir Minyak Kelapa di Dunia	7
Gambar 2.3. Minyak atau Lemak Sebagai Bahan Dasar Industri Oleokimia Beserta Produk Turunannya.....	8
Gambar 2.4. Struktur Kimia Sukrosa	12
Gambar 2.5. Persamaan Reaksi Enzimatis	15
Gambar 2.6. Penurunan Energi Aktivasi oleh Enzim	15
Gambar 2.7. Hipotesis Kerja Enzim	17
Gambar 2.8. Reaksi yang Dikatalisis oleh Lipase	23
Gambar 2.9. Struktur Tiga Dimensi Lipase <i>Candida rugosa</i>	25
Gambar 2.10. Persamaan Reaksi Esterifikasi.....	26
Gambar 2.11. Mekanisme Reaksi Esterifikasi Berkatalis Asam	26
Gambar 2.12. Karbohidrat Monoester	27
Gambar 4.1. Reaksi Hidrolisis Trigliserida	37
Gambar 4.2. Asam Lemak Minyak Kelapa	39
Gambar 4.3. Campuran Hasil Reaksi Setelah Terminasi	42
Gambar 4.4. Hasil Reaksi Sebelum dan Sesudah Proses Sentrifugasi	43
Gambar 4.5. Spektrum FT-IR Sukrosa	44
Gambar 4.6. Spektrum FT-IR Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa	45
Gambar 4.7. Spektrum FT-IR Ester Asam Lemak Sukrosa Hasil Sintesis	46
Gambar 4.8. Spektrum FT-IR Standar Ester Sukrosa (<i>Ryoto Sugar</i>).....	47
Gambar 4.9. Kromatogram HPLC dari Ester Sukrosa Hasil Sintesis	48
Gambar 4.10. Grafik Waktu Reaksi vs Yield Ester Sukrosa	50
Gambar 4.11. Grafik Hubungan Temperatur vs % Yield Ester Sukrosa	51
Gambar 4.12. Grafik Pengaruh mmol Asam Lemak Terhadap Persentase <i>Yield</i> Ester Asam Lemak Sukrosa	53
Gambar 4.13. Minyak dan Air Sebelum dan Sesudah Penambahan Ester Sukrosa Hasil Sintesis	54
Gambar 4.14. Hasil Pengamatan Emulsi dengan Mikroskop	55

DAFTAR TABEL

HALAMAN

Tabel 2.1.	Standar Mutu Minyak Goreng Berdasarkan SNI-3741-1995.....	10
Tabel 2.2.	Standar Mutu Minyak Kelapa Berdasarkan APCC.....	11
Tabel 2.3.	Sifat-sifat Minyak kelapa.....	11
Tabel 2.4.	Klasifikasi Enzim.....	14
Tabel 2.5.	Mikroorganisme Penghasil Lipase.....	21
Tabel 4.1.	Komposisi Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa.....	39
Tabel 4.2.	Komposisi Asam Lemak Minyak Kelapa.....	40
Tabel 4.3.	Tabel Kolerasi Spektrum FT-IR Sukrosa.....	45
Tabel 4.4.	Tabel Kolerasi Spektrum FT-IR Asam Lemak.....	45
Tabel 4.5.	Tabel Korelasi Spektrum FT-IR Produk Hasil Sintesis.....	46
Tabel 4.6.	Pengaruh Waktu Reaksi Terhadap % <i>yield</i> Ester Sukrosa.....	50
Tabel 4.7.	Pengaruh Temperatur Terhadap % <i>yield</i> Ester Sukrosa.....	51
Tabel 4.8.	Pengaruh Rasio Sukrosa : Asam Lemak Terhadap % <i>yield</i> Ester Sukrosa.....	52

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Perhitungan Berat Molekul Asam Lemak Hasil Hidrolisis
- Lampiran 2. Hubungan Waktu Reaksi Terhadap Persentase Yield Ester Asam Lemak Sukrosa
- Lampiran 3. Hubungan Temperatur Reaksi Terhadap Persentase Yield Ester Asam Lemak Sukrosa
- Lampiran 4. Hubungan Rasio Sukrosa : Asam Lemak Terhadap Persentase Yield Ester Asam Lemak Sukrosa
- Lampiran 5. Spesifikasi Lipase *Candida rugosa*
- Lampiran 6. Hasil Analisis Komposisi Asam Lemak Minyak Kelapa
- Lampiran 7. Hasil Analisis HPLC Ester Sukrosa Hasil Sintesis
- Lampiran 8. Hasil Analisis HPLC Standar Ester Sukrosa
- Lampiran 9. Perhitungan Komposisi Mono-, Di-, Tri-, dan Tetraester Pada Produk Hasil Reaksi
- Lampiran 10. Spektrum FT-IR Sukrosa
- Lampiran 11. Spektrum FT-IR Asam Lemak
- Lampiran 12. Spektrum FT-IR Ester Asam Lemak Sukrosa Hasil Sintesis
- Lampiran 13. Spektrum FT-IR Standar Ester Sukrosa (*Ryoto Sugar*)
- Lampiran 14. Spesifikasi Standar *Ryoto Sugar* S-1170

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Poliester sukrosa merupakan suatu senyawa yang memiliki struktur mirip lemak alami namun tidak dapat dicerna dan tidak diabsorpsi oleh tubuh. Ester sukrosa dengan derajat substitusi rendah banyak diaplikasikan sebagai *emulsifier*, sedangkan yang berderajat substitusi tinggi digunakan sebagai *fat replacer*.

Emulsifier merupakan suatu senyawa aktif penurun tegangan permukaan yang sekaligus memiliki gugus hidrofilik dan gugus hidrofobik dalam satu struktur molekul yang sama. Sifat yang unik inilah yang menyebabkan *emulsifier* sangat potensial dan banyak diaplikasikan secara luas dalam bidang industri, seperti industri pangan, farmasi, detergen, kosmetik, dll.

Seiring dengan meningkatnya kesadaran akan kesehatan dan lingkungan yang baik, permintaan akan *emulsifier* yang ramah lingkungan dan mudah terdegradasi semakin meningkat. Salah satu *emulsifier* yang memenuhi kriteria tersebut adalah ester asam lemak sukrosa dengan derajat substitusi rendah. Ester asam lemak sukrosa dapat disintesis dari bahan baku yang dapat diperbaharui seperti sukrosa dan asam lemak yang berasal dari minyak kelapa yang memang keberadaannya banyak di Indonesia.

Ester sukrosa merupakan *emulsifier* non-ionik yang ramah lingkungan karena dapat terdegradasi baik pada kondisi aerob maupun anaerob, tidak toksik, tidak berasa, tidak berbau, serta tidak menyebabkan iritasi pada kulit. Ester asam lemak sukrosa dapat diperoleh melalui rekasi esterifikasi antara sukrosa dengan asam lemak yang berasal dari minyak kelapa, baik secara kimiawi maupun enzimatis.

Dibandingkan dengan sintesis secara kimiawi, sintesis ester sukrosa secara enzimatis lebih banyak diminati karena sintesis secara kimiawi membutuhkan kondisi reaksi yang cukup ekstrim. Kondisi ini sering menyebabkan terjadinya karamelisasi sukrosa serta selektifitas yang rendah. Sementara itu, sintesis secara enzimatis membutuhkan kondisi reaksi yang lunak

(pada suhu dan tekanan rendah), ramah lingkungan, memiliki efisiensi katalisis yang tinggi, serta memiliki regioselektifitas yang tinggi sehingga meminimalisasi terbentuknya produk samping.

Lipase merupakan jenis enzim hidrolase yang dapat menghidrolisis ikatan gliserida pada trigliserida pada minyak atau lemak. Namun, pada kondisi tertentu, lipase juga dapat mengkatalisis reaksi kebalikan dari hidrolisis, yaitu reaksi esterifikasi. Oleh karena itu, lipase dapat digunakan untuk mengkatalisis reaksi esterifikasi antara sukrosa dengan asam lemak minyak kelapa. Dalam penelitian ini digunakan enzim lipase yang berasal dari *Candida rugosa* sebagai katalis reaksi.

Untuk menghasilkan produk ester asam lemak sukrosa dengan persentase *yield* yang tinggi, perlu dilakukan studi optimasi kondisi reaksi esterifikasi, yang meliputi optimasi waktu reaksi, suhu reaksi, serta perbandingan konsentrasi antara sukrosa dengan asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa yang digunakan.

1.2 Perumusan Masalah

1. Apakah Lipase *Candida rugosa* dapat digunakan sebagai katalis dalam reaksi esterifikasi antara sukrosa dengan asam lemak minyak kelapa
2. Bagaimana pengaruh waktu reaksi, temperatur, serta perbandingan konsentrasi antara sukrosa dengan asam lemak terhadap produk ester sukrosa yang dihasilkan.
3. Kondisi seperti apa yang dibutuhkan untuk menghasilkan ester asam lemak sukrosa dengan persentase *yield* yang tinggi.

1.3 Hipotesis

1. Lipase *Candida rugosa* dapat digunakan sebagai katalis dalam reaksi esterifikasi antara sukrosa dengan asam lemak minyak kelapa.
2. Waktu reaksi, temperatur, serta perbandingan konsentrasi sukrosa dengan asam lemak dapat berpengaruh terhadap sintesis ester asam lemak sukrosa.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui apakah lipase *Candida rugosa* dapat digunakan sebagai katalis dalam reaksi esterifikasi antara sukrosa dengan asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa.
2. Mencari kondisi optimum dari reaksi esterifikasi antara sukrosa dengan asam lemak minyak kelapa dengan bantuan enzim lipase *Candida rugosa* sebagai katalis.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kelapa

Kelapa merupakan tanaman perkebunan/industri berupa pohon dengan batang lurus yang berasal dari famili palmae. Tanaman kelapa merupakan tanaman daerah tropis dan dapat dijumpai di seluruh wilayah di Indonesia. Berdasarkan data data FAO tahun 2004-2008, Indonesia merupakan negara penghasil kelapa kedua terluas di dunia yang wilayahnya tersebar di Riau, Sulawesi Utara, Jawa Timur, Jawa Tengah, Jawa Barat, Sulawesi Tengah, Sulawesi Selatan, Lampung, Jambi, dan Maluku. Selain itu Indonesia juga merupakan negara dengan total produksi kelapa tertinggi di dunia, yaitu sebesar 18,16 juta ton (Pusat Data dan Informasi Pertanian, Kementerian Pertanian, 2010).

Berikut merupakan taksonomi dari tumbuhan kelapa:

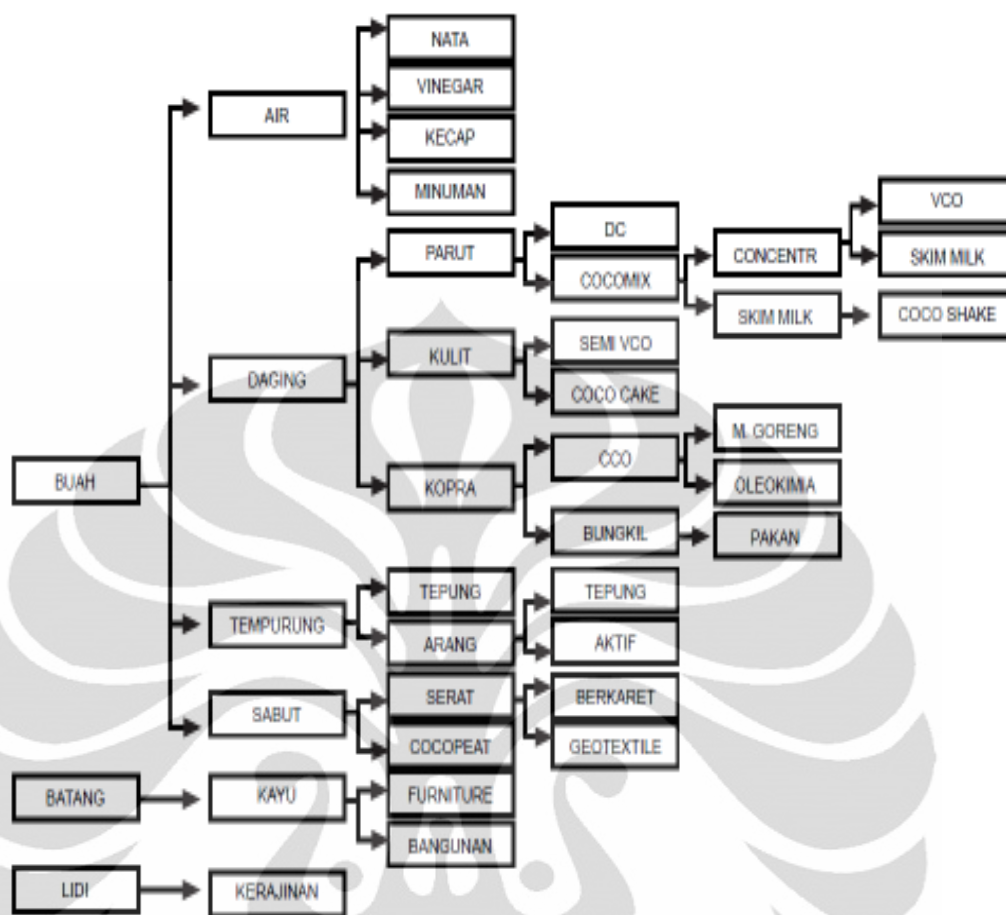
Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Super Divisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Liliopsida
Sub Kelas : Arecidae
Ordo : Arecales
Famili : Arecaceae
Genus : Cocos
Spesies : *Cocos nucifera L* (www.plantamor.com).

Terdapat banyak faktor yang mempengaruhi pertumbuhan tanaman kelapa seperti temperatur, curah hujan, sinar matahari, kelembaban, ketinggian, serta keadaan tanah. Tanaman kelapa tumbuh dengan baik pada temperatur 27-28 °C. Pada temperatur dibawah 20 °C dan di atas 30 °C pertumbuhan tanaman ini tidak baik dan menghasilkan buah yang berukuran kecil. Tanaman ini juga akan tumbuh baik pada daerah dengan curah hujan 1.000-2.250 mm per tahun. Untuk mendapatkan hasil yang baik, curah hujan yang dibutuhkan tanaman ini adalah

1.500-2.000 mm per tahun yang tersebar merata sepanjang tahun. Apabila dilihat dari faktor kelembaban, tanaman ini akan tumbuh baik dan produktif pada daerah dengan kelembaban 70-80% dengan kelembaban minimum 65%. Ketinggian tanah yang cocok untuk tanaman ini adalah 0-600 m di atas permukaan laut dan yang terbaik adalah pada ketinggian kurang dari 400 m di atas permukaan laut. Faktor lain yang mempengaruhi pertumbuhan kelapa adalah kondisi tanah. Tanaman kelapa dapat tumbuh apabila ditanam pada tanah dengan pH 5-8 dan tumbuh optimum pada pH 5,5-6,5. Tanah yang mengandung fosfor dan kalium akan sangat baik untuk menunjang pertumbuhan tanaman kelapa (Warisno, 1998).

Tanaman kelapa dapat dikatakan sebagai pohon kehidupan karena semua bagian tanaman ini dapat dimanfaatkan untuk keperluan manusia. Sebagai contoh, daging buah kelapa dapat dimanfaatkan untuk memproduksi kopra, minyak kelapa, *coconut cream*, santan, dan kelapa parutan kering (*desiccated coconut*). Batang kelapa digunakan sebagai bahan bangunan untuk kerangka atau atap. Daun kelapa digunakan untuk sapu lidi dan barang anyaman. Tempurung kelapa dimanfaatkan untuk *charcoal*, karbon aktif, dan kerajinan tangan. Nira kelapa digunakan untuk membuat gula merah.

Selain manfaat-manfaat tersebut, masih banyak lagi manfaat yang dapat diperoleh dari pohon kelapa dan memiliki nilai ekonomi tinggi seperti *Virgin Coconut Oil (VCO)*, serta pemanfaatan di bidang oleokimia yang dapat menghasilkan asam lemak, metil ester, *fatty alcohol*, *fatty amine*, *fatty nitrogen*, gliserol, dan lain-lainnya (Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis Kelapa, 2010). Berikut adalah gambaran pemanfaatan kelapa dalam industri:



Gambar 2.1. Pohon Industri Kelapa

Sumber: Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis Kelapa, 2010

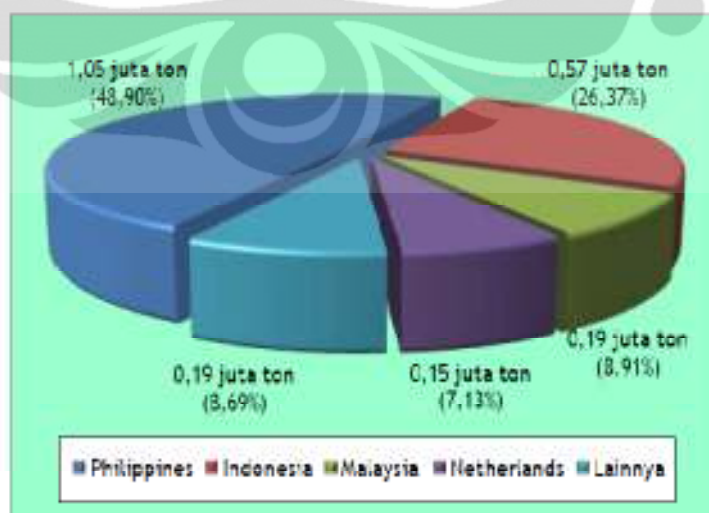
2.2 Minyak Kelapa

Minyak kelapa merupakan minyak yang diperoleh dari kopra (daging buah kelapa yang dikeringkan) atau dari perasan santannya. Kandungan minyak pada daging buah kelapa tua diperkirakan mencapai 30%-35%, sedangkan kandungan minyak dalam kopra mencapai 63-72%. Minyak kelapa, sebagaimana minyak nabati lainnya merupakan senyawa trigliserida yang tersusun atas berbagai asam lemak dan 90% di antaranya merupakan asam lemak jenuh seperti asam laurat dan miristat. Selain itu minyak kelapa yang belum dimurnikan juga mengandung sejumlah kecil komponen bukan lemak seperti fosfatida, gum, sterol (0,06-0,08%), tokoferol (0,003%), dan asam lemak bebas (< 5%) serta sedikit protein dan karoten. Sterol

berfungsi sebagai stabilizer dalam minyak dan tokoferol sebagai antioksidan (Ketaren, 1986).

Minyak kelapa merupakan salah satu minyak nabati yang diperdagangkan di dunia baik untuk kebutuhan rumah tangga maupun industri. Kontribusi minyak kelapa dalam perdagangan dunia sebesar 2,98% jauh lebih kecil dibanding minyak sawit dan minyak kedelai yang masing-masing hampir mencapai 30%. Meskipun persentasenya relatif kecil, namun minyak kelapa merupakan bahan baku yang sangat penting bagi industri oleokimia (Anonim, Peran Minyak Kelapa dalam Industri Oleokimia).

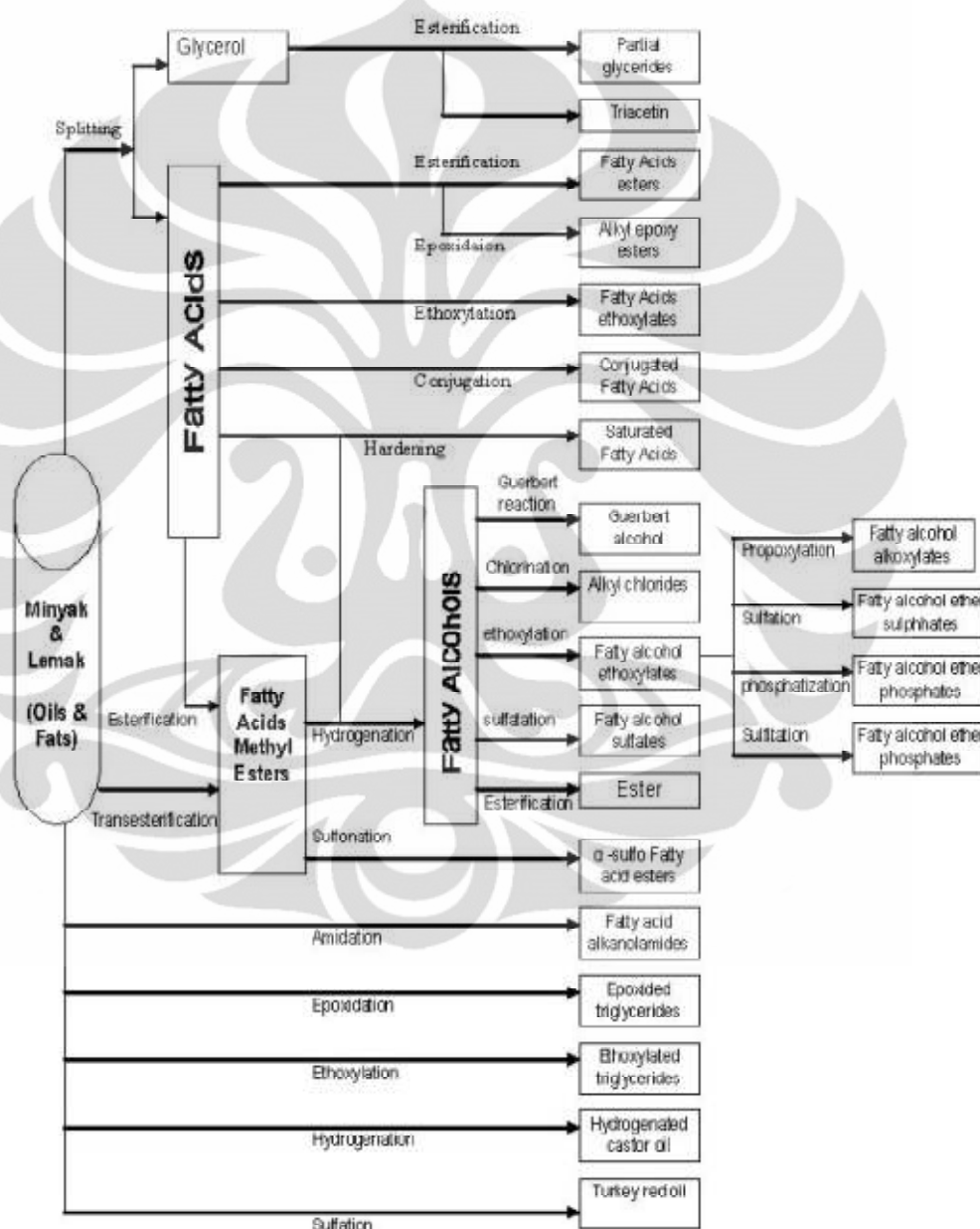
Ekspor minyak kelapa selama periode tahun 2003-2007 didominasi oleh empat negara, yaitu Filipina, Indonesia, Malaysia, dan Belanda. Keempat negara tersebut memberikan kontribusi ekspor minyak kelapa dunia sebesar 91,31% terhadap total ekspor dunia. Rata-rata volume ekspor minyak kelapa dari Philipina mencapai 1,05 juta ton per tahun, berkontribusi 48,90% serta merupakan negara eksportir minyak kelapa terbesar dunia. Indonesia menduduki posisi kedua dengan rata-rata volume ekspor minyak kelapa 0,57 juta ton per tahun, berkontribusi 26,37%. Urutan ketiga dan keempat adalah Malaysia dan Belanda dengan rata-rata volume ekspor masing-masing 0,19 juta ton per tahun dan 0,15 juta ton per tahun (Pusat Data dan Informasi Pertanian, Kementerian Pertanian, 2010).



Gambar 2.2. Negara Eksportir Minyak Kelapa di Dunia

Sumber: Anonim, Outlook Komoditas Pertanian Perkebunan

Minyak kelapa merupakan sumber utama asam lemak (terutama asam laurat) dan berbagai turunannya yang selanjutnya akan diproses lebih lanjut untuk menghasilkan produk yang bernilai ekonomis tinggi. Diagram berikut memperlihatkan berbagai proses untuk menghasilkan berbagai turunan produk asam lemak, kecuali proses epoksidasi dan sulfasi hanya digunakan pada minyak tak jenuh.



Gambar 2.3. Minyak atau Lemak Sebagai Bahan Dasar Industri Oleokimia Beserta Produk Turunannya

Sumber: Anonim, Peran Minyak Kelapa dalam Industri Oleokimia

2.2.1 Proses Pembuatan Minyak Kelapa

Secara garis besar, proses pembuatan minyak kelapa dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu:

- a. Minyak kelapa diekstrak dari daging kelapa segar, atau dikenal dengan proses basah. Untuk menghasilkan minyak dari proses ini, dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu:
 - Cara basah tradisional
 - Cara basah fermentasi
 - Cara basah sentrifugasi
 - Cara basah dengan penggorengan
- b. Minyak kelapa diekstrak dari daging buah kelapa yang telah dikeringkan yang disebut kopra. Proses ini dikenal dengan proses kering. Untuk menghasilkan minyak dari proses ini, dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu:
 - Ekstraksi cara mekanis (pres)
 - Ekstraksi dengan menggunakan pelarut (Anonim, Teknologi Proses Pengolahan Minyak Kelapa).

2.2.2 Standar Mutu Minyak Kelapa

Untuk keamanan konsumen, minyak yang dihasilkan dari berbagai proses pengolahan harus memenuhi persyaratan tertentu yang berkaitan dengan mutu minyak goreng. Berikut adalah standar mutu minyak goreng berdasarkan SNI-3741-1995:

Tabel 2.1. Standar Mutu Minyak Goreng Berdasarkan SNI - 3741- 1995

No	Kriteria	Persyaratan
1	Bau dan Rasa	Normal
2	Warna	Muda Jernih
3	Kadar Air	max 0,3%
4	Berat Jenis	0,900 g/liter
5	Asam lemak bebas	Max 0,3%
6	Bilangan Peroksida	Max 2 Meg/Kg
7	Bilangan Iod	45 - 46
8	Bilangan Penyabunan	196 - 206
9	Index Bias	1,448 - 1,450
10	Cemaran Logam	Max 0,1 mg/kg
		kecuali seng

Selain standar mutu SNI, terdapat juga penggolongan kelas mutu minyak kelapa berdasarkan rekomendasi APCC (2006) sebagai berikut:

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

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

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

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

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

Syarat mutu dari setiap kelas mutu (*grade*) minyak goreng di atas disajikan pada tabel dibawah ini:

Tabel 2.2. Standar Mutu Minyak Kelapa Berdasarkan APCC

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

Sumber: APCC, 2006

Pada Tabel 2.3 tertera sifat-sifat yang dimiliki oleh minyak kelapa:

Tabel 2.3. Sifat-sifat Minyak Kelapa

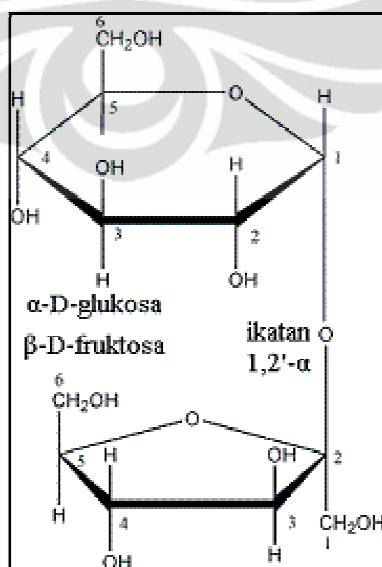
Sifat-sifat	Nilai pengukuran
Indeks refraksi pada 40°C	1448-1450
Bilangan penyabunan	250-264
Bilangan Iod	6,3-10,6
Titik lebur (°C)	23-26
Indeks Lemak Padat (%)	
Pada 10,0 °C	54,5
21,1 °C	26,6
26,7 °C	0,3
Komposisi asam lemak	
Kaprilat C8:0	7,6
Kaprat C10:0	7,3
Laurat C12:0	48,2
Miristat C14:0	16,6
Palmitat C16:0	8,0
Palmitoleat C16:1	1,0
Stearat C18:0	3,8
Oleat C18:1	5,0
Linoleat C18:2	2,5

*O'Brien (1998)

2.3 Sukrosa

Sukrosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$), atau yang biasa kita kenal sebagai gula pasir, merupakan jenis gula yang terdapat paling banyak di alam. Gula ini dapat diperoleh dari batang tebu, umbi bit, nira palem, nira pohon *maple*, dll. Sukrosa merupakan senyawa disakarida yang tersusun atas molekul glukosa dan fruktosa yang dipersatukan oleh suatu ikatan glikosida. Ikatan glikosida menghubungkan karbon ketal dan asetal dan bersifat β dari fruktosa dan α terhadap glukosa. Dalam sukrosa kedua atom karbon anomerik, baik yang ada pada glukosa maupun fruktosa, digunakan untuk membentuk ikatan glikosida. Dalam struktur sukrosa, baik glukosa maupun fruktosa yang menyusunnya tidak memiliki gugus hemiasetal, sehingga sukrosa di dalam air tidak berada pada keadaan kesetimbangan dengan suatu bentuk aldehid atau keto. Sukrosa tidak menunjukkan mutarotasi dan juga bukan merupakan gula pereduksi.

Sukrosa juga dikenal sebagai gula invert. Gula invert adalah campuran D-glukosa dan D-fruktosa yang diperoleh dari proses hidrolisis asam atau enzimatik dari sukrosa. Nama gula invert diturunkan dari inversi (pembalikan) tanda rotasi jenis bila sukrosa dihidrolisis. Sukrosa memiliki rotasi jenis $+66,5$, suatu rotasi positif. Sedangkan apabila dihidrolisis dan menghasilkan campuran glukosa ($[\alpha] = +52,7$) dan fruktosa ($[\alpha] = -92,4$) akan menghasilkan rotasi netto negatif. Berikut adalah struktur sukrosa:



Gambar 2.4. Struktur kimia sukrosa

Sumber: kimia-upi.edu

Universitas Indonesia

2.4 Enzim

Enzim merupakan suatu biomolekul yang memiliki kemampuan untuk mengkatalisis suatu reaksi kimia tanpa habis bereaksi. Hampir semua enzim merupakan protein. Enzim bekerja dengan cara menempel pada permukaan molekul-molekul zat-zat yang bereaksi untuk kemudian mempercepat proses reaksi. Secara lebih jelas, enzim bekerja dengan cara menurunkan energi aktivasi, yang dengan sendirinya akan mempermudah terjadinya reaksi, sehingga akan mempercepat jalannya reaksi. Aktivitas katalitik dari suatu enzim tergantung pada konformasi protein-protein penyusunnya. Jika suatu enzim terdenaturasi atau terdisosiasi menjadi subunitnya, maka aktivitas katalitiknya akan hilang. Jika suatu enzim terpecah menjadi komponen asam aminonya, maka aktivitas katalitiknya juga akan hilang. Oleh karena itu dapat dikatakan bahwa struktur primer, sekunder, tersier, dan kuartener dari protein-protein penyusun enzim memiliki peran esensial terhadap aktivitas katalitiknya.

Enzim memiliki berat molekul yang beragam, berkisar antara 12.000 sampai lebih dari satu juta. Beberapa enzim membutuhkan komponen kimia tambahan yang disebut kofaktor (baik satu atau lebih ion anorganik seperti Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , atau Zn^{2+}) atau koenzim (molekul organik atau organologam). Koenzim berfungsi sebagai pembawa sementara dari gugus fungsional yang berperan dalam aktivitas katalitik suatu enzim. Beberapa enzim membutuhkan keduanya, baik kofaktor maupun koenzim untuk aktivitas katalitiknya. Suatu koenzim atau ion logam yang terikat secara kuat atau memiliki ikatan kovalen terhadap protein enzim disebut sebagai gugus prostetik. Gugus prostetik ini sulit dilepas dari enzim tanpa merusak enzim yang bersangkutan. Suatu enzim yang komplisit bersama dengan koenzim dan/atau ion logam sehingga memiliki aktivitas katalitik disebut sebagai holoenzim, sedangkan komponen protein inaktif dari suatu enzim disebut apoenzim atau apoprotein.

2.4.1 Klasifikasi Enzim

Enzim diberi nama dengan menambahkan akhiran “-ase” pada nama substratnya atau pada suatu kata yang menggambarkan aktivitasnya, seperti urease

yang mengkatalisis reaksi hidrolisis urea dan DNA polimerase yang mengkatalisis reaksi polimerisasi nukleotida untuk membentuk DNA. Terdapat beberapa pengecualian terhadap enzim-enzim proteolitik yang diberi nama dengan akhiran “-in” seperti tripsin, renin, dan pepsin. Untuk menyeragamkan penamaan enzim, dibuatlah sistem penamaan enzim yang disetujui secara internasional.

Berdasarkan sistem ini, enzim dibagi menjadi enam kelas, kemudian dibagi lagi menjadi subkelas-subkelas berdasarkan tipe reaksi yang dikatalisis. Berikut adalah klasifikasi enzim secara internasional:

Tabel 2.4. Klasifikasi Enzim

Kelas Enzim	Tipe Reaksi
Oksidoreduktase	mengkatalisis reaksi redoks (transfer elektron atau proton)
Transferase	transfer atom atau gugus dari suatu substrat ke lainnya
Hidrolase	Reaksi hidrolisis
Liase	pelepasan gugus dari suatu substrat selain dengan cara hidrolisis, sering meninggalkan ikatan rangkap
Isomerase	reaksi isomerasi
Ligase	pembentukan ikatan baru yang disertai dengan pemutusan ATP atau nukleosida trifosfat lainnya

2.4.2 Kerja Enzim

Fungsi katalisis suatu enzim bagi kehidupan sangatlah penting. Pada kondisi biasa, suatu reaksi akan berjalan lambat tanpa enzim. Kerja suatu enzim bersifat spesifik terhadap reaksi yang dikatalisisnya. Sifat inilah yang membuat enzim menjadi sangat penting dan menarik untuk dipelajari. Beberapa enzim menunjukkan sifat spesifik absolut, yaitu hanya akan mengkatalisis satu jenis reaksi. Sedangkan enzim lainnya bersifat spesifik terhadap suatu tipe ikatan kimia ataupun gugus fungsi tertentu. Pada umumnya, terdapat empat tipe spesifisitas enzim, yaitu:

- Spesifik absolut: hanya akan mengkatalisis satu jenis reaksi saja

- Spesifik terhadap gugus fungsi: enzim hanya akan mengkatalisis / bereaksi terhadap molekul dengan gugus fungsi tertentu
- Spesifik terhadap ikatan: enzim akan mengkatalisis substrat dengan tipe ikatan kimia tertentu tanpa menghiraukan struktur molekulnya.
- Spesifik terhadap stereokimia tertentu

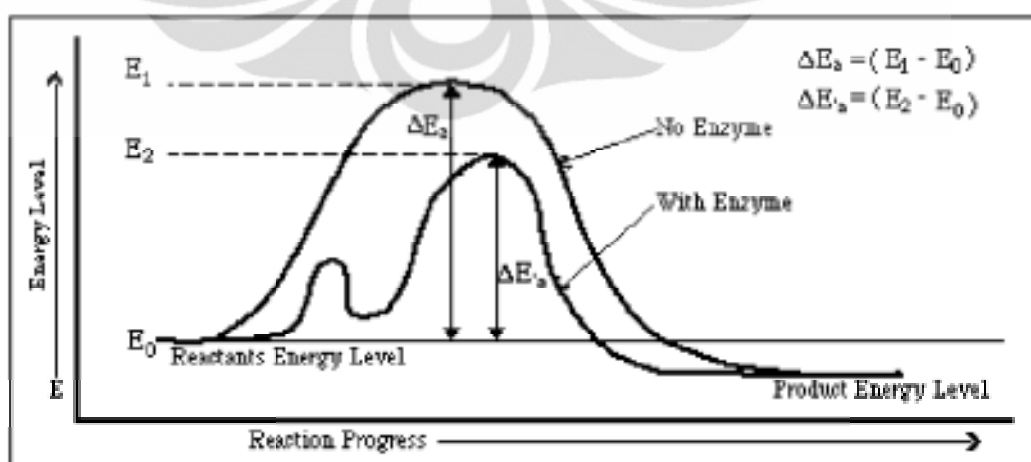
Secara sederhana reaksi yang dikatalisis oleh enzim dapat dituliskan dengan persamaan reaksi sebagai berikut:



Gambar 2.5. Persamaan Reaksi Enzimatis

E, S, dan P menggambarkan enzim, substrat, dan produk. ES dan EP merupakan kompleks enzim dengan substrat dan produk yang bersifat sementara.

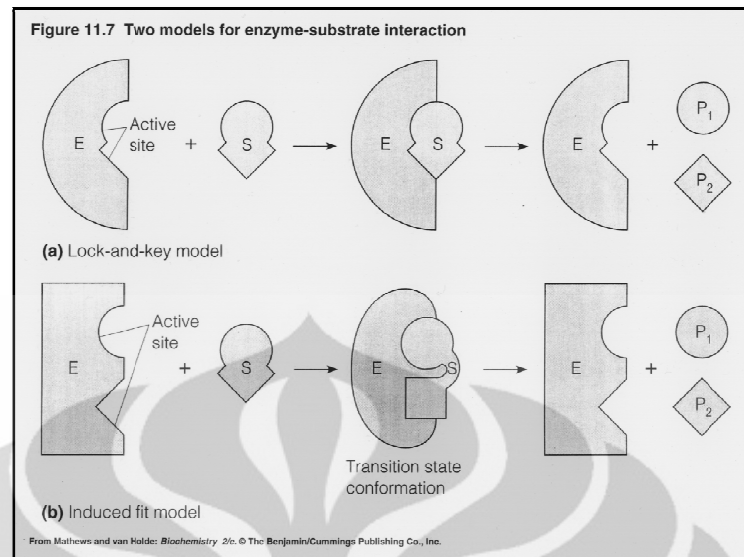
Berdasarkan reaksi di atas, dapat dilihat bahwa pada akhir reaksi enzim akan diperoleh kembali. Enzim bekerja dengan cara menempel pada permukaan molekul zat-zat yang bereaksi dan mempercepat proses reaksi. Percepatan terjadi karena enzim menurunkan energi pengaktifan yang dengan sendirinya akan mempermudah terjadinya reaksi. Berikut adalah ilustrasi yang menggambarkan fenomena tersebut:



Gambar 2.6. Penurunan Energi Aktivasi Oleh Enzim

Pada tahun 1984, seorang ilmuwan berkebangsaan Jerman bernama Emil Fisher menyatakan bahwa spesifisitas enzim berkaitan dengan struktur komplementer dari enzim dan substratnya. Substrat akan terikat pada bagian komplementer dari enzim seperti kunci dan gembok. Teori ini dikenal dengan teori *lock and key*. Substrat berperan sebagai kunci yang masuk ke dalam sisi aktif enzim yang berperan sebagai gemboknya, sehingga terbentuklah kompleks enzim-substrat. Pada saat ikatan enzim-substrat terputus, produk hasil reaksi akan dilepaskan dan enzim akan kembali pada konfigurasi semula. Berdasarkan teori ini dapat dikatakan bahwa sisi aktif enzim cenderung bersifat kaku dan hanya dapat berikatan dengan substrat yang sesuai.

Hipotesis *lock and key* hanya dapat menerangkan spesifisitas enzim tetapi tidak memperhatikan fleksibilitas molekul protein dari enzimnya. Data sinar-x dan spektroskopi lainnya menunjukkan bahwa terdapat perbedaan konformasi antara enzim bebas dengan enzim yang mengikat substrat. Perubahan ini terjadi pada struktur tiga dimensi tetapi tidak pada struktur primernya. Pada tahun 1958, Kohsland menyempurnakan model yang dibuat oleh Fisher, dengan hipotesisnya yaitu hipotesis *induced fit*. Hipotesis ini menjelaskan bahwa struktur dari substrat merupakan komplemen dari sisi aktif suatu kompleks enzim-substrat, tetapi bukan pada enzim bebas. Perubahan konformasi akan terjadi pada enzim selama mengikat substrat sehingga terbentuk struktur yang sesuai. Hipotesis ini membutuhkan sisi aktif enzim yang bersifat fleksibel sedang substratnya dianggap rigid. Berikut adalah gambaran dari kedua hipotesis di atas:



Gambar 2.7. Hipotesis Kerja Enzim

Sumber: Mathew and Holde

Dalam melakukan aktivitasnya sebagai katalis, enzim harus berada pada kondisi yang sesuai yang dibutuhkannya, sehingga kerja enzim menjadi optimal. Terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas katalisis enzim, di antaranya:

1. Temperatur

Seperti kebanyakan reaksi kimia, kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim akan meningkat seiring dengan meningkatnya temperatur, karena kenaikan temperatur akan meningkatkan energi kinetik molekul-molekul. Namun jika dikaitkan dengan struktur enzim yang berupa protein, maka ada batas temperatur yang memungkinkan struktur enzim tetap terjaga yaitu pada temperatur optimumnya. Di atas temperatur optimumnya, struktur enzim akan terganggu bahkan dapat rusak (terdenaturasi), sehingga enzim akan kehilangan aktivitas katalitiknya. Enzim yang berbeda memiliki temperatur optimum yang berbeda pula.

2. pH (Tingkat Keasaman)

Kerja suatu enzim juga dipengaruhi oleh pH. Terdapat pH pada saat aktivitas enzim paling optimal yaitu pada pH optimumnya. Di atas maupun di bawah pH optimumnya aktivitas enzim akan lebih rendah. Kondisi pH yang ekstrim, terlalu asam atau terlalu basa biasanya akan menyebabkan

kebanyakan enzim kehilangan aktivitas katalitiknya. Setiap enzim memiliki pH optimum yang berbeda-beda.

3. Aktivator dan Inhibitor

Aktivator adalah suatu zat yang memiliki kemampuan untuk mengaktifkan dan meningkatkan kerja enzim, sedangkan inhibitor adalah zat yang dapat menghambat kerja enzim. Inhibitor reversibel berikatan dengan enzim secara reversibel sehingga dapat dilepas kembali dengan proses dialisis atau dengan pengenceran sehingga akan diperoleh kembali aktivitas enzimnya. Inhibitor irreversibel berikatan kuat dengan enzim dan tidak dapat dilepaskan dengan cara dialisis. Biasanya ikatan yang terjadi antara inhibitor irreversibel dengan enzim adalah ikatan kovalen.

Terdapat tiga tipe inhibitor yang termasuk ke dalam inhibitor reversibel, yaitu inhibitor kompetitif, non-kompetitif, dan inhibitor unkompetitif.

Inhibitor kompetitif adalah inhibitor yang bersaing dengan substrat untuk berikatan dengan sisi aktif enzim. Biasanya inhibitor kompetitif memiliki struktur yang mirip dengan substrat. Ketika inhibitor yang lebih dulu berikatan dengan sisi aktif enzim, maka reaksi akan berlangsung lambat karena sebagian sisi aktif enzim telah berikatan dengan inhibitor.

Inhibitor non-kompetitif adalah inhibitor yang berikatan dengan sisi lain dari enzim (selain sisi aktif) namun pada akhirnya nanti akan mengubah konformasi dari sisi aktif enzim, sehingga substrat tidak dapat berikatan dengan sisi aktif enzim.

Inhibitor unkompetitif adalah inhibitor yang berikatan dengan kompleks enzim-substrat dan tidak dengan enzim bebas. Pengikatan substrat dapat menyebabkan perubahan konformasi enzim yang memungkinkan terjadinya pengikatan inhibitor.

4. Konsentrasi Enzim

Konsentrasi enzim berbanding lurus dengan kecepatan reaksi. Semakin tinggi konsentrasi enzim maka kecepatan reaksi enzimatik juga akan meningkat.

5. Konsentrasi Substrat

Jika konsentrasi enzim dibuat tetap, dan konsentrasi substrat secara perlahan ditingkatkan, maka kecepatan reaksi akan meningkat sampai tercapainya titik maksimum. Setelah titik ini tercapai, peningkatan konsentrasi substrat tidak akan lagi meningkatkan kecepatan reaksi. Hal ini disebabkan semua sisi aktif enzim sudah berikatan dengan substrat membentuk kompleks enzim-sustrat ES sehingga penambahan substrat tidak akan mempengaruhi kecepatan reaksi. Konsentrasi substrat yang berlebihan juga dapat menyebabkan inhibisi, yang disebut dengan inhibisi substrat. Inhibisi jenis ini terjadi jika satu molekul substrat terikat pada sisi yang berbeda pada enzim membentuk kompleks “dead-end”. Pola inhibisi ini mirip dengan inhibisi unkompetitif.

2.5 Lipase

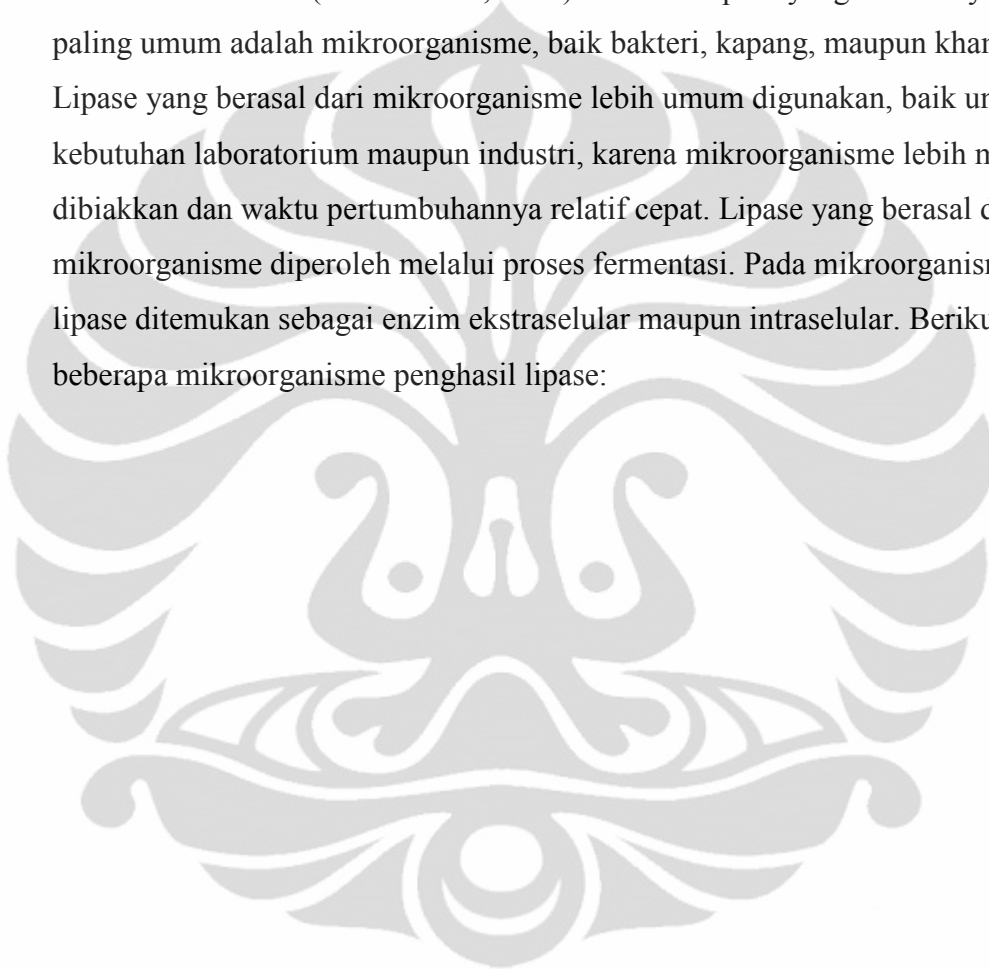
Lipase (EC.3.1.1.3, triasilgliserol hidrolase) adalah enzim yang dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis lemak hewani dan minyak nabati secara reversibel di bawah kondisi alami. Hasil hidrolisis ini adalah asam lemak dan gliserol. Ketertarikan terhadap lipase semakin meningkat karena lipase dapat digunakan pada *range* substrat yang luas, serta memiliki kestabilan yang tinggi terhadap temperatur, pH, dan pelarut organik. Selain itu lipase juga memiliki kemo-, regio-, dan enansioselektifitas yang tinggi. Lipase tersebar secara luas baik pada hewan, tumbuhan, maupun mikroorganisme dan memiliki aktivitas yang tinggi pada substrat yang bersifat non polar. Kerja lipase berada pada antar muka (*interface*) air-minyak karena lipase mengalami aktivasi interfisial (ÖZTÜRK, 2001).

2.5.1 Sumber Lipase

Lipase terdistribusi secara luas dan dapat diperoleh dari hewan, mikroorganisme, dan tumbuhan. Lipase yang berasal dari hewan dapat ditemukan di organ pankreas. Enzim ini memecah trigliserida, minyak, lemak, ester asam lemak sederhana, serta aril ester. Lipase yang berasal dari hewan cenderung

mengkatalisis reaksi hidrolisis trigliserida dengan rantai asam lemak lebih dari 12 atom karbon terutama pada posisi C-1 dari gliserol (ÖZTÜRK, 2001)..

Sumber lipase yang kedua adalah tumbuhan. Beberapa studi telah berhasil mengisolasi lipase ekstrak kasar dari lobak, biji jarak, dll melalui proses ekstraksi dengan aseton atau larutan buffer (ÖZTÜRK, 2001). Lipase juga telah berhasil diekstrak dari beras (Prabhu et al., 1999). Sumber lipase yang lain dan yang paling umum adalah mikroorganisme, baik bakteri, kapang, maupun khamir. Lipase yang berasal dari mikroorganisme lebih umum digunakan, baik untuk kebutuhan laboratorium maupun industri, karena mikroorganisme lebih mudah dibiakkan dan waktu pertumbuhannya relatif cepat. Lipase yang berasal dari mikroorganisme diperoleh melalui proses fermentasi. Pada mikroorganisme, lipase ditemukan sebagai enzim ekstraselular maupun intraselular. Berikut adalah beberapa mikroorganisme penghasil lipase:



Tabel 2.5. Mikroorganisme Penghasil Lipase

Bakteri	Khamir	Kapang
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Rhizopus chinensis</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida utilis</i>	<i>Rhizopus homothallicus</i>
<i>Staphylococcus caseolyticus</i>	<i>Candida rugosa</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Candida cylindracea</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
<i>Burkholderia multivorans</i>	<i>Candida</i> sp.	<i>Penicillium restrictum</i>
<i>Serratia rubidaea</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Williopsis californica</i>	<i>Geotrichum</i> sp.
<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Geotrichum candidum</i>
<i>Micrococcus caseolyticus</i>		<i>Aspergillus carneus</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		<i>Rhizopus</i> sp.
<i>Pseudomonas fragi</i>		<i>Aspergillus niger</i>
<i>Streptococcus faecalis</i>		<i>Rhizopus oryzae</i>
		<i>Colletotrichum gloesporioides</i>

Sumber: Helen Treichel et al, A Review on Microbial Lipase Production, 2009.

2.5.2 Klasifikasi Lipase

Keunggulan reaksi enzimatik dibandingkan reaksi kimia biasa adalah spesifisitasnya. Spesifisitas enzim adalah kemampuan suatu enzim untuk mendiskriminasi substrat-substratnya berdasarkan perbedaan afinitas substrat dalam mencapai sisi aktif enzim, membentuk kompleks enzim-substrat, dan akhirnya membentuk produk. Spesifisitas suatu enzim merupakan ciri khas yang berkaitan dengan struktur tiga dimensi yang dimiliki oleh enzim tersebut. Spesifisitas lipase terhadap substrat dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

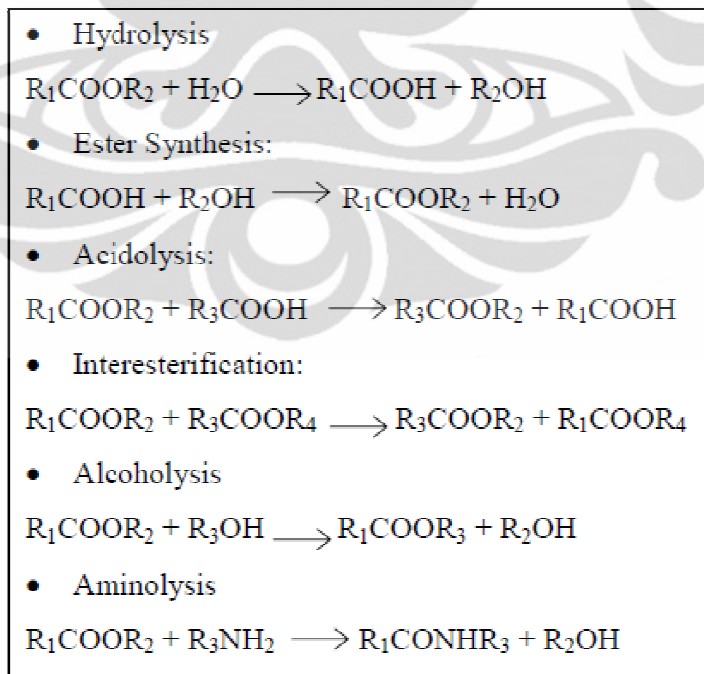
- Spesifisitas jenis lipid
Spesifisitas jenis lipid adalah kemampuan lipase untuk bereaksi dengan jenis lipid tertentu. Sebagai contoh, lipase asal pankreas memiliki tingkat hidrolisis terhadap triasilgliserol lebih tinggi dibandingkan diasilgliserol dan monoasilgliserol.
- Spesifisitas Posisi
Spesifisitas posisi adalah kemampuan lipase untuk menghidrolisis ikatan ester pada triasilgliserol pada posisi primer (sn-1 dan sn-3) atau posisi sekunder (sn-2). Produk reaksi yang dihasilkan tidak hanya asam lemak bebas dan gliserol, melainkan juga monogliserida dan digliserida. Selain itu, terdapat lipase yang tidak memiliki spesifisitas khusus dalam pemecahan trigliserida. Kelompok ini disebut sebagai lipase non-spesifik. Lipase jenis ini akan melepaskan asam lemak dari ketiga posisi gliserol. Hasil dari reaksi yang dikatalisis oleh lipase non-spesifik adalah asam lemak bebas dan gliserol. Contoh dari lipase tipe ini adalah lipase yang diperoleh dari *Candida rugosa*, *Corynebacterium acnes*, *Chromobacterium spp.* dan *Staphylococcus aureus*
- Spesifisitas asam lemak
Spesifisitas jenis ini berdasarkan pada panjang rantai dan/atau derajat ketidakjenuhan asam lemak. Yang termasuk dalam golongan ini adalah lipase yang secara spesifik menghidrolisis asam lemak tertentu dari trigliserida. Contohnya lipase yang berasal dari *Penicillium cyclopium* spesifik terhadap asam lemak rantai panjang.

- Spesifisitas alkohol

Spesifisitas alkohol berhubungan dengan reaksi sintesis ester karena setiap lipase memiliki perbedaan dalam aktivitas esterifikasinya terhadap jenis alkohol.

2.5.3 Reaksi yang Dikatalisis oleh Lipase

Lipase telah lama digunakan sebagai biokatalis pada berbagai reaksi. Tidak seperti enzim hidrofilik, lipase yang berasal dari berbagai sumber memiliki kestabilan pada pelarut organik non-polar dan dapat bekerja pada *range* substrat yang luas. Protein “*backbone*” yang fleksibel menyebabkan lipase memiliki stereokimia yang kompleks, sehingga lipase memiliki kemampuan untuk mengkatalisis berbagai reaksi seperti hidrolisis, esterifikasi, transesterifikasi (asidolisis, interesterifikasi, alkoholisis), dan aminolisis (ÖZTÜRK, 2001). Keseimbangan antara reaksi hidrolisis dengan reaksi kebalikannya yaitu esterifikasi dikontrol dengan banyaknya air yang digunakan dalam reaksi. Berikut adalah gambaran reaksi yang dikatalisis oleh lipase:



Gambar 2.8. Reaksi yang Dikatalisis oleh Lipase

Sumber: Banu ÖZTÜRK, 2001

2.5.4 Aplikasi Lipase

Pemanfaatan enzim lipase di dalam industri pangan maupun non pangan semakin meningkat. Pada industri pangan, lipase banyak digunakan dalam industri susu (hidrolisis lemak susu), industri roti dan kue (meningkatkan aroma dan memperpanjang umur simpan), industri bir (meningkatkan aroma dan mempercepat fermentasi), industri bumbu (meningkatkan kualitas/tekstur), serta pengolahan daging dan ikan (meningkatkan aroma dan mengubah lemak).

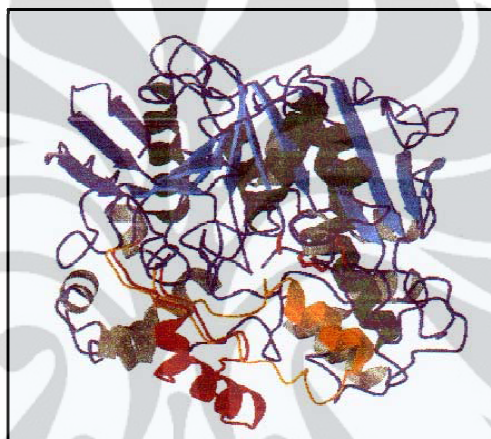
Sedangkan pada industri non pangan, lipase digunakan pada industri kimia dan obat-obatan (transesterifikasi minyak alami), industri oleokimia (hidrolisis lemak/minyak), industri detergen (melarutkan spot minyak/lemak), industri obat-obatan (mempermudah daya cerna minyak/lemak dalam pangan), kedokteran (analisis trigliserida dalam darah), industri kosmetik (mengubah lemak), dan industri kulit (mengubah lemak dalam jaringan lemak). Pemanfaatan lipase pada industri lemak dan minyak untuk mengubah bentuk fisik dan kimia minyak dan lemak alami menjadi produk yang bernilai tambah lebih tinggi.

Selain aplikasi diatas, lipase juga banyak diaplikasikan untuk mengkatalisis reaksi esterifikasi antara karbohidrat dengan asam lemak untuk menghasilkan ester asam lemak sukrosa. Lipase yang berasal dari *Candida antarctica* digunakan sebagai katalis dalam reaksi esterifikasi antara glukosa dan asam stearat dengan persen konversi diatas 25% (Jiugao Yu, 2007). Lipase yang berasal dari *Candida rugosa* juga telah digunakan untuk mensintesis ester fruktosa dari fruktosa dan fraksi asam olet yang terdapat pada biji buah mangga (Patravale, 2009). Ester asam lemak karbohidrat juga telah berhasil disintesis dengan mereaksikan berbagai karbohidrat seperti xilitol, fruktosa, sukrosa, sorbitol, glukosa, dan metil glukosida dengan asam oleat dengan bantuan lipase *Candida antarctica* sebagai katalis (In Sang Yoo, 2006).

2.6 Lipase *Candida rugosa*

Candida rugosa adalah salah satu spesies kapang dari genus *Candida* yang memiliki 154 spesies. *Candida rugosa* adalah mikrofungi yang berbentuk bola dan memiliki banyak manfaat dibandingkan dengan bahayanya. *Candida rugosa*

merupakan salah satu mikroorganisme yang dapat menghasilkan lipase. Lipase yang berasal dari jenis khamir ini merupakan non-spesifik lipase dengan massa molekul sekitar 120.000, memiliki titik isoelektrik pada pH 4,5 serta pH optimum antara 6,5 sampai 7,5 (Petersen et al., 2001). Lipase ini dapat menghidrolisis minyak zaitun dengan *yield* mencapai 95-97 %. Lipase ini juga memiliki karakteristik spesifik terhadap asam lemak oleat > laurat > palmitat > miristat > stearat (Banu ÖZTÜRK, 2001). Berikut adalah gambaran tiga dimensi dari lipase *Candida rugosa*:



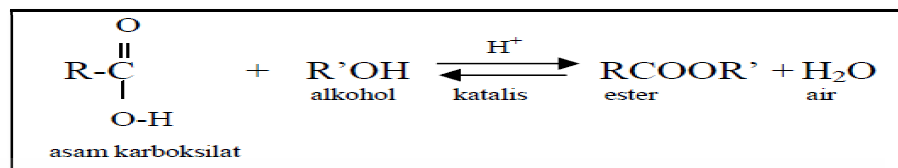
Gambar 2.9. Struktur Tiga Dimensi dari Enzim Lipase *Candida rugosa*

Sumber: Banu ÖZTÜRK, 2001

2.7 Esterifikasi

Ester adalah turunan dari asam karboksilat dimana gugus hidroksi (-OH) dari asam karboksilat digantikan oleh gugus alkoksi (-OR). Reaksi pembentukan suatu ester disebut sebagai reaksi esterifikasi. Reaksi ini berlangsung antara asam karboksilat dengan alkohol. Bila dilakukan tanpa katalis, maka reaksi ini akan berjalan sangat lambat. Biasanya digunakan katalis asam kuat seperti H_2SO_4 . Reaksi esterifikasi yang berkataliskan asam merupakan reaksi yang reversibel, sehingga untuk memperoleh hasil yang tinggi, kesetimbangan harus bergeser ke arah produk. Menurut prinsip Le Chatelier, penambahan salah satu reaktan secara berlebihan pada sistem kesetimbangan menyebabkan pergeseran reaksi yang mengarah ke pembentukan produk. Selain dengan katalis asam, reaksi ini juga

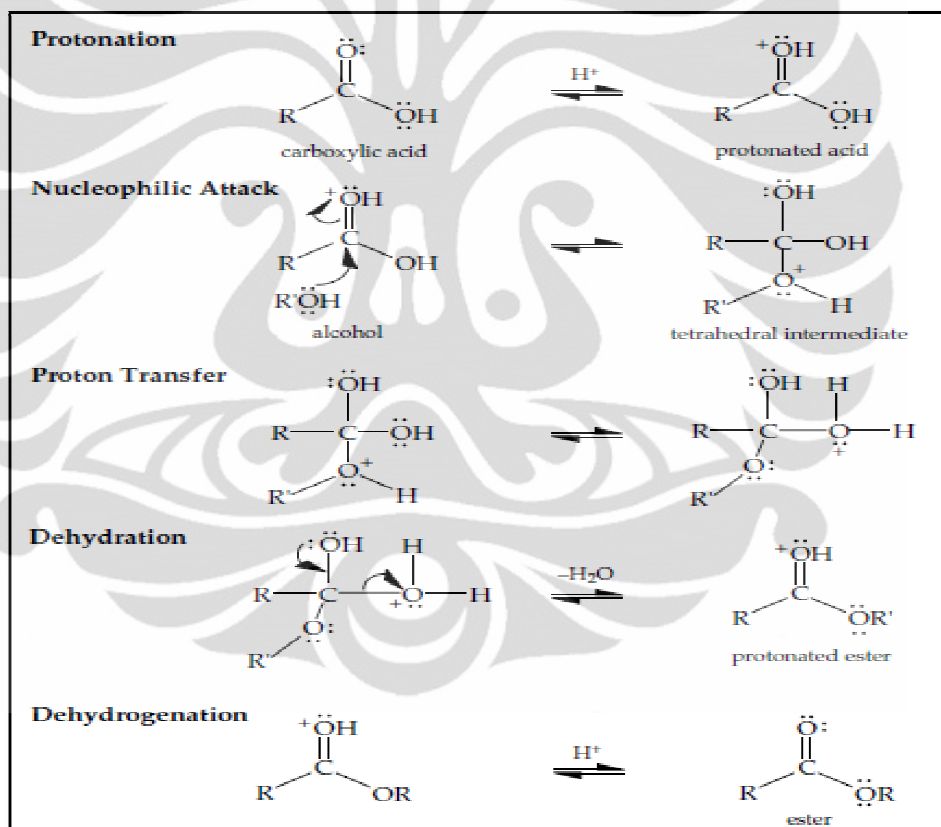
dapat berlangsung dengan bantuan enzim sebagai katalis. Berikut adalah gambaran reaksi esterifikasi:



Gambar 2.10. Persamaan Reaksi Esterifikasi

Sumber: Anonim

mekanisme dari reaksi esterifikasi yang dibantu oleh katalis asam adalah sebagai berikut:



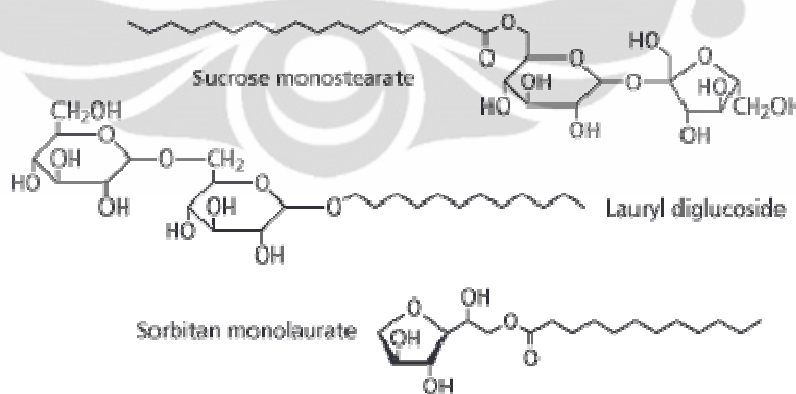
Gambar 2.11. Mekanisme Reaksi Esterifikasi Berkatalis Asam

Sumber: Ronald J Wikhlom, Preparing Isopentyl Acetate by Fisher Esterification, 1998.

2.8 Ester Asam Lemak Sukrosa

Ester asam lemak sukrosa merupakan molekul sintetik berupa ester non-ionik yang diperoleh dari hasil esterifikasi antara sukrosa dengan asam lemak. Ester asam lemak sukrosa memiliki banyak kegunaan bergantung pada derajat substitusinya. Ester sukrosa dengan derajat substitusi (DS) 1-3 dapat digunakan sebagai *emulsifier* non-ionik karena memiliki karakteristik *emulsifying*, *solubilizing*, dan *foaming* yang baik. Karena berasal dari bahan alami yaitu sukrosa dan asam lemak, *emulsifier* memiliki sifat *biodegradable* yang baik dan ramah lingkungan, tidak toksik, tidak menyebabkan iritasi kulit, tidak berbau, dan tidak berasa. Ester sukrosa dapat diaplikasikan secara luas dalam bidang industri, di antaranya industri makanan, kosmetik, detergen, dll (Rakmi, 2000).

Ester asam lemak sukrosa dengan derajat substitusi tinggi (lebih dari empat) biasa disebut sebagai poliester sukrosa dan dapat digunakan sebagai *fat replacer*. Senyawa ini bersifat lipofilik, serta tidak dapat dicerna dan diserap oleh tubuh. Ketika empat atau lebih asam lemak yang diesterifikasi ke sukrosa, poliester sukrosa bertindak sebagai lemak dan memiliki sifat fisik dan organoleptik yang sama dengan lemak konvensional tetapi poliester sukrosa tidak menyumbangkan kalori yang signifikan. Berikut adalah contoh ester sukrosa dan karbohidrat monoester lainnya:



Gambar 2.12. Karbohidrat monoester

Sumber: www.rsc.org

2.9 *Emulsifier*

Emulsi merupakan suatu sistem dispersi cairan dalam cairan Terdapat dua macam bentuk emulsi, yaitu emulsi air dalam minyak atau emulsi *water in oil* (w/o) dan emulsi minyak dalam air atau emulsi *oil in water* (o/w). Untuk menstabilkan sistem emulsi biasanya ditambahkan *emulsifier*.

Emulsifier merupakan suatu senyawa aktif penurun tegangan permukaan (*surface active agent*) yang sekaligus memiliki gugus hidrofilik dan gugus hidrofobik dalam satu struktur molekul yang sama. Senyawa ini dapat menurunkan tegangan antarmuka antara dua fasa cairan yang berbeda kepolarannya seperti minyak/air atau air/minyak. Sifat yang unik tersebut, menyebabkan emulsifier sangat potensial digunakan sebagai komponen bahan adhesif, penggumpal, pembasah, pembusa, dan pengemulsi. Bahan ini telah diaplikasikan secara luas pada berbagai bidang industri proses yang menggunakan sistem multifasa seperti pada industri makanan, farmasi, kosmetika, tekstil, polimer, cat, detergen dan agrokimia.

Daya kerja *emulsifier* terutama disebabkan oleh bentuk molekulnya yang dapat terikat baik pada minyak maupun air. Bila *emulsifier* tersebut lebih terikat pada air atau lebih larut dalam air (polar) maka dapat lebih membantu terjadinya dispersi minyak dalam air sehingga terjadilah emulsi minyak dalam air (o/w), contoh : susu. Bila emulsifier lebih larut dalam minyak (nonpolar) terjadilah emulsi air dalam minyak (w/o), contoh margarin, dan mentega.

2.10 FT-IR

Spektroskopi infra merah adalah salah satu teknik spektroskopi yang banyak digunakan untuk analisis suatu senyawa. Hampir setiap senyawa yang memiliki ikatan kovalen, baik itu senyawa organik maupun anorganik, akan menyerap frekuensi radiasi elektromagnetik dalam daerah spektrum infra merah. Tujuan utama dari spektroskopi ini adalah untuk menentukan gugus fungsi yang ada pada suatu senyawa, karena setiap gugus fungsi memiliki karakteristik frekuensi infra merah yang berbeda-beda. Daerah spektrum elektronik infra merah terletak antara 13.000 sampai 10 cm^{-1} , atau antara $0,78$ sampai $1000\ \mu\text{m}$.

Seperti halnya tipe penyerapan energi yang lain, pada proses penyerapan energi infra merah oleh suatu molekul, molekul tersebut akan mengalami eksitasi ke tingkatan energi yang lebih tinggi bila mereka menyerap radiasi infra merah. Penyerapan radiasi infra merah merupakan proses kuantisasi. Hanya frekuensi dengan energi tertentu yang sesuai yang akan diserap oleh molekul. Radiasi dalam kisaran energi infra merah sesuai dengan kisaran frekuensi vibrasi rentangan (*stretching*) dan bengkokan (*bending*) dari ikatan kovalen dalam kebanyakan molekul.

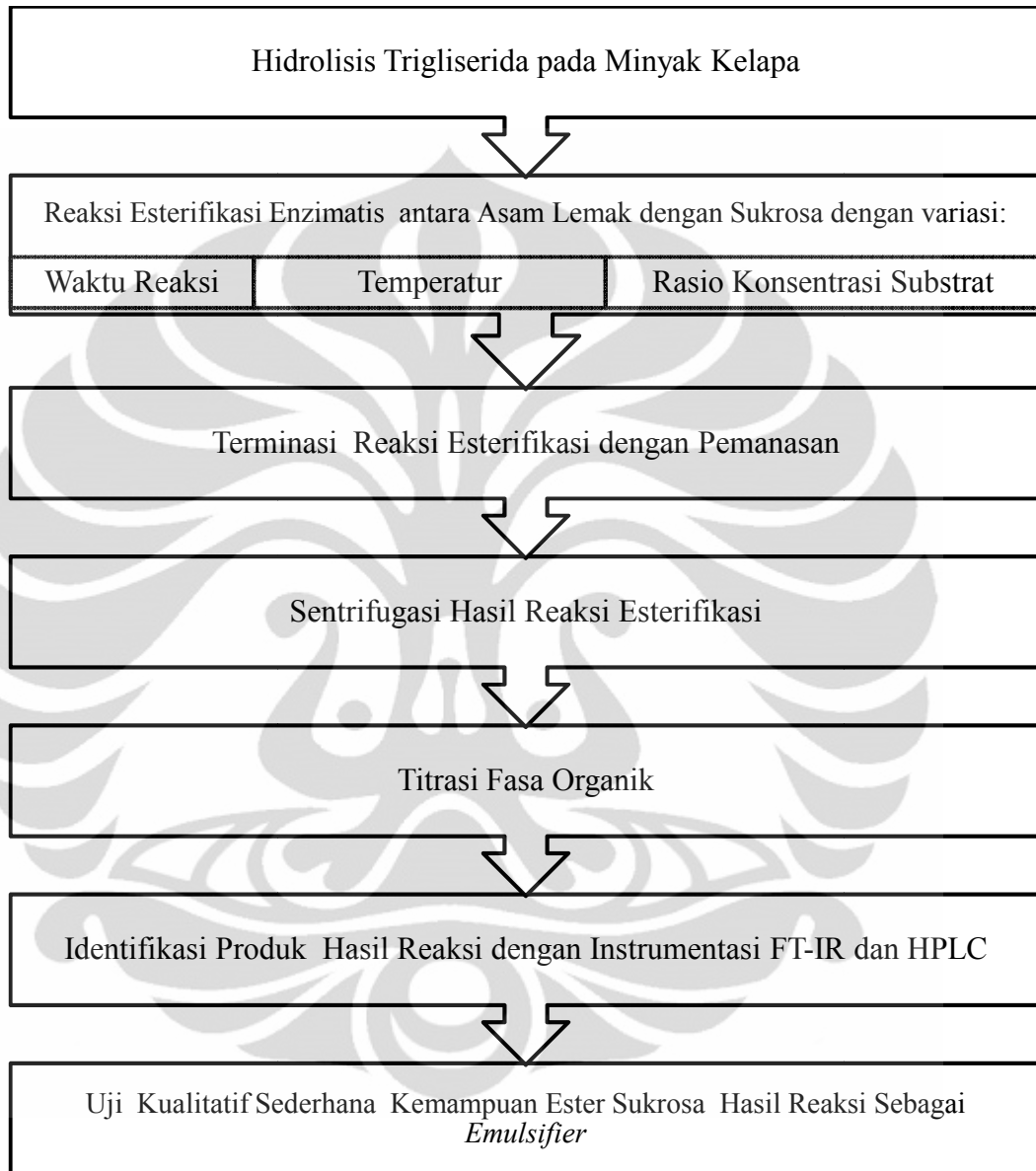


BAB 3

METODE PENELITIAN

Secara umum, penelitian ini terdiri atas beberapa tahapan, yaitu tahap preparasi alat dan bahan penelitian, hidrolisis minyak kelapa, sintesis ester asam lemak sukrosa, optimasi reaksi esterifikasi antara sukrosa dengan asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa dengan bantuan enzim lipase sebagai katalis, serta uji kualitatif sederhana kemampuan ester sukrosa yang dihasilkan sebagai *emulsifier*. Optimasi reaksi esterifikasi dilakukan pada beberapa variabel yaitu optimasi waktu reaksi, temperatur, serta perbandingan mol antara sukrosa dengan asam lemak. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

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



Bagan Kerja Secara Umum

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Pada penelitian ini, alat-alat yang digunakan meliputi alat-alat gelas yang digunakan di Laboratorium Biokimia seperti *beaker glass*, labu ukur, batang pengaduk, botol timbang, corong biasa, corong pisah, gelas ukur, pipet tetes, pipet ukur, pipet gondok, erlenmeyer, buret, labu bulat leher tiga, termometer, piknometer, tabung reaksi, dan tabung *centrifuge*. Selain itu juga digunakan spatula, *bulp*, neraca analitis, pH meter, *hot plate stirrer*, oven, serta *horizontal incubator shaker*, sedangkan instrumentasi yang digunakan adalah FT-IR.

3.1.2 Bahan

- Enzim

Enzim yang digunakan pada penelitian ini adalah lipase yang berasal dari *Candida rugosa* yang diperoleh dari Sigma-Aldrich dengan spesifikasi sebagai berikut:

- Bentuk fisik : padat
- Warna : kuning muda
- Aktivitas spesifik : 2,45 U/mg (1 U sesuai dengan banyaknya enzim yang menyebabkan penglepasan 1 Umol asam oleat dari triolein sebagai substrat per menit pada suhu 40°C dan pH 8)

- Minyak Kelapa

Minyak kelapa yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari salah satu supermarket yang berada di Kota Depok

- Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Laboratorium Biokimia Departemen Kimia FMIPA UI dan CV Dwinika. Bahan kimia yang digunakan adalah Sukrosa, KOH, etanol 95%, HCl 3N, aquades, n-heksana, Na₂SO₄ anhidrat, buffer fosfat pH 8, NaOH 0,5 N, serta indikator fenolftalein.

3.2 Prosedur Penelitian

3.2.1. Hidrolisis Trigliserida pada Minyak Kelapa

Hidrolisis trigliserida dilakukan untuk memperoleh asam lemak yang terdapat pada minyak kelapa. Hidrolisis trigliserida berkatalis basa dilakukan dengan cara sebagai berikut:

Sebanyak 20 g minyak kelapa dimasukkan ke dalam labu bulat leher tiga, kemudian ke dalam minyak ditambahkan 100 mL KOH 1M dalam alkohol 98%. Campuran ini kemudian dipanaskan dengan sistem refluks selama 1 jam pada suhu 62 ± 2 °C disertai pengadukan dengan *magnetic stirrer*.

Setelah dipanaskan, ke dalam campuran tersebut ditambahkan 50 mL aquades. Setelah itu, campuran ditambahkan 35 mL HCl 3N. Kemudian dilakukan pemisahan antara fasa organik yang merupakan asam lemak dengan fasa air. Fasa organik diekstraksi dengan 50 mL n-heksana sebanyak dua kali ekstraksi untuk menghilangkan fasa air yang masih tercampur dengan asam lemak. Selanjutnya ke dalam fasa organik ditambahkan 1 g Na_2SO_4 anhidrat. Setelah itu, larutan tersebut didekantasi untuk memisahkan padatan Na_2SO_4 . Selanjutnya pelarut n-heksana diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai filtrat yang dihasilkan pekat.

3.2.2 Sintesis Ester Asam Lemak Sukrosa

Mencampurkan sukrosa 0,1 M, asam lemak, serta n-heksana sebagai pelarut ke dalam erlenmeyer 100 mL. Perbandingan volume sukrosa dan asam lemak yang ditambahkan adalah 1:3 mL yang sebanding dengan 1:120 mmol. N-heksana yang dibutuhkan untuk reaksi adalah 1:1 terhadap volume substrat. Kemudian dilakukan inkubasi selama ± 10 menit dalam *horizontal incubator shaker* pada suhu reaksi yang dikehendaki. Setelah itu dilakukan penambahan enzim lipase *Candida rugosa* yang dilarutkan dalam buffer fosfat pH 8. Jumlah enzim yang ditambahkan adalah 5% dari berat total substrat. Setelah itu dilakukan

inkubasi kembali pada *horizontal incubator shaker* dengan kecepatan 200 rpm pada suhu dan waktu reaksi yang dibutuhkan.

Percobaan dilakukan secara triplo dengan menyertakan blangko sebagai faktor koreksi. Untuk mengetahui pengaruh waktu reaksi, temperatur, serta rasio asam lemak : sukrosa terhadap reaksi esterifikasi, dilakukan optimasi untuk variabel waktu reaksi yaitu pada 6, 12, 18, 24, 30, serta 36 jam, temperatur reaksi pada suhu 25, 30, 35, 40, serta 45 °C. Perbandingan konsentrasi antara asam lemak dengan sukrosa dilakukan dengan merubah jumlah asam lemak yang ditambahkan sedangkan sukrosa dibuat tetap. Variasi perbandingan mmol sukrosa dengan asam lemak adalah 1:16, 1:40, 1:80, dan 1:120.

3.2.3 Terminasi Reaksi Esterifikasi

Penghentian reaksi dilakukan dengan merendam erlenmeyer dalam penangas air pada suhu ± 80 °C untuk menonaktifkan lipase *Candida rugosa*.

3.2.4 Sentrifugasi Hasil Reaksi Esterifikasi

Proses sentrifugasi dilakukan untuk merusak emulsi yang dihasilkan dari reaksi esterifikasi. Proses ini dilakukan dengan kecepatan 3400 rpm selama 15 menit. Setelah dilakukan proses sentrifugasi hasil reaksi akan terpisah menjadi tiga fasa. Fasa organik yang berupa asam lemak yang terlarut dalam n-heksana lalu dipisahkan.

3.2.5 Titrasi Fasa Organik

Proses titrasi diperlukan untuk penentuan persentase *yield*. Titrasi dilakukan pada fasa organik yang merupakan asam lemak sisa yang terlarut dalam n-heksana. Fasa organik yang sudah terpisah melalui proses sentrifugasi kemudian dipipet dan dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL

dan volumenya ditepatkan dengan menambahkan n-heksana. Sebanyak 1 mL aliquot kemudian dititrasi dengan NaOH 0,5 N dengan menggunakan fenolftalein sebagai indikator titik akhir titrasi. Titrasi dilakukan sebanyak dua kali, baik terhadap blangko maupun sampel.

3.2.6 Identifikasi Produk

Identifikasi produk dilakukan dengan menggunakan instrumentasi FT-IR dan HPLC. Identifikasi dengan FT-IR dilakukan terhadap produk, sukrosa, asam lemak hasil hidrolisis, serta standar ester sukrosa yaitu *ryoto sugar*. Sebelum dilakukan pengukuran FT-IR, produk hasil reaksi terlebih dulu dikeringkan di oven pada suhu 60 °C. Produk dan sukrosa yang berbentuk padat kemudian dibuat pellet dengan mencampurkannya dengan kalium bromida lalu dilakukan pengukuran FT-IR. Untuk asam lemak yang berbentuk cair pada suhu ruang, pengukuran dilakukan dengan membuat lapisan tipis asam lemak di antara lempeng NaCl.

Analisis dengan HPLC dilakukan menggunakan fasa diam kolom C18, fasa gerak campuran metanol dan air dengan perbandingan 7:1 dan laju alir 1,1 mL/menit, detektor RID (Refractive Index Detector), serta temperatur kolom 40 °C (Cruces, et al, 2001). Analisis dilakukan terhadap ester sukrosa hasil sintesis dan standar ester sukrosa, yaitu *ryoto sugar*.

3.2.7 Uji Sederhana Kemampuan Ester Sukrosa Hasil Sintesis sebagai *Emulsifier*

Uji ini dilakukan dengan mencampurkan sejumlah air dengan minyak, lalu dilakukan penambahan ester sukrosa hasil sintesis sambil terus dikocok dan melihat perubahan yang terjadi. Apabila terbentuk emulsi, dilakukan pengamatan terhadap kestabilan emulsi selama 24 jam.

3.2.8 Penentuan Jenis Emulsi dengan Menggunakan Mikroskop

Uji ini dilakukan untuk mengetahui jenis emulsi yang terbentuk pada tahapan 3.2.7 di atas. Uji dilakukan dengan meneteskan satu tetes emulsi pada kaca preparat, lalu dilakukan penambahan eosin sebagai zat pewarna. Setelah itu dilakukan pengamatan dengan mikroskop untuk mengetahui apakah emulsi yang terbentuk emulsi minyak dalam air (o/w) atau air dalam minyak (w/o).

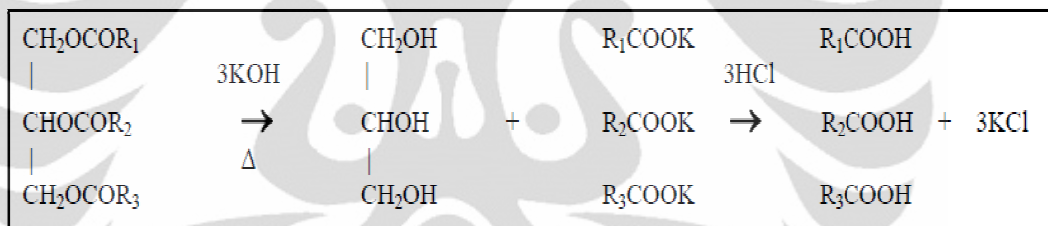


BAB 4 PEMBAHASAN

4.1 Hidrolisis Trigliserida

Trigliserida atau triasligliserol merupakan komponen utama penyusun lemak atau minyak. Trigliserida terdiri atas ester gliserol dan asam lemak. Proses hidrolisis ini bertujuan untuk memperoleh asam lemak yang selanjutnya akan digunakan untuk reaksi esterifikasi.

Pada proses hidrolisis ini digunakan katalis basa, yaitu KOH yang dilarutkan dalam etanol. Reaksi ini biasa disebut reaksi saponifikasi, karena pada prosesnya akan dihasilkan sabun atau ester asam lemak. Berikut adalah reaksi yang terjadi:



Gambar 4.1. Reaksi Hidrolisis Trigliserida

Sumber: Hasnisa binti Hashim dan Jumat Salimon, 2008

Apabila dibandingkan dengan NaOH, penggunaan KOH dalam reaksi saponifikasi lebih banyak digunakan karena kalium lebih reaktif dan lebih mudah membentuk garam asam lemak dibandingkan dengan natrium. Selain itu, garam kalium-asam karboksilat umumnya lebih larut dalam air dibandingkan dengan garam natrium. Kalium dan natrium merupakan unsur-unsur yang berada pada golongan yang sama dalam tabel periodik, yaitu pada golongan I (golongan alkali). Dalam satu golongan, kereaktifan unsur-unsur bertambah dari atas ke bawah, begitu juga dengan sifat elektropositif. Oleh karena itu, kecenderungan kalium untuk membentuk ion positif lebih besar dibandingkan dengan natrium, karena jari-jari atom kalium lebih besar daripada natrium. Semakin besar jari-jari atom, letak elektron valensi akan semakin jauh dari inti atom, sehingga lebih

mudah untuk lepas dan membentuk ion positif. Hal ini juga dapat dilihat dari besarnya energi ionisasi pertama kedua unsur ini, yaitu 496 kJ/mol untuk Na dan 419 kJ/mol untuk K.

Jika dilihat dari segi kekuatan kebasaaan hidroksida, sifat kebasaaan hidroksida unsur-unsur golongan alkali bertambah dari atas ke bawah, sehingga sifat basa KOH lebih kuat daripada NaOH. Dalam proses pembuatan sabun, KOH lebih banyak digunakan karena kestabilan KOH yang baik dan sabun yang dihasilkan lebih lembut dibandingkan jika menggunakan NaOH.

KOH yang digunakan dalam proses ini dilarutkan dalam etanol 95%. Fungsi dari etanol adalah sebagai medium perantara yang menjembatani antara trigliserida yang bersifat non polar dengan KOH yang bersifat polar, sehingga terjadi kontak antara KOH dengan trigliserida. Hal ini dilakukan karena tingkat kepolaran etanol berada di antara trigliserida dan KOH. Basa alkali, dengan kehadiran etanol sebagai pelarut, dapat memutus ikatan-ikatan trigliserida dan membentuk asam lemak dalam waktu yang lebih singkat dibandingkan dengan jika menggunakan basa alkali yang terlarut dalam air. KOH dalam etanol akan membentuk kalium etoksida yang berfungsi sebagai katalis sedangkan KOH dalam air hanya membentuk ion K^+ dan OH^- (Hashim, 2008).

Garam kalium-asam lemak yang terbentuk kemudian dikonversi ke bentuk asamnya dengan menambahkan asam klorida berlebih. Pada proses ini dihasilkan dua lapisan, dengan lapisan atas merupakan asam lemak. Selanjutnya dilakukan proses ekstraksi dengan heksana untuk menarik asam lemak dari fasa air. Untuk memperoleh asam lemak yang murni, heksana diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai dihasilkan filtrat asam lemak yang kental. Asam lemak dari minyak kelapa yang dihasilkan berbentuk cairan berwarna bening. Pada suhu kamar, asam lemak minyak kelapa tetap berada pada bentuk cairnya, hal ini disebabkan oleh komposisi asam lemak minyak kelapa yang sebagian besar terdiri dari asam lemak rantai sedang.



Gambar 4.2. Asam Lemak Minyak Kelapa

Berdasarkan hasil analisis yang dilakukan terhadap asam lemak yang terkandung dalam minyak kelapa yang digunakan, diperoleh bahwa komposisi asam lemak terbesar adalah asam laurat yaitu sebesar 54,1% . Berikut adalah komposisi asam lemak minyak kelapa yang digunakan berdasarkan analisis Laboratorium Analisis dan Kalibrasi Balai Besar Industri Agro (BBIA):

Tabel 4.1. Komposisi Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa yang Digunakan dan Berdasarkan literatur

Asam Lemak	Persentase Asam Lemak (%)
Kaprilat (C8)	7,2
Kaprat (C10)	8,02
Laurat (C12)	54,1
Miristat (C14)	17,4
Palmitat (C16:0)	6,64
Stearat (C18:0)	1,86
Oleat (C18:1)	3,99
Linoleat (C18:2)	0,81
Linolenat (C18:3)	0,02

Sedangkan berdasarkan Ketaren, 1986, komposisi asam lemak yang terdapat pada minyak kelapa adalah sebagai berikut:

Tabel 4.2. Komposisi Asam Lemak Minyak Kelapa

Asam Lemak	Persentase
Asam Kaproat	0-0,8
Kaprilat	5,5-9,5
Kaprat	4,5-9,5
Laurat	44-52
Miristat	13-19
Palmitat	7,5-10,5
Stearat	1-3
Arakhidat	0-0,4
Palmitoleat	0-1,3
Oleat	5-8
Linoleat	1,5-2,5

Sumber: Ketaren, 1986

4.2 Sintesis Ester Asam Lemak Sukrosa

Lipase merupakan enzim kelas hidrolase yang mengkatalisis reaksi hidrolisis trigliserida menghasilkan asam lemak dan gliserol. Namun, pada kondisi sedikit air, lipase juga dapat mengkatalisis reaksi kebalikan dari hidrolisis yaitu reaksi esterifikasi.

Reaksi esterifikasi yang dikatalisis oleh lipase terjadi pada sistem reaksi dengan jumlah air dalam sistem sedikit. Biasanya digunakan pelarut organik atau reaksi dilakukan tanpa pelarut. Dalam penelitian ini, digunakan n-heksana sebagai pelarut dalam reaksi esterifikasi enzimatis antara sukrosa dan asam lemak minyak kelapa.

Dalam melakukan fungsinya sebagai katalis, enzim harus berada pada kondisi yang baik, yang dapat menunjang aktivitas katalitiknya. Studi mengenai aktivitas katalitik enzim dalam pelarut organik menunjukkan bahwa pelarut dengan nilai log P di antara 2 sampai 4 dapat mempertahankan aktivitas dan stabilitas enzim (Zaks dan Klibanov, 1988). Hidrofobisitas pelarut yang

digunakan berpengaruh terhadap jumlah air esensial yang diperlukan suatu enzim untuk aktivitas katalitiknya.

Air esensial adalah jumlah air yang dibutuhkan suatu enzim untuk tetap dapat melakukan aktivitas katalitiknya. Air secara mutlak dibutuhkan untuk aktivitas katalitik enzim. Hal ini disebabkan air berperan secara langsung maupun tidak langsung dalam seluruh interaksi non kovalen (seperti ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan interaksi elektrostatik) yang mempertahankan konformasi katalitik alami suatu enzim (Klibanov, 1986). Selain itu air juga berperan dalam dinamika enzim (Zaks dan Russel, 1988). Air yang dibutuhkan untuk mempertahankan konformasi enzim ini hanya dibutuhkan dalam jumlah sedikit. Jika air esensial tetap melapisi molekul enzim, maka pergantian sisa-sisa air yang lain dengan pelarut organik tidak akan mengganggu aktivitas katalitik enzim.

Umumnya enzim yang disuspensikan dalam pelarut organik yang bersifat hidrofobik akan memerlukan air yang lebih sedikit dibanding jika digunakan pelarut yang hidrofilik. Pada pelarut hidrofobik, air cenderung akan berpartisipasi ke dalam molekul enzim, sehingga walaupun hanya ada sedikit air dalam sistem, aktivitas enzimatis akan tetap berlangsung dengan baik. Sebaliknya pelarut hidrofilik akan menarik sebagian air esensial dari molekul enzim sehingga menyebabkan terganggunya aktivitas enzimatisnya. Untuk mengembalikan aktivitas enzimatis tersebut, perlu ditambahkan lebih banyak air untuk menjenuhkan pelarut hidrofilik terlebih dahulu.

Pada penelitian ini digunakan pelarut n-heksana yang memiliki nilai log P 3,5. Berdasarkan referensi diketahui bahwa n-heksana merupakan pelarut yang baik pada reaksi esterifikasi antara sorbitol dan asam stearat dengan % *yield* di atas 80% (Ruchi Gulati et al., 2003). N-heksana yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 1:1 dibandingkan total volume substrat.

Enzim yang digunakan sebanyak 5 % dari berat total substrat. Sebelum dimasukkan ke dalam sistem reaksi, enzim terlebih dahulu dilarutkan dalam larutan buffer pH 8, yang bertujuan agar enzim berada pada keadaan optimumnya. Enzim yang digunakan dalam penelitian ini adalah enzim lipase *Candida rugosa* yang diperoleh dari Sigma Aldrich.

Reaksi esterifikasi yang dilakukan dengan mencampurkan sukrosa, asam lemak, enzim, serta pelarut n-heksana menghasilkan dua lapisan yang tidak saling bercampur pada awal reaksi karena adanya perbedaan kepolaran antara sukrosa dengan asam lemak dan n-heksana. Agar tetap terjadi kontak antara asam lemak dengan sukrosa dan terjadi reaksi esterifikasi maka dilakukan proses inkubasi campuran reaksi pada *horizontal incubator shaker*.

Reaksi esterifikasi dihentikan dengan proses pemanasan pada suhu tinggi untuk menginaktivkan enzim lipase. Pada suhu tinggi, terdapat dua kemungkinan yang menyebabkan inaktivasi suatu enzim, yaitu:

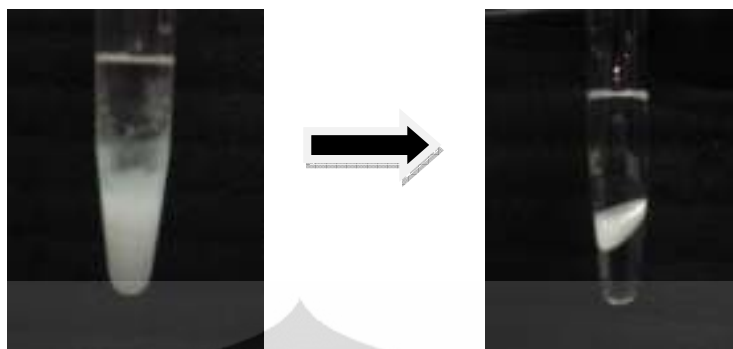
1. Adanya pembukaan parsial struktur sekunder, tersier, dan/atau kuarterner molekul enzim
2. Perubahan struktur primer enzim karena adanya kerusakan asam amino-asam amino tertentu oleh panas (Ahern dan Klibanov, 1987)

Hasil sintesis yang diperoleh berbentuk seperti sistem emulsi seperti yang terlihat pada Gambar 4.3. berikut ini:



Gambar 4.3. Campuran Hasil Reaksi Setelah Terminasi

Hasil sintesis berupa cairan yang bercampur menyerupai emulsi. Untuk memecah emulsi dan memisahkan antara fasa organik, fasa air, serta produk ester sukrosa dilakukan proses sentrifugasi, sehingga dihasilkan tiga lapis cairan seperti Gambar 4.4. berikut:



Gambar 4.4. Hasil Reaksi Sebelum dan Sesudah Proses Sentrifugasi

Lapisan atas yang berupa asam lemak yang terlarut dalam n-heksana kemudian dititrasi balik untuk menentukan banyaknya asam lemak yang bereaksi sehingga dapat diperoleh persentase *yield* ester sukrosa. Pada proses titrasi, terjadi reaksi saponifikasi antara asam lemak dengan NaOH membentuk garan Na-asam lemak, sesuai dengan reaksi:



Lapisan bagian tengah, yang diduga merupakan ester sukrosa yang terbentuk, dipanaskan pada oven untuk menghilangkan air maupun fasa organik yang masih terbawa saat proses pemisahan. Ester sukrosa akan meleleh antara suhu 40 sampai 60 °C, bergantung pada derajat esterifikasi dan asam lemak yang berhasil tersubstitusi. Pemanasan sampai suhu 185 °C dapat dilakukan tanpa merusak ikatan ester pada ester sukrosa, namun pada suhu 140 °C akan terjadi perubahan warna karena adanya proses karamelisasi sukrosa sisa yang masih terdapat pada produk hasil reaksi (Whitehurst, 2004).

Sukrosa merupakan poli alkohol dengan delapan gugus hidroksil, tiga di antaranya yaitu hidroksil C6, C1', dan C6' merupakan hidroksil primer dan lima gugus hidroksil lainnya merupakan hidroksil sekunder. Gugus hidroksil primer merupakan gugus yang reaktif dan paling mudah untuk disubstitusi oleh asam lemak, menghasilkan mono-, di-, dan tri-ester. Walaupun demikian, sintesis ester sukrosa dengan derajat substitusi satu sampai delapan secara teoritis dapat

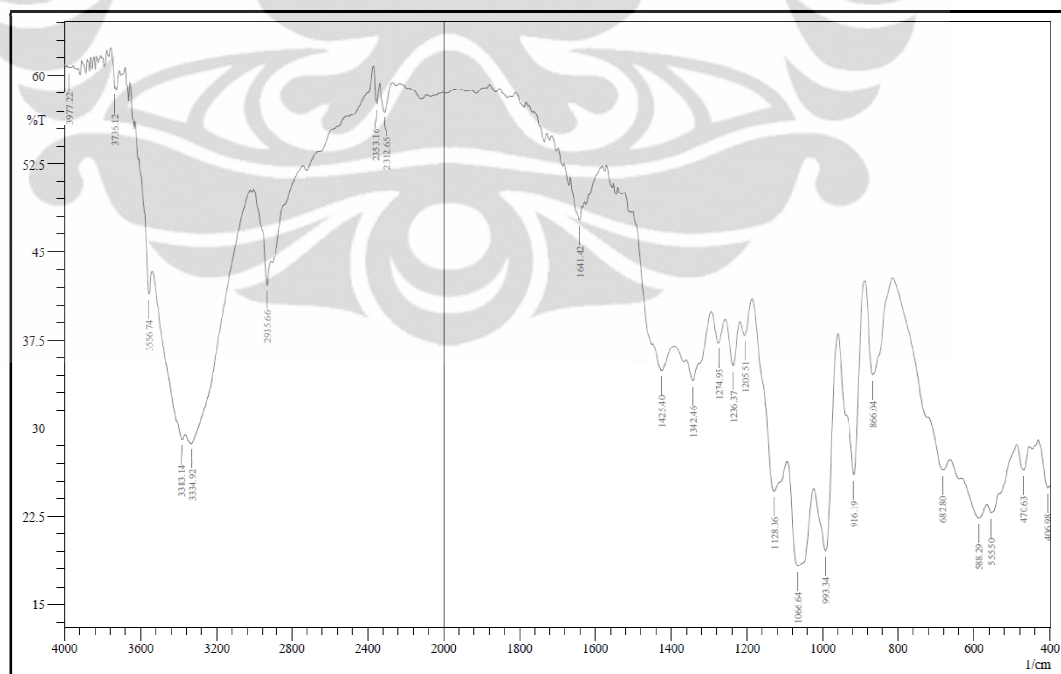
dilakukan. Derajat esterifikasi inilah yang nantinya akan mempengaruhi sifat dari ester sukrosa hasil sintesis.

Ester sukrosa dengan derajat substitusi tinggi seperti heksa, hepta, maupun okta ester dapat digunakan sebagai *fat replacer* sedangkan yang berderajat substitusi rendah digunakan sebagai *emulsifier*.

4.3 Identifikasi Ester Sukrosa

4.3.1 Identifikasi Menggunakan Instrumentasi FT-IR

Dasar analisis pengukuran FT-IR adalah pada perbedaan panjang gelombang absorpsi masing masing gugus fungsi, sehingga dengan analisis FT-IR dapat diketahui ada tidaknya gugus fungsi yang diinginkan pada senyawa hasil sintesis. Hasil reaksi antara asam lemak dengan sukrosa akan menghasilkan ester asam lemak sukrosa. Adanya gugus ester pada produk hasil sintesis dapat dibuktikan dengan munculnya puncak serapan baru pada spektrum IR jika dibandingkan dengan spektrum sukrosa maupun asam lemak.

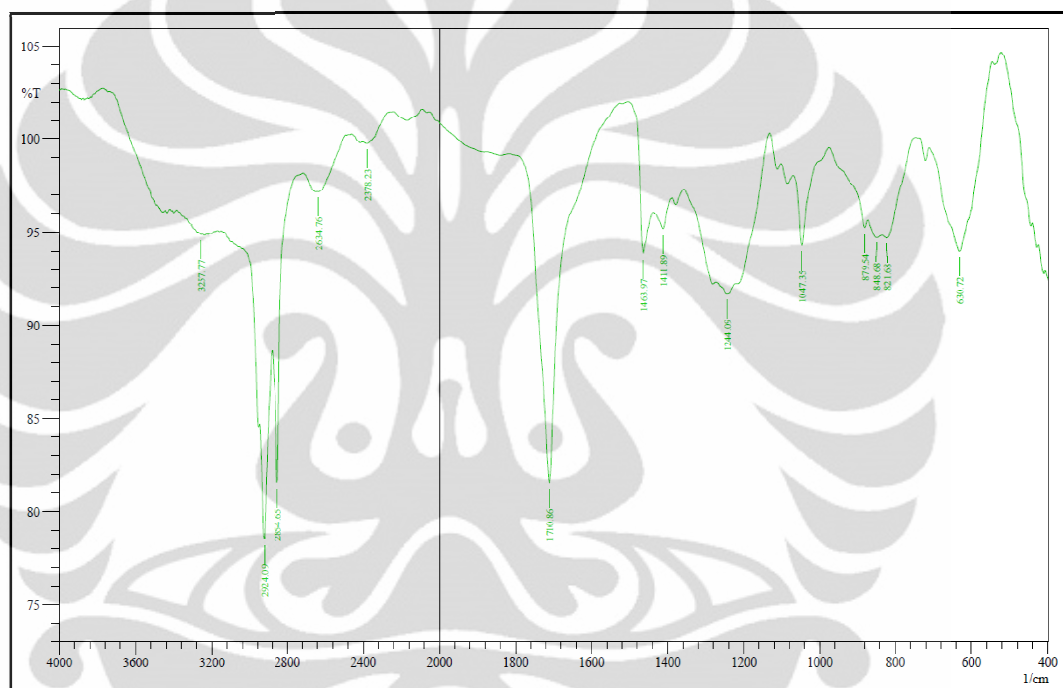


Gambar 4.5. Spektrum FT-IR Sukrosa

Berikut adalah tabel korelasi antara bilangan gelombang dengan gugus fungsi yang terdapat pada spektrum sukrosa di atas:

Tabel 4.3. Tabel Kolerasi Spektrum FT-IR Sukrosa

Bilangan Gelombang (cm^{-1})	Gugus Fungsi
3650-3200	O-H
3000-2850	C-H

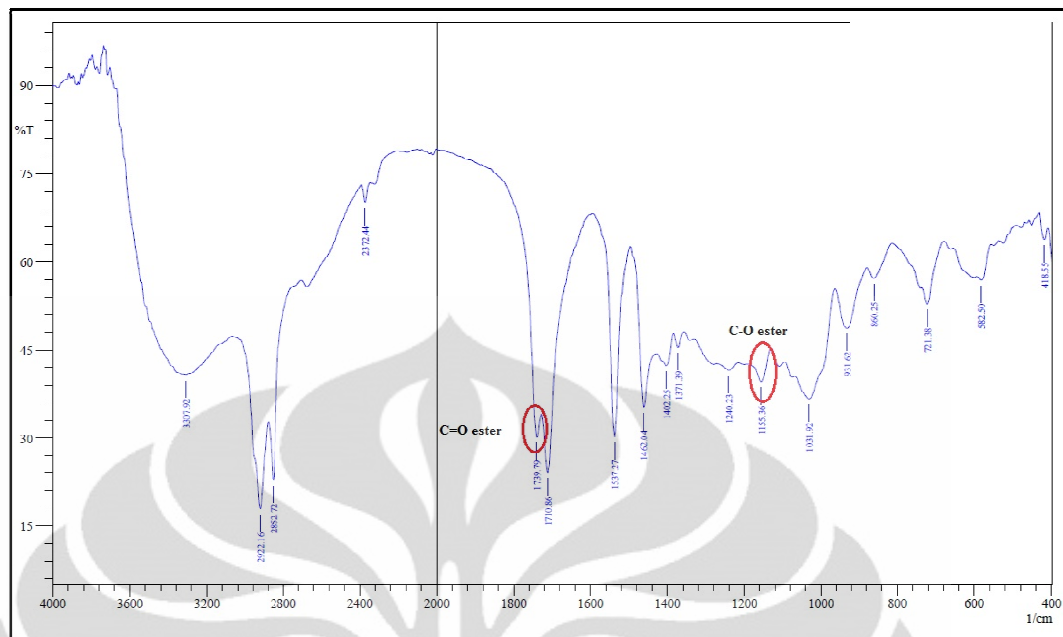


Gambar 4.6. Spektrum FT-IR Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa

Berikut adalah Tabel korelasi antara bilangan gelombang dengan gugus fungsi yang terdapat pada spektrum asam lemak:

Tabel 4.4. Tabel Kolerasi Spektrum FT-IR Asam Lemak

Bilangan Gelombang (cm^{-1})	Gugus Fungsi
3000-2850	C-H
1450-1375	-CH ₃
1463,97	-CH ₂ -
1725-1700	Asam karboksilat

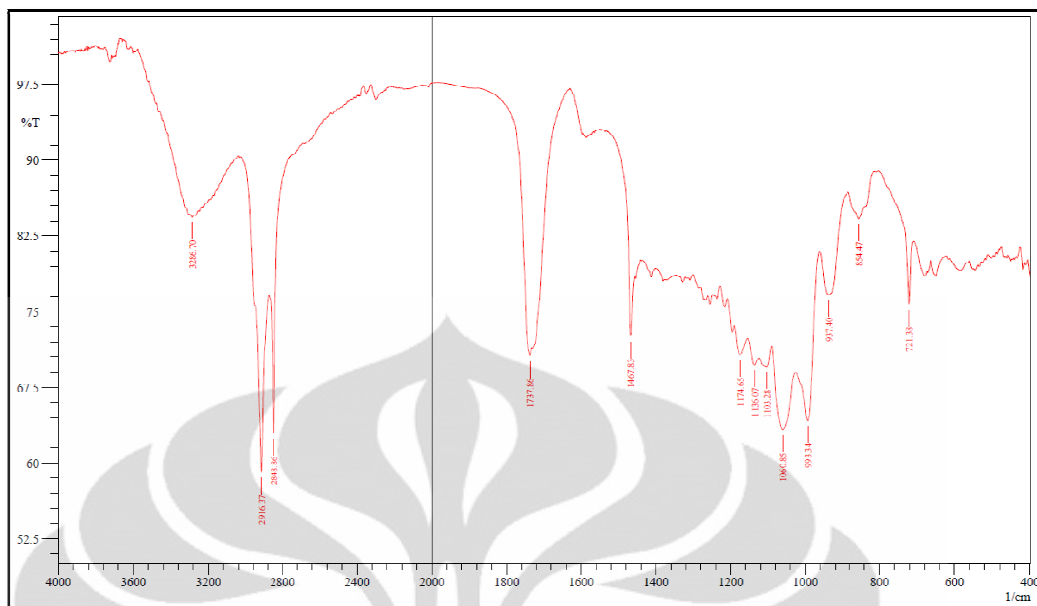


Gambar 4.7. Spektrum FT-IR Ester Sukrosa Hasil Sintesis

Berikut adalah Tabel korelasi antara bilangan gelombang dengan gugus fungsi yang terdapat pada spektrum produk hasil sintesis:

Tabel 4.5. Tabel Kolerasi Spektrum FT-IR Produk Hasil Sintesis

Bilangan Gelombang (cm^{-1})	Gugus Fungsi
3650-3200	O-H
3000-2850	C-H
1750-1730	C=O Ester
1155,36	C-O ester



Gambar 4.8. Spektrum FT-IR Standar Ester Sukrosa (*Ryoto Sugar*)

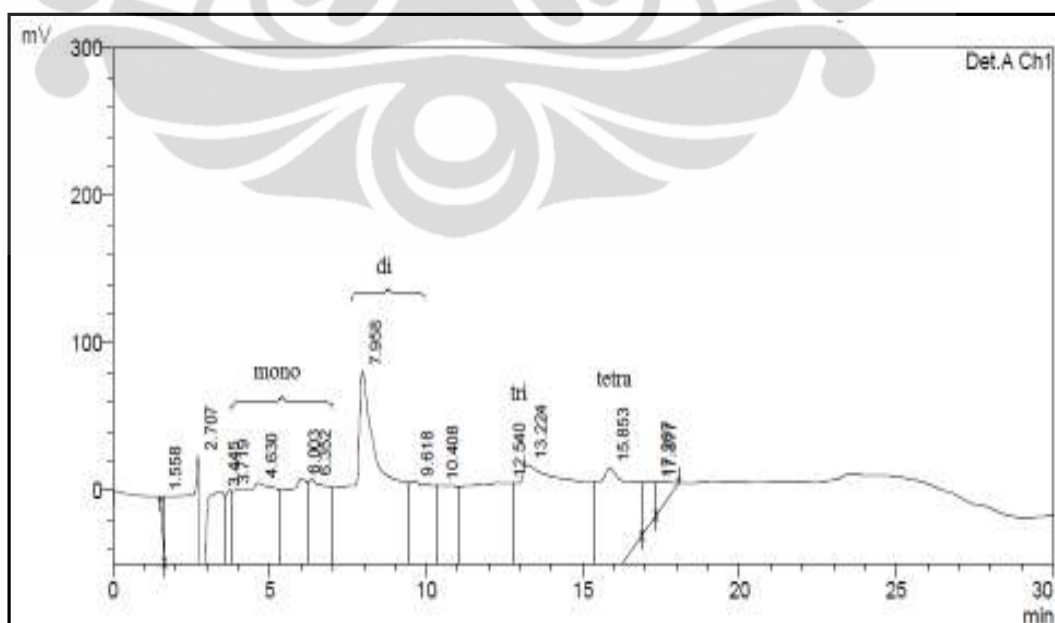
Berdasarkan keempat spektrum FT-IR di atas, dapat diketahui bahwa ester sukrosa telah berhasil disintesis. Hal ini dibuktikan dengan munculnya puncak baru pada spektrum FT-IR ester sukrosa hasil sintesis, yang tidak ditemukan pada spektrum sukrosa maupun asam lemak, yaitu puncak yang khas pada bilangan gelombang 1739 cm^{-1} . Berdasarkan tabel kolerasi, diketahui bahwa frekuensi serapan vibrasi regangan dari gugus fungsi ester $\text{C}=\text{O}$ berada pada bilangan gelombang $1750\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$. Selain itu, pada daerah sidik jari terdapat puncak pada bilangan gelombang $1155,36\text{ cm}^{-1}$. Puncak ini adalah puncak $\text{C}-\text{O}$ yang menyerap pada rentang $1110\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$. Jika dibandingkan antara spektrum sukrosa dengan spektrum ester sukrosa hasil sintesis, terlihat bahwa serapan OH pada sukrosa yang lebar mengalami penurunan pada spektrum ester sukrosa. Hal ini mengindikasikan adanya OH pada sukrosa yang berhasil teresterifikasi oleh asam lemak menghasilkan produk ester asam lemak sukrosa.

Selain membandingkan spektrum FT-IR sukrosa, asam lemak, dan ester sukrosa hasil sintesis, juga dilakukan perbandingan dengan standar ester sukrosa, yaitu *ryoto sugar*. Standar *ryoto sugar* yang digunakan adalah *ryoto sugar* tipe S-1170 yang diproduksi oleh Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation dan digunakan sebagai emulsifier pada industri makanan dan kosmetik. *Ryoto sugar* S-1170 merupakan campuran dari sukrosa mono-, di-, dan tristearat dengan komposisi

80%. Apabila dibandingkan antara spektrum FT-IR dari ester sukrosa hasil sintesis dan *ryoto sugar*, terdapat puncak yang berada pada bilangan gelombang yang berdekatan, yaitu 1739 cm^{-1} untuk ester sukrosa hasil sintesis dan 1737 cm^{-1} untuk *ryoto sugar*. Kedua puncak ini merupakan serapan yang khas untuk gugus fungsi ester. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa reaksi esterifikasi antara sukrosa dengan asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa telah berhasil dilakukan.

4.3.2 Identifikasi Menggunakan HPLC (High Performace Liquid Chromatography)

Untuk memperkuat hasil identifikasi FT-IR, dilakukan juga analisis kualitatif adanya ester sukrosa menggunakan instrumentasi HPLC. Identifikasi dilakukan dengan membandingkan waktu retensi antara ester sukrosa hasil sintesis dengan standar ester sukrosa, yaitu *ryoto sugar*, yang sudah diketahui komposisinya. *Ryoto sugar* yang digunakan merupakan campuran antara sukrosa mono-, di-, tri-, dan tetrastearat. Hasil analisis HPLC dari ester sukrosa hasil sintesis dapat dilihat pada Gambar 4.9 berikut ini:



Gambar 4.9. Kromatogram HPLC dari Ester Sukrosa Hasil Sintesis

Berdasarkan hasil analisis kualitatif menggunakan HPLC, diperoleh bahwa ester sukrosa yang terbentuk merupakan campuran antara ester sukrosa dengan derajat substitusi satu sampai empat. Hasil analisis HPLC standar *ryoto sugar* menunjukkan bahwa ester sukrosa dengan derajat substitusi satu akan memberikan puncak pada waktu retensi sekitar 6-8 menit, sedangkan di-, tri-, dan tetraester akan muncul pada waktu retensi 12, 15, dan 19 menit. Hasil HPLC ester sukrosa hasil sintesis menunjukkan munculnya puncak pada waktu retensi 4 dan 6 menit yang diperkirakan merupakan puncak dari monoester. Untuk puncak yang muncul pada waktu retensi 7 dan 9 menit merupakan puncak dari diester, sedangkan puncak yang berada pada waktu retensi 12 dan 15 menit merupakan puncak dari tri- dan tetraester.

Apabila dibandingkan, waktu retensi ester sukrosa hasil sintesis, baik mono-, di-, tri-, dan tetraester, lebih pendek dari waktu retensi *standar ryoto sugar* dengan derajat substitusi yang sama. Hal ini disebabkan oleh perbedaan asam lemak yang teresterifikasi. Pada ester sukrosa hasil sintesis, kemungkinan asam lemak yang teresterifikasi adalah asam laurat (C12) dan miristat (C14), sedangkan pada standar *ryoto sugar* asam lemak yang teresterifikasi adalah asam stearat (C18), yang memiliki tingkat kepolaran lebih rendah daripada asam laurat dan miristat. Fasa diam yang digunakan pada analisis HPLC adalah kolom C18 yang bersifat non polar dan fasa gerak metanol:air yang bersifat polar, sehingga semakin panjang rantai karbon dari asam lemak yang teresterifikasi, ester sukrosa yang dihasilkan akan lebih lama tertahan di kolom dan waktu retensi yang dihasilkan semakin panjang.

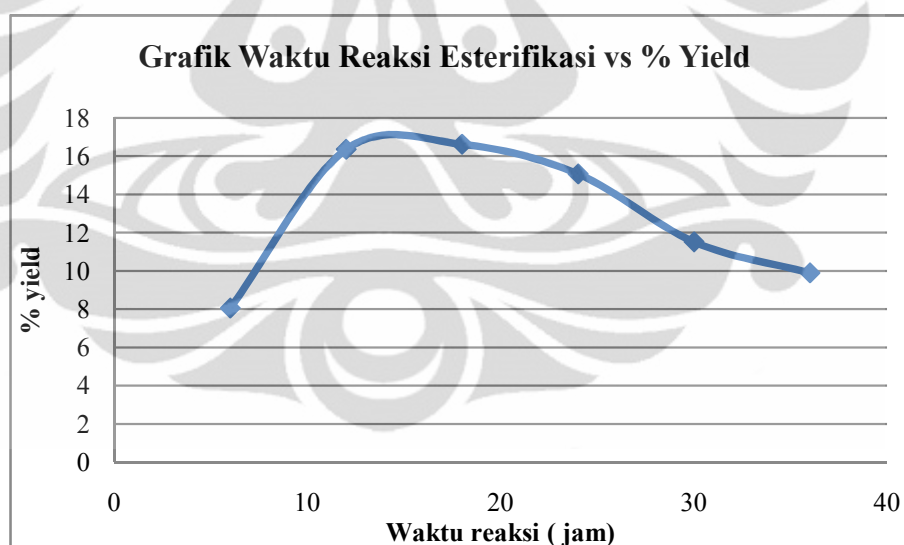
Selain untuk analisis kualitatif, hasil HPLC yang diperoleh juga dapat digunakan untuk analisis kuantitatif untuk mengetahui perbandingan antara komposisi mono-, di-, tri-, dan tetraester yang terdapat pada produk. Berdasarkan hasil perhitungan diperoleh bahwa sukrosa monoester yang terbentuk sebesar 40,28%, diester 42,05%, triester 13,65%, dan tetraester sebesar 4,03%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ester sukrosa yang dominan terbentuk adalah ester sukrosa dengan derajat substitusi dua dan satu.

4.4 Optimasi Waktu Reaksi

Optimasi waktu reaksi dilakukan untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan untuk menghasilkan ester asam lemak sukrosa dengan persentase *yield* yang paling tinggi. Reaksi dilakukan selama 6, 12, 18, 24, 30, dan 36 jam. Berikut adalah Tabel dan grafik antara waktu reaksi dengan persentase *yield* ester asam lemak sukrosa:

Tabel 4.6. Pengaruh Waktu Reaksi Terhadap % *Yield* Ester Sukrosa

Waktu reaksi (jam)	% <i>yield</i> ester sukrosa
6	8,05
12	16,36
18	16,62
24	15,07
30	11,54
36	9,89



Gambar 4.10. Grafik Waktu Reaksi vs *Yield* Ester Sukrosa

Waktu yang dibutuhkan untuk menghasilkan ester sukrosa dengan persentase paling tinggi adalah 18 jam. Setelah jam ke-18, persentase *yield* mengalami penurunan. Hal ini dapat disebabkan oleh terhidrolisisnya kembali ester asam lemak sukrosa yang dihasilkan menjadi asam lemak dan sukrosa dengan bertambahnya air hasil reaksi esterifikasi. Bertambahnya air dalam

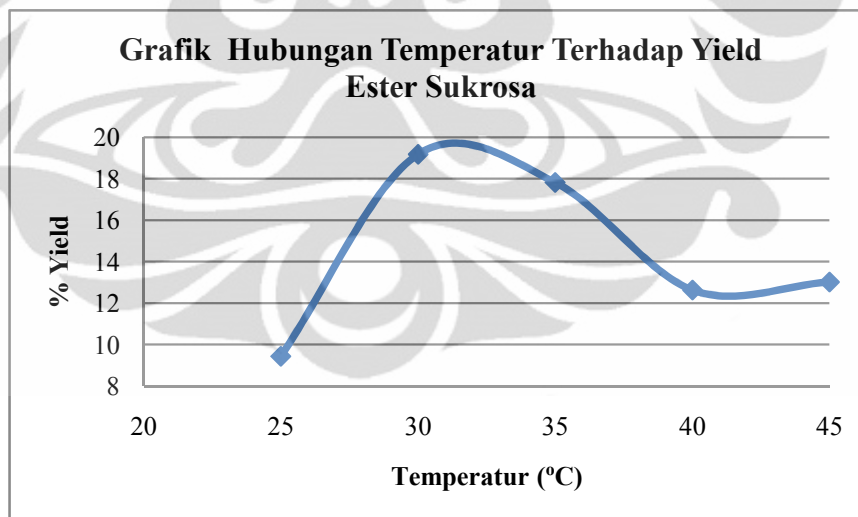
medium reaksi dapat menyebabkan enzim cenderung mengarahkan reaksi ke arah reaksi hidrolisis dibandingkan dengan reaksi esterifikasi,

4.5 Optimasi Temperatur Reaksi

Aktivitas suatu enzim dipengaruhi oleh temperatur, karena enzim adalah protein. Oleh karena itu, dilakukan optimasi suhu reaksi, yaitu pada 25, 30, 35, 40, serta 45°C.

Tabel 4.7. Pengaruh Temperatur Terhadap % Yield Ester Sukrosa

Temperatur (°C)	Yield (%)
25	9,44
30	19,19
35	17,83
40	12,64
45	13,02



Gambar 4.11. Grafik Hubungan Temperatur vs % Yield Ester Sukrosa

Berdasarkan grafik di atas, diketahui bahwa suhu optimum bagi lipase *Candida rugosa* dalam reaksi esterifikasi adalah pada 30 °C. Perubahan temperatur dapat menyebabkan perubahan aktivitas dan stabilitas suatu enzim dan kecepatan reaksi. Selain itu temperatur juga berpengaruh pada kelarutan substrat, yaitu asam lemak dan sukrosa. Pada temperatur 25 sampai 30 °C kecepatan reaksi

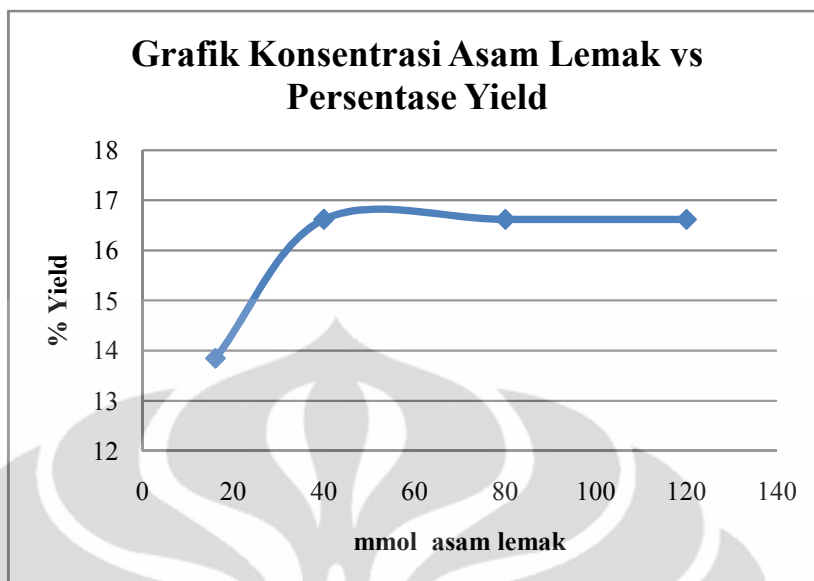
esterifikasi enzimatik meningkat seiring dengan meningkatnya temperatur, karena meningkatnya energi kinetik molekul sehingga frekuensi tumbukan antar molekul substrat dengan enzim semakin tinggi. Di atas temperatur 30 °C kecepatan reaksi menurun, karena pada temperatur yang lebih tinggi terjadi gangguan terhadap konformasi enzim sehingga enzim menjadi inaktif. Lipase *Candida rugosa* memiliki kestabilan termal dan temperatur optimum pada 30-35 °C (Fadölođlu, 1996).

4.6 Optimasi Perbandingan Konsentrasi Antara Sukrosa dengan Asam Lemak

Reaksi esterifikasi merupakan reaksi berkesetimbangan yang mengikuti azas Le Chatelier. Untuk meningkatkan produk hasil reaksi, digunakan reaktan yang berlebih sehingga kesetimbangan akan menuju ke arah pembentukan produk. Pada penelitian ini digunakan mmol asam lemak yang berlebih agar gugus hidroksil yang terdapat di sukrosa dapat teresterifikasi dengan baik dan dihasilkan ester asam lemak sukrosa yang maksimal. Konsentrasi sukrosa yang digunakan dibuat tetap agar dapat diamati pengaruh penambahan asam lemak terhadap persentase *yield* ester asam lemak sukrosa. Pada Tabel 4.8 dan Gambar 4.10 dapat dilihat hubungan antara rasio sukrosa dan asam lemak dengan persen *yield*:

Tabel 4.8. Pengaruh Rasio Sukrosa : Asam Lemak Terhadap Persentase *Yield*

Rasio Sukrosa : Asam Lemak	Persentase <i>Yield</i>
1 : 16	13,85
1 : 40	16,62
1 : 80	16,62
1 : 120	16,62



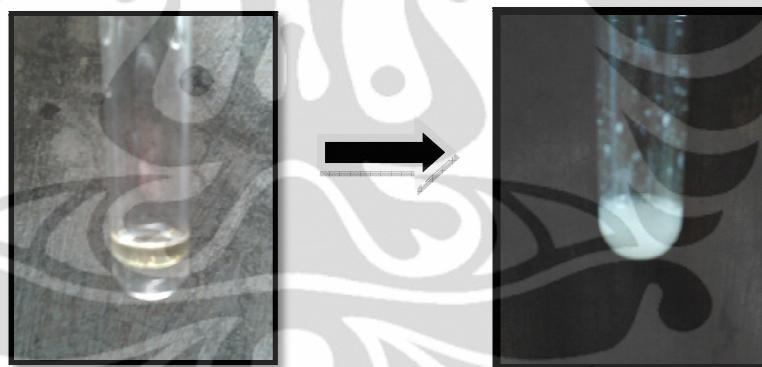
Gambar 4.12. Grafik Pengaruh mmol Asam Lemak Terhadap Persentase *Yield* Ester Asam Lemak Sukrosa

Berdasarkan data di atas, diperoleh bahwa produksi ester asam lemak sukrosa mengalami peningkatan pada saat rasio sukrosa:asam lemak 1:16 menuju 1:40. Sedangkan pada saat rasio 1:80 dan 1:120 persentase *yield* ester sukrosa tetap konstan. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan asam lemak tidak lagi dapat meningkatkan produksi ester sukrosa karena enzim yang digunakan telah jenuh karena semua sisi aktif enzim telah terikat dengan substrat membentuk kompleks enzim-substrat.

Ester sukrosa yang dihasilkan pada penelitian ini, diperkirakan memiliki derajat esterifikasi dua, yaitu hanya dua gugus hidroksil sukrosa yang berhasil teresterifikasi. Hal ini berdasarkan pada persentase *yield* ester sukrosa yang hanya mencapai 16,62 % pada kondisi optimal. Hal ini juga diperkuat dengan hasil analisis kuantitatif dengan HPLC yang menunjukkan bahwa persentase terbesar ester sukrosa yang terbentuk merupakan ester sukrosa dengan derajat substitusi dua.

4.7 Uji Kualitatif Sederhana Kemampuan Ester Sukrosa Hasil Sintesis sebagai *Emulsifier*

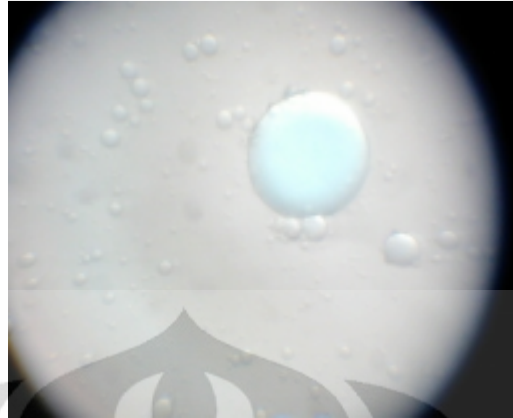
Air dan minyak merupakan dua senyawa yang tidak saling bercampur karena keduanya memiliki tingkat kepolaran yang berbeda. Air bersifat polar, sedangkan minyak non polar. Agar air dan minyak dapat bercampur, maka dibutuhkan senyawa ketiga yang memiliki baik gugus polar maupun non polar dalam molekulnya, sehingga dapat menjembatani antara air dan minyak. Senyawa ini dapat disebut sebagai *emulsifier*. Gugus polar *emulsifier* akan mengikat air sedangkan gugus non polarnya mengikat minyak, sehingga air dan minyak dapat bercampur. Pada uji ini, setelah dilakukan penambahan ester sukrosa hasil sintesis, air dan minyak yang awalnya terpisah dapat bercampur dengan baik dan emulsi yang terbentuk cukup stabil. Hal ini dibuktikan dengan emulsi yang terbentuk tetap stabil setelah didiamkan selama 24 jam. Hasil ini menunjukkan bahwa ester sukrosa hasil sintesis dapat digunakan sebagai *emulsifier*.



Gambar 4.13. Minyak dan Air Sebelum dan Sesudah Penambahan Ester Sukrosa Hasil Sintesis

4.8 Penentuan Jenis Emulsi dengan Menggunakan Mikroskop

Untuk menentukan jenis emulsi yang terbentuk pada uji kualitatif sederhana kemampuan ester sukrosa hasil sintesis sebagai *emulsifier*, dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop. Eosin yang digunakan sebagai pewarna akan larut dalam air, sehingga dapat dibedakan apakah emulsi yang terbentuk merupakan emulsi minyak dalam air (o/w) atau air dalam minyak (w/o). Berikut adalah gambar hasil pengamatan dengan mikroskop:



Gambar 4.14. Hasil Pengamatan Emulsi dengan Mikroskop

Berdasarkan gambar di atas, dapat disimpulkan bahwa emulsi yang terbentuk merupakan jenis emulsi minyak dalam air (o/w) karena terdapat butiran yang minyak berwarna bening dan lingkungan disekitarnya berwarna merah muda yang merupakan eosin yang terlarut dalam air. Hal ini sesuai dengan derajat esterifikasi ester sukrosa hasil sintesis yang diperkirakan mencapai dua. Ester sukrosa dengan derajat esterifikasi rendah (kurang dari tiga) lebih bersifat hidrofilik karena masih terdapat lima atau lebih gugus hidroksil pada sukrosa yang belum teresterifikasi, sehingga dapat digunakan untuk membentuk sistem emulsi minyak dalam air (o/w).

BAB 5

PENUTUP

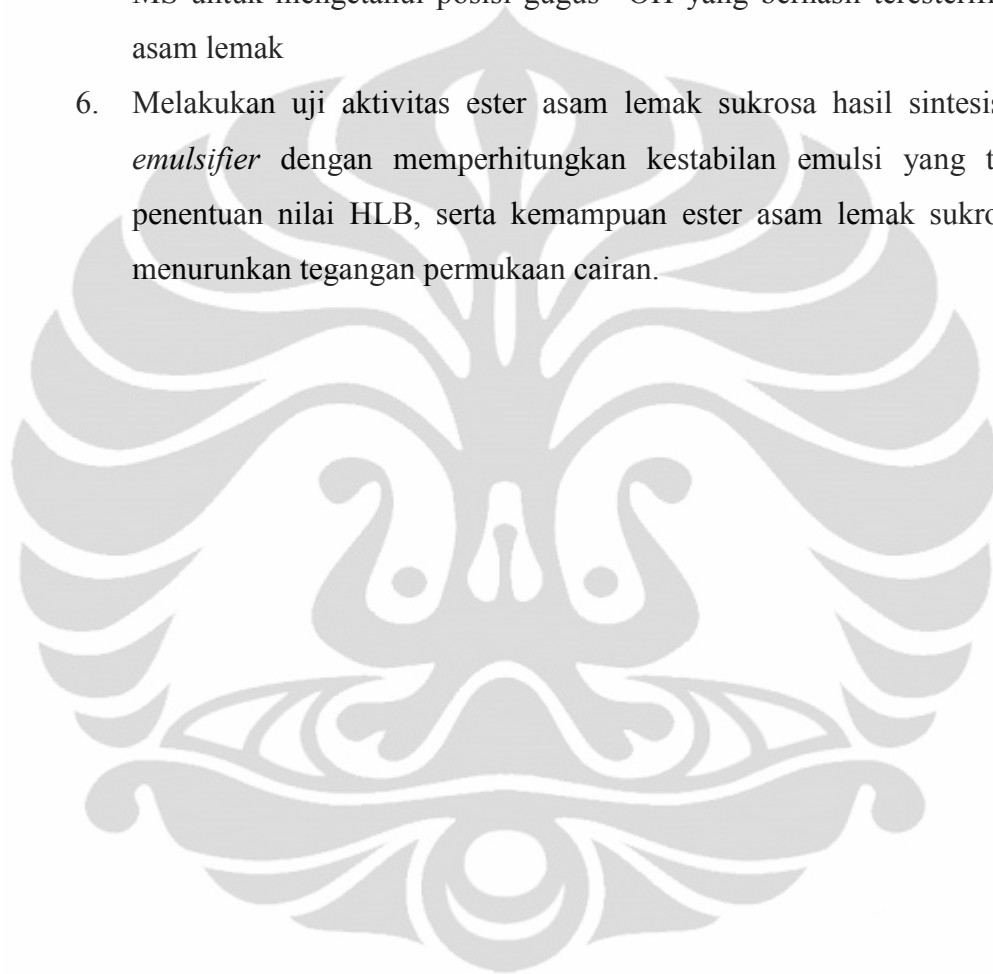
5.1 Kesimpulan

1. Lipase yang berasal dari *Candida rugosa* dapat digunakan sebagai katalis dalam reaksi esterifikasi antara sukrosa dengan asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa.
2. Berdasarkan hasil identifikasi produk dengan menggunakan FT-IR dan HPLC, diketahui bahwa reaksi esterifikasi antara sukrosa dengan asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa dengan katalis lipase *Candida rugosa* berhasil dilakukan.
3. Kondisi optimum untuk reaksi esterifikasi antara sukrosa dengan asam lemak hasil hidrolisis minyak kelapa dengan katalis enzim lipase *Candida rugosa* adalah pada waktu reaksi 18 jam, temperatur 30°C, dan perbandingan mol sukrosa:asam lemak sebesar 1:40.
4. Berdasarkan hasil analisis dengan HPLC, diperoleh bahwa ester sukrosa yang terbentuk merupakan campuran dari ester sukrosa dengan derajat substitusi satu sampai empat, dengan komposisi 40,28%, 42,05%, 13,65%, dan 4,03% untuk mono, di, tri, dan tetraester.
5. Persentase ester asam lemak sukrosa hasil sintesis terbesar merupakan ester sukrosa dengan derajat substitusi dua.
6. Ester asam lemak sukrosa hasil sintesis dapat digunakan sebagai *emulsifier* dan emulsi yang terbentuk stabil selama 24 jam.

5.2 Saran

1. Melakukan optimasi konsentrasi enzim yang dibutuhkan untuk reaksi esterifikasi enzimatik antara sukrosa dengan asam lemak minyak kelapa.
2. Melakukan optimasi terhadap pelarut yang digunakan untuk reaksi esterifikasi enzimatik antara sukrosa dengan asam lemak minyak kelapa.

3. Menggunakan *molecular sieve* dalam reaksi esterifikasi untuk menarik air yang dihasilkan dari reaksi agar % yield yang dihasilkan lebih besar.
4. Menggunakan enzim yang telah diimobilisasi, sehingga proses pemurnian produk hasil reaksi lebih mudah.
5. Melakukan karakterisasi produk yang dihasilkan dengan instrumentasi LC-MS untuk mengetahui posisi gugus -OH yang berhasil teresterifikasi oleh asam lemak
6. Melakukan uji aktivitas ester asam lemak sukrosa hasil sintesis sebagai *emulsifier* dengan memperhitungkan kestabilan emulsi yang terbentuk, penentuan nilai HLB, serta kemampuan ester asam lemak sukrosa untuk menurunkan tegangan permukaan cairan.



DAFTAR PUSTAKA

- Adamopoulos, lambrini. (2006). *Understanding the formation of sugar fatty acid esters*. Faculty of North Carolina State University.
- Byun, Hee-Guk et al. (2007). *Lipase Catalyzed Production of Monoacylglycerol by The Esterification of Fish Oil Fatty Acid with Glycerol*. Pukyong National University, Busan, Korea.
- Cruces, et al. (2001). *Improved synthesis of sucrose fatty acid monoesters*. Departamento de Biocatálisis, Instituto de Catálisis, C.S.I.C., Cantoblanco, dan Instituto de Química Orgánica, Spain.
- Elisabeth, Tricia. (2002). *Mempelajari Stabilitas Enzim Ekstraselular dari Kapang Rhizopus oryzae TR32 dalam Pelarut Heksana, Toluena, dan Benzena*. Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Elisabeth, Trisia H N. (2002). *Mempelajari Stabilitas Enzim Lipase Ekstraselular dari Kapang Rhizopus Orizae TR32 dalam Pelarut Heksana, Toluena, dan Benzena*. Institut Pertanian Bogor.
- Gulati, Ruchi, Pragya Arya, Bhawna Malhotra, Ashok K. Prasad, Rajendra K. Saxena, Jayant Kumar, Arthur C. Watterson, and Virinder S. Parmar. (2003). *Novel biocatalytic esterification reactions on fatty acids: synthesis of sorbitol 1(6) – monostearate*. ARKIVOC 2003 (iii) 159-170
- Hashim, Hasnisa binti dan Jumat Salimon. (2008). *Kajian Pengoptimuman Tindak Balas Hidrolisis Minyak Kacang Soya*. Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, Selangor, Malaysia.
- In Sang Yoo, Sang Joon Park, and Hyon Hee Yoon. (2006). *Enzymatic Synthesis of Sugar Fatty Acid Esters*. Department of Chemical Engineering, Kyungwon University, Kyunggi 461-701, Korea.
- K.M.W. Syamsul et al. (2010), *Green Synthesis of Lauryl Palmitate via Lipase-Catalyzed Reaction*. Universiti Petera Malaysia.
- Ketaren, S. (1986). *Pengantar teknologi minyak dan lemak pangan*. Jakarta: Universitas Indonesia.

- Klibanov, A. M. (1986). *Enzymes that work in organic solvents*. Chemtech. 16: 354-144
- M.L. Damstrup. (2005). *Solvent Optimization for Efficient Enzymatic Monoacylglycerol Production Based on a Glycerolysis Reaction*. Technical University of Denmark.
- ÖZTÜRK, Banu. (2001). *Immobilization of Lipase from Candida rugosa on Hydrophobic and Hydrophilic Supports*. İzmir Institute of Technology, Turkey.
- Patravale P B, P P Dandekar. (2009). *Enzymatic Synthetic of Fructose Ester from Mango Kernel Fat*. Institute of Chemical Technology, India.
- Peran Minyak Kelapa dalam Industri Oleokimia*. Januari 27, 2010. <http://www.dekindo.com/content/artikel/oleokimia.pdf>.
- Petersen M.T.N., Fojan P., Petersen S.B., . *How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution.*, Journal of biotechnology, 85, issue 2, (2001), 115-147
- Prabhu A.V., Tambe S.P., Gandhi N.N., Sawant S.B., Joshi J.B. (1999). *Rice bran lipase: extraction, activity and stability*. *Biotechnology progress*.
- Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis Kelapa*. Januari 27, 2011. <http://www.pdfwindows.com/pdf/prospek-dan-arrah-pengembangan-agribisnis-kelapa-2010>.
- Pusat Data dan Informasi Pertanian Kementerian Pertanian 2010. *Outlook Komoditas Pertanian dan Perkebunan*
- Rahman, Rakmi Abdul dan Tjahjono Herawan. (2000). *Properties of Biosurfactant Enzymatically Prepared from Fructose and Palm Fatty Acid*. Journal of Oil Palm Research Vol. 1.2 No. 1, June 2000, p. 117.122.
- Rakmi, AR, Herawan, TandOMAR, O(1997). *Preparation of biodegradable and vegetable based surfactant from sugar and palm fatty acid catalysed bykkormiehei lipase*. *EZaeis*, 9(2):100-110.
- Rajendran, Aravindan, Anbumathi Palanisamy and Viruthagiri Thangavelu. (2009). *Lipase Catalyzed Ester Synthesis for Food Processing Industries*. Anamaly University, India.

Reslow, M, Adlercreutz, P., dan Mattiasson, B. (1987). *Organic solvents for bioorganic synthesis. 1. Optimization of parameters for chymotrypsin catalyzed process*. Appl. Microbiol. Biotechnol.

Sugiharni, Nanik. (2010). *Isolasi Lipase Ekstrak Kasar Dari Pseudomonas Fluorescens Sebagai Biokatalisator Dalam Studi Pendahuluan Reaksi Esterifikasi Antara Asam Lemak Minyak Kelapa Dengan Sukrosa*. Universitas Indonesia

Taksonomi Kelapa. Februari 15, 2011.
<http://www.plantamor.com/index.php?plant=365>

Teknologi Proses Pengolahan Minyak Kelapa. Februari 5, 2011.
http://www.dekindo.com/content/teknologi/Proses_Pengolahan_Minyak_Kelapa.pdf

Treichel, Helen et al. (2009). *A Review on Microbial Lipases Production*. Food Bioprocess Technol (2010) 3:182–196

Utami, B. Sri, Tranggono, Purnomo Darmadji. *Optimasi Produksi dan Karakterisasi Poliester dengan Distilat Asam Lemak Minyak Sawit Sebagai Sumber Asam Lemak*. Universitas Gajah Mada.

Warisno. (1998). *Budidaya Kelapa Kopyor*. Kanisius: Yogyakarta

Whitehurst, Robert J. (2004). *Emulsifier in Food Technology*. Blackwell Publishing.

Yu, Jiugao, Jianshe Zhang, Ang Zhao dan Xiaofei Ma. (2007). *Study of glucose ester synthesis by immobilized lipase from Candida sp*. School of Science, Tianjin University, Tianjin, China.

Zaks, A dan Klivanov, A. M. (1984). *Enzymatic catalysis in organic media at 100°C*. Science 224:1249-1251

Zaks, A. dan Russell, A. J. 1988. Enzymes in organic solvents: properties and applications. J. Biotechnol. 8: 259-270.60

Zhang, Xun and Douglas G. Hayes. (1999). *Increased Rate of Lipase Catalyzed Saccharide–Fatty Acid Esterification by Control of Reaction Medium*. University of Alabama.

LAMPIRAN

Lampiran 1:

Perhitungan Berat Molekul Asam Lemak Hasil Hidrolisis

Tabel Komposisi Asam Lemak pada Minyak Kelapa yang Digunakan

Asam Lemak	BM	Persentase	Jumlah
Kaprilat	144	7,2	10,368
Kaprat	172	8,02	13,7944
Laurat	200	54,1	108,2
Miristat	228	17,4	39,672
Palmitat	256	6,64	16,9984
Stearat	284	1,86	5,2824
Oleat	282	3,99	11,2518
Linolet	280	0,81	2,268
Linolenat	278	0,02	0,0556
		BM	207,8906

Sumber: Nancy Estherlita Kitu, Sintesis Mono- dan Diasil Gliserol dari Destilat Asam Lemak Minyak Kelapa Melalui Reaksi Esterifikasi dengan Katalis Lipase *Rhizomucor miehei*, 2000, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

Lampiran 2:**Hubungan Waktu Reaksi Terhadap Persentase Yield Ester Asam Lemak****Sukrosa:**

Tabel Hasil Titrasi Asam Lemak Sisa dengan NaOH 0,68023 N

Waktu reaksi (jam)	Sampel	V NaOH yang dibutuhkan (mL)	% Yield
6	I	4,15	8,05
	II	4,25	
	blanko	4,65	
12	I	3,1	16,36
	II	3,3	
	III	3,35	
	blanko	4,1	
18	I	4,15	16,62
	II	3	
	III	2,95	
	blanko	3,3	
24	I	3,1	15,07
	II	3,8	
	III	2,65	
	blanko	3,25	
30	I	2,9	11,54
	II	2,9	
	III	2,55	
	blanko	3,35	
36	I	2,65	9,89
	II	2,45	
	III	3,7	
	blanko	4	

Lampiran 3:**Hubungan Temperatur Reaksi Terhadap Persentase Yield Ester Asam Lemak Sukrosa:**

Tabel Hasil Titrasi Asam Lemak Sisa dengan NaOH 0,6649 N

Temperatur	Sampel	V NaOH yang dibutuhkan (mL)	% Yield
25	I	1,45	9,44
	II	1,4	
	III	1,45	
	blanko	1,6	
30	I	1,5	19,19
	II	1,6	
	III	1,45	
	blanko	1,8	
35	I	1,25	17,83
	II	1,35	
	III	1,4	
	blanko	1,7	
40	I	1,45	12,64
	II	1,45	
	III	1,5	
	blanko	1,7	
45	I	1,5	13,02
	II	1,5	
	III	1,5	
	blanko	1,85	

Lampiran 4:

Hubungan Rasio Sukrosa : Asam Lemak Terhadap Persentase Yield Ester

Asam Lemak Sukrosa:

mmol asam lemak	Sampel	V NaOH yang dibutuhkan (mL)	% Yield
1,6	I	0,3	13,85
	II	0,25	
	III	0,25	
	blanko	1,5	
4	I	0,55	16,62
	II	0,5	
	III	0,6	
	blanko	0,65	
8	I	1,15	16,62
	II	1,1	
	III	1,05	
	blanko	1,3	
12	I	1,5	16,62
	II	1,4	
	III	1,6	
	blanko	1,8	

Mmol sukrosa dibuat tetap yaitu 0,1 mmol, sehingga perbandingan antara mmol sukrosa dengan asam lemak secara berurutan adalah 1:16, 1:40, 1:80, dan 1:120

Perhitungan Persentase *Yield* Ester Sukrosa:

- Mmol asam lemak yang bereaksi

$$= \frac{(V \text{ NaOH untuk titrasi blanko} - V \text{ NaOH sampel}) \times V \text{ total asam lemak sisa} \times N \text{ NaOH}}{V \text{ asam lemak yang dititrasi}}$$

- Persen Yield = $\frac{\text{mmol asam lemak yang bereaksi}}{\text{mmol asam lemak awal}} \times 100$

Perhitungan kasar perkiraan derajat substitusi ester sukrosa yang terbentuk:

- Apabila persen *yield* ester sukrosa yang dihasilkan = 16,62% = 0,1662 mmol
- Derajat substitusi ester sukrosa yang terbentuk adalah

$$= \frac{0,1662}{\text{mmol awal sukrosa}} = \frac{0,1662}{0,1} = 1,662 \approx 2$$



Lampiran 5:

Spesifikasi Lipase *Candida rugosa*

Sigma-Aldrich Certificate of Analysis http://tools.pcr03.storage.ssi.com/sapricot31.php?sr_charge=1298612

SIGMA-ALDRICH **Fluka Analytical**
Industriestrasse 25, CH-9471 Dorn (SO), Switzerland
Tel: +41 81 705 2011 Fax: +41 81 706 5449

Certificate of Analysis

Product Name:	LIPASE CANDIDA RUGOSA
Product Number:	92560
Product Brand:	Fluka
Molecular Formula:	
Molecular Mass:	
CAS Number:	9001-82-1

TEST	SPECIFICATION	LOT 1298612 RESULTS
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO SLIGHTLY BEIGE	SLIGHTLY BEIGE
APPEARANCE (FORM)	POWDER TO POWDER WITH LUMPS	POWDER
SOLUBILITY (COLOR)	COLORLESS TO FAINTLY BROWN	SLIGHTLY YELLOW (Y4)
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR (VISUAL)	CLEAR
SOLUBILITY (METHOD)	-	5 MG/ML H ₂ O
ENZYMATIC ACTIVITY	~ 2.0 U/MG	2.45 U/MG 1 U CORRESPONDS TO THE AMOUNT OF ENZYME WHICH LIBERATES 1 UMOL OLEIC ACID PER MINUTE AT PH 8.0 AND 40 DEG C (TRIOLEIN, FLUKA NO. 62314, AS SUBSTRATE)

QC RELEASE DATE	13JUL08
RECOMMENDED RETEST DATE	JUN12


E. Schwarz, Manager
Quality Control
Buchs, Switzerland


Sigma-Aldrich guarantees the 'Sales-Specification' values only; additional (or specific) tests may be included for further information. The current 'Sales-Specification' sheet is available on request. For further inquiries, please contact our Technical Service. Sigma-Aldrich warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the 'Certificate of Analysis' are the results determined at the time of analysis.

1 of 1 10/11/2010 17:28

Lampiran 6 :

Hasil Analisis Komposisi Asam Lemak Minyak Kelapa

KEMENTERIAN PERINDUSTRIAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN INDUSTRI
BALAI BESAR INDUSTRI AGRO
LABORATORIUM ANALISIS DAN KALIBRASI BALAI BESAR INDUSTRI AGRO
ANALYTICAL AND CALIBRATION LABORATORIES
CENTER FOR AGRO-BASED INDUSTRY
Jalan Ir. H. Juanda 11, Bogor 16122 Telp. : (0251) 8324088, 8323339 Fax : (0251) 8323339

 **KAN**
Komite Akreditasi Nasional
Laboratorium Penguji
LP-057-IDN

Kepada :
To: DEPARTEMEN KIMIA UI
KAMPUS UI
DEPOK

LAPORAN HASIL UJI
TEST REPORT

Balasan surat /
Permintaan tanggal : -
Reply to your letter/
request dated :

Nomor / Number : 11528/LHU@DIABICAL.1/XI/2010
Nomor Analisis /
Analysis Number : 12553 dari 12554
Nomor Seri /
Serial Number : 11528
Halaman : 1 dari / of 2
Tanggal penerbitan : 19 Nopember 2010
date of issue

Yang bertanda tangan dibawah ini menerangkan, bahwa hasil pengujian
The undersigned attests that the testing of

Contoh : Minyak Goreng - Kode : A & B
Sample (s)

Untuk analisis : Kemas
for analysis

Keterangan contoh : Dikemas dalam botol
Description of sample

Diambil dari : -
Taken from

Oleh : -
by

Tanggal penerimaan contoh : 25 Oktober 2010
Date of sample

Tanggal pelaksanaan analisis : 26 Oktober 2010
Date of analysis

Pengambilan contoh : -
Sampling

adalah sebagai berikut :
The result is as follows :

FAD.04a

HASIL PENGUJIAN INI TIDAK UNTUK DIGANDAKAN
DAN HANYA BERLAKU UNTUK CONTOH-CONTOH
TERSEBUT DIATAS.
PENGAMBILAN CONTOH BERTANGGUNG JAWAB
ATAS KE BENARAN TANDING BARANG.

lanjutan

H A S I L
TEST RESULT

Nomor Seri : 11528
Serial Number

Nomor / Number : 11528/LHU/Bd/ABICAL. 1/ XI / 2010

Nomor Analisis : 12663 dan 12664
Analysis Number

Halaman / Page : 2 Dari / of 2

No. Analisis		12663	12664	Metoda Uji/Teknik
Kode contoh		A	B	
Parameter	Satuan	Hasil		
Komposisi asam lemak :				G C
Asam lemak jenuh :				
Kaprilat (C8)	%	0,09	7,20	
Kaprat (C10)	%	0,13	8,02	
Laurat (C12)	%	0,51	54,1	
Miristat (C14)	%	1,24	17,4	
Palmitat (C16-0)	%	35,5	6,64	
Stearat (C18-0)	%	2,82	1,86	
Asam lemak tidak jenuh :				G C
Oleat (C18-1)	%	41,1	3,99	
Linoleat (C18-2)	%	17,8	0,81	
Linolenat (C18-3)	%	0,78	0,02	

ASLI
ORIGINAL

Laboratorium Analisis dan Kalibrasi
Balai Besar Industri Agro

Analytical and Calibration Laboratories
Center for Agro-Based Industry

Manajer Teknis Pengujian

(Mulhaquddin S, M.Si)

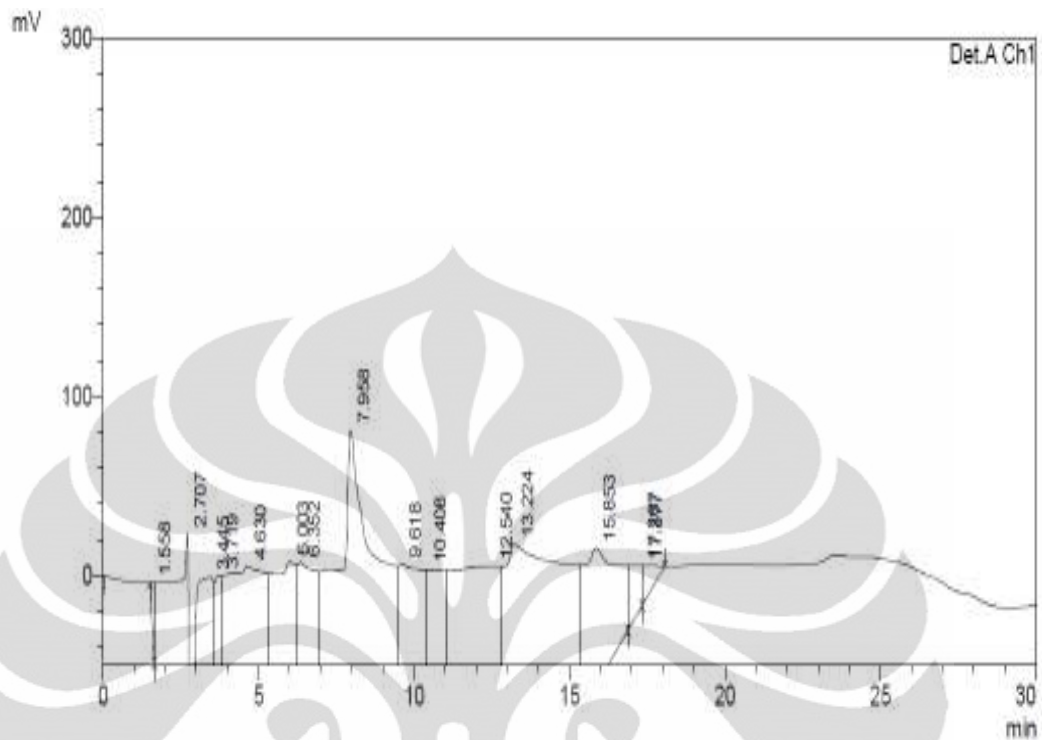
es/ef

HASIL PENGUJIAN INI TIDAK UNTUK DIGANDAKAN
DAN HANYA BERLAKU UNTUK CONTOH-CONTOH
TERSEBUT DIATAS
PENGAMBILAN CONTOH BERTANGGUNG JAWAB
ATAS KEBENARAN TANDING BARANG.

FAD.04a

Universitas Indonesia

Lampiran 7: Hasil Analisis HPLC Ester Sukrosa Hasil Sintesis

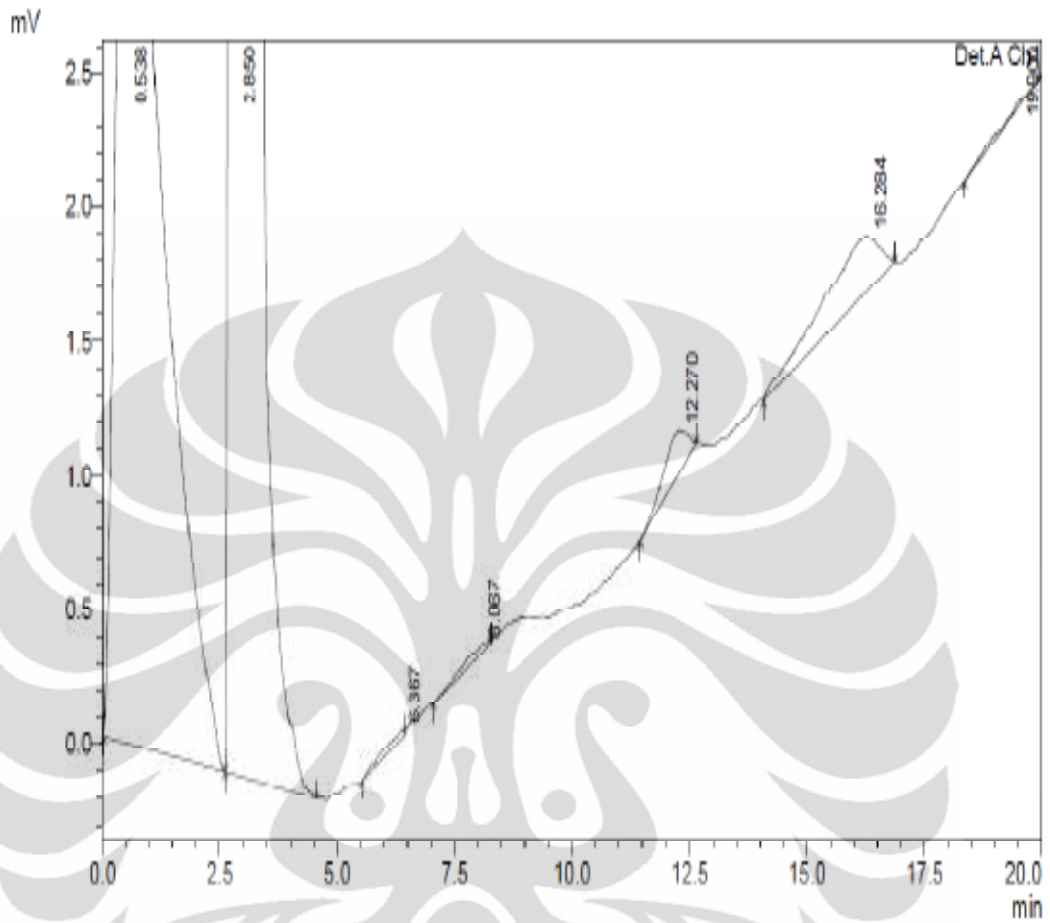


PeakTable

Detector A.Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.558	179704	16853	0.079	0.445
2	2.707	16530280	431354	7.244	11.393
3	3.445	17638000	439882	7.725	11.619
4	3.719	6051527	432570	2.650	11.426
5	4.630	37166808	409833	16.278	10.825
6	6.009	20321188	370248	8.900	9.779
7	6.352	15521715	359537	6.798	9.496
8	7.958	46378843	383975	20.313	10.142
9	9.618	13639612	258686	5.974	6.833
10	10.408	9118795	231728	3.994	6.121
11	12.540	19479998	168342	8.532	4.446
12	13.224	19254821	159770	8.433	4.220
13	15.853	5751873	77417	2.519	2.045
14	17.267	792584	24579	0.347	0.649
15	17.377	490852	21229	0.215	0.561

Lampiran 8: Hasil Analisis HPLC Standar Ester Sukrosa



1 Det.A Ch1/

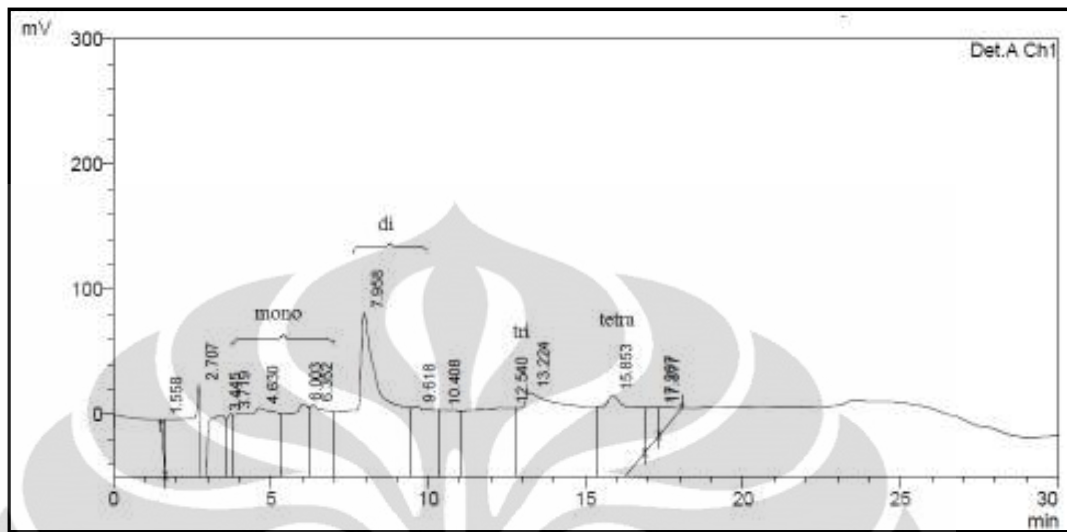
<Results>

PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	0.538	271669	4065	1.530	0.810
2	2.840	17440265	407530	98.300	99.104
3	6.367	1295	30	0.007	0.006
4	8.067	1457	31	0.008	0.006
5	12.270	5862	157	0.033	0.031
6	16.284	18945	203	0.107	0.040
7	19.900	1073	12	0.006	0.002
Total		17759565	502028	100.000	100.000

Lampiran 9: Perhitungan Komposisi Mono-, Di-, Tri-, dan Tetraester Pada Produk Hasil Reaksi



$$\text{Luas area puncak monoester} = 37.166.808 + 20.321.188 = 57.487.996$$

$$\text{Luas area puncak diester} = 46.378.843 + 13.639.612 = 60.018.455$$

$$\text{Luas are puncak triester} = 19.479.998$$

$$\text{Luas area puncak tetraester} = 5.751.873$$

$$\text{Luas total area} = 142.734.722$$

$$\% \text{ ester} = \frac{\text{luas area ester sukrosa}}{\text{luas area total}} \times 100\%$$

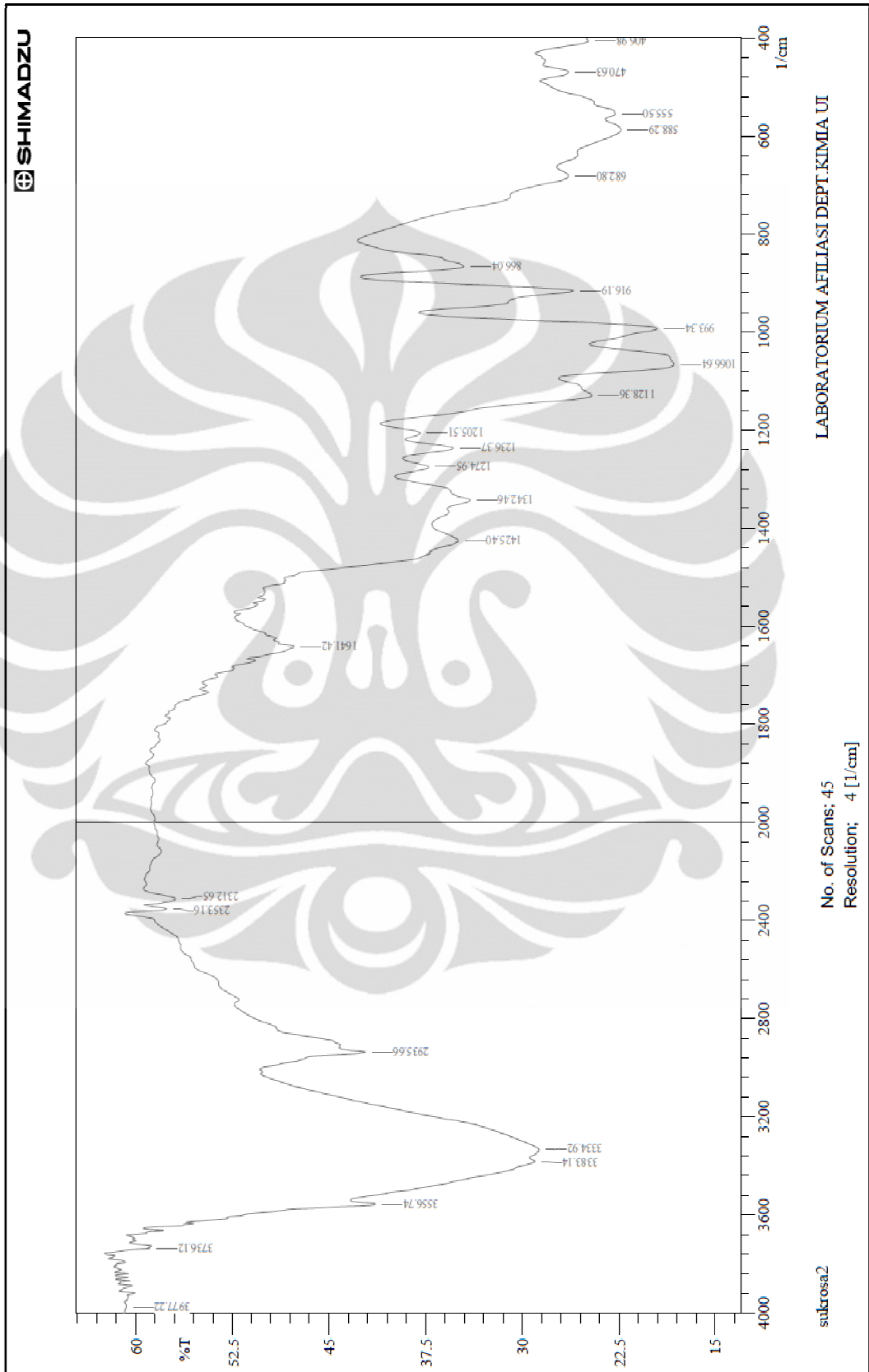
$$\% \text{ monoester} = \frac{57487996}{142734722} \times 100\% = 40,28\%$$

$$\% \text{ diester} = \frac{60018455}{142734722} \times 100\% = 42,05\%$$

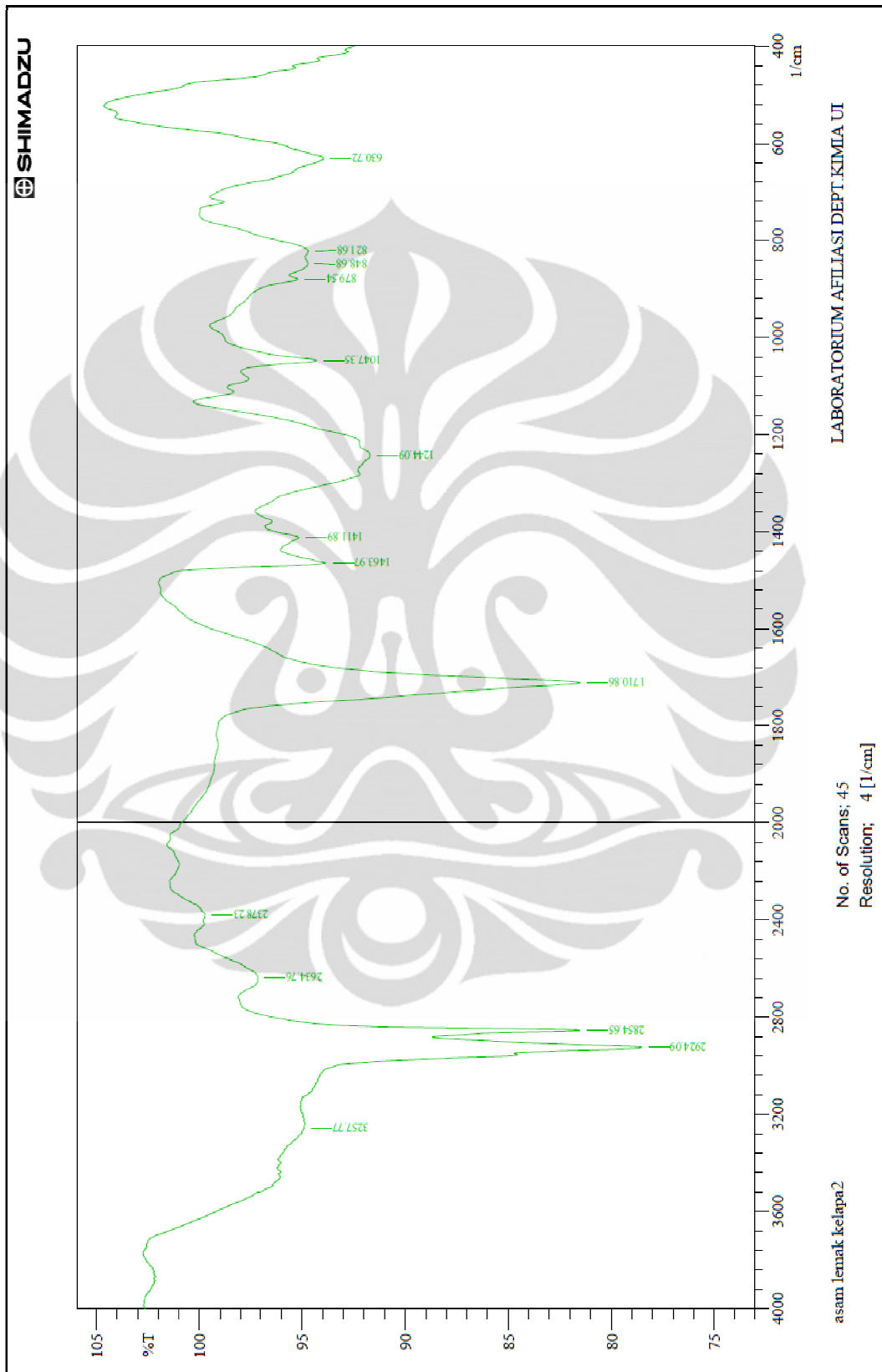
$$\% \text{ triester} = \frac{19479998}{142734722} \times 100\% = 13,65\%$$

$$\% \text{ tetraester} = \frac{5751873}{142734722} \times 100\% = 4,03\%$$

Lampiran 10: Spekrtum FT-IR Sukrosa

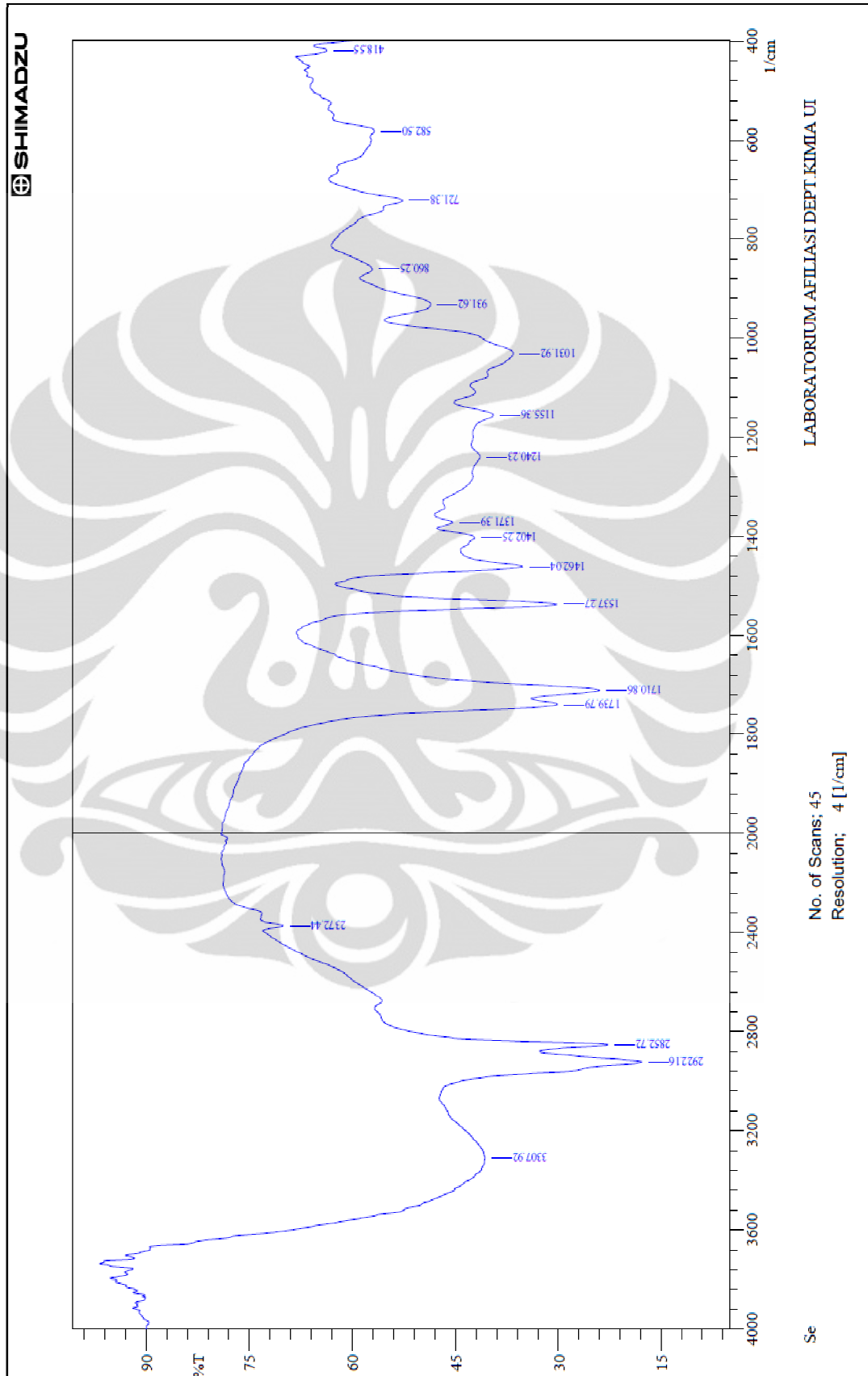


Lampiran 11: Spektrum FT-IR Asam Lemak Minyak Kelapa



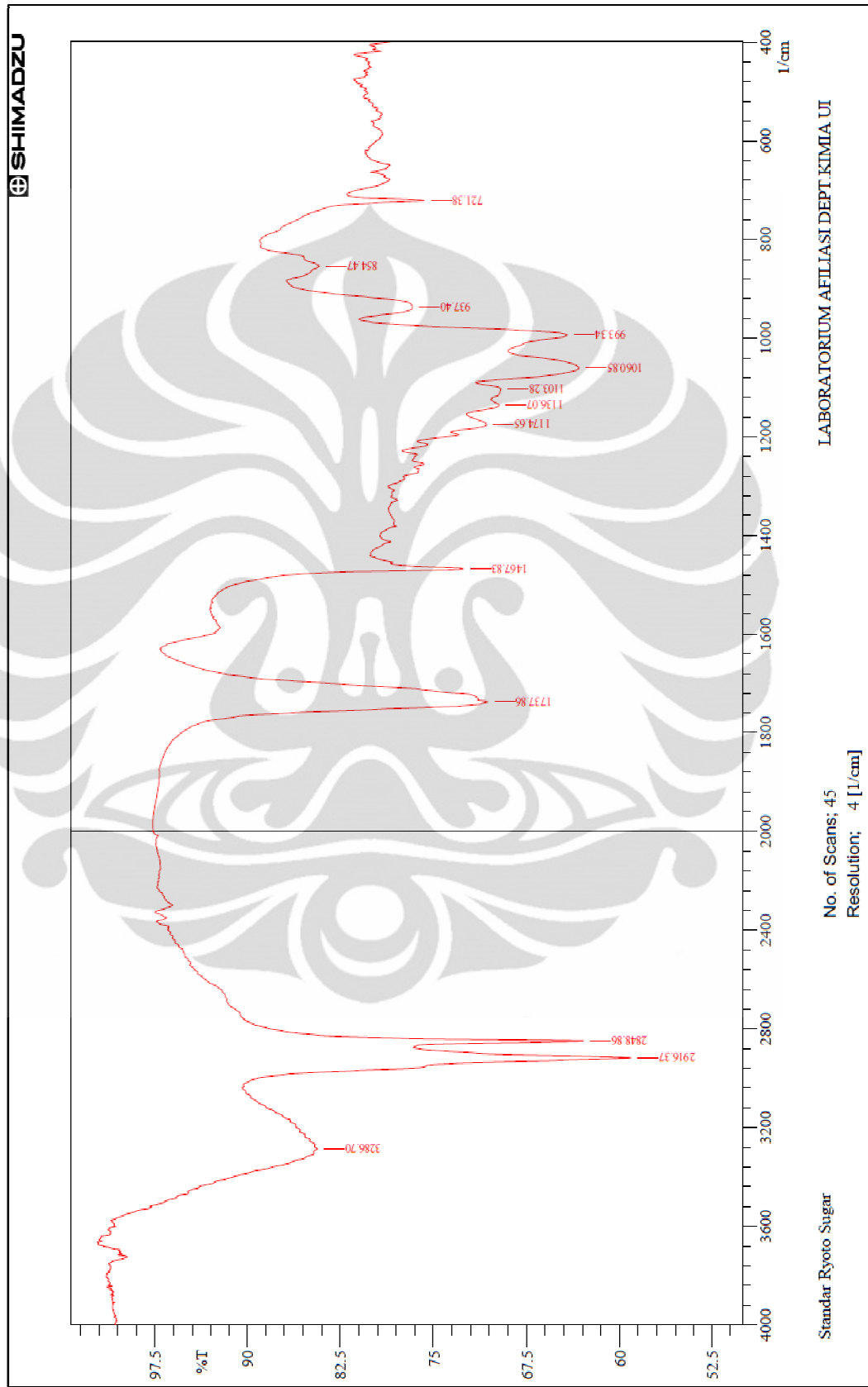
Universitas Indonesia

Lampiran 12: Spektrum FT-IR Ester Asam Lemak Sukrosa Hasil Sintesis



Universitas Indonesia

Lampiran 13: Spektrum FT-IR Standar Ester Sukrosa (*Ryoto Sugar*)



Lampiran 14: Spesifikasi Standar *Ryoto Sugar S-1170*

MITSUBISHI-KAGAKU FOODS CORPORATION

23/9-10

Hsp/10/eg/005

Date: April 18, 2010

To: CBC株式会社

210056

CERTIFICATE OF ANALYSIS of Ryoto Sugar Ester S-1170

Name	Sucrose fatty acid esters
Product Name (Used on Label)	Ryoto Sugar Ester S-1170 ✓
Lot Number	03101111 ✓
Quantity	5,450 KGS
Manufacturing date	March 10, 2010
Best before date	March 09, 2012 ✓

Item	Specification	Result
1 Assay (Mono-, di-, and tri-esters)	Not less than 80.0 %	pass
2 Free sucrose	Not more than 4.0 %*	0.2%
3 Acid value	Not more than 5.0*	1.5
4 Sulfated Ash	Not more than 1.5 %*	0.6%
5 Arsenic (as As ₂ O ₃)***	Not more than 1 mg/kg***	pass
6 Heavy metals (as Pb)***	Not more than 10 mg/kg***	pass
7 Lead	Not more than 2 mg/kg	pass
8 Dimethyl formamide**	Not more than 1 mg/kg	pass
9 Dimethylsulfoxide	Not more than 2 mg/kg	pass
10 Methyl ethyl ketone**	Not more than 10 mg/kg	pass
11 Ethyl acetate**, isopropanol** and propylene glycol**	Not more than 350 mg/kg (singly or in combination)	pass
12 Methanol	Not more than 10 mg/kg	pass
13 Isobutanol	Not more than 10 mg/kg	pass
14 Moisture***	Not more than 4.0 %***	0.3%
15 Color value ***	Not more than 2.0 ***	0.7

* : Lower than that defined in the 51st JECFA (1998)

** : Not used in the manufacturing process

*** : Not defined in the 51st JECFA (1998)

JECFA : Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

MITSUBISHI-KAGAKU FOODS CORPORATION

Mitsumasa Katou

Mitsumasa Katou
General Manager
Quality Assurance Department