



UNIVERSITAS INDONESIA

**ESTERIFIKASI ASAM OLEAT DENGAN STEARIL
ALKOHOL UNTUK MEMPRODUKSI WAX ESTER
MENGUNAKAN BIOKATALIS**

SKRIPSI

**MUHARZA
0706166876**

**FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA
PROGRAM SARJANA
DEPOK
JUNI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**ESTERIFIKASI ASAM OLEAT DENGAN STEARIL
ALKOHOL UNTUK MEMPRODUKSI WAX ESTER
MENGUNAKAN BIODKATALIS**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana teknik

**MUHARZA
0706166876**

**FAKULTAS TEKNIK
PROGRAM STUDI TEKNIK KIMIA
DEPOK
JUNI 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Muharza

NPM : 0706166876

Tanda Tangan : 

Tanggal : 9 Juni 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Muharza
NPM : 0706166876
Program Studi : Teknik Kimia
Judul Skripsi : Esterifikasi Asam Oleat dengan Stearil Alkohol
untuk Memproduksi Wax Ester Menggunakan Biokatalis.

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

DEWAN PENGUJI

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

Penguji : Ir. Rita Arbianti, M.Si ()

Penguji : Tania Surya Utami, ST., MT ()

Penguji : Dr. Eny Kusriani, S.Si ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 28 Juni 2011

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur senantiasa dipanjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas rahmat dan karunia-Nya, makalah skripsi yang berjudul “Esterifikasi Asam Oleat dengan Stearil Alkohol untuk Mendapatkan Wax Ester Menggunakan Biokatalis” dapat diselesaikan. Penulisan makalah skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Teknik Program Studi Teknik Kimia pada Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan hingga penyusunan makalah ini, makalah skripsi ini sangat sulit untuk diselesaikan. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

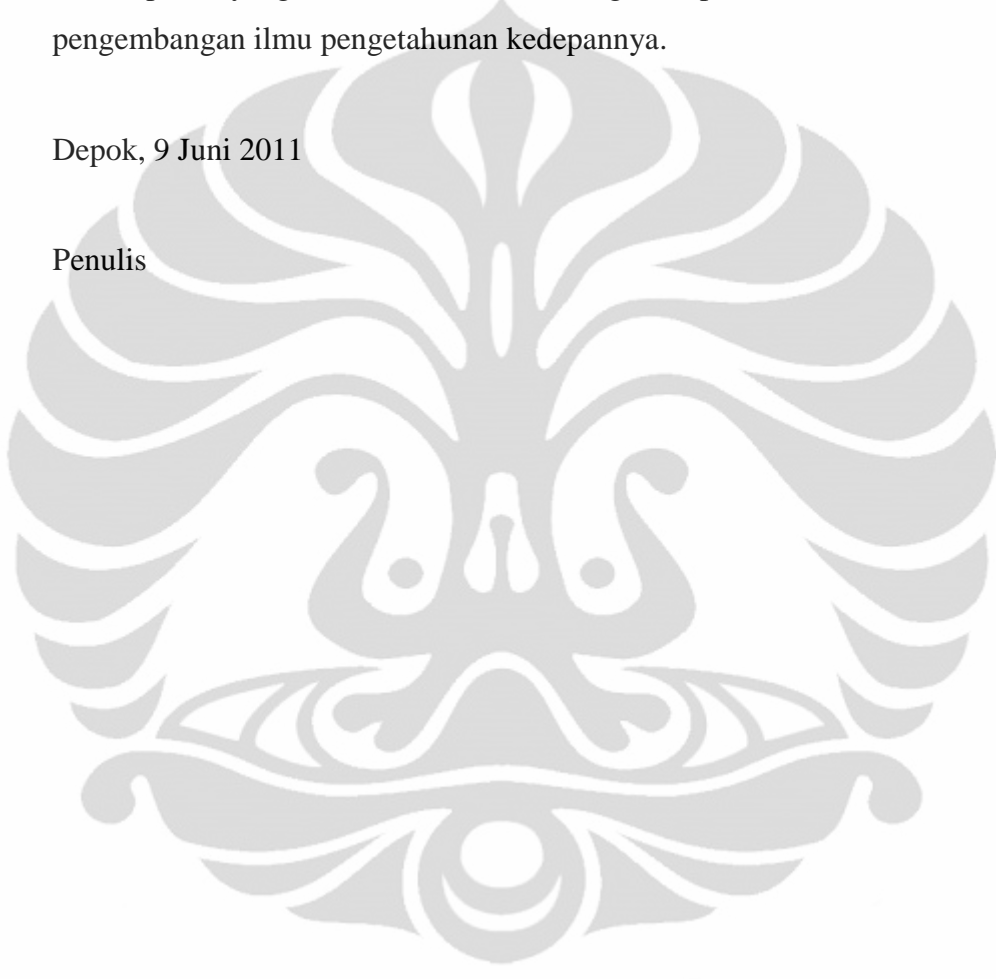
1. Bapak Prof. Dr. Ir. Widodo Wahyu Purwanto, DEA selaku ketua Departemen Teknik Kimia FTUI.
2. Bapak Dr. Heri Hermansyah, ST, M.Eng., selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan dalam penyusunan makalah skripsi ini.
3. Kedua orang tua, Syahrir dan Zaidar, dan keluarga atas kasih sayang kasih sayang, perhatian, bantuan, doa, dan dukungan yang selalu diberikan.
4. Seluruh dosen Departemen Teknik Kimia UI yang telah mengajar dan memberi wawasan sebagai mahasiswa teknik kimia.
5. Rekan yang telah banyak membantu dalam menyelesaikan makalah skripsi ini: Eric dan Felicia (UPH 2007) sebagai teman seperjuangan penelitian esterifikasi dan rekan-rekan penelitian di lantai 4 laboratorium bioproses Irfan, Tangguh, Faris (Tekim 07) dan Elber, Dora, Lalang, Olan (Ekstensi) .
6. Teman-teman Teknik Kimia 2007 atas persahabatan dan dukungan selama kuliah dan penelitian.
7. Semua rekan Tekita, Hadyan Aldio Galih, Ralpy Machio, Buyung Anggi, Tomi Erfando, Alifputra Etienne, dan semua yang tidak bisa disebutin disini, yang membuat jalannya skripsi terasa lebih mudah.
8. Kang Jajat, Mas Eko, Mang Ijal dan Ius atas bantuan teknis dan kerjasamanya selama melakukan penelitian.

9. Mas Taufik, atas bantuannya dalam mencari literatur di perpustakaan serta Mas Sriyono yang membantu dalam administrasi.
10. Pihak-pihak lain yang mendukung dan membantu yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Akhir kata, semoga Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan kedepannya.

Depok, 9 Juni 2011

Penulis



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

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

Nama : Muharza
NPM : 07061766876
Program Studi : Teknik Kimia
Departemen : Teknik Kimia
Fakultas : Teknik
Jenis karya : Skripsi

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

Esterifikasi Asam Oleat dengan Stearil Alkohol untuk Memproduksi Wax Ester Menggunakan Biokatalis.

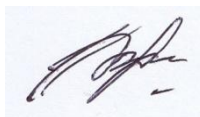
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 9 Juni 2011

Yang menyatakan



(Muharza)

ABSTRAK

Nama : Muharza
Program Studi : Teknik Kimia
Judul : Esterifikasi Asam Oleat dengan Stearil Alkohol untuk Memproduksi Wax Ester Menggunakan Biokatalis

Penelitian ini telah menghasilkan wax ester dengan bahan dasar asam oleat dan stearyl alkohol menggunakan biokatalis berupa enzim *Candida rugosa* lipase (CRL) dan *Porcine pancreatic* lipase (PPL) untuk menggantikan katalis asam yang tidak ramah lingkungan. Variasi yang dilakukan adalah variasi rasio molar reaktan, persentase enzim, dan waktu reaksi dengan menggunakan metode esterifikasi. Variasi yang ada ini dilakukan untuk mempelajari kinerja enzim CRL dan PPL terhadap produksi wax ester dan memperoleh kondisi optimum dari reaksi. Dari variasi yang telah dilakukan didapatkan konversi optimum berturut-turut sebesar 58,25 % dan 20,79 % untuk enzim CRL dan PPL dengan jumlah enzim 4 % dan rasio reaktan 1:1 selama 24 jam reaksi. Kinetika reaksi juga dibuat berdasarkan persamaan *Michaelis-Menten*. Dengan persamaan ini, didapatkan parameter K_m dan v_{max} masing-masing sebesar 3,785 mol/L dan $0,033 \text{ s}^{-1}$ untuk enzim CRL serta 3,139 mol/L dan $0,006 \text{ s}^{-1}$ untuk enzim PPL.

Kata kunci:

Wax ester, *Candida rugosa* lipase, *Porcine pancreatic* lipase, Kinetika *Michaelis Menten*

ABSTRACT

Name : Muharza
Study Program : Chemical Engineering
Title : Esterification of Oleic Acid with Stearyl Alcohol to Produce Wax Ester Using Biocatalyst

This research has produced wax esters synthesis using oleic acid and long chain alcohol (stearyl alcohol) as substrates and *Candida rugosa* lipase (CRL) and *porcine pancreatic* lipase (PPL) as biocatalyst was carried out to replace the acid catalyst that is not environmentally friendly. The effects of various reaction parameters such as molar ratio of substrates, amount of enzyme, and reaction time were investigated by using esterification methods to obtain optimum conditions of reaction. These variations produce optimum conversion of 58,25% and 20,79% for *candida rugosa* lipase and *Porcine pancreatic* lipase with 4% the amount of enzyme and molar ratio 1:1 for 24 hours of reaction. Reaction kinetics were also made on the basis using *Michaelis-Menten* kinetic model. By using this equation, the K_m and v_{max} parameter can be solved with the value of 3,785 mol/L and 0,033 s⁻¹ for *Candida rugosa* and 3,139 mol/L and 0,006 s⁻¹ for *Porcine pancreatic* lipase.

Key words:

Wax ester, *Candida rugosa* lipase, *Porcine pancreatic* lipase, Michaelis-Menten kinetic model

DAFTAR ISI

SKRIPSI.....	1
UNIVERSITAS INDONESIA.....	2
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
BAB 1	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Batasan Masalah.....	3
1.5 Sistematika Penulisan	4
BAB 2	5
2.1 Oleokimia.....	5
2.2 Wax Ester	7
2.3 Proses Sintesis Wax Ester	8
2.4 Asam Oleat.....	9
2.5 Katalis	10
2.6 Mekanisme Reaksi Biokatalisis Wax Ester.....	21
2.7 <i>State of the Art</i>	22
BAB 3	25
3.1 Diagram Alir Penelitian	25
3.2 Variabel dalam Eksperimen (Variabel Bebas dan Terikat).....	26
3.3 Alat dan Bahan	26
3.3.1 Alat Percobaan	26
3.3.2 Bahan Kimia.....	27
3.4 Posedur Penelitian	27
3.4.1 Pra-Eksperimen	27
3.4.2 Eksperimen.....	28

3.4.3 Pasca Eksperimen.....	29
3.5 Skema Reaktor	29
3.6.1 Konversi Asam Oleat	30
3.6.2 Yield Wax Ester	31
3.7 Kinetika Reaksi	32
3.7.1 Persamaan Michaelis-Menten	32
3.7.2 Penentuan Parameter v_{\max} dan K_m	34
3.7.3 Pembuatan Grafik Konsentrasi Substrat dan Produk	35
BAB 4	36
4.1 Reaksi Esterifikasi.....	36
4.1.1 Variasi Rasio Reaktan	38
4.1.2 Variasi Persentase Enzim.....	44
4.1.3 Variasi Waktu.....	49
4.2 Kinetika Reaksi Menggunakan Persamaan <i>Michaelis – Menten</i>	52
4.2.1 Penentuan parameter v_{\max} dan K_m	52
4.2.2 Permodelan dan <i>Fitting</i> Kurva dengan Data Eksperimen.....	54
BAB 5	56
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN.....	59

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1. Pohon Oleokimia.....	6
Gambar 2. 2. Struktur wax ester	7
Gambar 2. 3 Beberapa Cara Modifikasi Ester Asam Lemak yang Bisa digunakan	9
Gambar 2. 4. Struktur molekul asam oleat.....	10
Gambar 2. 5. Produk turunan asam oleat	10
Gambar 2. 6. Contoh strukur lipase	13
Gambar 2. 7 Suhu optimum biokatalis	15
Gambar 2. 8 PH Optimum Biokatalis	16
Gambar 2. 9 Inhibitor kompetitif	16
Gambar 2. 10 Inhibitor non-kompetitif.....	17
Gambar 2. 11 Pengaruh konsentrasi enzim terhadap kecepatan reaksi	17
Gambar 2. 12 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi.....	18
Gambar 2. 13 <i>Candida rugosa</i> lipase.....	18
Gambar 2. 14 Mekanisme reaksi esterifikasi	22
Gambar 3. 1 Diagram alir penelitian.....	25
Gambar 3. 2 Diagram alir eksperimen sampel tanpa enzim	28
Gambar 3. 3 Diagram alir eksperimen sampel dengan enzim	29
Gambar 3. 4 Skema Reaktor pada <i>Shaking Waterbath</i>	30
Gambar 3. 5 Unit Peralatan <i>Shaking Waterbath</i>	30
Gambar 3. 6 Skema reaksi enzimatik dengan satu substrat	32
Gambar 3. 7 Laju reaksi versus konsentrasi substrat untuk reaksi yang mengikuti kinetika Michaelis-Menten.....	34
Gambar 4. 1 Kondisi <i>shaking rate</i> dan <i>temperature</i> dari <i>shaking waterbath</i>	37
Gambar 4. 2 Penempatan tabung reaksi tertutup dalam <i>shaking waterbath</i>	37
Gambar 4. 3 Proses esterifikasi. (a) sebelum proses (b) setelah proses.....	38
Gambar 4. 4 Grafik Pengaruh rasio reaktan asam oleat dan oktanol terhadap konversi dengan enzim CRL.....	39
Gambar 4. 5 Grafik Pengaruh Rasio Reaktan asam oleat stearyl alkohol terhadap Konversi dengan enzim CRL	39

Gambar 4. 6 Grafik Perbandingan Pengaruh Rasio Reaktan yang digunakan terhadap Hasil Konversi.....	40
Gambar 4. 7 Grafik Pengaruh Rasio Reaktan terhadap Konversi. (a) CRL dan (b) PPL.....	42
Gambar 4. 8 Grafik Perbandingan Pengaruh Rasio Reaktan terhadap Konversi dengan Menggunakan CRL dan PPL.....	43
Gambar 4. 9 Grafik Pengaruh % Enzim CRL terhadap Konversi Asam Oleat dengan reaktan asam oleat-oktanol	45
Gambar 4. 10 Grafik Pengaruh % Enzim CRL terhadap Konversi Asam Oleat dengan reaktan asam oleat-stearil alkohol	45
Gambar 4. 11 Grafik Pengaruh % Enzim CRL terhadap Konversi Asam Oleat dengan beda Reaktan.....	46
Gambar 4. 12 Grafik Pengaruh % Enzim terhadap Konversi Asam Oleat. (a) CRL dan (b) PPL	47
Gambar 4. 13 Grafik Perbandingan Pengaruh % Enzim CRL dan PPL terhadap Konversi Asam Oleat	48
Gambar 4. 14 Grafik pengaruh waktu reaksi terhadap konversi yang dihasilkan menggunakan enzim CRL.....	49
Gambar 4. 15 Grafik pengaruh waktu reaksi terhadap konversi yang dihasilkan menggunakan enzim PPL.....	50
Gambar 4. 16 Grafik perbandingan pengaruh waktu reaksi terhadap konversi yang dihasilkan menggunakan enzim CRL dan PPL.....	51
Gambar 4. 17 Linearisasi data untuk mendapatkan nilai v_{max} dan K_m hasil titrasi. (a) CRL dan (b) PPL	53

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 <i>State of the art</i> produksi Wax ester	24
Tabel 4. 1 Hasil perhitungan K_m dan v_{max}	54



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Wax ester merupakan suatu lipid netral yang terdiri dari alkohol alifatik dan asam, dengan kedua gugus yang dimiliki biasanya mempunyai rantai panjang (C_{16} dan C_{18}) atau struktur rantai karbon yang sangat panjang (C_{20} atau lebih) yang banyak terdapat pada bakteri, serangga, mamalia, dan tanaman darat. Wax ester merupakan senyawa yang memiliki banyak kegunaan dalam dunia industri yaitu sebagai komposisi penting dalam formula kosmetik seperti pembersih, kondisioner, pelembab, dan produksi penisilin, pelumas, pembuat plastik, dan pelitur (Fengling et al, 2008). Wax ester terdapat di alam dalam bentuk minyak seperti minyak jojoba maupun dalam bentuk lain seperti sperma ikan paus. Namun, karena kebutuhan yang besar akan ketersediaan wax ester dan terbatasnya sumber wax ester di alam, maka banyak peneliti yang melakukan eksperimen untuk memproduksi ester rantai panjang ini dari berbagai bahan baku (Hermansyah et al, 2009).

Produksi wax ester yang ada dalam industri sekarang ini sudah banyak dilakukan dengan proses esterifikasi dengan menggunakan reaksi sintesis dengan menggunakan katalis enzim sehingga ramah lingkungan menggantikan penggunaan katalis asam yang tidak ramah lingkungan. Proses produksi wax ester banyak yang menggunakan bahan baku dari minyak yang berasal dari tumbuhan seperti dari minyak kelapa sawit yang banyak mengandung ester. Untuk menghasilkan wax ester dapat dilakukan beberapa modifikasi, yaitu modifikasi grup karboksil (Esterifikasi / transesterifikasi), modifikasi rantai asam lemak (hidrogenasi selektif, dimerisasi / oligomerasi), dan modifikasi dalam teknik pembibitan dan penanaman (Susanto, 2008).

Dalam perkembangan yang ada telah dilakukan penelitian untuk memproduksi wax ester (*palm kernel*) dari alkohol rantai panjang (oleyl alcohol) dengan menggunakan enzim lipase (lipozyme) sebagai katalisnya, dengan hasil wax ester yang paling baik dihasilkan pada kondisi optimum adalah $84.4 \pm 2.8 \%$ (Gunawan et al, 2008). Selain itu telah dilakukan juga penelitian mengenai

sintesis wax ester berbahan dasar asam oleat dan alkohol rantai panjang menggunakan katalis *Rhizopus niveous* dalam bentuk immobilisasi (Chen et al, 1996). Penelitian untuk produksi wax ester juga telah dilakukan di Departemen Teknik Kimia Universitas Indonesia yaitu dengan sintesis was ester berbahan dasar asam oleat dan oktanol dengan menggunakan katalis asam heteropoli yang disanggakan pada zeolit alam lampung (Susanto, 2008). Namun, penggunaan katalis asam ini memiliki kekurangan karena tidak ramah lingkungan dan menghasilkan reaksi samping yang tidak diharapkan. Selain itu sintesis wax ester dengan bahan baku asam oleat dan oktanol dengan menggunakan katalis enzim *candida rugosa* lipase yang menghasilkan konversi maksimum sebesar 87,5% (Hermansyah et al, 2009).

Enzim merupakan biokatalis yang diharapkan dapat mengoptimasi kondisi operasi proses dengan mereduksi kebutuhan energi sehingga reaktan dan produk yang dihasilkan juga tidak mengalami kerusakan karena panas (Decagny et al, 1998). Enzim lipase merupakan enzim yang umum digunakan untuk mengkatalisis reaksi hidrolisis, esterifikasi, asidolisis, aminolisis, maupun alkoholisis / transesterifikasi (Rajendran et al, 2009). Spesifitas dan selektivitas enzim merupakan faktor yang penting untuk mengkatalisis suatu reaksi. Pada dasarnya, karena selektivitas lipase inilah yang memungkinkan untuk memperoleh produk yang sulit dihasilkan melalui reaksi kimia konvensional (Salis et al, 2003) sehingga diharapkan dengan digunakannya biokatalis ini dapat mengoptimasi produksi wax ester yang dihasilkan. Pada penelitian-penelitian sebelumnya, enzim digunakan dalam bentuk terimobilisasi dengan disanggakan kepada suatu padatan seperti busa alumina-silika yang dilapisi karbon nanofiber (Kovalenko et al, 2009). Namun Liu et al. telah membandingkan aktifitas lipolitik antara lipase yang berasal dari *Burkholderia sp. C₂₀* terimobilisasi dan tersuspensi (Liu et al, 2007) dan hasilnya ternyata lipase tersuspensi memiliki karakteristik yang lebih baik dalam hal spesifitas.

Berdasarkan pada penelitian-penelitian yang telah dilakukan, maka penelitian yang akan dilakukan ini akan mensintesis wax ester dengan bahan dasar asam oleat dan stearyl alkohol dengan menggunakan biokatalis enzim lipase

dengan membandingkan kinerja enzim *Porcine pancreatic* lipase dan enzim *Candida rugosa* lipase.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana mendapatkan produk wax ester berbahan baku asam oleat dan stearil alkohol melalui metode esterifikasi menggunakan biokatalis enzim *Porcine pancreatic* lipase dan *Candida rugosa* lipase sebagai pengganti katalis asam maupun basa yang umumnya digunakan dan melihat kinerja biokatalis tersebut dalam memproduksi wax ester.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dari penelitian ini adalah:

1. Memperoleh produk wax ester berbahan baku asam oleat dan stearil alkohol dalam skala laboratorium.
2. Mengetahui kinerja biokatalis enzim *Porcine pancreatic* lipase dan *Candida rugosa* lipase dalam mendapatkan produk wax ester.
3. Menyelidiki faktor-faktor yang mempengaruhi fraksi wax ester menggunakan biokatalis dan mendapatkan kondisi optimum dari reaksi.
4. Menyelidiki mekanisme reaksi enzimatik untuk reaksi esterifikasi asam oleat dan stearil alkohol menggunakan enzim *Candida rugosa* lipase dan *Porcine pancreatic* lipase.

1.4 Batasan Masalah

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

1. Sumber asam lemak bebas yang digunakan sebagai bahan baku utama adalah asam oleat.
2. Biokatalis yang digunakan adalah *Candida rugosa* lipase dan *Porcine pancreatic* lipase tersuspensi.
3. Reaktor yang digunakan adalah reaktor *batch* berupa tabung reaksi berukuran 10 mL yang diletakkan dalam *shaking waterbath*.

4. Parameter yang ingin didapatkan dalam penelitian ini adalah konversi, yield dan kinetika berupa K_m dan v_{max} .

1.5 Sistematika Penulisan

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

BAB I : PENDAHULUAN

Bab ini terdiri dari latar belakang dilakukannya esterifikasi untuk mendapatkan sintesis wax ester, rumusan permasalahan bagaimana mendapatkan produk wax ester, tujuan dilakukannya penelitian, batasan masalah dalam melakukan penelitian, dan sistematika penulisan.

BAB II : TINJAUAN PUSTAKA

Bab ini berisi tinjauan tentang penjelasan umum yang diperlukan mengenai *State of the art* yang terdiri dari penelitian-penelitian yang telah dilakukan untuk mendapatkan sistesis wax ester dan teori-teori tentang penjelasan umum tentang oleokimia, wax ester, proses produksi wax ester di industri, asam oleat, biokatalis, dan reaksi esterifikasi.

BAB III : METODE PENELITIAN

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

BAB IV : HASIL DAN PEMBAHASAN

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

BAB V : KESIMPULAN

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

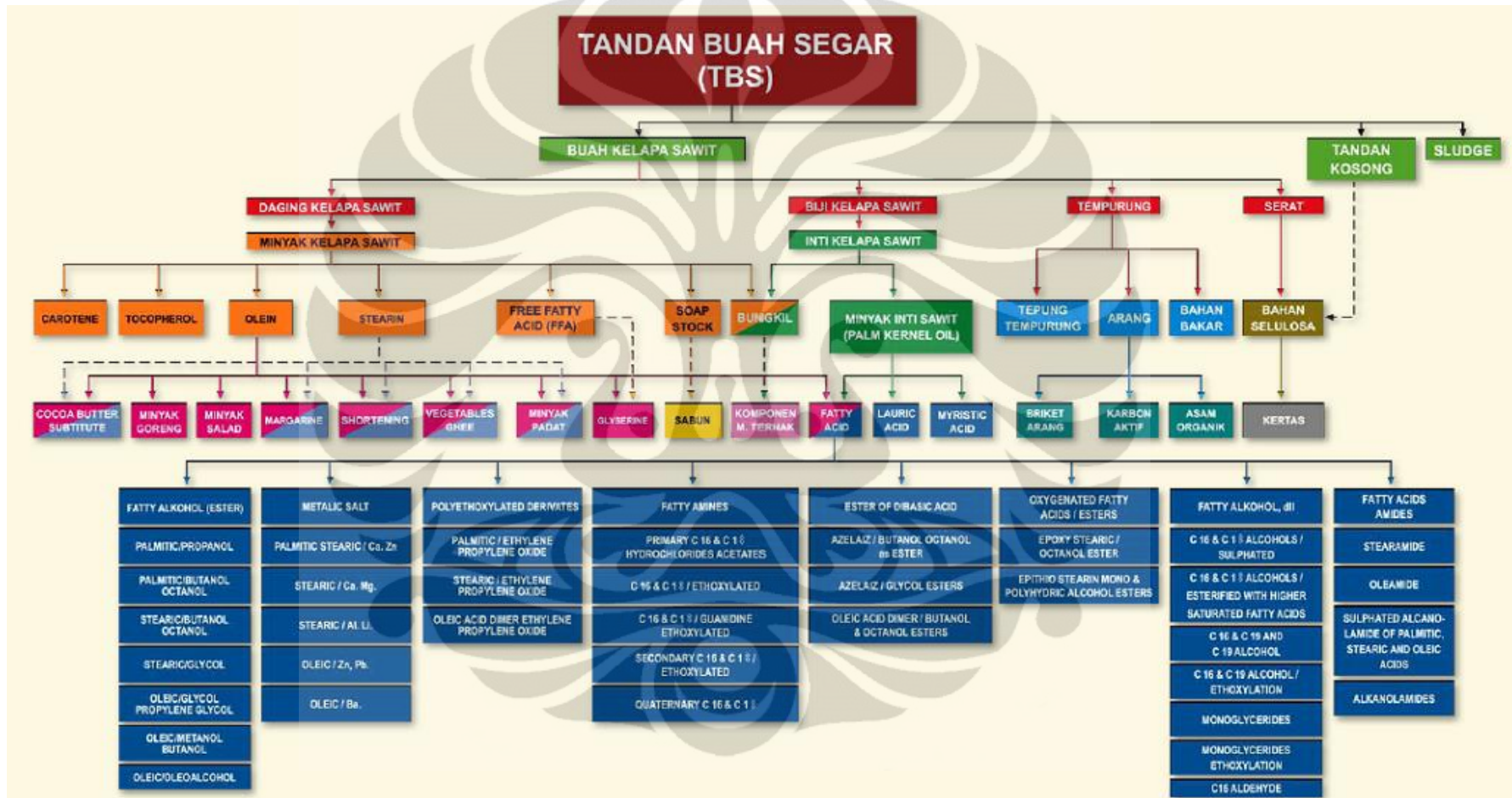
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Oleokimia

Oleokimia merupakan bagian dari ilmu kimia yang mempelajari tentang proses pengolahan asam lemak dan gliserin serta derivatnya baik yang dihasilkan dari minyak seperti gliserida juga hasil sintesis dari produksi etilena dan propilena serta industry petrokimia (Rahmi, 2006).

Sumber oleokimia yang berasal dari ester gliserida minyak atau lemak alami bisa berasal dari minyak kacang kedelai, biji bunga matahari, kelapa sawit, inti sawit, kelapa, alpukat, biji kapas, lemak sapi, lemak babi, minyak ikan paus, biji karet, kemiri, jarak, serta berbagai sumber lainnya. Oleokimia alami merupakan senyawa kimia yang berasal dari minyak dan tumbuh-tumbuhan yang diperoleh dengan cara saponifikasi diikuti hidrolisis sehingga menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol. Produk oleokimia dasar yang utama adalah asam lemak, ester asam lemak, alkohol asam lemak, amina asam lemak, serta gliserol yang merupakan produk samping yang juga tidak kalah penyingnya. Sedangkan oleokimia sintetis yang berasal dari petrokimia misalnya pembuatan alkohol asam lemak dari etilena serta gliserin dari propilena. Diantara produk-produk tersebut asam lemak merupakan bahan oleokimia yang terpenting dan sering digunakan dalam reaksi modifikasi kimia untuk menghasilkan berbagai macam produk turunan dengan berbagai aplikasi industrial yang berbeda. Asam lemak banyak digunakan dalam pembuatan sabun, produk-produk karet, kosmetika, lilin, dan juga bahan baku untuk produksi turunan amina asam lemak. Disisi lain aplikasi gliserol pada industri oleokimia juga sangat luas, ynga digunaka pada produk kosmetika, farmasi, bahan peledak, serta monogliserida yang digunakan sebagai bahan pengemulsi. Hingga saat ini, umumnya sebagian produk oleokimia diaplikasikan sebagai surfaktan dan produk-produk kosmetika, serta produk pencuci atau pembersih, baik untuk kebutuhan rumah tangga, maupun industri seperti tekstil, plastic, pertambangan, dan pengolahan limbah cair pabrik (Rahmi, 2006).



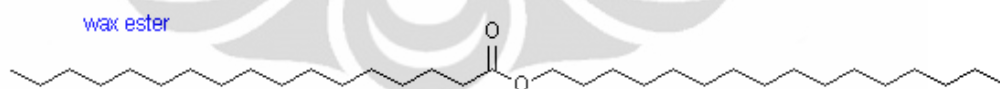
Gambar 2. 1. Pohon Oleokimia (Moniaga, 2009)

Universitas Indonesia

Aplikasi yang paling umum untuk proses oleokimia adalah produksi biodiesel. Dalam industri oleokimia, asam lemak dan alkohol (umumnya metanol) mengalami proses esterifikasi untuk membentuk metil ester. Aplikasi lain yang umum dalam industri oleokimia adalah dalam produksi deterjen, produk perawatan pribadi, produksi pelumas, *green solvent*, dan bioplastik.

2.2 Wax Ester

Wax ester adalah suatu lipid netral yang terdiri dari alkohol alifatik dan asam, dengan kedua gugus yang dimiliki biasanya mempunyai rantai panjang (C_{16} dan C_{18}) atau struktur rantai karbon yang sangat panjang (C_{20} atau lebih). Wax ester ini banyak terdapat pada bakteri, serangga, mamalia, dan tanaman darat dan merupakan komposisi penting untuk berbagai aplikasi industri. Dalam dunia industri wax ester merupakan komposisi penting dalam formula kosmetik seperti pembersih, kondisioner, pelembab, dan sebagai agen anti penyabunan dalam produksi penisilin, pelumas, pembuat plastik, dan pelitur. Wax ester terdapat di alam dalam bentuk minyak seperti minyak jojoba maupun dalam bentuk lain seperti sperma ikan paus. Pada tumbuhan, wax ester kebanyakan ditemukan di lapisan permukaan kutikula, tetapi wax ester juga terdapat dalam konsentrasi tinggi pada minyak dalam biji dari beberapa spesies tanaman, termasuk jojoba (*Simmondsia chinensis*), yang merupakan sumber komersial utama senyawa tersebut. (Fengling et al, 2008)



Gambar 2. 2. Struktur wax ester

Aplikasi dari wax ester sangat umum digunakan dalam dunia industri. Wax ester merupakan bahan yang penting dalam formulasi kosmetik seperti pembersih, conditioner dan sebagai bahan pelembab dalam industri industri. Selain itu wax ester biasa digunakan sebagai agen antifoaming dalam produksi penisilin dan dalam produksi tablet obat-obatan di industri farmasi. Aplikasi

umum dari produk was ester ini juga digunakan sebagai bahan pelumas, plastik dan bahan polesan (Ryantyn erin, 2008).

2.3 Proses Sintesis Wax Ester

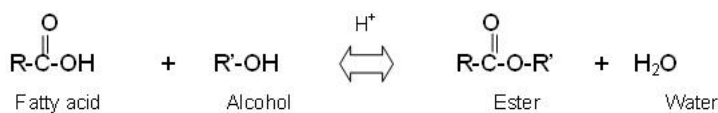
Wax ester banyak didapatkan dari bahan alam dalam bentuk minyak baik yang berasal dari tumbuhan maupun hewan. Untuk proses produksi wax ester banyak yang menggunakan minyak yang berasal dari tumbuhan seperti dari minyak kelapa sawit yang banyak mengandung ester. Untuk menghasilkan wax ester, ada beberapa modifikasi yang dapat dilakukan, yaitu (Susanto, 2008):

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

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

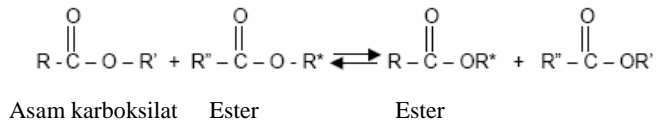
Ester asam lemak sering dimodifikasi baik untuk bahan makan maupun untuk bahan surfaktan, pelumas, aditif, detergen dan lain sebagainya. Modifikasi ester asam lemak dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu :

- a. Esterifikasi

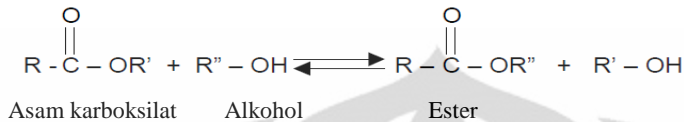


Universitas Indonesia

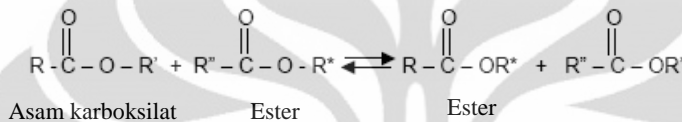
b. Interesterifikasi



c. Alkoholisis



d. Asidolisis

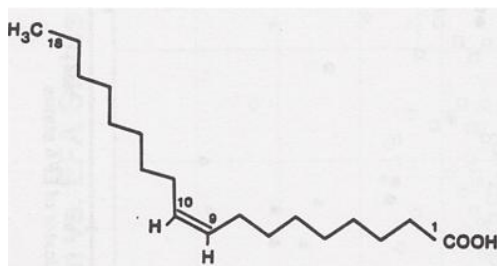


Gambar 2. 3 Beberapa Cara Modifikasi Ester Asam Lemak yang Bisa digunakan (Juliati, 2002)

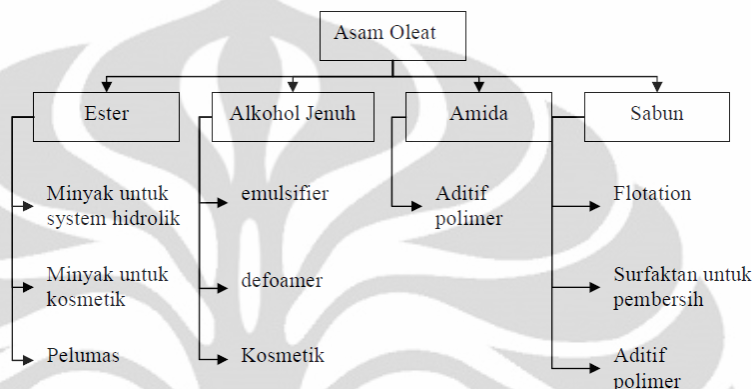
Dari berbagai metode di atas, metode yang paling sering digunakan untuk mensintesis wax ester adalah esterifikasi dan alkoholisis.

2.4 Asam Oleat

Asam oleat atau asam Z-9-oktadekenoat merupakan asam lemak tak jenuh yang banyak terkandung dalam minyak zaitun. Asam ini tersusun dari 18 atom C dengan satu ikatan rangkap di antara atom C ke-9 dan ke-10. Asam lemak ini pada suhu ruang berupa cairan kental dengan warna kuning pucat atau kuning kecokelatan. Asam ini memiliki aroma yang khas. Ia tidak larut dalam air, titik leburnya 15.3 °C dan titik didihnya 360 °C. Asam oleat memiliki rumus kimia $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CHCH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ atau $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$. Asam oleat banyak digunakan dalam farmasi sebagai eksipien dan juga banyak digunakan sebagai agen pengemulsi atau pelarut dalam produk aerosol. Struktur asam oleat dapat dilihat pada gambar 2.4, sedangkan produk turunan yang dapat dihasilkan dari asam oleat diperlihatkan pada Gambar 2.5.



Gambar 2. 4. Struktur molekul asam oleat (NIST Chemistry Webbook)



Gambar 2. 5. Produk turunan asam oleat

2.5 Katalis

Katalis adalah suatu bahan kimia yang dapat meningkatkan laju reaksi tanpa bahan tersebut ikut bereaksi; dan pada akhir reaksi, bahan tersebut tetap dalam bentuk awal tanpa terjadi perubahan kimia. Penggunaan katalis dapat menurunkan tingkat aktivasi energi yang dibutuhkan, membuat reaksi berjalan lebih cepat atau pada suhu yang lebih rendah.

Berdasarkan cara reaksinya, katalis dapat dibagi menjadi dua tipe, homogen dan heterogen. Pada reaksi homogen, katalis memiliki fasa yang sama dengan reaktannya. Katalis homogen umumnya bereaksi dengan satu atau lebih pereaksi untuk membentuk suatu perantara kimia yang selanjutnya bereaksi membentuk produk akhir reaksi, dalam suatu proses yang memulihkan katalisnya. Sedangkan dalam reaksi heterogen, katalis memiliki fasa yang berbeda dengan reaktan. Pada reaksi ini, awalnya akan terjadi adsorpsi reaktan pada permukaan aktif katalis, selanjutnya akan terjadi interaksi baik berupa reaksi sebenarnya pada permukaan katalis, atau terjadi pelemahan ikatan dari molekul yang terjep

(teradsorp). Setelah reaksi terjadi, produk dilepas dari permukaan katalis. Oleh karena itu, katalis yang baik perlu memiliki kemampuan menjerap dan melepaskan yang baik.

2.5.1 Biokatalis

Biokatalisis merupakan penggunaan katalis alam, seperti enzim protein, untuk melakukan transformasi kimia dari senyawa organik. Biokatalis, yang berupa enzim, sel mikroba (hidup atau mati), yang terikat dalam matriks atau bebas, secara tradisional telah digunakan untuk mengkonversi bahan baku yang berasal dari bahan organik atau bahan baku yang terbarukan. Namun, pemanfaatannya terus meluas, sehingga digunakan juga untuk mengolah material yang berasal dari bahan bakar fosil. Pemanfaatannya juga begitu beragam, dari biotransformasi senyawa khiral secara enzimatis untuk produksi obat sampai sintesis wax ester. Secara umum, enzim digunakan sebagai biokatalis dalam beragam reaksi, seperti hidrolisis, transesterifikasi, dan lain-lain (Sukara, 2008).

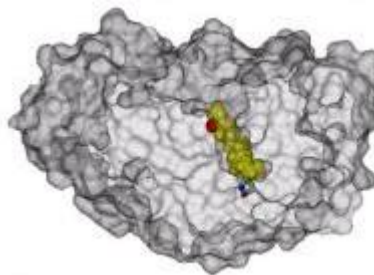
Dalam proses produksi wax ester dari asam oleat dan alkohol menggunakan biokatalis dengan menggunakan reaksi esterifikasi, katalis yang digunakan adalah katalis yang digunakan adalah katalis bio yang ramah lingkungan. Biokatalis yang digunakan dalam proses produksi wax ester ini menggunakan biokatalis yang umumnya digunakan yaitu enzim lipase dalam keadaan tersuspensi. Pengembangan biokatalis ini dilakukan untuk menggantikan penggunaan katalis asam maupun basa yang selama ini banyak digunakan namun memiliki kekurangan karena tidak ramah lingkungan.

2.5.1.1 Lipase

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

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

Selektivitas yang tinggi dan kondisi operasi yang ringan menjadikan enzim lipase sangat baik untuk mensintesis beragam produk alami, farmasi, bahan makanan, dan pelumas bio. Alasan utama penggunaan enzim ini adalah meningkatnya ketertarikan dan permintaan akan produk yang berasal dari alam dan ramah lingkungan (*biodegradable*). Selain itu Lipase mempunyai beberapa kelebihan bila dibandingkan dengan katalis lain. Lipase mempunyai spesifikasi dan stereoselektivitas reaksi relatif tinggi, sangat stabil pada pelarut organik dan menunjukkan substrat ketegasan yang luas. Bull *et al.* (1999) menambahkan bahwa lipase mempunyai sifat lebih ramah lingkungan bila dibandingkan dengan katalis lainnya, terutama katalis logam toksik. Lipase mempunyai peranan penting dalam mewujudkan proses dan produk industri yang ramah lingkungan. Kemampuan untuk didegradasi oleh alam yang tinggi merupakan kelebihan sekaligus kekurangan dari penggunaan enzim ini. *Biodegradability* enzim dapat membuat produk seperti pelumas bio terurai lebih cepat daripada pelumas biasa yang menggunakan katalis jenis lain. Sayangnya, kemampuan ini juga menjadikan produk menjadi lebih mudah kadaluarsa, karena sifat enzim sebagai makhluk hidup.



Gambar 2. 6. Contoh struktur lipase (Protein Data Bank)

Walaupun enzim lipase memiliki banyak kelebihan sebagai biokatalis, namun ada beberapa faktor yang perlu diperhatikan dengan penggunaannya dalam proses esterifikasi agar diperoleh hasil yang maksimal. Faktor-faktor yang mempengaruhi esterifikasi dengan media enzim antara lain sifat dasar substrat, pelarut, stabilitas termal, peran air dalam katalisis dengan media lipase.

1.) Sifat dasar substrat

Lipase menunjukkan tingkat selektivitas terhadap substrat yang berinteraksi dengannya. Rintangan sterik (percabangan, ketidakjenuhan, dan panjang rantai) dan efek elektronik dari substrat merupakan dua faktor utama yang menentukan selektivitas. Dalam reaksi esterifikasi, banyak lipase menunjukkan selektivitas yang tinggi untuk asam lemak berantai panjang dan sedang dibandingkan dengan yang berantai pendek dengan satu cabang. Kebanyakan lipase menunjukkan selektivitas terhadap asam karboksilat.

2.) Sifat dasar pelarut

Kebanyakan informasi mengenai katalisis enzim seperti laju reaksi, aspek kinetik dan mekanistik dipelajari dalam bentuk larutan. Ketika enzim terdispersi dalam pelarut organik, mereka memperlihatkan perubahan sifat. Pelarut organik mempengaruhi laju reaksi, kecepatan maksimum (V_{max}), aktivitas spesifik (K_{cat}), afinitas substrat (K_M), konstanta spesifitas (K_{cat} / K_M) enantio-selektivitas, stabilitas lipase dan stereo serta regio-selektivitas. Perbedaan aktivitas enzim pada larutan yang berbeda bisa jadi lebih disebabkan tingkat variabel dari hidrasi enzim yang dipengaruhi pelarut daripada efek langsung dari enzim atau substrat.

3) Stabilitas Termal

Banyak faktor yang menentukan aktivitas katalitik dan stabilitas operasional lipase pada suhu yang lebih tinggi dalam media tak berair. Dua di antaranya yang terpenting menyangkut sifat alami media organik yang digunakan dan kandungan air dalam lingkungan mikro enzim. Ada beberapa laporan mengenai termostabilitas lipase pada media berair. Lipase yang berasal dari *Pseudomonas fluorescens* 33 menjadi 10-20% lebih aktif selama proses pemanasan hingga 60-90°C selama 10 menit ketika kasein dan Ca^{2+} terbentuk.

4) Peran air dalam katalisis dengan media lipase

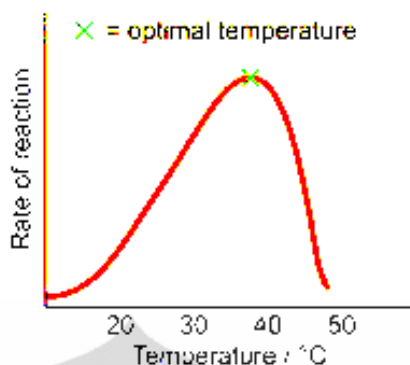
Air memainkan peranan penting dalam reaksi reversible yang dikatalisis menggunakan lipase. Ketika hanya terdapat jumlah air yang sangat sedikit, air tersebut sangat penting digunakan untuk mempertahankan konformasi enzim, sedangkan kelebihan air akan memfasilitasi hidrolisis. Air yang terbatas sangat penting untuk menstabilkan konformasi lipase dalam media tak berair.

2.5.1.2 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Lipase

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

1. Suhu

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



Gambar 2.7 Suhu optimum biokatalis

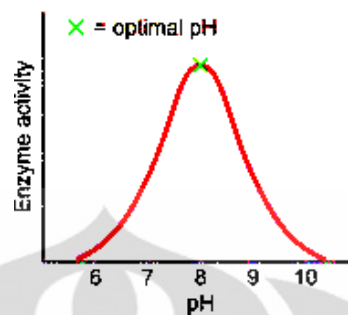
Pada kurva di atas dapat dilihat bahwa suhu optimum reaksi yang dikatalisis enzim adalah 40°C . Di atas suhu tersebut, produk yang dihasilkan menurun. Peningkatan suhu di atas suhu optimum menyebabkan putusya ikatan hidrogen dan ikatan lain yang merangkai molekul enzim, sehingga enzim mengalami denaturasi.

Denaturasi adalah rusaknya bentuk tiga dimensi enzim yang menyebabkan enzim tidak dapat lagi berikatan dengan substratnya (Gambar 2.8). Denaturasi menyebabkan aktivitas enzim menurun atau hilang. Denaturasi umumnya bersifat *irreversible* (tidak dapat kembali). Namun, enzim-enzim yang langka seperti RNAase dapat mengalami renaturasi setelah mengalami denaturasi. Renaturasi adalah kembalinya bentuk enzim yang rusak ke bentuk sebelum rusak. Suhu optimal enzim bergantung pada lamanya pengukuran kadar yang dipakai untuk menentukannya. Semakin lama suatu enzim dipertahankan pada suhu dimana strukturnya sedikit labil, maka semakin besar kemungkinan enzim tersebut mengalami denaturasi.

2. pH (Derajat Keasaman)

Derajat keasaman (pH) juga mempengaruhi aktivitas enzim. Perubahan kondisi asam dan basa di sekitar molekul enzim mempengaruhi bentuk tiga dimensi enzim dan dapat menyebabkan denaturasi enzim. Setiap enzim memiliki pH optimum. Sebagai contoh, pepsin (enzim yang bekerja di dalam lambung) memiliki pH optimum sekitar 2 (sangat asam), sedangkan amilase (enzim yang

bekerja di mulut dan usus halus) memiliki pH optimum sekitar 7,5 (agak basa). Gambar dibawah ini menunjukkan pH optimum dari biokatalis.



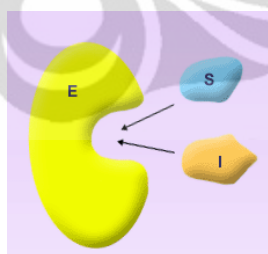
Gambar 2. 8 PH Optimum Biokatalis

3. Aktivator

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

4. Inhibitor

Inhibitor adalah zat yang dapat menghambat kerja enzim. Penghambatan kerja enzim dibedakan menjadi penghambatan reversibel dan penghambatan ireversibel. Selain itu, ada pula inhibitor kompetitif dan inhibitor non-kompetitif. Inhibitor kompetitif adalah molekul penghambat yang cara kerjanya bersaing dengan substrat untuk mendapatkan sisi aktif enzim. Contohnya sianida bersaing dengan oksigen untuk mendapatkan hemoglobin dalam rantai respirasi terakhir. Inhibitor kompetitif dapat diatasi dengan cara penambahan konsentrasi substrat.

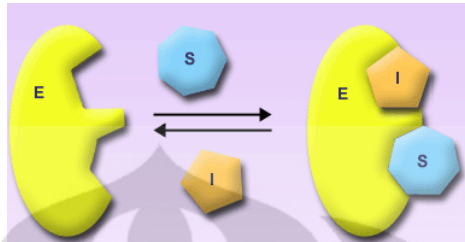


Gambar 2. 9 Inhibitor kompetitif (Molson, 2008)

Inhibitor non kompetitif adalah suatu zat yang menghambat kerja enzim dengan cara berikatan dengan enzim tetapi bukan pada active sidenya, karena inhibitor tidak memiliki kesamaan dengan struktur substrat, maka peningkatan

Universitas Indonesia

konsentrasi substrat umumnya tidak menghilangkan inhibitor tersebut. Banyak racun yang bekerja sebagai inhibitor non kompetitif terhadap aktivitas enzim, antara lain ion logam berat, iodasetamida, dan zat-zat pengoksidatif.



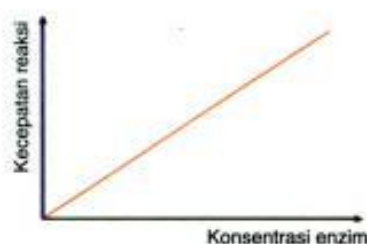
Gambar 2. 10 Inhibitor non-kompetitif (Molson, 2008)

Berdasarkan sifat ikatan enzim-inhibitor dibagi menjadi dua jenis yaitu inhibitor reversibel dan inhibitor irreversibel. Inhibitor reversibel dapat berikatan dengan enzim bebas maupun kompleks enzim substrat, terikat pada tempat yang berbeda dengan pengikatan substrat dan dapat menurunkan kadar enzim yang aktif. Inhibitor irreversibel dapat berikatan dengan enzim secara irreversibel dan dapat merubah konformasi enzim atau *active site*, sehingga enzim menjadi inaktif.

5. Konsentrasi Enzim

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

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



Gambar 2. 11 Pengaruh konsentrasi enzim terhadap kecepatan reaksi

6. Konsentrasi Substrat

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



Gambar 2. 12 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi

2.5.2 *Candida Rugosa* Lipase

Candida sp. Merupakan organisme yang tergabung di dalam kingdom fungi. Kelas taksonomi lengkapnya sebagai berikut :

<i>Kingdom</i>	: <i>Fungi</i>
<i>Phylum</i>	: <i>Ascomycota</i>
<i>Subphylum</i>	: <i>Ascomycotina</i>
<i>Class</i>	: <i>Ascomycetes</i>
<i>Order</i>	: <i>Saccharomycetales</i>
<i>Family</i>	: <i>Saccharomycaceae</i>
<i>Genus</i>	: <i>Candida</i>
<i>Species</i>	: <i>Candida rugosa</i>



Gambar 2. 13 *Candida rugosa* lipase (Protein Data Bank)

Candida sp. Merupakan fungi yang hampir tersebar di seluruh dunia. Biasanya hidup berkoloni pada kulit manusia, daun, bunga, air, tanah, dan membran mukosa. Genus *Candida* terdiri dari 154 spesies yang sudah diketahui. Sebagian besar dari mereka umumnya bersifat patogen dan dapat menginfeksi manusia. Beberapa yang paling berbahaya adalah *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, dan *Candida glabrata*. Infeksi yang disebabkan *Candida* adalah *Candidiasis*. Namun ada juga beberapa spesies yang tidak patogen. Salah satunya adalah *Candida rugosa*. Telah dilaporkan oleh *Food Standards Australia New Zealand* (FSANZ) pada 5 oktober 2005 bahwa *Candida rugosa* adalah organisme nonpatogen. Lipase yang dihasilkan dari organisme ini merupakan lipase yang dapat menyerang ketiga gugus lemak pada rantai trigliserida.

Koloni *Candida* sp. berupa krim berwarna kekuningan, tumbuh dengan cepat dan matang dalam tiga hari. *Candida* sp. termasuk dalam golongan *yeast* atau ragi. Ragi merupakan kelompok fungi yang penting. Fungi, sama seperti bakteri tersebar banyak di alam, meskipun mereka biasanya hidup di tanah dan pada daun yang relatif lembab dibanding tempat hidup bakteri. Fungi tidak dapat mengambil energi dari sinar matahari. Walaupun kebanyakan fungi memiliki morfologi yang relatif kompleks, ragi dapat dibedakan karena merupakan mikroorganisme bersel satu dan berukuran panjang dari 5 sampai 30 μm dan lebar 1 hingga 5 μm . *Candida rugosa* lipase biasanya digunakan secara luas untuk reaksi katalitik yang mana termasuk hidrolisis non spesifik dan sterospesifik, kebalikan dari hidrolisis melalui esterifikasi.

Pemurnian dan karakteristik dari berbagai macam lipase yang berasal dari *yeast* (*Candida rugosa*, *Candida antarctica*) dapat menjadi lebih kompleks di dalam biologi molekuler. *Candida rugosa* lipase dan *G. Candidum* telah dilakukan studi secara bersamaan sejak kedua jenis lipase tersebut menunjukkan persamaan-persamaan dalam berbagai aspek. Kedua lipase tersebut memiliki perbedaan dalam *lipase encoding genes* (lipase pseudogene family), yang mana dapat dihitung untuk membedakan rangkaian urutan asam amino dan kemungkinan untuk sifat-sifat enzimatik dan biokimia.

2.5.3 *Porcine Pancreatic Lipase*

Porcine pancreatic lipase adalah enzim yang tersebar yang mengkatalisis hidrolisis lemak dan minyak. Aktivitas lipase terjadi dipermukaan air-lemak, yang merupakan karakteristik struktural yang unik dari kelas enzim ini. *Porcine pancreatic* lipase telah dimurnikan dari porcine pankreas dari prosedur yang diadaptasi oleh Verger *et al.* *Porcine pancreatic* dipisahkan dari lipid dan enzim proteolytic dengan menggunakan *diisopropyl fluorophospat* yang diperlukan untuk mencegah ketidaksabilan lipase di dalam langkah-langkah pemurnian selanjutnya.

Porcine pancreatic lipase termasuk dalam *ester hydrolase*, memiliki kecenderungan menghidrolisis trigliserida dalam emulsi, dalam misel dan dalam film monomolekular. Sejak *Porcine pancreatic* menunjukkan kinerja dapat mengkatalisis lipid, karena memiliki permukaan adsorpsi, permukaan aktivasi, dan permukaan katalisis, studi tentang penggunaan enzim *Porcine pancreatic* lipase sebagai biokatalis berkembang dengan pesat. Perilaku enzim tersebut pada substrat dapat menyebabkan sistem enzimatik dapat digunakan untuk studi interaksi lipid dan protein sebagai enzim kompleks pada lingkungan yang lebih kompleks. Persyaratan untuk studi enzim *Porcine pancreatic* seperti interaksi pada preparasi penentuan komposisi dari lipase, karakteristik kimia dari *Porcine pancreatic* lipase sebagai glikoprotein yang mengandung manosa dan glukosamin.

Porcine pancreatic lipase adalah suatu enzim yang larut dalam air dan merupakan suatu glikoprotein yang berfungsi sebagai kunci dalam mengabsorpsi lemak dengan menghidrolisis trigliserida ke dalam digliserida dan kemudian ke dalam monogliserida dan asam lemak bebas.

Sejauh ini struktur kimia enzim *Porcine pancreatic* lipase telah ditemukan dengan berisi rantai tunggal M, sebanyak 50.000. Rantai ini berisi empat *methionine* residu dan menghasilkan lima peptida. Peptida ini telah dimurnikan dan diurutkan. Hasil penelitian dari J.D. Bianchetta tentang *Porcine pancreatic* lipase melaporkan bahwa pada tiga peptida *cyanogen* bromida yang pertama terbentuk berisi adalah CNI, CNII, CNIII termasuk 234 asam amino dari jumlah total yang terdiri sekitar 460 untuk keseluruhan rantai dan *Porcine pancreatic*

Universitas Indonesia

lipase juga berisi dua kelompok *sulphydryl* dimana kelompok ini tidak termasuk dalam kelompok *active site* dari *Porcine pancreatic lipase* dan senyawa non esensial *tyrosine* yang bereaksi dengan *diisopropyl-phosphorofluorida*.

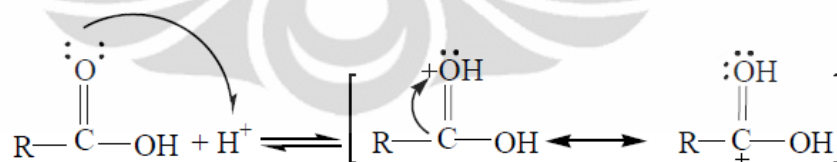
Berikut kelas taksonomi lengkap *Porcine pancreatic*:

<i>Fold</i>	: <i>Lipase</i>
<i>Super family</i>	: <i>Lipase</i>
<i>Class</i>	: <i>All beta protein</i>
<i>Family</i>	: <i>Colipase-binding domain</i>
<i>Domain</i>	: <i>Pancreatic lipase C-terminal domain</i>
<i>Species</i>	: <i>Pig</i>
<i>Architecture</i>	: <i>3-layer Sandwich</i>
<i>Molecular function</i>	: <i>Catalytic activity, hydrolase activity</i>
<i>Biological process</i>	: <i>Lipid metabolic process</i>

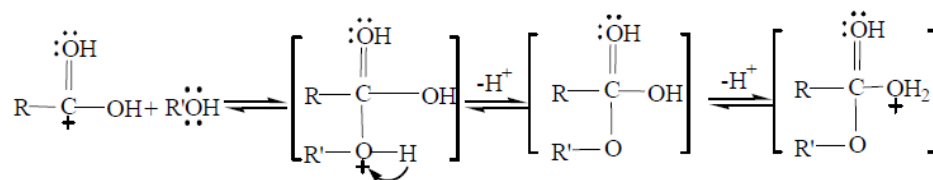
2.6 Mekanisme Reaksi Biokatalisis Wax Ester

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

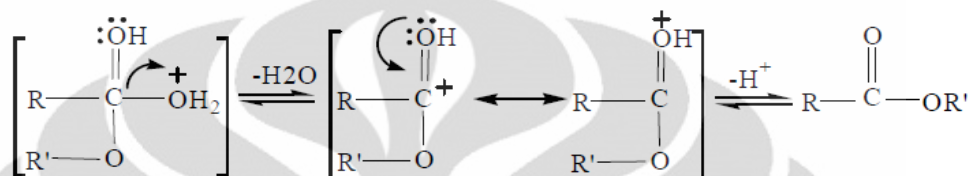
1. Oksigen karbonil diprotonisasi oleh asam. Disini terjadi Transfer proton dari katalis asam ke atom oksigen karbonil, sehingga meningkatkan elektrofilitas dari atom karbon karbonil



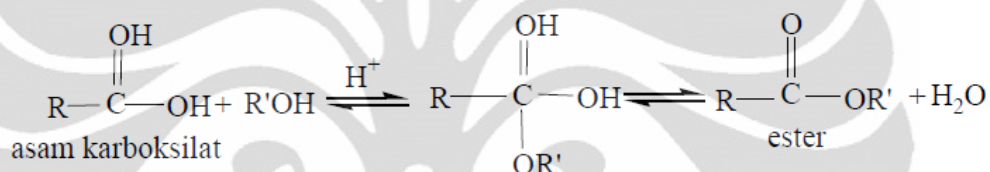
2. Alkohol nukleofilik menyerang karbon positif, di mana atom karbon karbonil kemudian diserang oleh atom oksigen dari alkohol, yang bersifat nukleofilik sehingga terbentuk ion oksonium. Terjadi pelepasan proton dari gugus hidroksil milik alkohol, menghasilkan kompleks teraktivasi.



3. Protonasi terhadap salah satu gugus hidroksil, yang diikuti oleh pelepasan molekul air menghasilkan ester (eliminasi molekul air diikuti penarikan H⁺ oleh H₂O)



Tahapan reaksi diatas dapat dirangkum menjadi sebagai berikut :



Gambar 2. 14 Mekanisme reaksi esterifikasi (Fessenden, 1990)

2.7 State of the Art

Berbagai penelitian telah dilakukan dalam proses produksi wax ester dengan reaksi esterifikasi dari berbagai sumber bahan baku dengan menggunakan berbagai katalis baik biokatalis dan katalis asam maupun basa. Sebelumnya, proses esterifikasi untuk sintesis wax ester banyak dilakukan dengan menggunakan katalis asam, penggunaan katalis homogen yang konvensional pada reaksi-reaksi senyawa organik seperti AlCl₃, BF₃, H₂SO₄, dan lain-lain kurang menguntungkan, karena dapat menimbulkan dampak yang serius bagi lingkungan reaksi baik toksisitas yang tinggi, korosi akibat pengeluaran asam buangan, juga biasanya diakibatkan adanya kesulitan-kesulitan untuk memisahkan katalis dari produk dan penanggulangannya. Penelitian menggunakan katalis asam pernah dilakukan di Departemen Teknik Kimia UI untuk mendapatkan sintesis wax ester berbahan dasar asam oleat dan oktanol dengan menggunakan katalis asam heteropoli yang disanggakan pada zeolit alam lampung dimana didapatkan

konversi asam oleat maksimum sebesar 80.73% (Susanto, 2008). Sedangkan katalis konvensional lain seperti resin penukar ion (Amberlyst-15) hanya dapat digunakan pada suhu di bawah 100°C karena memiliki stabilitas termal yang rendah. Oleh karena itu, saat ini telah banyak dikembangkan juga penelitian sintesis ester melalui esterifikasi asam karboksilat dengan alkohol menggunakan enzim lipase.

Enzim lipase sekarang lebih sering digunakan untuk sintesis wax ester karena keunggulannya dalam selektivitas sehingga reaksi samping dapat dihindari. Lipase dari *Candida antarctica* (Novozym 435) telah digunakan oleh beberapa peneliti untuk mensintesis ester rantai panjang dari berbagai bahan dasar, seperti triolein (Hadzir, 2000), asam oleat (Mat Radzi, 2005), serta asam lemak dari tanaman crambe dan camelina (Steinke, 2001). Enzim ini berhasil menghasilkan yield wax ester hingga >95% (Steinke, 2001; Mat Radzi, 2000). Bahkan yield >90% masih dapat dihasilkan untuk penggunaan Novozym sebanyak 9 kali (Mat Radzi, 2000). Beberapa peneliti lain telah mensintesis wax ester melalui transesterifikasi lemak maupun minyak nabati dari kelapa sawit (Gunawan, 2008), menggunakan lipozyme. Sedangkan Decagny telah membandingkan unjuk kerja beberapa jenis enzim lipase dalam sintesis ester rantai panjang berbahan dasar triolein. Lipase dari *Alcaligenes* sp. menunjukkan hasil paling baik dengan yield >50% selama 5 jam reaksi (Decagny, 1998). Sintesis wax ester dengan menggunakan bahan baku asam oleat dan berbagai macam alkohol primer juga pernah dilakukan dalam sebuah *batch stirred tank reactor* dengan menggunakan katalis enzim lipozyme IM dalam keadaan immobilisasi (Maja Habulin, 1996). Selain itu, sintesis wax ester berbahan dasar asam oleat dan alkohol rantai panjang menggunakan katalis *Rhizopus niveous* dalam bentuk immobilisasi juga telah dilakukan (Chen, 1996). Sintesis wax ester juga dilakukan kembali di Departemen Teknik Kimia UI penelitian dengan bahan baku asam oleat dan oktanol dengan menggunakan katalis enzim *candida rugosa* lipase dan menghasilkan konversi maksimum sebesar 87,5% (Hermansyah, 2009).

Penelitian kali ini akan menggunakan *Candida rugosa* lipase dan PPL tersuspensi sebagai biokatalis untuk menghasilkan wax ester dari asam oleat

Universitas Indonesia

melalui rute esterifikasi. Untuk lebih memahami *state of the art* dan posisi penelitian ini, maka disajikan tabel 2.1 berikut:

Tabel 2. 1 *State of the art* produksi Wax ester

Katalis		Rute	
		Transesterifikasi	Esterifikasi
Asam	HPW/Z		Susanto, 2008
	Amberlyst-15		Fumin, 2006
Biokatalis Enzim Lipase	Novozym	Hadzir, 2000	Mat Radzi, 2005; Steinke, 2001
	Lipozyme	Laudani, 2006; Gunawan, 2008; Suhendra, 2008 M, Hadzir et al, 2000	
	<i>Candida rugosa</i>		Hermansyah, 2009
	Alcaligenes sp.	Decagny, 2001	
	<i>C. viscosum</i>		
	<i>M. javanicus</i>		
	<i>P. fluorescens</i>		
	PPL	Decagny, 2001;	
	<i>Candida rugosa</i> PPL		Penelitian yang akan dilakukan
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PPL	Tsujita, 1999	
<i>R. niveus</i>	Ping Chen et al, 1996		
Lipase AH Lipase Ps-C	M, Hadzir et al, 2000		

BAB 3 METODE PENELITIAN

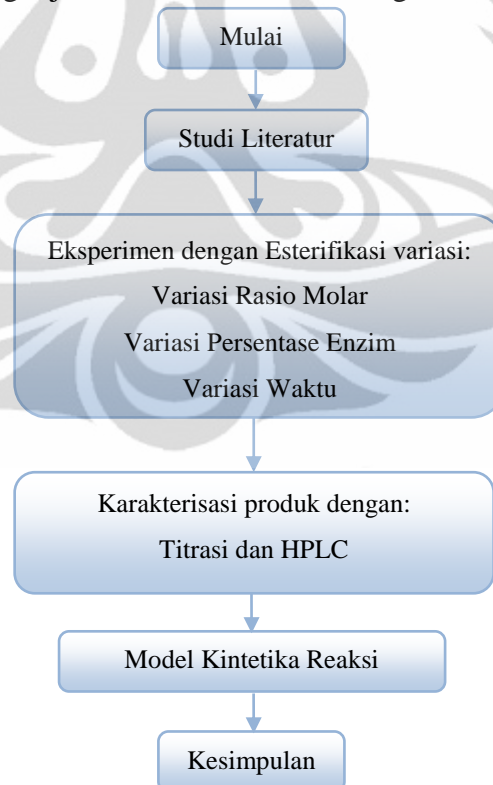
3.1 Diagram Alir Penelitian

Rancangan penelitian yang dijalankan bertujuan untuk membandingkan hasil sintesis wax ester berbahan baku asam oleat dan alkohol dengan menggunakan katalis enzim PPL dan *Candida rugosa* lipase dalam bentuk tersuspensi. Dari penelitian ini diharapkan dapat dihasilkan konversi optimum dari sintesis wax ester dengan menggunakan komposisi bahan baku dan katalis yang tepat.

Penelitian yang akan dilakukan ini memiliki beberapa tahap, yaitu:

1. Perparasi sampel
2. Reaksi esterifikasi
3. Karakterisasi produk (uji HPLC)

Penelitian yang dijalankan terlihat dalam diagram alir penelitian berikut:



Gambar 3. 1 Diagram alir penelitian

3.2 Variabel dalam Eksperimen (Variabel Bebas dan Terikat)

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

1. Rasio reaktan (Asam Oleat : Stearil Alkohol)

Perbandingan reaktan antara asam oleat dengan stearyl alkohol dibuat bervariasi mulai dari 1:1 (stoikiometrik), 1:2, 1:3, dan 1:6 dengan penambahan 4 % Enzim CRL dan PPL untuk reaksi selama 24 jam.

2. Persentase Enzim terhadap Jumlah Asam Oleat Tetap

Persentase enzim CRL dan PPL terhadap asam oleat bervariasi antara 0 – 4%. Perbandingan reaktan asam oleat dan stearyl alkohol 1:1 dengan reaksi berlangsung selama 24 jam.

3. Variasi Waktu

Pengambilan sampel dilakukan antara selang waktu 0 – 21 jam, yaitu 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 18, dan 21 jam.

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

1. Konversi reaktan.
2. Yield produk.
3. Parameter Kinetika (K_m dan V_{max})

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat Percobaan

Peralatan yang digunakan pada percobaan ini adalah sebagai berikut:

- | | |
|---|------------------|
| - Botol kaca 250 mL | - Neraca digital |
| - Tabung reaksi | - Spatula besi |
| - Gelas beaker | - Kaca arloji |
| - Gelas ukur | - Stopwatch |
| - Pipet | - Stereofoam |
| - Labu Erlenmeyer | - Termometer |
| - Reaktor (Tabung reaksi dalam <i>shaking waterbath</i>) | |
| - Labu ukur 250 mL | - Buret |
| - HPLC | - Sentrifuge |

Universitas Indonesia

3.3.2 Bahan Kimia

1. Katalis berupa enzim PPL dan *Candida rugosa* lipase dalam bentuk berbentuk tersuspensi, dibeli dari Biocatalysts dengan aktivitas hidrolitik 8000 U/g (Pontypridd, United Kingdom).

2. Reaktan :

Asam oleat *technical grade*

BM = 282,4614 g/mol Berat jenis = 0.895 g/cm³

Titik didih = 360 °C

Stearil Alkohol *technical grade* dengan spesifikasi berikut:

BM = 270.48 g/mol Berat jenis = 0,8124 g/cm³

Titik didih = 210.5°C

Bahan kimia lainnya:

- | | |
|--------------------------------|-----------------|
| a. KOH | b. Etanol 96 % |
| c. Aquadest (H ₂ O) | d. Indikator PP |
| e. Hexane | |

3.4 Posedur Penelitian

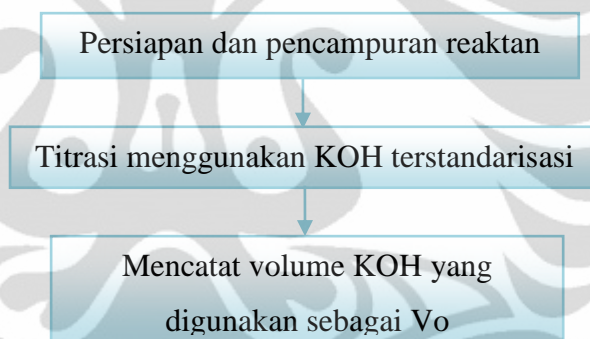
3.4.1 Pra-Eksperimen

1. Mempersiapkan alat dan bahan yang akan digunakan untuk eksperimen, termasuk mengeset kecepatan dan suhu *shaking waterbath* agar sesuai dengan kondisi operasi yang diinginkan.
2. Membuat larutan KOH 0,1 M, dengan cara sebagai berikut:
 - 1) Menimbang KOH seberat 1,4 gram.
 - 2) Melarutkannya dalam 250 mL etanol 96% dalam labu ukur (penambahan etanol dilakukan secara bertahap agar KOH dapat terlarut sempurna).
 - 3) Larutan KOH kemudian dimasukkan ke dalam buret sebagai titran.
3. Standarisasi larutan KOH, dengan cara sebagai berikut:
 - 1) Melarutkan 0,1 gram asam KHP dalam 10 mL aquades.

- 2) Larutan asam KHP kemudian diberi 3 tetes indikator PP kemudian dititrasi menggunakan larutan KOH.
- 3) Volume KOH untuk menitrasi asam KHP kemudian dicatat dan akan digunakan untuk menghitung konsentrasi aktual KOH.

3.4.2 Eksperimen

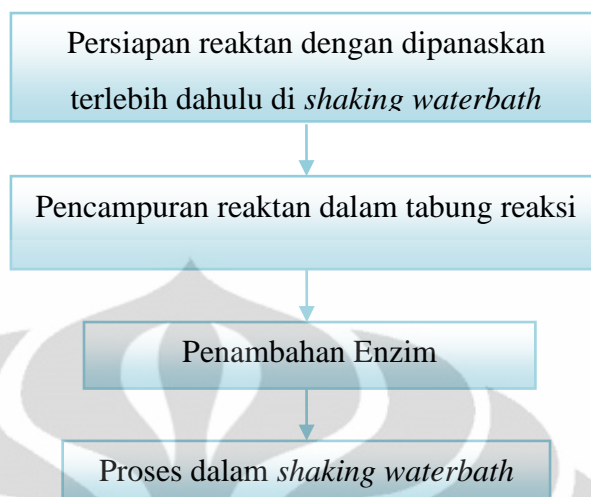
1. Sampling awal (tanpa enzim).
 - 1) Sejumlah asam oleat, stearil alkohol, dan hexane dicampur, kemudian ditambahkan indikator PP ke dalamnya.
 - 2) Sampel kemudian dititrasi menggunakan larutan KOH yang telah distandarisasi.
 - 3) Volume KOH yang digunakan untuk menitrasi sampel dicatat untuk dimasukkan ke dalam perhitungan (V_0).



Gambar 3. 2 Diagram alir eksperimen sampel tanpa enzim

2. Eksperimen menggunakan enzim, dengan cara sebagai berikut:
 - 1) Asam oleat, stearil alkohol, dan hexane (jumlah sesuai variabel) masing-masing dihangatkan terlebih dahulu dalam *shaking waterbath* agar suhunya sesuai kondisi operasi.
 - 2) Ukur suhunya dengan thermometer untuk memastikan suhu operasi telah tercapai.
 - 3) Kedua reaktan dicampurkan dalam tabung reaksi dan dicampurkan dengan hexane sebagai pelarut stearil alkohol, kemudian ditambahkan enzim (jumlah sesuai variabel).

- 4) Tabung reaksi dimasukkan ke dalam *shaking waterbath*.



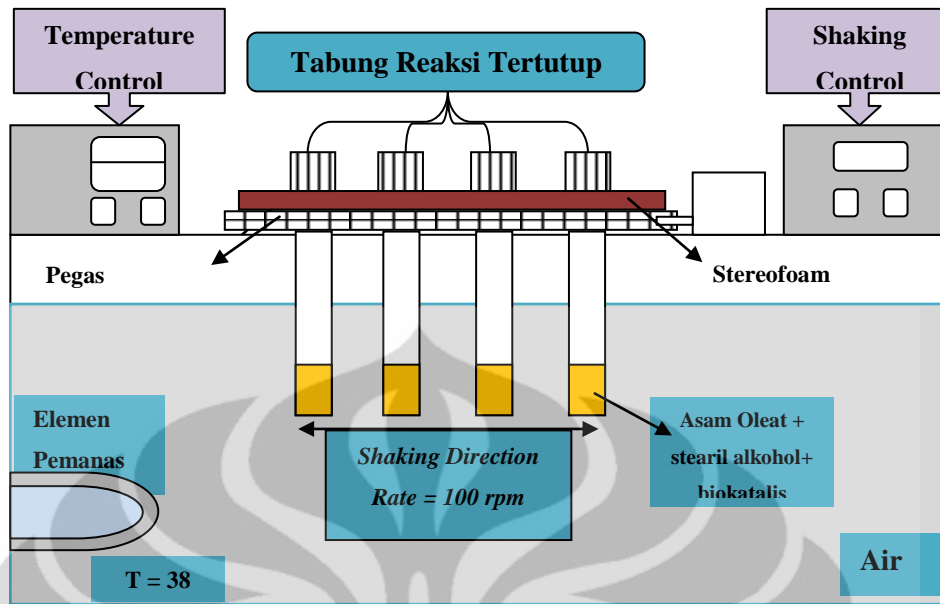
Gambar 3. 3 Diagram alir eksperimen sampel dengan enzim

3.4.3 Pasca Eksperimen (Titrasi Sampel)

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

3.5 Skema Reaktor

Dalam eksperimen ini reaktor yang digunakan adalah Reaktor yang digunakan adalah tabung reaksi tertutup berukuran 10 mL yang dimasukkan dalam *shaking waterbath*. *Stereofom* digunakan untuk menjaga posisi tabung reaksi selama proses *shaking* agar tidak terlepas. Skema dari reaktor yang digunakan dalam eksperimen esterifikasi asam oleat ini terlihat dalam gambar 3.4 dan gambar peralatan yang digunakan terlihat dalam gambar 3.5.



Gambar 3. 4 Skema Reaktor pada *Shaking Waterbath*



Gambar 3. 5 Unit Peralatan *Shaking Waterbath*

3.6.1 Konversi Asam Oleat

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

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

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

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

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

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

Keterangan:

V_0 = Volume KOH untuk menitrasi sampel tanpa enzim (mL)

V_t = Volume KOH untuk menitrasi sampel dengan enzim (mL)

3.6.2 Yield Wax Ester

Untuk mengetahui % yield sintesis wax ester yang dihasilkan maka analisa dapat dilakukan dengan menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatograph*). Penggunaan HPLC didasari sifat fasa sampel yang berbentuk liquid. Banyaknya (%) yield sintesis wax ester yang terbentuk dilihat dari kandungan oktil-oleatnya. Namun, pada kenyataannya hasil dari reaksi tidak hanya menghasilkan oktil oleat melainkan juga metil oleat, triolein, diolein, dan monoolein. Komponen oleat digunakan karena mewakili jumlah komponen asam lemak terbesar di dalam kandungan trigliserida. Tes analisa sampel menggunakan HPLC yang dilakukan di PUSPITEK (Pusat Penelitian dan Teknologi), Serpong, Tangerang.

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

Keterangan:

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

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

Dari tahapan-tahapan percobaan ini maka akan diperoleh data berupa konversi reaktan dan yield produk dengan beberapa variasi yang diinginkan. Dari data-data ini, kemudian akan dibuat grafik yang menunjukkan pengaruh variabel bebas terhadap variabel terikat, sehingga akan didapatkan kondisi operasi

Universitas Indonesia

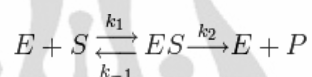
optimum untuk menghasilkan produk wax ester berbahan dasar asam oleat dan alkohol yang dilakukan.

3.7 Kinetika Reaksi

3.7.1 Persamaan Michaelis-Menten

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

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



Gambar 3. 6 Skema reaksi enzimatik dengan satu substrat

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

k_1 : konstanta laju reaksi pembentukan enzim-substrat kompleks

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

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

C_s : Konsentrasi substrat

C_p : Konsentrasi produk

C_{ES} : Konsentrasi kompleks substrat-biokatalis

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

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

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

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

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

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

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

Dengan pengaturan ulang, didapatkan

$$C_{ES} = \frac{k_1 C_S C_{E,total}}{k_{-1} + k_2 + k_1 C_S} \quad (3.8)$$

Laju pembentukan produk, dC_p/dt atau v dinyatakan sebagai $k_2 C_{ES}$,

sehingga $v = k_2 C_{ES} = \frac{k_1 k_2 C_S C_{E,total}}{k_{-1} + k_2 + k_1 C_S}$ (3.9)

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

atau $v = \frac{k_2 C_S C_{E,total}}{K_m + C_S}$ (3.10)

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

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

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

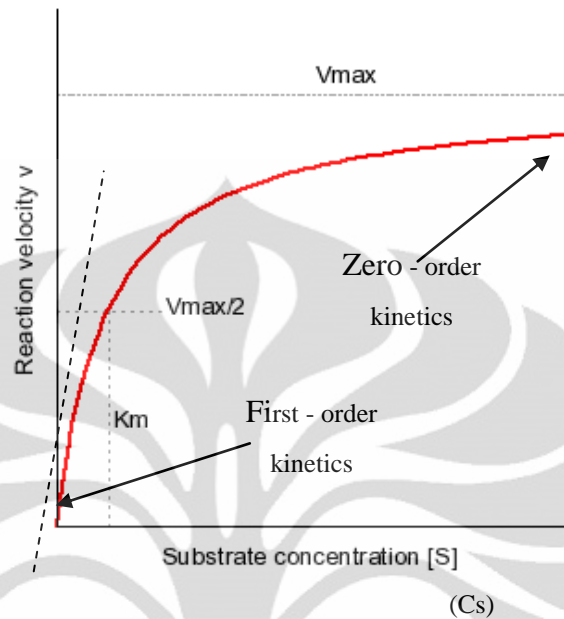
sehingga reaksi akan mengikuti kinetika orde pertama terhadap konsentrasi substrat.

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

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

sehingga reaksi akan berjalan dengan kinetika reaksi orde nol. Enzim kemudian akan jenuh terhadap substrat, dan lebih jauh kenaikan konsentrasi substrat tidak

akan berdampak lagi terhadap laju reaksi. Semua fenomena ini ditunjukkan pada gambar 2.6.



Gambar 3. 7 Laju reaksi versus konsentrasi substrat untuk reaksi yang mengikuti kinetika Michaelis-Menten

Persamaan 2.8 dapat ditulis sebagai

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

V_{\max} , yang setara dengan $k_2 C_{E,\text{total}}$, merupakan laju reaksi tercepat pada konsentrasi substrat yang tinggi. Saat C_S setara dengan K_m , maka persamaan 3.13 dapat ditulis menjadi

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

Parameter V_{\max} dan K_m merupakan ciri reaksi enzimatik yang dijelaskan oleh kinetika Michaelis-Menten. V_{\max} tergantung pada konsentrasi total enzim, sedangkan K_m tidak (Fogler, 1999).

3.7.2 Penentuan Parameter v_{\max} dan K_m

Dua parameter ini dapat diketahui dengan metode linearisasi. Oleh karena itu, persamaan yang menggambarkan hubungan antara konsentrasi substrat dan

konsentrasi produk harus terlebih dahulu diturunkan. Penurunan dilakukan dari rumus dasar berikut:

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

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

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

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

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

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

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

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

3.7.3 Pembuatan Grafik Konsentrasi Substrat dan Produk

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

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

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

4.1 Reaksi Esterifikasi

Dalam eksperimen yang dilakukan dengan reaksi esterifikasi ini digunakan asam oleat sebagai bahan dasar direaksikan dengan stearyl alkohol (alkohol rantai panjang) dengan menggunakan enzim *Candida rugosa* lipase (CRL) dan *Porcine pancreatic* lipase (PPL) untuk menghasilkan produk wax ester yang diinginkan. Beberapa variasi yang dilakukan dalam eksperimen ini digunakan untuk mendapatkan kondisi operasi optimum, yaitu variasi rasio molar, persentase enzim, dan waktu.

Pada eksperimen ini, sejumlah asam oleat ditimbang menggunakan timbangan digital sekaligus dimasukkan ke dalam tabung reaksi bersama dengan stearyl alkohol. Campuran reaktan ini kemudian ditambahkan hexane sebagai pelarut stearyl alkohol dan dipanaskan sampai stearyl alkohol terlarut. Campuran reaktan kemudian dihangatkan terlebih dahulu dalam *shaking waterbath* hingga suhu mencapai 40 °C. Prosedur ini dilakukan untuk menyesuaikan kondisi reaktan dengan suhu aktivasi enzim. Setelah suhu tercapai, enzim yang digunakan dalam reaksi esterifikasi ini yang berupa CRL dan PPL kemudian dimasukkan ke masing-masing tabung reaksi, kemudian ditutup. Tabung reaksi tertutup digunakan untuk menjaga reaktan agar tidak tumpah karena proses *shaking* dan *sentrifuge*. Oleh karena pegas pada *shaking waterbath* tidak dapat menyangga tabung reaksi, maka *stereofom* digunakan sebagai penyangga tambahan. *Shaking rate* di-set sebesar 150 rpm untuk memastikan reaktan tercampur dengan baik dengan enzim.

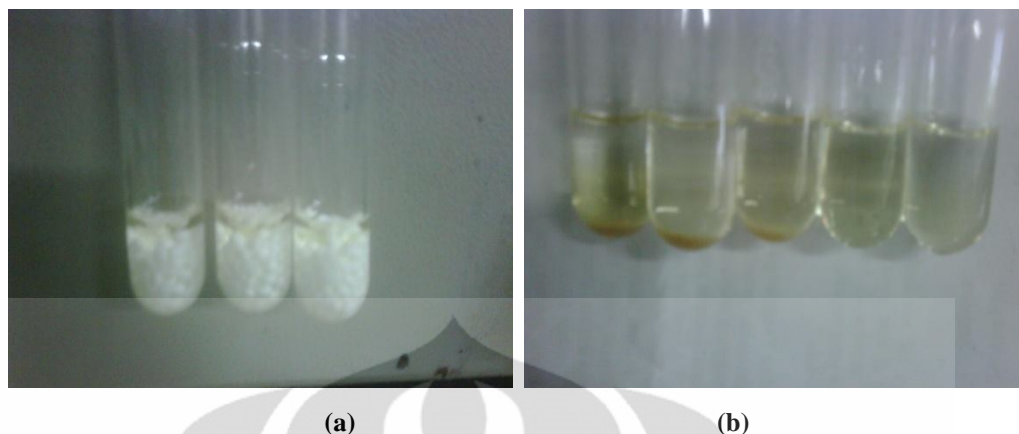


Gambar 4. 1 Kondisi *shaking rate* dan *temperature* dari *shaking waterbath*



Gambar 4. 2 Penempatan tabung reaksi tertutup dalam *shaking waterbath*

Setelah reaksi berakhir, maka sampel dan enzim yang ada akan dipisahkan. Pemisahan enzim dan sampel ini tidak perlu menggunakan sentrifuge karena enzim telah terendap di bagian bawah tabung reaksi, sehingga sampel dan enzim bisa langsung dipisahkan. Sampel yang dipisahkan dari enzim dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer untuk kemudian akan dititrasi. Metode ini cukup efektif mengendapkan enzim di dasar tabung reaksi, sehingga ketika sampel dituangkan ke dalam labu erlenmeyer, tidak ada enzim yang terikut. Pemisahan enzim menggunakan kertas saring tidak dilakukan pada eksperimen ini karena jumlah sampel yang sedikit, sehingga lebih banyak sampel yang terserap dalam kertas saring daripada yang terlewat. Pemisahan sampel berupa minyak menggunakan kertas saring juga akan memakan waktu yang relatif lama.



Gambar 4. 3 Proses esterifikasi. (a) sebelum proses (b) setelah proses (Rasio 1:1, 40°C, 150 rpm, 24 jam)

Sampel hasil reaksi dibuat sebanyak 5 buah untuk dititrasi, dimana 3 buah sampel merupakan sampel menggunakan enzim dan 2 buah sampel merupakan variabel kontrol yang hanya menggunakan reaktan tanpa enzim. Proses titrasi sampel ini menggunakan KOH 0.1 M yang telah distandarisasi. Sampel yang tidak menggunakan enzim juga dititrasi untuk mengetahui jumlah asam oleat awal sebelum terjadinya reaksi.

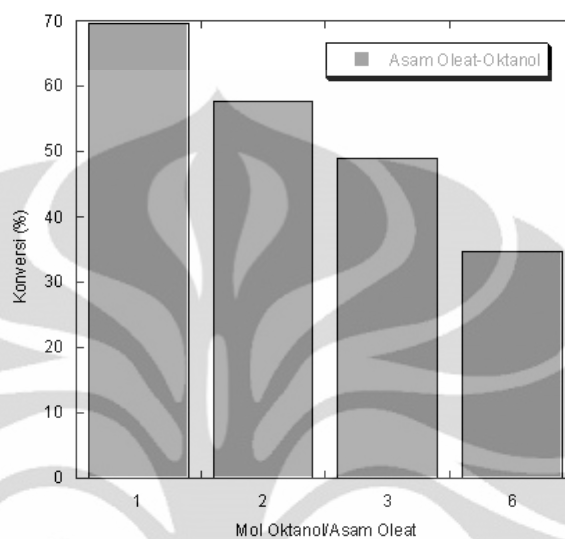
4.1.1 Variasi Rasio Reaktan

4.1.1.1 Perbandingan Rasio Reaktan (Asam oleat–Stearil alkohol : Asam oleat-oktanol) dengan Enzim CRL

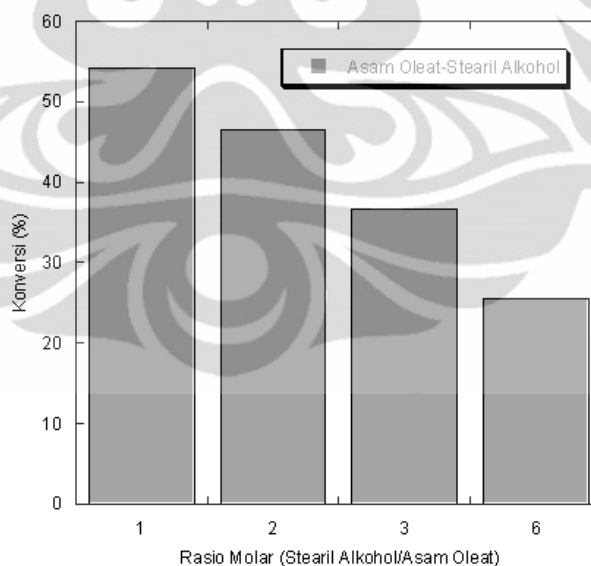
Perbandingan jumlah asam oleat dengan stearil alkohol dibuat bervariasi untuk mengetahui rasio reaktan yang optimum dalam reaksi esterifikasi. Variasi dilakukan dari rasio stoikiometrik yaitu 1:1, kemudian 1:2, 1:3, dan 1:6. Pada tahap ini jumlah asam oleat mol asam oleat dibuat tetap sedangkan jumlah mol stearil alkohol dibuat meningkat. Parameter yang dibuat konstan adalah persentase enzim sebanyak 4% dan waktu reaksi selama 24 jam yang biasa dilakukan untuk mereaksikan asam lemak dan alkohol dengan reaksi esterifikasi. Pada percobaan kali ini reaksi dilakukan di dalam tabung reaksi tertutup. Hasil dari konversi dengan menggunakan bahan asam oleat dan stearil alkohol ini akan di bandingkan dengan bahan asam oleat dan oktanol yang telah dilakukan sebelumnya oleh Angga. Gambar 4.4 dan 4.5 memperlihatkan pengaruh dari variasi rasio mol

Universitas Indonesia

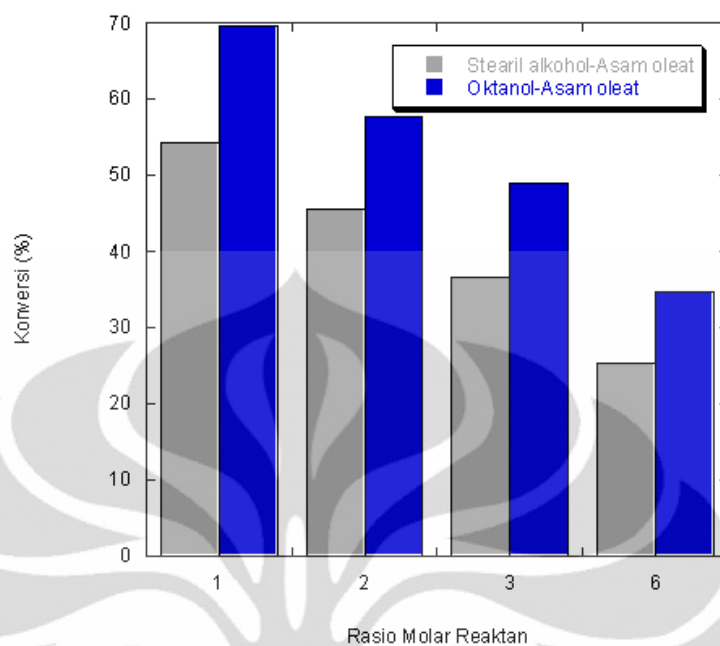
reaktan yang telah dilakukan sebelumnya dengan asam oleat-oktanol dan yang dilakukan sekarang dengan asam oleat-stearil alkohol dengan menggunakan enzim *Candida rugosa* lipase sehingga konversi yang dihasilkan dari proses esterifikasi yang telah dilakukan dapat dibandingkan.



Gambar 4. 4 Grafik Pengaruh rasio reaktan asam oleat dan oktanol terhadap konversi dengan enzim CRL. (T=40°C, 100 rpm, 4% enzim, 6 jam)



Gambar 4. 5 Grafik Pengaruh Rasio Reaktan asam oleat stearil alkohol terhadap Konversi dengan enzim CRL. (T=40°C, 150 rpm, 4% enzim, 24 jam)



Gambar 4. 6 Grafik Perbandingan Pengaruh Rasio Reaktan yang digunakan terhadap Hasil Konversi (40°C, 4% enzim, 6 jam untuk Asam oleat-oktanol dan 24 jam untuk Asam oleat-Stearil Alkohol)

Grafik 4.4 merupakan grafik pengaruh rasio reaktan terhadap konversi yang didapatkan dengan menggunakan bahan asam oleat dan oktanol dengan menggunakan biokatalis enzim CRL. Sedangkan grafik 4.5 merupakan grafik pengaruh rasio reaktan terhadap konversi yang didapatkan dengan menggunakan bahan dasar asam oleat dan stearil alkohol dengan bantuan enzim CRL. Dari kedua grafik ini terlihat bahwa kenaikan perbandingan jumlah rasio reaktan oktanol terhadap asam oleat maupun stearil alkohol terhadap asam oleat akan menurunkan jumlah konversi yang dihasilkan. Dalam jurnalnya, Kanasawud, Claon dan Akoh menduga bahwa hal ini disebabkan oleh kemampuan alkohol berlebih pada rasio reaktan di atas stoikiometrik untuk mengubah sifat dasar lapisan air dari enzim. Selain itu, sesuai dengan pendapat Basri dalam jurnalnya bahwa penggunaan alkohol yang berlebih akan mengganggu frekuensi interaksi antara substrat dengan lipase sehingga hasil konversi yang dihasilkan kurang maksimal. Rasio stoikiometrik (1:1) merupakan rasio yang menghasilkan hasil konversi maksimum baik menggunakan oktanol maupun stearil alkohol sebagai

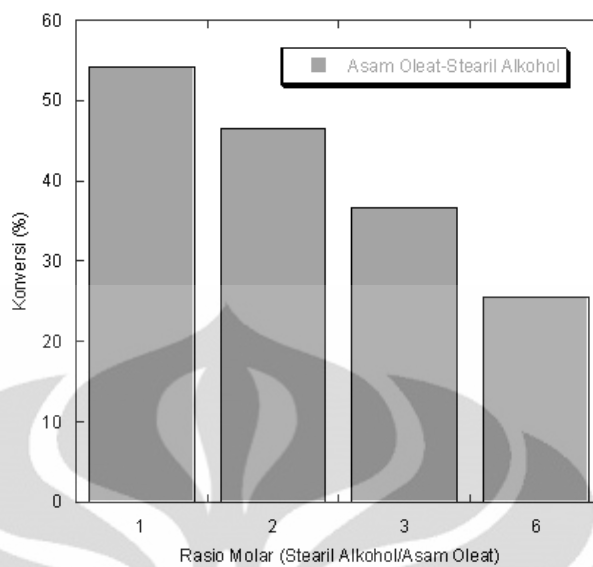
Universitas Indonesia

reaktan. Konversi maksimum yang dihasilkan pada rasio ini adalah sebesar 54.15 % dengan reaktan asam oleat dan stearil alkohol dan konversi maksimum sebesar 69.67 % dengan reaktan asam oleat dan oktanol menggunakan enzim CRL sebagai biokatalis. Dengan konversi maksimum didapatkan pada rasio reaktan 1:1 maka bahan yang digunakan akan semakin bisa dihemat, sehingga dari segi keekonomiaian proses ini lebih baik.

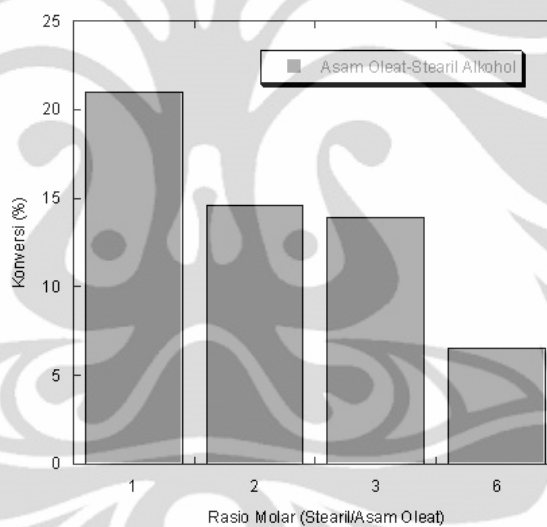
Grafik 4.6 merupakan grafik yang membandingkan pengaruh reaktan yang digunakan dengan menggunakan enzim CRL terhadap konversi yang dihasilkan. Dari grafik ini terlihat bahwa pada rasio reaktan yang sama konversi yang dihasilkan dengan menggunakan reaktan berupa asam oleat dan oktanol memiliki konversi yang lebih besar daripada dengan menggunakan reaktan asam oleat dan stearil alkohol dengan menggunakan enzim yang sama. Selain dari segi konversi yang dihasilkan, penggunaan asam oleat dan oktanol juga memiliki waktu reaksi yang lebih kecil untuk mendapatkan konversi yang lebih besar sehingga lebih hemat dan efektif dari penggunaan asam oleat dan stearil alkohol sebagai reaktan.

4.1.1.2 Perbandingan Rasio Reaktan (Asam oleat–Stearil alkohol) dengan Enzim CRL dan PPL

Pada grafik dibawah ini akan dibandingkan hasil konversi yang didapatkan dari rasio reaktan yang sama yaitu menggunakan asam oleat dan stearil alkohol namun menggunakan variasi biokatalis yang digunakan, yang kali ini menggunakan enzim *Candida rugosa* lipase dan *Porcine pancreatic* lipase.

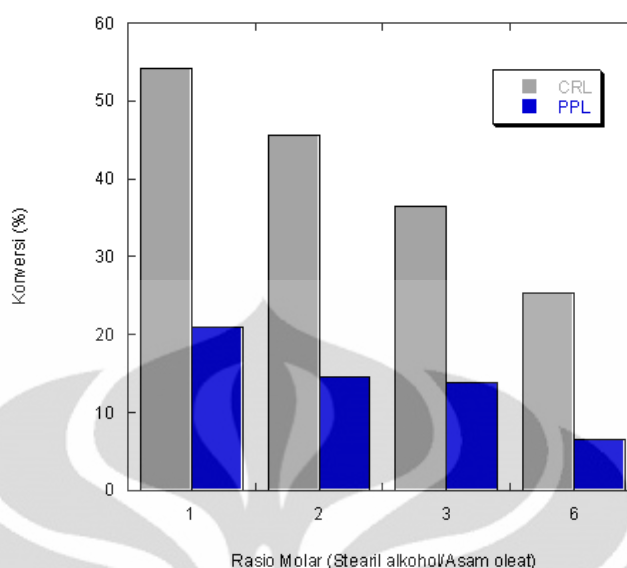


(a)



(b)

Gambar 4. 7 Grafik Pengaruh Rasio Reaktan terhadap Konversi. (a) CRL dan (b) PPL (T=40°C, 150 rpm, 4% enzim, 24 jam)



Gambar 4. 8 Grafik Perbandingan Pengaruh Rasio Reaktan terhadap Konversi dengan Menggunakan CRL dan PPL (T=40°C, 150 rpm, 4% enzim, 24 jam)

Grafik 4.7 merupakan grafik yang memperlihatkan pengaruh rasio reaktan yang digunakan terhadap konversi yang dihasilkan dengan menggunakan biokatalis berupa enzim CRL dan PPL. Dari grafik terlihat bahwa kecenderungan hasil konversi akan menurun seiring meningkatnya rasio reaktan stearyl alkohol terhadap asam oleat baik dengan menggunakan CRL maupun PPL. Rasio stoikiometrik (1:1) menghasilkan konversi maksimum sebesar 54.15 % dengan menggunakan enzim *Candida rugosa* lipase dan konversi maksimum sebesar 20.96 % dengan menggunakan enzim *Porcine pancreatic* lipase sebagai katalis.

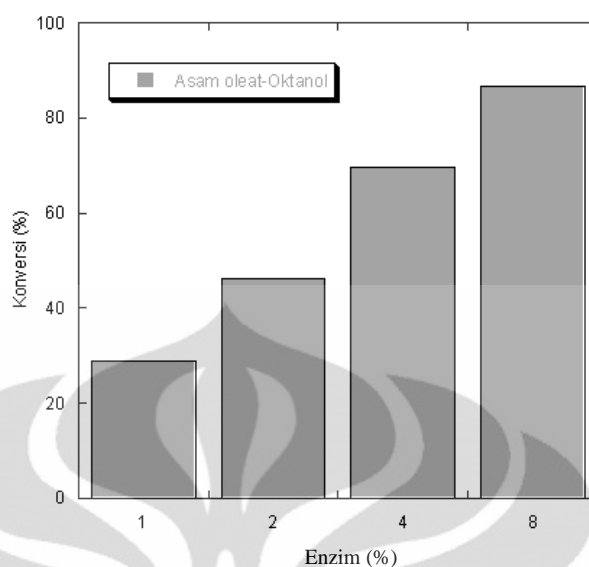
Dari grafik 4.8 yang merupakan grafik perbandingan konversi yang dihasilkan dengan menggunakan reaktan yang sama berupa stearyl alkohol dengan enzim yang berbeda. Dari grafik ini didapatkan bahwa data konversi dari proses esterifikasi menggunakan enzim CRL sebagai biokatalis memberikan hasil konversi yang jauh lebih besar dibandingkan penggunaan enzim PPL sebagai biokatalis, sehingga penggunaan enzim CRL ini lebih efektif untuk reaksi esterifikasi asam oleat dan stearyl alkohol pada percobaan yang dilakukan.

4.1.2 Variasi Persentase Enzim

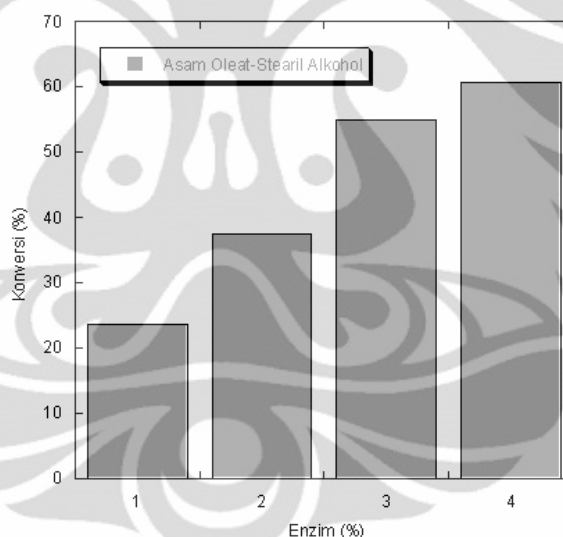
4.1.2.1 Perbandingan Persentase Enzim CRL dengan Reaktan yang berbeda (Asam oleat–Stearil alkohol : Asam oleat-oktanol)

Variasi persentase enzim merupakan variasi yang dilakukan untuk mengetahui jumlah enzim yang optimum untuk mengaktalisis reaksi esterifikasi pada eksperimen ini. Variasi enzim yang digunakan dalam eksperimen ini adalah sebanyak 1%, 2%, 3%, dan 4% dari massa asam oleat yang digunakan. Pada variasi ini parameter rasio reaktan dibuat konstan senilai 1:1 antara asam oleat dan stearil alkohol yang digunakan sebagai reaktan. Waktu esterifikasi yang digunakan dalam variasi waktu ini adalah 24 jam dengan menggunakan shaking waterbath dalam tabung reaksi tertutup. Pada variasi ini juga akan dilihat perbandingan antara pengaruh penggunaan reaktan yang berbeda yaitu asam oleat dan stearil alkohol yang dilakukan sekarang dengan reaktan asam oleat dan oktanol yang telah dilakukan sebelumnya terhadap konversi yang dihasilkan menggunakan enzim yang sama yaitu *Candida rugosa* lipase.

Untuk variasi enzim ini akan dilihat konversi yang paling optimum dari dari penggunaan enzim dalam reaksi. Selain dari segi konversi, variasi ini juga melihat dari segi keekonomian proses dalam reaksi. Mahalnya harga enzim membuat variasi enzim yang digunakan dalam proses esterifikasi ini tidak terlalu besar. Dari data yang dihasilkan maka didapatkan grafik seperti yang ditunjukkan oleh gambar dibawah ini.



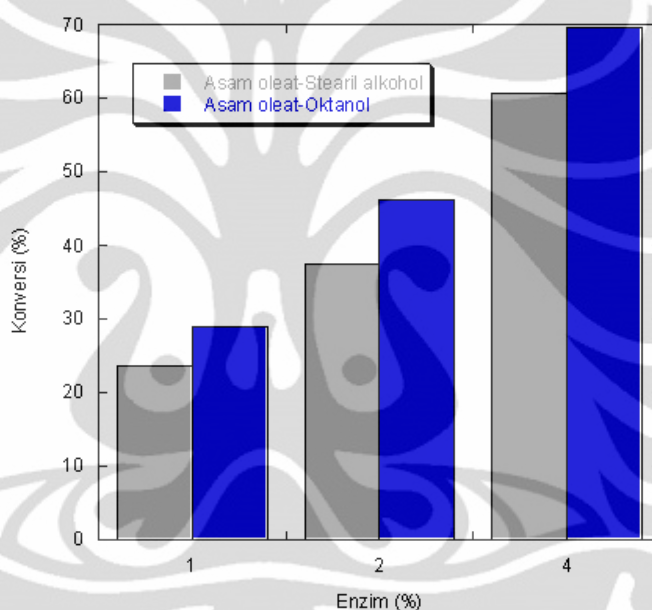
Gambar 4. 9 Grafik Pengaruh % Enzim CRL terhadap Konversi Asam Oleat dengan reaktan asam oleat-oktanol (40°C, 100 rpm, 6 jam, rasio reaktan 1:1)



Gambar 4. 10 Grafik Pengaruh % Enzim CRL terhadap Konversi Asam Oleat dengan reaktan asam oleat-stearil alkohol (40°C, 150 rpm, 24 jam, rasio reaktan 1:1)

Grafik 4.9 merupakan grafik yang memperlihatkan pengaruh persentase enzim CRL yang digunakan terhadap konversi yang dihasilkan dengan menggunakan reaktan berupa asam oleat dan oktanol. Sedangkan grafik 4.10 merupakan grafik yang memperlihatkan pengaruh persentase enzim CRL yang digunakan terhadap konversi yang dihasilkan dengan menggunakan reaktan asam

oleat dan stearyl alkohol. Dari kedua grafik ini terlihat bahwa semakin besar persentase enzim yang diberikan maka hasil konversi asam oleat yang didapatkan akan semakin besar pula. Hal ini terjadi karena semakin banyak enzim yang berikatan dengan substrat, kecepatan reaksi semakin meningkat dan semakin banyak kompleks enzim-substrat yang terbentuk. Maka produk yang terbentuk pun semakin banyak. Penambahan 4 % enzim dengan menggunakan enzim CRL dengan menggunakan reaktan berupa asam oleat dan oktanol memberikan konversi sebesar 69,67% dan dengan menggunakan reaktan berupa asam oleat dan stearyl alkohol sebesar 60,59%.



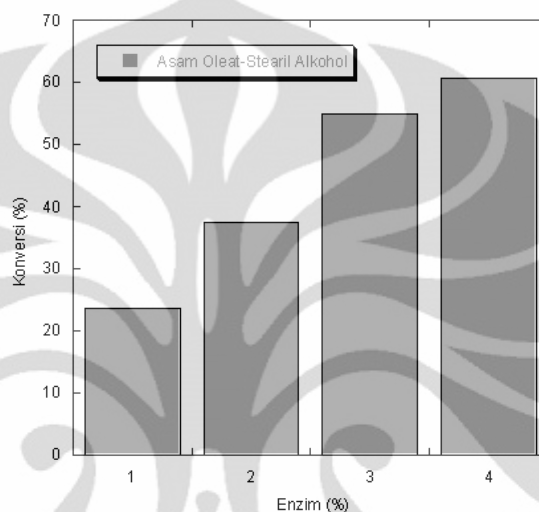
Gambar 4. 11 Grafik Pengaruh % Enzim CRL terhadap Konversi Asam Oleat dengan beda Reaktan (40°C, rasio reaktan 1:1)

Grafik 4.11 ini merupakan grafik yang memperlihatkan perbandingan hasil konversi yang didapatkan dengan menggunakan variasi persentase enzim CRL yang digunakan dalam reaksi dengan reaktan yang berbeda yaitu asam oleat-oktanol dan asam oleat-stearyl alkohol. Dari grafik ini terlihat bahwa penggunaan enzim CRL pada reaksi asam oleat dan oktanol memberikan konversi yang lebih besar daripada menggunakan asam oleat dan stearyl alkohol. Dari segi waktu reaksi juga terlihat bahwa penggunaan asam oleat dan oktanol sebagai reaktan memerlukan waktu yang lebih sedikit sehingga lebih hemat untuk digunakan.

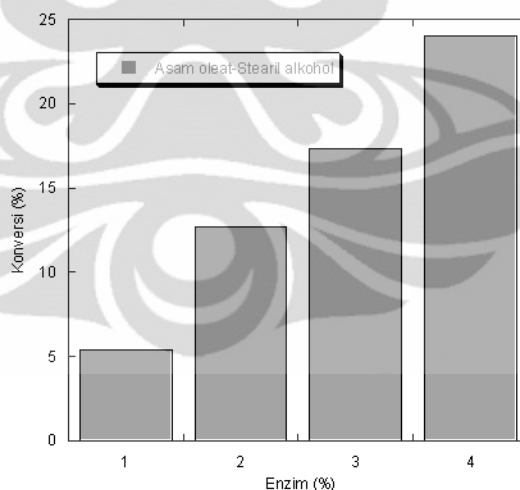
Universitas Indonesia

4.1.2.2 Perbandingan Persentase Enzim CRL dan PPL dengan Reaktan Asam oleat–Stearil alkohol

Variasi enzim ini untuk melihat konversi yang paling optimum dari penggunaan enzim dalam reaksi. Mahalnya harga enzim membuat variasi enzim yang digunakan dalam proses esterifikasi ini tidak terlalu besar. Gambar 4.12 menunjukkan pengaruh jumlah enzim CRL dan PPL terhadap konversi.



(a)

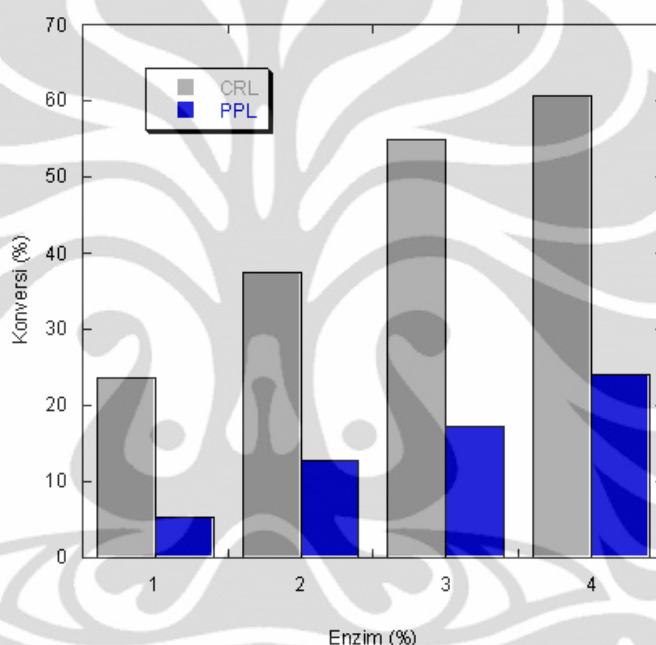


(b)

Gambar 4. 12 Grafik Pengaruh % Enzim terhadap Konversi Asam Oleat. (a) CRL dan (b) PPL (40°C, 150 rpm, 24 jam, rasio reaktan 1:1)

Grafik 4.12 merupakan grafik yang memperlihatkan pengaruh persentase enzim yang digunakan dalam reaksi asam oleat dan stearil alkohol terhadap konversi dengan menggunakan enzim CRL dan PPL. Pengaruh jumlah enzim

terhadap konversi baik itu dengan menggunakan enzim CRL ataupun PPL memperlihatkan bahwa konversi asam oleat akan meningkat seiring dengan penambahan jumlah enzim. Hal ini terjadi karena semakin banyak enzim yang berikatan dengan substrat, kecepatan reaksi semakin meningkat dan semakin banyak kompleks enzim-substrat yang terbentuk. Maka produk yang terbentuk pun semakin banyak. Penambahan 4 % enzim dengan menggunakan enzim CRL dan PPL mampu menghasilkan konversi berturut-turut sebesar 60,59% dan 24,01% .

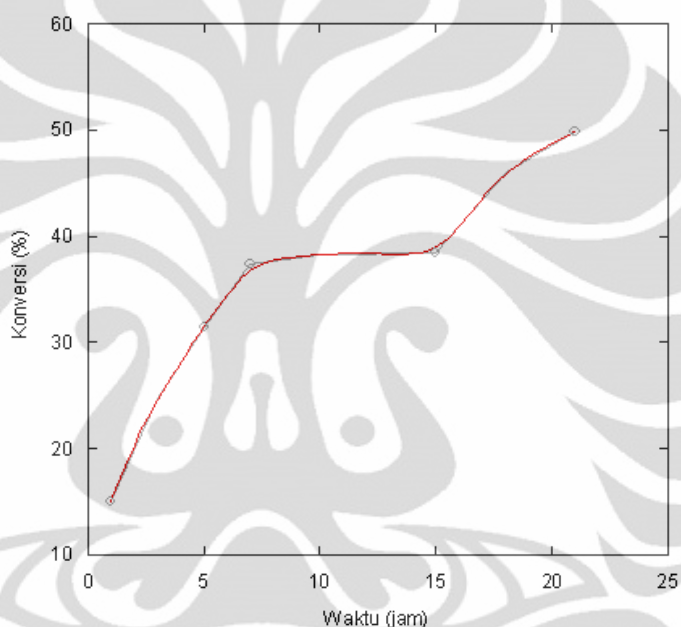


Gambar 4. 13 Grafik Perbandingan Pengaruh % Enzim CRL dan PPL terhadap Konversi Asam Oleat (40°C, 150 rpm, 24 jam, rasio reaktan 1:1)

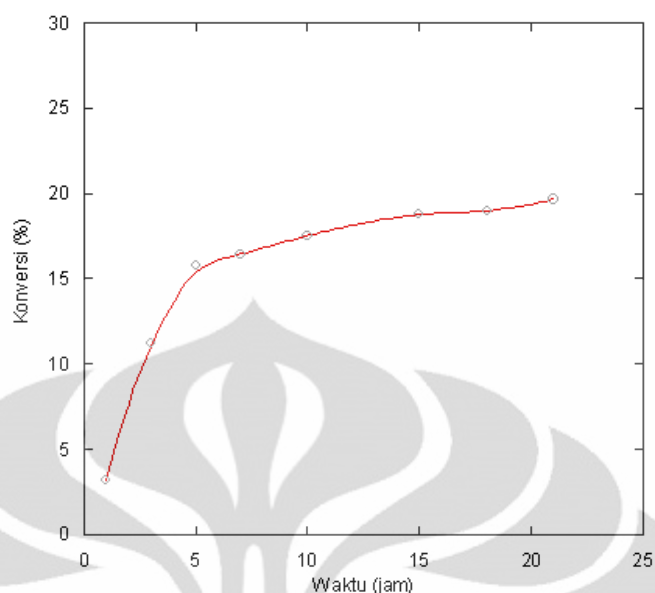
Dari grafik 4.13 yang memperlihatkan perbandingan pengaruh persentase enzim yang digunakan terhadap konversi asam oleat dengan menggunakan enzim yang berbeda berupa CRL dan PPL terlihat bahwa pengaruh jumlah enzim terhadap konversi baik itu dengan menggunakan enzim CRL ataupun PPL memperlihatkan bahwa konversi asam oleat akan meningkat seiring dengan penambahan jumlah enzim. Dari grafik terlihat bahwa penggunaan enzim CRL sebagai biokatalis dalam reaksi esterifikasi asam oleat dan stearyl alkohol memberikan konversi yang lebih besar daripada penggunaan enzim PPL.

4.1.3 Variasi Waktu

Waktu merupakan parameter penting dalam setiap reaksi kimia yang menghasilkan produk. Penentuan waktu optimum bertujuan untuk efisiensi proses. Variasi waktu yang dilakukan dalam eksperimen ini antara lain 1, 3, 5, 7, 10, 15, 18, dan 21 jam. Reaksi untuk variasi waktu ini dilakukan dalam tabung reaksi tertutup. Perbandingan reaktan dan jumlah enzim CRL dan PPL yang digunakan dalam reaksi ini dibuat konstan, masing-masing 1:1 dan 4 %. Hasil dari eksperimen ini dapat dilihat pada gambar 4.14 dan 4.15.



Gambar 4. 14 Grafik pengaruh waktu reaksi terhadap konversi yang dihasilkan menggunakan enzim CRL (40°C, 150 rpm, 4% enzim, rasio reaktan 1:1)

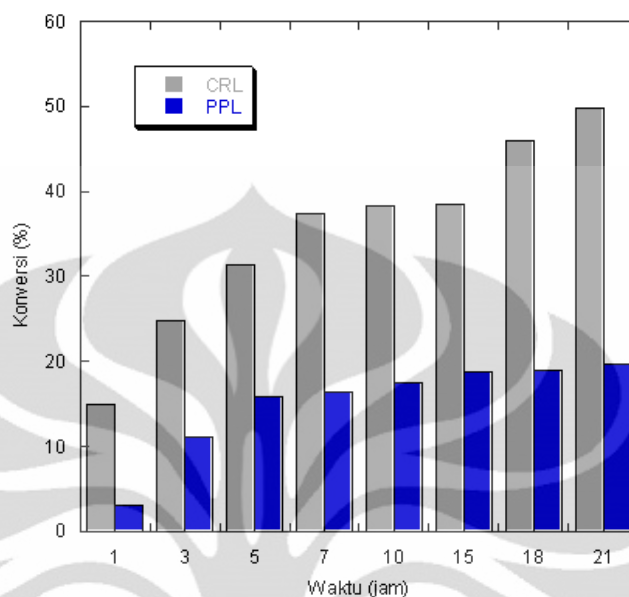


Gambar 4. 15 Grafik pengaruh waktu reaksi terhadap konversi yang dihasilkan menggunakan enzim PPL (40°C, 150 rpm, 4% enzim, rasio reaktan 1:1)

Grafik 4.14 dan 4.15 merupakan grafik yang menunjukkan pengaruh waktu reaksi esterifikasi asam oleat dan stearil alkohol yang dihasilkan terhadap konversi dengan menggunakan enzim CRL dan PPL. Dari grafik ini terlihat bahwa semakin lama waktu yang digunakan untuk melakukan proses esterifikasi maka konversi yang dihasilkan akan semakin meingkat. Konversi maksimum yang didapatkan adalah sebesar 47,67 % dengan menggunakan enzim CRL untuk waktu reaksi selama 21 jam dan 18,23 % dengan menggunakan enzim PPL untuk waktu reaksi selama 21 jam. Dari data yang didapatkan diketahui bahwa waktu optimum yang menghasilkan konversi terbesar pada variasi waktu ini adalah selama 21 jam dengan menggunakan enzim CRL dan PPL. Dengan membandingkan hasil konversi dari reaksi esterifikasi dengan menggunakan enzim CRL dan PPL ini untuk reaksi selama 24 jam yaitu sebesar Untuk reaksi esterifikasi dengan menggunakan enzim CRL dan PPL ini jika dibandingkan dengan konversi yang didapatkan untuk reaksi selama 24 jam yaitu sebesar 58.25 % menggunakan CRL dan 20,79 % jika menggunakan PPL, maka dapat diambil kesimpulan bahwa waktu untuk mendapatkan konversi terbesar adalah selama 24 jam. Sedangkan Konversi yang didapatkan pada variasi waktu ini sebenarnya

Universitas Indonesia

cenderung konstan. Konversi yang cenderung konstan ini kemungkinan terjadi karena reaksi yang telah mencapai kesetimbangan (Basri et al., 2005).



Gambar 4. 16 Grafik perbandingan pengaruh waktu reaksi terhadap konversi yang dihasilkan menggunakan enzim CRL dan PPL (40°C, 150 rpm, 4% enzim, rasio reaktan 1:1)

Dari grafik 4.16 yang merupakan grafik perbandingan konversi yang dihasilkan dari pengaruh waktu reaksi dengan menggunakan enzim CRL dan PPL terlihat bahwa konversi yang dihasilkan dengan menggunakan enzim CRL lebih besar daripada PPL walaupun kecenderungan konversi akan meningkat seiring dengan kenaikan waktu reaksi.

Dari ketiga variasi yang telah dilakukan yaitu variasi rasio molar reaktan, variasi jumlah enzim, dan variasi waktu terlihat bahwa konversi yang dihasilkan dengan menggunakan biokatalis enzim *Candida rugosa* lipase lebih besar bila dibandingkan dengan penggunaan enzim *Porcine pancreatic* lipase sebagai biokatalis pada reaksi asam oleat dengan stearil alkohol. Sehingga penggunaan enzim CRL sebagai biokatalis untuk mendapatkan sintesis wax ester dengan reaksi esterifikasi ini lebih baik untuk digunakan dan lebih efektif dalam menghasilkan konversi untuk reaktan asam oleat dan stearil alkohol. Sedangkan bila dibandingkan dengan reaktan berupa asam oleat dan oktanol yang telah

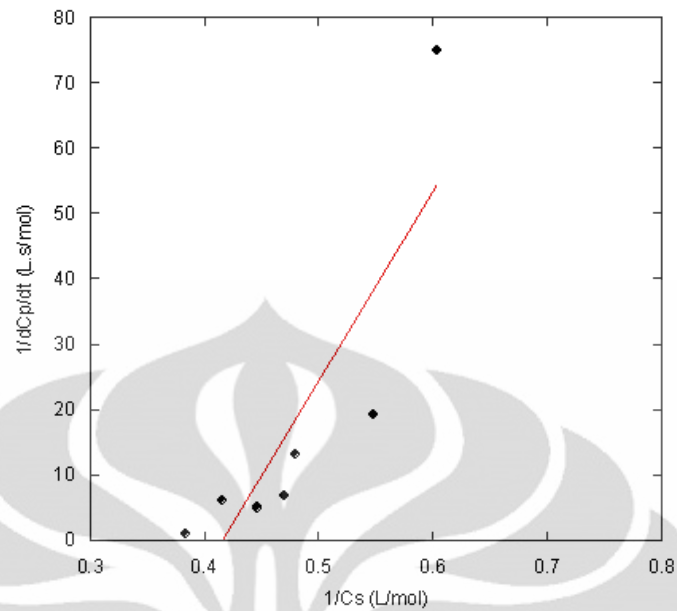
dilakukan sebelumnya terlihat bahwa onversi yang dihasilkan menggunakan enzim CRL memberikan hasil konversi yang lebih besar.

4.2 Kinetika Reaksi Menggunakan Persamaan *Michaelis – Menten*.

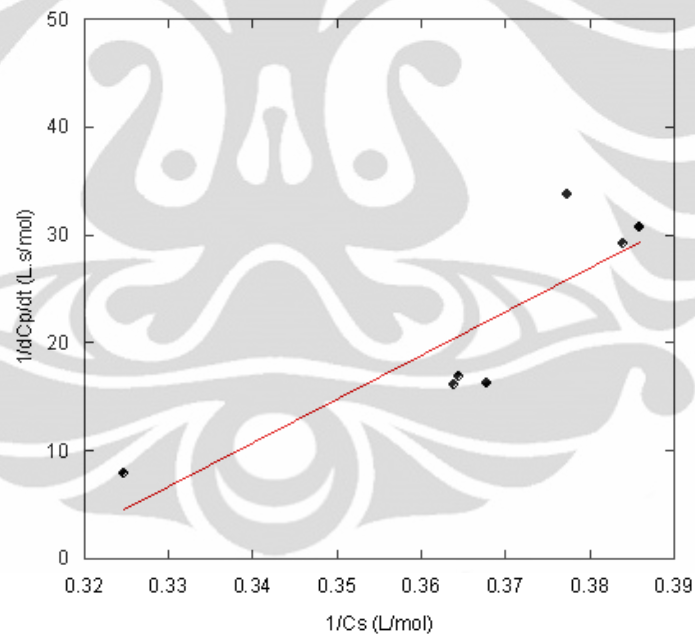
Kinetika reaksi merupakan sesuatu yang biasa ditemui dalam melakukan suatu sintesis secara kimia maupun bioproses yang kompleks. Supaya kualitas dari proses maupun produk yang dihasilkan baik, maka penting untuk mengontrol perubahan-perubahan secara kimia maupun bio tersebut. Pada eksperimen ini, permodelan akan dilakukan dengan data yang didapatkan dari hasil titrasi.

4.2.1 Penentuan parameter v_{\max} dan K_m

Parameter-parameter seperti V_{\max} dan K_m merupakan parameter yang ditemui dalam kinetika reaksi *Michaelis-Menten*. V_{\max} merupakan parameter yang menunjukkan kecepatan maksimum dalam reaksi esterifikasi ini, sedangkan K_m merupakan konstanta *Michaelis-Menten*. Kedua parameter ini dapat diselesaikan menggunakan metode linearisasi data konsentrasi substrat dan produk yang didapatkan dari hasil titrasi. Dengan menggunakan persamaan 3.18, maka akan didapatkan grafik 4.17.



(a)



(b)

Gambar 4. 17 Linearisasi data untuk mendapatkan nilai v_{\max} dan K_m hasil titrasi. (a) CRL dan (b) PPL (Rasio 1:1, 40°C, 150 rpm, 4% enzim)

Dari linearisasi grafik di atas, maka *slope* yang merupakan nilai dari K_m/v_{\max} dan konstanta $1/v_{\max}$ dapat diketahui. Maka setelah nilai-nilai tersebut

diketahui, maka nilai K_m dan v_{max} dapat dihitung. Hasil perhitungan K_m dan v_{max} dapat dilihat pada tabel 4.4.

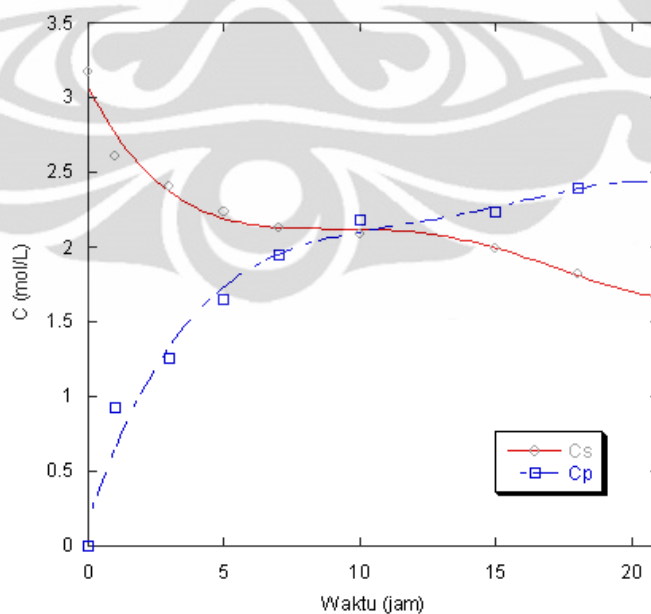
Tabel 4. 1 Hasil perhitungan K_m dan v_{max} (Rasio reaktan 1:1, 40°C, 150 rpm, 4% enzim)

Data Titrasi	Slope	Konstanta	K_m (mol/L)	V_{max} (s ⁻¹)
Sampel				
CRL	54.73	13.91	3.935	0.071891
PPL	2955.5	999.5	2.956	0.001005

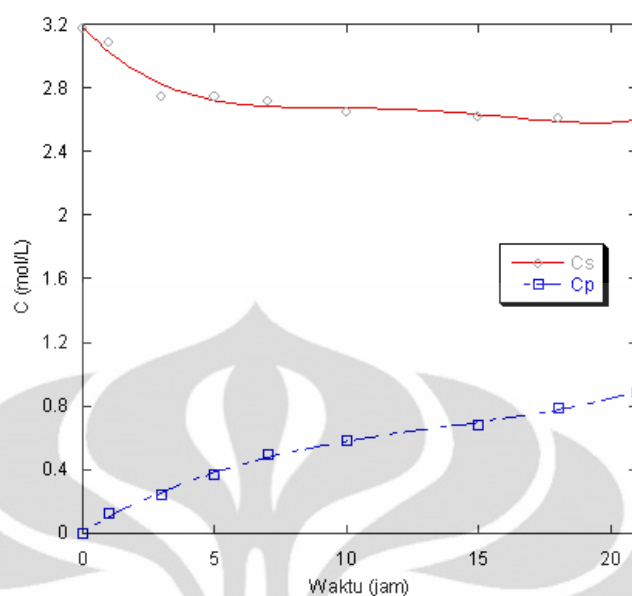
4.2.2 Permodelan dan *Fitting* Kurva dengan Data Eksperimen

Setelah menentukan parameter K_m dan v_{max} dari reaksi esterifikasi dengan menggunakan enzim CRL dan PPL, maka model kinetika dapat dibuat. *Fitting* kurva bertujuan untuk melihat kecocokan model *Michaelis Menten* dengan data eksperimen.

Profil konsentrasi dibuat dengan memasukkan kembali konsentrasi asam oleat ke persamaan 3.15 untuk produk wax ester dan 3.16 untuk asam oleat dengan parameter K_m dan v_{max} yang telah diketahui. Untuk mendapatkan kurva model yang mulus, maka selisih waktu diperkecil (dt).



(a)



(b)

Gambar 4. 18 Profil konsentrasi substrat dan produk beserta permodelannya hasil titrasi. (a) CRL dan (b) PPL (Rasio 1:1, 40°C, 150 rpm, 4% enzim)

Hasil *fitting* data eksperimen menggunakan biokatalis enzim CRL dan PPL menghasilkan grafik hasil titrasi yang menunjukkan hasil yang kurang memuaskan karena hasil konsentrasi produk yang didapatkan tidak sampai setengah dari konsentrasi jumlah substrat awal dengan menggunakan enzim PPL, dan dengan penggunaan enzim CRL hanya sampai 60 % konsentrasi produk yang dihasilkan dari konsentrasi substrat awal. Namun dari grafik dan parameter K_m dan V_{max} yang telah didapatkan diketahui bahwa model kinetika *Michealis-Menten* mampu mendeskripsikan perilaku substrat dan produk dalam sintesis wax ester menggunakan enzim CRL dan PPL.

Dari kedua grafik terlihat bahwa semakin besar waktu yang digunakan dalam proses esterifikasi maka semakin besar produk yang dihasilkan dan asam oleat yang tersisa akan semakin sedikit pula.

BAB 5

KESIMPULAN

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

1. Wax ester dapat dihasilkan melalui esterifikasi asam oleat dengan stearil alkohol menggunakan *Candida rugosa* lipase dan *Porcine pancreatic* lipase.
2. Semakin besar persentase enzim dalam reaksi, maka konversi yang dihasilkan akan semakin besar.
3. Meningkatnya jumlah stearil alkohol yang digunakan akan menurunkan konversi asam oleat.
4. Konversi meningkat seiring waktu hingga mencapai kesetimbangan.
5. Penggunaan enzim *Candida rugosa* lipase memberikan konversi yang lebih besar dibandingkan penggunaan *Porcine pancreatic* lipase.
6. Konversi asam oleat yang dihasilkan dengan menggunakan reaktan asam oleat dan oktanol lebih besar daripada menggunakan asam oleat dan stearil alkohol dengan enzim yang sama yaitu *Candida rugosa* lipase.
7. Konversi maksimum sebesar 60,59% dihasilkan dengan menggunakan enzim *Candida rugosa* lipase dan 24,01% dengan menggunakan enzim *Porcine pancreatic* lipase oleh rasio reaktan 1:1 (stoikiometrik) dengan penambahan 4% enzim selama waktu reaksi 24 jam.
8. Kondisi operasi optimum pada eksperimen ini adalah rasio reaktan 1:1, 4 % enzim, dan waktu reaksi selama 24 jam.
9. Melalui model kinetik *Michaelis-Menten*, didapatkan parameter K_m dan v_{max} sebesar 3,785 dan 0,033 untuk *Candida rugosa* lipase serta 3,139 dan 0,006 untuk *Porcine pancreatic* lipase.

DAFTAR PUSTAKA

- Benjamin, Sailas. 1998. *Candida rugosa Lipase : Molecular Biology and Versatility in Biotechnology*. Biotechnology Division, Regional Research Laboratory, Trivandrium – 695 019, India
- Decagny, B and S. Jan. 1998. *Synthesis of Wax Ester through Triolein Alcoholysis: Choise of the Lipase and Study of the Mechanism*. Enzyme Microb. Technol., 22, 578-582
- Divakar, S. and B. Manohar. 2007. *Use of Lipases in the Industrial Production of Esters*. Industrial Enzymes. 2007, 283-300
- Fessenden, R.J and Fessenden, J.S, (1990), “*Kimia Organik*”, edisi kesatu, Penerbit Erlangga
- Gunawan, E. R and D. Suhendra. 2008. *Synthesis of Wax Esters from Palm Kernel Oil Catalyzed by Lipase*. Jurnal Matematika dan Sains. Vol 13 No.3
- Hadzir, N.M, M. Basri, M.B.A. Rahman, C.N.A. Razak, R.N.Z. Rahman, A.B. Saleh. 2001. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, Vol. 7, No. 1. 213-216
- Jarvis, N. G. & J. H. Thiele. 1997. *Qualitative Rhodamin B Assay Which Uses Tallow as a Substrate for Lyplitic Obligately Anaerobic Bacteria*. J. Microbiol Methods 29 (1): 41-47.
- Kovalenko, G.A, L.V. Perminova, T.V. Chuenko, N.A Rudina. 2009. *Adsorptive immobilization of enzymatic active substances on alumina–silica foam coated by carbon nanofibers*. Carbon 47. 420 – 427
- Fengling, Li. 2008. *Identification of the Wax Ester Synthase/Acyl-Coenzyme A:Diacylglycerol Acyltransferase WSD1 Required for Stem Wax Ester Biosynthesis in Arabidopsis*. American Society of Plant Biologists
- Liu, C. H, and J. S. Chang. 2008. *Lipolytic activity of suspended and membrane immobilized lipase originating from indigenous Burkholderia sp. C20*. Bioresource Technology 99. 1616–1622
- Mat Radzi, S. and M. Basri. 2005. *High Performance Enzymatic Synthesis of Oleyl Oleate Using Immobilized Lipase from Candida antartica*. Electronic Journal of Biotechnology, vol. 8 no.3

- MacRae, A.R. 1983. *Lipase Catalysed Interesterification of Oil and Fats*. JAOAC. 60(2):291-294
- Moniaga, Frank. 2009. "Pohon Industri Kelapa Sawit". Majalah Infokimia Vol 1 No. 3, 47
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N. and Soccol, V. T. 1999. *The Realm of Microbial Lipases in Technology*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 29, 119-131
- Prameshwari, D. A. 2008. *Sintesis Biodisel dari Minyak Goreng Bekas Melalui Rute Non Alkohol Menggunakan Biokatalis Terimobilisasi pada Reaktor Batch*. Depok: UI Press
- Rahmi, ulfa. 2006. *Pengaruh jenis asam dan ph pada pemurnian residu gliserol dari hasil samping produksi biodisel*. Departemen Kimia Fakultas MIPA Universitas Sumatra Utara.
- Rajendran, A. and A, Palanisamy. 2008. *Lipase Catalyzed Ester Synthesis for Food Processing Industries*. Food Science and Technology
- Rizkiyadi, M. E. 2008. *Reaksi Interesterifikasi Minyak Jelantah dengan Metil Asetat Menggunakan Biokatalis Candida rugosa Lipase untuk Memproduksi Biodiesel*. Depok: UI Press.
- Salis, A. and V. Solinas. 2003. *Wax Ester Synthesis from Heavy Fraction of Sheep Milk Fat and Cetyl Alcohol by Immobilized Lipases*. *Journal of Molecular Catalyst B: Enzymatic*, 21, 167-174
- Steinke G, P. Weitkamp, and E. Klein. 2001. *High-Yield Preparation of Wax Esters via Lipase-Catalyzed Esterification Using Fatty Acids and Alcohols from Crambe and Camelina Oils*. *J. Agric. Food Chem*, 49, 647-651
- Sukara, Endang. 2008. *Pemanfaatan Biodiversity*. <http://www.biotek.lipi.go.id>. Diakses tanggal 7 Juli 2010
- Susanto, B. H. 2008. *Sintesis Pelumas Dasar Bio Melalui Esterifikasi Asam Oleat Menggunakan Katalis Asam Heteropoli/Zeolit*. Depok: UI Press
- Takahiro Tsujita, Maho S, and Hiromichi O. 1999. *Wax Ester-Synthesizing Activity of Lipases*. *JAOCS* Vol.34, no.11

LAMPIRAN

Lampiran 1: Data Hasil Titration

1.1 Variabel Molar

Tabel 1. Data titrasi sampel variasi molar. (a) Percobaan (b) Percobaan 2 dan (c) Percobaan 3 (40°C, 150 rpm, 4% enzim, 24 jam)

Rasio molar	Sampel		Hasil titrasi	Hasil titrasi
1:1	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim	13.7	32.6
		PPL	13.1	31.4
			15.3	33.1
	Tanpa Enzim		41.2	
			39.7	
1:2	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim	16.3	32.6
		PPL	18.7	31.4
			16.6	33.1
	Tanpa Enzim		34.8	
			40.2	
1:3	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim	21.1	32.3
		PPL	28.2	33.3
			21.4	34.5
	Tanpa Enzim		38.1	
			40.2	
1:4	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim	29.5	34.7
		PPL	30	34.1
			31.1	33.2
	Tanpa Enzim		36.9	
			38.3	

(a)

Rasio molar	Sampel		Hasil titrasi	Hasil titrasi
1: 1	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim PPL	10.2	24.1
			12.8	23.6
			14.6	24.8
	Tanpa Enzim		30.1	
			31.2	
1: 2	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim PPL	13.3	24.6
			16.2	24
			16.9	23.9
	Tanpa Enzim		29.5	
			28.3	
1: 3	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim PPL	16.3	25.8
			18.5	27.2
			17.1	26
	Tanpa Enzim		31.9	
			33.5	
1: 4	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim PPL	18.2	26.1
			18.6	27.5
			19.5	26.7
	Tanpa Enzim		28	
			-	

(b)

Rasio molar	Sampel		Hasil titrasi	Hasil titrasi
1:1	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim PPL	15.8	23.8
			13.9	23.6
			15	23.5
	Tanpa Enzim		30.7	
			29.7	
1:2	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim PPL	17.4	24.5
			19.2	25.3
			18.6	24.7
	Tanpa Enzim		28.4	
			29.1	
1:3	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim PPL	20.7	23.8
			22.3	26.2
			24.2	26.5
	Tanpa Enzim		28.1	
			28.6	
1:4	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim PPL	22.7	29.8
			22	27.8
			23.1	25.6
	Tanpa Enzim		29.1	
			29.7	

(c)

1.2 Variabel Enzim

Tabel 2. Data titrasi sampel variasi enzim. (a) Percobaan (b) Percobaan 2 dan (c) Percobaan 3 (40°C, 150 rpm, 24 jam, rasio 1:1)

Variasi Enzim	Sampel		Hasil titrasi	Hasil titrasi
1%	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim	13.4	24.6
		PPL	14	25.4
			13.3	25.5
	Tanpa Enzim		30.8	
			30.9	
2%	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim	14.1	24.5
		PPL	13.5	28
			14.2	26
	Tanpa Enzim		31.2	
			31.4	
3%	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim	17.6	24.6
		PPL	18.2	29.7
			18.9	29
	Tanpa Enzim		32	
			31.4	
4%	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim	22.5	28.1
		PPL	23.2	27.5
			22.8	29.8
	Tanpa Enzim		29.1	
			31.1	

(a)

Variasi Enzim	Sampel		Hasil titrasi	Hasil titrasi
1%	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim PPL	24.2	30.9
			23	30.5
			24.5	29.3
	Tanpa Enzim		31.5	
			30.8	
2%	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim PPL	18.3	27
			20.1	27.5
			21.9	28.1
	Tanpa Enzim		32.5	
			-	
3%	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim PPL	11.9	25.2
			13.4	27.1
			13.2	25.1
	Tanpa Enzim		32.5	
			32	
4%	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim PPL	11	22
			11.3	23.7
			10	23.3
	Tanpa Enzim		31.5	
			31.9	

(b)

Variasi Enzim	Sampel		Hasil titrasi	Hasil titrasi
1%	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim	26.8	31.9
		Dengan Enzim PPL	25.1	32.1
			26.4	30
	Tanpa Enzim		32.3	
			35.7	
2%	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim	24.8	30.3
		Dengan Enzim PPL	21	30.5
			24.5	31.8
	Tanpa Enzim		32.9	
			36	
3%	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim	18.8	30.2
		Dengan Enzim PPL	17.5	31
			18.7	30.5
	Tanpa Enzim		36.2	
4%	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim	14.6	23.1
		Dengan Enzim PPL	13.7	25.8
			14.5	29.5
	Tanpa Enzim		35.4	

(c)

1.3 Variasi waktu

Tabel 3. Data titrasi sampel variasi waktu (40°C, 150 rpm, 4% enzim, Rasio 1:1)

Variasi Enzim	Sampel		Hasil titrasi	Hasil titrasi	Hasil titrasi	Hasil titrasi	Hasil titrasi	Hasil titrasi
			Percobaan 1		Percobaan 2		Percobaan 3	
1 jam	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim	22.4	23.5	21.8	24.4	21.9	25.7
		Dengan Enzim	18	23	20.5	24.1	21.7	24.9
		PPL	21.3	23.8	19.9	24.5	18.4	26.2
	Tanpa Enzim		24.3	24.2	27.1			
			24.1	25	26.3			
3 jam	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim	18.2	22.6	19.3	21.1	21.7	23.5
		Dengan Enzim	18.9	23.5	20.7	23.6	21.3	24.6
		PPL	21.4	22.9	20.3	21.5	20.6	24.9
	Tanpa Enzim		26.5	24.7	29.7			
			25.3	25.3	29.1			
5 jam	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim	18	21.3	18.7	22.4	18.3	23.2
		Dengan Enzim	17.8	22.1	17.7	20.3	18.1	22.9
		PPL	17.8	22.4	18.9	21.2	17.2	23.9
	Tanpa Enzim		25.1	24	26.8			
			27	24.5	26.1			
7 jam	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim	16.6	18.2	19.1	22	17.9	24.4
		Dengan Enzim	16.7	22.4	18.3	20.9	16.8	22.7
		PPL	14.5	23.2	18	21.8	17.4	23.1
	Tanpa Enzim		26.4	24.7	29.1			
			24.5	24.4	25.3			
10 jam	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim	26.8	31.9	26.8	31.9	20.9	24.4
		Dengan Enzim	25.1	32.1	25.1	32.1	20.7	24.5
		PPL	26.4	30	26.4	30	19	26.6

	Tanpa Enzim		32.3		32.3		28.8	
			35.7		35.7		31.4	
15 jam	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim PPL	22.5	30.8	16.8	19.9	19.7	24.8
			21.9	29.4	16.1	19.3	19.9	25.5
			23.2	30.1	15.4	20.6	19.5	25.7
	Tanpa Enzim		36.6		23.8		31.6	
			36.4		23.2		29.4	
18 jam	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim PPL	19.2	28.7	14.9	22.8	19.1	25.9
			18.1	28	15.7	23.1	18.8	26.1
			18.6	27.3	15.1	22.4	20.2	23.9
	Tanpa Enzim		34.2		26.8		29.4	
			34.9		28.3		31.6	
21 jam	Dengan Enzim CRL	Dengan Enzim PPL	17.7	28.1	16.1	26.5	15.3	25.1
			17.9	26.9	15.4	25.4	17.7	24.3
			16.9	29	17.1	25.7	16.9	25.3
	Tanpa Enzim		34.1		31		30.5	
			35.6		31.8		29.8	