



UNIVERSITAS INDONESIA

**IMMOBILISASI *CANDIDA RUGOSA* LIPASE DENGAN
METODE *SOL-GEL* MENGGUNAKAN *SUPPORT*
KITOSAN SEBAGAI BIOKATALIS DALAM SINTESIS WAX
ESTER**

SKRIPSI

PARAMITHA KHARISTIANANDA

0806340183

**DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA
FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA
DEPOK**

JANUARI 2012



UNIVERSITAS INDONESIA

**IMMOBILISASI *CANDIDA RUGOSA* LIPASE DENGAN
METODE *SOL-GEL* MENGGUNAKAN *SUPPORT*
KITOSAN SEBAGAI BIOKATALIS DALAM SINTESIS WAX
ESTER**

SKRIPSI

Diajukan sebagai Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar Sarjana Teknik

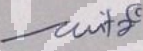
PARAMITHA KHARISTIANANDA

0806340183

**DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA
FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA
DEPOK
JANUARI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Paramitha Kharistiananda
NPM : 0806340183
Tanda Tangan : 
Tanggal : 4 Januari 2011

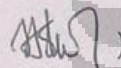
HALAMAN PENGESAHAN

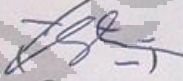
Skripsi ini diajukan oleh :

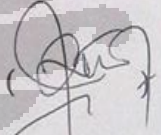
Nama : Paramitha Kharistiananda
NPM : 0806340183
Program Studi : Teknologi Bioproses
Judul Skripsi : Immobilisasi Lipase *Candida rugosa* dengan metode Sol-Gel menggunakan *Support* Kitosan sebagai Biokatalis dalam Sintesis *Wax* Ester.

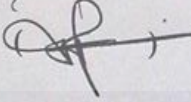
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik Kimia pada Program Studi Teknologi Bioproses, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia


DEWAN PENGUJI

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

Pembimbing II : Dr. Tania Surya Utami, S.T., M.T. 

Penguji : Ir. Rita Arbianti, M.Si 

Penguji : Dr. Ing. Misri Gozan, M.Tech 

Penguji : Ir. Eva Fatul Karamah, M.T. 

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 17 Januari 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan kepada Allah SWT atas kasih sayang dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan makalah seminar dengan judul “Immobilisasi *Candida Rugosa* Lipase dengan Metode *Sol-Gel* menggunakan *Support* Kitosan sebagai Biokatalis dalam Sintesis *Wax Ester*” sebagai syarat mencapai gelar sarjana teknik pada Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia.

Penulis menyadari dalam menyelesaikan makalah ini akan sangat sulit tanpa bantuan dan bimbingan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Heri Hermansyah, S.T., M.Eng., dan Tania Surya Utami, S.T., M.T., sebagai dosen pembimbing yang telah memberikan waktu dan pikiran untuk membimbing dan mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi ini;
2. Ir. Rita Arbianti M.Si., sebagai dosen pembimbing akademik yang selalu membantu segala permasalahan akademik selama perkuliahan;
3. Ir. Yuliusman M.Eng sebagai kordinator seminar Teknik Kimia FTUI;
4. Para dosen Departemen Teknik Kimia UI yang telah memberikan ilmu, wawasan, dan pengalamannya;
5. Orang tua penulis, Khairul Nur dan Asmawati Bahasan yang tidak pernah kurang dalam memberikan kasih sayang, bimbingan, dukungan, dan doa bagi penulis. Maaf Pa, Ma, kalau Mitha jarang pulang;
6. Nico Vanenda, Diana Kharisma Putri, Azharul Nevananda, Andini Kharistiananda, Ilham Ramadhani, Nanda Nur Wulan Sari, dan Ninda yang selalu memiliki cara untuk menceriakan suasana rumah dan suasana hati penulis sehingga penulis dapat memiliki pelarian sejenak dari rutinitas di kampus;

7. Dara Dienayati, Sara Mutiara, dan Mondya Purna Septa sebagai teman bergosip yang selalu memberikan canda tawa yang sangat berguna terutama di kelas yang membosankan;
8. Kanya, Dara Dienayati, Iqlima Fuqoha dan teman jalan-jalan lain yang selalu punya rencana mengunjungi tempat baru setiap semester, yang rencananya selalu bisa menjadi penyemangat menghadapi hari-hari terakhir semester.
9. Rekan satu bimbingan: Merisa Bestari, Republik Daudi, dan Sara Mutiara yang sudah membantu dalam bertukar wawasan dan informasi;
10. Teman-teman Teknik Kimia dan Teknologi Bioproses yang telah memberikan dukungan dan informasi sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini;
11. Semua pihak yang telah membantu penyusunan skripsi ini secara langsung maupun tidak langsung;

Penulis menyadari bahwa dalam skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun sehingga dapat menyempurnakan skripsi ini dan melaksanakan perbaikan di masa yang akan datang. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu.

Depok, 4 Januari 2012

Paramitha Kharistiananda

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

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

Nama : Paramitha Kharistiananda

NPM : 0806340183

Program Studi : Teknologi Bioproses

Departemen : Teknik Kimia

Fakultas : Teknik

Jenis karya : Skripsi

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

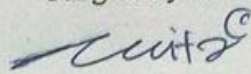
Immobilisasi Lipase *Candida rugosa* dengan Metode Entrapment menggunakan Support Kitosan sebagai Biokatalis dalam Sintesis Wax Ester beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam 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 : 4 Januari 2012

Yang menyatakan



(Paramitha Kharistiananda)

ABSTRAK

Nama : Paramitha Kharistiananda
Program Studi : Teknologi Bioproses
Judul : Immobilisasi *Candida Rugosa* Lipase dengan Metode *Sol-gel*
menggunakan *Support* Kitosan sebagai Biokatalis dalam Sintesis
Wax Ester

Penelitian ini telah menghasilkan *wax* ester dari reaksi esterifikasi menggunakan katalis yang diimmobilisasi dengan metode *entrapment* pada *support* kitosan. Variasi dilakukan pada saat immobilisasi lipase yaitu variasi konsentrasi kitosan sebesar 20 mg/mL dan 30 mg/mL dan variasi perbandingan volume lipase dengan kitosan pada jangkauan 1:3 hingga 1:12. Dari percobaan dapat disimpulkan bahwa variasi tersebut tidak mempengaruhi enzim *loading* biokatalis hasil immobilisasi karena perbedaan enzim *loading* yang didapatkan tidak terlalu signifikan. Untuk mengetahui kinerja biokatalis hasil immobilisasi, dilakukan sintesis *wax* ester dari reaksi esterifikasi. Hasil reaksi menunjukkan bahwa *yield* yang paling besar, yaitu 27,52%, adalah reaksi dengan katalis lipase yang diimmobilisasi menggunakan konsentrasi kitosan sebesar 20 mg/mL dan perbandingan lipase dengan kitosan sebesar 1:3.

Kata kunci: Immobilisasi lipase, kitosan, *sol-gel*, esterifikasi, *wax* ester

ABSTRACT

Name : Paramitha Kharistiananda

Major : Teknologi Bioproses

Title : Immobilization of *Candida rugosa* Lipase in Chitosan by Sol-gel Method
as Biocatalyst in WaxEster Synthesis

This research has produced waxester by esterification using lipase that immobilized on chitosan by entrapment method. The effect of parameters such as chitosan concentration and ratio of lipase and chitosan at immobilization process to enzyme loading is investigated. Concentration of chitosan used in this paper is 20 mg/mL and 30 mg/mL. Ration of lipase and chitosan used in this paper range in 1:3 to 1:12. The variation of parameters do not affect enzyme loading. Immobilized lipase then used in waxester synthesis. The optimum *yield* is 27.52% from lipase immobilized on chitosan concentration of 20 mg/mL and ratio of lipase and chitosan 1:3.

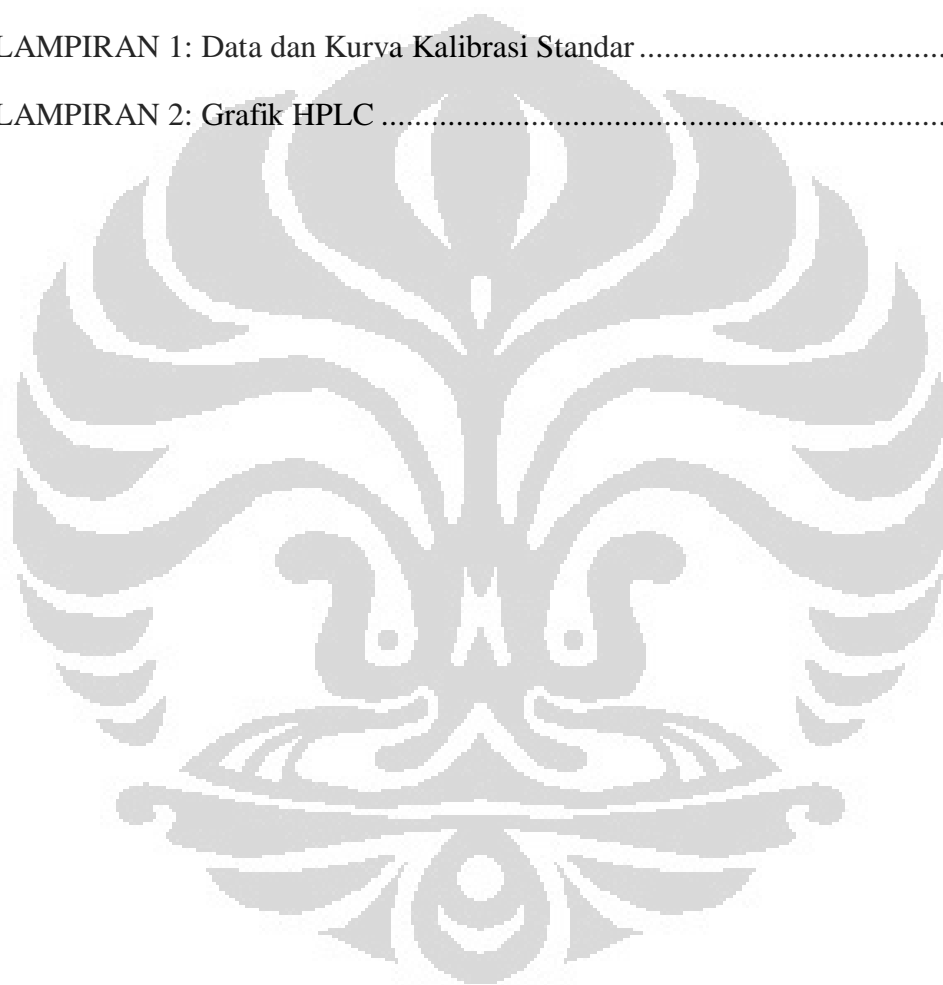
Keyword: Immobilization of lipase, chitosan, sol-gel, esterification, waxester

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL	xv
BAB I.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Batasan Masalah	3
1.5 Sistematika Penulisan	3
BAB II.....	2
2.1 Lipase	2
2.1.1 Mekanisme Kerja Enzim.....	6
2.1.2 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim	7
2.1.3 Faktor yang Mempengaruhi Esterifikasi dengan Media Enzim	12
2.2 Immobilisasi Lipase	13
2.2.1 Metode Carrier-binding.....	14
2.2.2 Metode <i>Cross-linking</i>	15
2.2.3 Metode <i>Entrapment</i>	16

2.3 Kitosan	17
2.4 Metode Sol-gel	18
2.5 Oleokimia	19
2.6 Wax Ester	20
2.7 Asam Oleat	21
2.8 Reaksi Pembentukan Ester	22
2.9 <i>State of the Art</i>	25
BAB III	28
METODE PENELITIAN	28
3.1 Diagram Alir Penelitian	28
3.2 Alat dan Bahan	29
3.2.1 Alat	29
3.2.2 Bahan	31
3.3 Prosedur Penelitian	32
3.3.1 Immobilisasi Lipase	32
3.3.2 Menentukan Konsentrasi Lipase Terimmobilisasi	33
3.3.3 Sintesis Wax Ester dengan Reaksi Esterifikasi	33
3.4 Variabel dalam Penelitian	34
3.4.1 Variabel Bebas	34
3.4.2 Variabel Terikat	34
3.5 Teknik Analisis Data	34
3.5.1 Menghitung Enzim <i>Loading</i>	34
3.5.2 Menghitung <i>YieldWax Ester</i>	35
BAB IV	35
HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1 Immobilisasi Lipase	35
4.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi Standar	39
4.3 Penentuan Enzim <i>Loading</i>	40

4.4 Sintesis <i>Wax Ester</i>	43
4.5 Penentuan <i>Yield Wax Ester</i>	45
BAB V	49
PENUTUP.....	49
V.1 Kesimpulan.....	49
5.2 Saran	49
DAFTAR PUSTAKA	50
LAMPIRAN 1: Data dan Kurva Kalibrasi Standar	55
LAMPIRAN 2: Grafik HPLC	56



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Cara Kerja Enzim berdasarkan Teori Gembok Kunci	6
Gambar 2.2 Cara Kerja Enzim Berdasarkan Kecocokan yang Terinduksi (Carr, 2009)	7
Gambar 2.3 Suhu Optimum Biokatalis	8
Gambar 2.4 pH Optimum Biokatalis	9
Gambar 2.5 Inhibitor kompetitif (Siregar, 2008)	10
Gambar 2.6 Inhibitor nonkompetitif (Siregar, 2008)	10
Gambar 2.7 Pengaruh konsentrasi enzim terhadap kecepatan reaksi (Aryulina, et al, 2006)	11
Gambar 2.8 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi (Aryulina, et al, 2006)	11
Gambar 2.9 Metode Immobilisasi Enzim dengan Adsorpsi (University of Saskatchewan, 2008)	14
Gambar 2.10 Metode Immobilisasi Enzim dengan Covalent Binding (Nunes dan Louis, 2006)	15
Gambar 2.11 Metode Immobilisasi Enzim dengan Cross-linking (Hartoto, 2006)	16
Gambar 2.12 Metode cross-linking yang telah dikombinasikan dengan metode adsorpsi (Hartoto, 2008)	16
Gambar 2.13 Metode Immobilisasi Enzim dengan entrapment (Nunes dan Louis, 2006)	17
Gambar 2.14 Struktur Kitin (Krajewska, 2004)	17
Gambar 2.15 Struktur Kitosan (Krajewska, 2004)	18
Gambar 2.16 Pilihan Proses <i>Sol-Gel</i>	18
Gambar 2.17 Struktur wax ester (Patel, et al, 2001)	21
Gambar 2.18 Struktur molekul asam oleat (NIST Chemistry Webbook)	22
Gambar 2.19 Reaksi Esterifikasi (Tarigan, 2002)	22
Gambar 2.20 Reaksi Esterifikasi Asam Oleat dengan Stearil Alkohol	23
Gambar 2.21 Reaksi Interesterifikasi (Tarigan, 2002)	23
Gambar 2.22 Reaksi Alkoholisis (Tarigan, 2002)	24

Gambar 2.23 Reaksi Asidolisis (Tarigan, 2002)	24
Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian	28
Gambar 4.1 <i>Candida rugosa</i> Lipase (a) sebelum dilarutkan (b) setelah dilarutkan	35
Gambar 4.2 Immobilisasi Lipase dengan Konsentrasi Kitosan 10 mg/ml.....	36
Gambar 4.3 Pelarutan Kitosan (a) sebelum diaduk dan dipanaskan (b) setelah diaduk dan dipanaskan.....	37
Gambar 4.4 Larutan Lipase dan Kitosan	37
Gambar 4.5 Proses <i>Gelation</i> Kitosan <i>Bead</i> dalam Larutan TPP.....	38
Gambar 4.6 Kitosan <i>Bead</i> yang Telah Didekantasi.....	38
Gambar 4.7 Sampel Pengukuran Absorbansi.....	39
Gambar 4.8 Grafik Perbandingan Lipase:Kitosan terhadap Enzim Loading pada Konsentrasi Kitosan 20 mg/mL.....	41
Gambar 4.9 Grafik Perbandingan Lipase:Kitosan terhadap Enzim Loading pada Konsentrasi Kitosan 30 mg/mL.....	41
Gambar 4.10 Grafik Perbandingan Volume Lipase:Kitosan terhadap Enzim <i>Loading</i> pada Konsentrasi Kitosan 20 mg/mL dan 30 mg/mL	42
Gambar 4.11 Reaksi Esterifikasi Asam Oleat dengan Stearil Alkohol	44
Gambar 4.12 Hasil Reaksi (a) Beberapa Saat Setelah Reaksi (b) Pada Suhu Ruang	45
Gambar 4.13 Grafik Perbandingan Lipase:Kitosan terhadap Yield Wax Ester pada Konsentrasi Kitosan 20mg/mL.....	46
Gambar 4.15 Grafik Perbandingan Volume Lipase:Kitosan terhadap <i>Yield Wax Ester</i> pada Konsentrasi Kitosan 20 mg/mL dan 30 mg/mL	48
Gambar 4.14 Grafik Perbandingan Lipase:Kitosan terhadap Yield Wax Ester pada Konsentrasi Kitosan 30mg/mL.....	47

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 <i>State of the Art</i>	27
Tabel 3.1 Alat yang Digunakan dalam Immobilisasi Lipase	29
Tabel 3.2 Alat yang Digunakan untuk Penentuan Konsentrasi Enzim Terimmobilisasi.....	30
Tabel 3.3 Alat yang Digunakan dalam Sintesis Wax Ester dengan Reaksi Esterifikasi.....	31
Tabel 4.1 Enzim <i>Loading</i> pada Variasi Perbandingan Lipase : Kitosan dengan Konsentrasi Kitosan 20 mg/mL.....	40
Tabel 4.2 Enzim <i>Loading</i> pada Variasi Perbandingan Lipase : Kitosan dengan Konsentrasi Kitosan 30 mg/mL.....	40
Tabel 4.3 Data <i>Yield</i> dengan Variasi Perbandingan Lipase:Kitosan pada Konsentrasi Kitosan 20mg/mL.....	46
Tabel 4.4 Data <i>Yield</i> dengan Variasi Perbandingan Lipase:Kitosan pada Konsentrasi Kitosan 30mg/mL.....	46

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Wax ester adalah ester yang dibentuk dari asam lemak dan alkohol rantai panjang. *Wax* ester memiliki struktur yang mirip dengan produk turunan dari petroleum sehingga dapat menjadi pengganti produk turunan petroleum yang tidak dapat diperbaharui. *Wax* ester banyak digunakan pada industri kosmetik, misalnya pada pembuatan *conditioner* dan *moisturizer*, dalam industri farmasi misalnya sebagai *antifoaming* dalam pembuatan penisilin (Gunawan dan Suhendra, 2008). Produksi *wax* ester secara konvensional adalah dengan reaksi transesterifikasi asam lemak rantai panjang dengan alkohol rantai panjang menggunakan katalis asam. Namun reaksi ini membutuhkan suhu dan tekanan tinggi serta waktu lama (1-2 hari) karena pembentukan produk sampingan yang tidak diinginkan (Guncheva dan Zhiryakova., 2008)

Untuk itu, digunakan alternatif katalis lain yang lebih baik. Salah satu alternatif tersebut adalah dengan katalis lipase. 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, 2003) sehingga diharapkan dengan digunakannya katalis ini dapat mengoptimasi produksi *wax* ester yang dihasilkan. Namun, harga lipase komersial biasanya sangat tinggi karena proses produksinya yang sulit dan memakan waktu. Selain itu, dalam proses reaksi enzimatik, lipase tidak dapat digunakan kembali lagi karena terlarut dalam media reaksi (Kirk, et al., 2002). Hal ini menyebabkan biaya reaksi yang dikatalisis lipase menjadi meningkat. Perlu adanya teknik agar lipase dapat digunakan kembali, salah satunya adalah teknik reaksi immobilisasi dengan bantuan support sebagai media pembantu yang dapat menahan enzim dalam struktur molekulnya, diharapkan enzim dapat digunakan kembali sehingga biaya produksi reaksi enzimatik dapat ditekan (Scragg, 1989).

Saat ini, ada beberapa metode dalam mengimmobilisasi lipase, antara lain metode *carrier-binding*, *cross-linking*, dan *entrapment*. Dari ketiga metode tersebut tidak ada metode yang benar-benar memenuhi semua kriteria metode yang baik. Masing-masing metode memiliki kekurangan dan kelebihan. Mengimmobilisasi lipase pada permukaan *support* dengan ikatan lemah merupakan cara immobilisasi yang paling mudah dan murah, namun stabilitasnya rendah karena lipase dapat terdesorpsi dari *support* dengan mudah (Tan, et al., 2010). Mengimmobilisasi lipase menggunakan ikatan kovalen untuk mengikat lipase pada *support* memiliki stabilitas yang tinggi, namun aktivitas lipase berkurang karena struktur lipase berubah. Selain itu, proses yang dibutuhkan untuk mengimmobilisasi lipase sangat sulit (Tan, et al., 2010). Begitu juga dengan metode *cross-linking*. Stabilitas lipase terjaga, namun aktivitasnya berkurang karena ikatan yang dibentuk adalah ikatan kimia sehingga mengubah struktur lipase. Metode *entrapment* lebih mudah dalam prosesnya dan tidak mengubah struktur lipase. Namun, masalah yang terjadi dalam mengimmobilisasi lipase dengan metode *entrapment* adalah restriksi transfer massa selama proses katalitik sehingga metode ini hanya efektif untuk substrat dengan berat molekul rendah (Tan, et al., 2006). Metode *entrapment* adalah metode yang paling ideal karena hasil immobilisasi enzimnya stabil, tidak seperti metode *carrier-binding*, dan cara yang digunakan tidak serumit metode *cross-linking* (Noureddini, et al., 2004)

Dalam penelitian ini, lipase diimmobilisasi dengan metode *entrapment* menggunakan *support* kitosan. Variasi yang digunakan adalah perbandingan volume lipase dan *support*, dan konsentrasi kitosan. Hasil immobilisasi lipase tersebut digunakan sebagai katalis untuk sintesis *wax* ester dari reaksi esterifikasi asam oleat dengan stearil alkohol. Produk dari reaksi tersebut kemudian dianalisis dengan HPLC untuk mengetahui *yield*. Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat mengetahui kondisi optimal dalam immobilisasi lipase dengan metode *entrapment* pada *support* kitosan.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh perubahan faktor-faktor dalam proses immobilisasi lipase, seperti konsentrasi kitosan dan perbandingan volume lipase dengan kitosan terhadap enzim *loading*.
2. Bagaimana pengaruh variasi faktor dalam immobilisasi tersebut terhadap *yield wax ester* yang dihasilkan

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh konsentrasi kitosan dan perbandingan volume lipase dengan *support* dalam immobilisasi lipase terhadap enzim *loading*.
2. Mengetahui pengaruh variasi dalam immobilisasi terhadap *yield wax ester* yang dihasilkan.

1.4 Batasan Masalah

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

1. Biokatalis yang digunakan adalah *Candida rugosa* lipase yang diimmobilisasi dengan metode *entrapment* menggunakan *support* kitosan.
2. *Wax ester* didapatkan dengan reaksi esterifikasi dari stearil alkohol dan asam oleat sebagai sumber asam lemak bebas.
3. Reaktor yang digunakan adalah reaktor *batch* berupa tabung reaksi berukuran 10 mL yang diletakkan dalam *shaking waterbath*.

1.5 Sistematika Penulisan

Sistematika penulisan dari proposal ini adalah:

BAB I: PENDAHULUAN

Bab ini berisi latar belakang, rumusan masalah, tujuan, batasan masalah, dan sistematika penulisan.

BAB II: TINJAUAN PUSTAKA

Bab ini menjelaskan tentang dasar-dasar teori yang berhubungan dengan dengan penelitian. Berisi penjelasan umum yang diperlukan mengenai *State*

Universitas Indonesia

of the art yang terdiri dari penelitian-penelitian yang telah dilakukan untuk mengimmobilisasilipase 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

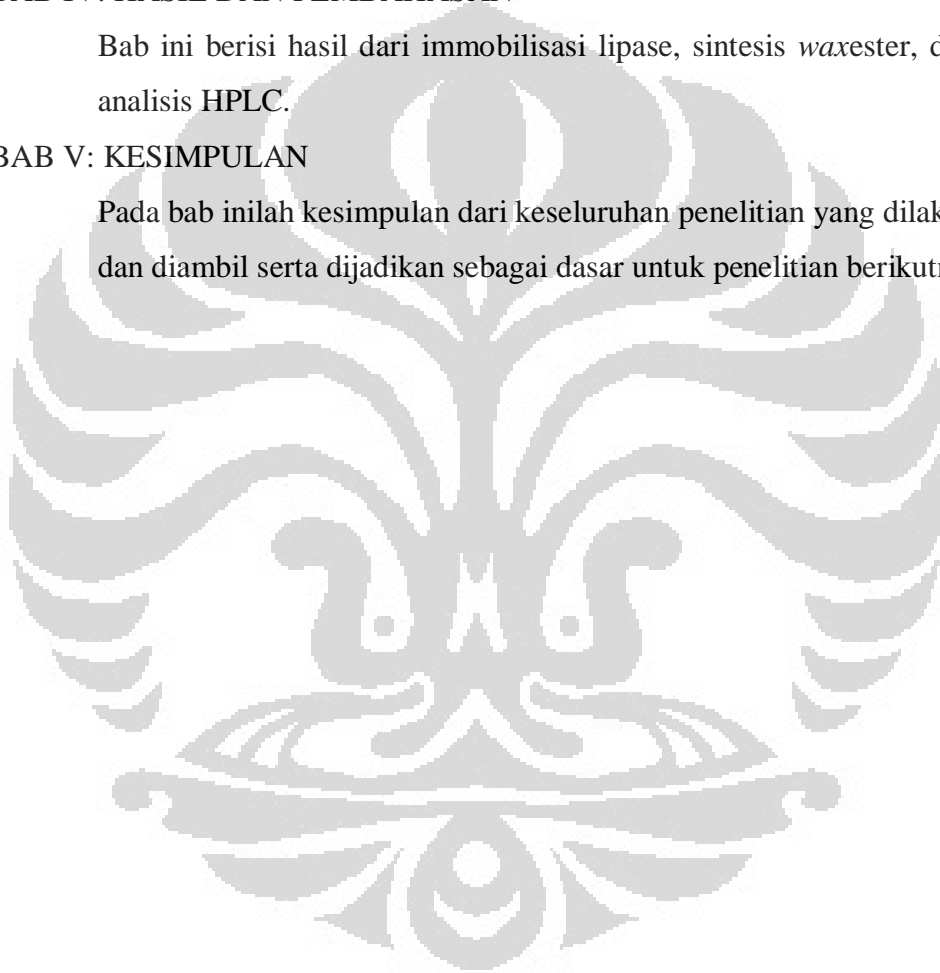
Menjelaskan tentang diagram alir penelitian, alat dan bahan yang digunakan, dan metode yang digunakan untuk menganalisis data.

BAB IV: HASIL DAN PEMBAHASAN

Bab ini berisi hasil dari immobilisasi lipase, sintesis *wax* ester, dan hasil analisis HPLC.

BAB V: KESIMPULAN

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



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Lipase

Lipase (*Triasil gliserol hidrolase*) merupakan enzim 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 pada interaksi dengan permukaan *hidrofobik* seperti droplet lemak, memungkinkan pergerakan seperti 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.

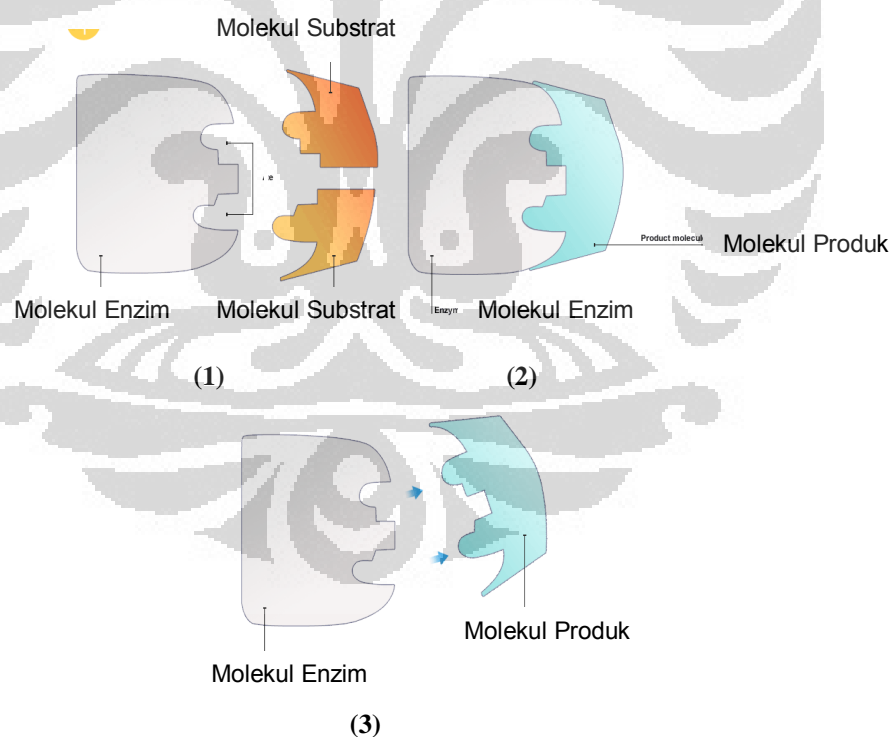
Selektivitas yang tinggi dan kondisi operasi yang ringan menjadikan enzim lipase sangat baik untuk mensintesis beragam produk alami, farmasi, bahan makanan, dan pelumas bio. Alasan utama penggunaan enzim ini adalah meningkatnya ketertarikan dan permintaan akan produk yang berasal dari alam dan ramah 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. 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.

2.1.1 Mekanisme Kerja Enzim

Enzim mengkatalisis reaksi dengan meningkatkan kecepatan reaksi yang dilakukan dengan cara menurunkan energi aktivasi (energi yang diperlukan untuk reaksi). Penurunan dilakukan dengan membentuk kompleks dengan substrat. Setelah produk dihasilkan, Enzim kemudian dilepaskan. Enzim bebas akan membentuk kompleks dengan substrat lain (Aryulina, et al, 2006). Cara kerja enzim diterangkan dengan dua teori, yaitu:

1. Teori Gembok dan Kunci (*Lock and Key Theory*)

Di dalam enzim terdapat sisi aktif yang tersusun dari sejumlah kecil asam amino. Bentuk sisi aktif sangat spesifik, sehingga hanya molekul dengan bentuk tertentu yang dapat menjadi substrat bagi enzim. Enzim dan substrat akan bergabung bersama membentuk kompleks. Seperti kunci yang masuk ke dalam gembok. Ilustrasi dari teori tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.1.

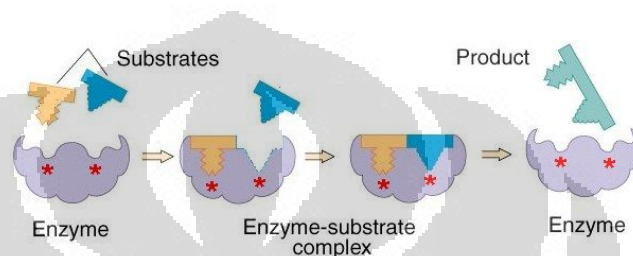


Gambar 2.1 Cara Kerja Enzim berdasarkan Teori Gembok Kunci

http://www.bbc.co.uk/scotland/learning/bitesize/standard/biology/investigating_cells/enzymes_and_aerobic_respiration_rev4.shtml

2. Teori Kecocokan yang Terinduksi (*Induced Fit Theory*)

Berdasarkan bukti dari kristalografi sinar X, analisis kimia sisi aktif enzim, serta teknik lainnya, diduga bahwa sisi aktif enzim bukan merupakan bentuk yang kaku. Menurut teori kecocokan yang terinduksi, sisi aktif enzim merupakan bentuk yang fleksibel. Ketika substrat memasuki sisi aktif enzim, bentuk sisi aktif termodifikasi untuk membentuk kompleks. Ilustrasi dari teori ini dapat dilihat pada Gambar 2.2.



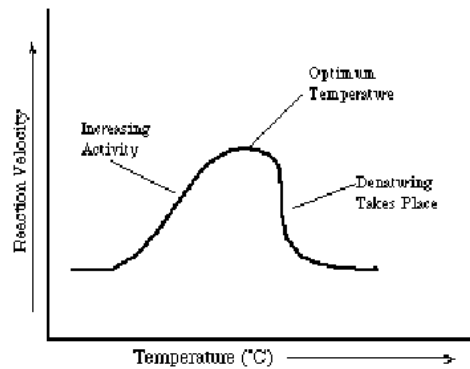
Gambar 2.2 Cara Kerja Enzim Berdasarkan Kecocokan yang Terinduksi (Carr, 2009)

2.1.2 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

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). Gambar 2.3 menggambarkan hubungan antara suhu dengan kecepatan reaksi. Dari grafik tersebut diketahui bahwa aktivitas enzim meningkat dengan meningkatnya suhu sampai pada titik tertentu yang disebut suhu optimum. Setelah melewati suhu tersebut, aktivitas enzim akan menurun.



Gambar 2.3 Suhu Optimum Biokatalis

(<http://www.worthingtonbiochem.com/intro/biochem/effectsph.html>)

Suhu optimum reaksi yang dikatalisis enzim adalah 40 °C. Di atas suhu tersebut, produk yang dihasilkan menurun. Peningkatan suhu di atas suhu optimum menyebabkan putusannya ikatan hidrogen dan ikatan lain yang merangkai molekul enzim, sehingga enzim mengalami denaturasi.

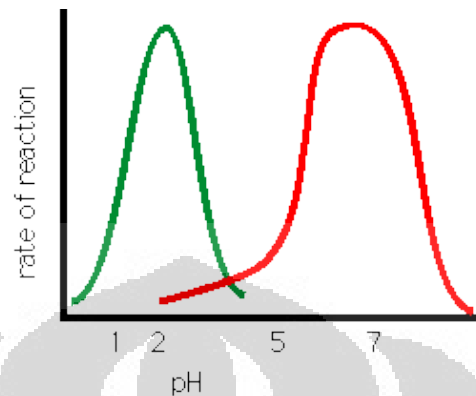
Denaturasi adalah rusaknya bentuk tiga dimensi enzim yang menyebabkan enzim tidak dapat lagi berikatan dengan substratnya. Denaturasi menyebabkan aktivitas enzim menurun atau hilang. Denaturasi umumnya bersifat *irreversible* (tidak dapat kembali). Namun, enzim-enzim yang langka seperti RNAase dapat 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, dapat dilihat pada Gambar 2.4 dimana kurva yang berwarna hijau menunjukkan pH optimum pepsin (enzim yang bekerja di dalam lambung). Pepsin memiliki pH optimum sekitar 2 (sangat asam), sedangkan amilase (enzim yang bekerja di mulut dan usus halus) ditunjukkan dengan kurva

Universitas Indonesia

berwarna merah, memiliki pH optimum sekitar 7. Gambar dibawah ini menunjukkan pH optimum dari biokatalis.



Gambar 2.4 pH Optimum Biokatalis

(http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/ph_and_.htm)

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

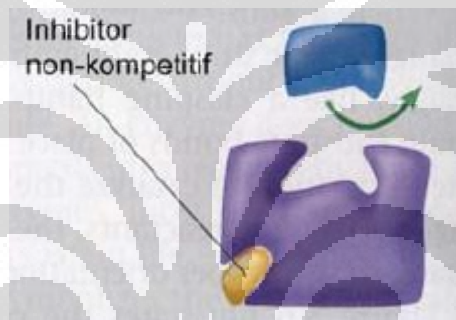
Inhibitor adalah zat yang dapat menghambat kerja enzim. Penghambatan kerja enzim dibedakan menjadi penghambatan reversibel dan penghambatan ireversibel. Selain itu, ada pula inhibitor kompetitif dan inhibitor non-kompetitif. Inhibitor kompetitif adalah molekul penghambat yang cara kerjanya bersaing dengan 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.

Inhibitor nonkompetitif adalah suatu zat yang menghambat kerja enzim dengan cara berikatan dengan enzim tetapi bukan pada *active side*-nya, karena inhibitor tidak memiliki kesamaan dengan struktur substrat, maka peningkatan 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. Ilustrasi cara

kerja inhibitor kompetitif dan nonkompetitif dapat dilihat pada Gambar 2.5 dan 2.6.



Gambar 2.5 Inhibitor kompetitif (Siregar, 2008)



Gambar 2.6 Inhibitor nonkompetitif (Siregar, 2008)

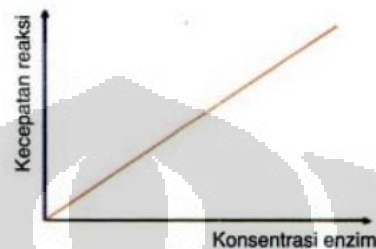
Berdasarkan sifat ikatan enzim-inhibitor dibagi menjadi dua jenis yaitu inhibitor reversibel dan inhibitor irreversibel. Inhibitor reversibel dapat berikatan dengan enzim bebas maupun kompleks enzim substrat, terikat pada tempat yang berbeda dengan pengikatan substrat dan dapat menurunkan kadar enzim yang aktif. Inhibitor irreversibel dapat berikatan dengan enzim secara irreversibel dan dapat mengubah 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. Hubungan antara konsentrasi enzim dan kecepatan reaksi diilustrasikan pada Gambar 2.7.

Universitas Indonesia

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 2.7 Pengaruh konsentrasi enzim terhadap kecepatan reaksi (Aryulina, et al, 2006)

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}). Pada Gambar 2.8, dapat dilihat hubungan antara konsentrasi substrat dengan kecepatan reaksi.



Gambar 2.8 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi (Aryulina, et al, 2006)

2.1.3 Faktor yang Mempengaruhi Esterifikasi dengan Media Enzim

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.

2.2 Immobilisasi Lipase

Lipase memiliki aktivitas katalitik dan regio-, enantio-, dan kemoselektivitas yang tinggi. Hal, tersebut memungkinkan lipase untuk diaplikasikan dalam berbagai industri. Namun, ada beberapa kelemahan dalam penggunaan lipase di industri. Sistem reaksi lipase terlalu kompleks, biasanya terdiri dari dua fasa: fasa *aqueous* dengan enzim yang terlarut dan fasa organik dengan substrat yang terlarut. Tidak seperti hidrolase lain yang bekerja pada fasa *aqueous*, lipase hanya aktif hanya jika diadsorpsi ke dalam hubungan antar muka minyak/air (Knežević, 2004). Selain itu, mahalnya harga lipase juga menjadi kendala penggunaan lipase dalam industri. Oleh karena itu, dibutuhkan suatu cara untuk memaksimalkan penggunaan lipase. Salah satu caranya adalah dengan melakukan immobilisasi lipase.

Immobilisasi enzim adalah proses menempatkan atau mengikat enzim secara fisik pada sebuah *microenvironment* yang menyimpan aktivitas katalis sehingga enzim dapat digunakan secara berulang-ulang. Keuntungan menggunakan enzim yang diimmobilisasi adalah (Parshad, et al., 2008):

1. Enzim dapat digunakan berulang-ulang dan secara kontinyu.
2. Enzim dapat dipisahkan dengan mudah dari produk yang mudah larut.
3. Meningkatkan stabilitas enzim yang menyebabkan enzim dapat bertahan pada lingkungan yang lebih keras misalnya pada pH rendah dan suhu yang cukup tinggi.

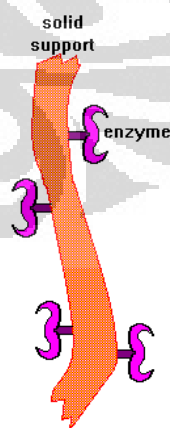
Beberapa metode immobilisasi enzim telah dikembangkan, antara lain metode *carrier-binding*, *cross-linking*, dan *entrapment*. Berikut adalah penjelasan dari masing-masing metode tersebut:

2.2.1 Metode Carrier-binding

2.2.1.1 Adsorpsi

Immobilisasi dengan adsorpsi dilakukan dengan cara melekatkan lipase pada permukaan *support* menggunakan ikatan yang lemah seperti van der Waals, interaksi hidrofobik, atau ikatan hidrogen. Metode ini dapat dilakukan tanpa menyebabkan kehilangan aktivitas enzim yang besar, prosesnya pun termasuk yang paling mudah dan murah dibandingkan dengan metode lain (Tan, et al., 2010). Namun, karena lemahnya daya adhesi antara enzim dan *support*, enzim yang diimmobilisasi dengan metode ini tidak cukup stabil untuk mencegah terjadinya desorpsi dari *support*. Metode adsorpsi harus dihindari jika enzim tidak toleran di dalam produk. (Knežević, et al., 2004).

Sejumlah *support* telah diteliti untuk mengimmobilisasi lipase dengan metode adsorpsi. *Support* tersebut antara lain acrylic resin (Watanabe, et al., 2000), membran tekstil (Tan, et al., 2006), polypropilene (Salis, et al., 2008), dan *diatomaceous* (Gupta, et al., 2007). Ilustrasi enzim yang diimmobilisasi dengan metode adsorpsi dapat dilihat pada Gambar 2.9.



Gambar 2.9 Metode Immobilisasi Enzim dengan Adsorpsi (University of Saskatchewan, 2008)

2.2.1.2 Covalent-binding

Covalent binding lipase terhadap *support* organik dan anorganik lebih menguntungkan dibandingkan metode lain karena pembatasan difusi pada substrat. Selain itu, immobilisasi kovalen memberikan keuntungan yang sangat besar dengan meningkatkan stabilitas enzim dan bercampur dengan larutan.

Terdapat banyak *support* anorganik dan organik untuk immobilisasi lipase dengan metode ini, termasuk *porous alumina, metallic oxides, stainless steel*, dan *controlled pore glass (CPG)*, selulosa, pati, kitin, *sepharose* dan polimer sintetik. *Support* tersebut tidak memiliki gugus reaktif untuk langsung mengikat enzim. Namun gugus hidroksi, amino, amida dan karboksi dapat diaktivasi untuk immobilisasi enzim. Ikatan kovalen biasanya dibentuk oleh jembatan molekul aktif, seperti CNBr, dan reagen bi- atau multifungsional seperti glutaraldehid. (Knežević, et al., 2004)

Walaupun metode *covalent binding* memiliki banyak keuntungan, namun aplikasinya lebih terbatas karena *support* dapat diaktivasi hanya dengan sedikit metode. Selain itu, kondisi reaksi yang diperlukan relatif rumit dan efisiensi prosedur immobilisasinya sangat rendah. (Knežević, et al., 2004).

Ilustrasi enzim yang diimmobilisasi dengan metode *covalent binding* dapat dilihat pada Gambar 2.10.



Gambar 2.10 Metode Immobilisasi Enzim dengan Covalent Binding (Nunes dan Louis, 2006)

2.2.2 Metode *Cross-linking*

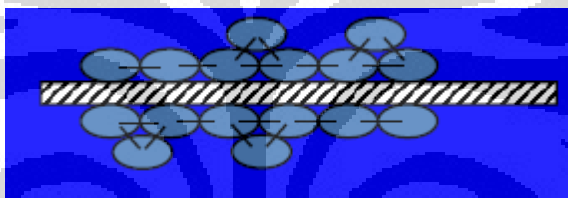
Immobilisasi ini dilakukan dengan pembentukan hubungan silang intermolekular antara molekul enzim dengan reagen bifungsional atau multifungsional. Reagen yang paling sering digunakan adalah glutaraldehid. Sebenarnya, pada metode *cross-linking* dan ikatan kovalen akan terjadi perubahan bentuk molekul enzim. Hal ini akan menyebabkan penurunan aktivitas enzim.

Maka dari itu, untuk meningkatkan stabilitas enzim, hal yang paling baik adalah mengombinasikan *cross-linking* dengan metode adsorpsi.

Ilustrasi enzim yang diimmobilisasi dengan metode *cross-linking* dapat dilihat pada Gambar 2.11 dan 2.12



Gambar 2.11 Metode Immobilisasi Enzim dengan Cross-linking (Hartoto, 2006)



Gambar 2.12 Metode cross-linking yang telah dikombinasikan dengan metode adsorpsi (Hartoto, 2008)

2.2.3 Metode *Entrapment*

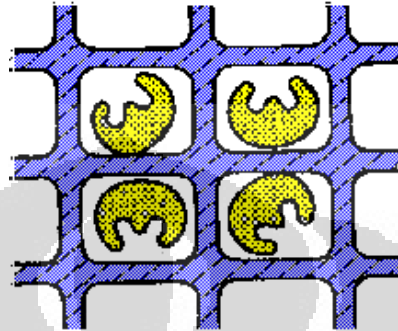
Immobilisasi lipase dengan metode *entrapment* adalah berdasarkan porositas matriks yang rendah dan pada waktu yang bersamaan menahan enzim di dalam *support* serta menyediakan difusi substrat atau produk. Polimer alami dapat digunakan sebagai material *carrier* untuk immobilisasi lipase seperti alginate yang ter-*cross-linked* dengan rantai linear ion Ca^{2+} (Moon, et al., 2005), gelatin, carrageenan (Devi, et al., 2004), dan kitosan (Neau, et al., 2002). *Support* tersebut memiliki kelebihan yaitu bersifat non-toksik, biokompatibel dan biodegradable.

Namun, kebocoran dan masalah difusi sangat jelas jika menggunakan metode ini. Keterbatasan difusi mengurangi aktivitas lipase yang diimmobilisasi. Untuk mengurangi masalah tersebut, dapat dilakukan dengan berbagai cara antara lain, dengan mengurangi ukuran partikel, meningkatkan porositas dan mengoptimalkan distribusi lipase dalam *bead*. Oleh karena itu, ukuran diameter

Universitas Indonesia

bead menjadi parameter yang penting jika menggunakan *bead* hidrogel sebagai *support* untuk immobilisasi lipase (Knežević, 2004).

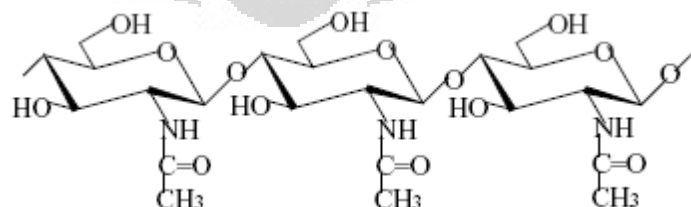
Ilustrasi enzim yang diimmobilisasi dengan metode *entrapment* dapat dilihat pada Gambar 2.13.



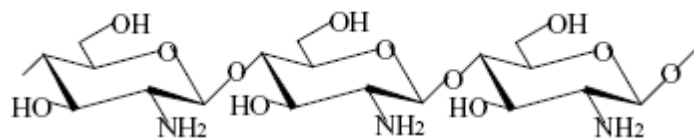
Gambar 2.13 Metode Immobilisasi Enzim dengan entrapment (Nunes dan Louis, 2006)

2.3 Kitosan

Kitosan adalah senyawa poli N-asetil glukosamin yang terdeasetilasi sebanyak mungkin, namun tidak cukup sempurna untuk disebut poli glukosamin. Kitosan tidak larut dalam air dan larutan basa kuat, sedikit larut dalam HCl dan tidak larut dalam H₂SO₄ dan beberapa pelarut organik seperti alkohol, aseton, dimetil formamida dan dimetilsulfoksida. Namun, kitosan larut dalam asam format dengan konsentrasi 0,2%-100%. Kitosan tidak beracun dan mudah dibiodegradasi. Berat molekulnya sekitar $1,2 \times 10^5$ gram/mol, tergantung pada degradasi yang terjadi selama proses deasetilasi (Pasaribu, 2004). Struktur kitin dan kitosan dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 2.14 Struktur Kitin (Krajewska, 2004)

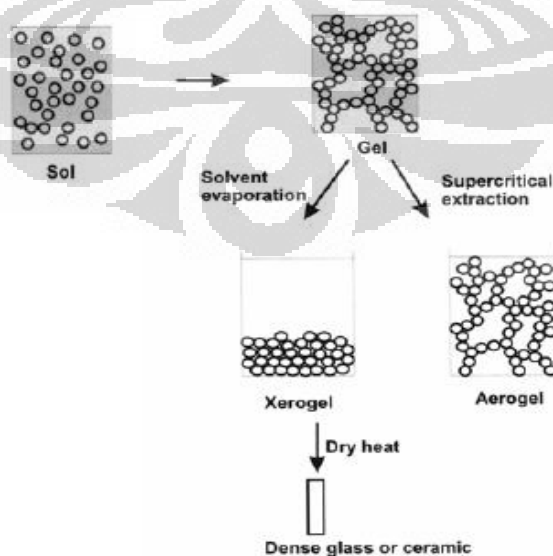


Gambar 2.15 Struktur Kitosan (Krajewska, 2004)

2.4 Metode Sol-gel

Proses sol-gel adalah proses perubahan dari bentuk sol (cair) menjadi *gel* (seperti padatan). Sol terdiri dari partikel koloid yang tidak terlarut dan juga tidak tersedimentasi. Partikel atau polimer yang terdispersi dalam sol berkumpul untuk membentuk jaringan tiga dimensi yang seperti padatan (*gel*). Selama sol berubah menjadi *gel*, viskositasnya mendekati tak terhingga dan akhirnya menjadi tak bergerak (tidak dapat mengalir dan tidak dapat mengikuti bentuk wadahnya). Perubahan dari sol menjadi *gel* ini disebut *gelation*. Waktu yang dibutuhkan untuk membentuk *gel* setelah semua bahan dicampur disebut waktu *gelation*. Proses sol-gel umumnya terjadi karena interaksi antara partikel dalam koloid yang disebabkan oleh gaya Van der Waals atau ikatan hidrogen. Namun, *gel* juga dapat terbentuk akibat ikatan antar rantai polimer.

Produk akhir dari proses sol-gel ini bermacam-macam tergantung dari proses tambahan setelah sol berubah menjadi *gel*. Di bawah ini adalah gambar berbagai pilihan dalam memproses sol-gel.



Gambar 2.16 Pilihan Proses Sol-Gel

Jika sol-gel dikeringkan dengan evaporasi, gaya kapilaritas akan menyebabkan pengerutan, jaringan *gel* akan hilang dan akan terbentuk *xerogel*. Jika pengeringan dilakukan pada kondisi superkritis, struktur jaringan akan bertahan dan menghasilkan *gel* dengan pori yang besar. *Gel* ini disebut *aerogel*. Densitas dari *aerogel* ini akan sangat rendah, yaitu sekita 0,005 gram/L

2.5 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, yang digunakan 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).

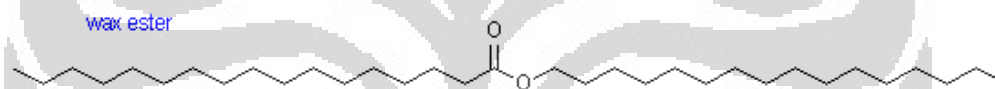
2.6 Wax Ester

Wax ester merupakan salah satu produk oleokimia. *Wax* ester adalah ester rantai panjang yang diturunkan dari asam lemak dan alkohol dengan panjang rantai karbon 12 karbon atau lebih (Gunawan dan Suhendra, 2008). Senyawa ini memiliki banyak potensi aplikasi karena sifatnya yang membasahi namun tidak menimbulkan rasa lengket ketika diaplikasikan ke kulit. *Wax* ester merupakan bahan yang penting untuk kosmetik, farmasi, pelumas, *plasticizers* dan *polishes* serta industri kimia lainnya (Gunawan dan Suhendra, 2008).

Wax dapat dibagi menjadi 2 jenis, solid *wax* ester yaitu *wax* ester yang berbentuk solid/padatan pada suhu ruang dan juga liquid *wax* ester, yaitu *wax* ester yang berbentuk cair pada suhu ruang. Sifat ini bergantung pada panjang rantai karbon dan derajat kejenuhan dari ester. Semakin panjang rantai karbon dan kejenuhannya akan meningkatkan titik lebur dari ester (Gunawan dan Suhendra, 2008).

Sifat dan karakteristik dari *wax* ester ini sangat dipengaruhi oleh asam lemak dan alkohol yang membentuknya. Semakin panjang asam lemak maka akan semakin tinggi titik lelehnya. Setiap penambahan atom karbon akan meningkatkan titik leleh sekitar 1-2°C seperti halnya yang terjadi pada hidrokarbon. Sedangkan adanya ikatan rangkap di alkohol atau asam akan menurunkan titik leleh sekitar 30°C. Letak penambahan ikatan ini juga berpengaruh terhadap besarnya penurunan titik leleh. Penambahan ikatan rangkap di tengah atau pusat molekul akan mengakibatkan penurunan yang lebih drastis jika dibandingkan penambahan ikatan rangkap di dekat ujung atau akhir molekul. Selain itu penambahan ikatan rangkap di rantai alkohol akan menimbulkan efek yang lebih drastis (kurang lebih 35°C) jika dibandingkan dengan penambahan ikatan rangkap yang dilakukan pada rantai lemak (kurang lebih 25°C). Penambahan ikatan rangkap yang kedua juga akan menurunkan titik leleh dari *wax* ester, tetapi penurunan ini tidak sebanyak seperti penurunan pada penambahan ikatan rangkap yang pertama (Patel, et al, 2001).

Selain penambahan ikatan rangkap dan panjang rantai karbon, titik leleh dari *wax* ester juga dapat dipengaruhi oleh adanya ikatan ester dan letaknya. Adanya ikatan ester akan menurunkan titik leleh sekitar 15°C jika dibandingkan dengan hidrokarbon dengan jumlah karbon yang sama. Hal ini disebabkan ikatan ester akan membuat lipid menjadi kaku sehingga akan mempengaruhi lipid *packing* dan akhirnya menurunkan titik leleh dari *wax* ester. Selain itu letak ikatan ester juga mempengaruhi. Ikatan ester yang lebih berada di tengah rantai atau rantai yang lebih 'simetris' akan membuat titik leleh *wax* ester 1-5°C lebih tinggi. Jika ikatan ester ini dipindahkan ke ujung rantai maka titik lelehnya akan menurun 1-5°C (Patel, et al, 2001). Struktur umum dari *wax* ester dapat dilihat pada Gambar 2.17.



Gambar 2.17 Struktur wax ester (Patel, et al, 2001)

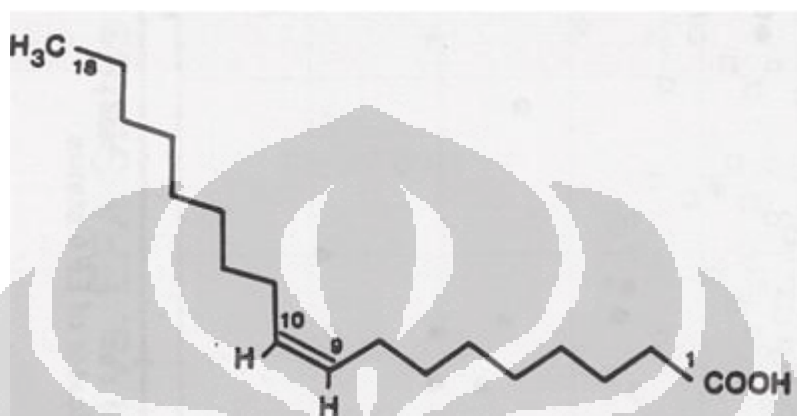
Wax ester terdapat di alam dalam bentuk lain. *Wax* ester kebanyakan ditemukan di lapisan permukaan kutikula pada daun, serangga, alga laut, dan bakteri tertentu. Pada mamalia, *wax* ester disintesis pada beberapa jaringan terutama jaringan hati. Selain itu, kelenjar minyak menyekresikan campuran lipid yang mengandung *wax* ester ke permukaan kulit (Tsujita et al, 1999). *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).

2.7 Asam Oleat

Asam oleat atau asam Z-9-oktadenoat 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 C₉ dan C₁₀. 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

Universitas Indonesia

dan titik didihnya 360 °C. Asam oleat memiliki rumus kimia $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ 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 di bawah ini.



Gambar 2.18 Struktur molekul asam oleat (NIST Chemistry Webbook)

2.8 Reaksi Pembentukan Ester

Seperti yang disebutkan oleh Tarigan (2009) pada *Ester Asam Lemak*, ada beberapa reaksi yang dapat menghasilkan ester asam lemak yaitu

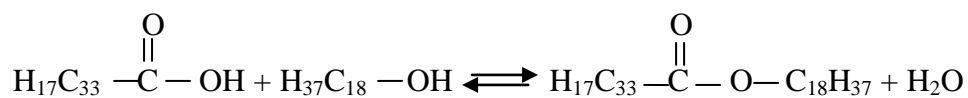
1. Esterifikasi

Esterifikasi adalah reaksi ionik antara asam karboksilat dan alkohol dimana terjadi reaksi adisi dan penataan ulang eliminasi. Reaksi ini dapat dikatalis dengan menggunakan lipase atau dengan asam anorganik seperti asam sulfat dan asam klorida. Asam anorganik akan membuat asam karboksilat mengalami konjugasi dan hasil konjugasi dari asam karboksilat tersebut akan berperan sebagai substrat (Pangestu, 2011). Mekanisme reaksi esterifikasi dapat dilihat pada Gambar 2.19.



Gambar 2.19 Reaksi Esterifikasi (Tarigan, 2002)

Pada penelitian ini, wax ester dihasilkan dari reaksi esterifikasi antara asam oleat dan stearil alkohol. Mekanisme reaksinya dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



Gambar 2.20 Reaksi Esterifikasi Asam Oleat dengan Stearil Alkohol

2. Interesterifikasi

Interesterifikasi adalah reaksi pertukaran atau penataan ulang gugus asil antara dua buah ester. Jika reaksi pertukaran gugus asil terjadi pada satu molekul trigliserida maka reaksi tersebut disebut intraesterifikasi. Sedangkan jika pertukaran terjadi pada molekul triasilgliserida yang berbeda maka disebut interesterifikasi dan karena penataan ulang ini bersifat acak atau random, maka reaksi ini disebut juga randomisasi (Pangestu, 2011).

Reaksi interesterifikasi ini dapat terjadi dengan atau tanpa katalis. Jika tidak menggunakan katalis, reaksi dilakukan pada suhu tinggi (300⁰C) dan juga dalam waktu lama. Katalis yang dapat digunakan untuk mengkatalis reaksi ini dapat berupa biokatalis atau enzim atau katalis kimia. Katalis kimia lebih murah dan mudah dilakukan sedangkan dengan menggunakan enzim reaksinya lebih mudah dikontrol, tidak ada reaksi samping dan ramah lingkungan (Pangestu, 2011). Gambar di bawah ini adalah mekanisme reaksi interesterifikasi.



Gambar 2.21 Reaksi Interesterifikasi (Tarigan, 2002)

3. Alkoholisis

Alkoholisis adalah reaksi antara suatu ester dengan alkohol untuk membentuk ester baru. Reaksi ini disebut juga reaksi transesterifikasi yang dapat dikatalis dengan

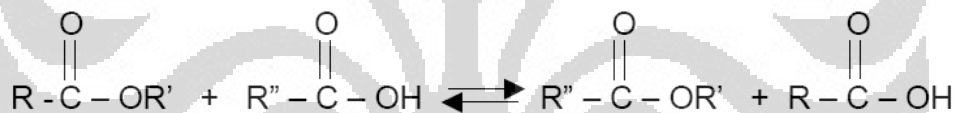
katalis basa ataupun dalam bentuk alkoholat dan juga dengan katalis asam. (Pangestu, 2011). Mekanisme reaksi alkoholisis dapat dilihat pada Gambar 2.22.



Gambar 2.22 Reaksi Alkoholisis (Tarigan, 2002)

4. Asidolisis

Asidolisis adalah reaksi antara asam lemak dengan ester lain untuk membentuk ester yang baru. Reaksi ini dapat dikatalis dengan cara kimia atau dengan enzim. Reaksi ini memungkinkan untuk mengganti jenis asam lemak yang terdapat dalam ester atau triasilgliserida sehingga terbentuk ester dengan asam lemak yang berbeda yang sifatnya berbeda dengan ester asalnya (Pangestu, 2011). Gambar 2.23 di bawah ini adalah mekanisme reaksi asidolisis.



Gambar 2.23 Reaksi Asidolisis (Tarigan, 2002)

5. Reaksi-reaksi lainnya

Reaksi lain yang dapat membentuk ester adalah dengan mengubah asam lemak menjadi asil klorida terlebih dahulu dengan reaksi klorinasi dengan menggunakan SOCl₂ atau PCl₃. Dengan mengubahnya menjadi asil klorida, asam lemak menjadi lebih sensitif ketika direaksikan dengan alkohol (Pangestu, 2011).

Selain itu ester juga dapat dihasilkan dengan mereaksikan alkohol dengan anhidrida. Alkohol tersier juga dapat bereaksi dengan alkohol namun sangat lambat. Diperlukan kondisi yang tepat untuk menghasilkan ester dari alkohol tersier. Pembentukan ester dengan menggunakan alkohol tersier dapat dilakukan dengan baik jika menggunakan reagen Grignard. Disamping itu, ester juga dapat dihasilkan dengan mereaksikan garam perak dengan alkil halida dalam larutan etanolik, dengan melewati campuran uap asam ke dalam alkohol dengan katalis oksida logam pada temperatur 300⁰C, dengan mereaksikan asam karboksilat dengan olefin dengan katalis

boron trifluorida, serta dengan mereaksikan eter dengan karbon monoksida (Pangestu, 2011).

2.9 State of the Art

Saat ini, ada beberapa metode dalam mengimmobilisasi lipase, antara lain metode *carrier-binding*, *cross-linking*, dan *entrapment*. Metode *carrier-binding* adalah metode immobilisasi lipase dengan cara melekatkan lipase pada permukaan *support*. Dalam melekatkan lipase pada *support*, terdapat dua cara yaitu menggunakan ikatan yang lemah seperti van der Waals, interaksi hidrofobik, atau ikatan hidrogen dan menggunakan ikatan kovalen antara lipase dengan *support* (Knežević, 2004). Terdapat beberapa *support* yang digunakan dalam mengimmobilisasi lipase dengan metode *carrier-binding* yaitu *polyvinyl alcohol* (Ozturk dan Killinc., 2010), alumina (Bagi, et al., 1997), silika (Pfromm, et al., 2009; Wang, et al., 2009), *acrylic resin* (Xu, et al., 2005), *celite* (Gupta dan Shah, 2007), lateks (Wulan, et al.), serat selulosa (Karra-Châabounia, et al., 2008), *aminopropyl glass beads* (Yilmaz, et al., 2011), sporopollenin (Yilmaz, et al., 2009), dan *microporous* matriks polimer (Keskinler, et al., 2009a)

Metode kedua adalah *cross-linking*. Metode ini mengimmobilisasi lipase dengan menggunakan ikatan kovalen untuk menghubungkan antara molekul enzim. *Support* yang telah digunakan untuk mengimmobilisasi dengan metode *cross-linking* antara lain *poly(allyl glycidylether-co-ethylene glycol dimethacrylate)* (Nene, et al., 2008), SBA-15 (Usai, et al., 2010), dan *styrene-divinylbenzene* (Keskinler, et al., 2009b).

Metode yang ketiga adalah metode *entrapment*. Metode ini mengimmobilisasi lipase dengan cara memerangkap lipase dalam *support*. Beberapa *support* yang telah digunakan dalam penelitian sebelumnya antara lain Ca-alginat *bead* (Ozyilmaz, et al., 2010; Moon, et al., 2005; Parshad, et al., 2008; Cheirsilp, et al., 2009), *styrene-divinylbenzene bead* (Hernandez, et al., 2011), karbon aktif (Nouredini, et al., 2004; Moreno-Pirajan, et al., 2011), matriks zirconia (Pirozzi, et al., 2009), kitosan (Neau, et al., 2002), dan K-carrageenan (Devia, et al., 2004).

Lipase yang telah diimmobilisasi berasal dari berbagai sumber, antara lain pankreas babi, *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Pseudomonas cepacia*, dan mikroorganisme lain. Penggunaannya pun beragam, mulai dari katalis untuk reaksi hidrolisis, transesterifikasi, interesterifikasi, gliserolisis, hingga metanolisis. Pemetaan tentang penelitian-penelitian yang telah dilakukan sebelumnya dapat dilihat pada Tabel 2.1. Penelitian yang akan dilakukan kali ini menggunakan lipase yang berasal dari *Candida rugosa* yang akan diimmobilisasi dengan metode *entrapment* menggunakan *support* kitosan. Hasil immobilisasi lipase tersebut kemudian digunakan untuk mengkatalisis reaksi esterifikasi antara asam oleat dengan stearyl alkohol untuk mendapatkan *wax ester*.



Tabel 2.1 State of the Art

		REAKSI	SUPPORT	METODE		
				Carrier-binding	Cross-linking	Entrapment
S U M B E R L I P A S E	<i>Porcine Pancreatic</i>	esterifikasi	Polyvinyl	Ozturk, et al		
			Ca-alginat			Ozyilmaz, et al, 2010
		Hidrolisis	Alumina	Bagi, et al, 1997		
	<i>Candida antarctica</i>	esterifikasi	Silica	Pfromm, et al, 2009		
			Styrene-divinylbenzene beads			Hernandez, et al, 2004
		Interesterifikasi	Acrylic resin	Xu, et al, 2005		
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	transesterifikasi	Karbon aktif			Noureddini, et al, 2004
			Glutaraldehyde		Kumari, et al, 2007	
			Celite	Shah, et al, 2007		
		Gliserolisis	Ca-alginat			Cheirsilp, et al, 2009
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Hidrolisis	Zirconia			Pirozzi, et al, 2009
			Latex	Wulan, et al,		
			Serat Selulosa	Karra-Chaabounia, et al, 2009		
	<i>Candida rugosa</i>	Hidrolisis	Aminopropyl Glass bead	Yilmaz, et al, 2011		
			Sporopollenin	Yilmaz, et al, 2011		
			Silica	Wang, et al, 2009		
			Ca-Alginat			Won, et al, 2005
		esterifikasi	K-carrageenan			Devia, et al, 2004
			Kitosan			Neau, et al, 2002
			silica			Kawakami, et al, 1998
Karbon aktif					Moreno-pirajan, et al, 2011	
Sumber lipase lain	transesterifikasi	Microporous Polymeric Matrix	Keskinler, et al, 2009			
		SBA-15		Usai, et al, 2010		
	Metanolisis	Styrene-divinylbenzene beads		Keskinler, et al, 2009		
	Hidrolisis	Ca-alginat			Parshad, et al, 2008	

Universitas Indonesia

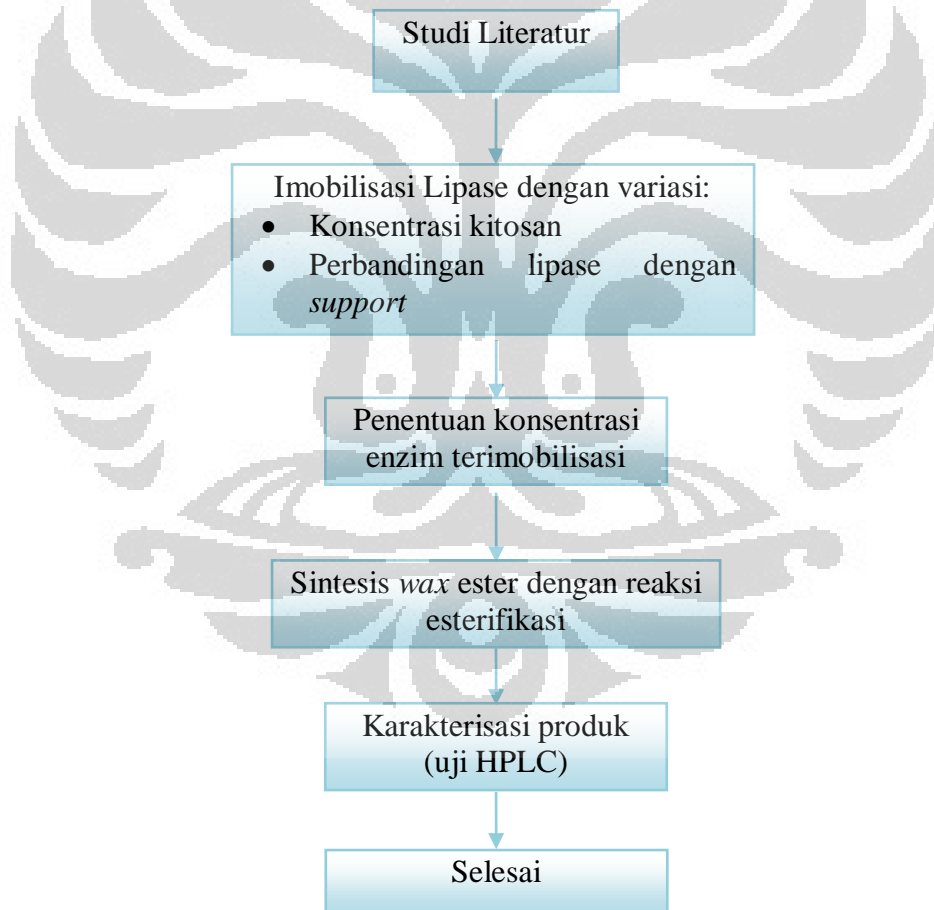
BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Diagram Alir Penelitian

Penelitian yang akan dilakukan memiliki beberapa tahap, yaitu:

1. Immobilisasi lipase
2. Penentuan konsentrasi enzim terimmobilisasi
3. Sintesis *wax* ester dengan reaksi esterifikasi
4. Karakterisasi produk

Penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada diagram alir dibawah ini:



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini antara lain:

1. Immobilisasi Lipase

Tabel 3.1 Alat yang Digunakan dalam Immobilisasi Lipase

No.	Alat	Fungsi
1.	Gelas Beaker 1L	Tempat larutan Tripoliposfat dan tempat mengimmobilisasi enzim
2.	<i>Hotplate stirrer dan stirrer bar (magnetic stirrer)</i>	Mengaduk larutan kitosan dalam asam asetat
3.	Kaca arloji	Sebagai wadah saat menimbang
4.	Labu Erlenmeyer 250 mL	Sebagai tempat melarutkan kitosan dalam asam asetat
5.	Timbangan digital	Untuk menimbang bahan
6..	Pipet Volume	Untuk mengambil larutan sesuai dengan volume yang diperlukan
7.	Spatula <i>stainless steel</i>	Untuk membantu memindahkan bahan
8.	Pipet tetes	Untuk meneteskan/memindahkan
9.	Kertas filter	Untuk memisahkan retentat (lipase terimmobilisasi) dari permeat (larutan yang digunakan selama immobilisasi)
10.	Pompa vakum	Untuk membantu filtrasi
11.	Corong Buchner	Untuk membantu proses filtrasi
12.	Refrigerator	Untuk menyimpan lipase immobilisasi
13.	Termometer	Untuk mengukur temperature

2. Penentuan Konsentrasi Enzim Terimmobilisasi

Tabel 3.2 Alat yang Digunakan untuk Penentuan Konsentrasi Enzim Terimmobilisasi

No.	Alat	Fungsi
1.	Kaca arloji	Sebagai wadah saat menimbang
2.	Timbangan digital	Untuk menimbang bahan
3.	Vortex	Alat untuk menghomogenkan larutan
4.	Pipet volume	Alat untuk mengambil Lowry reagen, Folin reagen, dan sampel sesuai ukuran.
5.	Spatula <i>stainless steel</i>	Untuk membantu memindahkan bahan
6.	Spektrofotometer	Untuk mengetahui konsentrasi protein yang ada dalam larutan sebelum dan sesudah immobilisasi lipase dengan cara mengukur absorbansinya
7.	Cuvvette	Sebagai wadah sampel saat dilakukan absorbansi di dalam spektrofotometer
8.	Tabung reaksi	Tempat membuat sampel yang akan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer

3. Sintesis Wax Ester dengan Reaksi Transesterifikasi

Tabel 3.3 Alat yang Digunakan dalam Sintesis Wax Ester dengan Reaksi Esterifikasi

No.	Alat	Fungsi
1.	Tabung reaksi dengan	Sebagai reaktor terjadinya reaksi esterifikasi dalam mensintesis wax ester
2.	<i>Shaking waterbath</i>	Untuk membantu terjadinya reaksi esterifikasi dalam mensintesis wax ester
3.	<i>Micropipet</i>	Untuk meneteskan/memindahkan larutan dalam ukuran sangat kecil
4.	Termometer	Untuk mengukur temperatur
5.	Spatula kaca	Sebagai alat untuk mengaduk
6.	Spatula <i>stainless steel</i>	Untuk membantu memindahkan bahan
7.	Kaca arloji	Sebagai wadah saat menimbang
8.	Timbangan digital	Untuk menimbang bahan
9.	Tabung reaksi	Sebagai tempat berlangsungnya reaksi
10.	<i>Hotplate</i>	Alat memanaskan stearyl alkohol agar dapat dilarutkan dengan heksana

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Immobilisasi lipase :
 - a. *Candida rugosa* lipase
 - b. kitosan
 - c. asam asetat
 - d. tripoliposfat (TPP)
2. Penentuan konsentrasi enzim terimmobilisasi :
 - a. Na_2CO_3
 - b. NaOH
 - c. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

- d. $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
 - e. reagen folin-ciocalteu
 - f. sampel (larutan sebelum dan setelah immobilisasi lipase)
3. Sintesis *Wax* Ester dengan Reaksi Transesterifikasi :
 - a. biokatalis yaitu *candida rugosa* lipase yang telah diimmobilisasi
 - b. reaktan:
 - asam oleat
 - stearil alkohol *technical grade*
 - c. bahan kimia lain:
 - aquadest (H_2O)
 - heksana

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Immobilisasi Lipase

3.3.1.1 Pra Immobilisasi Lipase

1. Menyiapkan larutan enzim dengan konsentrasi 35 mg/mL.
2. Menyiapkan kitosan dengan cara sebagai berikut:
 - a. Menimbang kitosan sesuai dengan variasi.
 - b. Mencampurkan kitosan yang telah ditimbang dengan asam asetat 2%.
 - c. Mengaduk campuran tersebut dengan magnetic stirrer hingga homogen pada suhu 55°C
3. Menyiapkan larutan sodium tripolyphosphate (konsentrasi sesuai variasi) dengan cara sebagai berikut:
 - a. Menimbang sodium tripolyphosphate (TPP) sesuai dengan variasi.
 - b. Melarutkan TPP yang telah ditimbang dalam 200 mL aquadest.

3.3.1.2 Immobilisasi Lipase

1. Mencampurkan larutan enzim dengan larutan kitosan dengan perbandingan volume sesuai variasi.
2. Meneteskan larutan enzim dan kitosan dalam larutan TPP.
3. Mendinginkan larutan tersebut selama 120 menit.
4. Mendekantasi *gelbeads* yang terbentuk.

Universitas Indonesia

5. Menyimpan enzim yang telah diimmobilisasi di dalam refrigerator dalam suhu 4°C.
6. Menyimpan filtrat hasil filtrasi untuk menentukan konsentrasi lipase yang diimmobilisasi.

3.3.2 Menentukan Konsentrasi Lipase Terimmobilisasi

1. Membuat reagen untuk analisis dengan cara sebagai berikut
 - a. Mencampurkan 50 mL larutan Na_2CO_3 2% berat dengan 50 mL NaOH 0,1N
 - b. Mencampurkan 10 mL larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,56% berat dengan $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2,73% berat
 - c. Mencampurkan 50 mL reagen a dengan 1 mL reagen b
2. Menyiapkan reagen Folin 1 N
3. Menambahkan 2 mL reagen analisis pada sampel
4. Mengaduk campuran lalu diinkubasi pada temperatur kamar selama 10 menit
5. Menambahkan 0,2 mL reagen Folin 1 N pada setiap tabung lalu diinkubasi selama 30 menit
6. Mempersiapkan spektrofotometer dengan panjang gelombang 750 nm
7. Memplot kurva absorbansi terhadap konsentrasi protein untuk mendapatkan kurva kalibrasi
8. Mengecek absorbansi sampel dan menentukan konsentrasi sampel yang tidak diketahui dengan menggunakan kurva kalibrasi.

3.3.3 Sintesis Wax Ester dengan Reaksi Esterifikasi

1. Menimbang stearil alkohol sebanyak 0,9576 gram.
2. Menimbang asam oleat sebanyak 1 gram.
3. Menimbang enzim sebanyak 0,04 gram.
4. Asam oleat dan stearil alkohol masing-masing dihangatkan terlebih dahulu dalam *shaking waterbath* agar suhunya sesuai kondisi operasi.
5. Ukur suhunya dengan thermometer untuk memastikan suhu operasi telah tercapai.

6. Melarutkan stearil alkohol dalam heksana sebanyak 2,394 mL.
7. Menambahkan asam oleat ke dalam stearil alkohol yang telah dilarutkan dalam heksana.
8. Menambahkan enzim ke dalam campuran.
9. Tabung reaksi dimasukkan ke dalam *shaking waterbath* dengan kondisi suhu 37°C dan kecepatan agitasi 150 RPM selama 24 jam

3.4 Variabel dalam Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

1. Variasi Perbandingan Volume Lipase dan Kitosan
Perbandingan volume antara larutan enzim dan larutan kitosan dibuat bervariasi dari 1:3, 1:6, dan 1:12 dengan konsentrasi TPP sebesar 2%, dan waktu proses *gelation* selama 120 menit.
2. Variasi Konsentrasi Kitosan
Konsentrasi kitosan yang digunakan adalah 20 mg/mL; 30 mg/mL; dengan waktu proses *gelation* selama 120 menit dan konsentrasi TPP sebesar 2%.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini atau parameter yang akan diamati adalah enzim *loading*, konversi asam oleat, dan *yield wax ester*.

3.5 Teknik Analisis Data

3.5.1 Menghitung Enzim *Loading*

Untuk menentukan konsentrasi enzim terimmobilisasi, dengan persamaan berikut

$$C_E = C_o - C_t \quad (3.1)$$

Untuk menentukan persentase enzim *loading* dengan persamaan berikut

$$\% \text{ loading} = \frac{C_E}{C_0} \times 100\% \quad (3.2)$$

Dimana

C_E = konsentrasi enzim terimmobilisasi

C_0 = konsentrasi enzim sebelum terimmobilisasi

C_t = konsentrasi enzim pada filtrat hasil immobilisasi

Konsentrasi enzim ditentukan menggunakan metode Lowry yaitu dengan menggunakan larutan BSA sebagai larutan standar dengan berbagai konsentrasi. Sampel BSA tersebut diukur absorbansinya menggunakan UV Spektrofotometer pada panjang gelombang 750nm. Dari hasil absorbansi sampel BSA dengan berbagai konsentrasi tersebut, didapatkan kurva kalibrasi yang digunakan untuk menentukan konsentrasi enzim.

3.5.2 Menghitung *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 stearil-oleatnya. Namun, pada kenyataannya hasil dari reaksi tidak hanya menghasilkan stearil 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 PUSPIPTEK (Pusat Pengkajian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi), Serpong, Tangerang.

$$\% \text{ yield wax ester} = \frac{C_{WE t=t}}{C_{AO t=0}} \times 100\% \quad (3.3)$$

Dimana:

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

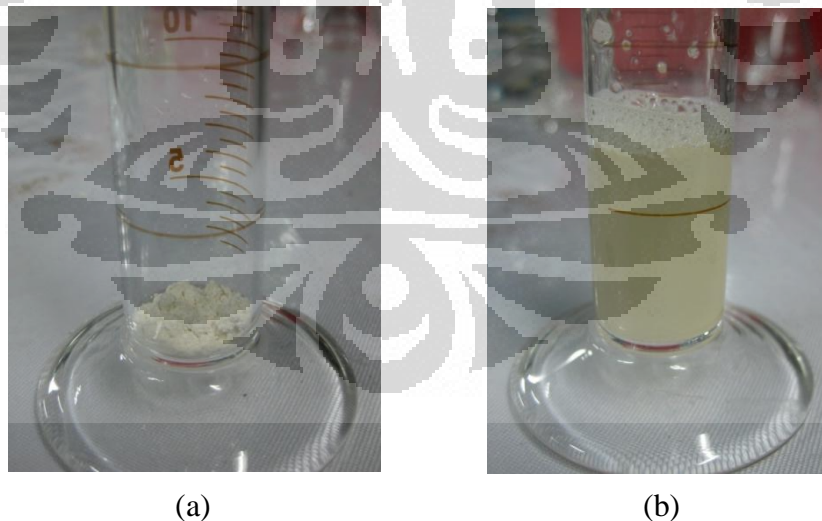
$C_{AO t=0}$: Konsentrasi asam oleat pada awal reaksi (mmol/L)

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada bab ini akan dibahas mengenai hasil immobilisasi lipase, pembuatan kurva kalibrasi standar, penentuan enzim *loading*, sintesis *wax* ester, hasil HPLC, dan penentuan *yield*.

4.1 Immobilisasi Lipase

Dalam percobaan immobilisasi lipase ini, digunakan *Candida rugosa* Lipase (CRL) dan *support* kitosan. Lipase yang digunakan adalah CRL karena CRL memiliki aktivitas yang baik. Hal ini telah dibuktikan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Muharza (2011). Pada penelitian tersebut, digunakan CRL dan *Porcine Pancreatic Lipase* (PPL). Hasil yang didapatkan adalah konversi maksimum dari reaksi yang menggunakan katalis CRL lebih besar yaitu 60,59% dibandingkan dengan PPL sebesar 24,01%. Lipase yang akan diimmobilisasi juga dilarutkan dalam air dengan konsentrasi 35 mg/mL. Gambar di bawah ini adalah gambar lipase sebelum dan sesudah dilarutkan.



Gambar 4.1 *Candida rugosa* Lipase (a) sebelum dilarutkan (b) setelah dilarutkan

Kitosan digunakan sebagai *support* karena waktu immobilisasi yang dibutuhkan lebih singkat daripada *support* lain seperti zeolit atau karbon aktif

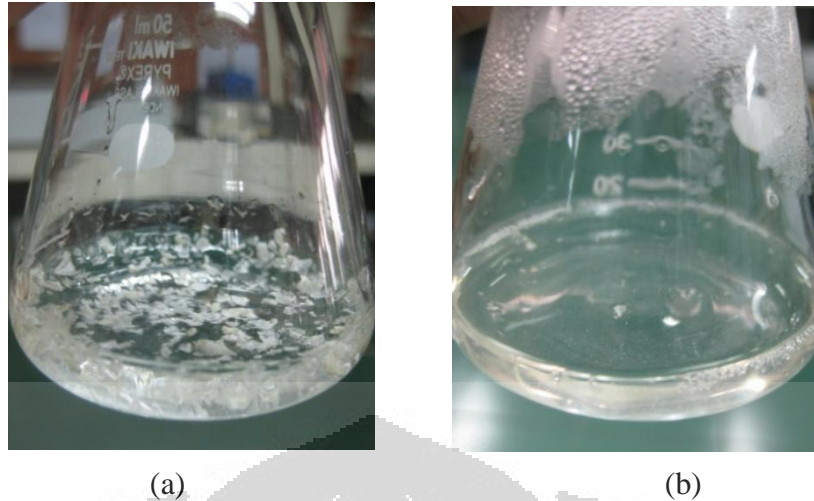
yang membutuhkan waktu sekitar tujuh hari untuk mengimobilisasi sedangkan waktu yang dibutuhkan kitosan yang hanya beberapa jam. Selain itu, aktivitas kitosan juga lebih baik dibandingkan *support* lain seperti Ca-alginat *bead*. Menurut Neau dan Betigeri (2002), aktivitas Ca-alginat *bead* hanya 240 unit/mL dibandingkan dengan kitosan yang mencapai 1110 unit/mL yang digunakan sebagai *support* dilarutkan dalam asam asetat 2% (m/v).

Dalam penelitian ini, konsentrasi kitosan dalam asam asetat yang digunakan adalah 20 mg/mL dan 30 mg/mL. Konsentrasi tersebut dipilih karena merupakan konsentrasi yang paling ideal. Jika menggunakan kitosan dengan konsentrasi 10 mg/mL, proses sol-gel yang terjadi tidak sempurna. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 4.2 dimana campuran lipase dan kitosan, yang diteteskan ke dalam larutan TPP kemudian didekantasi, tidak berbentuk *bead*.



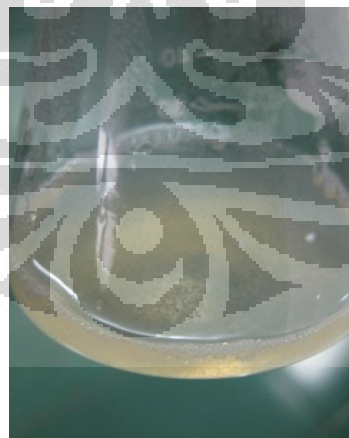
Gambar 4.2 Immobilisasi Lipase dengan Konsentrasi Kitosan 10 mg/ml

Ketika ditambahkan asam asetat, kitosan tidak langsung melarut. Oleh karena itu, dibutuhkan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 55°C. Setelah beberapa lama, kitosan melarut. Pelarutan kitosan tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Pelarutan Kitosan (a) sebelum diaduk dan dipanaskan (b) setelah diaduk dan dipanaskan

Pada setiap konsentrasi kitosan sebesar 20 mg/mL dan 30 mg/mL tersebut, dilakukan variasi perbandingan volume larutan lipase dengan larutan kitosan. Variasi yang dilakukan adalah 1:3, 1:6, dan 1:12. Variasi perbandingan volume tersebut dimulai dari 1:3 karena imobilisasi menggunakan perbandingan volume sebesar 1:1 dan 1:2 tidak berhasil membentuk *bead*. Hasil pencampuran larutan lipase dan kitosan dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Larutan Lipase dan Kitosan

Setelah larutan kitosan dan lipase dicampurkan sesuai dengan perbandingan tersebut, larutan kemudian ditetaskan dalam larutan tripoliposfat (TPP). *Gel bead* kitosan langsung terbentuk saat larutan kitosan dan lipase

Universitas Indonesia

diteteskan. Proses sol-gel ini terjadi karena terjadi *cross-linking* antara kitosan yang bermuatan positif dengan TPP yang bermuatan negatif (Neau, et al, 2004). Namun, setelah diteteskan, *bead* ini didiamkan dalam larutan TPP selama 120 menit agar proses *gelation* berlangsung sempurna dan kitosan *bead* yang didapatkan tidak mudah hancur. Gambar di bawah ini adalah proses *gelation* kitosan *bead* dalam larutan TPP.



Gambar 4.5 Proses *Gelation* Kitosan *Bead* dalam Larutan TPP

Proses tersebut berlangsung selama 120 menit, kemudian kitosan *bead* hasil immobilisasi didekantasi. Gambar 4.6 menunjukkan kitosan *bead* yang telah didekantasi. Hasil immobilisasi tersebut kemudian disimpan pada suhu 4°C hingga nantinya digunakan untuk sintesis *wax ester*. Sedangkan filtrat dari proses ini akan diukur absorbansinya untuk mengetahui konsentrasi lipase di dalamnya agar dapat diketahui enzim yang terimmobilisasi.



Gambar 4.6 Kitosan *Bead* yang Telah Didekantasi

4.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi Standar

Kurva kalibrasi standar adalah kurva yang menghubungkan konsentrasi protein dan absorbansi spektrofotometri. Oleh karena itu, konsentrasi lipase dalam filtrat hasil immobilisasi dapat diketahui dari nilai absorbansinya. Kurva kalibrasi standar ini dibuat dengan metode Lowry menggunakan spektrofotometer *visible*. Pada metode Lowry, protein dalam larutan digumpalkan oleh reagen Lowry dan diinkubasi dengan reagen Folin-Ciocalteu sehingga warna larutan berubah. Pada Gambar 4.7 dapat dilihat warna sampel yang berubah menjadi biru setelah ditambahkan reagen Lowry dan reagen Folin-Ciocalteu. Dari perubahan warna itulah dapat diukur absorbansi larutan dengan spektrofotometer *visible* pada panjang gelombang 750 nm.



Gambar 4.7 Sampel Pengukuran Absorbansi

Konsentrasi lipase yang digunakan untuk membuat kurva kalibrasi standar ini adalah 0,0050 g/mL; 0,0010 g/mL; 0,0005 g/mL; dan 0,0002 g/mL. Pelarut yang digunakan untuk melarutkan lipase dalam proses immobilisasi adalah air. Oleh karena itu, dalam membuat kurva kalibrasi standar, lipase juga harus dilarutkan dengan air. Setiap pengukuran dibuat duplo. Data hasil pengukuran absorbansi dari setiap konsentrasi dapat dilihat pada Lampiran 1

Data tersebut kemudian dibuat ke dalam grafik untuk dapat mengetahui hubungan antara absorbansi dan konsentrasi yang dapat dilihat dari persamaan garisnya. Kurva kalibrasi standar yang didapatkan dapat dilihat pada Lampiran 1. Persamaan garis yang didapatkan dari linearisasi kurva kalibrasi tersebut adalah $y = 0,0369x - 0,0007$ dengan nilai R^2 sebesar 0,9986. Karena nilai R^2 telah memenuhi syarat, maka kurva kalibrasi standar ini dapat digunakan untuk mengetahui konsentrasi lipase dalam filtrat.

4.3 Penentuan Enzim *Loading*

Untuk menentukan enzim *loading* harus ditentukan konsentrasi enzim yang terimmobilisasi yang dapat diketahui dengan mengukur konsentrasi enzim yang ada pada filtrat (tidak terimmobilisasi). Konsentrasi enzim pada filtrat diketahui dengan cara mengukur absorbansinya, Pengukuran ini menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm. Metode yang digunakan dalam mengukur absorbansi filtrat pada setiap variasi sama dengan metode dalam membuat kurva kalibrasi standar yaitu dengan metode Lowry.

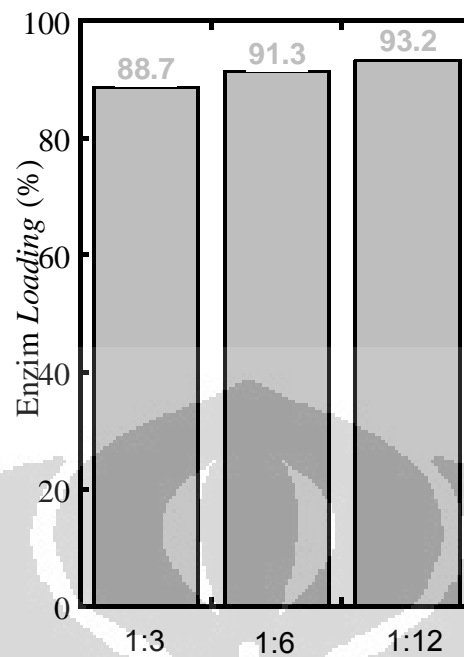
Setelah nilai absorbansi masing-masing sampel diketahui, konsentrasi enzim dalam sampel tersebut dapat diketahui dari kurva kalibrasi yang telah dibuat sebelumnya. Kemudian, konsentrasi enzim yang terimmobilisasi dan besarnya enzim *loading* dapat dihitung dengan persamaan 3.1 dan 3.2. Hasil pengukuran absorbansi, konsentrasi filtrat, dan besarnya enzim *loading* dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 4.1 Enzim *Loading* pada Variasi Perbandingan Lipase : Kitosan dengan Konsentrasi Kitosan 20 mg/mL

Perbandingan Volume Lipase:Kitosan	C_o (mg/mL)	C_t (mg/mL)	Enzim <i>Loading</i> (%)
1:3	0,00875	0,00099	88,73
1:6	0,00500	0,00043	91,34
1:12	0,00270	0,00018	93,24

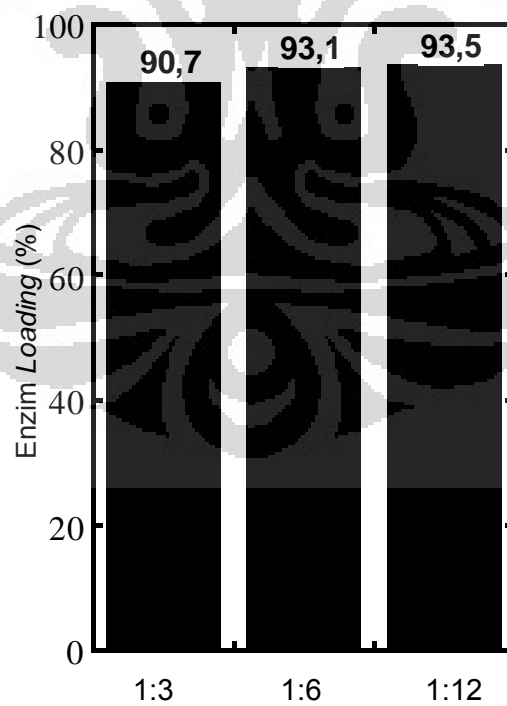
Tabel 4.2 Enzim *Loading* pada Variasi Perbandingan Lipase : Kitosan dengan Konsentrasi Kitosan 30 mg/mL

Perbandingan Volume Lipase:Kitosan	C_o (mg/mL)	C_t (mg/mL)	Enzim <i>Loading</i> (%)
1:3	0,00875	0,00081	90,71
1:6	0,00500	0,00034	93,12
1:12	0,00270	0,00018	93,50



Perbandingan Volume Lipase:Kitosan

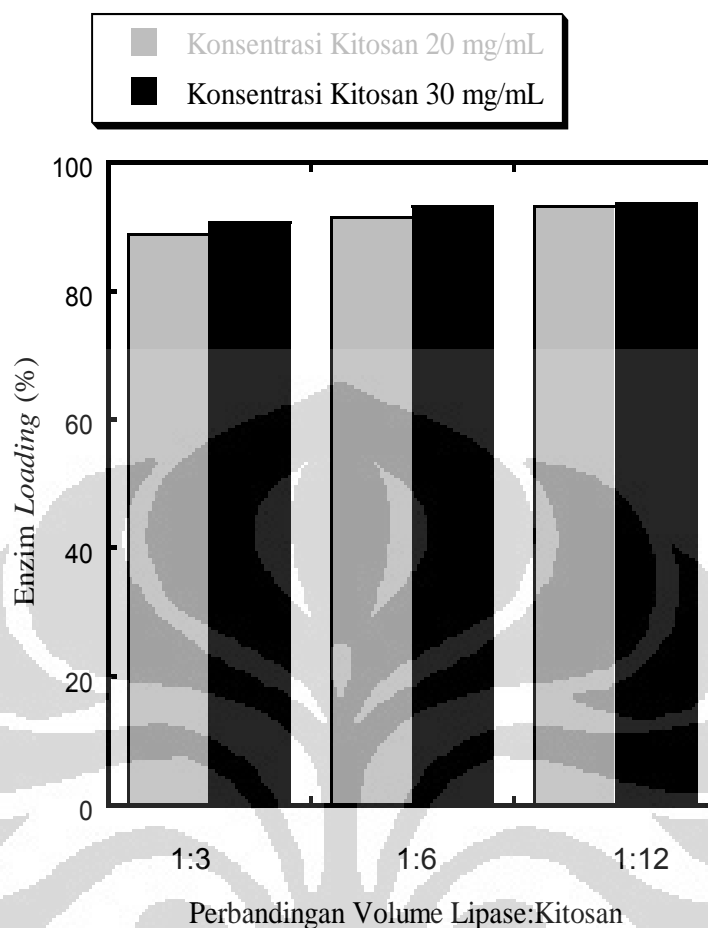
Gambar 4.8 Grafik Perbandingan Lipase:Kitosan terhadap Enzim Loading pada Konsentrasi Kitosan 20 mg/mL



Perbandingan Volume Lipase:Kitosan

Gambar 4.9 Grafik Perbandingan Lipase:Kitosan terhadap Enzim Loading pada Konsentrasi Kitosan 30 mg/mL

Universitas Indonesia



Gambar 4.10 Grafik Perbandingan Volume Lipase:Kitosan terhadap Enzim *Loading* pada Konsentrasi Kitosan 20 mg/mL dan 30 mg/mL

Dari tabel dan gambar tersebut dapat dilihat bahwa semakin banyak *support* yang digunakan, semakin besar juga enzim *loading*-nya. Selain itu, dapat dilihat bahwa enzim *loading* pada imobilisasi menggunakan kitosan dengan konsentrasi sebesar 20 mg/mL, lebih kecil daripada jika menggunakan kitosan dengan konsentrasi 30 mg/mL. Namun, kenaikan tersebut tidak terlalu signifikan. *Range* enzim *loading* hanya pada 88,73% hingga 93,50% sehingga dapat dikatakan bahwa variasi perbandingan lipase dengan kitosan pada *range* 1:3 hingga 1:12 tidak berpengaruh pada enzim *loading*-nya. Begitu juga dengan dengan kenaikan enzim *loading* berdasarkan kenaikan konsentrasi kitosan yang digunakan tidak berpengaruh pada enzim *loading*-nya. Hasil ini mirip dengan eksperimen yang dilakukan Neau (2002) dimana kenaikan konsentrasi kitosan memang tidak terlalu mempengaruhi enzim *loading*. Enzim *loading* hasil

immobilisasi pada eksperimen ini sekitar 88%-93%. Nilai tersebut jauh lebih besar dibandingkan enzim *loading* hasil eksperimen yang dilakukan Neau tersebut yaitu sekitar 45% - 48%. Hal ini mungkin terjadi karena konsentrasi enzim yang tidak terimmobilisasi hanya dilihat dari filtrat hasil proses *gelation*. Setelah kitosan *bead* didapatkan, tidak dilakukan pencucian untuk melepaskan lipase yang tidak terimmobilisasi namun menempel pada permukaan kitosan *bead* sehingga konsentrasi lipase tidak terimmobilisasi yang didapatkan tidak terlalu akurat.

4.4 Sintesis Wax Ester

Dalam eksperimen ini dilakukan reaksi esterifikasi antara asam oleat sebagai bahan dasar dengan stearil alkohol menggunakan enzim *Candida rugosa* lipase (CRL) yang terimmobilisasi untuk menghasilkan produk *wax ester* yang diinginkan. Eksperimen ini dilakukan untuk mengetahui kinerja enzim yang telah diimmobilisasi pada eksperimen sebelumnya.

Pada eksperimen ini, stearil alkohol sebanyak 0,9576 gram ditimbang menggunakan timbangan digital kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian, ditambahkan heksana sebanyak 2,394 mL sebagai pelarut. Pelarut diperlukan agar reaksi dapat berlangsung pada suhu 37°C dimana lipase bekerja optimum. Jika tidak menggunakan pelarut, stearil alkohol akan menjadi padat pada suhu 37°C dan mengakibatkan reaktan tidak bercampur sempurna (Pangestu, 2011). Pelarut heksana digunakan karena pelarut ini bersifat nonpolar. Pelarut polar akan merusak lapisan air di sekitar molekul enzim yang penting untuk menjaga enzim agar tetap aktif. Selain itu, pelarut juga dapat menghindari penghambatan yang terjadi jika sisi enzim yang berikatan dengan gugus alkohol sama dengan sisi yang berikatan dengan asam lemak. Jadi penggunaan pelarut dapat pula membuat reaksi berjalan lebih optimal.

Setelah itu, campuran stearil alkohol dan heksana dipanaskan pada suhu 70°C agar stearil alkohol menjadi cair dan mudah bereaksi dengan asam oleat. Pada campuran tersebut kemudian ditambahkan asam oleat sebanyak 1 gram agar perbandingan mol antara asam oleat dan stearil alkohol menjadi 1:1. Kedua reaktan tersebut kemudian dihangatkan dalam *waterbath* hingga suhunya mencapai 37°C sesuai dengan suhu optimum enzim. Setelah suhu optimum

tercapai, biokatalis sebanyak 4% dari massa asam oleat dimasukan ke dalam tabung reaksi. Tabung reaksi ditutup dengan plastik *wrap* untuk mencegah penguapan yang mengakibatkan reaktan berkurang dan mencegah uap air yang berada dalam *waterbath* masuk ke dalam reaksi. Kemudian tabung reaksi dimasukan ke dalam *shaking waterbath*.

Reaksi dilakukan selama 24 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan agitasi 150 RPM. Agitasi ini dilakukan agar area interfase menjadi tinggi. Menurut Ghosh (1996), lipase bekerja pada interfase antara minyak dan air. Jumlah minyak yang tersedia pada area interfase menentukan aktivitas dari lipase dan area interfase dapat ditingkatkan salah satunya dengan agitasi. Selain itu agitasi juga dilakukan untuk memastikan reaktan dan enzim tercampur dengan baik. Kondisi operasi dari reaksi ini didapatkan dari kondisi optimum dari eksperimen yang sebelumnya telah dilakukan oleh Muharza (2011) yang mereaksikan asam oleat dengan stearil alkohol menggunakan CRL bebas sebagai katalis.

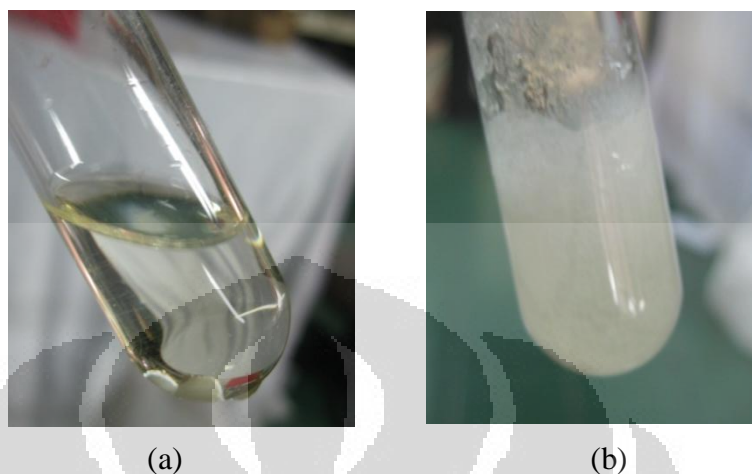
Reaksi yang terjadi pada tahap ini adalah reaksi esterifikasi antara asam oleat dengan stearil alkohol menghasilkan stearil oleat dan air. Persamaan reaksi tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.10.



Gambar 4.11 Reaksi Esterifikasi Asam Oleat dengan Stearil Alkohol

Setelah reaksi berakhir, maka sampel dan enzim yang ada akan dipisahkan. Pemisahan enzim dan sampel ini tidak perlu menggunakan *sentrifuge* seperti yang dilakukan jika menggunakan lipase bebas sebagai katalis karena enzim yang telah terimmobilisasi tidak bercampur dengan produk dan berada di dasar tabung reaksi. Pemisahan cukup dilakukan dengan cara mengambil lipase tersebut dengan spatula. Sesaat setelah dikeluarkan dari *waterbath*, hasil reaksi masih berbentuk cairan. Namun, setelah berada pada suhu ruangan, hasil reaksi berubah menjadi padat. Hasil reaksi tersebut kemudian dikirim ke PUSPIPTEK, Serpong

untuk dianalisis menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).



Gambar 4.12 Hasil Reaksi (a) Beberapa Saat Setelah Reaksi (b) Pada Suhu Ruangan

4.5 Penentuan *Yield Wax Ester*

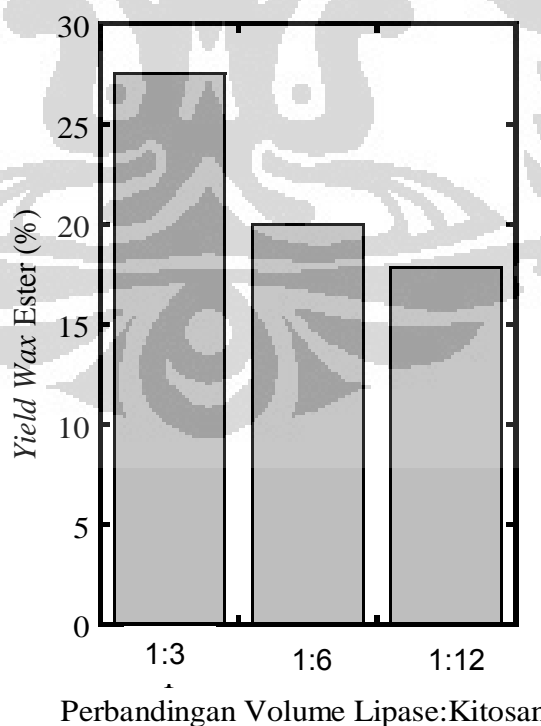
Data yang didapatkan dari analisis HPLC kemudian diolah untuk mengetahui *yield wax ester* hasil reaksi. Analisis HPLC seharusnya dilakukan dengan membandingkan sampel dengan standar produknya yaitu stearil oleat. Namun, karena tidak tersedianya standar ini, maka analisis dilakukan menggunakan standar ester lain, yaitu metil oleat yang merupakan standar untuk analisis biodiesel. Grafik hasil analisis HPLC dapat dilihat pada Lampiran 2. Dari grafik yang didapatkan dari analisis HPLC tersebut diketahui luas area stearil oleat yang kemudian dikonversi menjadi data konsentrasi stearil oleat. Konsentrasi stearil oleat tersebut kemudian diolah untuk mendapatkan *yield wax ester* menggunakan persamaan (3.3). Data hasil analisis dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Tabel 4.3 Data Yield dengan Variasi Perbandingan Volume Lipase:Kitosan pada Konsentrasi Kitosan 20mg/mL

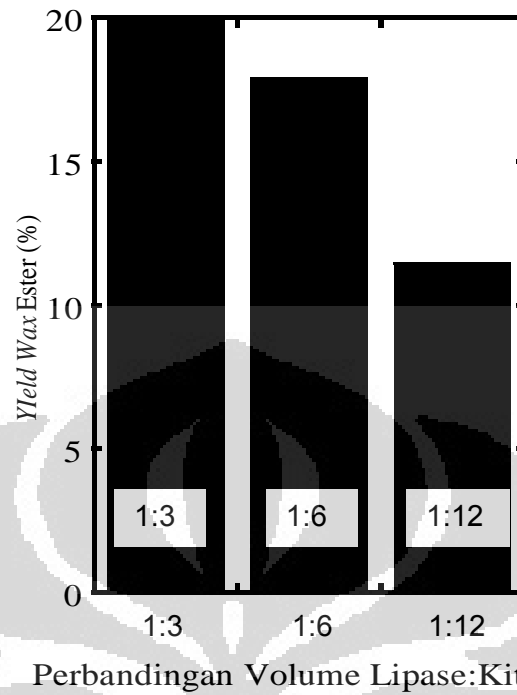
Perbandingan Volume Lipase:Kitosan	C _{WE} (mol/L)	Yield (%)
1:3	0,4070	27,52
1:6	0,2958	19,99
1:12	0,2637	17,83

Tabel 4.4 Data Yield dengan Variasi Perbandingan Volume Lipase:Kitosan pada Konsentrasi Kitosan 30mg/mL

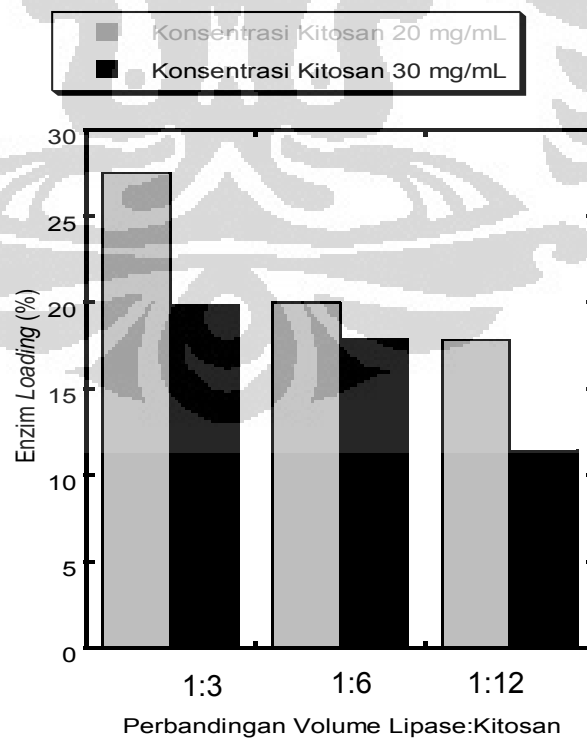
Perbandingan Volume Lipase:Kitosan	C _{WE} (mol/L)	Yield (%)
1:3	0,2942	19,89
1:6	0,2646	17,89
1:12	0,1693	11,44



Gambar 4.13 Grafik Perbandingan Lipase:Kitosan terhadap Yield Wax Ester pada Konsentrasi Kitosan 20mg/mL



Gambar 4.14 Grafik Perbandingan Lipase:Kitosan terhadap Yield Wax Ester pada Konsentrasi Kitosan 30mg/mL



Gambar 4.15 Grafik Perbandingan Volume Lipase:Kitosan terhadap Yield Wax Ester pada Konsentrasi Kitosan 20 mg/mL dan 30 mg/mL

Dari grafik tersebut diketahui bahwa saat menggunakan kitosan dengan konsentrasi 20 mg/mL, *yield* terbesar didapatkan saat reaksi menggunakan lipase yang diimmobilisasi menggunakan komposisi perbandingan lipase dan kitosan sebesar 1:3. Begitu juga saat menggunakan kitosan dengan konsentrasi 30 mg/mL. Jika dibandingkan, *yield* yang lebih besar didapatkan saat menggunakan kitosan dengan konsentrasi 20 mg/mL dibandingkan dengan 30 mg/mL. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa semakin banyak kitosan yang digunakan dalam immobilisasi, *yield* yang dihasilkan semakin kecil. Selain itu, semakin besar konsentrasi kitosan yang digunakan dalam immobilisasi juga menyebabkan *yield* semakin kecil kecil. Hal ini terjadi karena berkurangnya difusivitas yang menyebabkan transfer substrat ke lipase semakin terbatas. Difusivitas berkurang karena semakin banyak kitosan yang digunakan, densitas polimer disekitar lipase semakin besar (Neau, et al, 2002). Eksperimen yang dilakukan oleh Neau (2002), dimana konsentrasi kitosan yang digunakan adalah 15 mg/mL, 20 mg/mL, dan 25 mg/mL. Pada kitosan dengan *range* konsentrasi tersebut juga mendapatkan hasil bahwa semakin besar konsentrasi kitosan yang digunakan, *yield* yang dihasilkan semakin kecil. Hasil eksperimen ini juga sesuai dengan eksperimen yang dilakukan dengan *support* lain, yaitu Ca-alginat *bead*, namun dengan metode yang sama. Eksperimen tersebut dilakukan oleh Moon (2004) dimana semakin besar konsentrasi alginat yang digunakan, *yield* yang dihasilkan semakin kecil.

Namun, kecenderungan ini juga dapat terjadi karena lipase yang digunakan dalam reaksi berbeda. Jumlah lipase yang terimmobilisasi yang digunakan memang sama, yaitu 0,04 gram, namun jumlah lipase yang terkandung dalam lipase terimmobilisasi tersebut berbeda karena adanya perbedaan jumlah kitosan yang digunakan. Sebaiknya, semakin besar jumlah kitosan yang digunakan dalam immobilisasi, jumlah lipase terimmobilisasi yang digunakan juga semakin banyak agar lipase yang mengkatalisis reaksi tersebut sama sehingga data yang didapatkan lebih akurat dan dapat dibandingkan antara satu variabel dengan variabel lain.

BAB V PENUTUP

V.1 Kesimpulan

Melalui penelitian ini, dapat diambil beberapa kesimpulan, yaitu

1. Variasi konsentrasi kitosan sebesar 20 mg/mL dan 30 mg/mL tidak mempengaruhi enzim *loading* hasil immobilisasi. Variasi perbandingan lipase dengan kitosan pada *range* 1:3 hingga 1:12 juga tidak mempengaruhi enzim *loading*.
2. Enzim *loading* yang didapatkan dari hasil immobilisasi berkisar antara 88% hingga 94%.
3. *Yield* yang paling besar adalah 27,52% yang didapatkan pada reaksi dengan katalis lipase yang diimmobilisasi dengan kitosan sebesar 20 mg/mL dan perbandingan lipase dengan kitosan sebesar 1:3.
4. Semakin besar konsentrasi kitosan yang digunakan dalam immobilisasi lipase, *yield* yang didapatkan semakin kecil.
5. Semakin kecil perbandingan antara lipase dengan kitosan yang digunakan dalam immobilisasi, *yield* yang dihasilkan juga semakin kecil.

5.2 Saran

1. Setelah kitosan *bead* didekantasi, sebaiknya *bead* tersebut dibilas dengan larutan *buffer* untuk melepaskan lipase yang tidak ter-*entrap* namun menempel pada permukaan kitosan. Hal ini dilakukan agar data hasil penghitungan konsentrasi lipase terimmobilisasi lebih akurat.
2. Jumlah lipase terimmobilisasi yang digunakan dalam sintesis *wax* ester sebaiknya dibuat sedemikian rupa sehingga jumlah lipase yang dipakai sama agar *yield* yang didapatkan pada setiap variasi dapat dibandingkan.
3. Karena tujuan dari immobilisasi adalah mendapatkan lipase yang dapat digunakan berulang kali, sebaiknya dilakukan prosedur untuk mengetahui stabilitas lipase hasil immobilisasi dan berapa kali lipase itu dapat digunakan kembali.

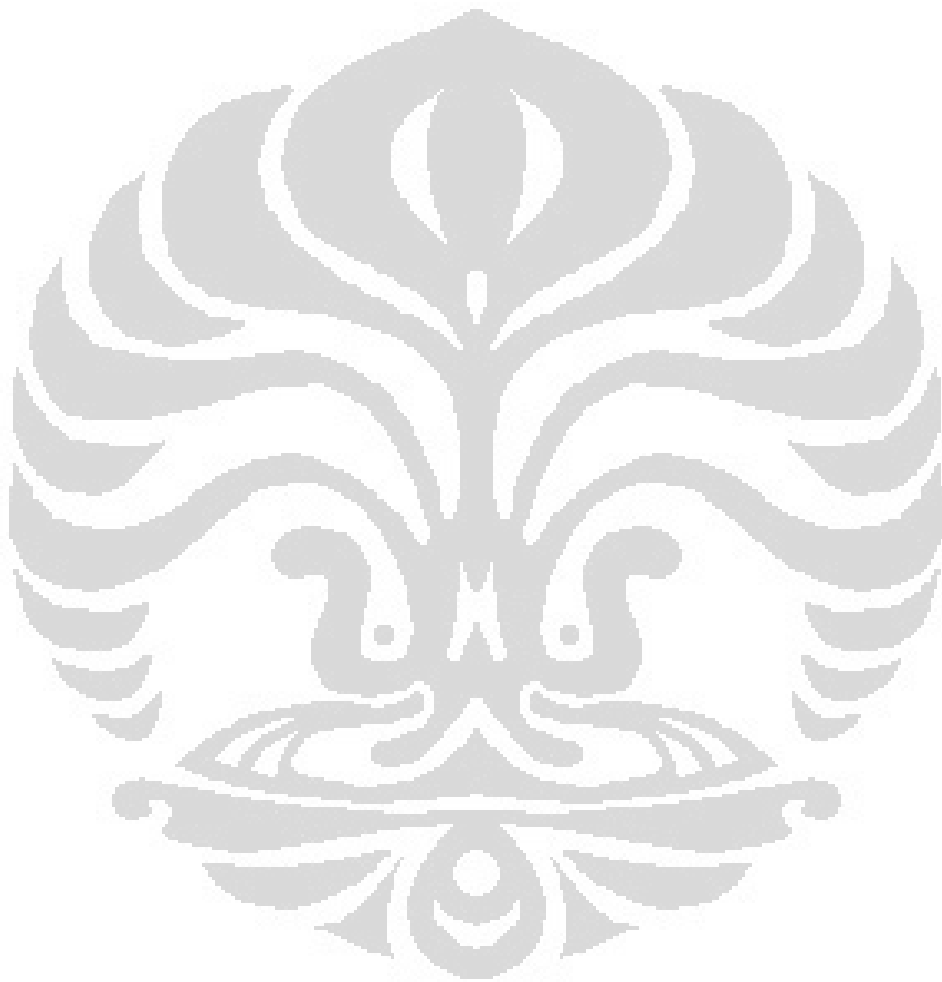
DAFTAR PUSTAKA

- Aryulina, D., Manaf, S., Muslim, C., dan Winarni, E.W.(2006).Biologi: Jilid 3. Esis.
- Carr, Steven M.(2009).Induced Fit Model of Enzyme Catalysis.[online].http://www.mun.ca/biology/scarr/Induced-Fit_Model.html. (Diakses tanggal 18 Januari 2012)
- Bagi, K., Simon, L. M., & SzajPni, B. (1997). Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, 20, 531-535.
- Cheirsilp, B., Jeamjounkhaw, P., & H-Kittikun, A. (2009). Optimizing an alginate immobilized lipase for monoacylglycerol production by the glycerolysis reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59, 206–211.
- Devi, S., Daveb, A., & Desaib, P. (2004). Entrapment of lipase into K-carrageenan beads and its use in hydrolysis of olive oil in biphasic system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 31, 143–150.
- Gunawan, E.R., dan Dedy S. 2008. Synthesis of Wax Ester From Palm Kernel Oil Catalyzed by Lipase. *Jurnal Matematika dan Sains* September 2008, Vol. 13: 75-83
- Guncheva, M., & Zhiryakova, D. (2008). High-yield synthesis of wax ester catalysed by modified *Candida rugosa* lipase. *Biotechnol Lett*, 30, 509-512.
- Gupta, M., Kumari, V., &Shah, S.(2007). Preparation of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of high free fatty acid containing oil from *Madhuca indica*. *Energy Fuel*, 21, 368–372.
- Gupta, M. &Shah, S.(2007). Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in a solvent free system. *Process Biochem*, 42, 409–414.
- Hartoto, L. (2008). Immobilisasi Enzim.Program Studi TIP Institut Pertanian Bogor.
- Hernandez, K., Garcia-Galan, C., & Fernandez-Lafuente, R. (2011). Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene–divinylbenzene beads. *Enzyme and Microbial Technology* .

- Karra-Châabounia, M., Bouazizb, I., Boufib, S., do Regoc, A. M., & Gargouria, Y. (2008). Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: Activity and stability studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *66*, 168–177.
- Keskinler, B., Dizge, N., & Tanriseven, A. (2009b). Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene-divinylbenzene copolymer. *Biochemical Engineering Journal*, *44*, 220–225.
- Keskinler, B., Dizge, N., Aydinler, C., Imer, D. Y., Bayramoglu, M., & Tanriseven, A. (2009a). Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. *Bioresource Technology*, *100*, 1983–1991.
- Kirk, O., Vedel, T., & Crone, C. (2002). Industrial Enzyme Application. *Current opinion on biotechnology*, *13*, 345–351.
- Knežević, Z. D.-M., Šiler-Marinković, S.S., dan Mojović L.V. (2004). Immobilized Lipases as Practical Catalysts. *APTEFF*, *35*, 1–280.
- Moon, S., Kim, K., Kim, S., Park, H.W., Won, K. (2005). Optimization of Lipase Entrapment in Ca-alginate Bead. *Process Biochemistry*, *40*, 2149–2154.
- Moreno-Pirajan, J., & Giraldo, L. (2011). Study of immobilized *Candida rugosa* lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry. *Arabian Journal of Chemistry*, *4*, 55–62.
- Neau, S. H., & Betigeri, S. S. (2002). Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. *Biomaterials*, *23*, 3627–3636.
- Neau, S.H., Alsarra, I.A, Howard, M.A.(2004). Effect of Preparative Parameters on the Properties of Chitosan Hydrogel Beads Containing *Candida rugosa* Lipase. *Biomaterials*, *25*, 2645–2655.
- Nene, S. N., Vaidya, B. K., Ingavle, G. C., Ponrathnam, S., & Kulkarni, B. (2008). Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(allyl glycidylether-co-ethylene glycol dimethacrylate) macroporous polymer particles. *Bioresource Technology*, *99*, 3623–3629.
- Noureddini, H., Gao, X., & R.S., P. (2004). Immobilized *Pseudomonas cepacia* Lipase for Biodiesel Fuel. *Bioresource Technology*, *96*, 769–777.

- Nunes, G. S., & Jean-Louis, M. (2006). Immobilization of Enzymes on Electrodes. In G. J. M, *Immobilization of Enzymes and Cells*. New Jersey: Humana Press Inc.
- Ozturk, T. K., & Kilinc, A. (2010). Immobilization of lipase in organic solvent in the presence of fatty acid additives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67, 214–218.
- Ozyilmaz, G., & Gezer, E. (2010). Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64, 140–145.
- Pangestu, Felicia S.(2011). Sintesis Wax Ester melalui Transesterifikasi Minyak Sawit dan Stearyl Alkohol menggunakan Biokatalis dari Lipase *Candida rugosa*.Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Pelita Harapan.
- Parshad, R., Bhushan, I., Qazi, G. N., & Gupta, V. K. (2008). Immobilization of Lipase by Entrapment in Ca-alginate Beads. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 23, 552-562.
- Pasaribu, Nuraida.(2004).Berbagai Ragam Pemanfaatan Polimer.USU Repository.
- Patel, S., Nelson D.R. dan Gibbs A.G. 2001. Chemical and Physical Analyses of Wax Ester Properties. *Journal of Insect Science*
- Pfromm, P. H., Cruz, J. C., & Rezac, M. E. (2009). Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B on fumed silica. *Process Biochemistry*, 44, 62–69.
- Pirozzi, D., Fanelli, E., Aronneb, A., Perniceb, P., & Mingione, A. (2009). Lipase entrapment in a zirconia matrix: Sol–gel synthesis and catalytic properties. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59, 116–120.
- Salis, A. (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.
- Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., & Solinas, V. (2008). Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. *J Mol Catal B Enzym*, 54, 19-26.

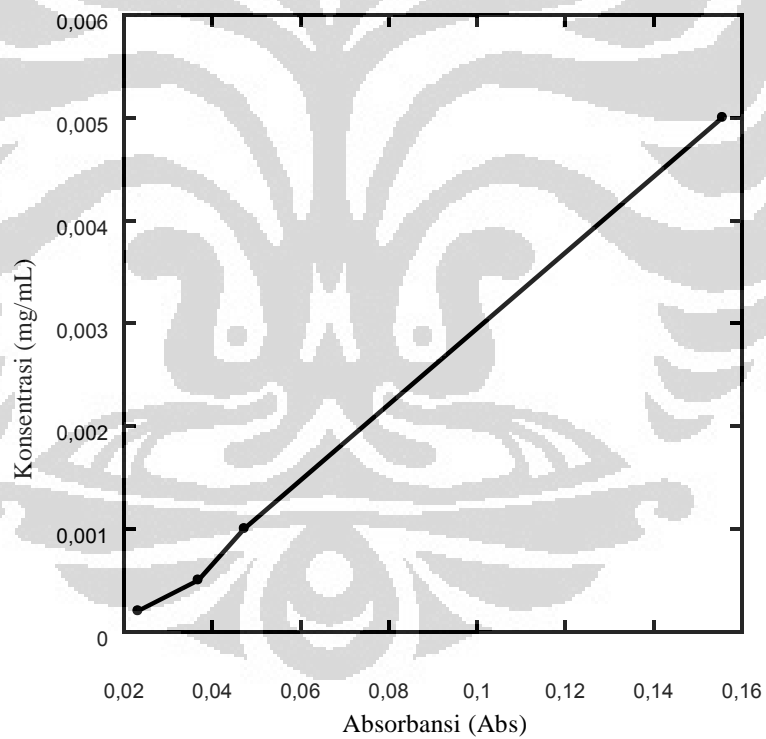
- Scragg, A. H. Chapter 12.(1989).Immobilized enzymes and cells. In *Biotechnology for Engineers: Biological Systems in Technological Processes*. New york: John willey & sons.
- Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., & Wang, F. (2010). Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances* , 28, 628–634.
- Tan, T., Nie, K., & Wang, F. (2006). Production of biodiesel by immobilized *Candida* sp. lipase at high water content. *Appl Biochem Biotechno*, 128, 109–116.
- Tarigan, Juliati Br. 2009. Ester Asam Lemak. USU repository
- Usai, E., Gualdi, E., Solinas, V., & Battistel, E. (2010). Simultaneous enzymatic synthesis of FAME and triacetyl glycerol from triglycerides and methyl acetate. *Bioresource Technology*, 101, 7707–7712.
- Wang, Y., Gao, S., Wang, T., Luo, G., & Dai, Y. (2009). Immobilization of lipase on methyl-modified silica aerogels by physical adsorption. *Bioresource Technology*, 100, 996–999.
- Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H., & Tominaga, Y. (2000). Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J Am Oil Chem Soc*, 77, 355-360.
- Wulan, P. P., Rejoso, M. T., & Hermansyah, H. (n.d.). Reaksi Hidrolisis Minyak Zaitun Menggunakan Lipase *Rhizopus oryzae* yang di Imobilisasi Melalui Metode Adsorpsi.
- Xu, Y., Du, W., & Liu, D. (2005). Study on the kinetics of enzymatic interesterification of triglycerides for biodiesel production with methyl acetate as the acyl acceptor. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 32, 241–245.
- Yilmaz, M., Tutar, H., Yilmaz, E., & Pehlivan, E. (2009). Immobilization of *Candida rugosa* lipase on sporopollenin from *Lycopodium clavatum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, 315–320.
- Yilmaz, M., Yilmaz, E., Can, K., & Sezgin, M. (2011). Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glass beads for enantioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester. *Bioresource Technology*, 102, 499–506.



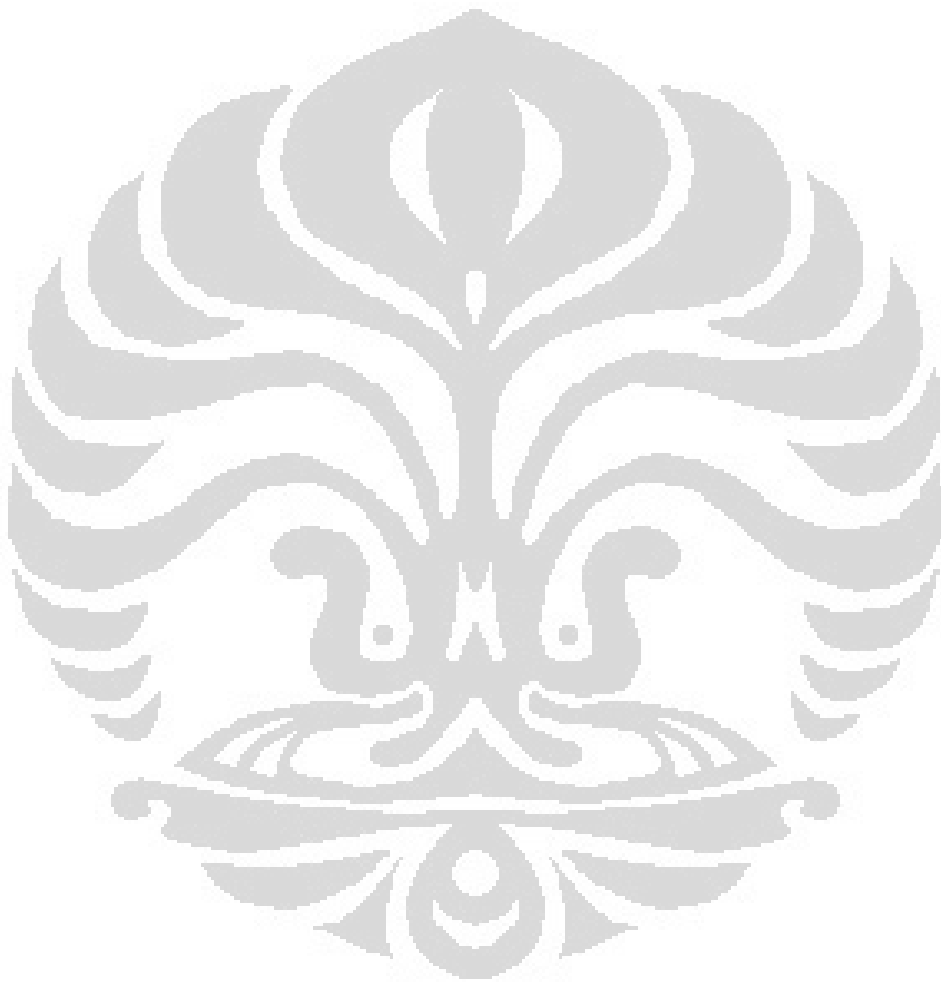
Universitas Indonesia

LAMPIRAN 1: Data dan Kurva Kalibrasi Standar

Absorbansi (abs)			Konsentrasi (mg/mL)
I	II	Rata-rata	
0,021100	0,025100	0,02310	0,00020
0,038200	0,035500	0,03685	0,00050
0,046300	0,048100	0,04720	0,00100
0,162100	0,149100	0,15560	0,00500



LAMPIRAN 2: Grafik HPLC



LAMPIRAN 3: Penghitungan Enzim *Loading*

Konsentrasi Kitosan= 20 mg/mL				
perbandingan lipase:kitosan	C _o (mg/ml)	Absorbansi Filtrat	C _t (mg/ml)	Enzim Loading (%)
1:3	0,00875	0,0457	0,000986	88,73
1:6	0,00500	0,0307	0,000433	91,34
1:12	0,00269	0,0239	0,000182	93,24
Konsentrasi Kitosan 30 mg/mL				
perbandingan lipase:kitosan	C _o (mg/ml)	Absorbansi Filtrat	C _t (mg/ml)	Enzim Loading (%)
1:3	0,00875	0,0410	0,000813	90,71
1:6	0,00500	0,0283	0,000344	93,12
1:12	0,00269	0,0237	0,000175	93,50

Nilai C_t didapatkan dengan menggunakan persamaan garis dari kurva kalibrasi standar dimana X adalah nilai absorbansi dari hasil pengujian dengan spektrofotometer. Persamaan garis yang didapatkan dari kurva adalah $y = 0,0369x - 0,0007$.

Enzim *loading* didapatkan dengan menghitung dari menggunakan persamaan (3.2), yaitu:

$$\% \text{ loading} = \frac{C_E}{C_0} \times 100\%$$

Dimana nilai C_E didapatkan dengan penghitungan menggunakan persamaan (3.1), yaitu:

$$C_E = C_0 - C_t$$

LAMPIRAN 4: Penghitungan Yield Wax Ester

Konsentrasi Kitosan 20 mg/mL			
lipase:support	Luas area wax ester	C _{WE} (mol/L)	yield (%)
1:3	386768	0,407096508	27,52786585
1:6	280996	0,2958	19,99963852
1:12	250559	0,2637	17,83331232
Konsentrasi Kitosan 30 mg/mL			
Lipase:support	Luas area wax ester	C _{WE} (mol/L)	yield (%)
1:3	279477	0,2942	19,8915
1:6	251391	0,2646	17,8925
1:12	160834	0,1693	11,4472

Luas area wax ester didapatkan dari grafik HPLC. Konsentrasi wax ester didapatkan dengan membagi luas area standar dari metil oleat kemudian mengalikannya dengan konsentrasi standar metil oleat di bawah ini adalah tabel standar HPLC.

Zat	Luas Area	Konsentrasi (mg/L)	Konsentrasi (mol/L)
Metil oleat	278236	100	0,29286

Yield wax ester didapatkan dengan menggunakan persamaan (3.3), yaitu:

$$\% \text{ yield wax ester} = \frac{C_{WEt=t}}{C_{AOt=0}} \times 100\%$$

C_{AO} adalah konsentrasi yang asam oleat yang digunakan pada awal reaksi, yaitu sebesar 1,479 mol/L